

Universidade Estadual de Maringá  
Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Física  
Programa de Pós Graduação em Física

**Raquel Dosciatti Bini**

SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO  
DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA  
E HIDROGÉIS MAGNÉTICOS  
PARA APLICAÇÕES NO  
TRATAMENTO DE CÂNCER

Orientador: **Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica**

**Maringá**

**18 de outubro de 2021**

RAQUEL DOSCIATTI BINI

**SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA  
E HIDROGÉIS MAGNÉTICOS PARA APLICAÇÕES NO TRATAMENTO DO  
CÂNCER**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora.

Aprovado em: Maringá, 29 de janeiro de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil  
Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tania Toyomi Tominaga  
Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO

---

Prof. Dr. Gustavo Sanguino Dias  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof. Dr. Ivair Aparecido dos Santos  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

B613s

Bini, Raquel Dosciatti

Síntese e funcionalização de nanopartículas de magnetita e hidrogéis magnéticos para aplicações no tratamento do câncer / Raquel Dosciatti Bini. -- Maringá, PR, 2021.  
82 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas,  
Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2021.

1. Nanopartículas. 2. Magnetita. 3. Hidrogél magnético. 4. Câncer - Tratamento. I.  
Cótica, Luiz Fernando, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências  
Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 23.ed. 530.41

*“Estou animada em receber o prêmio - levo muito a sério a responsabilidade de ser a quarta mulher a ganhar o prêmio Nobel (em física). Espero poder inspirar outras jovens mulheres para uma área que tem tantos prazeres, se você tem paixão pela ciência. Há muito para ser feito.”*

*Cientista e Professora Andrea Ghez, na coletiva de imprensa da divulgação do Prêmio Nobel 2020 de Física.*

# Agradecimentos

Aos meu Pais pelo amor e carinho incondicional, e pelo esforço, apesar das dificuldades, para que eu pudesse cursar o ensino superior e trilhar meu caminho até aqui. Junto a eles, agradeço ao meu irmão Rafael, que além de uma inspiração para mim, compartilhou seus conhecimentos científicos e contribuiu de forma ativa para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu companheiro Marcelo pelo amor e felicidade real, e por decidir compartilhar essa jornada da vida comigo. Eu te escolho todos os dias, para sempre!

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica pela compreensão, sugestões e ensinamentos para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos do laboratório GDDM, em especial ao Thiago, Denise, Eduardo, Ludmilla, Jaciele e Daniel pela ajuda e pelas conversas divertidas nas rodas de café. Agradeço também, as meninas da biotecnologia Karina e Elisa, pela ajuda e paciência, mas acima de tudo, pela amizade que construímos.

Aos queridos amigos e amigas que a Física me trouxe, mas que hoje ocupam um espaço enorme no meu coração.

A minha querida amiga Paula, que me recebeu de coração e braços abertos em Lyon-FR durante meu doutorado sanduíche. Além dos ensinamentos no laboratório, compartilhamos momentos, conversas e muitas risadas regadas a altas doses de café e tortas francesas.

Mes remerciements au Professeur Dr. Laurent David pour me souhaiter la bienvenue au laboratoire Imp à l'Université Claude Bernard Lyon 1, et de partager ses enseignements, ainsi que pour raconter des histoires merveilleuses et curiosités de la France autour d'un café.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Física - PFI, com os quais tive a oportunidade e o privilégio de aprender. Agradeço também a Mônica, pela paciência e prontidão para solucionar todas as minhas dúvidas.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento dessa Tese.

À CAPES pela bolsa concedida.

## Resumo

Nas últimas décadas, a busca por alternativas que reduzam os efeitos sistêmicos do tratamento de câncer se intensificou. O estudo de dispositivos nanométricos que utilizam materiais magnéticos em aplicações biomédicas, como liberação controlada de fármacos, hipertermia magnética e contraste para imagem de ressonância magnética, tem despertado grande interesse. Para essa finalidade, as nanopartículas (NPs) devem possuir algumas características fundamentais, como o comportamento superparamagnético a temperatura ambiente e uma superfície funcionalizada que garanta a biocompatibilidade ou biosseletividade. Dessa forma, neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas do óxido de ferro magnetita via método de coprecipitação. A modificação da superfície dos núcleos magnéticos foi realizada com três agentes diferentes: ácido oleico, quitosana e sílica. As amostras recobertas com quitosana e sílica foram funcionalizadas com o fármaco Doxorubicina para o estudo da viabilidade celular em células tumorais de mama (MCF-7). Por fim, as NPs foram incorporadas em hidrogéis de quitosana para a confecção de sistemas responsivos à aplicação de um campo magnético, com o objetivo de aliar ambas as técnicas terapêuticas, liberação controlada de fármacos e hipertermia magnética. As amostras foram caracterizadas pelas técnicas de difração de raios X, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica de transmissão, espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta e magnetização por amostra vibrante. Os resultados permitiram concluir que as modificações na superfície foram efetivas e garantiram uma melhor dispersão das NPs de magnetita, além de fornecer uma superfície ideal para futuras funcionalizações. As medidas magnéticas indicaram um caráter superparamagnético, o qual não foi influenciado pela presença da superfície orgânica promovidas pelo recobrimento. Os resultados de viabilidade celular mostraram que as NPs de magnetita modificadas conferiram menor citotoxicidade quando comparadas com elas sem recobrimento. A funcionalização com o fármaco mostrou que o efeito citotóxico foi maior quando comparado com as concentrações do fármaco livre, indicando uma possível internalização das NPs pelas células. Por fim, a incorporação das NPs de magnetita nos hidrogéis de quitosana produziu nanocompósitos com um aumento significativo das propriedades mecânicas dos hidrogéis aliadas a uma resposta magnética. Dessa forma, ambos hidrogéis magnéticos e NPs de magnetita funcionalizadas se mostraram aptas para serem aplicadas em protocolos de tratamento do câncer.

## Abstract

In the last decades, the search for alternatives that reduce the systemic effects in the treatment of cancer has intensified. The study of nanometric devices that use magnetic materials in biomedical applications, such as controlled drug release and magnetic hyperthermia and contrast for magnetic resonance imaging, has attracted attention. For this purpose, nanoparticles must have some fundamental characteristics, such as superparamagnetic behavior at room temperature and a functionalized surface to guarantee biocompatibility or bioselectivity. Therefore, in this work, nanoparticles of iron oxide magnetite were synthesized via coprecipitation method. The surface modification of the magnetic cores was carried out with three different agents: oleic acid, chitosan and silica. The samples coated with chitosan and silica were functionalized with Doxorubicin drug for the study of cell viability in breast tumor cells (MCF-7). Finally, the nanoparticles were incorporated into chitosan hydrogels to produce responsive systems to the application of a magnetic field, with the aim of combining both therapeutic techniques, controlled release of drugs and magnetic hyperthermia. The samples were characterized by X-ray diffraction techniques, Fourier transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, transmission electron microscopy, dynamic light scattering and zeta potential and magnetization by vibrant sample. The results allowed us to conclude that the changes in the surface were effective and guaranteed a better dispersion of the nanoparticles, in addition to providing a suitable surface for later functionalizations. Magnetic measurements indicated a superparamagnetic character, which was not influenced by the presence of the organic surface promoted by the nanoparticle coating. The cell viability results showed that the modified magnetite nanoparticles conferred less cytotoxicity when compared to the same ones without coating. The drug functionalization showed that the cytotoxic effect was greater when compared to the same concentrations of free drug, indicating a possible internalization of the nanoparticles by the cells. Finally, the incorporation of magnetite nanoparticles in chitosan hydrogels produced nanocomposites with a significant increase in the mechanical properties of hydrogels combined with a magnetic response. Thus, both magnetic hydrogels and functionalized magnetite nanoparticles proved to be suitable for application in cancer treatment protocols.

# Lista de Abreviaturas e Siglas

CHG	amostra sintetizada de hidrogel de quitosana 2,5% (m/m)
CHF1	amostra sintetizada de hidrogel de quitosana 2,5% (m/m) com 6,25% (m/m) de nanopartículas de magnetita
CHF2	amostra sintetizada de hidrogel de quitosana 2,5% (m/m) com 13,5% (m/m) de nanopartículas de magnetita
CHF3	amostra sintetizada de hidrogel de quitosana 2,5% (m/m) com 27% (m/m) de nanopartículas de magnetita
DA	degree of acetylation (grau de acetilação da quitosana)
DOX	doxorubicina
$Fe_3O_4$	amostra sintetizada de magnetita sem recobrimento
$Fe_3O_4/AO$	amostra sintetizada de magnetita com recobrimento de ácido oleico
$Fe_3O_4/SiO_2$	amostra sintetizada de magnetita com recobrimento de sílica
$Fe_3O_4/CH$	amostra sintetizada de magnetita com recobrimento de quitosana (DA:13%)
$Fe_3O_4/SiO_2/DOX$	amostra sintetizada de magnetita com recobrimento de sílica funcionalizada com DOX
$Fe_3O_4/CH/DOX$	amostra sintetizada de magnetita com recobrimento de quitosana funcionalizada com DOX
$Fe_3O_4/CHG$	amostra sintetizada de magnetita com recobrimento de quitosana (DA:0,4%)
$G$	módulo elástico
$G''$	módulo viscoso
H	campo magnético aplicado
$H_c$	campo magnético coercitivo

MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio
$M_s$	magnetização de saturação
$M_r$	magnetização remanente
NPMs	nanopartículas magnéticas
NPs	nanopartículas
SPION	superparamagnétic iron oxide nanoparticles
TEOS	tetraortosilicato
$\zeta$	potencial zeta

# Lista de Figuras

1.1	Ilustração das aplicações de NPMs na área de diagnóstico clínico e técnicas terapêuticas. [7] . . . . .	2
2.1	(a) Ilustração do movimento das paredes de domínio no sentido de $H$ aplicado e (b) ciclo de histerese completo com a indicação da $M_s$ , $M_r$ e $H_c$ [16].	5
2.2	Representação da energia de barreira em partículas monodomínio [19]. . . . .	6
2.3	Célula unitária cúbica de face centrada da estrutura cristalina do tipo espinélio da $Fe_3O_4$ . . . . .	8
2.4	Ilustração da molécula de ácido oleico. . . . .	10
2.5	Ilustração de NPMs com estrutura caroço/casca [6]. . . . .	10
2.6	Estrutura molecular da quitosana. . . . .	11
2.7	Ilustração de NPs multifuncionais [36]. . . . .	13
2.8	Estrutura química da doxorubicina e daunorrubicina [64]. . . . .	14
2.9	Ilustração da variação do $\Delta\mu_v$ , $\Delta\mu_s$ e $\Delta G$ em função do raio do núcleo (a) e do processo de nucleação e crescimento em função do tempo (b) [69]. . . . .	16
2.10	Modelo de micela reversa observada por Schulman [70]. . . . .	17
2.11	Ilustração da formação das micelas [73]. . . . .	18
2.12	Ilustração de microemulsões reversas para o recobrimento de nanopartículas com sílica. Na primeira rota, as NP são previamente sintetizadas (1A) e transferidas para microemulsões reversas estáveis preparadas pela agitação de solvente orgânico, água e surfactante (2A). Na segunda rota, ambas a solubilização (1B) e a reação dos precursores (2B) acontecem dentro da micela reversa, seguida pela hidrólise e condensação do TEOS (3). O envelhecimento e a lavagem levam à formação de núcleos com tamanhos e espessuras de revestimento que podem ser controlados experimentalmente (4) [37]. . . . .	20

2.13	Mecanismo mostrando a troca intermicelar para a formação tanto de nanopartículas como de estruturas caroço/casca pelo método de microemulsão por micela reversa. [7]. . . . .	20
2.14	Princípio das medidas oscilatórias. [81]. . . . .	23
4.1	Ilustração do esquema de síntese das NPs de magnetita por cobrecipitação adaptado da referência [13]. . . . .	26
4.2	Ilustração do esquema de síntese das NPs de magnetita por coprecipitação seguida da adição de ácido oleico adaptado da referência [13]. . . . .	27
4.3	Ilustração do esquema do recobrimento das NPs de magnetita com sílica pelo método de microemulsão reversa adaptado da referência [13]. . . . .	28
4.4	Ilustração do esquema de síntese das NPs de magnetita na presença de quitosana por coprecipitação adaptado da referência [13]. . . . .	28
4.5	Princípio do ensaio de citotoxicidade MTT [94]. . . . .	34
5.1	Difratogramas de raios X das amostras (a) $Fe_3O_4$ , (b) $Fe_3O_4/AO$ , (c) $Fe_3O_4/SiO_2$ e (d) $Fe_3O_4/CH$ . . . . .	37
5.2	Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras $Fe_3O_4$ com diferentes recobrimentos. Sendo os espectros em (a) $Fe_3O_4/AO$ e Ácido oleico puro (b) $Fe_3O_4/SiO_2$ e em (c) $Fe_3O_4/CH$ e quitosana pura. . . . .	38
5.3	Ilustração do quelante bidentado adaptado da referência [32]. . . . .	39
5.4	Representação esquemática da interação entre as moléculas de quitosana e as NPMs [101]. . . . .	40
5.5	Curvas termogravimétricas para as amostras (a) $Fe_3O_4$ , (b) $Fe_3O_4/AO$ e (c) $Fe_3O_4/CH$ . . . . .	41
5.6	Imagens das NPMs antes e após a realização do experimento de TGA. . . . .	42
5.7	Microscopia eletrônica de transmissão das NPs de magnetita sem recobrimento, amostra $Fe_3O_4$ (a,b), e com o recobrimento da superfície, amostras $Fe_3O_4/AO$ (c,d), $Fe_3O_4/SiO_2$ (e,f) e $Fe_3O_4/CH$ (g,h). . . . .	44
5.8	Histogramas de distribuição de tamanho das NPs de magnetita sem recobrimento, amostra $Fe_3O_4$ (a,b), e com o recobrimento da superfície, amostras $Fe_3O_4/AO$ (c,d), $Fe_3O_4/SiO_2$ (e,f) e $Fe_3O_4/CH$ (g,h). . . . .	45
5.9	Medida de magnetização ZFC-FC para a amostra $Fe_3O_4$ . . . . .	47
5.10	Curvas de Magnetização <i>vs</i> Campo Magnético das amostras $Fe_3O_4$ , $Fe_3O_4/AO$ , $Fe_3O_4/CH$ e $Fe_3O_4@SiO_2$ . O destaque ao lado direito da imagem corresponde às magnetizações em uma escala de baixo campo magnético. . . . .	47
5.11	Ensaio do MTT em células tumorais MCF-7 expostas as NPMs do Grupos 1 (a,b) e Grupo 2 (c,d). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0.05$ ). (— — —) Norma ISO 10993 – 5 : 2009. . . . .	49

5.12	Ensaio do MTT em células tumorais MCF-7 expostas as NPMs do Grupo 1 (a,b) e Grupo 2 (c,d). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0.05$ ). # Diferença estatisticamente significativa em relação a concentração de DOX correspondente ( $p < 0.05$ ). (— — —) Norma ISO 10993 – 5 : 2009. . . . .	51
5.13	Imagens de MEV de células MCF-7 incubadas por 48 h com diferentes concentrações das amostras $Fe_3O_4$ e $Fe_3O_4/CH$ , respectivamente. Sendo em (a) a amostra controle, (b,c) expostas a concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ e (d,e) 50 $\mu\text{g/mL}$ . Núcleo (Nu), Nanopartículas (NPMs), ( $\uparrow$ ) Rupturas no citoplasma. . . . .	53
5.14	Imagens de MEV de células MCF-7 incubadas por 48 h com diferentes concentrações das amostras $Fe_3O_4$ e $Fe_3O_4/SiO_2$ , respectivamente. Sendo em (a) a amostra controle, (b) DOX livre 10 $\mu\text{g/mL}$ , (c,d) expostas a concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ e (e,f) 50 $\mu\text{g/mL}$ . Núcleo (Nu), Nanopartículas (NPMs), ( $\uparrow$ ) Rupturas no citoplasma, ( $\Rightarrow$ ) Depressões no citoplasma, (**) Encolhimento da membrana. . . . .	55
5.15	Imagens de MEV de células MCF-7 incubadas por 48 h com 12,5 $\mu\text{g/mL}$ da amostra $Fe_3O_4/CH/DOX$ (a) e 10 $\mu\text{g/mL}$ da amostra $Fe_3O_4/SiO_2$ . Nanopartículas (NPMs), ( $\uparrow$ ) rupturas no citoplasma, ( $\Rightarrow$ ) depressões no citoplasma, (**) encolhimento da membrana. . . . .	56
5.16	Imagens dos hidrogéis preparadas, (a) $CHG$ , (b) $CHF1$ , (c) $CHF2$ e (d) $CHF3$ . . . . .	57
5.17	Difratogramas de raios X das amostras (a) $CHG$ , (b) $Fe_3O_4/CHG$ e (c) das amostras $CHF1$ , $CHF2$ e $CHF3$ . . . . .	58
5.18	Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras de quitosana pura $CHG$ , $Fe_3O_4$ e $Fe_3O_4/CHG$ . . . . .	59
5.19	Curvas termogravimétricas para as amostras da quitosana $CHG$ juntamente com s NPMs (a) $Fe_3O_4/CHG$ e os hidrogéis (b) $CHF1$ , $CHF2$ e $CHF3$ . . . . .	60
5.20	Micrografia eletrônica de transmissão (a) e distribuição de tamanho (b) da amostra $Fe_3O_4/CHG$ . . . . .	61
5.21	Imagem de MET-AR para a amostra $Fe_3O_4/CHG$ . As imagens ao lado esquerdo são ampliações para evidenciar os planos cristalinos paralelos. . .	62
5.22	Imagens de MEV para as amostras (a,b) $CHG$ , (c,d) $CHF1$ , (e,f) $CHF2$ e (g,h) $CHF3$ . . . . .	63
5.23	Variações dos módulos viscoso e elástico dos hidrogéis $CHG$ , $CHF1$ , $CHF2$ e $CHF3$ em função da frequência. . . . .	64

- 
- 5.24 Curvas de Magnetização *vs* Campo Magnético das amostras  $Fe_3O_4/CHG$ ,  $CHF1$ ,  $CHF2$  e  $CHF3$ . O destaque ao lado direito da imagem corresponde às magnetizações em uma escala de baixo campo magnético. . . . . 66
- 5.25 Fotografias da amostra de hidrogel CHF3 em água deionizada sob (a) ausência de um campo magnético e (b) presença de um campo magnético. . . 66

# Lista de Tabelas

5.1	Tamanho médio do cristalito estimado via fórmula de Scherrer. . . . .	37
5.2	Valores de $D_h$ , PDI e $\zeta$ para as amostras sintetizadas. . . . .	45
5.3	Valores de $M$ obtidos no experimento e de $M_n$ normalizados pela massa do recobrimento. . . . .	48
5.4	Bandas características no infravermelho para a amostra $Fe_3O_4/CHG$ . . .	59
5.5	Valores dos módulos $G'_e$ , $G''_e$ e $\tan(\delta)$ para as amostras de hidrogéis $CHG$ , $CHF1$ , $CHF2$ e $CHF$ . *DP é o desvio padrão relativo da medida. . . . .	65

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>4</b>
2.1	Nanopartículas magnéticas . . . . .	4
2.1.1	Propriedades magnéticas . . . . .	4
2.1.2	Nanopartículas de magnetita . . . . .	7
2.2	Revestimento das nanopartículas . . . . .	8
2.2.1	Ácido Oleico . . . . .	9
2.2.2	Sílica . . . . .	10
2.2.3	Quitosana . . . . .	11
2.3	Funcionalização da superfície das nanopartículas . . . . .	12
2.3.1	Doxorrubicina . . . . .	14
2.4	Métodos de síntese de nanopartículas . . . . .	15
2.4.1	Coprecipitação . . . . .	15
2.4.2	Microemulsões . . . . .	17
2.4.2.1	Recobrimento de nanopartículas via microemulsão reversa	19
2.5	Hidrogéis de quitosana . . . . .	21
2.6	Início dos estudos deste trabalho . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Parte Experimental</b>	<b>26</b>
4.1	Síntese das Nanopartículas de Óxido de Ferro . . . . .	26
4.2	Modificação da Superfície das Nanopartículas de Óxido de Ferro . . . . .	27
4.2.1	Superfície Hidrofóbica . . . . .	27
4.2.1.1	Recobrimento com ácido oleico . . . . .	27
4.2.2	Superfície Hidrofílica . . . . .	27
4.2.2.1	Recobrimento com sílica . . . . .	27
4.2.2.2	Recobrimento com quitosana . . . . .	28

4.3	Funcionalização da superfície das nanopartículas com Doxorubicina (DOX)	29
4.4	Preparação dos Hidrogéis Magnéticos de Quitosana . . . . .	29
4.4.1	Purificação da quitosana . . . . .	29
4.4.2	Recobrimento das nanopartículas com quitosana para incorporação nos hidrogéis . . . . .	30
4.4.3	Preparações dos Hidrogéis . . . . .	30
4.5	Caracterização das amostras de Nanopartículas e Hidrogéis Magnéticos . .	31
4.5.1	Difratometria de Raios X . . . . .	31
4.5.2	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier . . .	31
4.5.3	Análise Termogravimétrica . . . . .	32
4.5.4	Microscopia Eletrônica . . . . .	32
4.5.5	Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta . . . . .	32
4.5.6	Magnetometria de Amostra Vibrante . . . . .	32
4.5.7	Reologia . . . . .	33
4.6	Ensaio Biológico . . . . .	33
4.6.1	Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT . . . . .	33
4.6.2	Microscopia Eletrônica . . . . .	35
<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>36</b>
5.1	Síntese e Modificação da Superfície de Nanopartículas de Óxido de Ferro .	36
5.1.1	Difratometria de Raios X . . . . .	36
5.1.2	Espectroscopia no Infravermelho . . . . .	38
5.1.3	Análise Termogravimétrica . . . . .	40
5.1.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão . . . . .	43
5.1.5	Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta . . . . .	45
5.1.6	Magnetometria de Amostra Vibrante . . . . .	46
5.2	Ensaio Biológicos . . . . .	49
5.2.1	Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT . . . . .	49
5.2.2	Microscopia Eletrônica de Varredura . . . . .	52
5.3	Preparação de Hidrogéis Magnéticos de Quitosana . . . . .	56
5.3.1	Difratometria de Raios X . . . . .	57
5.3.2	Espectroscopia no Infravermelho . . . . .	58
5.3.3	Análise Termogravimétrica . . . . .	60
5.3.4	Microscopia Eletrônica De Transmissão e de Alta Resolução . . . .	61
5.3.5	Microscopia Eletrônica de Varredura . . . . .	62
5.3.6	Reologia . . . . .	64
5.3.7	Magnetometria de Amostra Vibrante . . . . .	65

---

<b>6</b>	<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>67</b>
6.1	Conclusões . . . . .	67
6.2	Perspectivas . . . . .	69
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>70</b>

## Introdução

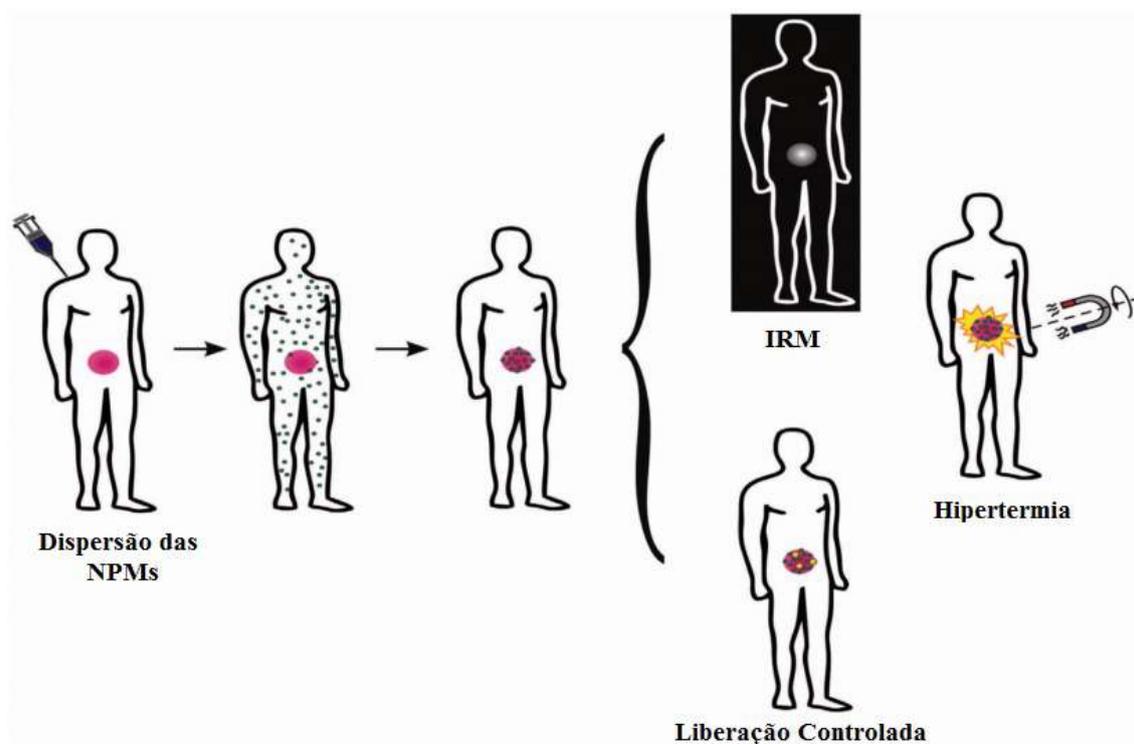
Nas últimas décadas, a classe de materiais obtidas em escala nanométrica de tamanho, os nanomateriais, tem despertado interesse e ganhado uma importância significativa, levando ao surgimento e consolidação de uma nova área de conhecimento, conhecida como ‘Nanociência e Nanotecnologia’ [1]. De maneira geral, a Nanociência estuda as relações fundamentais entre as propriedades físicas e os fenômenos dos materiais em escala nanométrica, e a Nanotecnologia pode ser entendida como uma tecnologia de design, fabricação e aplicações desses nanomateriais [2].

Essa área de conhecimento se baseia no fato de as propriedades dos materiais serem fortemente dependentes do tamanho das partículas que os constituem. Isso quer dizer que, abaixo de um determinado tamanho crítico as propriedades dos materiais (magnéticas, ópticas, elétricas, catalíticas, etc.) se tornam diferentes quando comparadas com seus correspondentes materiais massivos. Em vista disso, esses nanomateriais oferecem novas possibilidades de aplicação baseadas nessas novas propriedades únicas [1].

Com os avanços da nanotecnologia, o estudo de nanopartículas para o tratamento de doenças se ampliaram e aprofundaram, principalmente como terapias alternativas para o tratamento do câncer [3]. O câncer é uma doença maligna que acontece devido as células se dividirem rapidamente e se espalharem de forma anormal, invadindo tecidos adjacentes ou órgãos a distância. O processo de formação das células cancerosas é chamado de carcinogênese e pode ocorrer de forma rápida ou lenta, dependendo do tipo de câncer, para a proliferação das células resultarem em um tumor visível [4]. No Brasil, para o biênio 2019-2020, estima-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, 420 mil excluindo os casos de pele não melanoma. O mais frequente em homens é o câncer de próstata (31,7%) e em mulheres, o câncer de mama (29,5%). Essas estimativas são semelhantes ao de países desenvolvidos, entretanto o perfil crescente, é reflexo das desigualdades sociais de países que estão em desenvolvimento [5]. A quimioterapia convencional é a principal forma de tratamento do câncer, entretanto, não afeta somente as células e órgãos cancerosos, mas de forma sistêmica, as células saudáveis do organismo. Dessa forma, as nanopartículas

podem ser usadas para desenvolver estratégias de terapia localizada e seletiva que atuam somente em alvos desejados, e assim, minimizar os efeitos colaterais [3].

Embora, inúmeros nanomateriais estejam sendo estudados, a classe de nanopartículas magnéticas (NPMs) têm despertado interesse estratégico, principalmente por ser a maior classe de materiais em nanoescala com perspectivas promissoras para transformar os atuais diagnósticos clínicos e técnicas terapêuticas. As NPMs quando injetadas no corpo podem ser conduzidas por um campo magnético externo até um lugar de interesse, e assim atuar como um veículo para entrega de agentes terapêuticos. Podem ser usadas como agentes de contraste em imagem de ressonância magnética (IRM) devido a habilidade de aumentarem a relaxação do próton. Além disso, as NPMs podem ser aquecidas quando sujeitas a um campo magnético AC, abrindo possibilidades para tratamentos de câncer por hipertermia [6, 7], Figura 1.1 .



**Figura 1.1:** Ilustração das aplicações de NPMs na área de diagnóstico clínico e técnicas terapêuticas. [7]

Nesse cenário, explorando as propriedades magnéticas em nanoescala, como o superparamagnetismo, a síntese de NPMs com formatos e composições químicas variadas vem sendo continuamente propostas e avaliadas para aplicações biomédicas. Atualmente, os avanços da nanotecnologia permitem uma engenharia precisa para a fabricação de partículas, assim, fatores como a composição, tamanho, morfologia e superfície química podem ser adaptados, não só para melhorar as propriedades magnéticas, mas também o efeito do comportamento das nanopartículas *in vivo* [6].

As NPMs para aplicações biomédicas são basicamente compostas por um núcleo de nanopartículas inorgânicas e uma superfície de recobrimento biocompatível, sendo essa

última a responsável por promover uma maior estabilidade das partículas em condições fisiológicas e assim, aumentar seu tempo de circulação sanguíneo [6]. Adicionalmente, com uma superfície química adequada, é possível funcionalizar esses sistemas com moléculas de fármacos, compostos fluorescentes e biomoléculas específicas possibilitando inúmeras aplicações [6, 8].

Adicionalmente as NPMs, hidrogéis vem sendo extensivamente estudados em biomedicina, devido possuírem uma rede poliméricas porosa e hidrofílica, com estrutura íntegra, comportamento de entumescimento de água e propriedades mecânicas que fornecem um ambiente físico para a adesão e proliferação de células. Esses sistemas podem ser usados como lentes de contatos, em engenharia de tecido e *scaffolds*, cicatrização de feridas e como sistemas de liberação de fármacos [9]. Esses hidrogéis convencionais, exibem suas propriedades de entumescimento e desintegração ligadas à disponibilidade de água. De forma contrária, a classe de hidrogéis inteligentes ou estímulo-responsivos possui propriedades adicionais, que estão relacionadas a fatores do meio, como um estímulo externo que provoca mudanças na sua organização [10]. Em particular, a incorporação de NPMs na matriz dos hidrogéis para produzir nanocompósitos com propriedades magnéticas responsivas tem recebido avanços significativos. Nesses casos, um campo magnético pode ser usado para induzir deformações na matriz de hidrogéis termosensíveis e provocar a liberação controlada de fármacos que, por sua vez, pode ser combinada com a terapia por hipertermia [11, 12].

Nesse contexto, os desafios atuais para o uso de NPMs em aplicações biomédicas se encontram no método de preparação das amostras. Para a maioria das aplicações, é fundamental que as nanopartículas sintetizadas possuam tamanho e formato uniforme, com uma superfície química biocompatível e que facilite a funcionalização de moléculas ou agentes terapêuticos, além de apresentarem comportamento superparamagnético a temperatura ambiente. Atualmente, formulações de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPION) são as mais empregadas em aplicações com propósito de diagnóstico clínico, terapêutico e teranóstico, sendo esse último o termo utilizado quando se combina o diagnóstico e a terapia [13].

Em vista disso, o intuito deste trabalho é sintetizar NPMs de óxido de ferro superparamagnéticas via método de coprecipitação, que é uma rota simples, de baixo custo e que não produz resíduos químicos. Em busca de produzir NPMs que sejam biocompatíveis para aplicações no tratamento do câncer, modificações na superfície das NPMs serão realizadas, melhorando a interação entre a superfície e o meio, sendo esse um passo importante para a compreensão da interface nano-bio. Paralelamente, estudaremos a incorporação dessas NPMs em hidrogéis de quitosana como potenciais dispositivos para aplicações biomédicas.

## Revisão Bibliográfica

Esta revisão bibliográfica foi organizada de forma a apresentar alguns aspectos importantes sobre as nanopartículas de magnetita, como suas propriedades magnéticas e engenharia da superfície que devem ser considerados para aplicações em biomedicina. Em seguida, uma breve introdução sobre os métodos de síntese que foram utilizados nesse trabalho. Por final, alguns aspectos importantes sobre a preparação de hidrogéis, em particular o de quitosana.

### 2.1 Nanopartículas magnéticas

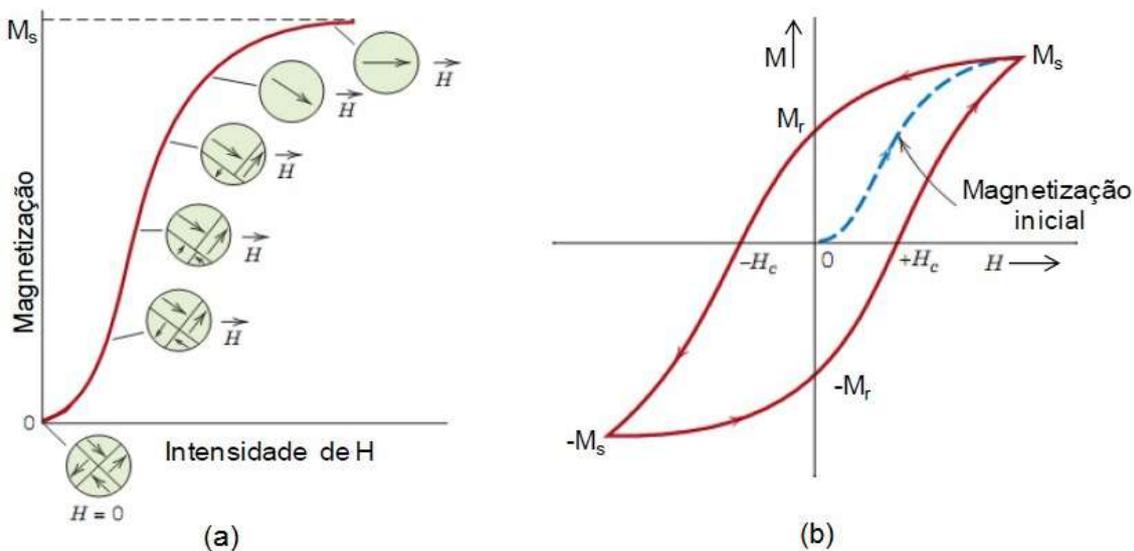
#### 2.1.1 Propriedades magnéticas

A teoria microscópica do magnetismo está relacionada com a mecânica quântica do momento angular eletrônico, visto que a principal fonte de momento magnético nos sólidos está associada aos elétrons. O elétron é uma partícula elementar e possui duas fontes distintas de momento angular, sendo uma associada ao momento orbital e a outra ao *spin*. Em termos do modelo de Bohr, o momento orbital é descrito como o movimento dos elétrons ao redor de um núcleo, em órbitas circulares e sob a influência do potencial de Coulomb, já o momento angular de *spin*, é um número quântico intrínseco do elétron, com valor  $s = \frac{1}{2}$  [14]. Nesse caso, o elétron se comporta como se, de algum modo, estivesse rodando sob seu próprio eixo [15].

O momento magnético atômico total é dado pela soma de todos os momentos eletrônicos, os quais podem ocorrer de duas formas diferentes. Os momentos magnéticos no átomo podem se orientar de forma a se cancelarem mutuamente levando a um momento magnético atômico total igual a zero. Átomos nessa condição são conhecidos como diamagnéticos. Por outro lado, o cancelamento pode ocorrer apenas de modo parcial, gerando um momento magnético atômico resultante. Materiais formados por esse arranjo de átomos são classificadas como paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos e antiferromagnéticos, sendo que a diferença entre eles é decorrente da natureza das interações

de acoplamento entre os elétrons na rede cristalina [15].

Em materiais ferro- ou ferrimagnéticos, existem regiões denominadas de domínios, onde os momentos magnéticos se encontram paralelamente alinhados em uma determinada direção. A mudança na direção dos momentos magnéticos nesses domínios ocorre de maneira gradual em uma região de transição conhecida por paredes de domínio. Esses materiais, variam sua magnetização pelo mecanismo de movimento das paredes de domínio, Figura 2.1(a). À medida que um campo magnético externo  $\mathbf{H}$  é aplicado, os domínios se orientam na direção do campo até alcançar a magnetização de saturação  $M_s$ . Quando a direção do campo é revertida, a medida que  $\mathbf{H}$  diminui, ocorre um efeito de histerese, Figura 2.1(b). Assim, para  $H$  igual a zero, existe uma magnetização residual, conhecida como magnetização remanente  $M_r$ , indicando que na ausência de campo aplicado o material permanece magnetizado. Para anular essa magnetização residual, um campo coercitivo,  $H_c$ , com direção oposta ao original, deve ser aplicado. Continuando com a aplicação do campo, obtém-se a magnetização de saturação no sentido inverso. Revertendo mais uma vez o campo  $\mathbf{H}$  até a saturação inicial, o ciclo de histerese fica completo [16].



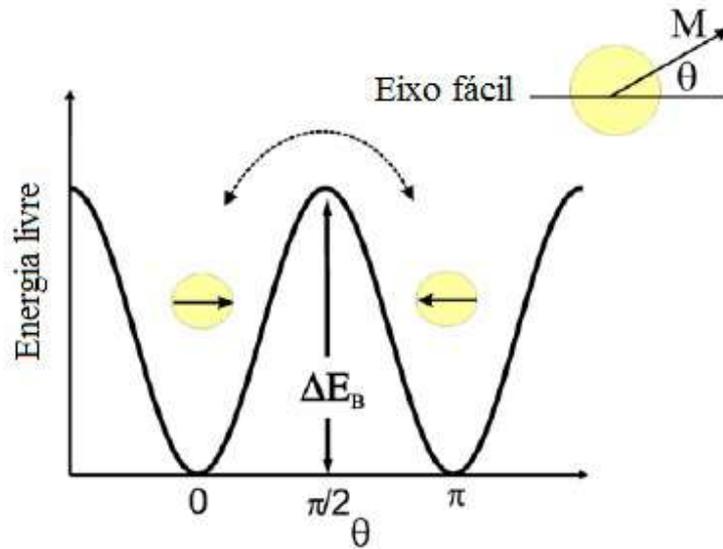
**Figura 2.1:** (a) Ilustração do movimento das paredes de domínio no sentido de  $H$  aplicado e (b) ciclo de histerese completo com a indicação da  $M_s$ ,  $M_r$  e  $H_c$  [16].

Duas características importantes dominam as propriedades magnéticas dos materiais conforme as partículas que os constituem diminuem de tamanho, conhecidas como efeitos de tamanho e de superfície. Efeitos de tamanho podem resultar, por exemplo, do confinamento quântico dos elétrons, enquanto que efeitos de superfície estão relacionados a quebra de simetria da estrutura do cristal nas fronteiras de cada partícula [17]. Um efeito de tamanho muito estudado em sistemas de partículas pequenas é o superparamagnetismo, desde que a energia anisotrópica, a qual representa a preferência de uma amostra de se magnetizar em uma determinada direção conhecida como eixo de fácil magnetização, seja proporcional ao volume partícula [18].

Em materiais multidomínios, conforme o volume das partículas diminuem, o tamanho dos domínios e a largura das paredes desses domínios são reduzidos, modificando sua estrutura interna. Abaixo de um volume crítico, as partículas necessitam de mais energia para formar os domínios magnéticos do que para suportar a energia de um estado de domínio único ou monodomínio [18]. Assim, como não há paredes de domínios para movimentar, a reversão da magnetização, neste tipo de partículas, ocorre pela rotação do *spin*. No equilíbrio térmico, a magnetização resultante por partícula aponta na direção que minimiza a energia anisotrópica total. Assim, assumindo um caráter uniaxial, a energia magnética, na ausência de um campo magnético aplicado, pode ser expressada pela Equação 2.1,

$$E_B = KV \sin^2 \theta, \quad (2.1)$$

onde  $V$  é o volume da partícula,  $K$  é a constante anisotrópica e  $\theta$  é o ângulo entre o momento magnético  $\mathbf{M}$  e o eixo fácil magnetização. A dependência da energia magnética  $E_B$  e  $\theta$  é apresentada graficamente na Figura 2.2. Assim, para que ocorra a reversão da magnetização, a energia de barreira  $KV$  deve ser sobreposta. Assim, na ausência de uma perturbação externa, o momento magnético da partícula pode ficar em qualquer dos dois estados de equilíbrio, isto é, em  $\theta = 0$  e  $\theta = \pi$ .



**Figura 2.2:** Representação da energia de barreira em partículas monodomínio [19].

Conforme o tamanho das partículas é reduzido, é comum ocorrerem flutuações térmicas capazes de produzirem perturbações que levam a sobreposição da barreira de energia, resultando na espontânea reversão da magnetização. A medida que  $T$  aumenta, a energia térmica  $k_b T$  se torna comparável a energia de barreira  $E_B$ , e acima de um certo valor de  $T$ , a excitação térmica induz rápidas flutuações do momento magnético da partícula quando comparado com o tempo de observação. Como consequência, a magnetização de

um conjunto de partículas pode ser descrito pelo modelo paramagnético. Entretanto, diferentemente de um paramagneto normal, o momento magnético da partícula se comporta como um *super-spin* que se reverte coerentemente na direção anisotrópica. Materiais com essa característica são classificados como superparamagnéticos e não apresentam curva de histerese, ou seja, ambos  $M_r$  e  $H_c$  são zero, resultando na perda da magnetização na ausência de um campo aplicado. Além disso, as curvas de magnetização medidas a diferentes temperaturas se sobrepõem quando plotadas em função de  $\frac{H}{T}$  [15, 18, 20].

O tempo de relaxação ( $\tau$ ) do momento magnético entre esses dois estados de equilíbrio é dado pela expressão de Néel-Brown, Equação 2.2, onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $\tau_0 \approx 10^{-9}$  s,

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right). \quad (2.2)$$

Se o momento magnético da partícula se reverte em tempo menores que o tempo característica de medida ( $t_m$ ),  $\tau < t_m$ , o sistema está no regime superparamagnético, caso contrário, para  $\tau > t_m$ , o sistema está no regime de bloqueio. Esses dois regimes são separados pela temperatura de bloqueio,  $T_B$ , a qual é calculada usando o tempo da janela de medida que, para uma medida experimental com um magnetômetro, é aproximadamente  $t_m = 100$  s, e é expressada pela Equação 2.3 [15, 17, 18],

$$T_B = \frac{KV}{25k_B}. \quad (2.3)$$

Essa propriedade superparamagnética é uma vantagem significativa para aplicações biomédicas, especialmente em experimentos *in vivo*, por permitir que as partículas mantenham sua estabilidade coloidal evitando que se aglomerem no organismo na ausência de um campo magnético externo [6].

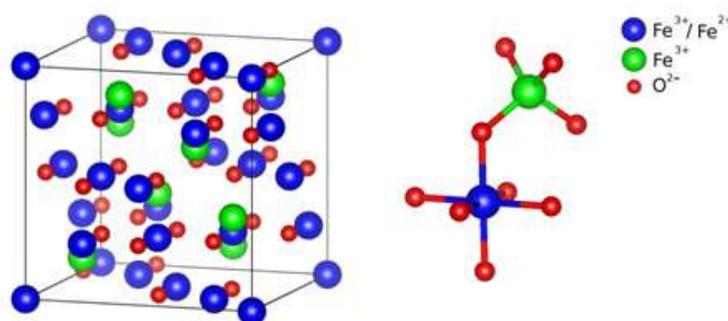
Outra consequência que resulta da redução do tamanho das partículas é a elevada razão superfície/volume de átomos na partícula, os quais resultam em pronunciados efeitos de superfície, tais como *spins* não colineares, comportamento *spin-glass* ou *spins* inclinados, os quais podem influenciar as propriedades magnéticas do material. Geralmente, valores de  $M_s$  de nanopartículas são menores do que seus correspondentes materiais em *bulk* [6, 17].

### 2.1.2 Nanopartículas de magnetita

Há uma diversidade de materiais que podem ser utilizados como núcleo magnético para a aplicação de sistemas de NPMs em biomedicina, como por exemplo, os formadas por ferro puro, ligas de  $CoPt_3$  e  $FePt$  e óxidos de ferro. Entre os óxidos de ferro, as nanopartículas coloidais de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) ou maguemita ( $\gamma - Fe_2O_3$ ) têm sido extensivamente estudadas devido possuírem, além do fenômeno magnético em nanoescala como o superparamagnetismo, biocompatibilidade e a facilidade de se degradarem em

seus componentes não tóxicos de ferro e oxigênio [6, 21].

A  $Fe_3O_4$  é um óxido de ferro misto que faz parte do grupo das ferritas, os quais são caracterizados pela fórmula estrutural  $MO.Fe_2O_3$ , onde M é um íon metálico divalente. É um material ferrimagnético a temperatura ambiente, possuindo uma magnetização permanente resultante da existência de interações de super-troca antipareladas entre os momentos de *spins* dos íons metálicos adjacentes, no caso  $Fe^{3+}$  e  $Fe^{2+}$ , mediadas pelo íon  $O^{2-}$  [15, 16]. Sua estrutura cristalina é do tipo espinélio inversa, com célula unitária cúbica de face centrada e parâmetro de rede  $a = 0,839\text{ nm}$ . Nesse tipo de estrutura, os íons metálicos  $Fe^{3+}$  são igualmente divididos entre os sítios tetraédricos, A, e octaédricos, B, enquanto que os íons  $Fe^{2+}$  ocupam apenas o sítio B. Na Figura 2.3, é possível visualizar as sequências das camadas de Fe- e O- ao longo da direção [111] (esquerda), e o arranjo dos sítios tetraédricos e octaédricos pelo modelo bola e palito (direita) [22].



**Figura 2.3:** Célula unitária cúbica de face centrada da estrutura cristalina do tipo espinélio da  $Fe_3O_4$ .

## 2.2 Revestimento das nanopartículas

O grande desafio associado às aplicações de sistemas de NPMs em diagnóstico de imagem ou como ferramenta terapêutica é o seu comportamento *in vivo*. A eficiência desses sistemas é frequentemente comprometida pelo sistema reticuloendotelial (SRE)<sup>1</sup> que faz o reconhecimento e depuração dessas NPMs antes de chegarem nos tecidos alvos, e também, por uma falta de habilidade em superar algumas barreiras biológicas, como o endotélio vascular<sup>2</sup> ou a barreira hematoencefálica<sup>3</sup>. Dessa forma, o destino das NPMs por administração intravenosa é altamente dependente de suas propriedades físico-químicas como, tamanho, morfologia, carga e superfície química, pois essas afetam diretamente sua subsequente biodistribuição e farmacocinética<sup>4</sup>. Em vista disso, novas formulações vem

<sup>1</sup>O SRE é constituído por células reticuloendoteliais e ou macrófagos. Possuem a função de eliminar resíduos e impurezas do sangue.

<sup>2</sup>É uma camada de células finas que reveste a parte interna dos vasos sanguíneos. Atua como uma barreira de difusão passiva entre os elementos do sangue circulante e o tecido intersticial [23].

<sup>3</sup>É um importante componente que conecta o Sistema Nervoso Central aos demais tecidos periféricos, além de regular e filtrar substâncias neurotóxicas presentes no sangue, que possam tentar ultrapassar essa barreira [24].

<sup>4</sup>O estudo do destino dos fármacos no organismo após sua ingestão.

sendo adotadas para a preparação de NPMs com diferentes núcleos, novos revestimentos e funcionalização da superfície, que possam aumentar o tempo de circulação sanguínea desses sistemas e assim, serem capazes de atingir os tecidos alvos [6, 21].

O revestimento da superfície é uma etapa muito importante quando se utilizam NPMs para aplicações biomédicas. Apesar de não serem atraídas magneticamente entre si, devido ao fenômeno superparamagnético, NPs em geral, possuem a tendência de se aglomerarem devido a sua grande energia de superfície. Existem dois métodos de estabilização coloidal que podem diminuir as interações entre partículas, a estabilização eletrostática e a estérica. A primeira, resulta da repulsão entre as cargas da superfície das NPMs, entretanto, este tipo de estabilização não é adequado para prevenir a agregação em soluções biológicas devido a presença de sais ou outros eletrólitos que podem neutralizar a carga da superfície. Além disso, após a injeção intravenosa, a superfície das NPMs fica sujeita a adsorção de proteínas plasmáticas, ou opsonização<sup>5</sup>, como primeiro passo para sua depuração pelo SRE [6].

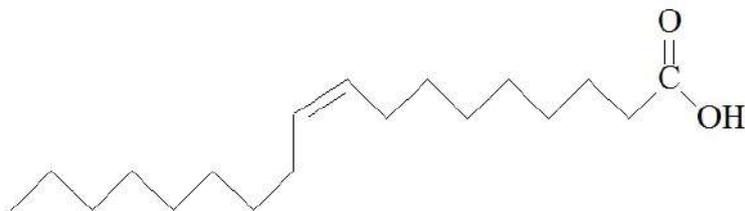
Por outro lado, os revestimentos poliméricos fornecem uma barreira estérica, que previne a aglomeração das NPMs, fornece grupos funcionais para a conjugação de moléculas de fármacos ou anticorpos específicos, além de poder limitar a interação das NPMs com células não específicas. Adicionalmente, esses tipo de revestimento tem a capacidade de aprimorar a farmacocinética, liberação endossomal e o comportamento de carregamento e liberação de fármacos das NPMs [21]. Vários materiais de revestimento vem sendo usados tanto para estabilizar como para funcionalizar as NPMs, como os polímeros naturais e sintéticos de dextrana, quitosana, poly(ethyleneglycol) (PEG) e poly(vinyl alcohol) (PVA), materiais inorgânicos como sílica e ouro, além de lipossomos e surfactantes de cadeia longa [25–32].

### 2.2.1 Ácido Oleico

O revestimento de NPMs com surfactantes como o ácido oleico, resulta em um recobrimento hidrofóbico, uma vez que os grupos polares da cadeia carbônica estão fortemente ligados a superfície das partículas. Esse tipo de recobrimento tem sido empregado com a finalidade de prevenir e/ou diminuir os aglomerados de partículas, resultando em sistemas monodispersos e uniformes [33,34]. O ácido oleico é caracterizado por possuir um grupo carboxílico, (-COOH), ligado a uma cadeia carbônica insaturada, com uma cauda C18 e uma dupla ligação *cis* no meio, o que proporciona uma torção na cadeia, Figura 2.4. Essa torção é essencial para a estabilização de sistemas de NPMs, pois favorece a solvatação completa da cadeia carbônica pelo solvente apolar, levando-as a uma estabilização por repulsão estérica [35].

---

<sup>5</sup>É um processo que facilita a ação do sistema imunológico em fixar opsoninas ou fragmentos do complemento na superfície de partículas sólidas ou microorganismos que são estranhos ao corpo, permitindo o reconhecimento e posterior ingestão pelas células fagocitárias.



**Figura 2.4:** Ilustração da molécula de ácido oleico.

## 2.2.2 Sílica

Estruturas do tipo caroço/casca, Figura 2.5, que utilizam materiais biocompatíveis, como sílica ou ouro, para encapsular as NPMs, têm se tornado uma abordagem muito explorada, pois essas cascas fornecem uma proteção contra a degradação química dos núcleos magnéticos, como também, previnem que componentes tóxicos possam ser liberados no organismo [6, 17]. Esta boa biocompatibilidade da casca irá evitar efeitos colaterais imunofisiológicos indesejáveis *in vivo* e facilitar a rápida depuração das NPMs do corpo [36].



**Figura 2.5:** Ilustração de NPMs com estrutura caroço/casca [6].

O uso da sílica como revestimento de NPMs é uma opção atraente pois oferece alta estabilidade em meio aquoso, é quimicamente inerte e opticamente transparente [37]. Além disso, esse recobrimento estabiliza as NPMs de duas formas diferentes. A primeira é devido a sílica ser carregada negativamente e com isso, aumentar as repulsões coulombianas, e a outra é devido a casca de sílica blindar as interações de dipolo magnético. A presença dos grupos silanos na superfície da sílica é uma vantagem interessante, pois esses podem reagir com álcoois ou agentes de acoplamento de silano e produzir dispersões estáveis, além de promover sítios de ancoragem para ligações covalentes com biomoléculas ou agentes terapêuticos [38, 39].

Alguns dos precursores de sílica, como os alcóxidos tetraetilortosilicato (TEOS) e 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTS) possuem fórmula geral  $Si(OR)_4$ , onde R é um grupo alquil,  $C_xH_{2x+1}$ . Esses precursores reagem com as NPMs por meio de reações de hidrólise e condensação. As reações de hidrólise substituem os grupos alcóxidos (RO) por grupos

hidroxil (OH), e as reações de condensação envolvendo o grupo silano são substituídas pela ligação  $Si - O - Si$ , com a eliminação de etanol ou água. Vale destacar que os dois processos ocorrem de forma simultânea [40]. As reações entre os grupos alcóxido e a superfície das NPMs, as quais contêm grupos (OH), ocorrem por meio de ligações de hidrogênio, entretanto, quando aquecidas, evoluem em parte, para ligações covalentes [41].

### 2.2.3 Quitosana

A quitina é um dos materiais orgânicos mais produzido anualmente por biossíntese depois da celulose, e é um importante constituinte do exoesqueleto de insetos, crustáceos e moluscos, podendo ser encontrada também, em alguns fungos [42]. A N-desacetilação da quitina em meio básico produz seu principal derivado, a quitosana. A quitosana é um material versátil e com muitas possibilidades de aplicações na área biomédica e de biotecnologia, por ser um polímero natural não tóxico, biodegradável e estável [43]. Ambas pertencem a uma classe de copolímeros lineares, sendo sua estrutura química composta por unidades de 2 - acetamino - 2 - desoxi - D - glicopiranoose e 2 - amino - 2 - desoxi - D - glicopiranoose unidos por ligações glicosídicas  $\beta(1 \rightarrow 4)$  de forma aleatória, Figura 2.6 [44].

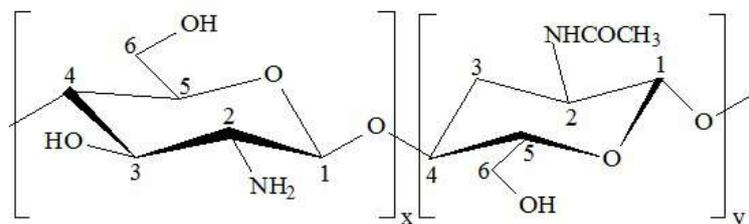


Figura 2.6: Estrutura molecular da quitosana.

Na obtenção da quitosana, os grupos N-acetil ( $-NHCOCH_3$ ) são convertidos em grupos amino ( $-NH_2$ ) resultando em quantidades diferentes de unidades acetiladas e desacetiladas [45]. Em geral, quando o grau de N-desacetilação da quitina é maior que 50%, a estrutura é considerada quitosana [46]. As condições usadas na desacetilação resultam em quitosanas com grau de desacetilação (DD) entre 50 e 98% e massa molecular (Mw) entre  $5 \times 10^4$  Da e  $2 \times 10^6$  Da. As propriedades físico-químicas e biológicas da quitosana são diretamente afetadas por esses parâmetros [47].

A quitosana apresenta excelentes propriedades biológicas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, que oferecem oportunidades para amplas aplicações, principalmente na área biomédica e farmacêutica, atuando na engenharia e regeneração de tecidos, sistemas de liberação de fármacos e terapia de genes [48–51]. Na área agrícola, pode ser aplicada na estimulação do crescimento das plantas e na liberação de nutrientes e fertilizantes no solo, além de trazer benefícios para o tratamento de águas e resíduos por meio da redução de metais e de odor. Atua ainda na área de cosméticos e alimentícia

com tratamentos para acne e suplementação para as unhas e como conservante e protetor antibacteriano e fungicida para frutas [46, 52]. Devido essa versalidade de aplicações, a quitosana pode ser preparada na forma de hidrogéis, filmes, nanopartículas e fibras.

A quitosana é um material facilmente solúvel em soluções de ácidos diluídos ( $pH < 6$ ), devido a protonação dos grupos aminos ( $-NH_3^+$ ) que se tornam positivamente carregados, o que a faz um polieletrólito catiônico solúvel em água. Em contrapartida, o aumento do pH acima de 6 faz com que o polímero perca sua carga e se torna insolúvel. Assim, a transição solúvel - insolúvel ocorre para valores de pKa com pH entre 6 e 6,5. Como o valor do pKa é dependendo do DD, a solubilidade também se torna dependente do DD. Além disso, a Mw também afeta significativamente a solubilidade da quitosana. Isso faz com que outras propriedades se tornem dependentes desses parâmetros como, a viscosidade, biodegradabilidade e citocompatibilidade [47, 48].

O controle da taxa de degradação da quitosana é essencial para aplicações biomédicas. Estudos mostram que a taxa de degradação é inversamente proporcional ao DD e a Mw. Uma alta taxa de degradação da quitosana pode resultar em uma resposta inflamatória indesejada devido ao acúmulo de aminosacarídeos, por outro lado, um valor alto de DD resulta em uma resposta mínima devida a baixa taxa de degradação. Dessa forma, dependendo da aplicação desejada, esses parâmetros devem ser cuidadosamente modulados. Em um meio fisiológico, com condições adequadas, a quitosana pode ser degradada tanto pela enzima lisozima como por quitinases encontradas no sangue ou na flora intestinal [48].

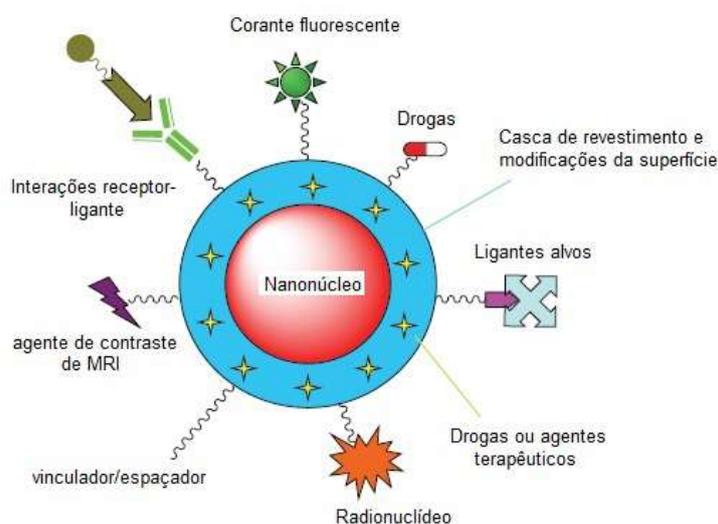
Adicionalmente, a quitosana contém três grupos reativos em sua estrutura, os grupos aminos na posição  $C - 2$  e os álcoois primário e secundário nas posições  $C - 3$  e  $C - 6$ , respectivamente, os quais podem ser usados em reações de reticulações e modificações químicas para a produção de derivados funcionais com propriedades melhoradas e ampliando as aplicações [45, 52, 53].

## 2.3 Funcionalização da superfície das nanopartículas

A possibilidade de conjugar à superfície das NPMs agentes de direcionamento, como anticorpos, proteínas, aptâmeros, entre outros, permite melhorar a eficiência da entrega desses sistemas aos alvos desejados devido a especificidade dos ligantes. Além disso, agentes quimioterápicos e fluorescentes também podem ser incorporados ao sistema, resultando em dispositivos localizados de liberação de fármacos e imageamento [21, 36]. Vários trabalhos vêm sendo reportados na literatura utilizando sistemas de NPMs superparamagnéticas de óxido de ferro conjugadas a biomoléculas para células alvo específicas. Como exemplo, a funcionalização com ácido fólico para a detecção de células cancerosas de mama pela superexpressão do receptor folato, e a conjugação do aptâmero A10 RNA demonstrando alta eficiência e especificidade na detecção de células de câncer na próstata. Ambas aliadas ao monitoramento por imagem por ressonância magnética promovido pelo

aumento do contraste negativo observado nas NPMs [54, 55].

A falta de ligantes específicos nos quimioterápicos com células tumorais alvo faz com que a integração de agentes de direcionamento se torne necessária para minimizar efeitos colaterais indesejados e, conseqüentemente, melhorar os dispositivos de entrega de fármacos. Com isso, formulações contendo NPMs e quimioterápicos como doxorrubicina (DOX) e paclitaxel (PTX), vem sendo aplicadas em terapias para o tratamento do câncer [56–59]. Adicionalmente, essas formulações podem ainda ser conjugadas com agentes de imagem fluorescentes como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a rodamina para o monitoramento da internalização nas células [28, 60–62]. A Figura 2.7 resume as principais estratégias de bioconjugação para a funcionalização da superfície das NPMs.



**Figura 2.7:** Ilustração de NPs multifuncionais [36].

Os métodos utilizados para a conjugação dessas moléculas na superfície das NPMs consistem nas estratégias de ligações covalentes ou interações físicas, e o que determina a escolha de tais métodos, em parte, são as propriedades químicas e os grupos funcionais achados na superfície das NPMs e do ligante que será conjugado. A ligação deve ocorrer sem comprometer a funcionalidade das biomoléculas ou agentes terapêuticos [21]. Ligações covalentes podem ser formadas especificamente entre as biomoléculas conjugadas e os grupos funcionais na superfície das NPMs, tipicamente, ácidos carboxílicos, grupo aminos e tióis, e normalmente, são ligações fortes e estáveis. Ligações diretas entre os grupos funcionais das NPMs e ligantes reativos também podem ser formadas. Entretanto, a eficiência desse tipo de química é variável, sendo adequada para moléculas pequenas. Uma alternativa é adicionar a reação moléculas para interligar os grupos envolvidos ou ainda realizar uma modificação na biomolécula, que não são naturalmente reativas. Isso torna a tarefa desafiadora, uma vez que cuidados devem ser tomados para a biomolécula não perder sua funcionalidade. Interações físicas consistem de interações eletrostáticas, hidrofílicas/hidrofóbicas e de afinidade. Sua química possui algumas vantagens únicas

que incluem, rápida velocidade de reação, alta eficiência e nenhuma necessidade de etapas intermediárias de modificações [21].

### 2.3.1 Doxorubicina

A quimioterapia é uma abordagem clínica adicional ao tratamento de câncer, que tem como objetivo a cura ou a sobrevivência prolongada das pessoas que são atingidas pela doença. Entre os fármacos disponíveis, os antibióticos pertencentes a família das antraciclina são os mais utilizados. Na década de 60, as duas primeiras antraciclina isolados de culturas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* foram a doxorubicina (DOX) e a daunorrubicina (DNR), Figura 2.8 [63, 64].

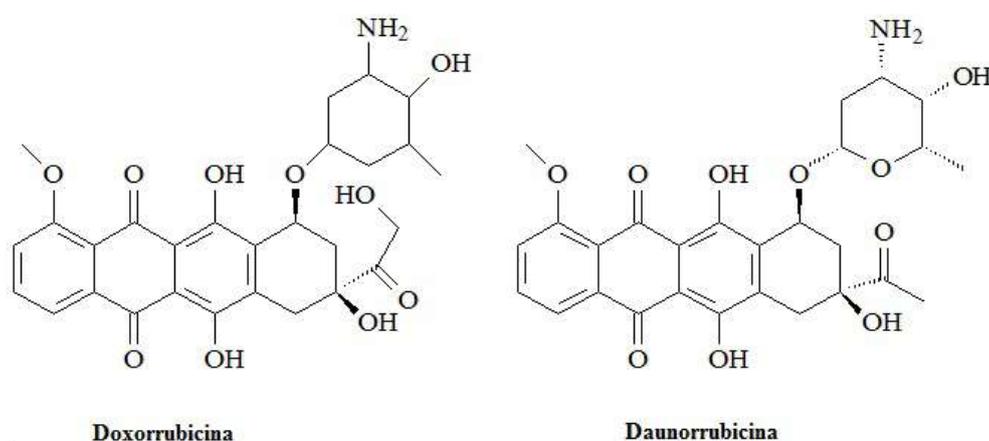


Figura 2.8: Estrutura química da doxorubicina e daunorrubicina [64].

A DOX é um dos quimioterápico mais potentes que existe atualmente, podendo agir sozinho ou em combinação com outros agentes. Sua atividade antitumoral é atribuída a capacidade da DOX de se intercalar na hélice do DNA ou se ligar de maneira covalente à enzimas que envolvem a replicação e transcrição do DNA. Essa interações resultam na inibição do DNA, RNA e síntese de proteínas e, conseqüentemente, a morte celular. Descobriu-se recentemente, que além disso, a DOX também pode se intercalar com o DNA das mitocôndrias [64].

Apesar do uso generalizado, os efeitos citotóxicos das antraciclina são multidirecionais, sendo a cardiotoxicidade o efeito colateral mais conhecido. Algumas modificações na molécula de DOX resultaram no derivado epirubicina, mas ocorreram mudanças metabólicas e farmacocinéticas que diminuíram o tempo de meia vida no corpo, além de não reduzir os riscos de cardiotoxicidade. Outros derivados como a idarrubicina e a valrubicina obtiveram aprovação clínica, mas este último apresentou efeitos colaterais indesejáveis, como sangue na urina, incontinência, dor e dificuldades para urinar [64]. Dessa forma, o uso de carreadores para direcionar a DOX para uma região alvo seria uma alternativa para minimizar os efeitos colaterais produzidos [65].

## 2.4 Métodos de síntese de nanopartículas

Nanopartículas de magnetita têm sido produzidas por uma variedade de processos sintéticos, que vão desde as tradicionais rotas químicas em fase líquida, coprecipitação, microemulsão, hidrotérmico, etc., até técnicas mais sofisticadas de deposição química em fase de vapor [17, 66]. Para que essas nanopartículas tenham potencial para aplicações em biomedicina, elas devem possuir uma combinação de propriedades como magnetização de saturação elevada, distribuição de tamanho monodispersa, comportamento superparamagnético, biocompatibilidade e uma superfície com funções interativas [39, 66, 67]. Atualmente, as nanopartículas de magnetita usadas ou que estão sendo investigadas para essas aplicações são predominantemente sintetizadas pelo processo de coprecipitação na presença de agentes estabilizantes [6]. Essa rota sintética envolve a precipitação simultânea de íons  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  em solução aquosa na presença de uma base. É vantajosa por ser simples, econômica e possuir apreciável controle sobre o tamanho, composição e formato das partículas. Essas características das nanopartículas dependem muito do tipo de sal utilizado, da razão  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ , da temperatura de reação, o valor de pH e força iônica do meio [17, 39, 68].

### 2.4.1 Coprecipitação

O método de coprecipitação é um processo de nucleação homogênea que consiste de dois processos distintos, a nucleação e o crescimento dos núcleos. Para que ocorra a formação de nanopartículas por esse processo, uma solução supersaturada com as espécies de crescimento deve ser criada. Soluções com essa característica possuem uma energia livre de Gibbs elevada, a qual deve ser reduzida por meio da precipitação do soluto na solução. Essa diminuição na energia livre de Gibbs é a força que impulsiona para ambos, nucleação e crescimento. A energia livre de Gibbs por unidade de volume da fase formada é dada pela seguinte expressão [69]:

$$\Delta G_v = \frac{-kT}{\Omega} \ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = \frac{-kT}{\Omega} \ln(1 + \sigma), \quad (2.4)$$

onde  $C$  é a concentração do soluto,  $C_0$  a concentração de equilíbrio,  $\Omega$  é o volume atômico e  $\sigma$  é a supersaturação definida por  $\frac{C-C_0}{C_0}$ . Sem a condição de saturação,  $\sigma = 0$ ,  $\Delta G_v = 0$ , não ocorrerá nucleação. Já quando  $C > C_0$ ,  $\Delta G_v$  é negativo e a nucleação ocorre espontaneamente. Assumindo que os núcleos formados sejam esféricos com raio igual a  $r$ , a energia livre de Gibbs total,  $\Delta G$  é dada por [69]:

$$\Delta G = \Delta\mu_v + \Delta\mu_s, \quad (2.5)$$

sendo  $\Delta\mu_v$  a energia livre de volume dada pela expressão

$$\Delta\mu_v = \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v, \quad (2.6)$$

e  $\Delta\mu_s$  a energia livre de superfície do sistema dada por

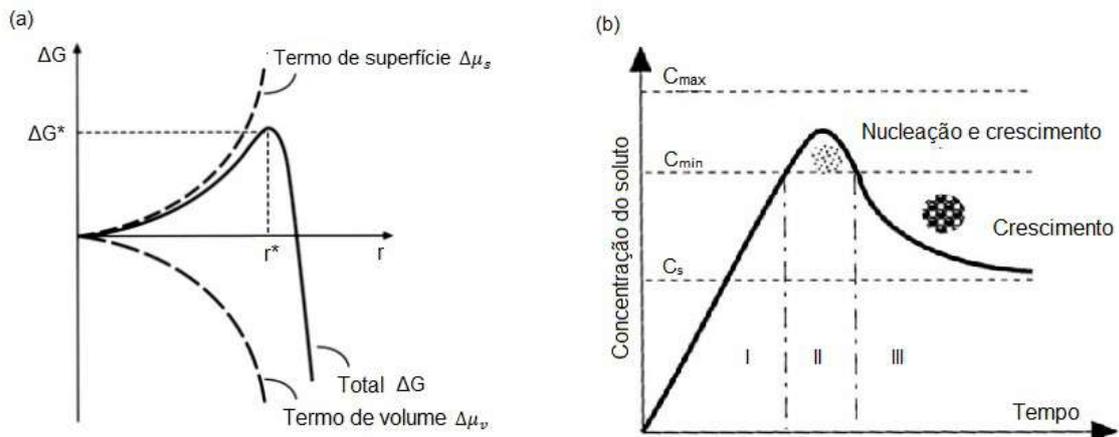
$$\Delta\mu_s = 4\pi r^2 \gamma, \quad (2.7)$$

onde  $\gamma$  é a energia de superfície por unidade de área. Na Figura 2.9 (a) é possível visualizar as variações dessas energias em função do raio do núcleo. Novos núcleos só serão formados quando a raio exceder um tamanho crítico  $r^*$  e sobrepor a barreira de energia  $\Delta G^*$ , os quais são definidos por [69]:

$$r^* = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v}, \quad (2.8)$$

$$\Delta G^* = \frac{16\pi\gamma}{3\Delta G_v)^2}. \quad (2.9)$$

A Figura 2.9 (b) ilustra um esquema do processo de nucleação e crescimento em função do tempo. Não acontece nenhum processo de nucleação conforme a concentração de soluto aumenta, mesmo acima da concentração de equilíbrio,  $C_s$ . Quando a supersaturação alcançar um valor acima da solubilidade, o qual corresponde ao valor da barreira de energia  $\Delta G^*$  definida pela Equação 2.9, ocorrerá a nucleação. Abaixo de uma concentração mínima  $C_{min}$ , nenhum núcleo novo será formado, enquanto que os núcleos existentes continuarão a crescer até que a concentração das espécies se reduza para a  $C_s$ . A formação de partículas uniformes pode ser obtida se o processo de crescimento for eficientemente controlado, e isso pode ocorrer saturando a superfície das nanopartículas com um estabilizante estérico ou eletrostático, rapidamente após a nucleação [66, 69].



**Figura 2.9:** Ilustração da variação do  $\Delta\mu_v$ ,  $\Delta\mu_s$  e  $\Delta G$  em função do raio do núcleo (a) e do processo de nucleação e crescimento em função do tempo (b) [69].

### 2.4.2 Microemulsões

Em 1943, Hoar e Schulman introduziram pela primeira vez o termo microemulsão quando notaram que certas combinações de água, óleo, surfactante e cosurfactante produziam soluções claras, aparentemente homogêneas. No caso em questão, a fase oleosa era composta por hidrocarbonetos de cadeia longa e o surfactante por moléculas orgânicas anfífilas de cadeia longa, as quais são formadas por uma cabeça hidrofílica e uma cauda lipofílica [70]. Devido essa natureza do surfactante, ele se torna miscível tanto no hidrocarboneto como na água, entretanto, a mistura resultante, embora opticamente isotrópica, não pode ser descrita como uma solução. Conforme foi observado por Schulman, a orientação das moléculas de surfactante não era aleatória, elas se organizavam formando agregados esféricos de água em óleo (w/o) cercada por uma única camada de surfactante e cosurfactante [70], como ilustrado na Figura 2.10.

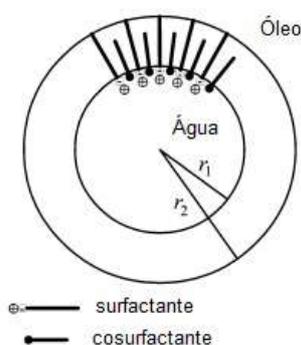


Figura 2.10: Modelo de micela reversa observada por Schulman [70].

Mais tarde, Friberg demonstrou por uma série de experimentos que a orientação das moléculas nas microemulsões diminuía a tensão interfacial entre os agregados, tornando as microemulsões sistemas termodinamicamente estáveis. Esta estabilidade característica é o que distingue as microemulsões das tradicionais macroemulsões que são, por definição, termodinamicamente instáveis [70].

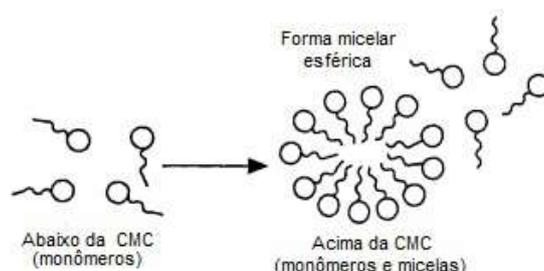
De uma forma mais ampla, podemos, então, definir as microemulsões como sendo dispersões termodinamicamente estáveis, isotrópicas e opticamente transparentes de dois líquidos imiscíveis, tais como água e solvente orgânico (óleo), na forma de gotículas nanométricas estabilizadas por uma camada de surfactante. Devido ao tamanho das gotículas serem na faixa dos nanômetros, as microemulsões são frequentemente utilizadas como um meio de reação confinada para uma variedade de reações químicas orgânicas, inorgânicas e bioorgânicas, as quais incluem catálise micelar, polimerização, processos enzimáticos e, também, síntese de nanopartículas [37].

Os sistemas microemulsionados podem ser categorizados como microemulsões óleo-em-água (o/w) quando gotículas de óleo são dispersas em fase contínua de água ou microemulsões água-em-óleo (w/o), também chamadas de microemulsões reversa, quando

gotas de água são dispersas em uma fase contínua de óleo. Em uma região intermediária entre esses dois tipos de microemulsões pode existir ainda, microemulsões bicontínuas cujos domínios de água e óleo são aleatoriamente interconectados [71]. Alguns parâmetros como a concentração dos reagentes e a presença de agentes estabilizantes adicionais são importantes para a formação desses sistemas. Além disso, um fator altamente relevante é a escolha do surfactante pois, fatores como balanço hidrofílico-lipofílico (BHL), concentração micelar crítica (CMC) e o parâmetro de empacotamento do surfactante ( $N_s$ ) influenciam fortemente no tamanho e formato dos agregados micelares [37, 71, 72].

Os surfactantes são moléculas orgânicas com um grupo polar (hidrofílico) e uma cadeia alquil longa (parte lipofílica) e são utilizados para reduzir a tensão interfacial entre duas fases imiscíveis. Dependendo do tamanho das duas cadeias, um número empírico, BHL, é designado para cada surfactante numa escala de 1 a 20, sendo o número BHL 1 designado para a molécula mais lipofílica e 20 para a molécula mais hidrofílica. Assim, o valor BHL vai depender da estrutura do surfactante e conseqüentemente, vai decidir a sua ação na solução. Por exemplo, microemulsões w/o podem ser formadas usando um surfactante com o número BHL baixo enquanto que microemulsões o/w são formadas utilizando surfactantes com um número de HBL alto [72].

A CMC é uma faixa de concentração onde ocorre a formação das micelas e depende de fatores relacionados a estrutura da molécula de surfactante como das condições experimentais de temperatura, contra-íons e força iônica da solução, etc. Em concentrações baixas, a molécula de surfactante em uma solução aquosa, por exemplo, esta predominantemente na forma de monômero e encontra-se, em sua maioria, na interface do sistema água-ar. Quando a concentração aumenta e excede a CMC, as moléculas do surfactante se organizam espontaneamente na forma de agregados moleculares com dimensões coloidais que tentam minimizar o contato com a água, esses agregados são chamados de micelas ou vesículas, Figura 2.11. A faixa de concentração em que as micelas são formadas é pequena e provoca variações bruscas em algumas propriedades físico-químicas em função da concentração do surfactante como tensão superficial, condutividade e pressão osmótica. Em virtude disso, é possível determinar a CMC de sistemas diferenciados por meio de técnicas que sejam capazes de quantificar essas propriedades [73].



**Figura 2.11:** Ilustração da formação das micelas [73].

O formato e tamanho dos agregados micelares podem ser controlados pelo parâmetro de empacotamento do surfactante ( $N_s$ ) definido como

$$N_s = \frac{V}{al_c}, \quad (2.10)$$

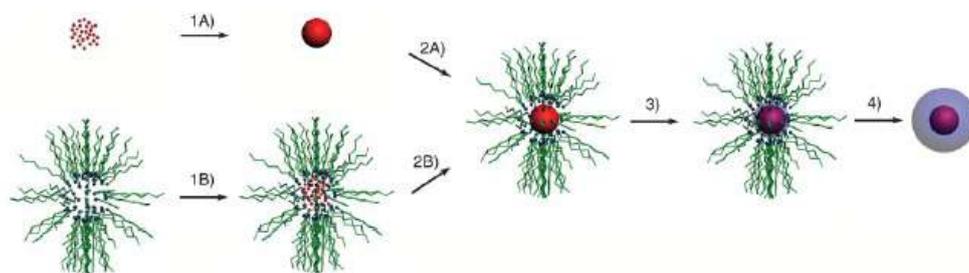
onde  $V$  é o volume da parte hidrofóbica,  $a$  é área da cabeça polar e  $l_c$  é o comprimento da cauda hidrofóbica [71,72]. Micelas esféricas são formadas quando  $N_s < \frac{1}{3}$ , os valores máximos para micelas cilíndricas e bicamadas são  $\frac{1}{2}$  e 1, respectivamente. Estruturas de micela reversa são formadas para  $N_s > 1$ , sendo que para micelas cilíndricas  $N_s \leq 2$  e esféricas  $N_s > 3$ . Assim, quando óleo é solubilizado em micelas hidrofílicas ou água em micelas hidrofóbicas, pode-se observar a formação de microemulsões o/w para  $N_s < 1$  ou microemulsões w/o para  $N_s > 1$ . Quando  $N_s \approx 1$ , são observadas fases lamelares ou microemulsões bicontínuas [71].

#### 2.4.2.1 Recobrimento de nanopartículas via microemulsão reversa

As microemulsões reversas tem sido consideradas extremamente úteis como nanoreatores tanto para a síntese como para o recobrimento com sílica de partículas nanométricas, devido ao fato de poderem, eficientemente, dissolver ambos sais inorgânicos e precursores organometálicos, como também nanocristais pré-sintetizados, proporcionando uma maior flexibilidade para a síntese de nanoestruturas com diferentes tamanhos, formatos e funções [37].

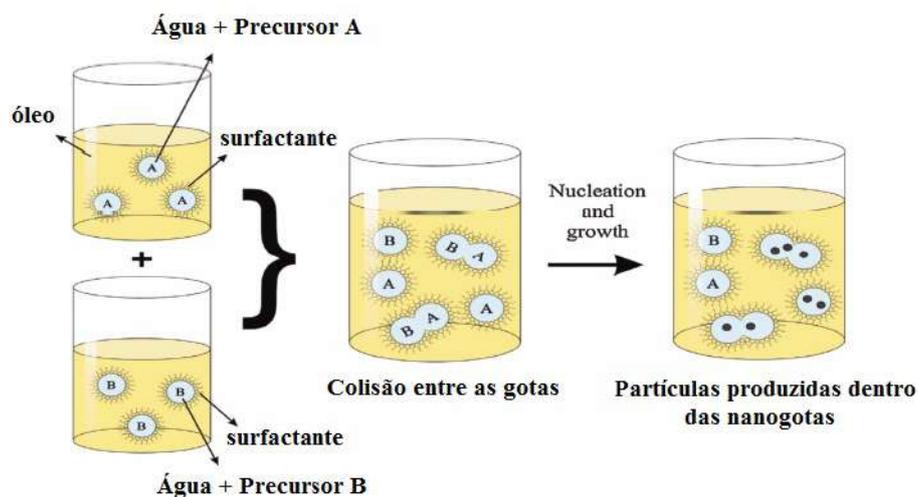
As microemulsões reversas são uma escolha muito popular para o recobrimento com sílica de nanopartículas inorgânicas que são instáveis no clássico meio reacional de Stöber (hidrólise e condensação do tetraetilortosilicato (TEOS) em uma mistura de água-amônia-etanol), pois apresenta um maior controle sobre a nucleação da sílica, visto que são limitadas ao interior das gotículas nanométricas [37]. O tamanho destas gotículas pode ser controlado por parâmetros que estão envolvidos na formação das microemulsões como a natureza do surfactante, o tipo de solvente, adição de co-surfactantes e, em particular, a razão água/surfactante (W). Dessa forma, controlando esses componentes é possível obter nanomateriais com diferentes tamanhos e formatos [72].

Várias abordagens com relação ao recobrimento com sílica de nanopartículas inorgânicas pelo método de microemulsão reversa têm sido consideradas. A metodologia mais simples e extensa, consiste de recobrir com sílica os núcleos magnéticos pré-sintetizados, enquanto que em um segundo procedimento, ambos núcleo e o processo de silanização ocorrem no interior das gotículas, Figura 2.12 [37].



**Figura 2.12:** Ilustração de microemulsões reversas para o recobrimento de nanopartículas com sílica. Na primeira rota, as NP são previamente sintetizadas (1A) e transferidas para microemulsões reversas estáveis preparadas pela agitação de solvente orgânico, água e surfactante (2A). Na segunda rota, ambas a solubilização (1B) e a reação dos precursores (2B) acontecem dentro da micela reversa, seguida pela hidrólise e condensação do TEOS (3). O envelhecimento e a lavagem levam à formação de núcleos com tamanhos e espessuras de revestimento que podem ser controlados experimentalmente (4) [37].

Em ambas as abordagens ocorre a preparação de dois sistemas microemulsionados contendo os reagentes. Visando a primeira metodologia, é preparado um sistema contendo os núcleos pré-sintetizados e um outro, contendo os precursores para gerar a camada de recobrimento. Quando essas microemulsões são misturadas, as micelas reversas começam a colidir umas com as outras formando canais de água transitentes, por onde ocorrem as trocas dos reagentes intermicelares. A partir disso, inicia-se a reação para a formação das estruturas caroço/casca que, por fim, se revertem em gotas isoladas. A duração desses transientes é na ordem de microsegundos, isso quer dizer que, em quase todos os sistemas microemulsionados tanto o conteúdo das gotas como as moléculas do surfactante na interface são trocadas entre diferentes partículas frequentemente a cada segundo [37, 72, 74].



**Figura 2.13:** Mecanismo mostrando a troca intermicelar para a formação tanto de nanopartículas como de estruturas caroço/casca pelo método de microemulsão por micela reversa. [7].

## 2.5 Hidrogéis de quitosana

Os hidrogéis são redes poliméricas 3D com vários grupos hidrofílicos capazes de absorver e reter uma grande quantidade de água ou fluídos biológicos. Possuem integridade física, ou seja, são impedidos de se dissolverem devido a formação de pontos de reticulações químicos ou físicos entre as cadeias poliméricas [75]. As dimensões dos hidrogéis podem variar de nanômetros a centímetros, com formatos físicos desde sólidos moldados a membranas ou folhas e micropartículas. Esses recursos permitiram o uso dos hidrogéis em áreas da biomedicina, agricultura e indústria [43, 76].

Hidrogéis totalmente entumecidos tem propriedades físicas comuns aos tecidos vivos, como consistência macia e elástica, além de baixa tensão superficial em água ou fluídos. Para aplicações biomédicas, essas características impedem que os tecidos ao redor da implantação do hidrogel inflamem ou ainda, que produzam uma resposta imune negativa, que pode ocorrer devido a adsorção de proteínas na superfície do hidrogel, que levam ao reconhecimento pelo SRE. Além disso, alguns polímeros possuem propriedades muco e bioadesivas, as quais facilitam a formação de pontes entre as cadeias poliméricas do hidrogel e proteínas do muco, melhorando a interação em regiões específicas do corpo [43, 76].

A combinação de hidrogéis com nanopartículas (orgânico e inorgânico), resulta em um novo tipo de hidrogel polimérico, os géis nanocompósitos. Essa nova classe de materiais possui as propriedades que resultam da simples adição do bulk das nanopartículas na matriz dispersante, mas também devido a interação sinérgica entre os dois, resultando em propriedades mecânicas, ópticas, biológicas, de entumecimento e de responsividade a estímulos melhoradas [77, 78].

Recentemente, o desenvolvimento de hidrogéis inteligentes, tem se destacado no campo de pesquisa em biomateriais. Esses hidrogéis podem alterar suas propriedades, funções, formato, etc., como resposta a estímulos externos específicos, como temperatura, pH, campo magnético, luz, entre outros. Isso ocorre porque as cadeias dos polímeros podem ser projetadas para reagir às mudanças provadas no meio e assim, alterar as propriedades da matriz do gel, como por exemplo, solubilidade, grau de reticulação, conformação, etc. A adição de nanopartículas ao hidrogel pode fornecer responsividade ao gel ou alterar a funcionalidade em um gel que já é responsivo [76, 78].

Hidrogéis de polímeros naturais, como a quitosana, quando comparados com os polímeros sintéticos, atraem a atenção devido suas propriedades de baixa toxicidade, biocompatibilidade e degradabilidade por enzimas humanas. Essas características positivas entre outras, fazem da quitosana um polímero adequado para a fabricação de hidrogéis inteligentes com amplo potencial de aplicações em separação e cultura de células, engenharia de tecidos, imobilização de enzimas, liberação controlada e distribuição direcionada de fármacos [43, 76].

Os hidrogéis são classificados de acordo com as interações que formam suas redes, as quais podem ser químicas ou físicas. A preparação de hidrogéis químicos é feita por meio de um método direto para produzir redes irreversíveis usando ligações covalentes entre as cadeias poliméricas [79]. Nos hidrogéis de quitosana, as redes podem ser formadas entre os grupos ( $-NH_2$ ) e ( $-OH$ ) disponíveis na cadeia do polímero juntamente com as moléculas dos reticuladores. Os reticuladores são moléculas com  $M_w$  bem menor que a  $M_w$  da cadeia do polímero, com um ou mais grupos funcionais reativos que permitem a formação das ligações entre as cadeias poliméricas. Entre os mais utilizados e com metodologia bem documentada para o preparo de hidrogéis de quitosana estão o glutaraldeído, formaldeído, genipin, entre outros. As ligações químicas formadas com maior frequência incluem as bases de Schiff ( $-N = CH-$ ) e ligações amida [43, 76, 80].

Os hidrogéis físicos são redes mantidas unidas por entrelaçamento molecular e/ou interações moleculares secundárias. Essas ligações são reversíveis e incluem atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e cristalização. Devido apresentarem reticulações reversíveis, os hidrogéis físicos tem a capacidade de se reformar e com isso apresentam a característica de autocura [79]. As interações eletrostáticas têm um papel dominante na formação de hidrogéis físicos devido a quitosana ser um polissacarídeo catiônico, podendo interagir com qualquer molécula iônica ou íons. Hidrogéis de complexo polieletrólito (PEC) podem ser formados por interações eletrostáticas quando envolvem a quitosana e um polímero aniônico. A diferença entre as duas interações é que a primeira usa moléculas com peso molecular baixo, enquanto a PEC trabalha com uma ampla faixa de peso molecular. Quando as cadeias da quitosana são neutralizadas, tanto por adição de sais ou por variações de temperatura, por exemplo, as interações de hidrogênio entre as hidroxilas da quitosana e a água, como outras interações hidrofóbicas, conduzem a reticulação. É interessante ressaltar que, muitas vezes, não ocorre só uma interação específica, mas multi-interações são responsáveis pela formação dos hidrogéis físicos [43, 76].

As propriedades mecânicas são critérios importantes quando se deseja investigar o uso de hidrogéis para uma aplicação biomédica específica. Os géis devem ter rigidez suficiente para se sustentarem como uma estrutura de suporte, mas ao mesmo tempo essa rigidez deve ser apropriada para que determinado fenótipo celular consiga se aderir e proliferar. Com as propriedades de fluxo adequadas, se tornam excelentes candidatos para sistemas de entrega de fármacos injetáveis, pois se diluem mediante a aplicação de uma determinada tensão e se recuperam em sólidos uma vez que a deformação é removida. Com a recuperação da rigidez do gel, agentes terapêuticos que foram encapsulados podem ser liberados localmente. Por fim, a compreensão do processo de gelificação ajuda a entender a formação das redes poliméricas dos hidrogéis [81].

A caracterização reológica padrão é normalmente realizada pela aplicação de uma tensão, ou deformação, ao material que está sujeito a um movimento oscilatório sinusoidal de baixa amplitude de frequência ( $\omega$ ). Por exemplo, se a medida for realizada em um

reômetro de tensão controlada, uma tensão de corte é aplicada na amostra, na forma,

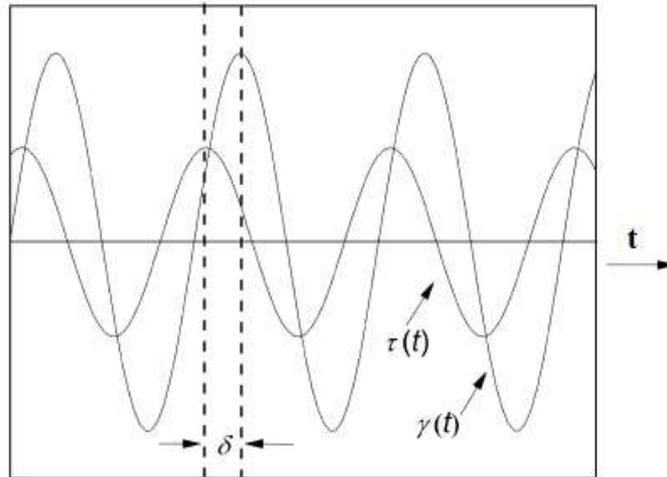
$$\tau(t) = \tau_0(\text{sen}(\omega t)), \quad (2.11)$$

sendo a deformação resultante medida, do tipo,

$$\gamma(t) = \gamma_0(\text{sen}(\omega t + \delta)), \quad (2.12)$$

onde  $\tau_0$  e  $\gamma_0$  são as amplitudes máximas de tensão e deformação, respectivamente, e  $\delta$  é o ângulo de defasagem. A Figura 2.14, ilustra o princípio das medidas oscilatórias [81].

Quando as ondas de tensão e deformação estão em fase,  $\delta = 0^\circ$ , o material se comporta como um sólido puro. Quando  $\delta = 90^\circ$ , o material é considerado um fluido puramente viscoso. Para sistemas viscoelásticos, o ângulo de defasagem se encontra variando entre esses dois extremos clássicos [81,82].



**Figura 2.14:** Princípio das medidas oscilatórias. [81].

Por meio dessas medidas, é possível monitorar a componente elástica  $G'$ , definida como a medida da energia armazenada e devolvida ao material, a componente viscosa  $G''$ , definida como a energia dissipada no escoamento, e a tangente de dissipação,  $\tan \delta$ , sendo expressas pelas seguintes expressões [82],

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta), \quad (2.13)$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \text{sen}(\delta), \quad (2.14)$$

e

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad (2.15)$$

Para valores de  $\tan(\delta) < 1$ ,  $G' > G''$ , o comportamento do material se aproxima

de um sólido elástico, e para  $\tan(\delta) > 1$ ,  $G'' > G'$  o material se comporta como um líquido viscoso. Quando se observa a igualdade dos módulos,  $G' = G''$ ,  $\tan(\delta) = 1$  e isso é um critério importante da transição sol-gel e é usado para determinação do ponto de gelificação [81, 83].

Os módulos elástico e viscoso também refletem o comportamento das interações existentes entre as cadeias dos polímeros na rede. Um gel forte é caracterizado por possuir a propriedade  $G' > G''$ , onde ambos os módulos, mas especialmente  $G'$ , apresentam um comportamento próximo ao linear por toda a gama de frequência  $\omega$  aplicada. Por outro lado, um gel fraco é caracterizado pelos valores dos módulos elástico e viscoso serem fortemente dependentes da frequência aplicada, com um valor de  $G'' > G'$  [81, 84, 85].

## 2.6 Início dos estudos deste trabalho

Este trabalho de pesquisa teve origem a partir dos estudos iniciais da pesquisadora Paula Nunes de Oliveira no laboratório do Grupo de Desenvolvimento e Inovação em Dispositivos Multifuncionais - GDDM no período de 2014 a 2015. A pesquisadora Paula otimizou a síntese de NPMs de magnetita pela técnica de polimerização utilizando o PVA, onde o óxido de ferro foi obtido pela pirólise a baixas temperaturas. Com base nisso, o meu trabalho de Mestrado se iniciou comparando NPMs de magnetita sintetizadas pela técnica do PVA com a obtida pela rota sintética de coprecipitação. Nesse aspecto, este trabalho prosseguiu na mesma linha de pesquisa. Visando aplicações na área biomédica, as NPMs foram sintetizadas com diferentes modificações na superfície química. Pelo programa de Doutorado Sanduíche - PDSE, trabalhei, novamente, em parceria com a pesquisadora Paula no Laboratório *Ingénierie des Matériaux Polymères* da *Université Claude Bernard Lyon 1* - FR, no desenvolvimento de hidrogéis magnéticos, oferecendo novas possibilidades de estudos em biomateriais para o grupo GDDM utilizando as NPMs de magnetita.

## Objetivos

O objetivo geral deste trabalho de pesquisa foi sintetizar e caracterizar nanopartículas de magnetita funcionalizadas com caráter superparamagético, morfologia uniforme, estabilidade coloidal e que sejam biocompatíveis para serem utilizados em protocolos para aplicações no tratamento do câncer. Para isso, o trabalho foi dividido em três etapas.

Na primeira etapa do trabalho, foi investigada a síntese de nanopartículas de magnetita via rota de coprecipitação utilizando ácido oleico, sílica e quitosana como agentes de recobrimento e modificação da superfície. Também foram investigadas as interações entre a superfície das NPMs e agente de recobrimento, bem como sua influência na estabilidade coloidal, distribuição de tamanho e propriedades magnéticas das NPMs.

Na segunda etapa do trabalho, a superfície das nanopartículas com recobrimento de sílica e quitosana foram funcionalizadas com o fármaco Doxorrubicina (DOX) e foram avaliados os efeitos citotóxicos e morfológicos das NPMs em células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).

Na terceira etapa do trabalho, estudou-se a incorporação das NPMs modificadas com quitosana em hidrogéis de quitosana com o objetivo de produzir nanocompósitos estímulo-responsivos. Foi investigado a influência da adição das NPMs nos parâmetros reológicos do hidrogel, bem como a estrutura morfológica e as propriedades magnéticas do nanocompósito.

## Parte Experimental

Durante o desenvolvimento deste trabalho, todas as etapas de preparações das amostras foram realizadas utilizando-se reagentes químicos com grau analítico e sem tratamento prévio.

### 4.1 Síntese das Nanopartículas de Óxido de Ferro

As NPs (nanopartículas) de magnetita foram sintetizadas via método de coprecipitação em meio básico [86, 87]. Uma solução de cloretos de ferro com concentrações de 6 mmol de  $Fe^{3+}$  e 3 mmol de  $Fe^{2+}$  foi inicialmente preparada em 30 mL de água deionizada e desgasificada. Sob agitação magnética, o frasco contendo a mistura foi aquecido a 80 °C sob atmosfera de Argônio e então, 15 mL de  $NH_4OH$  28% foram adicionados ao sistema reacional e, instantaneamente, um precipitado de coloração preta foi formado. A suspensão resultante foi mantida sob agitação. Após 1 hora, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente e mantido em repouso para a separação do precipitado por meio de um ímã permanente. O sobrenadante foi removido e foram realizadas três lavagens com água destilada. Parte das partículas foram secas em estufa a 50 °C por 4h e o restante foi redisperso em água destilada. Essa amostra possui a nomenclatura de  $Fe_3O_4$ . Uma ilustração do esquema da síntese está apresentado na Figura 4.1.

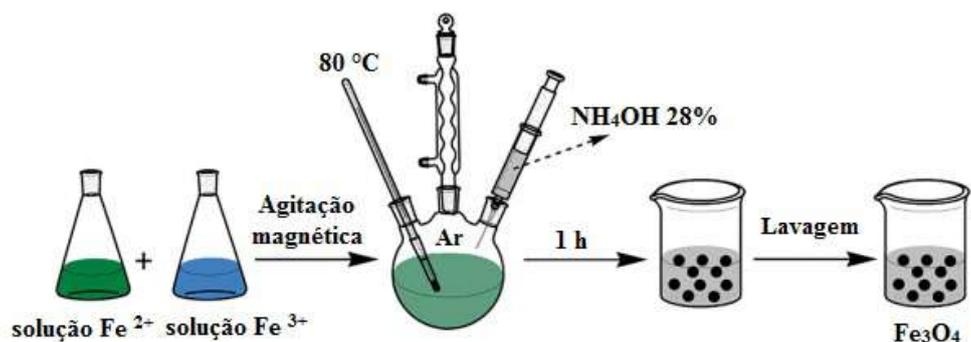


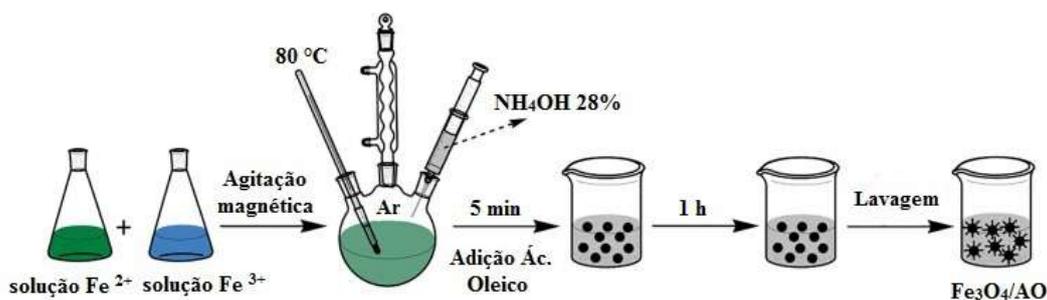
Figura 4.1: Ilustração do esquema de síntese das NPs de magnetita por coprecipitação adaptado da referência [13].

## 4.2 Modificação da Superfície das Nanopartículas de Óxido de Ferro

### 4.2.1 Superfície Hidrofóbica

#### 4.2.1.1 Recobrimento com ácido oleico

As NPs de magnetita recobertas com o ácido oleico foram sintetizadas pelo mesmo procedimento descrito na **Seção 4.1**. Após 5 minutos da adição de  $NH_4OH$  28%, 1,5 mmol de ácido oleico foram adicionados ao precipitado. A suspensão resultante foi mantida sob agitação por 1 hora, e na sequência, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente e mantido em repouso para a separação do precipitado por meio de um ímã permanente. O sobrenadante foi removido e foram realizadas três lavagens com água destilada e álcool, e ao final do processo, uma alíquota do precipitado de NPs com nomenclatura  $Fe_3O_4/AO$  foi redisperso em ciclohexano e o restante foi seco em estufa a 50 °C por 2h. Na Figura 4.2, é possível visualizar um esquema da síntese.

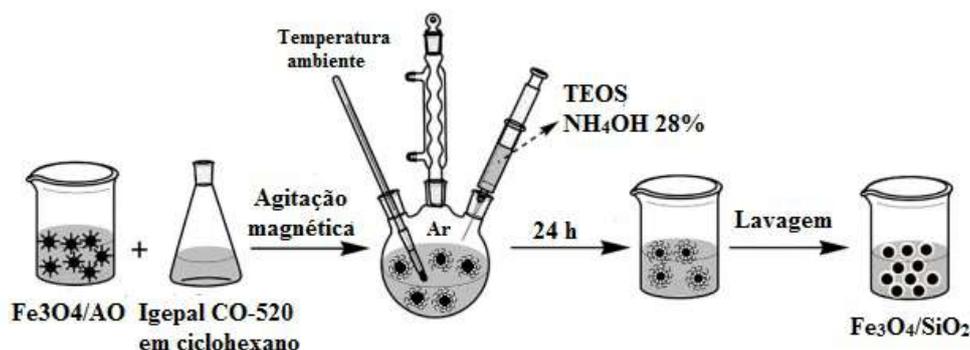


**Figura 4.2:** Ilustração do esquema de síntese das NPs de magnetita por coprecipitação seguida da adição de ácido oleico adaptado da referência [13].

### 4.2.2 Superfície Hidrofilica

#### 4.2.2.1 Recobrimento com sílica

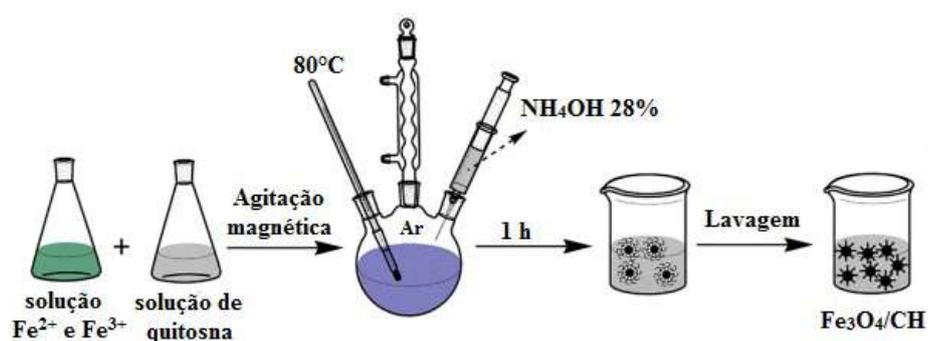
As NPs de magnetita obtidas na **Seção 4.2.1.1** foram recobertas com sílica utilizando o método de microemulsão por micela reversa [28]. Nesta etapa foi preparada uma solução de 4 mL do surfactante Igepal CO-520 em 75 mL de ciclohexano em um erlenmeyer de 250 mL, esta mistura foi agitada por 5 minutos e então, 7,5 ml de uma dispersão das NPs de  $Fe_3O_4/AO$  em ciclohexano foi adicionada a mistura e a solução ficou 30 minutos sob agitação magnética. Depois disso, foi adicionado, lentamente, 750  $\mu$ L de TEOS e deixado, por mais 30 minutos, sob agitação. Finalmente, 650  $\mu$ L de  $NH_4OH$  28% foi adicionado a solução e a mistura foi mantida por 24 h sob agitação. Ao final do processo, as NPs com nomenclatura  $Fe_3O_4/SiO_2$  foram lavadas três vezes com etanol e depois uma alíquota foi redispersa em álcool isopropílico e o restante foi seco em estufa na temperatura de 50 °C por 4h. Um esquema da síntese é ilustrado na Figura 4.3.



**Figura 4.3:** Ilustração do esquema do recobrimento das NPs de magnetita com sílica pelo método de microemulsão reversa adaptado da referência [13].

#### 4.2.2.2 Recobrimento com quitosana

As NPs de magnetita foram sintetizadas na presença de uma solução de quitosana com a metodologia baseada na referência [88]. Previamente, 0,25 g de quitosana (*Sigma-Aldrich*, DA: 13 %, Mw:  $4,608 \times 10^5$  g/mol) foram solubilizados em 25 mL de uma solução aquosa de ácido acético 1 %. Em seguida, essa solução foi adicionada a uma solução aquosa de sais de ferro, previamente preparada como descrita na **Seção 4.1**. A mistura ficou sob agitação magnética por 30 min a  $80^\circ C$  sob atmosfera de Argônio, e então, 15 mL de  $NH_4OH\ 28\%$  foram adicionados lentamente ao sistema reacional e um precipitado de coloração preta foi formado. A suspensão foi mantida em agitação por 1 h. O sistema foi resfriado a temperatura ambiente e o precipitado formado foi separado por meio de um ímã permanente e lavado com água destilada e álcool. Ao final do processo, as NPs com nomenclatura  $Fe_3O_4/CH$  foram redispersas em água deionizada e o restante foi seco em estufa na temperatura de  $50^\circ C$  por 4h. Um esquema da síntese é ilustrado na Figura 4.4.



**Figura 4.4:** Ilustração do esquema de síntese das NPs de magnetita na presença de quitosana por coprecipitação adaptado da referência [13].

### 4.3 Funcionalização da superfície das nanopartículas com Doxorrubicina (DOX)

As NPMs recobertas com sílica e quitosana,  $Fe_3O_4/SiO_2$  e  $Fe_3O_4/CH$ , foram funcionalizadas com o fármaco Doxorrubicina seguindo o procedimentos descritos nas referências [88,89]. Para ambas as NPMs o procedimento foi o mesmo, diferenciando apenas na concentração do fármaco DOX. O experimento consistiu em preparar uma dispersão de 1 mg/mL de NPMs em uma solução de DOX de 0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL par as amostras  $Fe_3O_4/SiO_2$  e  $Fe_3O_4/CH$ , respectivamente. Essa mistura foi dispersada em sonda ultrassônica (UP400St - Hielscher (400W, 24kHz)- COMCAP) por 15 min. Em seguida, foram adicionadas a um *shaker* e mantidas sob agitação por 24h a temperatura ambiente. No final do período, a dispersão foi centrifugada e o sobrenadante foi reservado para medir a eficiência do carregamento da DOX. As NPMs, com nomenclatura  $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$  e  $Fe_3O_4/CH/DOX$ , foram submetidas aos ensaios biológicos.

Para o cálculo de eficiência do carregamento (EC) do fármaco (Equação 4.1), uma curva de calibração com concentrações padrão de DOX (1,5 – 50  $\mu$ L) foi preparada a partir da leitura da absorção UV-VIS, realizada no espectrofotômetro PharmaSpec UV-1700, Shimadzu, no comprimento de onda de 480 nm.

$$EC (\%) = \frac{\mu g \text{ de DOX total} - \mu g \text{ de DOX no sobrenadante}}{\mu g \text{ de DOX total}} \times 100 \quad (4.1)$$

### 4.4 Preparação dos Hidrogéis Magnéticos de Quitosana

A amostra de quitosana (CH) produzida a partir da carcaça de caranguejo (DA: 0,4%;  $M_w = 3,655 \times 10^5$  g/mol) pela Mahtani Chitosan Ldt (Veraval, India), foi fornecida pelo laboratório *IMP - Ingénierie des Matériaux Polymères* da *Université Claude Bernard Lyon 1 - FR* durante o período de Doutorado Sanduíche.

#### 4.4.1 Purificação da quitosana

Uma solução aquosa de quitosana, com concentração de 0,5 % (m/v), foi preparada na presença de uma quantidade estequiométrica de ácido acético em relação ao grupo amina ( $-NH_2$ ) da quitosana. A mistura foi deixada sob agitação mecânica à temperatura ambiente por aproximadamente 24h. Na sequência, a solução resultante foi filtrada sucessivamente em filtros de acetato de celulose (Milipore) com porosidades diferentes: 3, 1, 2, 0,8 e 0,45  $\mu$ m. Essa filtração foi feita por pressão, à 3 bars. Depois disso, o polímero foi precipitado pela adição de solução de  $NH_4OH$  28 % até atingir pH entre 9 – 10. A amostra foi então centrifugada a 10.000 rpm por 15 min a uma temperatura de 10°C. A quitosana precipitada foi recuperada em um béquer e lavada com água destilada. Esse

procedimento foi repetido até se obter pH neutro. Por fim, a quitosana neutralizada foi congelada e liofilizada.

#### 4.4.2 Recobrimento das nanopartículas com quitosana para incorporação nos hidrogéis

As NPMs de magnetita utilizadas nesta etapa do trabalho foram as com recobrimento de quitosana. Optou-se por utilizar na superfície das partículas a mesma quitosana que seria empregada no preparo dos hidrogéis. As NPMs foram sintetizadas seguindo o procedimento descrito na referência [90]. Previamente, uma solução contendo 0,25 g de quitosana purificada, obtida na **Seção 4.4.1**, e 88  $\mu\text{L}$  de ácido acético foi preparada em 100 mL de água deionizada. Essa solução foi adicionada lentamente, sob agitação mecânica a  $60^\circ\text{C}$ , a solução de íons de ferro descrita na **Seção 4.1**. Após 1 h, 15 mL foi adicionado gota a gota na mistura e a suspensão foi mantida por mais 1 h sob vigorosa agitação. Ao final do processo, as NPs com nomenclatura  $Fe_3O_4/CHG$  foram redispersas em água e o restante foi seca em estufa a vácuo na temperatura de  $50^\circ\text{C}$  por 12 h.

#### 4.4.3 Preparações dos Hidrogéis

Uma solução de quitosana 2,5 % (m/m) foi preparada dentro de um reator, e deixada sob agitação mecânica durante 12 h para a completa solubilização da solução. A quantidade estequiométrica de ácido acético adicionado foi calculada seguindo a Equação 4.2.

$$m_{\text{ácido acético}} = \frac{m_{\text{quitosana}} \times (1 - DA) \times (1 - \%_{H_2O}) \times M(\text{AcOH})}{M_{\text{quitosana}}} \quad (4.2)$$

$m_{\text{ácido acético}}$  = massa de ácido acético

$m_{\text{quitosana}}$  = massa de quitosana utilizada

$DA$  = grau de acetilação da quitosana

$\%_{H_2O}$  = % de água presente na quitosana e ácido utilizado ( 5%)

$M(\text{AcOH})$  = massa molar do ácido acético  $60,04\text{g}/\text{mol}$

$M_{\text{quitosana}}$  = massa molar da quitosana

O hidrogel foi preparado em uma placa de Petri de poliestireno, com 5 cm de diâmetro, na qual foi pesando 3,5 g de solução. Em seguida, essa solução foi neutralizada pelo contato direto com  $NaOH$  1 M durante aproximadamente 50 min. Posteriormente, o hidrogel foi lavado com água deionizada até pH neutro. A nomenclatura  $CHG$ , foi designada para a amostra do hidrogel de quitosana pura.

As NPs obtidas na **Seção 4.4.2** foram adicionadas nos hidrogéis nas concentrações de 6, 25, 13, 5 e 27 % em relação a quantidade mássica de quitosana, e foram incorporadas durante a preparação da solução inicial de quitosana 2,5 % (m/m). Os hidrogéis magnéticos foram preparados seguindo o procedimento descrito para a preparação dos hidrogéis de quitosana pura. As amostras receberam a nomenclatura de *CHF1*, *CHF2* e *CHF3*, respectivamente, e foram produzidas em quadruplicata.

## 4.5 Caracterização das amostras de Nanopartículas e Hidrogéis Magnéticos

### 4.5.1 Difratomia de Raios X

Nesse trabalho, a identificação das fases presentes tanto nas amostras de NPs como nos hidrogéis foram realizadas por difratometria de raios X (DRX), em um difratômetro Shimadzu XRD 7000. O procedimento de medida foi realizado usando radiação  $\text{CuK}_\alpha$  ( $\lambda = 1,5406$ ) e  $\text{MoK}_\alpha$  ( $\lambda = 0,70932$ ) no intervalo de 10 a 70 graus e 10 a 30 graus, respectivamente, com velocidade de varredura igual a 0,5 graus/minuto no modo contínuo. As amostras estavam na forma de pó sobre suporte de alumínio. A identificação das fases nos difratogramas foi realizada por comparação direta com um banco de dados padrão de difração, *International Centre for Diffraction Data (ICDD)*.

### 4.5.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

O estudo da interação dos agentes de recobrimento com a superfície das partículas foi realizado por meio de medidas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). As análises foram realizadas em um espectrofotômetro Bruker Vetex na Central de Análise Avançadas de Materiais -CAM, do Complexo de Apoio a Pesquisa - COMCAP, da Universidade Estadual de Maringá. As amostras foram misturadas com KBr na proporção 2:200 (m/m) e comprimidas em pastilhas. Os espectros foram obtidos no intervalo espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $(\text{cm})^{-1}$ .

Medidas de FTIR também foram realizadas nas amostras de NPMs recobertas com quitosana para incorporação nos hidrogéis em um espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet iS-10 FTIR no laboratório IMP, da Université Claude Bernard Lyon 1, França, nas mesmas configurações descritas a cima.

### 4.5.3 Análise Termogravimétrica

A massa dos agentes de recobrimento na superfície das NPMs foram quantificadas pela degradação térmica das amostras por análise termogravimétrica (TGA - *Thermogravimetric Analysis*) em um equipamento TGA-Q500- TA Instruments, no laboratório IMP, da Université Claude Bernard Lyon 1, França. Além disso, a degradação dos agentes de recobrimentos puros e dos hidrogéis magnéticos também foi realizada. Os termogramas foram obtidos a uma taxa de aquecimento de  $10^\circ \text{C}/\text{min}$  em um intervalo de temperatura de  $30^\circ \text{C}$  a  $700^\circ \text{C}$  em atmosfera de ar.

### 4.5.4 Microscopia Eletrônica

O tamanho e a morfologia das partículas foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) JEOL JEM 1400 que se encontra na Central de Microscopia -CMI, do COMCAP, na Universidade Estadual de Maringá, com uma voltagem de aceleração igual a 120 eV. Para as partículas incorporadas no hidrogel, também foram realizadas medidas de MET em um microscópio Philips CM120 e microscopia eletrônica de alta resolução (MET-AR) JEOL JEM 2100F, com voltagem de acelerações igual a 120 e 200 keV, respectivamente, na *Plateforme de Microscopie Multidisciplinaire* - Université Claude Bernard Lyon 1, França. As amostras de NPMs foram preparadas pingando uma gota da dispersão de interesse, em um *grid* de cobre recoberto com carbono (300 mesh). A distribuição de tamanhos foi calculada a partir da medida dos diâmetros das partículas ( $n = 150$ ) pelo *software* de análise ImageJ. Os tamanhos médios das partículas foram obtidos por meio do ajuste do histograma de tamanho utilizando uma função LogNormal.

### 4.5.5 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta

Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - *DLS*) e Potencial Zeta ( $\zeta$ ) foram realizadas para investigar o tamanho hidrodinâmico e a carga na superfície das NPMs em meio líquido, respectivamente. As medidas foram feitas após a síntese de cada nanopartícula, em uma analisador Litesizer 500 - Anton Paar, sendo os valores de diâmetro e  $\zeta$  médios calculados via *software* Kalliope versão 2.10.6. As amostras foram preparadas com concentração de 0,01 mg/mL em água deionizada e submetida a 10 min em banho ultrassônico.

### 4.5.6 Magnometria de Amostra Vibrante

As curvas de *Zero Field Cooling*-ZFC e *Field Cooling*-FC para a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram medidas em um magnetômetro MPMS SQUID 7T, no Laboratório de Materiais e Baixas Temperaturas, do Instituto de Física Gleb Wataghin - UNICAMP. Para a obtenção da curva ZFC, inicialmente, a amostra foi resfriada a 4 K e em seguida, um campo magnético

constante de 200 Oe foi aplicado enquanto a temperatura era elevada até 300 K. Já para a curva FC, a amostra inicialmente sob a aplicação do campo magnético de 200 Oe a 300 K foi resfriada até a temperatura de 4 K.

Para todas as amostras foram realizadas medidas de histerese magnética em um magnetômetro de amostra vibrante - VSM (*home made*) no Laboratório do Grupo de Desenvolvimento e Inovação em Dispositivos Multifuncionais - GDDM, da Universidade Estadual de Maringá - UEM. As amostras em pó foram condicionadas em um porta amostra e as medidas realizadas à temperatura ambiente ( $\sim 296\text{K}$ ) com campo máximo de 15 kOe.

As histereses magnéticas das amostras de hidrogéis foram realizadas em um VSM *C-MAG Cryogen-FREE Superconducting Magnet System*, na Central de Análises de Matérias Avançadas - CAM - COMCAP, da Universidade Estadual de Maringá. Amostras liofilizadas, com aproximadamente 3 g, foram utilizadas nas medidas realizadas a temperatura de 275 K com campo máximo de 5 kOe.

### 4.5.7 Reologia

O comportamento viscoelástico dos hidrogéis foi analisado, tendo como variáveis resposta, os módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ). As medidas foram realizadas em um reômetro ARES da TA Instruments no laboratório IMP, da Université Claude Bernard Lyon 1, França, com geometria de placas paralelas de 25 mm de diâmetro. As análises foram feitas no regime viscoelástico linear a 25° C, com tensão de 0,5 Pa e a frequência variando de 0,1 a 100 Hz.

## 4.6 Ensaios Biológico

### 4.6.1 Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT

As NPMs com recobrimentos hidrofílicos, quitosana e sílica, foram encaminhadas para o Laboratório de de Mutagênese e Monitoramento Ambiental (LMMA) do Departamento de Ciências Biológicas - UEM e o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos - UEM, respectivamente, para a realização de testes *in vitro*. Estes ensaios fazem parte de um estudo mais detalhado dos efeitos das NPMs em células humanas e ocorreram de forma independente, ambas seguindo a norma internacional padrão de procedimento operacional "*Tests for in vitro cytotoxicity*" da ISO 10993 – 5 : 2009 [91].

A citotoxicidade das amostras de NPMs foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular de redução do MTT, (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio). Esse ensaio foi desenvolvido por Mosmann em 1983 e se baseia na redução do sal tetrazólio (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan de cor violeta,

Figura 4.5. Esses cristais não são solúveis em água, por isso deve-se adicionar uma solução de isopropanol acidificado, DMSO dentre outros para que ocorra a solubilização. A clivagem do anel tetrazólio, ocorre pela enzima succinato desidrogenase que está presente em mitocôndrias ativas, de forma que apenas células vivas podem fazer essa conversão. Dessa forma, a formação da coloração violeta atua como um marcador de células vivas. A quantidade de formazan é obtida pela medida por espectroscopia de absorção no UV-VIS [92,93].

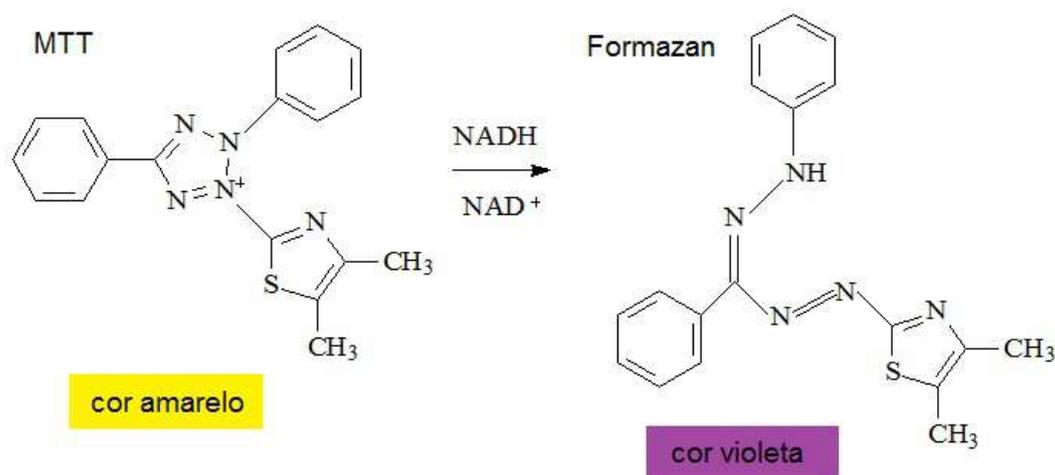


Figura 4.5: Princípio do ensaio de citotoxicidade MTT [94].

As células da linhagem de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) foram cultivadas em meio de cultura celular DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF), em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. Esses frascos foram mantidos nas condições padrão de temperatura e umidade (37° C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade).

A concentração de células em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SBF foi de  $1 \times 10^4$  e  $2,5 \times 10^5$  células/mL para os testes envolvendo as amostras de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CH e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>, respectivamente. Em ambos os testes, a amostra sem recobrimento, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, também foi testada. Dessa forma, foi designado o nome Grupo 1 para o conjunto de amostras Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CH, e Grupo 2 para Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>. As células foram cultivadas em placas de 96 poços.

As células do Grupo 1 foram expostas as NPs de magnetita com concentrações de 0, 75, 1, 5, 3, 12, 6, 25, 12, 5, 25 e 50 µg/mL e mantidas em incubação por 24 e 48h. Para o Grupo 2, as células foram expostas as concentrações de NPs de magnetita de 1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL para os mesmos períodos de incubação. Como controle negativo, foi preparado uma solução do agente citotóxico Doxorrubicina, (DOX, 18 µM), em meio de cultura DMEM.

Após os tratamentos, as suspensões de NPMs foram retiradas e os poços foram lavados com solução tampão fosfato salino. Em seguida, 100 µL da solução do corante MTT

(0,2 mg/mL) em DMEM foi adicionado aos poços. As placas foram protegidas da luz e incubadas por 4h. No final do período, a solução do corante foi descartada e dimetil sulfóxido (DMSO) foi adicionado. As placas foram mantidas protegidas da luz e em agitação por 10 min para homogeneização. A absorvância foi medida em espectrofotômetro leitor de microplacas *Labtech Microplate Reader-LT-4000*, no comprimento de onda de 550 nm.

Para as NPs de magnetita funcionalizadas com DOX,  $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$  e  $Fe_3O_4/CH/DOX$ , o mesmo procedimento foi realizado.

A análise estatística foi realizada no *software GraphPad Prism 8* por análise de variância *one way* (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.6.2 Microscopia Eletrônica

As células tumorais MCF-7, com concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL, foram cultivadas em lamínulas de vidro e colocadas dentro de placas de cultura celular por um período de 24h até o crescimento celular atingir confluência, ou seja, toda a superfície. As células foram expostas por 48 h às concentrações de NPs descritas na **Subseção 4.6.1** para ambos os grupos. Ao final do período, foram lavadas com uma solução tampão de cacodilato de sódio (0,1 M) e fixadas com uma solução de 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio, e mantidas a 4° C por 24 h. Em seguida, as células passaram pelo processo de desidratação gradual com etanol (30%-100%) e foram submetidas a secagem pelo método do ponto crítico com  $CO_2$  no equipamento da Baltec CPD 030. A análise das imagens foi realizada em microscópio eletrônico de feixe duplo FEI SCIOS com voltagem de aceleração igual a 20 kV. Ambos os equipamentos se encontram na Central de Microscopia (CMI) do COMCAP - UEM.

## Resultados e Discussão

### 5.1 Síntese e Modificação da Superfície de Nanopartículas de Óxido de Ferro

#### 5.1.1 Difractometria de Raios X

Foram realizadas medidas de DRX nas amostras de magnetita pura,  $Fe_3O_4$ , Figura 5.1 (a), e nas amostras com modificação da superfície  $Fe_3O_4/AO$ ,  $Fe_3O_4/SiO_2$  e  $Fe_3O_4/CH$ , Figura 5.1 (b), (c) e (d), respectivamente. Para todas as amostras foram observados os padrões de difração característicos das distâncias interplanares de uma estrutura cúbica do tipo espinélio, sendo os ângulos de Bragg e as intensidades relativas semelhantes aos descritos na ficha cristalográfica  $n^\circ$  88-0315 do ICDD para a magnetita. Para o caso da amostra recoberta com sílica, Figura 5.1 (c), nota-se o aparecimento de um halo de difração bastante alargado na região de  $2\theta = 20^\circ - 25^\circ$ , o qual corresponde a difração da camada do óxido de silício descrito na ficha  $n^\circ$  82-1554 do ICDD. Pode-se observar ainda, que a adição dos agentes modificadores da superfície, ácido oleico e TEOS, não causaram nenhuma mudança estrutural nas fases da magnetita. O mesmo ocorreu para a quitosana, que diferente dos outros, esteve presente durante o processo de síntese das NPMs.

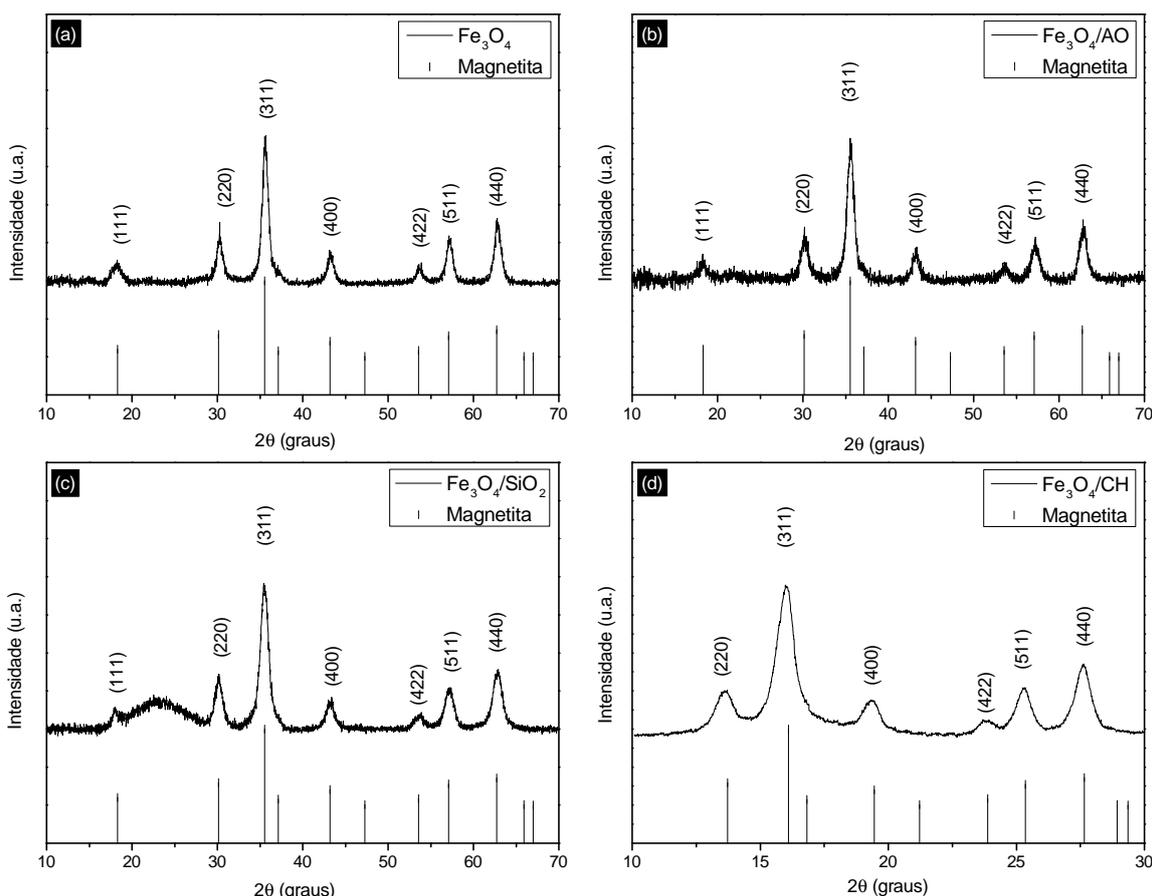
O tamanho médio do cristalito ( $t_c$ ) foi estimado a partir dos padrões de DRX usando a medida da largura a meia altura do plano de reflexão mais intenso (311), aplicando-se a fórmula de Scherrer, Equação 5.1 [95]:

$$t_c = \frac{K\lambda}{b \cos \theta} \quad (5.1)$$

sendo K a constante de Scherrer;  $\lambda$  é comprimento de onda da radiação X utilizada;  $\theta$  o ângulo de Bragg; b o valor da largura a meia altura da reflexão de interesse e deve ser corrigido com relação a largura instrumental. Os valores estão listados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1:** Tamanho médio do cristalito estimado via fórmula de Scherrer.

Amostras	$t_c$ (nm)
$Fe_3O_4$	$10,3 \pm 0,8$
$Fe_3O_4/AO$	$8,8 \pm 0,9$
$Fe_3O_4/SiO_2$	$8,3 \pm 0,6$
$Fe_3O_4/CH$	$5,6 \pm 0,2$

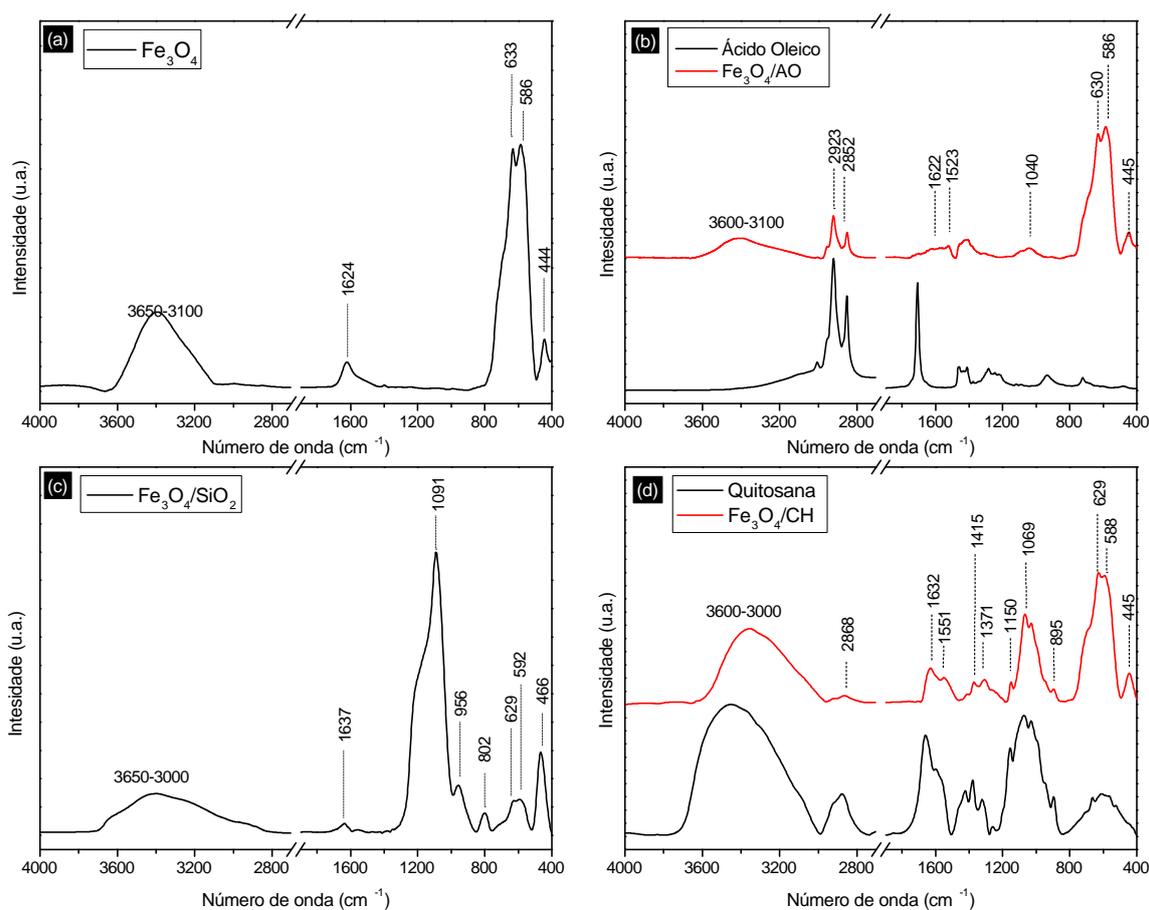
**Figura 5.1:** Difratogramas de raios X das amostras (a)  $Fe_3O_4$ , (b)  $Fe_3O_4/AO$ , (c)  $Fe_3O_4/SiO_2$  e (d)  $Fe_3O_4/CH$ .

Conforme os dados mostrados na Tabela 5.3, observou-se que os valores do tamanho médio do cristalito para a amostra de magnetita pura,  $Fe_3O_4$ , é maior do que para as de magnetita com a superfície modificada. Embora o processo de síntese das nanopartículas seja o mesmo, por coprecipitação, a adição dos agentes modificadores da superfície ocorreram em momentos diferentes na síntese. No caso da amostra  $Fe_3O_4/AO$ , a adição do ácido oleico ocorreu após a precipitação dos núcleos magnéticos, ou seja, após a nucleação das NPs, atuou no controle do crescimento das partículas. Já a amostra  $Fe_3O_4/CH$ , a precipitação das NPs de magnetita foi realizada na presença da quitosana, e nesse caso, a nucleação e crescimento das NPs foram controlados pela arquitetura restrita da solução polimérica [38]. Dessa forma, a solução de quitosana atuou como um nanoreator para a

formação das NPs, e assim, influenciando no tamanho final das NPs. Para a modificação da superfície com sílica, amostra  $Fe_3O_4/SiO_2$ , usou-se as NPMs de magnetita com ácido oleico previamente sintetizadas, dessa forma, o tamanho do cristalito não apresentou modificações.

### 5.1.2 Espectroscopia no Infravermelho

Medidas de FTIR foram realizadas para identificar os grupos funcionais nas NPs de magnetita recobertas com diferentes agentes de superfície, assim como nas NPs pura. A Figura 5.2 apresenta o espectro no infravermelho das amostras  $Fe_3O_4$  (a),  $Fe_3O_4/AO$  (b),  $Fe_3O_4/SiO_2$  (c) e  $Fe_3O_4/CH$  (d). Em todos os espectros da Figura 5.2, a presença da absorção referente a ligação  $Fe - O$  das NPMs de magnetita pode ser identificada, respectivamente, pelas bandas de absorção em (a) 444, (b) 445, (c) 466 e (d) 445  $cm^{-1}$ , referente à vibração de estiramento  $\nu_1$  no sítio octaédrico. Assim como, pelas bandas nas regiões de (a) 633 e 586, (b) 630 e 586, (c) 629 e 592 e (d) 629 e 588  $cm^{-1}$ , referentes à vibração de estiramento  $\nu_2$  nos sítios tetraédricos e octaédricos, respectivamente [96].

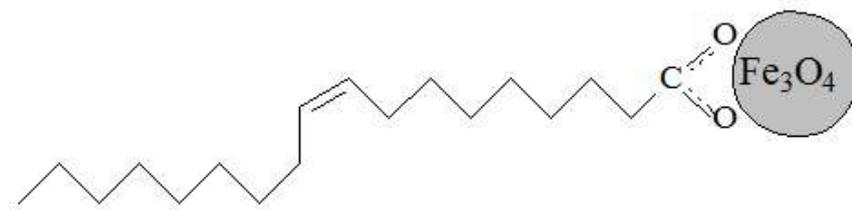


**Figura 5.2:** Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras  $Fe_3O_4$  com diferentes recobrimentos. Sendo os espectros em (a)  $Fe_3O_4/AO$  e Ácido oleico puro (b)  $Fe_3O_4/SiO_2$  e em (c)  $Fe_3O_4/CH$  e quitosana pura.

Quando comparadas com as bandas de absorção ( $375$  e  $570$   $cm^{-1}$ ) da ligação  $Fe - O$  da magnetita em *bulk*, é possível verificar o deslocamento dessas bandas para números

de onda maiores, o qual é decorrente, principalmente, da quebra de um grande número de ligações entre os átomos na superfície das NPMs, resultando em um rearranjo dos elétrons. Assim, conforme o tamanho das partículas de magnetita é reduzido, ocorre um aumento na constante de força das ligações químicas na superfície e as bandas de absorção da ligação  $Fe - O$  são deslocadas para números de ondas maiores [97]. No espectro da Figura 5.2 (a), além da ligação de  $Fe - O$ , duas bandas referentes a ligação  $H - O$ , centradas em  $3394$  e  $1624\text{ cm}^{-1}$  estão presentes. Isso ocorre porque durante a síntese das NPs por coprecipitação, a superfície das NPMs pode ser coberta por grupos hidroxil do meio aquoso [86].

Na Figura 5.2 (b), amostra recoberta com ácido oleico, duas bandas características do estiramento assimétrico ( $\nu_{ass}$ ) e simétrico ( $\nu_{sim}$ ) do grupo  $CH_2$  aparecem em  $2923$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. A banda na região de  $3423\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento do grupo  $O - H$ . A presença da banda em  $1705\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento  $C = O$  do grupo carboxil, indicando que deve haver uma quantidade remanescente de ácido oleico livre [33]. As bandas em  $1523$  e  $1622\text{ cm}^{-1}$  são características das vibrações de estiramentos  $\nu_{ass}$  e  $\nu_{sim}$  do grupo carboxilato,  $COO^-$ , indicando que o padrão de ligação do ácido carboxílico na superfície das NPMs é uma combinação de moléculas ligadas simetricamente ou com um determinado ângulo com a superfície. A banda de absorção na região de  $1040\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento de uma ligação simples  $C - O$ . Esses resultados indicam que o ácido oleico está quimissorvido nas NPMs de magnetita na forma de carboxilatos. O tipo de interação entre os grupos carboxilatos e a superfície das NPMs pode ser determinado pela separação do número de onda,  $\Delta\nu$ , entre as bandas de estiramentos simétricos e antissimétricos do grupo  $COO^-$ . Neste trabalho, o valor de  $\Delta\nu$  ( $1622 - 1523 = 99\text{ cm}^{-1}$ ) foi atribuído ao de um quelante bidentado, onde a interação entre o grupo  $COO^-$  e os átomos de Fe é covalente [32].

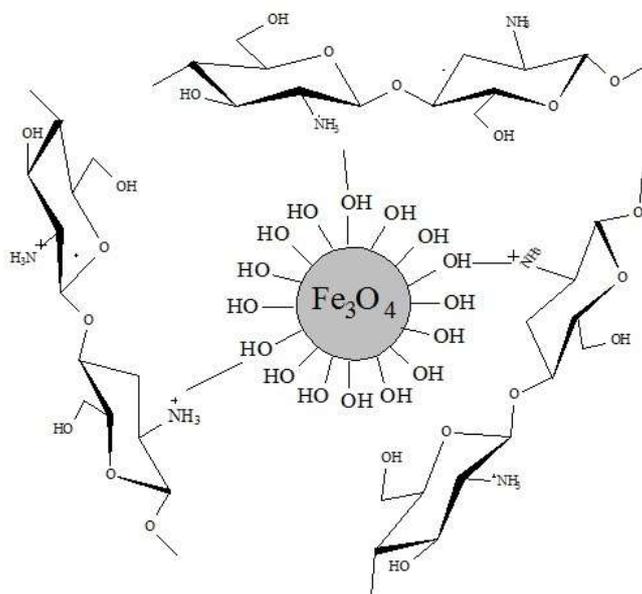


**Figura 5.3:** Ilustração do quelante bidentado adaptado da referência [32].

No espectro da amostra recoberta com sílica, Figura 5.2 (c), foi possível verificar a presença da camada de sílica pelas bandas de absorção características do grupo silanol  $Si-O$  nas regiões de  $956$  e  $802\text{ cm}^{-1}$  e do grupo siloxano  $Si-O-Si$  na região de  $1091\text{ cm}^{-1}$ , indicando a condensação do TEOS na superfície das NPMs [98]. Além disso, foi possível observar o deslocamento da banda de absorção característica do estiramento  $Fe - O$  de  $586\text{ cm}^{-1}$  para  $592\text{ cm}^{-1}$ . Para que ocorra a formação da ligação  $Fe - O - Si$ , deve haver

uma substituição do  $-H$  dos grupos  $Fe - O - H$  pelos grupos  $Fe(SiO-)$ , formando  $Fe - O - (SiO-)_2-$  na superfície das NPMs. Essa substituição, por um grupo mais eletronegativo, faz com que a banda nessa região sofra um deslocamento para números de onda mais altos [97]. As regiões  $3396$  e  $1637\text{ cm}^{-1}$  são referentes ao grupo hidroxil.

No espectro da amostra recoberta com quitosana, Figura 5.2 (d), a banda larga na região  $3600 - 3000\text{ cm}^{-1}$  é devido a sobreposição de vibrações de estiramento da ligação hidroxil  $O - H$  e do grupo amina  $N - H$ . A vibração de estiramento da ligação  $C - H$  dos grupos metil alifáticos aparece em  $2868\text{ cm}^{-1}$ . As bandas intensas na região de  $1632$  e  $1551\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento  $C = O$  dos grupos amida (amida I) e a sobreposição das vibrações de estiramento da ligação  $N - H$  das aminas primárias e do grupo amida (amida II), respectivamente. A banda em  $1415\text{ cm}^{-1}$  é referente ao estiramento da ligação  $O - H$  dos álcoois primários e da deformação angular da ligação  $C - H$  presentes no anel e a banda em  $1371\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento da ligação  $C - N$ . A ligação glicosídica  $\beta(1 \rightarrow 4)$  da estrutura sacarídea da quitosana referente a vibração de estiramento  $C - O - C$  aparece na região de  $1150$  e  $895\text{ cm}^{-1}$ . A banda em  $1069\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento  $C - O - C$  no anel [90, 99, 100]. A Figura 5.4 ilustra a interação das moléculas de quitosana com a superfície das NPMs, a qual é predominantemente eletrostática e é caracterizada pela interação entre o grupo amina protonado ( $-NH_3^+$ ) e o grupo ( $-OH^-$ ) [101].



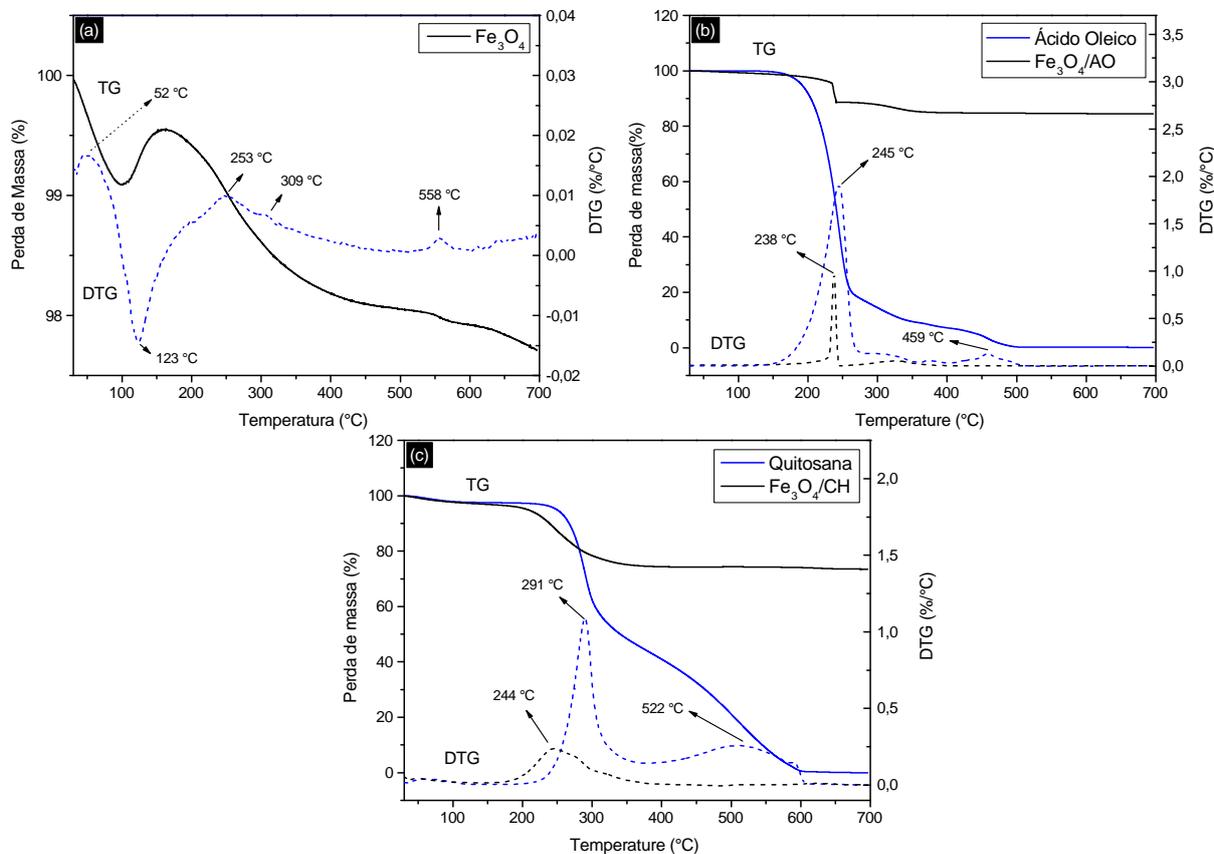
**Figura 5.4:** Representação esquemática da interação entre as moléculas de quitosana e as NPMs [101].

### 5.1.3 Análise Termogravimétrica

As medidas de TGA fornecem uma evidência quantitativa adicional do recobrimento das NPMs de magnetita. Na Figura 5.5, estão apresentadas os termogramas (TG) e

a derivada da perda de massa (DTG) para as amostras  $Fe_3O_4$  (a),  $Fe_3O_4/AO$  (b) e  $Fe_3O_4/CH$ , as duas últimas juntamente com os precursores do recobrimento, ácido oleico e quitosana, respectivamente.

Para a amostra de  $Fe_3O_4$ , Figura 5.5 (a), a primeira perda de massa de 0,31 %, é devido a evaporação de água adsorvida na superfície das partículas e ocorre no intervalo de temperatura entre 30 e 100 °C, com máximo de variação no DTG em 52 °C. Como o processo ocorre em atmosfera de ar, a magnetita é rapidamente oxidada. Primeiramente, ocorre a oxidação de magnetita para maguemita. É possível visualizar o ganho de massa na curva de TG, com um máximo no DTG em 123 °C. O subsequentes perdas de massa são referentes a perda de  $-OH$  estrutural, com máximo nas temperaturas de 248 e 308 °C, visto na curvas de DTG. A oxidação da maguemita em hematita ocorre em temperatura superior a 550 °C e pode ser seguida de perda de  $-OH$  estrutural. É possível observar uma perda de massa em 558 °C no DTG, que pode estar relacionada a transformação de fase da hematita, entretanto análises complementares devem ser realizadas para esta confirmação, pois por DTG não é possível visualizar um ganho de massa evidente referente a um processo de oxidação [102, 103]. Dessa forma, a perda de massa total da amostra foi de 2,26 %. A Figura 5.6, mostra as NPMs de  $Fe_3O_4$  antes do experimento de TGA, com uma coloração preta, e depois, com cor avermelhada característica de óxidos com íons  $Fe^{+3}$ .



**Figura 5.5:** Curvas termogravimétricas para as amostras (a)  $Fe_3O_4$ , (b)  $Fe_3O_4/AO$  e (c)  $Fe_3O_4/CH$ .

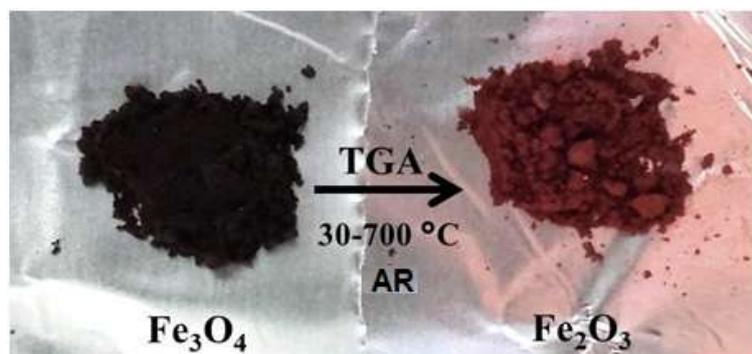


Figura 5.6: Imagens das NPMs antes e após a realização do experimento de TGA.

Na Figura 5.5 (b), o ácido oleico puro começa a se degradar em 176 °C, com uma taxa máxima no DTG em 245 °C, e em 600 °C está completamente degradado. Uma perda de massa equivalente a 79,33 % é decorrente da degradação da cadeia carbônica, a partir disso ocorre a oxidação dos resíduos de carbono até a decomposição completa. Já na presença das NPs de magnetita, a degradação do ácido oleico acontece a partir de 200 °C, com máxima perda no DTG em 238 °C e completando sua degradação em 400 °C, com uma perda de massa de 18,42 %. Esse comportamento é similar aos encontrados na literatura para NPs de magnetita recobertas com ácido oleico [32,86].

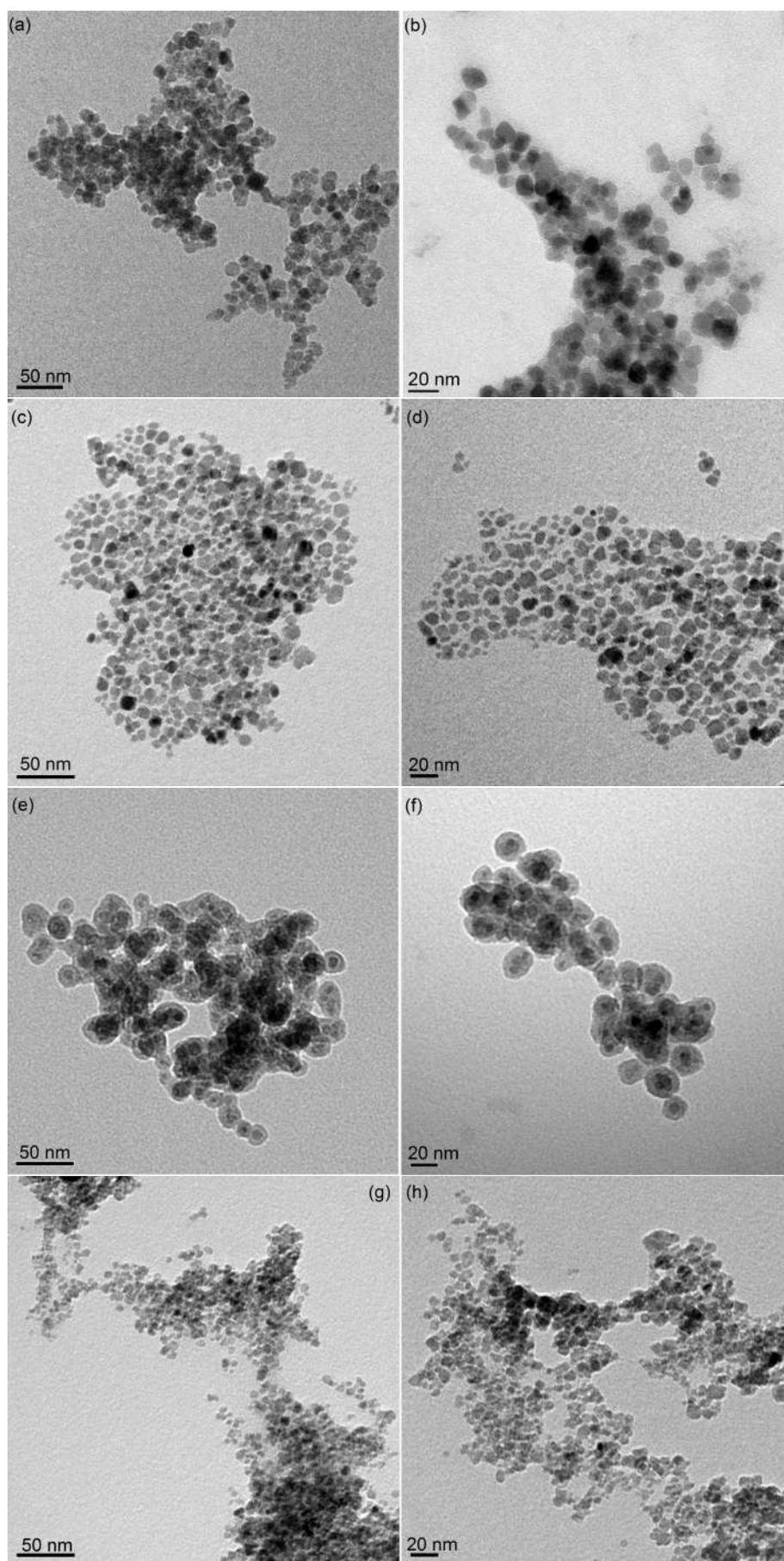
Na Figura 5.5 (c), a decomposição do polímero quitosana ocorre em três estágios. O primeiro, entre 30 e 100 °C, corresponde a perda de massa de 2,35 % e está associada a perda de água adsorvida nas moléculas. No segundo estágio, entre 200 e 350 °C, com variação máxima no DTG em 291 °C, uma perda de massa de 56,46 % está relacionada a desidratação, despolimerização e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero. No último estágio entre 350 e 600 °C ocorre a decomposição oxidativa dos resíduos carbonáceos do polímero, com perda de massa de 41,19 % [100, 104, 105]. Na amostra  $Fe_3O_4/CH$ , a perda de água inicial corresponde a 3,13 % da massa total. A degradação da quitosana na superfície das NPMs ocorreu no intervalo entre 150 e 400 °C, com uma variação de máxima perda em 244 °C. Nessa etapa, a quantidade de perda de massa foi equivalente a 29,96 % da massa total. Resultados semelhantes são reportados na literatura para NPMs de magnetita recoberta com quitosana, podendo ocorrer variações na temperatura de máxima perda de massa devido a diferentes tipos e quantidades de quitosana utilizada, bem como dos procedimentos prévios realizados nas amostras [105–107].

Para a amostra  $Fe_3O_4/SiO_2$ , a medida de TG não foi realizada devido as reações térmicas levarem a diferentes polimorfismos do  $SiO_2$ , sendo a perda de massa devido somente a água adsorvida na superfície das NPMs [102].

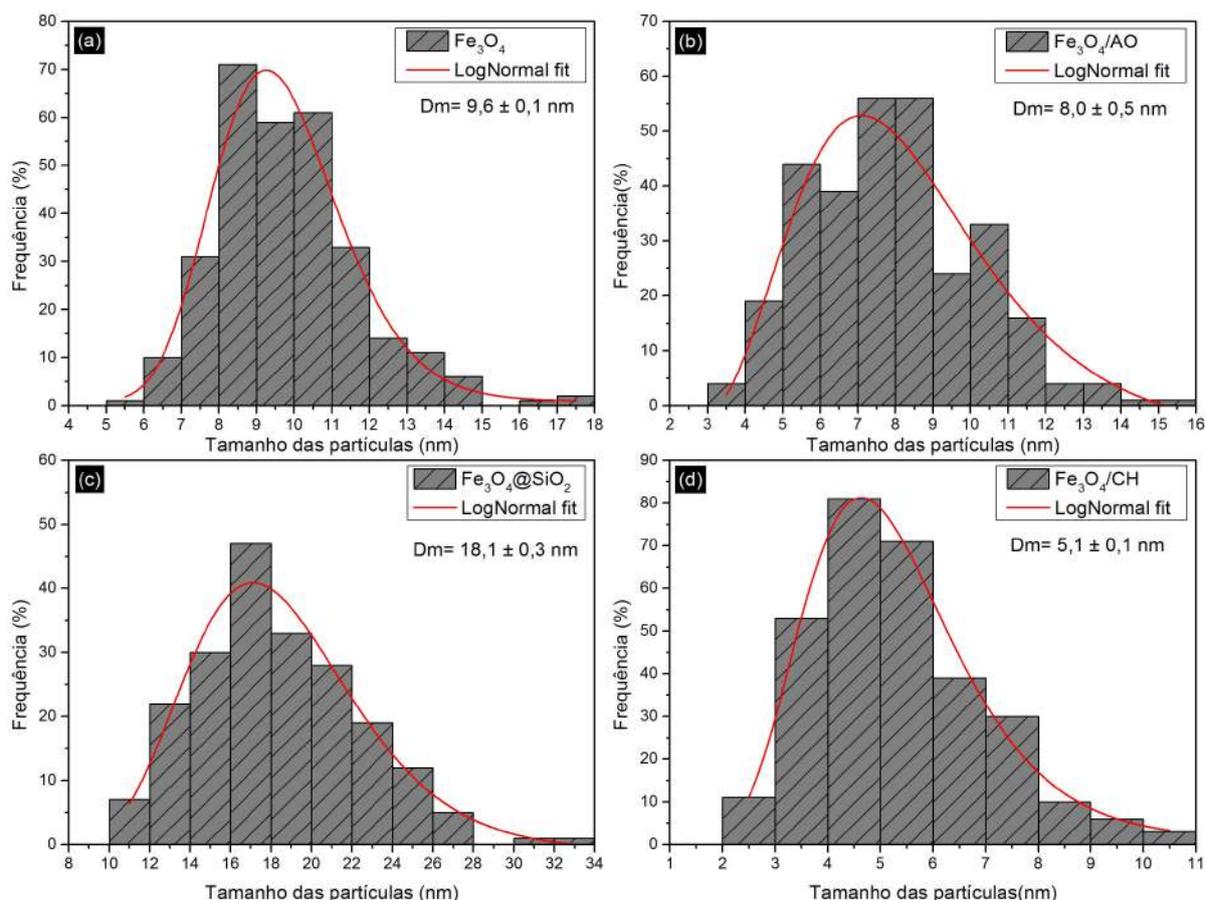
### 5.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas com o intuito de obter informações diretas sobre o tamanho e a morfologia das partículas de magnetita pura bem como das partículas com diferentes recobrimentos de superfície. Na Figura 5.7 são apresentadas as imagens das amostras  $Fe_3O_4$  (a,b),  $Fe_3O_4/AO$  (c,d),  $Fe_3O_4/SiO_2$  (e,f) e  $Fe_3O_4/CH$  (g,h), respectivamente. De uma forma geral, é possível observar, que as nanopartículas apresentam morfologia aproximadamente esférica. Além disso, fica evidente o efeito do recobrimento da superfície. Nas partículas de magnetita pura, Figura 5.7 (a,b), é possível verificar a formação de aglomerados e agregados, e isso ocorre devido a forças atrativas, principalmente de van der Waals, entre as NPMs [38, 108]. Na Figura 5.7 (c,d) é possível observar a barreira promovida pela adição do ácido oleico na superfície das partículas evitando a formação de aglomerados. Na Figura 5.7 (e,f) é possível verificar a formação da estrutura caroço/casca, onde o núcleo magnético, com maior contraste, é recoberto por sílica, com um contraste menos intenso. Na Figura 5.7 (g,h), fica evidente a diminuição do tamanho das partículas quando comparadas com as nanopartículas de magnetita pura com o mesmo valor de magnificação, entretanto, não é possível visualizar a camada de quitosana na superfície das nanopartículas. Apesar da presença dos recobrimentos ajudarem na dispersão das nanopartículas em maior ou menor grau dependendo das características do agente escolhido, ainda é possível observar que os tamanhos das partículas não são uniformes, sendo estes uma das desvantagens da síntese por coprecipitação.

A Figura 5.8 mostra os gráficos de histograma de tamanho para as amostras  $Fe_3O_4$  (a),  $Fe_3O_4/AO$  (b),  $Fe_3O_4/SiO_2$  (c) e  $Fe_3O_4/CH$  (d), correspondendo a uma distribuição logNormal com valores de diâmetro médio ( $D_m$ ) igual a  $9,6 \pm 0,1$  nm,  $8,0 \pm 0,5$  nm,  $18,1 \pm 0,3$  nm e  $5,1 \pm 0,1$  nm, respectivamente. Esses valores estão de acordo com os do tamanho de cristalito obtidos por DRX, com exceção da amostra  $Fe_3O_4/SiO_2$ , a qual engloba a esse valor a espessura da casca de sílica. Para essa amostra foi estimado a espessura da camada de sílica, onde usou-se o  $D_m$  das partículas da amostra  $Fe_3O_4/AO$ , as quais foram utilizadas como o núcleo magnético para a síntese de modificação da superfície, e obteve-se um valor de aproximadamente 5 nm de espessura de sílica.



**Figura 5.7:** Microscopia eletrônica de transmissão das NPs de magnetita sem recobrimento, amostra  $Fe_3O_4$  (a,b), e com o recobrimento da superfície, amostras  $Fe_3O_4/AO$  (c,d),  $Fe_3O_4/SiO_2$  (e,f) e  $Fe_3O_4/CH$  (g,h).



**Figura 5.8:** Histogramas de distribuição de tamanho das NPs de magnetita sem recobrimento, amostra  $Fe_3O_4$  (a,b), e com o recobrimento da superfície, amostras  $Fe_3O_4/AO$  (c,d),  $Fe_3O_4/SiO_2$  (e,f) e  $Fe_3O_4/CH$  (g,h).

### 5.1.5 Espalhamento de Luz Dinâmico e Potencial Zeta

Os diâmetros hidrodinâmicos médios ( $D_h$ ) e os índices de polidispersão (PDI) das amostras  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4/AO$ ,  $Fe_3O_4/SiO_2$  e  $Fe_3O_4/CH$  estão apresentados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2:** Valores de  $D_h$ , PDI e  $\zeta$  para as amostras sintetizadas.

Amostras	$D_h$ (nm)	PDI (%)	$\zeta$ (eV)
$Fe_3O_4$	1395,2	13,9	$-17,9 \pm 0,7$
$Fe_3O_4/AO$	64,4	23,5	—
$Fe_3O_4/SiO_2$	253,0	23,5	$-28,1 \pm 0,5$
$Fe_3O_4/CH$	293,3	24,4	$+24,6 \pm 2,15$

Com o estudo dos valores de  $D_h$ , é possível verificar que a presença de uma camada de recobrimento na superfície das NPMs influencia diretamente na distribuição de tamanho das mesmas. Esses valores englobam o tamanho da cauda do surfactante/polímero na superfície, além de apresentarem um tamanho maior, entre 2 - 10 nm, que o normal, por terem sido medidas em água deionizada. A ausência de íons falha em proteger as

partículas de interações de longa distância. Os valores de PDI entre 10 e 40, indicam que as NPMs apresentam uma polidispersão moderada [109].

O  $\zeta$  foi medido para as amostras de NPMs sem recobrimento,  $Fe_3O_4$ , e com os recobrimentos de sílica e quitosana,  $Fe_3O_4/SiO_2$  e  $Fe_3O_4/CH$ , uma vez que essas NPMs tem potencial para serem aplicadas como carreadoras de fármacos. Os valores obtidos para as amostras estão apresentados na Tabela 5.2. As medidas do  $\zeta$  são importantes para o estudo da estabilidade das suspensões das NPMs, principalmente a estabilização eletrostática. Para a amostra  $Fe_3O_4$ , a carga negativa é devido a desprotonação da hidroxila no meio aquoso em pH neutro. As partículas são consideradas relativamente estáveis, pois seu valor se encontra entre  $\pm 10$  e  $20$  eV [109]. Esse resultado está de acordo com as medidas de tamanho por DLS, que sugere a formação de aglomerados de nanopartículas. Para as amostras  $Fe_3O_4/SiO_2$  e  $Fe_3O_4/CH$ , a presença do recobrimento produziu um aumento significativo na magnitude do  $\zeta$ , provando que a adição de um agente estabilizador é essencial para se obter um sistema coloidal estável. Os valores obtidos estão entre  $\pm 20$  e  $30$  eV [109], sendo considerados moderadamente estáveis. Para a amostra  $Fe_3O_4/SiO_2$ , o recobrimento de sílica levou a um aumento na densidade de cargas na superfície das NPMs, mas não promove uma estabilização estérica, sendo somente a estabilização eletrostática presente. O valor negativo é devido a desprotonação da hidroxila no meio aquoso em pH neutro. Já para a amostra  $Fe_3O_4/CH$ , o valor positivo ocorre devido a protonação do amina da quitosana, confirmando seu caráter policatiónico. O recobrimento da superfície das NPs de magnetita com esse polímero leva a um impedimento de aglomeração tanto estérico, devido as cadeias do polímero, como a uma repulsão eletrostática gerada pelas cargas nas cadeias carbônicas [110]. É importante ressaltar, que esse valores são muito sensíveis a variação do pH e força iônica do meio [109, 110]. Além disso, a confirmação da carga positiva nas NPs de magnetita reforça a ideia de uma conjugação eletrostática entre o polímero quitosana e a superfície das NPMs.

### 5.1.6 Magnetometria de Amostra Vibrante

A Figura 5.9 mostra a dependência da magnetização em função da temperatura para a amostra  $Fe_3O_4$ , por meio das curvas de ZFC e FC sob a aplicação de um campo magnético de 200 Oe. A temperatura de bloqueio  $T_B$  é determinada pela derivada da diferença entre as magnetizações de ZFC e FC em função da temperatura [111], que para essa amostra, foi de aproximadamente 177 K, bem abaixo da temperatura ambiente. Isso quer dizer que, a baixo dessa temperatura, as partículas estão "bloqueadas" ou termicamente estáveis, e acima dessa temperatura são classificadas como superparamagnética (SPM), uma vez que as flutuações térmicas sejam grandes o suficiente para fazer com que a magnetização média do tempo seja zero, na ausência de campo externo aplicado [112]. Como a medida foi realizada na amostra em pó, a interação interpartículas bem como a distribuição de

tamanho das partículas, tem influência na curva ZFC podendo provocar o deslocamento de  $T_B$  e o alargamento da curva [113–115].

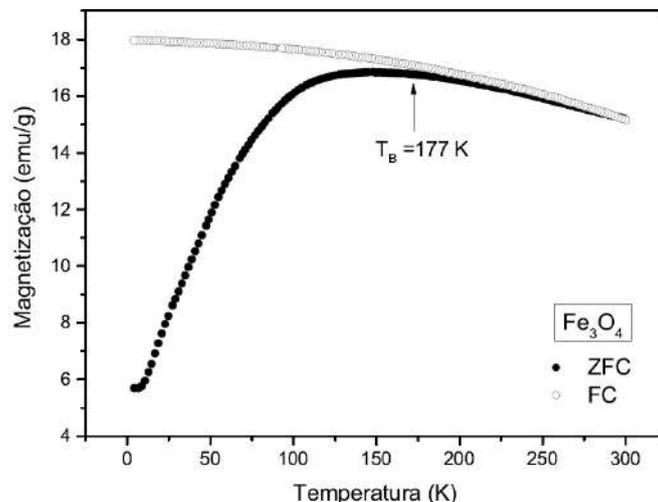


Figura 5.9: Medida de magnetização ZFC-FC para a amostra  $Fe_3O_4$ .

A Figura 5.10 apresenta as curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado para as amostras  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4/AO$ ,  $Fe_3O_4/CH$  e  $Fe_3O_4/SiO_2$ . Para todas as amostras constatou-se a ausência de histerese magnética, ou seja, não foi observado coercividade e remanência, sugerindo que as nanopartículas possuem um caráter superparamagnético em temperatura ambiente (296 K). Essa similaridade nas curvas das amostras com recobrimento em relação a amostra sem recobrimento indica que a modificação da superfície não altera a característica superparamagnética das NPs de magnetita. Os valores de magnetização de saturação ( $M_s$ ) encontrados foram 63,8, 58,9, 42,7 e 18,2 emu/g, respectivamente.

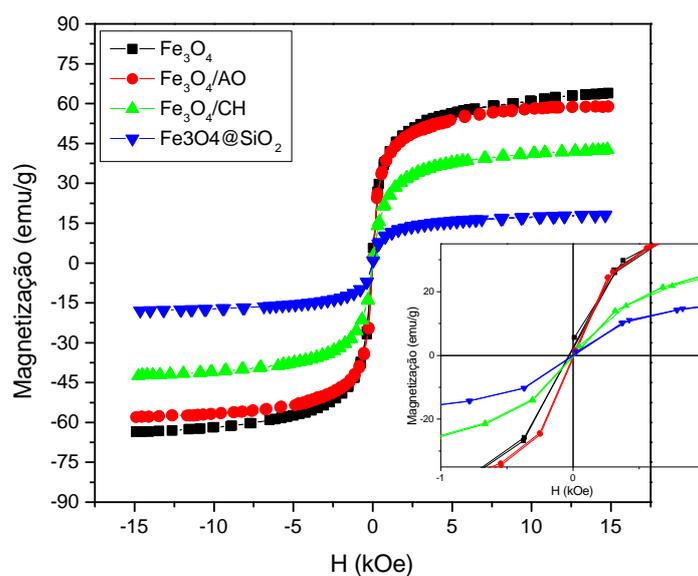


Figura 5.10: Curvas de Magnetização vs Campo Magnético das amostras  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4/AO$ ,  $Fe_3O_4/CH$  e  $Fe_3O_4@SiO_2$ . O destaque ao lado direito da imagem corresponde às magnetizações em uma escala de baixo campo magnético.

O valor de  $M_s$  para a amostra  $Fe_3O_4$  é menor que o encontrado para a magnetita em *bulk* (92,0 emu/g) e isso pode estar associado a diminuição do tamanho das partículas, a qual gera efeitos de superfície, tal como uma camada magneticamente inerte contendo *spins* inclinados e não colineares com o campo magnético [86]. Além disso, para as NPMs com recobrimento, parte dessa redução pode ser atribuída a presença das moléculas orgânicas na superfície das NPMs que aumenta a distância entre as partículas, o que provoca uma diminuição nas interações entre os núcleos magnéticos. Os valores de  $M_s$  para as amostras de magnetita recoberta com ácido oleico e quitosana podem variar dependendo da quantidade do surfactante/polímero utilizado além das condições de síntese empregadas. Neste trabalho, os valores de  $M_s$  encontrados para as amostras  $Fe_3O_4/AO$  e  $Fe_3O_4/CH$ , estão próximos aos valores reportados na literatura [86,106]. Para a amostra  $Fe_3O_4/SiO_2$ , o valor de  $M_s$  encontrado corresponde a  $\sim 29\%$  do valor de  $M_s$  da amostra sem recobrimento, e isso ocorre, principalmente, devido a presença da camada de sílica que esta recobrindo o núcleo magnético, que é um material não magnético, e não contribui para a magnetização das NPMs [98]. Além disso, a espessura da camada de sílica, a qual pode ser controlada nas condições de síntese empregadas, pode influenciar no valor de  $M_s$  obtida.

Para a realização do experimento, a medida da massa da amostra engloba tanto o núcleo magnético quanto o recobrimento das NPMs e isso resulta em diferenças no valor de  $M_s$ , visto que a quantidade do núcleo magnético não é a mesma. Dessa forma, por meio dos valores de perda de massa obtidos por TGA, pôde-se normalizar os valores de magnetização ( $M_s n$ ) e encontrar os valores para os núcleos magnéticos, os quais estão apresentados na Tabela 5.3. Esses resultados mostram que o recobrimento tende a proteger o núcleo magnético de degrada-se, sendo essa proteção mais acentuada no recobrimento com o ácido oleico, que é hidrofóbico, do que com o polímero de quitosana, que é hidrofílico. Nesse trabalho, não pode-se inferir a influência da camada de sílica.

**Tabela 5.3:** Valores de  $M$  obtidos no experimento e de  $M_n$  normalizados pela massa do recobrimento.

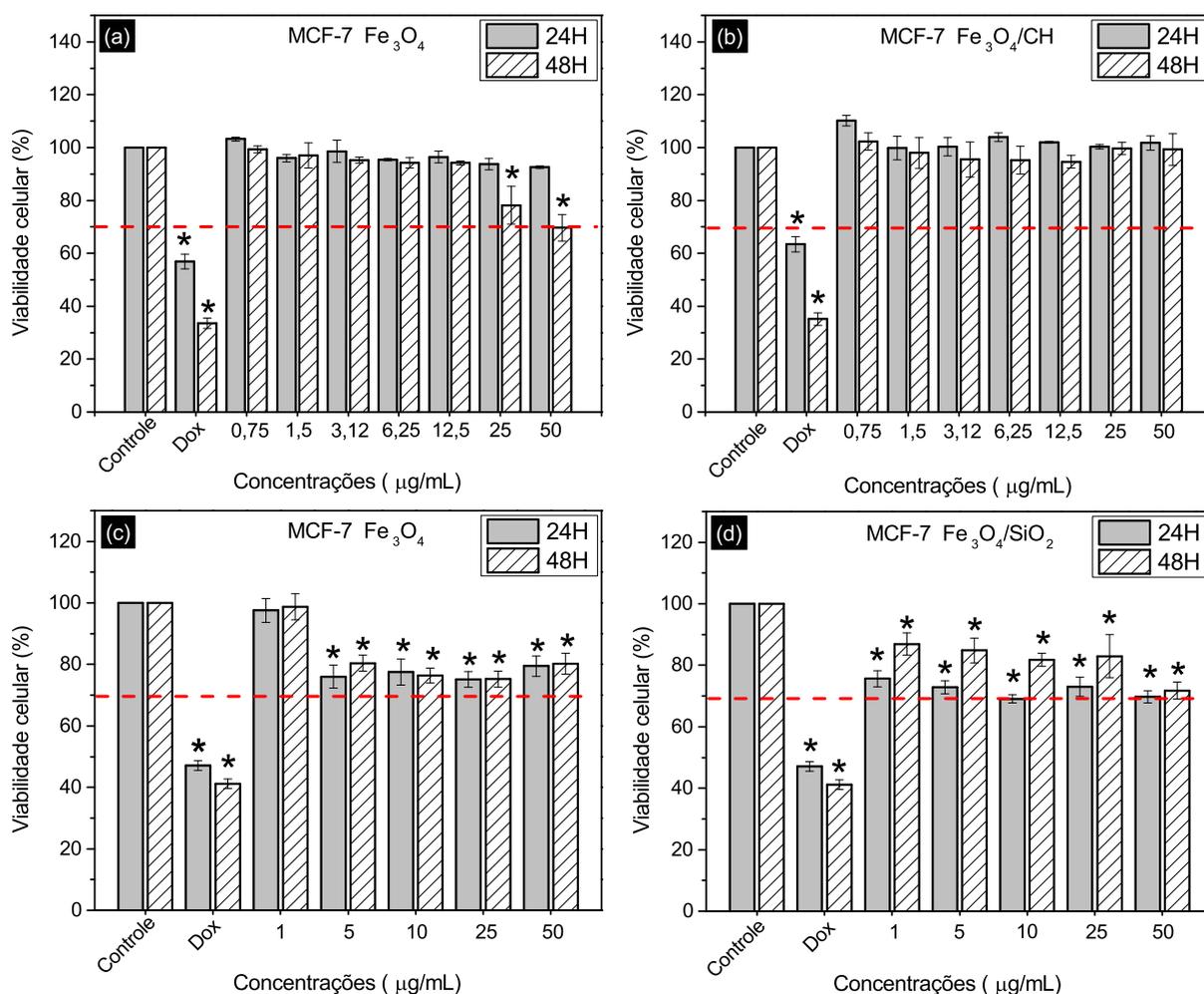
Amostras	$M$ (emu/g)	$M_n$ (emu/g)
$Fe_3O_4$	63, 8	63, 8
$Fe_3O_4/AO$	58, 9	72, 3
$Fe_3O_4/CH$	42, 7	60, 2
$Fe_3O_4/SiO_2$	18, 2	--

## 5.2 Ensaios Biológicos

### 5.2.1 Ensaio de citotoxicidade utilizando MTT

O teste colorimétrico do MTT foi utilizado para investigar se as NPMs da amostra  $Fe_3O_4/CH$ , (Grupo 1), e  $Fe_3O_4/SiO_2$ , (Grupo 2), **Subseção 4.6.1**, apresentam citotoxicidade em células MCF-7, sendo os resultados apresentados na Figura 5.11.

As NPMs de magnetita sem recobrimento do Grupo 1,  $Fe_3O_4$ , Figura 5.11 (a), não apresentaram redução significativa da viabilidade celular no período de 24 h em relação ao controle. Entretanto, no período de 48 h, as maiores concentrações, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , apresentaram resultados estatisticamente significativos, com valores de 78,1 % e 69,7 % da viabilidade celular, respectivamente. De acordo com a Norma ISO 10993-5 : 2009 [91], a qual estabelece um limite de 70% da viabilidade celular para caracterizar um efeito citotóxico (linha tracejada em vermelho), apenas a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  tem indícios de citotoxicidade. Para a amostra  $Fe_3O_4/CH$ , Figura 5.11 (b), em ambos os períodos de incubação não foi observado citotoxicidade das NPMs em células MCF-7.



**Figura 5.11:** Ensaio do MTT em células tumorais MCF-7 expostas as NPMs do Grupo 1 (a,b) e Grupo 2 (c,d). \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0.05$ ). (---) Norma ISO 10993 – 5 : 2009.

A redução da viabilidade celular presente nos tratamentos com 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  da amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  é decorrente da superfície reativa das NPMs. Após entrar nas células, as NPMs são degradadas na forma de íons por enzimas presente nos lisossomos. O processo metabólico produz espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido e o peróxido de hidrogênio. Com isso, a presença de íons  $\text{Fe}^{2+}$ , por meio de reações *Fenton*, aumentam a formação de ROS alterando as funções mitocondriais e de outras organelas e assim, induzindo vias de sinalização celular que levam à ativação de sinais inflamatórios. A geração de ROS é normalmente contrabalanceada por enzimas antioxidantes ou outras moléculas, entretanto, altos níveis de ROS acarretam em estresse oxidativo, ou seja, provocam uma lesão celular e por fim, a morte das células [116]. Dessa forma, o recobrimento se torna fundamental para as aplicações biomédicas.

Para as NPMs do Grupo 2, tanto a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Figura 5.11 (c), como a  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , Figura 5.11 (d), apresentaram redução estatisticamente significativa na viabilidade celular das células MCF-7 em relação ao controle. Entretanto, para a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Figura 5.11 (c), a viabilidade possui valores que variam de 75-97 % não sendo consideradas citotóxicas. Já para a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ , Figura 5.11 (d), no período de incubação de 24 h, as concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram efeitos citotóxicos, e no período de 48 h, apenas a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  foi citotóxica.

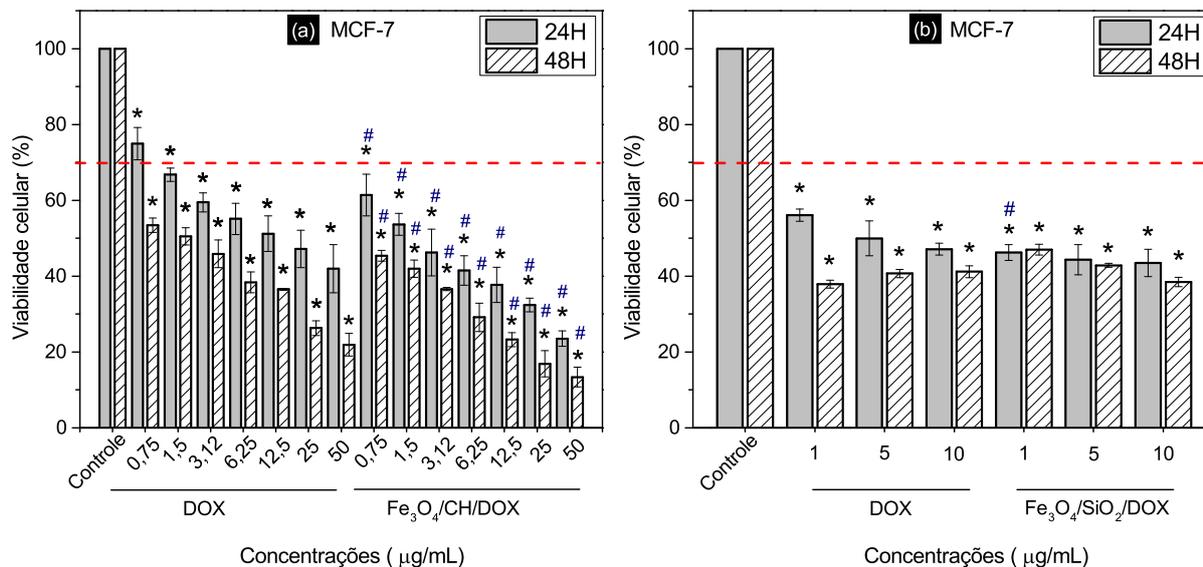
Embora a cobertura de sílica proteja a interação do núcleo magnético com as células, os resultados de viabilidade celular apresentaram oscilações entre os dois períodos de tempo, indicando que após 24h as células tumorais se recuperam e voltam ao seu metabolismo normal.

A citotoxicidade das amostras funcionalizadas com o fármaco,  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CH}/\text{DOX}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{DOX}$ , em comparação com a DOX livre foi investigada em células da linhagem MCF-7. A eficiência do carregamento foi igual a 47% e 69%, respectivamente. Essa eficiência foi calculada pela Equação 4.1, a partir da quantidade de DOX remanescente nas soluções sobrenadantes do processo de funcionalização, obtidas por medidas de absorvância no UV-VIS.

Assim como as NPMs, as propriedades da molécula de DOX em solução, Figura, são dependentes do pH do meio. Os grupos amino presente na estrutura são facilmente protonados em pH ácido. Já em pH neutro e levemente básico, a presença de moléculas neutras começam a se tornar predominantes. Dessa forma, como a funcionalização do fármaco DOX foi realizada em meio com pH neutro, ambas as partículas como também a molécula de DOX, estão presentes em partes na forma neutra e em outras ionizadas, sendo a conjugação da molécula em ambas as amostras um misto de interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio [117–119].

Os gráficos de viabilidade celular pelo ensaio do MTT estão apresentadas na Figura 5.12 (a) e (b), para as concentrações de DOX e NPMs estabelecidas nos Grupo 1 e 2, respectivamente. Na Figura 5.12 (a), é possível verificar que ocorreu uma diminuição

da viabilidade celular em relação ao controle estatisticamente significativa, para todas as concentrações das amostras de DOX livre e  $Fe_3O_4/CH/DOX$ , além de refletir um decaimento tempo-dependente em nível de metabolismo celular. É importante destacar que, para a amostra  $Fe_3O_4/CH/DOX$ , a viabilidade celular reduziu de maneira significativa em relação as respectivas concentrações de DOX livre. Esse resultado sugere que as NPMs facilitaram a internalização do fármaco aumentando sua eficiência [106].



**Figura 5.12:** Ensaio do MTT em células tumorais MCF-7 expostas as NPMs do Grupos 1 (a,b) e Grupo 2 (c,d). \*Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0.05$ ). # Diferença estatisticamente significativa em relação a concentração de DOX correspondente ( $p < 0.05$ ). (---) Norma ISO 10993 – 5 : 2009.

Para os tratamentos mostrados na Figura 5.12 (b), também houve uma diminuição significativa da viabilidade celular em relação ao controle, para todas as concentrações, em ambos os períodos de incubação. No período de 24h, a concentração de 1 µg/mL da amostra de NPMs,  $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$ , foi a única dosagem que apresentou uma diferença significativa em relação a mesma concentração de DOX livre. Para o restante, a eficiência das NPMs carregadas foi semelhante a de DOX livre.

É interessante destacar, que ambos os ensaios foram realizados em meio com pH de 7,4. Assim como no carregamento do fármaco, a liberação é afetada pelo valor do pH do meio. Trabalhos na literatura reportaram que a liberação do fármaco DOX é facilitada em pH ácido para ambos os recobrimentos [106, 119, 120].

Com base nesses resultados, fica evidente o efeito citotóxico que o fármaco DOX provoca nas células tumorais MCF-7 quando carregadas pelas NPMs. Esse fato fornece benefícios para as aplicações de controle e liberação de fármacos, principalmente por envolver a diminuição da dosagem do fármaco e a liberação local no órgão alvo mediada pela aplicação de um campo magnético.

### 5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

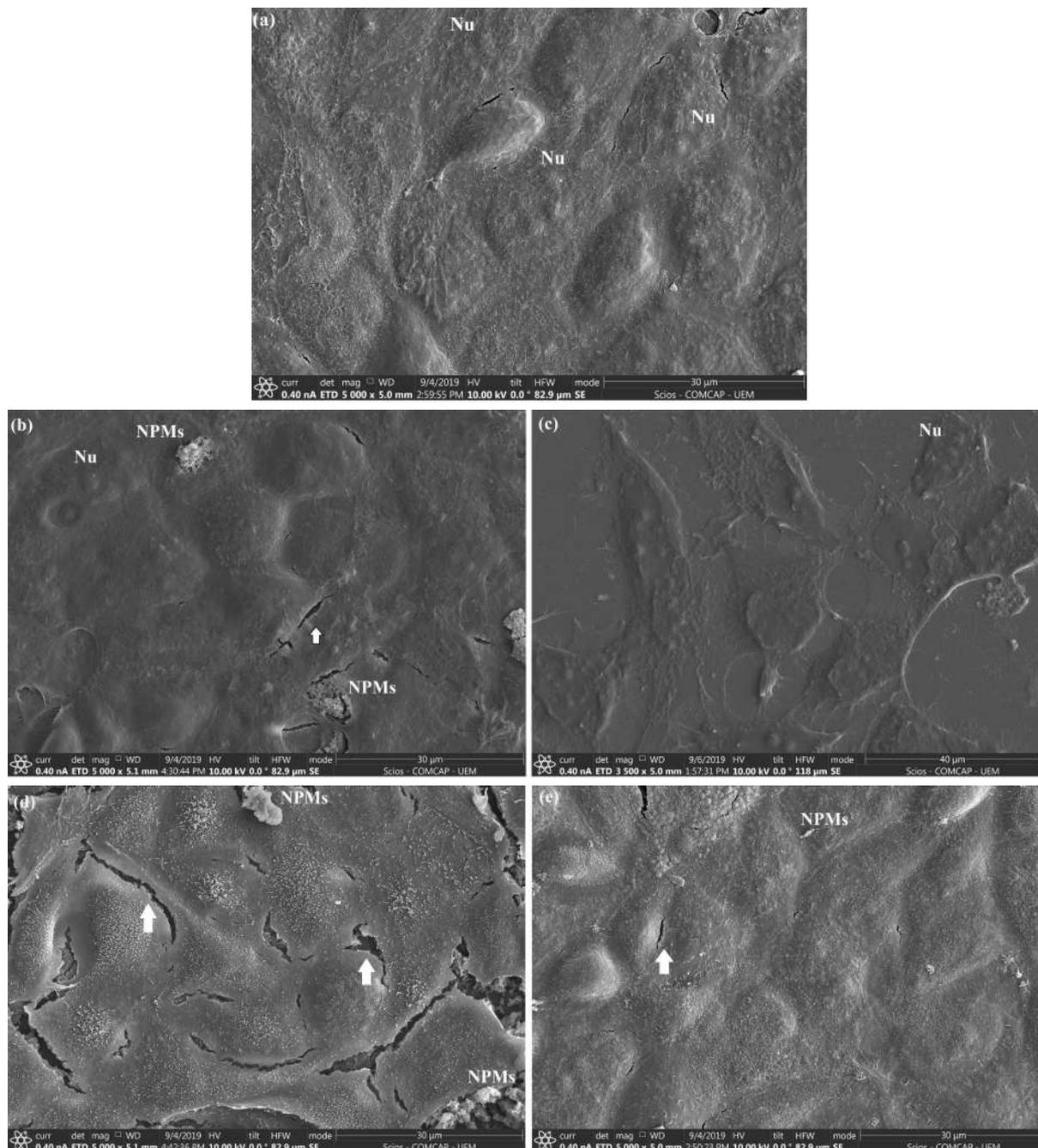
As análises estruturais das células MCF-7 sem e após o tratamento com as NPMs, no período de incubação de 48h, foram realizadas por MEV e estão apresentadas nas Figuras 5.13 e 5.14 para as NPMs dos Grupos 1 e 2, respectivamente. O conjunto de imagens do Grupo 1, na Figura 5.13, exibe as células submetidas a diferentes tratamentos, sendo em (a) o controle positivo, (b,c) concentração de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e (d,e) concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  das amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CH}$ , respectivamente. Na imagem do tratamento controle, Figura 5.13 (a), pode-se observar que as células possuem formato poligonal com vários nucléolos e com crescimento agrupado, típicos da linhagem MCF-7, por toda a superfície da lamínula.

Para as células tratadas com as NPMs, as formas gerais e de crescimento apresentaram semelhanças com aquelas do controle. Para o tratamento com concentração de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , as NPMs sem recobrimento,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Figura 5.13 (b), aparecem na forma de grandes aglomerados e um indício de ruptura da membrana celular é aparente. Para o tratamento com a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CH}$ , Figura 5.13 (c), não fica evidente a presença de aglomerados de partículas, indicando que o recobrimento da quitosana na superfície ajudou na dispersão das NPMs. Além disso, a presença das células bem aderidas ao substrato revelam a ausência de sérios danos na membrana celular. Já para o tratamento na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , na amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , Figura 5.13 (d), observa-se grandes aglomerados de partículas na superfície da membrana celular, ocasionando um encolhimento da célula com o comprometimento da adesão ao substrato e entre as células, além da presença de ruptura do citoplasma. Na Figura 5.13 (e), tratamento com a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CH}$ , a dispersão das NPMs é evidenciada pela ausência de aglomerados na imagem. A integridade da membrana celular é clara, sendo esse resultado muito parecido com o tratamento controle. Esses resultados evidenciam a importância da dispersão das NPMs para aplicações biomédicas.

A presença das NPMs interagindo com as células e os danos causados pelas mesmas corroboram os resultados obtidos pelo ensaio do MTT, no qual, no período de 48 h, as concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , diminuíram a viabilidade celular de forma estatisticamente significativa em relação ao controle, sendo a última citotóxica às células. Por outro lado, nas mesmas concentrações, a amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CH}$  não apresentou redução da viabilidade celular para ambas as concentrações.

Para o Grupo 2, a Figura 5.14 apresenta as imagens de MEV das células MCF-7 submetidas aos tratamentos controle (a), DOX livre 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (b) e expostas as amostras  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  com concentração igual a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (c,d) e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (e,f), respectivamente, no período de 48 h. Na amostra do controle, Figura 5.14 (a), verifica-se a presença de células saudáveis, com prolongamentos do citoplasma que favorecem a adesão ao substrato. Células com formato poligonal e crescimento agrupado também são obser-

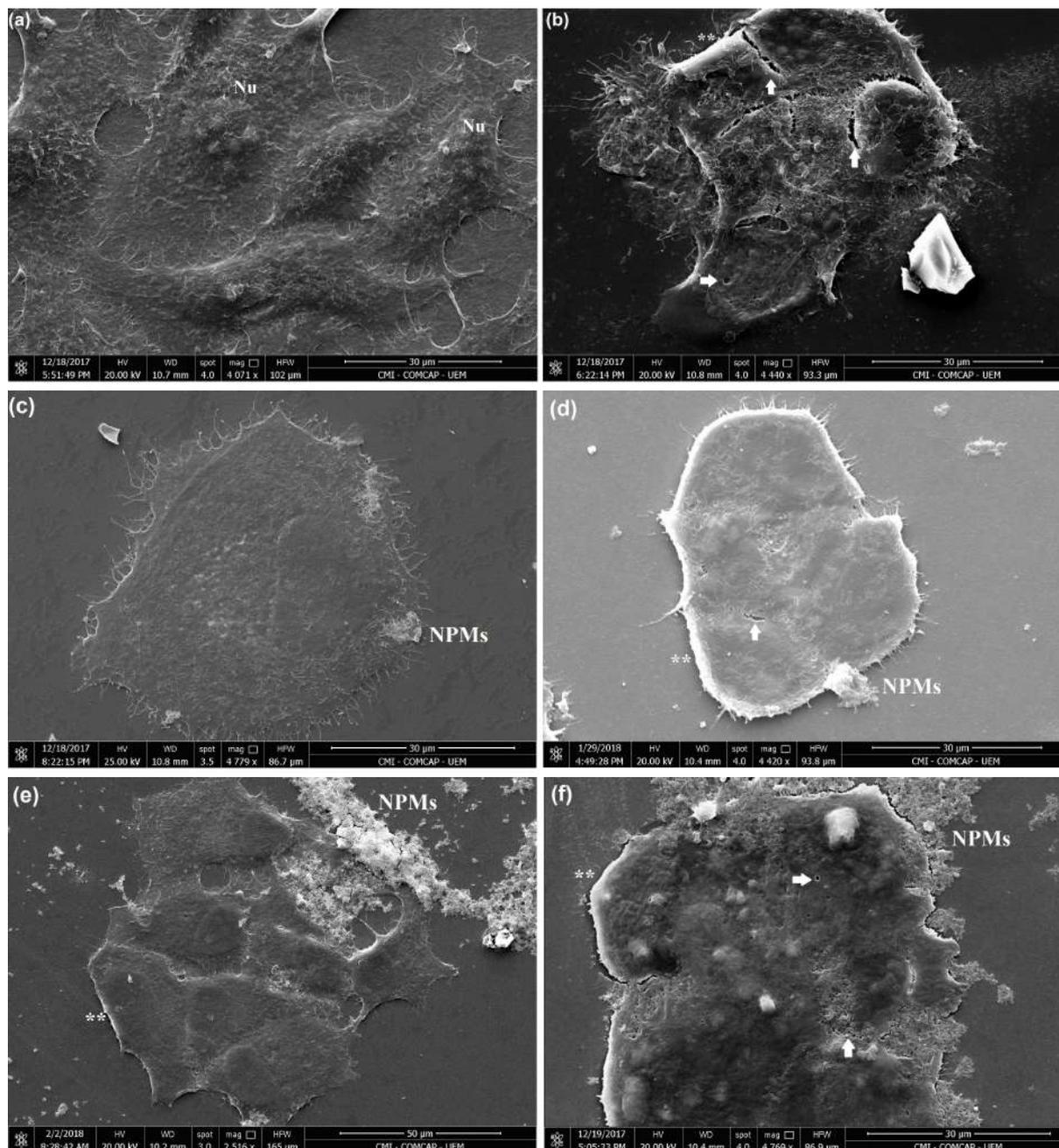
vados. Na Figura 5.14 (b), as mudanças morfológicas sofridas pela célula na presença de DOX, revelam o efeito citotóxico do fármaco. A perda de aderência com o substrato, encolhimento da membrana celular, a presença de depressões e rupturas no citoplasma são acentuados e levam a apoptose celular.



**Figura 5.13:** Imagens de MEV de células MCF-7 incubadas por 48 h com diferentes concentrações das amostras  $Fe_3O_4$  e  $Fe_3O_4/CH$ , respectivamente. Sendo em (a) a amostra controle, (b,c) expostas a concentrações de 25  $\mu\text{g/mL}$  e (d,e) 50  $\mu\text{g/mL}$ . Núcleo (Nu), Nanopartículas (NPMs), (↑) Rupturas no citoplasma.

O tratamento das células com a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  de NPMs mostra, para ambas as amostras  $Fe_3O_4$  e  $Fe_3O_4/SiO_2$ , Figura 5.14 (c) e (d), a presença de aglomerados de NPMs aderidos a superfície da membrana celular, mas em um aspecto geral, a

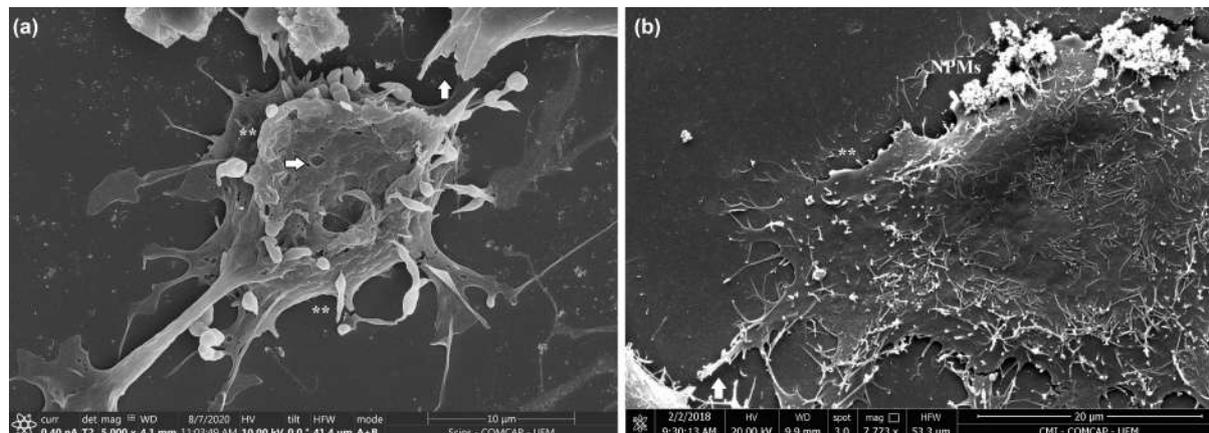
célula está bem aderida ao substrato, sem danos aparentes na membrana. Para ambas as amostras  $Fe_3O_4$  e  $Fe_3O_4/SiO_2$  com concentração de  $50 \mu\text{g/mL}$ , Figura 5.14 (e) e (f), respectivamente, a presença de aglomerados de NPMs aderidos a superfície da membrana celular é bastante acentuado. Esses aglomerados podem forçar, de forma mecânica, a superfície da membrana celular, levando a sua ruptura e, conseqüentemente, a morte das células. Esses resultados foram vistos, de maneira semelhante, pelo ensaio do MTT. Diferentemente do que foi observado para a amostra  $Fe_3O_4/CH$ , o recobrimento de sílica sozinho não melhora a dispersão das NPMs, embora proteja o núcleo magnético de reagir com o meio.



**Figura 5.14:** Imagens de MEV de células MCF-7 incubadas por 48 h com diferentes concentrações das amostras  $Fe_3O_4$  e  $Fe_3O_4/SiO_2$ , respectivamente. Sendo em (a) a amostra controle, (b) DOX livre 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (c,d) expostas a concentrações de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e (e,f) 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Núcleo (Nu), Nanopartículas (NPMs), ( $\uparrow$ ) Rupturas no citoplasma, ( $\Rightarrow$ ) Depressões no citoplasma, (\*\*) Encolhimento da membrana.

As imagens de MEV das células MCF-7 tratadas por 48 h com as amostras funcionalizadas com DOX,  $Fe_3O_4/CH/DOX$  e  $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$ , estão apresentadas na Figura 5.15 (a) e (b), respectivamente. Na Figura 5.15 (a), para a concentração de 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da amostra  $Fe_3O_4/CH/DOX$ , não é possível visualizar a presença de aglomerados das NPMs, mas fica evidente o efeito citotóxico nas células. Observam-se mudanças morfológicas como a presença de depressões pela membrana, superfície irregular e quebra dos prolongamento de adesão ao substrato. Para a amostra  $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$ , Figura 5.15 (b), com concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , as mudanças morfológicas são menos acentuadas,

entretanto, visualiza-se uma perda de aderência com o substrato, além, da presença das NPMs aderidas a superfície da membrana.



**Figura 5.15:** Imagens de MEV de células MCF-7 incubadas por 48 h com 12,5 µg/mL da amostra  $Fe_3O_4/CH/DOX$  (a) e 10 µg/mL da amostra  $Fe_3O_4/SiO_2$ . Nanopartículas (NPMs), (†) rupturas no citoplasma, (⇒) depressões no citoplasma, (\*\*) encolhimento da membrana.

Essa diferença entre os efeitos provocados pelas amostras de NPMs está relacionado ao mecanismo de resistência múltipla a fármacos (*Multi Drug Resistance-MDR*) que pode ser observada em algumas células tumorais, e consiste no fato de que algumas proteínas responsáveis pelo transporte transmembrana provocam o efluxo dos quimioterápicos, sendo a resistência promovida pela proteína glicoproteína-P (P-pg) uma das mais estudadas. Entre outros, a DOX é um quimioterápico que está envolvido nesse fenômeno [121].

Na amostra  $Fe_3O_4/CH/DOX$  o efeito da DOX nas células MCF-7 em comparação com as mesmas concentrações de DOX livre é pronunciado e pode estar relacionada com o processo de internalização das NPMs por endocitose, que aumenta a eficiência da DOX, uma vez que não tem chances de serem barradas pela proteína P-pg [120]. Já para amostra  $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$ , embora as partículas possam ser internalizadas, o fato de serem maiores e se aglomerarem com facilidade na superfície da membrana celular faz com que a DOX carregada nas NPMs tenda a se difundir pela superfície da membrana, e assim sofrer resistência, refletindo nos resultados semelhantes ao da DOX livre, como visto pelo ensaio do MTT.

### 5.3 Preparação de Hidrogéis Magnéticos de Quitosana

A produção dos hidrogéis de quitosana foi realizada por um processo físico sem a adição de um reticulante externo. A solubilização da quitosana ocorreu em meio ácido, levando à protonação dos grupos amina da quitosana ( $pK_a$  6,3). A neutralização dos grupos amina por meio de uma solução de hidróxido de sódio impede que ocorra uma repulsão iônica entre as cadeias poliméricas. Por outro lado, permite a formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os grupos N-acetil que agem como sítios reticulantes no

hidrogel [122, 123]. A Figura 5.16 apresenta a imagem dos hidrogéis de quitosana pura 2,5 % (m/m) (CHG), e com a adição das NPMs de magnetita nas concentrações de 6,25 % (CHF1), 13,5 % (CHF2) e 27 % (CHF3). Não foi possível detectar visualmente a formação de aglomerados, o que sugere uma boa dispersão das NPMs no hidrogel.

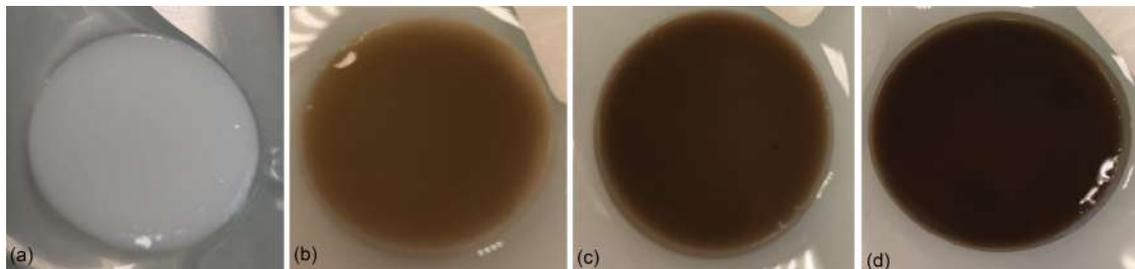


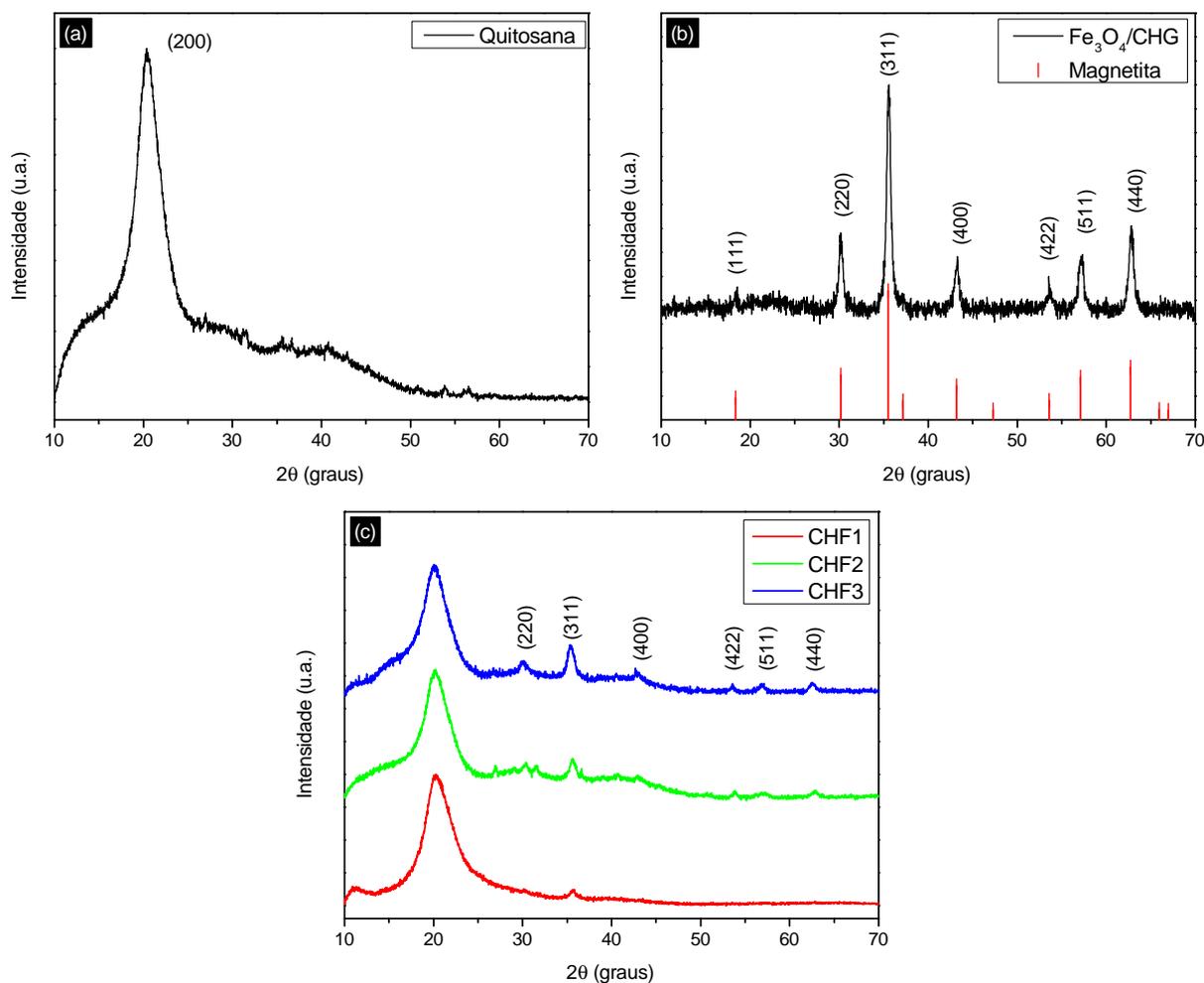
Figura 5.16: Imagens dos hidrogéis preparadas, (a) CHG, (b) CHF1, (c) CHF2 e (d) CHF3.

### 5.3.1 Difractometria de Raios X

A análise estrutural das amostras secas da quitosana purificada, das NPMs sintetizadas,  $Fe_3O_4/CHG$ , e dos hidrogéis magnéticos CHF1, CHF2, CHF3 estão apresentados na Figura 5.17. Na literatura, a quitosana é caracterizada como um polímero semicristalino, indexada com uma célula unitária ortorrômbica, embora uma estrutura monoclinica não seja excluída como uma possibilidade alternativa [124]. A célula unitária contém duas cadeias de quitosana antiparalelas que podem ou não, ser estabilizadas por moléculas de água, ácido ou sais, gerando diferentes polimorfos cristalinos de quitosana [125, 126]. Os diferentes polimorfismos e cristalinidade dependem das condições experimentais e do peso molecular da quitosana [46, 127]. Na Figura 5.17 (a), para a amostra de quitosana, um pico muito intenso aparece em  $20,4^\circ$  e está associado a reflexão (200). Uma ampla faixa abaixo do pico está associada a forma amorfa do material [128, 129].

No difratograma da amostra  $Fe_3O_4/CHG$ , Figura 5.17 (b), as intensidades relativas e as posições dos picos em  $2\theta$  estão em concordância com a ficha padrão da magnetita 88-0315, do banco de dados ICDD. A presença da quitosana não apresentou nenhuma interferência na estrutura da magnetita. O  $t_c$  foi calculado aplicando-se a fórmula de Scherrer no plano de reflexão (311), sendo o valor encontrado igual a  $7,9 \pm 0,9$  nm.

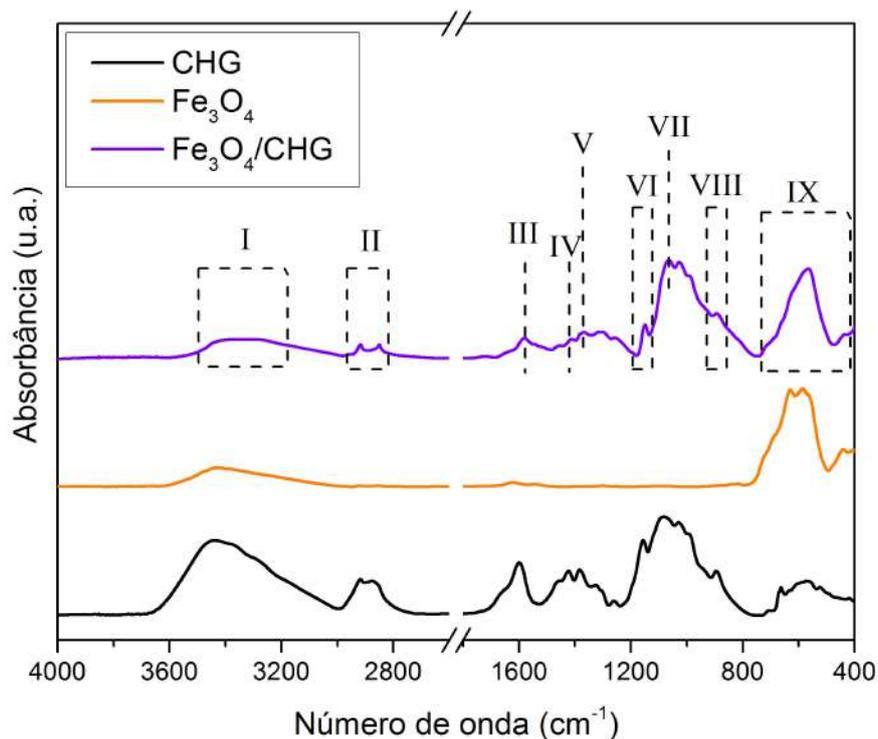
Foram realizadas medidas de DRX dos hidrogéis liofilizados para confirmar a presença das NPMs. Na Figura 5.17 (c), é possível verificar para todas as amostras o pico de difração referente ao plano (200) da quitosana. As reflexões da magnetita também estão presentes, e conforme aumenta a quantidade de NPMs, amostra CHF3, mais evidentes os picos de difração se tornam. Na amostra CHF2, na região entre  $25^\circ$  e  $35^\circ$ , ainda se observa indícios da estrutura da quitosana.



**Figura 5.17:** Difratogramas de raios X das amostras (a) *CHG*, (b) *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CHG* e (c) das amostras *CHF1*, *CHF2* e *CHF3*.

### 5.3.2 Espectroscopia no Infravermelho

Medidas de FTIR foram realizadas para confirmar o recobrimento das NPMs de magnetita com a mesma quitosana utilizada nos hidrogéis, *CHG*. A Figura 5.18, apresenta o espectro das amostras de quitosana pura, *CHG*, NPMs de magnetita pura, *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>*, e das NPMs de magnetita recobertas com quitosana, *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CHG*. Na Tabela 5.4, estão descritas as bandas características para as principais vibrações presentes no espectro da amostra *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CHG*. É possível verificar que para a amostra *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/CHG*, as regiões destacadas no espectro mostram a presença das ligações comuns a quitosana pura e as NPMs de magnetita pura, com destaque para a região III, que é referente a sobreposição de duas vibrações, o estiramento *N – H* das aminas primárias e a do grupo amida II, presentes em unidades desacetiladas. As regiões VI e VIII, que se referem ao estiramento da ligação (*C – O – C*) presente na unidade sacarídea da quitosana e a região IX, com as vibrações de estiramento da ligação *Fe – O* da NPMs de magnetita. Com isso, é possível evidenciar que as NPMs de magnetita foram eficientemente recobertas com quitosana.



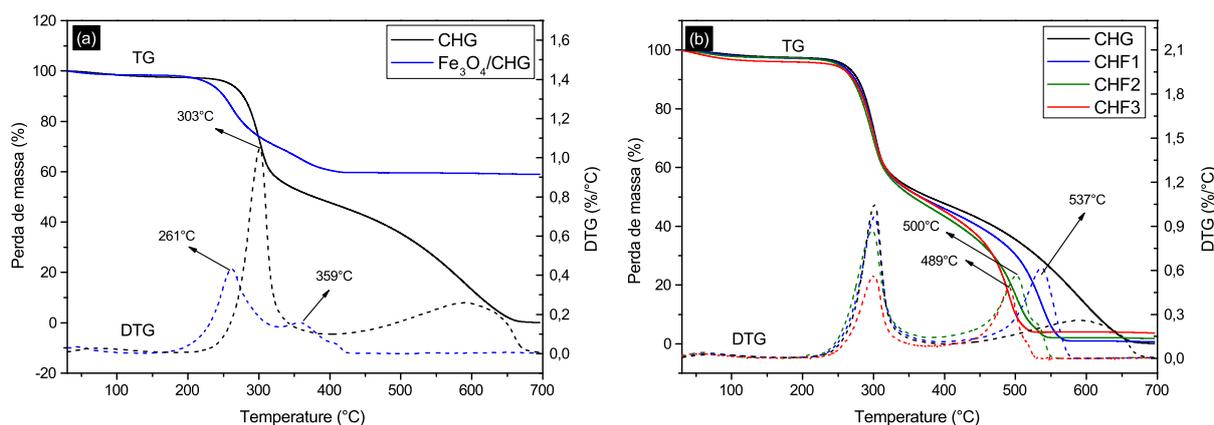
**Figura 5.18:** Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras de quitosana pura *CHG*,  $Fe_3O_4$  e  $Fe_3O_4/CHG$ .

**Tabela 5.4:** Bandas características no infravermelho para a amostra  $Fe_3O_4/CHG$ .

	Nº de onda ( $cm^{-1}$ )	Vibração
I	3500 - 3200	$\nu(N - H)$ , $\nu(O - H)$
II	2917,2851	$\nu(C - H)$
III	1580	Amida II, $\nu(N - H)$
IV	1417	$-OH$ álcool I $C - H$ no anel
V	1372	$C - N$
VI	1149	$\beta(1 \rightarrow 4)$ $\nu(-O-)$
VII	1069	$C - O - C$
VIII	885	$\beta(1 \rightarrow 4)$ $\nu(-O-)$
IX	620, 571, 437	$\nu(Fe - O)$

### 5.3.3 Análise Termogravimétrica

As curvas termogravimétricas das NPs de magnetita bem como dos hidrogéis, estão apresentados na Figura 5.19. Na Figura 5.19 (a), estão presentes as amostras das NPs recobertas com quitosana,  $Fe_3O_4/CHG$ , e da quitosana pura,  $CHG$ . É possível verificar a perda de massa inicial entre 30 e 100 °C de 1,64 % e 2,31 %, respectivamente, referente a perda de água adsorvida na superfície das amostras. Na amostra,  $CHG$ , a pirólise das unidades sacarídeas da quitosana ocorre entre 200 e 400 °C, com máxima variação de perda no DTG em 303 °C. Em seguida, ocorre oxidação dos resíduos de carbono até completa degradação em 700 °C. Para a amostra  $Fe_3O_4/CHG$ , o perfil de degradação é similar ao da quitosana pura. A variação máxima de perda de massa ocorre em 241 °C, seguida da degradação oxidativa dos resíduos de carbono, com máxima no DTG em 359 °C, resultando em uma perda de massa equivalente a 43,02 % da massa total. Vale ressaltar que a oxidação das NPMs ocorre em temperaturas similares a de degradação do polímero de forma que as perdas de massa se sobrepõem. Além disso, a superfície das NPMs pode fornecer sítios ativos para a degradação do polímero, visto que óxidos de ferro são conhecidos por suas propriedades catalíticas.



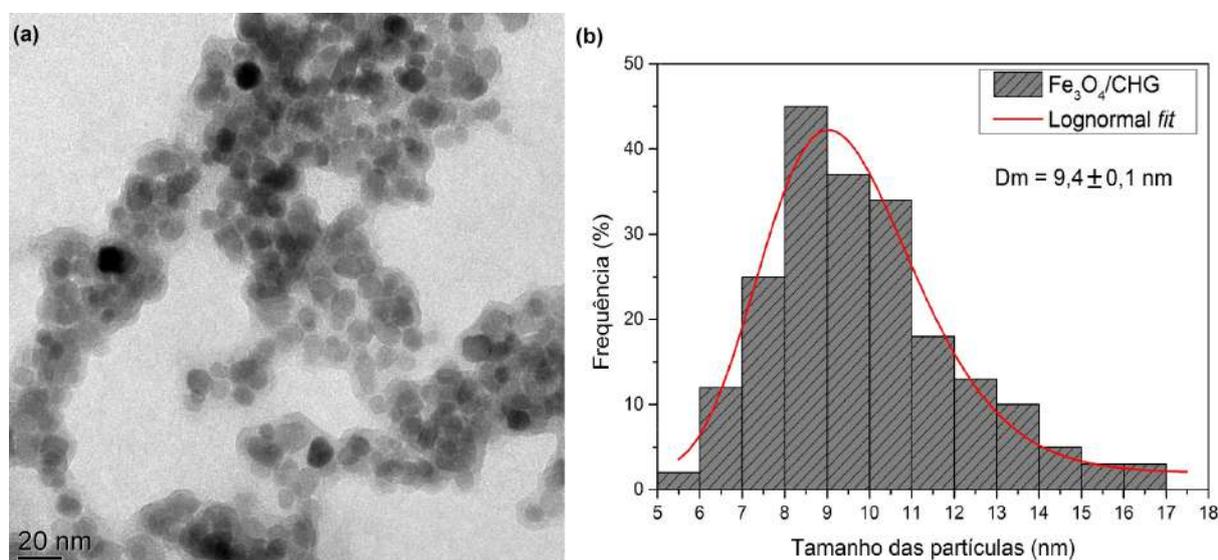
**Figura 5.19:** Curvas termogravimétricas para as amostras da quitosana  $CHG$  juntamente com s NPMs (a)  $Fe_3O_4/CHG$  e os hidrogéis (b)  $CHF1$ ,  $CHF2$  e  $CHF3$ .

Nas Figura 5.19 (b), estão apresentadas as curvas de TG das amostras dos hidrogéis  $CHG$ ,  $CHF1$ ,  $CHF2$  e  $CHF3$ . É possível verificar a similaridade entre as curvas da amostra pura e com a incorporação das NPs de magnetita. Além disso, a presença das NPs promove uma redução nas temperatura de degradação do polímero, com variação máxima no DTG em 537, 500 e 489 °C para as amostras  $CHF1$ ,  $CHF2$  e  $CHF3$ , respectivamente. Com isso, verificamos que a presença das NPMs auxilia na degradação dos resíduos de carbono, e que com um aumento da quantidade das NPMs o máximo da taxa de degradação se desloca para temperaturas menores. Além disso, foi possível estimar a quantidade de NPMs presente nas amostras, sendo os valores encontrados de 1,15, 3,04 e 6,23 %, para as amostras  $CHF1$ ,  $CHF2$  e  $CHF3$ , respectivamente. Esses resultados incluem o valor estimado da quantidade de recobrimento de quitosana e estão

bem próximos dos valores da porcentagem em massa de NPMs adicionadas no hidrogel inicialmente.

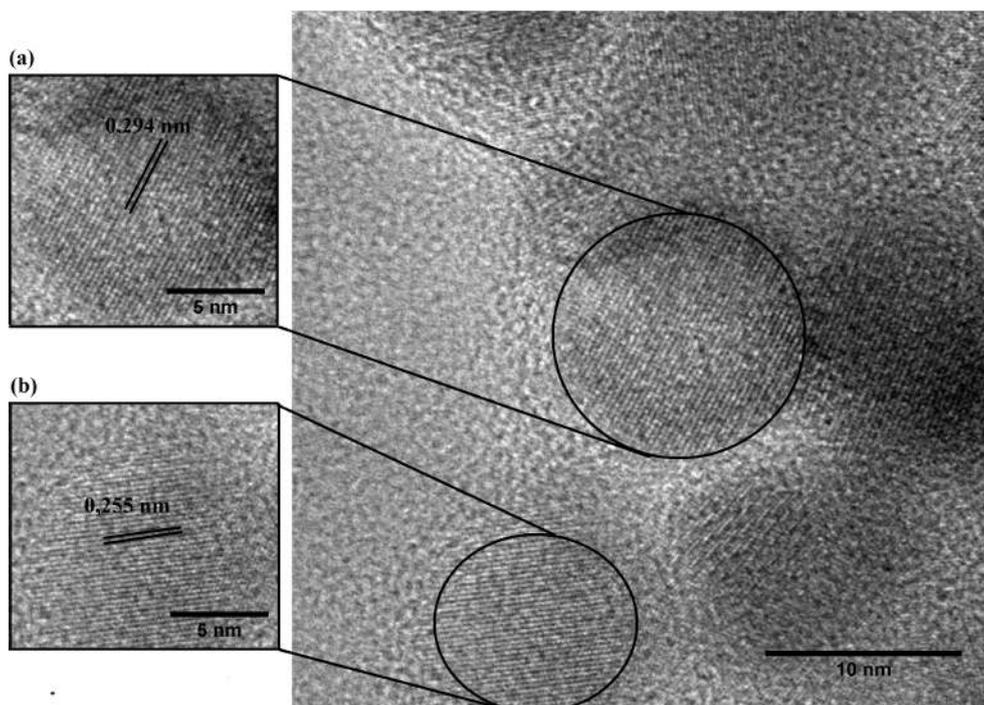
### 5.3.4 Microscopia Eletrônica De Transmissão e de Alta Resolução

As NPMs sintetizadas para a incorporação nos hidrogéis foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão e de alta resolução. Na Figura 5.20 está presente a imagem da amostra  $Fe_3O_4/CHG$ , juntamente com o histograma da distribuição de tamanho das partículas. Na imagem da Figura 5.20 (a), as partículas estão bem definidas e apresentam morfologia aproximadamente esférica, uma camada em volta das partículas deixa evidente a presença da quitosana na superfície das NPMs [106, 130]. O histograma de tamanho, Figura 5.20 (b), corresponde a um distribuição LogNormal com tamanhos entre 5 e 17 nm e diâmetro médio ( $D_m$ ) de  $9,4 \pm 0,1$  nm.



**Figura 5.20:** Micrografia eletrônica de transmissão (a) e distribuição de tamanho (b) da amostra  $Fe_3O_4/CHG$

A Figura 5.21 apresenta a imagem de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução da amostra  $Fe_3O_4/CHG$ . Para as partículas na imagem, estão claramente visíveis as franjas dos planos cristalinos paralelos. Essas franjas correspondem a um conjunto de planos no interior da partícula e revelam de forma satisfatória a cristalinidade e uniformidade estrutural da amostra [101, 131]. As distâncias entre as franjas foram medidas e os valores encontrados foram de  $0,294$  nm e  $0,255$  nm, os quais estão em boa concordância com a distância espacial dos planos (220) e (311) da estrutura espinélio da magnetita na ficha 85-0315 do banco de dados ICDD.



**Figura 5.21:** Imagem de MET-AR para a amostra  $Fe_3O_4/CHG$ . As imagens ao lado esquerdo são ampliações para evidenciar os planos cristalinos paralelos.

### 5.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Informações sobre a estrutura dos hidrogéis foram obtidas por MEV, nas amostras sem e com NPMs de magnetita. As amostras foram congeladas utilizando nitrogênio líquido e, em seguida, liofilizadas por 96 h. As Figuras 5.22 (a e b) mostram as micrografias do hidrogel *CHG*, nas quais é possível observar uma estrutura 3D altamente porosa com o interlaçamento entre si das cadeias da quitosana.

A adição das NPMs, Figura 5.22 (c,d), (e,f) e (g,h) amostras *CHF1*, *CHF2* e *CHF3*, respectivamente, não perturba a estrutura original do hidrogel de quitosana pura, entretanto nota-se que a densidade de poros diminui conforme a adição de NPMs ocorre. É possível que a presença das NPMs com o recobrimento de quitosana forneça novos sítios ativos de reticulação.

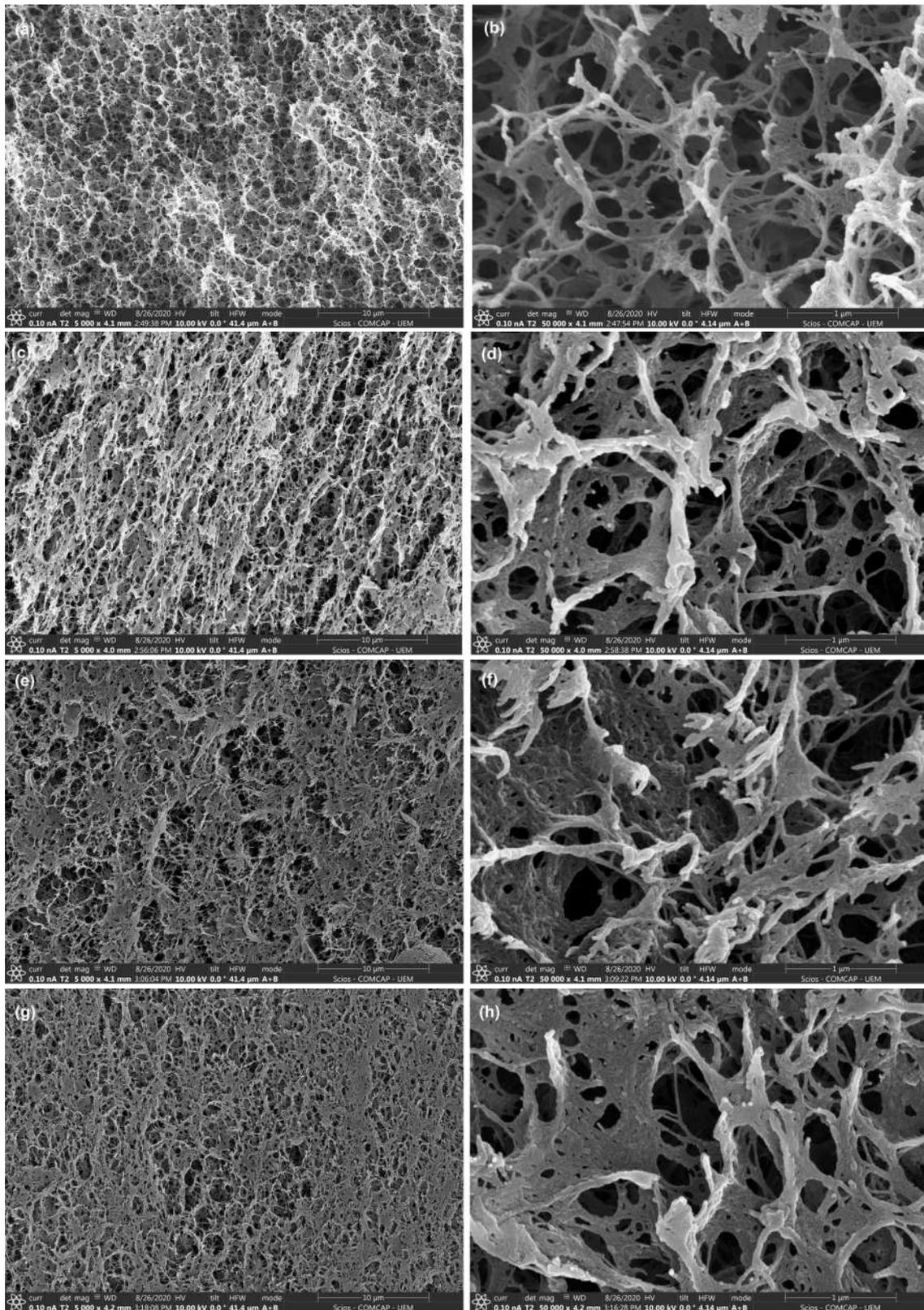
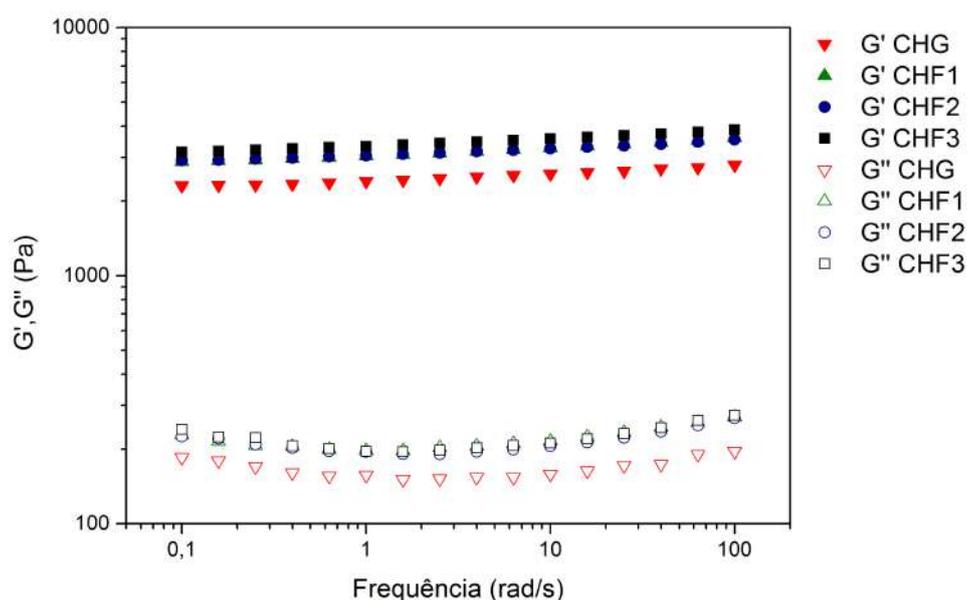


Figura 5.22: Imagens de MEV para as amostras (a,b) *CHG*, (c,d) *CHF1*, (e,f) *CHF2* e (g,h) *CHF3*.

### 5.3.6 Reologia

O estudo das propriedades viscoelásticas dos hidrogéis fornece informações sobre a estrutura interna dos mesmos. Para as amostras *CHG*, *CHF1*, *CHF2* e *CHF3*, os módulos elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) foram avaliados em função da frequência, e estão apresentados na Figura 5.23. Para todas as amostras, o valor de  $G'$  é maior que de  $G''$ , e ambos, especialmente  $G'$ , são quase independentes da frequência no intervalo de 0,1-100 rad/s. Esse comportamento é característico de hidrogéis fortes ou totalmente desenvolvidos [84, 132].



**Figura 5.23:** Variações dos módulos viscoso e elástico dos hidrogéis *CHG*, *CHF1*, *CHF2* e *CHF3* em função da frequência.

Os valores dos módulos elástico ( $G'_e$ ) e viscoso ( $G''_e$ ) no equilíbrio foram calculados para as amostras de hidrogéis de quitosana pura e com adição das NPs de magnetita, e estão indicados na Tabela 5.5. Esse valor foi calculado fazendo a média dos valores de  $G'$  e  $G''$  no platô em baixas frequências [132]. O módulo  $G'_e$  possui uma dependência com a quantidade de NPMs adicionadas a matriz, ou seja, quanto maior a quantidade de NPMs maior é o valor de  $G'_e$ , refletindo no aumento da elasticidade do hidrogel com a adição de NPMs. A introdução de 6,25% ( $m/m$ ) de NPs de magnetita na amostra *CHF1*, leva a um aumento significativo no módulo elástico de equilíbrio, quando comparado com a quitosana pura. Um aumento em maior extensão é observado para as amostras *CHF2* e *CHF3* com 13,5% e 27% ( $m/m$ ) de NPs, respectivamente. Esse aumento das propriedades mecânicas é esperado quando se deseja introduzir NPMs em uma matrix de gel, uma vez que as NPMs agem como pontos de reticulação, e dessa forma, aumentam a conectividade entre as cadeias [78, 133].

A incorporação das NPs não afeta o comportamento viscoelástico dos hidrogéis expressado pela tangente de dissipação, Equação 2.15. Todas as amostras apresentaram  $\tan(\delta) < 1$  ( $G' > G''$ ), ou seja, o comportamento do material se aproxima de um sólido elástico [82, 132, 134].

**Tabela 5.5:** Valores dos módulos  $G'_e$ ,  $G''_e$  e  $\tan(\delta)$  para as amostras de hidrogéis *CHG*, *CHF1*, *CHF2* e *CHF3*. \*DP é o desvio padrão relativo da medida.

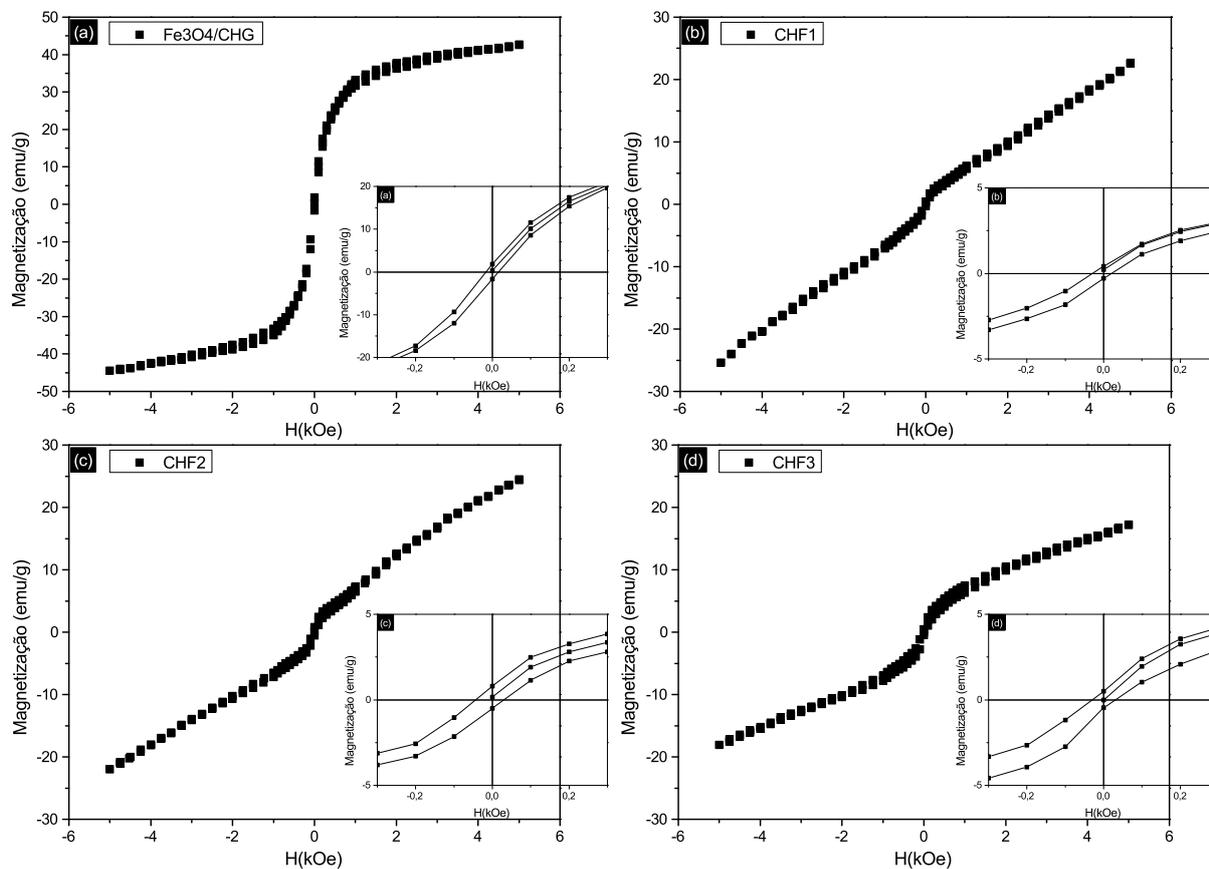
Amostras	$G'_e$ (Pa)/DP	$G''_e$ (Pa)/DP	$\tan(\delta)$
<i>CHG</i>	2320,52 ± 15,01	173,64 ± 10,76	0,07483
<i>CHF1</i>	2918,46 ± 33,00	213,28 ± 10,39	0,07308
<i>CHF2</i>	2944,93 ± 29,64	213,80 ± 10,18	0,07260
<i>CHF3</i>	3215,32 ± 43,93	222,90 ± 13,75	0,06964

### 5.3.7 Magnetometria de Amostra Vibrante

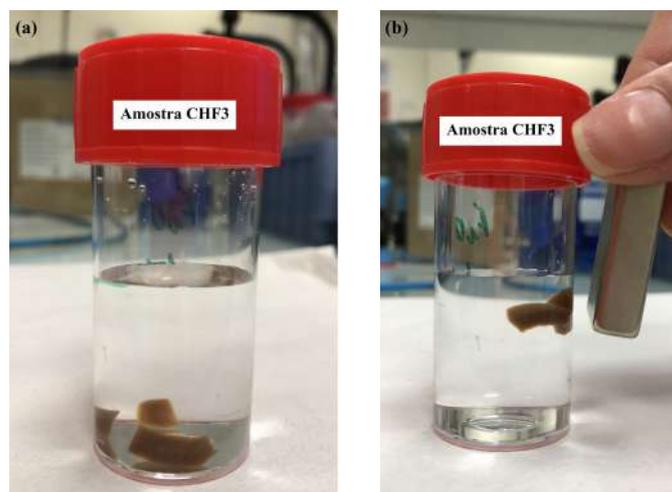
A Figura 5.24 apresenta as curvas de magnetização em função do campo magnético para amostras  $Fe_3O_4/CHG$ , *CHF1*, *CHF2* e *CHF3* na temperatura de 275 K. Na Figura 5.24 (a), a amostra de  $Fe_3O_4/CHG$  apresentou um comportamento típico do superparamagnetismo, com os valores de  $H_c$  e  $M_r$  próximos de zero. Devido essa medida ter sido realizada em amostra em pó, a alta concentração de partículas pode resultar em interações dipolares que leva ao aparecimento de uma pequena histerese [115], como é possível observar no destaque ao lado direito da figura. O valor de  $M$  encontrado, com um campo aplicado de 5 kOe, foi 42,67 emu/g. Embora não tenha sido obtido a  $M_s$  com essa intensidade de campo aplicado, esse valor é similar ao encontrado para a amostra  $Fe_3O_4/CH$  na primeira etapa desse trabalho e aos valores de  $M_s$  reportados na literatura [106, 135, 136]. Normalizando esse valor da magnetização pela massa de quitosana obtida por TG foi encontrada uma magnetização para o núcleo magnético de 74,89 emu/g.

Para as amostras dos hidrogéis *CHF1*, *CHF2* e *CHF3*, Figura 5.24 (b), (c) e (d), respectivamente, é possível observar o efeito da quitosana de forma predominante nas curvas de magnetização em função do campo magnético. Devido a quitosana ser um polímero natural e não apresentar magnetização, é esperado um comportamento paramagnético, ou seja, uma reta. Para as amostras *CHF1*, *CHF2* e *CHF3* a concentração de NPMs utilizadas foram 6,25, 13,5 e 27 %, respectivamente, em relação a massa de quitosana. Conforme são adicionadas as NPMs de  $Fe_3O_4/CHG$ , as curvas apresentam um comportamento em formato de 'S' e revelam a magnetização decorrente das NPMs, sendo esse efeito maior conforme o aumento na concentração das NPMs ocorre. A Figura 5.25 apresenta uma fotografia da amostra de hidrogel *CHF3* em água deionizada, sendo que em (a) o hidrogel está sob ausência de um campo magnético externo, e em (b) o hidrogel está sob a influência de um campo magnético externo. Pela imagem fica evidente

a presença de magnetização nos hidrogéis. As quantidades de NPMs podem ser ajustadas dependendo da aplicação desejada, que como já mencionado anteriormente, pode variar desde *scaffolds* na engenharia de tecido, membranas terapêuticas, como em hipertermia e liberação controlada de fármacos.



**Figura 5.24:** Curvas de Magnetização *vs* Campo Magnético das amostras  $Fe_3O_4/CHG$ ,  $CHF1$ ,  $CHF2$  e  $CHF3$ . O destaque ao lado direito da imagem corresponde às magnetizações em uma escala de baixo campo magnético.



**Figura 5.25:** Fotografias da amostra de hidrogel  $CHF3$  em água deionizada sob (a) ausência de um campo magnético e (b) presença de um campo magnético.

## Conclusões e Perspectivas

### 6.1 Conclusões

Diante dos objetivos propostos e com base nos resultados obtidos destacam-se as seguintes conclusões: (i) a síntese de NPMs de  $Fe_3O_4$  via coprecipitação foi eficaz. As modificações na superfície das NPMs se mostraram eficientes e foram confirmadas por medidas de FTIR, onde as bandas de absorção características do ácido oleico, sílica e quitosana foram identificadas nas amostras  $Fe_3O_4/AO$ ,  $Fe_3O_4/SiO_2$  e  $Fe_3O_4/CH$ , respectivamente. As imagens de MET indicaram NPMs aproximadamente esféricas, com uma distribuição de tamanhos estreita, sendo possível visualizar o efeito dos recobrimentos na dispersão das partículas. Esse efeito também foi observado pelas medidas de DLS, onde observou-se a diminuição dos  $D_h$  das partículas. Os valores de PDI indicaram que as NPMs possuem caráter moderadamente polidisperso, resultado confirmado pelos histogramas do MET. Em pH neutro, o  $\zeta$  indicou que em meio aquoso as NPMs  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4/SiO_2$  possuem uma carga de superfície negativa, enquanto que, na amostra  $Fe_3O_4/CH$  a superfície se encontra carregada positivamente, revelando seu caráter policatiônico. As medidas de magnetização revelaram que a presença dos recobrimentos não alteram o caráter superparamagnético das amostras, constatado pela ausência de histerese, essencial para as aplicações biomédicas. Entretanto, a magnetização das amostras é reduzida em virtude da quantidade do recobrimento na superfície das amostras, uma vez que são compostos orgânicos e não contribuem para a magnetização; (ii) as amostras  $Fe_3O_4/CH$  e  $Fe_3O_4/SiO_2$ , com diferentes tratamentos, submetidas aos ensaios de citotoxicidade em células tumorais MCF-7 indicaram uma redução do efeito tóxico das NPMs nas células, quando comparadas com a amostra sem recobrimento,  $Fe_3O_4$ . Ou seja, o recobrimento empregado é fundamental para uma boa dispersão das NPMs no meio. Por meio das imagens de MEV foi possível observar que a amostra  $Fe_3O_4/SiO_2$  apresentou aglomerados de partículas na membrana das células de forma mais acentuada que a amostra  $Fe_3O_4/CH$ , indicando que a estabilização das NPMs com sílica não é su-

ficiente para evitar que as partículas não se aglomerem. A funcionalização do fármaco doxorrubicina (DOX) na superfície das amostras ocorreu por conjugação eletrostática e interações de ponte de hidrogênio, com eficiência de carregamento de 47 e 69% para as amostras  $Fe_3O_4/CH/DOX$  e  $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$ , respectivamente. Os resultados do ensaio de MTT, com diferentes tratamentos das NPMS, revelaram uma redução da viabilidade celular estatisticamente significativa em relação ao controle. Para a amostra  $Fe_3O_4/CH/DOX$ , a redução da viabilidade também foi significativa em relação as mesmas concentrações de DOX livre, indicando uma melhor eficiência na liberação do fármaco. Por outro lado, a amostra  $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$  apresentou resultados similares ao da DOX livre. As análises MEV mostraram mudanças morfológicas acentuadas, como a perda de adesão das células ao substrato e rupturas no citoplasma indicando o efeito citotóxico da DOX liberada pelas NPMS. (iii) A preparação das NPMS para a incorporação no hidrogel foi realizada via coprecipitação. A amostra  $Fe_3O_4/CHG$  apresentou as bandas características da quitosana na superfície das NPMS. As análises morfológicas apresentaram partículas aproximadamente esféricas e com distribuição de tamanhos estreita. Foi possível visualizar uma fina camada do polímero de quitosana na superfície das partículas. Por meio das imagens de MET-AR foi possível visualizar as franjas dos planos cristalinos no interior da partícula com distâncias espaciais em concordância com as dos planos da estrutura espinélio da magnetita obtida por DRX. A preparação de hidrogéis de quitosana sem a adição de um agente de reticulação externo foi obtido de forma satisfatória. A incorporação das NPMS também ocorreu de forma eficaz, sem a formação de aglomerados, sugerindo uma boa dispersão das partículas. As medidas de DRX confirmaram a presença das fases da magnetita nas amostras dos hidrogéis. Por medidas de TG foi confirmado a quantidade de NPMS na matriz polimérica. As imagens de MEV revelaram a estrutura porosa do hidrogel. A adição das NPMS na matriz polimérica induziu a formação de novos sítios ativos de reticulação levando a um aumento na conectividade das cadeias. As medidas reológicas mostraram a formação de um hidrogel forte com os módulos  $G' > G''$  e com comportamento viscoelástico próximo a de um sólido elástico ( $\tan(\delta) < 1$ ). O valor de  $G'_e$  aumentou conforme a quantidade de NPMS no hidrogel aumentaram. Esse resultado reflete um aumento na resistência do hidrogel em virtude do aumento da conectividade entre as cadeias. Medidas de VSM revelaram a presença das NPMS na matriz do hidrogel. O efeito se torna mais evidente conforme aumenta a concentração das NPMS.

Em resumo, pode-se concluir que foram obtidas nanopartículas de magnetita recobertas com diferentes agentes modificadores de superfície de forma efetiva, com eficiência na funcionalização com o fármaco DOX e que podem ser usados como carreadores em sistemas de liberação de fármaco. Aliado a isso, foram obtidos sistemas de hidrogéis magnéticos com a possibilidade de unir em um único nanocompósito as terapias de hipertermia magnética e liberação de fármaco com potencial de aumentar a eficiência no tratamento do câncer.

## 6.2 Perspectivas

Diante dos resultados obtidos, o trabalho gerou uma série de perspectivas das quais pode-se destacar: (i) a realização de medidas de magnetização em função da temperatura para a obtenção da temperatura de bloqueio ( $T_B$ ), bem como realizar medidas de histerese magnética em diferentes temperaturas para as amostras  $Fe_3O_4/AO$ ,  $Fe_3O_4/SiO_2$  e  $Fe_3O_4/CH$  com o propósito de verificar os efeitos dos diferentes recobrimentos; (ii) com o intuito de auxiliar o desenvolvimento de protocolos de tratamentos, ensaios de liberação da DOX nas amostras  $Fe_3O_4/CH/DOX$  e  $Fe_3O_4/SiO_2/DOX$  em função do pH devem ser realizados e com isso, avaliar o desempenho das amostras em condições específicas; devido a molécula de DOX possuir fluorescência, investigar a internalização das NPMs nas células MCF-7 por microscopia de fluorescência e confocal; (iii) investigar a capacidade de aquecimento dos hidrogéis em equipamento de hipertermia magnética em colaboração com o laboratório *IMP - Ingénierie des Matériaux Polymères* da *Université Claude Bernard Lyon 1 - FR*, bem como realizar um estudo de carregamento e liberação com o fármaco paracetamol.

## Referências Bibliográficas

- [1] ZARBIN, A. J. Química de (nano) materiais. *Química Nova*, v. 30, n. 6, p. 1469, 2007.
- [2] CAO, G. *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications*. Imperial College Press, 2004.
- [3] ZUVIN, M.; KOÇAK, M.; ÜNAL, Ö.; AKKOÇ, Y.; KUTLU, Ö.; ACAR, H. Y.; GÖZÜAÇIK, D.; KOŞAR, A. Nanoparticle based induction heating at low magnitudes of magnetic field strengths for breast cancer therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Amsterdam, v. 483, p. 169–177, 2019.
- [4] INCA-Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - Ministério da Saúde. *O que é câncer?* <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>, acessado em Dezembro de 2020.
- [5] DE OLIVEIRA SANTOS, M. Estimativa 2018: incidência de câncer no brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 64, n. 1, p. 119–120, 2018.
- [6] SUN, C.; LEE, J. S.; ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in mr imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 11, p. 1252–1265, 2008.
- [7] SHABESTARI KHIABANI, S.; FARSHBAF, M.; AKBARZADEH, A.; DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 45, n. 1, p. 6–17, 2017.
- [8] CORR, S. A.; RAKOVICH, Y. P.; GUN'KO, Y. K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. *Nanoscale Research Letters*, v. 3, n. 3, p. 87, 2008.
- [9] SONG, F.; LI, X.; WANG, Q.; LIAO, L.; ZHANG, C. Nanocomposite hydrogels and their applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 11, n. 1, p. 40–52, 2015.

- [10] FERREIRA, N.; FERREIRA, L.; CARDOSO, V.; BONI, F.; SOUZA, A.; GREMIÃO, M. Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches. *European Polymer Journal*, v. 99, p. 117–133, 2018.
- [11] LI, Y.; HUANG, G.; ZHANG, X.; LI, B.; CHEN, Y.; LU, T.; LU, T. J.; XU, F. Magnetic hydrogels and their potential biomedical applications. *Advanced Functional Materials*, v. 23, n. 6, p. 660–672, 2013.
- [12] QIN, J.; ASEMPAH, I.; LAURENT, S.; FORNARA, A.; MULLER, R. N.; MUHAMMED, M. Injectable superparamagnetic ferrogels for controlled release of hydrophobic drugs. *Advanced Materials*, v. 21, n. 13, p. 1354–1357, 2009.
- [13] DADFAR, S. M.; ROEMHILD, K.; DRUDE, N. I.; VON STILLFRIED, S.; KNÜCHEL, R.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 138, p. 302–325, 2019.
- [14] COEY, J. M. *Magnetism and magnetic materials*. Cambridge University Press, 2010.
- [15] CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. *Introduction to magnetic materials*. John Wiley & Sons, 2011.
- [16] CALLISTER, W. D. *Fundamentos da ciência e engenharia de materiais: uma abordagem integrada*. LTC, 2006.
- [17] LU, A.-H.; SALABAS, E. E.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.
- [18] BATLLE, X.; LABARTA, A. Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 35, p. R15, 2002.
- [19] BEDANTA, S.; KLEEMANN, W. Supermagnetism. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 42, n. 1, p. 013001, 2008.
- [20] MORRISH, A. H. *The physical principles of magnetism*. 2001.
- [21] VEISEH, O.; GUNN, J. W.; ZHANG, M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, n. 3, p. 284–304, 2010.
- [22] CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. John Wiley & Sons, 2003.

- [23] DE ANDRADE CARDOSO, F.; DE CAMPOS, E. R.; DE MATTOS, E. C.; JUNIOR, A. M. Endotélio vascular: Parte i: função e propriedade. *Revista de Ciências Médicas*, v. 3, n. 3, 2012.
- [24] ROJAS, H.; RITTER, C.; DAL PIZZOL, F. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteínas de matriz. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 23, n. 2, p. 222–227, 2011.
- [25] SABAREESWARAN, A.; ANSAR, E. B.; VARMA, P. R. V. H.; MOHANAN, P. V.; KUMARY, T. V. Effect of surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles (spions) on mast cell infiltration: An acute in vivo study. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, n. 6, p. 1523–1533, 2016.
- [26] KARIMZADEH, I.; AGHAZADEH, M.; DALVAND, A.; DOROUDI, T.; KOLIVAND, P. H.; GANJALI, M. R.; NOROUZI, P. Effective electrosynthesis and in situ surface coating of  $Fe_3O_4$  nanoparticles with polyvinyl alcohol for biomedical applications. *Materials Research Innovations*, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2019.
- [27] KHMARA, I.; STRBAK, O.; ZAVISOVA, V.; KONERACKA, M.; KUBOVCIKOVA, M.; ANTAL, I.; KAVECANSKY, V.; LUCANSKA, D.; DOBROTA, D.; KOPCANSKY, P. Chitosan-stabilized iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Amsterdam, v. 474, p. 319–325, 2019.
- [28] SOUZA, C.; BECK, W.; VARANDA, L. Multifunctional luminomagnetic  $FePt@Fe_3O_4/SiO_2/RhodamineB/SiO_2$  nanoparticles with high magnetic emanation for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 15, n. 4, p. 1545, 2013.
- [29] ZHANG, C.; WÄNGLER, B.; MORGENSTERN, B.; ZENTGRAF, H.; EISENHUT, M.; UNTENECKER, H.; KRÜGER, R.; HUSS, R.; SELIGER, C.; SEMMLER, W. et al. Silica-and alkoxy-silane-coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a promising tool to label cells for magnetic resonance imaging. *Langmuir*, Washington, v. 23, n. 3, p. 1427–1434, 2007.
- [30] SILVA, S. M.; TAVALLAIE, R.; SANDIFORD, L.; TILLEY, R. D.; GOODING, J. J. Gold coated magnetic nanoparticles: from preparation to surface modification for analytical and biomedical applications. *Chemical Communications*, v. 52, n. 48, p. 7528–7540, 2016.
- [31] LIAO, Z.; WANG, H.; LV, R.; ZHAO, P.; SUN, X.; WANG, S.; SU, W.; NIU, R.; CHANG, J. Polymeric liposomes-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles

- as contrast agent for targeted magnetic resonance imaging of cancer cells. *Langmuir*, Washington, v. 27, n. 6, p. 3100–3105, 2011.
- [32] ZHANG, L.; HE, R.; GU, H.-C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science*, v. 253, n. 5, p. 2611–2617, 2006.
- [33] BLOEMEN, M.; BRULLOT, W.; LUONG, T. T.; GEUKENS, N.; GILS, A.; VERBIEST, T. Improved functionalization of oleic acid-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 14, n. 9, p. 1100, 2012.
- [34] PATIL, R.; SHETE, P.; THORAT, N.; OTARI, S.; BARICK, K.; PRASAD, A.; NINGTHOUJAM, R.; TIWALE, B.; PAWAR, S. Non-aqueous to aqueous phase transfer of oleic acid coated iron oxide nanoparticles for hyperthermia application. *RSC Advances*, v. 4, n. 9, p. 4515–4522, 2014.
- [35] TADMOR, R.; ROSENSWEIG, R. E.; FREY, J.; KLEIN, J. Resolving the puzzle of ferrofluid dispersants. *Langmuir*, Washington, v. 16, n. 24, p. 9117–9120, 2000.
- [36] LIU, Z.; KIESSLING, F.; GÄTJENS, J. Advanced nanomaterials in multimodal imaging: design, functionalization, and biomedical applications. *Journal of Nanomaterials*, v. 2010, p. 51, 2010.
- [37] GUERRERO-MARTÍNEZ, A.; PÉREZ-JUSTE, J.; LIZ-MARZÁN, L. M. Recent progress on silica coating of nanoparticles and related nanomaterials. *Advanced Materials*, v. 22, n. 11, p. 1182–1195, 2010.
- [38] LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*, v. 108, n. 6, p. 2064–2110, 2008.
- [39] GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3995–4021, 2005.
- [40] BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. Academic press, 2013.
- [41] BINI, R. A. *Síntese e funcionalização de superfície de óxidos de ferro superparamagnéticos*. Tese de Doutorado - (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, 2011.
- [42] ROBERTS, G. A. *Chitin chemistry*. Macmillan International Higher Education, 1992.

- [43] BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, n. 1, p. 83–99, 2010.
- [44] BOUCARD, N.; DAVID, L.; ROCHAS, C.; MONTEBAULT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Polyelectrolyte microstructure in chitosan aqueous and alcohol solutions. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 4, p. 1209–1217, 2007.
- [45] GONSALVES, A. D. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. D. Different strategies for crosslinking of chitosan. *Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.
- [46] RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006.
- [47] CHANDRA HEMBRAM, K.; PRABHA, S.; CHANDRA, R.; AHMED, B.; NIMESH, S. Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 44, n. 1, p. 305–314, 2016.
- [48] DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan—a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.
- [49] AMIDI, M.; MASTROBATTISTA, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, n. 1, p. 59–82, 2010.
- [50] SEOL, Y.-J.; LEE, J.-Y.; PARK, Y.-J.; LEE, Y.-M.; RHYU, I.-C.; LEE, S.-J.; HAN, S.-B.; CHUNG, C.-P. et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters*, v. 26, n. 13, p. 1037–1041, 2004.
- [51] AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 100, n. 1, p. 5–28, 2004.
- [52] KUMAR, M. N. R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.
- [53] KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Bio-medical activity of chitin/chitosan based materials—influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of n-acetylation. *Polymers*, v. 3, n. 4, p. 1875–1901, 2011.

- [54] SUN, C.; SZE, R.; ZHANG, M. Folic acid-peg conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by mri. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, v. 78, n. 3, p. 550–557, 2006.
- [55] WANG, A. Z.; BAGALKOT, V.; VASILLIOU, C. C.; GU, F.; ALEXIS, F.; ZHANG, L.; SHAIKH, M.; YUET, K.; CIMA, M. J.; LANGER, R. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle–aptamer bioconjugates for combined prostate cancer imaging and therapy. *ChemMedChem*, v. 3, n. 9, p. 1311–1315, 2008.
- [56] JAIN, T. K.; RICHEY, J.; STRAND, M.; LESLIE-PELECKY, D. L.; FLASK, C. A.; LABHASETWAR, V. Magnetic nanoparticles with dual functional properties: drug delivery and magnetic resonance imaging. *Biomaterials*, v. 29, n. 29, p. 4012–4021, 2008.
- [57] SHEN, C.; WANG, X.; ZHENG, Z.; GAO, C.; CHEN, X.; ZHAO, S.; DAI, Z. Doxorubicin and indocyanine green loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles with pegylated phospholipid coating for magnetic resonance with fluorescence imaging and chemotherapy of glioma. *International Journal of Nanomedicine*, v. 14, p. 101, 2019.
- [58] SCHLEICH, N.; PO, C.; JACOBS, D.; UCAKAR, B.; GALLEZ, B.; DANHIER, F.; PRÉAT, V. Comparison of active, passive and magnetic targeting to tumors of multifunctional paclitaxel/spio-loaded nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Journal of Controlled Release*, v. 194, p. 82–91, 2014.
- [59] GANIPINENI, L. P.; UCAKAR, B.; JOUDIOU, N.; RIVA, R.; JÉRÔME, C.; GALLEZ, B.; DANHIER, F.; PRÉAT, V. Paclitaxel-loaded multifunctional nanoparticles for the targeted treatment of glioblastoma. *Journal of Drug Targeting*, v. 27, n. 5-6, p. 614–623, 2019.
- [60] SCHLEICH, N.; SIBRET, P.; DANHIER, P.; UCAKAR, B.; LAURENT, S.; MULLER, R. N.; JÉRÔME, C.; GALLEZ, B.; PRÉAT, V.; DANHIER, F. Dual anticancer drug/superparamagnetic iron oxide-loaded plga-based nanoparticles for cancer therapy and magnetic resonance imaging. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 447, n. 1-2, p. 94–101, 2013.
- [61] CHEKINA, N.; HORÁK, D.; JENDELOVÁ, P.; TRCHOVÁ, M.; BENEŠ, M. J.; HRUBÝ, M.; HERYNEK, V.; TURNOVCOVÁ, K.; SYKOVÁ, E. Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, v. 21, n. 21, p. 7630–7639, 2011.

- [62] ZHANG, J.; LI, J.; RAZAVI, F. S.; MUMIN, A. M. One-pot synthesis and characterization of rhodamine derivative-loaded magnetic core-shell nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 13, n. 5, p. 1909–1916, 2011.
- [63] ARCAMONE, F. *Doxorubicin: anticancer antibiotics*. Elsevier, 2012.
- [64] CARVALHO, C.; SANTOS, R. X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P. J.; SANTOS, M. S.; MOREIRA, P. I. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 25, p. 3267–3285, 2009.
- [65] SPETH, P.; VAN HOESEL, Q.; HAANEN, C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 15, n. 1, p. 15–31, 1988.
- [66] GOESMANN, H.; FELDMANN, C. Nanoparticulate functional materials. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 49, n. 8, p. 1362–1395, 2010.
- [67] XU, C.; SUN, S. Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Polymer International*, v. 56, n. 7, p. 821–826, 2007.
- [68] FIGUEROLA, A.; DI CORATO, R.; MANNA, L.; PELLEGRINO, T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. *Pharmacological Research*, v. 62, n. 2, p. 126–143, 2010.
- [69] CAO, G. *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications*. Imperial College Press, 2004.
- [70] CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 9, p. 3893–3946, 2004.
- [71] CAPEK, I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 110, n. 1, p. 49–74, 2004.
- [72] GANGULI, A. K.; GANGULY, A.; VAIDYA, S. Microemulsion-based synthesis of nanocrystalline materials. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 2, p. 474–485, 2010.
- [73] MANIASSO, N. et al. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 87–93, 2001.
- [74] EASTOE, J.; HOLLAMBY, M. J.; HUDSON, L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 128, p. 5–15, 2006.
- [75] PEPPAS, N.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

- [76] FU, J.; YANG, F.; GUO, Z. The chitosan hydrogels: from structure to function. *New Journal of Chemistry*, v. 42, n. 21, p. 17162–17180, 2018.
- [77] HARAGUCHI, K. Nanocomposite gels: new advanced functional soft materials. In: *Macromolecular Symposia*. 2007. v. 256, p. 120–130.
- [78] DA SILVA, M. A.; DREISS, C. A. Soft nanocomposites: nanoparticles to tune gel properties. *Polymer International*, v. 65, n. 3, p. 268–279, 2016.
- [79] RICHTERING, W.; SAUNDERS, B. R. Gel architectures and their complexity. *Soft Matter*, v. 10, n. 21, p. 3695–3702, 2014.
- [80] BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.
- [81] YAN, C.; POCHAN, D. J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 9, p. 3528–3540, 2010.
- [82] MOURA, M. J.; FIGUEIREDO, M. M.; GIL, M. H. Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 12, p. 3823–3829, 2007.
- [83] FUCHS, T.; RICHTERING, W.; BURCHARD, W.; KAJIWARA, K.; KITAMURA, S. Gel point in physical gels: rheology and light scattering from thermoreversibly gelling schizophyllan. *Polymer Gels and Networks*, v. 5, n. 6, p. 541–559, 1998.
- [84] HORKAY, F.; DOUGLAS, J. F. Polymer gels: Basics, challenges, and perspectives. In: *Gels and Other Soft Amorphous Solids*. ACS Publications, 2018. p. 1–13.
- [85] MORRIS, E. Industrial hydrocolloids. In: *The structure, Dynamics and Equilibrium Properties of Colloidal Systems*. Springer, 1990. p. 449–470.
- [86] ARAÚJO-NETO, R.; SILVA-FREITAS, E.; CARVALHO, J.; PONTES, T.; SILVA, K.; DAMASCENO, I.; EGITO, E.; DANTAS, A. L.; MORALES, M. A.; CARRIÇO, A. S. Monodisperse sodium oleate coated magnetite high susceptibility nanoparticles for hyperthermia applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Amsterdam, v. 364, p. 72–79, 2014.
- [87] CHANG, E. P.; HATTON, T. A. Membrane emulsification and solvent pervaporation processes for the continuous synthesis of functional magnetic and janus nanobeads. *Langmuir*, Washington, v. 28, n. 25, p. 9748–9758, 2012.

- [88] JAVID, A.; AHMADIAN, S.; SABOURY, A. A.; KALANTAR, S. M.; REZAEI-ZARCHI, S. Chitosan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for doxorubicin delivery: synthesis and anticancer effect against human ovarian cancer cells. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 82, n. 3, p. 296–306, 2013.
- [89] KAYAL, S.; RAMANUJAN, R. Doxorubicin loaded pva coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, v. 30, n. 3, p. 484–490, 2010.
- [90] DE OLIVEIRA, P. N.; MOUSSA, A.; MILHAU, N.; BINI, R. D.; PROUILLAC, C.; DE OLIVEIRA, B. F.; DIAS, G. S.; SANTOS, I. A.; MORFIN, I.; SUDRE, G. et al. In situ synthesis of fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub> nanoparticles coated by chito-oligosaccharides: physico-chemical characterizations and cytotoxicity evaluation for biomedical applications. *Nanotechnology*, v. 31, n. 17, p. 175602, 2020.
- [91] ISO, I. 10993–5: 2009 biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. *International Organization for Standardization, Geneva*, 2009.
- [92] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.
- [93] RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. In: *Assay Guidance Manual [Internet]*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.
- [94] SUKHRAMANI, P. S.; SUKHRAMANI, P. S.; TIRTHANI, S. R.; DESAI, S. A.; SUTHAR, M. P. Biological cytotoxicity evaluation of spiro [azetidino-2, 3'-indole]-2', 4 (1'h)-dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. *Der Pharmacia Lettre*, v. 3, n. 5, p. 236–243, 2011.
- [95] LANGFORD, J. I.; WILSON, A. Scherrer after sixty years: a survey and some new results in the determination of crystallite size. *Journal of Applied Crystallography*, v. 11, n. 2, p. 102–113, 1978.
- [96] WALDRON, R. Infrared spectra of ferrites. *Physical Review*, New York, v. 99, n. 6, p. 1727, 1955.
- [97] MA, M.; ZHANG, Y.; YU, W.; SHEN, H.-Y.; ZHANG, H.-Q.; GU, N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 212, n. 2, p. 219–226, 2003.

- [98] YAMAURA, M.; CAMILO, R.; SAMPAIO, L.; MACEDO, M.; NAKAMURA, M.; TOMA, H. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Amsterdam, v. 279, n. 2, p. 210–217, 2004.
- [99] MAHDAVINIA, G. R.; SOLEYMANI, M.; ETEMADI, H.; SABZI, M.; ATLASI, Z. Model protein bsa adsorption onto novel magnetic chitosan/pva/laponite rd hydrogel nanocomposite beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 719–729, 2018.
- [100] KUMARI, S.; ANNAMAREDDY, S. H. K.; ABANTI, S.; RATH, P. K. Physico-chemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 104, p. 1697–1705, 2017.
- [101] UNSOY, G.; YALCIN, S.; KHODADUST, R.; GUNDUZ, G.; GUNDUZ, U. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 14, n. 11, p. 964, 2012.
- [102] FÖLDVÁRI, M. *Handbook of thermogravimetric system of minerals and its use in geological practice*. Geological Institute of Hungary Budapest, 2011. v. 213.
- [103] CORNELL, R. *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*. Wiley VCH, 2000.
- [104] PENICHE-COVAS, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; SAN ROMÁN, J. A kinetic study of the thermal degradation of chitosan and a mercaptan derivative of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, v. 39, n. 1, p. 21–28, 1993.
- [105] SOARES, P. I.; MACHADO, D.; LAIA, C.; PEREIRA, L. C.; COUTINHO, J. T.; FERREIRA, I. M.; NOVO, C. M.; BORGES, J. P. Thermal and magnetic properties of chitosan-iron oxide nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 149, p. 382–390, 2016.
- [106] ADIMOOLAM, M. G.; AMREDDY, N.; NALAM, M. R.; SUNKARA, M. V. A simple approach to design chitosan functionalized fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub> nanoparticles for ph responsive delivery of doxorubicin for cancer therapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Amsterdam, v. 448, p. 199–207, 2018.
- [107] CASTELLÓ, J.; GALLARDO, M.; BUSQUETS, M. A.; ESTELRICH, J. Chitosan (or alginate)-coated iron oxide nanoparticles: a comparative study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 468, p. 151–158, 2015.

- [108] DI MARCO, M.; SADUN, C.; PORT, M.; GUILBERT, I.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. Physicochemical characterization of ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles (uspio) for biomedical application as mri contrast agents. *International Journal of Nanomedicine*, v. 2, n. 4, p. 609, 2007.
- [109] BHATTACHARJEE, S. Dls and zeta potential—what they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, v. 235, p. 337–351, 2016.
- [110] SOARES, V. F. *Dispersão e estabilização de partículas submicrométricas de óxido de alumínio em sistemas líquidos destinados à produção de materiais refratários*. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.
- [111] BRUVERA, I.; MENDOZA ZÉLIS, P.; PILAR CALATAYUD, M.; GOYA, G. F.; SÁNCHEZ, F. H. Determination of the blocking temperature of magnetic nanoparticles: The good, the bad, and the ugly. *Journal of Applied Physics*, Woodbury, v. 118, n. 18, p. 184304, 2015.
- [112] LIVESEY, K.; RUTA, S.; ANDERSON, N.; BALDOMIR, D.; CHANTRELL, R.; SERANTES, D. Beyond the blocking model to fit nanoparticle zfc/fc magnetisation curves. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.
- [113] CHESNEL, K.; TREVINO, M.; CAI, Y.; HANCOCK, J.; SMITH, S.; HARRISON, R. Particle size effects on the magnetic behaviour of 5 to 11 nm fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub> nanoparticles coated with oleic acid. In: *Journal of Physics: Conference Series*. 2014. v. 521, p. 012004.
- [114] GAMARRA, L.; PONTUSCHKA, W.; MAMANI, J.; CORNEJO, D.; OLIVEIRA, T.; VIEIRA, E.; COSTA-FILHO, A.; AMARO JR, E. Magnetic characterization by squid and fmr of a biocompatible ferrofluid based on fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub>. *Journal of Physics: Condensed Matter*, Bristol, v. 21, n. 11, p. 115104, 2009.
- [115] FABRIS, F.; TU, K.-H.; ROSS, C.; NUNES, W. Influence of dipolar interactions on the magnetic properties of superparamagnetic particle systems. *Journal of Applied Physics*, Woodbury, v. 126, n. 17, p. 173905, 2019.
- [116] PATIL, R. M.; THORAT, N. D.; SHETE, P. B.; BEDGE, P. A.; GAVDE, S.; JOSHI, M. G.; TOFAIL, S. A.; BOHARA, R. A. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 13, p. 63–72, 2018.
- [117] BEKAROĞLU, M. G.; İŞÇI, Y.; İŞÇI, S. Colloidal properties and in vitro evaluation of hydroxy ethyl cellulose coated iron oxide particles for targeted drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, v. 78, p. 847–853, 2017.

- [118] ROIK, N.; BELYAKOVA, L.; DZIAZKO, M. Kinetic and equilibrium studies of doxorubicin adsorption on mcm-41-type silica surface. *Chemistry, Physics and Technology of Surface*, n. 7, p. 405–412, 2016.
- [119] DING, B.; SHEN, S.; WU, L.; QI, X.; NI, H.; GE, Y. Doxorubicin-loaded fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub>@ sio<sub>2</sub> nanoparticles as magnetic targeting agents for combined photothermal-chemotherapy of cancer. *Chemistry Letters*, v. 44, n. 6, p. 858–860, 2015.
- [120] UNSOY, G.; KHODADUST, R.; YALCIN, S.; MUTLU, P.; GUNDUZ, U. Synthesis of doxorubicin loaded magnetic chitosan nanoparticles for ph responsive targeted drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 62, p. 243–250, 2014.
- [121] HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. P-glycoprotein and multidrug resistance: structure-activity relationships of modulators. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2148–2154, 2010.
- [122] LADET, S.; DAVID, L.; DOMARD, A. Multi-membrane hydrogels. *Nature*, London, v. 452, n. 7183, p. 76–79, 2008.
- [123] MONTEBAULT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials*, v. 26, n. 8, p. 933–943, 2005.
- [124] CLARK, G. L.; SMITH, A. F. X-ray diffraction studies of chitin, chitosan, and derivatives. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 40, n. 7, p. 863–879, 2002.
- [125] OGAWA, K.; YUI, T.; OKUYAMA, K. Three d structures of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 34, n. 1-2, p. 1–8, 2004.
- [126] MAZEAU, K.; WINTER, W. T.; CHANZY, H. Molecular and crystal structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data. *Macromolecules*, Washington, v. 27, n. 26, p. 7606–7612, 1994.
- [127] OGAWA, K.; YUI, T.; MIYA, M. Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 56, n. 6, p. 858–862, 1992.
- [128] ALI, S. W.; RAJENDRAN, S.; JOSHI, M. Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, n. 2, p. 438–446, 2011.

- [129] COSTA-JÚNIOR, E. S.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; MANSUR, A. A.; VASCONCELOS, W. L.; MANSUR, H. S. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, n. 3, p. 472–481, 2009.
- [130] REDDY, A. N.; ANJANEYULU, K.; BASAK, P.; RAO, N. M.; MANORAMA, S. V. A simple approach to the design and functionalization of fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub>-au nanoparticles for biomedical applications. *ChemPlusChem*, v. 77, n. 4, p. 284–292, 2012.
- [131] YE, X.-R.; DARAIIO, C.; WANG, C.; TALBOT, J.; JIN, S. Room temperature solvent-free synthesis of monodisperse magnetite nanocrystals. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 6, n. 3, p. 852–856, 2006.
- [132] MONTEBAULT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Rheometric study of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials*, v. 26, n. 14, p. 1633–1643, 2005.
- [133] BINI, R. A.; SILVA, M. F.; VARANDA, L. C.; DA SILVA, M. A.; DREISS, C. A. Soft nanocomposites of gelatin and poly (3-hydroxybutyrate) nanoparticles for dual drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 157, p. 191–198, 2017.
- [134] MONTEBAULT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 2, p. 653–662, 2005.
- [135] UNSOY, G.; YALCIN, S.; KHODADUST, R.; GUNDUZ, G.; GUNDUZ, U. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 14, n. 11, p. 964, 2012.
- [136] PHAM, X. N.; NGUYEN, T. P.; PHAM, T. N.; TRAN, T. T. N.; TRAN, T. V. T. Synthesis and characterization of chitosan-coated magnetite nanoparticles and their application in curcumin drug delivery. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, v. 7, n. 4, p. 045010, 2016.