

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas – CCET
Programa de Pós-Graduação em Física – PPGFIS
Departamento de Física – DF UFSCar
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais – CNPEM
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS

MAGNETO HIPERTERMIA *IN VITRO* EM CÉLULAS HEK293T UTILIZANDO
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MAGNÉTICAS COM DIFERENTES
RECOBRIMENTOS

Willian Takemitsu Shigeyosi

Orientador: Prof. Dr. Mateus Borba Cardoso
Agências Financiadoras: CAPES, FAPESP, CNPq
Instituição Colaboradora: CNPEM

São Carlos, 2017

Universidade Federal de São Carlos – UFSCar
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas – CCET
Programa de Pós-Graduação em Física – PPGFIS

MAGNETO HIPERTERMIA *IN VITRO* EM CÉLULAS HEK293T UTILIZANDO
NANOPARTICULAS DE ÓXIDO DE FERRO MAGNÉTICAS COM DIFERENTES
RECOBRIMENTOS

Willian Takemitsu Shigeyosi

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física como
requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Física

Orientador: Prof. Dr. Mateus Borba Cardoso
Agências Financiadoras: CAPES, FAPESP, CNPq
Instituição Colaboradora: CNPEM

São Carlos, 2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Física

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Willian Takemitsu Shigeyosi, realizada em 03/08/2017:

Prof. Dr. Mateus Borba Cardoso
LNLS

Prof. Dr. Diego Muraca
CNPEM

Prof. Dr. Claudio Antonio Cardoso
UFSCar

Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo Moreira
UFSCar

Prof. Dr. Flávio Garcia
CBPF

Resumo

Um dos maiores desafios da medicina é desenvolver tratamentos para os diversos tipos de câncer. Entretanto tratamentos convencionais para o câncer como a quimioterapia e a radioterapia apresentam, em muitos casos, efeitos colaterais indesejados. Como alternativa, nanomateriais têm a premissa de aprimorar e criar uma nova rota de tratamento e diagnóstico. Atualmente as nanopartículas de óxido de ferro são intensamente estudadas, especialmente devido à sua capacidade de gerar calor quando sujeitas a um campo magnético alternado. O mecanismo de aquecimento induzido via campo magnético externo é conhecido como hipertermia magnética. Através deste mecanismo é possível realizar aplicações biotérmicas e redirecionamento de fármacos. A vantagem da utilização de um nanomaterial magnético provém da sua característica incomum conhecida como superparamagnetismo. Sistemas superparamagnéticos não apresentam magnetização espontânea, nem campo coercitivo e, como consequência, sua curva de magnetização não apresenta perdas por histerese.

Portanto, a motivação deste trabalho vem da necessidade de informações biofísicas a respeito do tratamento magneto hipertérmico destes nanomateriais em tecidos humanos. Assim, o objetivo desta tese é tratar de aspectos fundamentais voltados ao comportamento das nanopartículas Fe_3O_4 em meio celular durante a hipertermia. Neste contexto, serão abordadas questões a respeito da utilização do uso de nanopartículas de óxido de ferro com diferentes tipos de recobrimentos, buscando desta forma, discutir as vantagens e desvantagens de cada recobrimento de acordo com suas características físico-químicas bem como sua citotoxicidade. Além disso, o trabalho aborda o potencial magneto hipertérmico destas nanopartículas superparamagnéticas com distintos recobrimentos comparando seus respectivos desempenhos no tratamento em células embrionárias de rim humano HEK293T.

Através do desenvolvimento deste trabalho observou-se que para uma boa bioaplicabilidade as amostras devem apresentar uma baixa citotoxicidade. Neste quesito os recobrimentos formados por surfactantes como brometo de cetrimônio e o dodecil sulfato de sódio apresentaram uma alta taxa de mortalidade celular não sendo indicados ao tratamento. Por fim deve-se avaliar o potencial magneto hipertérmico dos nanomateriais biocompatíveis, uma vez que os melhores resultados associados ao tratamento hipertérmico foram obtidos para as nanopartículas recobertas com quitosana, polietileno glicol e fosfolipídio peglado.

Abstract

One of the largest challenges on medicine has been developing treatments for several types of cancer. Moreover, conventional treatments for cancer such as chemotherapy and radiotherapy have been presenting undesirable secondary effects. As an alternative, nanomaterials have the premise of improving and creating a new route of treatment and diagnosis. Currently, iron oxide nanoparticles are strongly studied especially because of their ability to produce heat when they are subjected to an alternating magnetic field. The mechanism of induced heating via external magnetic field is called magnetic hyperthermia and, through this mechanism, it becomes possible to make the biothermic applications and use drug delivery system. The advantage of using a magnetic nanomaterial comes from the unusual feature known as superparamagnetism. The superparamagnetic systems does not present spontaneous magnetization nor coercive field therefore their magnetization curves do not present hysteresis losses.

Therefore, the motivation of this work comes from the need for biophysical information regarding the hyperthermic magneto treatment of these nanomaterials in human tissues. Thus, the aim of this thesis is to deal with fundamental aspects related to the behavior of the Fe₃O₄ nanoparticles in cell media during hyperthermia. In this context, it will be approaching some questions about the use of iron oxide nanoparticles with distinct types of coatings. Discussing the advantages and disadvantages of each coating according to its physico-chemical characteristics as well as its cytotoxicity. In addition, this work approaches the hyperthermic magneto potential of these superparamagnetic coated nanoparticles by comparing their respective performances in the treatment of human's embryonic kidney cells HEK293T.

Through the development of this work it was observed that for a good bioapplicability's samples must present a low cytotoxicity, in this case the coatings formed by surfactants like centrimonium bromide and sodium dodecyl sulfate presented a high rate of cellular mortality not being indicated for the treatment. Finally, the potential of magnetic hyperthermia for a biocompatible nanomaterial should be evaluated, in this case the best results associated to hyperthermia treatment were obtained for nanoparticles coated with chitosan, polyethylene glycol and PEGylated phospholipid.

Sumário

1	Introdução.....	1
2	Introdução aos nanomateriais magnéticos e fluidos magnéticos.....	5
2.1	Magnetismo Clássico	6
2.1.1	Paramagnetismo	8
2.1.2	Função de Langevin e o Cálculo para o Paramagnetismo Clássico.....	9
2.2	Magnetismo quântico - Interação de troca e campo molecular.....	11
2.2.1	Função de Brillouin e o Paramagnetismo Quântico.....	12
2.2.2	Diamagnetismo	13
2.2.3	Ferromagnetismo	14
2.2.4	Antiferromagnetismo	16
2.2.5	Ferrimagnetismo	17
2.3	Espinélios e Ferrimagnetos	18
2.4	Nanopartículas e o Superparamagnetismo	19
2.5	Curvas de magnetização e histerese M-H	23
2.6	Coloides magnéticos.....	26
2.6.1	Coloide magnético e relaxação de Brown.....	26
2.6.2	Relaxação de Brown	27
2.6.3	Tempo de relaxação efetivo	28
2.6.4	SAR e a magneto hipertermia das NPs	29
2.7	Estabilidade coloidal e recobrimentos.....	30
2.7.1	Recobrimento via Surfactantes	34
2.7.2	Recobrimento via Polímeros	35
2.7.3	Recobrimento via Fosfolipídios	37
3	Revisão bibliográfica e o estado da arte	39
3.1	Nanopartículas magnéticas e a atualidade.....	39
3.2	SPIONs e bioaplicações	41
3.3	Recobrimentos e Funcionalização dos SPIONs	45
3.4	O potencial da hipertermia em células	46
3.5	NPs e aparatos comerciais.....	47

4	Materiais e Métodos	49
4.1	Materiais	49
4.2	Síntese das nanopartículas de Fe ₃ O ₄	49
4.3	Recobrimento das NPs	50
4.3.1	Processo de secagem das amostras	51
4.4	Cultura de células	51
5	Aparatos e procedimentos experimentais	53
5.1	Instrumentação utilizada na caracterização	53
5.1.1	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos.....	53
5.1.2	Espectroscopia Ultravioleta-Visível	55
5.1.3	Potencial Zeta.....	57
5.1.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão	59
5.1.5	Microscopia Eletrônica de Varredura	61
5.1.6	Termogravimetria.....	63
5.1.7	Magnetometria – S.Q.U.I.D.	64
5.1.8	SAR e Hipertermia.....	67
5.2	Cultura de célula.....	69
5.2.1	HEK293T	71
5.2.2	U2OS.....	72
5.2.3	CellTiter 96® - MTS e o Perkin EnSpire Multimode Reader	73
5.2.4	Ensaio de viabilidade celular via MTS	74
5.2.5	Citometria de Fluxo	75
5.2.6	Countess® II FL Automated Cell Counter	78
5.2.7	Microscopia confocal	79
6	Resultados	82
6.1	Síntese das nanopartículas de Fe ₃ O ₄	82
6.2	Recobrimento das nanopartículas de óxido de ferro	83
6.3	Morfologia.....	84
6.4	Caracterização física e química do material.....	88
6.4.1	Magnetometria	88
6.4.2	Potencial ZETA.....	100

6.4.3	TGA	102
6.4.4	Medidas de SAR	105
6.5	Viabilidade e morfologia celular	111
6.5.1	MTS	111
6.5.2	UV-VIS e a Internalização das NPs	113
6.5.3	Microscopia Confocal	117
6.6	Primeiros testes com hipertermia magnética	119
6.6.1	Citometria	119
6.6.2	Countess	124
6.6.3	MTS Adaptado	125
6.7	Aplicação hipertérmica	127
6.8	Discussão geral dos resultados	136
7	Perspectivas Futuras	144
8	Conclusões	146
9	Referências Bibliográficas	149
10	Anexo	165
10.1	TEM de todas as amostras	165
10.2	Teste estatístico T ou T-Student	166
10.3	Artigo submetido	167

Lista de Figuras

- Figura 1 – Comportamento dos materiais paramagnéticos quando expostos a um campo externo. No primeiro estágio quando não há campo aplicado e os momentos magnéticos (seta azul) estão desparelhados. Quando o campo aplicado (seta vermelha) incide no material o mesmo se orienta a favor do campo. Por fim, quando o campo é retirado, os momentos magnéticos ficam desparelhados. 9
- Figura 2 – Comportamento dos materiais diamagnéticos quando expostos a um campo externo. No primeiro estágio quando não há campo aplicado não há nenhum indício de ordenamento (ausência de setas azuis) dos momentos magnéticos. Quando o campo aplicado (seta vermelha) incide no material, os momentos magnéticos (setas azuis) se orientam no sentido contrário com o campo. Por fim, quando o campo é retirado, os momentos magnéticos ficam desaparecem. 14
- Figura 3 – Comportamento dos materiais ferromagnéticos quando expostos a um campo externo. No primeiro estágio quando não há campo aplicado temos alguns indícios de ordenamento dos momentos magnéticos (seta azul). Quando o campo aplicado (seta vermelha) incide no material, ele se orienta fortemente no sentido favorável ao campo; entretanto quando o campo é retirado, a magnetização depende se o material está acima da temperatura de Curie (T_C) ou abaixo dela. Caso a temperatura esteja acima da temperatura de Curie o material apresentará um desordenamento similar a um paramagneto, sendo que alguns domínios magnéticos ainda estarão voltados ao sentido do campo retirado. Caso o material esteja abaixo de T_C , os momentos magnéticos são mantidos mesmo na ausência de campo externo. 15
- Figura 4 – Acoplamento antiparalelo dos spins com resultante do momento magnético nula de um antiferromagneto..... 16
- Figura 5 – Comportamento da susceptibilidade magnética contra a temperatura. No primeiro gráfico encontra-se um paramagneto com um comportamento linear típico; no segundo caso um ferromagneto cuja susceptibilidade dependerá da temperatura de Curie T_C e o último caso é o antiferromagnetismo que apresenta uma descontinuidade conhecida como temperatura de Néel..... 17
- Figura 6 – Em um ferrimagneto os arranjos dos spins se dão de forma alternada com diferenças nos momentos magnéticos entre cada par associado. Esta diferença faz com que a resultante do acoplamento antiparalelo dos spins gere um momento magnético total diferente de zero em um ferrimagneto..... 17

Figura 7 – Esquema de configuração dos momentos dos espinélios magnéticos de uma ferrita. As esferas pretas representam os ânions de Oxigênio, as esferas laranjas representam os cátions octaédricos de Fe^{+3} , as esferas vermelhas representam os cátions tetraédricos de Fe^{+3} , já as esferas laranjas representam os cátions octaédricos de Fe^{+2}	18
Figura 8 – Representação dos domínios magnéticos de acordo com o tamanho da partícula. A diminuição do tamanho até a escala nanométrica suficientemente pequena ocasiona o efeito de monodomínio magnético conhecido também como macros핀.	20
Figura 9 – Esquema simplificado do alinhamento dos spins de um monodomínio de uma NP demonstrando como ordenamento dos spins dos átomos de uma NP se comportam.....	20
Figura 10 – Loop de histerese entre MxH . Inicialmente quando o campo magnético é aplicado a magnetização acompanha o campo magnético até a magnetização de saturação M_s ; quando o campo é invertido a magnetização sofre um atraso, o valor deste atraso a campo H igual zero é conhecido como magnetização remanescente M_r . Quando essa magnetização é zero obtém-se o valor do campo coercitivo H_c	23
Figura 11 – Figura adaptada da referência (Q. A. PANKHURST et al., 2003). Curvas de histerese de (A) um material diamagnético (DM) com escala ampliada em 1000 vezes sob um alto campo magnético aplicado apresentando uma baixa magnetização, (B) um material paramagnético (PM) com escala ampliada 100 vezes sob um alto campo aplicado e uma boa magnetização de resposta, (C) um material ferromagnético (FM) apresenta um campo coercitivo e magnetização remanescente e (D) um material superparamagnético (SPM) apresentando um comportamento similar ao ferromagneto, porém sem o loop característico da histerese.	24
Figura 12 – Esboço do comportamento do tempo de relaxação efetivo (linha azul) comparado com a relaxação de Néel (linha vermelha) e a de Brown (linha azul) de acordo com o raio das NPs de magnetita.	29
Figura 13 – Esquema da cadeia de surfactantes exemplificando a organização do grupo cabeça hidrofílico e o grupo cauda hidrofóbico.	34
Figura 14 – Cadeia química do monômero de PEG.	36
Figura 15 – Cadeia química do monômero da quitosana.	37
Figura 16 – Dupla camada típica de um fosfolipídio descrito pelo grupo cabeça hidrofílico e pelo grupo cauda hidrofóbico.	38
Figura 17 – Esquema adaptado de uma experimento de SAXS(“ http://biosaxs.com/technique.html - acessado em 16/09/2013”, [S.d.]) desde a	

produção do feixe, seguido pela a interação com a amostra e o registro do padrão de espalhamento pelos detectores de raio-X.	54
Figura 18 – Espectrofotômetro da Agilent Technologies Ultravioleta Visível que consiste de uma fonte luminosa na faixa UV-VIS, um compartimento para se alojar a cubeta, um detector de absorção e um computador para a aquisição de dados.	55
Figura 19 – Esquema adaptado da espectroscopia UV-VIS (“ http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/UV_Vis/Cary50.htm - acessado em 16/09/2013”, [S.d.]). A emissão da luz incide sob o monocromador e em seguida incide sob amostra; após a absorção o detector mede a intensidade que passou pela amostra e compara com a intensidade incidente.	56
Figura 20 – Aparato do equipamento Malvern Zetasizer para medições do potencial zeta que consiste de um leitor do potencial zeta gerado pelas amostras seguido de um computador para aquisição de dados.	58
Figura 21 – Microscópio de transmissão eletrônica TEM-MSM nas instalações do LNNano.	59
Figura 22 – Esquema simplificado do funcionamento do TEM (“ http://www.olharnano.com/artigos/4001/18002/MET-e-MEV:-conhe%C3%A7a-os-principais-tipos-de-microsc%C3%B3pios-eletr%C3%B4nicos - acessado em 16/09/2013”, [S.d.]) constituído pela produção do feixe, interação com a amostra e leitura da imagem por transmissão.	60
Figura 23 – Microscópio de Varredura eletrônica Inspect nas instalações do LNNano.	61
Figura 24 – Esquema simplificado do SEM constituído pela produção do feixe, interação com a amostra e leitura da imagem por retroespalhamento. Fonte (“ http://www.olharnano.com/artigos/4001/18002/MET-e-MEV:-conhe%C3%A7a-os-principais-tipos-de-microsc%C3%B3pios-eletr%C3%B4nicos - acessado em 16/09/2013”, [S.d.]).....	62
Figura 25 – Aparato do equipamento Perkin-Elmer de TGA que consiste em uma fornalha, um termômetro de precisão, um sistema de controle de fluxo de ar e um computador para aquisição de dados.	63
Figura 26 – Equipamento MPMS3 – S.Q.U.I.D. da Quantum Design utilizado nas instalações do CBPF.	65
Figura 27 – Esquema da junção de um S.Q.U.I.D.-DC adaptada da referência (“ http://www.engr.sjsu.edu/rkwok/squid.htm acessado em 19/06/2017”, [S.d.]), onde se circula uma corrente através a junção de Josephson que dependerá do fluxo do campo	

magnético e da temperatura do experimento, assim mede-se a variação desse sinal em forma de tensão e corrente.	66
Figura 28 – Aparato experimental do dispositivo da Ambrell designado para hipertermia magnética, composto por um computador que registra as informações do ensaio, uma fonte de corrente, uma bobina e um sistema de arrefecimento líquido.	67
Figura 29 – Esquema da instrumentação para aplicação de hipertermia que consiste na fonte de corrente, bobina, medidor de temperatura e computador para registro de dados.....	68
Figura 30 – Instalações da sala de cultura celular no LNBio: (A) Capelas para cultura celular (B) Estufas de incubação do cultivo celular.	70
Figura 31 – Imagens da Células HEK293T tiradas do microscópio ótico.	71
Figura 32 – Imagem das Células de U2OS provenientes da microscopia confocal. O núcleo da célula foi marcado com DAPI (azul) e o citoplasma com mitotracker (vermelho).....	72
Figura 33 – Espectrofotômetro de absorção Perkin EnSpire Multimode Reader que mede a viabilidade celular via MTS; este equipamento encontra-se situado nas dependências do LNBio.	73
Figura 34 – Citômetro de Fluxo situado nas instalações do LNBio. Composto pelo citômetro de fluxo para a contagem dos eventos celulares e um computador para a aquisição de dados.....	75
Figura 35 – Setup de leitura da amostra do BD®FACSCANTO-II. Composto por um injetor de amostra, sistema de focalização de fluxo e um laser para a leitura da amostra.....	76
Figura 36 – Setup de interação óptica e leitura dos eventos do BD®FACSCANTO-II composto pelos conjuntos de lentes de focalização acromáticas que produzem um feixe espacialmente separado o qual é aplicado nas células de fluxo.	76
Figura 37 – Contador automático e de viabilidade celular Countess®.	78
Figura 38 – Foto do microscópio confocal Leica – SP8 nas instalações do LNBio.....	79
Figura 39 – Princípio de funcionamento da microscopia confocal adaptado, o laser representado pelo feixe vermelho é focalizado na amostra representado pelo retângulo verde e cria a fluorescência representada pelo feixe azul que é separado pelo divisor de feixe o qual redireciona apenas o feixe azul para o pinhole. Por fim, apenas o feixe da fluorescência do plano focal e chega ao detector. Fonte (“ https://en.wikipedia.org/wiki/Confocal_microscopy#/media/File:Confocalprinciple_in_English.svg acessado em 19/06/2017”, [S.d.].....	80
Figura 40 – Produto da reação por decomposição térmica do Fe (acac) ₃ em atmosfera controlada de N ₂ resultando em nanopartículas de Fe ₃ O ₄	83

Figura 41 – Soluções de nanopartículas de magnetita suspensas em seus respectivos recobrimentos antes da agitação e sonicação da solução. Da esquerda para direita nomeamos as NPs de acordo com seus respectivos recobrimentos: NP@CH, NP@PEG, NP@SDS, NP@CTAB, NP@DPPC e NP@DSPE.....	84
Figura 42 – Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ sem recobrimento submetidas a microscopia eletrônica de varredura MEV.....	85
Figura 43 – (A) Imageamento convencional de TEM das NPs sem recobrimento (NP#). (B) Imageamento de alta resolução TEM das NP# detalhando a estrutura do material.	86
Figura 44 – (A) Espalhamento SAXS das NPs sem recobrimento seguido pelo ajuste (linha vermelha). B) Distribuição do tamanho do diâmetro das NPs esféricas sem recobrimento através do ajuste da curva de SAXS.	87
Figura 45 – Magnetização contra Campo Magnético das amostras: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG	89
Figura 46 – Magnetização contra Campo Magnético ampliada em a baixos campos: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG	90
Figura 47 – Resultado dos valores dos Campos Coercitivos extraídos da Figura 46 para todas as amostras com recobrimento e sem recobrimento de acordo com cada temperatura correspondente.....	92
Figura 48 – Resultado dos valores das Magnetizações Remanescentes extraídas da Figura 46 para todas as amostras com recobrimento e sem recobrimento de acordo com cada temperatura correspondente.....	93
Figura 49 – Resultado dos valores das Magnetizações de Saturações da Figura 45 para todas as amostras* com e sem recobrimento de acordo com cada temperatura correspondente.....	94
Figura 50 – Curvas de ZFC e FC das amostras: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG.....	96
Figura 51 – Resultado da subtração das curvas ZFC – FC para as amostras: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG	97
Figura 52 – Derivadas das curvas ZFC – FC para as amostras: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG.....	98
Figura 53 –Análise dos resultados obtidos através da Figura 52. (A) Temperatura de bloqueio média (coluna vermelha). (B) Estimativa de tamanho do diâmetro dos aglomerados (coluna azul) para as amostras: NP#; NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS, NP@DPPC e NP@DSPE. Para a amostra NP# foram obtidas duas populações, já para a amostra NP@PEG	

não foi possível determinar os parâmetros devido ao baixo sinal de magnetização da amostra.	99
Figura 54 – Potencial Zeta de todas as amostras utilizados com e sem recobrimentos das amostras: NP@CH, NP@PEG, NP@DSPE, NP@CTAB, NP@SDS, NP@DPPC e NP#. ..	101
Figura 55 – (A) Resultado do TGA das amostras NP@SDS, NP@CTAB, NP@PEG, NP@CH e NP@DSPE. (B) Análise da primeira derivada do TGA de acordo com a massa relativa de cada respectiva amostra.....	102
Figura 56 – Resultado da análise do percentual da massa relativa das amostras NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS e NP@DSPE via TGA.....	103
Figura 57 – Frasco de vidro contendo NPs suspensas para a medição do SAR. No interior do frasco foi colocado a fibra ótica para a aferição da temperatura.	105
Figura 58 – Submissão das amostras NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS e NP@DSPE ao campo magnético externo oferecido pela bobina do equipamento de hipertermia magnética. Quando submetidos a esse campo as NPs se alinham de acordo com o gradiente axial do campo formando linhas de NPs nas paredes da vidraria conhecidas como needles.	105
Figura 59 – Conjunto de medidas das taxas de aquecimento sob as condições de 313 kHz de frequência a 200Oe de campo magnético aplicado; referente a 1 mg/mL das amostras NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS e NP@DSPE. (A) Comportamento da variação da taxa temperatura de 0 a 500 segundos para o conjunto de NPs com seus respectivos recobrimentos. (B) Comportamento da variação da taxa de temperatura de 0 a 100 segundos para o conjunto de NPs com seus respectivos recobrimentos com ajuste linear realizado. (C) Comportamento da variação da taxa de temperatura de 0 a 500 segundos apenas para os respectivos recobrimentos sem NPs. (D) Comportamento da variação da taxa de temperatura de 0 a 100 segundos apenas para os respectivos recobrimentos sem NPs com ajuste linear realizado.....	107
Figura 60 – Resultado das medidas do SAR para 1 mg/mL sob um campo de 200 Oe a 313kHz das amostras: NP@PEG, NP@CH, NP@SDS, NP@CTAB e NP@DSPE. (A) Variação da taxa de temperatura efetiva dT/dt normalizada pela massa de NPs de magnetita. (B) Resultado do cálculo do SAR para cada amostra.	109
Figura 61 – Células de HEK em uma placa de cultura celular de 96 poços após a interação com o MTS.....	111
Figura 62 – Resultados da viabilidade celular das amostras incubadas nas células via MTS. Incubação realizada com: (A) Células de HEK293T. (B) Células de U2OS.	112

Figura 63 - (A) Espectro UV-VIS médio do ferro da magnetita dissolvido em HCl. (B) Espectro médio do controle de células dissolvido em HCl.	114
Figura 64 – Espectro UV-VIS da média da triplicata da incubação celular das amostras: NP@CH, NP@PEG, NP@DSPE e NP@SDS dissolvidas em HCl.....	114
Figura 65 – Concentração da massa de ferro por célula HEK293T (pg/célula) via internalização das amostras NP@CH, NP@PEG, NP@DSPE e NP@SDS incubadas por 24h.	115
Figura 66 – Microscopia confocal da interação das células HEK293T e U2OS com as amostras: NP@PEG, NP@CH, NP@DSPE, NP@SDS e NP@CTAB.	117
Figura 67 – Ampliação da região de estudo da microscopia confocal das amostras NP@DSPE e NP@SDS nas células HEK293T e U2OS. A ampliação se refere ao imageamento DIC e da composição de imagens do DIC com os biomarcadores DAPI e Mitotracker para avaliação da localização os aglomerados de nanopartículas indicados pelas setas brancas.....	118
Figura 68 – Esquema do que ocorre na interação das nanopartículas em meio celular durante os estágios de incubação, internalização e perinucleação das NPs.....	119
Figura 69 – Citometria das células de controle: pontos vermelhos representam células vivas, pontos azuis células mortas e pontos pretos são eventos como fragmentos celulares. (A) Controle sem hipertermia; (B) Controle de mortalidade em alta concentração de CTAB; (C) Controle com hipertermia após 500 segundos; (D) Controle com hipertermia após 1500 segundos	120
Figura 70 – Citometria das células mais a amostra NP @PEG. (A) Conjunto de células com a amostra NP@PEG sem a realização de hipertermia; (B) NP@PEG junto ao CTAB; (C) Conjunto de células com a amostra NP@PEG seguido da realização de hipertermia a 500 segundos; (D) Conjunto de células com a amostra NP@PEG seguido da realização de hipertermia a segundos	121
Figura 71 – Citometria de fluxo para a análise da interação das NPs com o marcador de apoptose PI. (A) Citometria de fluxo apenas das NPs; (B) Citometria de fluxo das NPs com o marcador PI.....	122
Figura 72 – Citometria de fluxo da interação das nanopartículas com o marcador PI. Azul para mortalidade e vermelho para células vivas. (A) Marcação do controle de células vivas sem hipertermia (B) Marcação PI do controle negativo em CTAB para a quantificação; (C) Resultado aplicado da marcação PI nas células de controle sem hipertermia (D) Resultado aplicado da marcação PI ao controle de mortalidade em alta concentração de CTAB;	123

Figura 73 – Análise da viabilidade celular obtida na citometria através do marcador PI. (A) Viabilidade celular sem a aplicação de hipertermia. (B) Viabilidade celular com a aplicação de hipertermia a 500 e 1500 segundos.	124
Figura 74 – Teste de viabilidade celular via MTS, a barra azul representa a medida realizada pelo procedimento convencional de leitura e a barra vermelha representa o procedimento adaptado de medida que consiste em realocar o material do poço com células a ser medido para outro poço vazio e realizar a leitura de viabilidade logo em seguida.....	126
Figura 75 – Bobina magnética a esquerda e o poço individual de cultura celular previamente cortado a direita.	128
Figura 76 – Arranjo experimental para hipertermia voltado a aplicações biológicas constituído de uma bobina para a indução do campo, o termômetro ótico e o poço individual previamente cortado contendo células com NPs e seus respectivos recobrimentos.	130
Figura 77 – Resultado da viabilidade celular via MTS adaptado para hipertermia magnética realizada na célula HEK293T com as amostras NP@PEG, NP@CH, NP@SDS e NP@DSPE. (A) Viabilidade celular referente a hipertermia para 100 µg de NP para cada amostra. (B) Viabilidade celular normalizada pelo controle individual de cada recobrimento referente a hipertermia para 100 µg de NP para cada amostra. (C) Viabilidade celular referente a hipertermia para 200 µg de NP para cada amostra. (D) Viabilidade celular normalizada pelo controle individual de cada recobrimento referente a hipertermia para 200 µg de NP para cada amostragem.....	131
Figura 78 – Esquema dos recobrimentos das NPs de acordo com suas classes e tipos adotados durante o trabalho. Para os polímeros foram sintetizadas as amostras NP@PEG e NP@CH, para os fosfolipídios obteve-se as amostras NP@DSPE e NP@DPPC e para os surfactantes foram adotadas as amostras NP@CTAB e NP@SDS.	136
Figura 79 – Esquema da formação de aglomerados através da interação dipolar entre as NPs de magnetita.	138
Figura 80 – Esquema da internalização das NPs através da endocitose na membrana celular. Após a endocitose as NPs iniciam o tráfego celular.....	140
Figura 81 – Esquema do passo a passo do ensaio de hipertermia magnética nas células. O primeiro processo está associado à incubação das amostras com as células em poços individuais. Após 24 h estes poços individuais são levados para a aplicação magneto hipertérmica in vitro, onde as NPs no interior do citoplasma serão aquecidas. O último passo consiste no registro do dano celular infligido via MTS adaptado.	142

Figura 82 – Conjunto das amostras NP@CH, NP@PEG e NP@DSPE recomendadas para aplicação magneto hipertérmica in vitro em células de HEK293T.	143
Figura 83 – Microscopia de varredura dos nano anéis recobertos com: (A) PEG; (B) CH; (C) CTAB; (D) SDS; (E) DSPE; (F) DPPC.	145
Figura 84 - Microscopia de transmissão de todas as amostras. (A,B) – NP sem recobrimento; (C,D) – NP recoberta com DSPE; (E,F) – NP recoberta com PEG; (G,H) – NP recoberta com CH; (K,L) – NP recoberta com SDS.	165

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Tabela adaptada(WUST et al., 2002) de estudos clínicos em hipertermia para diferentes tipos de câncer em diferentes estágios.....	44
Tabela 2 - Razão entre a massa porcentagem da massa de NP pela massa de recobrimento.	104
Tabela 3 - Normalização da Magnetização de Saturação através dos resultados encontrados na Termogravimetria.....	104
Tabela 4 – Comparação dos resultados obtidos na termogravimetria, na magnetometria e no SAR	109
Tabela 5 – Conjunto de amostras previamente preparadas em células HEK293T para aplicação biológica de acordo com cada configuração.....	129
Tabela 6 – Resultado do teste estatístico T para a Figura 77B entre as colunas Controle e Hipertermia por 500 s com 100 µg de NPs para cada amostra recoberta.....	132
Tabela 7 – Resultado do teste estatístico T para a Figura 77B entre as colunas Controle e Hipertermia por 1500 s com 100 µg de NPs para cada amostra recoberta.....	133
Tabela 8 – Resultado do teste estatístico T para a Figura 77D entre as colunas Controle e Hipertermia por 500 s com 200 µg de NPs para cada amostra recoberta.....	134
Tabela 9 – Resultado do teste estatístico T para a Figura 77D entre as colunas Controle e Hipertermia por 1500 s com 200 µg de NPs para cada amostra recoberta.....	134

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, aos meus pais Armando Yassuo Shigeyosi, o pequeno oriental que sempre foi grandioso e sábio em me dar conselhos; à minha mãe Terezinha Batista Shigeyosi guerreira e heroína nos momentos precisos e à minha irmã Natália Tiemi Shigeyosi que duelou comigo da infância à juventude (na verdade até hoje brigamos) e me ensinou que nem tudo na vida é fácil e muitas coisas exigem paciência e determinação.

Deixo um abraço aos meus melhores amigos Anderson Vieira, Danila Bueno, Elaine Kroth e Regiane Barbosa, que me ajudaram num momento muito delicado da minha vida me dando forças para enfrentar uma depressão e seguir em frente para defender esta Tese. A minha segunda família de São Carlos: Pedro (PH), Elaine (Dora), Mateus (Barretos), ao Amauri (Mirradis), que sempre me confortaram no calor dessa cidade do clima. E a Diana Carla que me ajudou a ter coragem para finalizar esse trabalho, além de me reestruturar emocionalmente.

A toda a minha turma e colegas de trabalho: Francine, Augustin, Jéssica, Maiara, Leticia, Karim, Murilo, Simone, Ana Flávia, Carlos, Glauco dentre outros que agora me falha a memória e não consigo lembrar o nome. Um agradecimento especial ao meu amigo Dr. Carlos Sato que praticamente me abriu as portas dentro do ramo da hipertermia e das nanopartículas magnéticas. A Dra. Fernanda Costa que teve a maior paciência do mundo comigo em me ensinar muito sobre biologia.

Ao meu orientador Dr. Mateus Borba Cardoso que pegou um orientando cru que não sabia sequer fazer uma apresentação decente, e transformou num pesquisador capaz de ganhar prêmios de melhores trabalhos em congressos.

Ao Dr. Flávio Garcia do CBPF que me ajudou na parte das análises das nanopartículas magnéticas e cedeu o seu equipamento para que eu pudesse realizar o ensaio de magnetometria das minhas amostras.

Agradeço as agências de fomento e todas as pessoas que compõem as instituições que tornaram esse projeto possível: UFSCar, CNPEM, LNLS, LNBio, LNNano e CBPF.

“A grande batalha das nossas vidas é a construção do nosso próprio futuro. É viver com dignidade, apesar da nossa natureza imperfeita. É aceitar os outros como iguais, e ao mesmo tempo ter consciência da nossa verdadeira importância, e da capacidade de reger o nosso destino. Somos os donos de nossos caminhos, os únicos responsáveis por nossas vitórias, e pelos nossos fracassos. Ninguém nos controla. Somos livres, e essa é nossa única arma.”

Eduardo Spohr

1 Introdução

Os tratamentos convencionais de câncer (BASKAR *et al.*, 2012; CRUZ; ROSSATO, 2015; JR *et al.*, 2007) vêm obtendo sucesso em muitos casos, entretanto nem sempre o tratamento convencional com quimioterapia e radioterapia são os mais indicados para cada caso, podendo em alguns momentos levantar incertezas (ANGELO; MOREIRA; RODRIGUES, 2010) a respeito do tratamento mais indicado. É nesse cenário que os nanomateriais aparecem com a promessa de criar rotas alternativas para o tratamento expandindo as possibilidades de diagnósticos e tratamentos. Aqui, em especial, serão tratadas as vantagens dos nanomateriais magnéticos (BADRUDDOZA *et al.*, 2013; BRANQUINHO *et al.*, 2013; GUARDIA *et al.*, 2012; HUANG; HAINFELD, 2013; LIONG *et al.*, 2008; WUST *et al.*, 2002) que se estendem não somente no tratamento do câncer, mas sim em diversas aplicações como tratamentos de infecções bacterianas (GAO *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2013), direcionamento de drogas (BENZ, 2012; GALIMARD *et al.*, 2012; LIONG *et al.*, 2008; LIU, GANG *et al.*, 2013; MAHMOUDI *et al.*, 2011; MAJEED *et al.*, 2013; NAQVI *et al.*, 2010; PRESS, 2012; ZHANG, J *et al.*, 2008; ZHANG, YING *et al.*, 2010) e, claro, materiais nanotecnológicos como os microprocessadores projetados nanometricamente (ULLAH, 2012). Trabalhar com nanomateriais parecia um futuro distante onde só se observava as aplicações em filmes de ficção científica. No entanto, com o advento da tecnologia e da ciência foram elaborados dispositivos cada vez menores e hoje é possível obter facilmente um equipamento com processadores nanométricos como tablets e smartphones.

Então, já era de se esperar que rotas inovadoras para o diagnóstico e tratamento das doenças citadas seriam buscadas. Assim os materiais nanométricos trouxeram consigo um leque de opções de tratamentos e diagnósticos promissores de doenças que afligem a sociedade como o câncer, infecções bacterianas e virais entre outras enfermidades. Dentro deste cenário as nanopartículas magnéticas ganham espaço e visibilidade devido às suas propriedades magnéticas especiais como a ausência de remanência magnética típica do superparamagnetismo (GOYA *et al.*, 2003; MEHDAOUI *et al.*, 2012; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012; SUNGHYUN, 2011; ZHANG, YING *et al.*, 2010). A vantagem de se trabalhar com sistemas nanométricos é que isso viabiliza o endereçamento de drogas (*drug delivery*) (BENZ, 2012; GALIMARD *et al.*, 2012; LIONG *et al.*, 2008; LIU, GANG *et al.*, 2013; MAHMOUDI *et al.*, 2011; MAJEED *et al.*, 2013; NAQVI *et al.*, 2010; PRESS, 2012; ZHANG, J *et al.*, 2008; ZHANG, YING *et al.*, 2010), assim como o diagnóstico por imageamento (ALKILANY *et al.*,

2009; GALIMARD *et al.*, 2012; GOYA *et al.*, 2003; MAHMOUDI *et al.*, 2011; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012; SUNGHYUN, 2011; ZHANG, YINAN *et al.*, 2012; ZHANG, YING *et al.*, 2010) através da funcionalização das superfícies (KURTZ-CHALOT *et al.*, 2014; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012; WU; HE; JIANG, 2008) do nanomaterial, e, particularmente, neste trabalho, o grande interesse está na aplicação das nanopartículas magnéticas no tratamento de câncer via hipertermia magnética (BARALDI, 2015; MAHMOUDI *et al.*, 2011; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012).

O termo hipertermia está associado à elevação da temperatura normal do corpo. Portanto hipertermia magnética deve-se a elevação da temperatura normal do corpo via ação magnética, em geral com a aplicação de um campo magnético externo. A vantagem de se utilizar isso em bioaplicações está correlacionado à indução da morte celular via aquecimento hipertérmico (HUANG; HAINFELD, 2013; MAHMOUDI *et al.*, 2011; NAQVI *et al.*, 2010; SOENEN; DE CUYPER, 2009, 2010; WUST *et al.*, 2002), em especial as células cancerígenas que são mais sensíveis à troca de calor do que as células saudáveis. Entretanto, apenas aquecer as nanopartículas descontroladamente através de um campo magnético alternado tornará o tratamento ineficaz e indesejado, podendo causar danos a tecidos que não são de interesse. Para corrigir essa deficiência é possível concentrar o tratamento apenas na região desejada através do redirecionamento do nanomaterial. Dessa forma, a hipertermia magnética e os nanomateriais magnéticos ganham visibilidade, pois quando as nanopartículas magnéticas estão sujeitas a um campo alternado elas liberam calor tornando assim possível o tratamento via hipertermia.

A hipertermia magnética traz consigo o conceito termodinâmico da taxa de aquecimento produzido pelo nanomaterial magnético quando exposto a um campo alternado externo. Isso está relacionado ao “Specific Loss Power – SLP” ou ao “Specific Absorption Rate – SAR” (BARALDI, 2015; GUARDIA *et al.*, 2012; LIU, XIAO LI *et al.*, 2015; MEHDAOUI *et al.*, 2012; THOMAS *et al.*, 2009; WUST *et al.*, 2002) que é a potência gerada pelo nanomaterial por um tempo, em geral normalizado pela massa. Pensando em termos de bioaplicações, o SAR elevado gera um aquecimento rápido, reduzindo assim a dose a ser administrada de nanomaterial. Entretanto, uma taxa elevada de variação de temperatura pode provocar uma variação abrupta de temperatura com uma pequena variação de campo magnético, gerando danos indesejados. Já um SAR reduzido leva a um bom controle da variação da temperatura, em especial sob o controle da área afetada, entretanto, é necessária uma dose maior do nanomaterial. No entanto, essa elevada dose, em alguns casos, pode induzir efeitos colaterais indesejados ao paciente.

Em meio a esses questionamentos, é importante salientar que por se tratar de um tecido biológico (JUNQUEIRA, 2012), algumas características citológicas devem ser observadas tais como seletividade da membrana plasmática, saturação de material em seu interior e viabilidade celular de acordo com a concentração do material envolvido. O foco deste trabalho é voltado as possíveis aplicações biomédicas, portanto, alguns critérios devem ser atendidos tais como a biocompatibilidade, baixa remanência magnética e baixo campo de saturação. As importâncias destes parâmetros apresentados vêm da necessidade de um alto controle biofísico do durante o tratamento magneto hipertérmico no tecido humano.

Com relação ao pré-requisito das propriedades magnéticas foram utilizadas nanoestruturas de óxido de ferro conhecidas também como “Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles – SPIONs” (BARALDI, 2015; LI *et al.*, 2013; MAHMOUDI *et al.*, 2011; NAQVI *et al.*, 2010; UNSOY *et al.*, 2012). Fundamentalmente, esse nanomaterial magnético não apresenta remanência magnética e tem um baixo campo de saturação, atendendo assim os requisitos magnéticos exigidos. Um outro fator desejado está relacionado à possibilidade de internalização das nanopartículas no tecido biológico. Assim, a escolha da morfologia é um importante parâmetro e, neste trabalho, nanopartículas de magnetita/maghemita esféricas de aproximadamente 15 nm foram utilizadas, buscando uma maior internalização do nanomaterial no citoplasma celular. Visando trabalhos futuros foi realizado alguns testes com nano anéis magnéticos (BARALDI, 2015) visando recobri-los com os métodos desenvolvidos nesta tese.

Para atender o pré-requisito de biocompatibilidade, o recobrimento do nanomaterial foi modificado gerando um impacto imediato na interação do nanomaterial com o tecido biológico. Isso pode ser feito através do recobrimentos com polímeros (BADRUDDOZA *et al.*, 2013; HOLTZ, 2009; NEL *et al.*, 2009), surfactantes (KURTZ-CHALOT *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2013; ROSENSWEIG, 2002; SUNGHYUN, 2011; ZHANG, YINAN *et al.*, 2012) e fosfolipídios (CUYPER; JONIAU, 1991; GIRI *et al.*, 2005; GONZALES; KRISHNAN, 2005; LEE, NOHYUN *et al.*, 2011; LIU, GANG *et al.*, 2013; NEL *et al.*, 2009; SOENEN; DE CUYPER, 2009; XIE; SUN, 2011; ZHANG, YINAN *et al.*, 2012) em meio aquoso alterando assim as características do coloide magnético (COEY, 2010) (KNIGHT *et al.*, 1999; SOENEN; DE CUYPER, 2009) (NAQVI *et al.*, 2010) (GALIMARD *et al.*, 2012). Entretanto, essas modificações podem também impactar no aquecimento do nanomaterial pois, ao modificar a superfície do coloide alteramos também a capacidade térmica do mesmo. Além disso a interação do coloide com o meio celular interfere diretamente nas propriedades termodinâmicas do meio, em especial a capacidade térmica do meio de acordo com o calor específico de cada componente; isso impactará diretamente no potencial de aquecimento do conjunto. Portanto

avaliar o SAR real do coloide em meio celular não é uma tarefa simples, entretanto pode-se verificar alguns parâmetros tais como a taxa de aquecimento que permite correlacioná-los com tratamento do tecido em estudo.

Assim encontra-se uma vasta gama de variáveis a serem controladas, e nem sempre os recobrimentos irão atender a todos os requisitos supracitados. Dentro deste amplo contexto, o foco do trabalho aqui descrito visa caracterizar, compreender o comportamento dos diferentes recobrimentos, quantificar a quantidade de nanomaterial internalizado e escolher os candidatos mais promissores para a aplicação hipertérmica nas células de HEK293T (F.L. GRAHAM, 1977; LUO; BUSILLO; BENOVIC, 2008).

Esta tese contém 9 capítulos divididos da seguinte forma:

No capítulo 2 serão abordados os fundamentos teóricos básicos para a compreensão dos fenômenos físicos e químicos que governam a hipertermia magnética e o comportamento dos coloides magnéticos. No capítulo 3 será descrito um levantamento do cenário geral do desenvolvimento das nanopartículas relacionadas às aplicações médicas bem como a utilização de distintos recobrimentos descritos na literatura. Será discutida a importância dos trabalhos que contribuíram para o desenvolvimento dos nanomateriais magnéticos na atualidade. O capítulo 4 trata das sínteses das nanopartículas bem como técnicas de recobrimentos do nanomaterial com surfactantes, polímeros e fosfolipídios. O capítulo 5 é dedicado ao contexto de toda a instrumentação utilizada na caracterização das amostras, toda a preparação para cada processo e como foram cultivadas e tratadas as células utilizadas neste trabalho. O capítulo 6 trata dos resultados obtidos através de cada técnica de caracterização, realizando discussões em cima de cada resultado obtido investigando as propriedades de cada recobrimento envolvido; neste capítulo será introduzido uma discussão dos estudos direcionados à aplicação hipertérmica em cultura celular com o nanomaterial recoberto avaliando e selecionando as amostras mais propícias para os ensaios hipertérmicos em virtude da sua viabilidade para bioaplicações. Este capítulo também descreve o passo-a-passo das aplicações *in vitro* com as células HEK293T de acordo como cada nanomaterial recoberto se comporta sob situações de stress hipertérmico. No capítulo 7 será apresentado a possibilidade de se aplicar o trabalho disposto aqui nesta tese para uma morfologia conhecida como nano anéis magnéticos; este nanomaterial foi amplamente discutido na tese do Dr. Carlos Sato (BARALDI, 2015). Além disso, neste tópico, será abordado a continuidade do próprio trabalho desenvolvido, especialmente em termos de publicações correlacionadas com as aplicações hipertérmicas. No capítulo 8 será apresentada uma ampla discussão e um fechamento do trabalho de acordo com os resultados obtidos.

2 *Introdução aos nanomateriais magnéticos e fluidos magnéticos*

A nanotecnologia já faz parte do nosso cotidiano, está presente nos nossos telefones celulares e computadores entre outros eletrônicos. Ela já não é mais um marco do futuro, mas sim, um investimento presente onde indústrias gastam trilhões de dólares somente com produtos nanotecnológicos e nanofármacos (HUANG; HAINFELD, 2013; LI *et al.*, 2013; NAQVI *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2012; SOENEN; DE CUYPER, 2010).

Atualmente vivemos em um cenário em que a tecnologia acaba impulsionando a ciência no desenvolvimento de novos nanomateriais estruturados e vice-versa. O fato destes materiais serem tipicamente muito pequenos acabam por apresentar fenômenos quânticos tais como os plasmon (GWAMURI *et al.*, 2015) no caso das nanopartículas metálicas, evento que se desenvolve com a excitação coletiva dos elétrons em um sólido. O impacto direto desse fenômeno de plasmon é a alteração das bandas de eletrônicas e com isso as frequências de excitação e emissão do material, o que altera o aspecto de cor do objeto de acordo com o tamanho do nanoparticulado. Já as nanoestruturas magnéticas apresentam um comportamento singular conhecido como superparamagnetismo. Este fenômeno ocorre em nanopartículas que apresentam apenas um único domínio magnético. Isto é possível quando o seu diâmetro é inferior ao diâmetro crítico que depende de algumas condições que serão explicadas adiante. Nesta condição, considera-se que a magnetização das nanopartículas é um único momento magnético gigante, que nada mais é que a somatória de todos os momentos magnéticos atômicos. Este fenômeno superparamagnético é conhecido como macrospin (BANDOPADHYAY; CHAUDHURI; JAYANAVAR, 2014) e está intimamente ligado ao tempo de relaxação dos momentos magnéticos e da temperatura de bloqueio (GOYA; MORALES, 2004; MARKINK, 2012; PEREZ, N *et al.*, 2008; WINKLHOËER; FABIAN; HEIDER, 1997).

Dentro desse cenário nanomagnético existe uma classe de materiais conhecida como fluido magnético (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997; SCHERER; NETO, 2005; SHAW, 1980), muito em geral chamado de ferrofluido ou coloide ferromagnético. Estes materiais se destacam, porque se encontram no estado líquido, porém ainda apresentam propriedades que somente materiais em estado sólido teriam. Produzir esse tipo de material demanda sínteses específicas, como um controle de condições que viabilizem a distribuição das nanopartículas magnéticas no meio líquido. Isso traz consigo um conceito muito importante conhecido como estabilidade eletrostática e eletrostérica de coloides. Para tal pode-se utilizar diferentes

recobrimentos junto às nanopartículas, este processo modifica o meio coloidal e possibilita um novo leque de opções para biocompatibilidade do nosso ferrofluido com biomateriais. O objetivo deste primeiro capítulo é descrever os sistemas investigados nesse trabalho.

Neste contexto, serão apresentados conceitos químicos e físicos que permitem a estabilização de um coloide bem como avaliar a investigação da interface entre as nanopartículas e os seus respectivos recobrimentos e suas consequências. A síntese utilizada para a obtenção do fluído magnético foi decomposição térmica. Já os recobrimentos adotados foram os fosfolipídios, polímeros e surfactantes cuja finalidade dos recobrimentos está correlacionado com a estabilização e preparação dos coloides para bioaplicações. Os fundamentos teóricos voltado ao nanomagnetismo foram, em suma, extraídos de duas referências (COEY, 2010; GUIMARÃES, 2009).

2.1 Magnetismo Clássico

O Magnetismo pode ser definido no dicionário *Aurélio* como “o conjunto de fenômenos associados às forças produzidas entre circuitos em que há uma corrente elétrica, ou entre magnetos”. Em física podemos representar o campo magnético pela letra H , o campo de indução magnética pela letra B e a magnetização pela letra M . A relação entre essas grandezas é descrita por:

$$\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \vec{M}) \quad (2-1)$$

onde, $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} N \cdot A^{-2}$ é a constante de permeabilidade magnética no vácuo no SI.

A origem dos efeitos magnéticos vem momentos de dipolos magnéticos de partículas elementares ou de correntes elétricas. O momento de dipolo magnético \vec{m} de um material é um vetor que, em presença de um campo magnético gera um o torque $\vec{\tau}$ que pode ser descrito por:

$$\vec{\tau} = \vec{m} \times \vec{B} \quad (2-2)$$

No caso dos materiais que apresentam magnetização devido ao arranjo de seus momentos de dipolos magnéticos elementares, pode-se definir a magnetização como a somatória de cada momento de dipolo magnético individual dividido pelo volume deste material:

$$\vec{M} = \frac{\Sigma \vec{m}}{V} \quad (2-3)$$

Como o material apresentará regiões com conjuntos de dipolos apontando em uma mesma direção, cabe neste ponto definir o que é domínio magnético. Basicamente o domínio magnético é uma região dentro de um material magnético em que a magnetização está em uma direção uniforme. Isso significa que os momentos magnéticos individuais dos átomos estão alinhados um com o outro e eles apontam na mesma direção.

Em física atômica podemos definir o momento magnético de um elétron devido ao seu momento angular orbital e de spin. Para expressar essa unidade natural utiliza-se o magnéton de Bohr. Que em unidades SI pode ser expresso por:

$$\mu_B = \frac{e\hbar}{2m_e} \quad (2-4)$$

onde, $\mu_B = 9,274 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$ no SI; e é a carga elementar do elétron; \hbar é a constante de Planck reduzida; m_e é a massa do elétron.

Quando essas cargas estão em movimento, elas produzem corrente elétrica. Seja a nível atômico no caso dos momentos orbitais e de spin, tanto quanto no caso macroscópico no movimento dos elétrons livres em um condutor. No caso das correntes elétricas em um condutor, um dos exemplos mais simples de momento magnético é o de uma espira circular de área A , ao qual circula uma corrente elétrica i , para qual a magnitude do momento de dipolo magnético pode ser descrita por:

$$\vec{m} = i \cdot \vec{A} \quad (2-5)$$

O termo ferromagnetismo é por causa do magnetismo permanente da magnetita observado por Tales de Mileto (640 a.C.-546 a.C.). Entretanto, a maioria dos materiais não apresentam momentos magnéticos permanentes. Alguns materiais só apresentam resposta magnéticas quando estão sujeitos a um campo magnético externo.

O material magnético pode apresentar diferentes respostas de acordo com o arranjo dos seus domínios magnéticos. Uma das respostas é o material paramagnético, neste caso o material não apresenta um alinhamento organizado dos momentos magnéticos em condições normais, entretanto quando um campo magnético externo é aplicado ao paramagneto, o material se orienta fracamente a favor do campo externo. Outro comportamento possível é o ferromagnetismo, naturalmente neste material há um grande alinhamento dos momentos

magnéticos em determinadas regiões do material conhecidas como domínios magnéticos. As direções do alinhamento destes domínios dependem dos arranjos cristalográficos do material. De maneira geral, haverá um eixo preferencial de alinhamento magnético este eixo é denominado eixo fácil de magnetização. Quando o material ferromagnético é submetido um campo magnético externo ele responderá com uma forte orientação de seus momentos em relação ao campo. Outro comportamento possível é o diamagnetismo. O material diamagnético se organiza de forma a repelir o campo magnético externo conhecido como diamagnetismo.

2.1.1 Paramagnetismo

São materiais que apresentam magnetismo quando submetido a um campo externo sendo fracamente atraídos pelo campo aplicado, por exemplo: o alumínio e o magnésio (“Search results matching magnetic moment”, [S.d.]). O arranjo paramagnético de um material consiste que seus elétrons não estão pareados, desta forma cada momento está livre para alinhar com momentos magnéticos em qualquer direção. Quando um campo externo é aplicado, esses momentos magnéticos tendem a se alinhar na mesma direção do campo aplicado. Os materiais magnéticos obedecem a relação de Weiss de acordo com a definição:

$$M = \chi H \quad (2-6)$$

onde, no SI M é a magnetização medida em ampere/metro [A/m], χ é a susceptibilidade magnética adimensional, no sistema internacional H é o campo magnético medido em ampère/metro [A/m]. Através destes parâmetros estabelece-se também uma relação de dependência com a temperatura conhecida como a relação de Curie-Weiss:

$$\chi = \frac{C}{T - \theta} \quad (2-7)$$

onde, χ é a susceptibilidade magnética, T é a temperatura absoluta medida em kelvins [K], θ é uma constante que depende do material e C é a constante de Curie. De uma maneira simplificada a agitação térmica de um paramagneto se opõe a tendência dos elétrons não emparelhados de se alinhar com o campo aplicado, mantendo desta forma os momentos aleatoriamente orientados. Caso a temperatura não seja um fator determinante pode-se avaliar os momentos magnéticos do material apenas verificando-se como o material se comporta antes, durante e depois da aplicação de um campo magnético externo. Para um paramagneto obtém-

se como resultado apenas um alinhamento na direção do campo que pode ser acompanhado na Figura 1.



Materiais Paramagnéticos

Figura 1 – Comportamento dos materiais paramagnéticos quando expostos a um campo externo. No primeiro estágio quando não há campo aplicado e os momentos magnéticos (seta azul) estão desparelhados. Quando o campo aplicado (seta vermelha) incide no material o mesmo se orienta a favor do campo. Por fim, quando o campo é retirado, os momentos magnéticos ficam desparelhados.

Entretanto, os sistemas de maneira geral estarão sujeitos a variação de temperatura apresentando, portanto, agitação térmica. Essa agitação irá influenciar diretamente na organização dos domínios magnéticos deixando-os desorientados após a remoção do campo, o que leva a diminuição da susceptibilidade magnética do material.

2.1.2 Função de Langevin e o Cálculo para o Paramagnetismo Clássico

Para o cálculo da função de Langevin, é preciso considerar temperaturas suficientemente altas onde a energia de agitação térmica ($k_b T$) é superior à barreira de anisotropia (BENZ, 2012; GUIMARÃES, 2009) (ΔE). Fazendo essa consideração, é possível desprezar a energia de barreira fazendo com que a magnetização do sistema possa assumir qualquer direção. Este caso é conhecido como um paramagneto clássico que pode ser descrito pela função de Langevin. Além disso o sistema de NPs é formado por n átomos em um volume V , com momentos magnéticos atômicos μ_B .

A escolha do eixo de aplicação do campo de referência é arbitrária, portanto, nesse caso, toma-se como referência o eixo \hat{z} , de tal forma que ao aplicar um campo magnético no sistema obtém-se apenas a componente \hat{z} permitindo descrever o campo magnético através da relação $\vec{H} = H\hat{z}$. Este campo incide sobre um material de momento magnético (\vec{m}), assim pode-se obter a energia magnética (E_{mag}) que será descrita por:

$$E_{mag} = -\vec{B} \cdot \vec{m} = -mB \cos \theta \quad (2-8)$$

sendo θ , o ângulo entre o campo \vec{B} e o momento magnético \vec{m} . Assim, a magnetização do sistema será dada pela integração de cada momento magnético:

$$\vec{M} = \int_0^n \vec{m} \, dn \quad (2-9)$$

É necessário fazer algumas considerações em termos de mecânica estatística para se resolver essa integração: primeiro que a magnetização induzida deve ser mensurada somente na direção do campo aplicado, isto é: $m = n(\theta)\mu_B \cos(\theta)$. D-esta forma, a média da magnetização de uma população de partículas de um material de volume V , é igual a:

$$M = \left(\frac{\mu_B}{V}\right) \int_0^\pi n(\theta) \cos \theta \, d\theta \quad (2-10)$$

Agora, se o material for levado ao estado de saturação, isto significa que todos os momentos magnéticos estarão alinhados ao campo aplicado. Seja N o número total de população, então:

$$N = \int_0^\pi n(\theta) \, d\theta \quad (2-11)$$

Utilizando a função de probabilidade $n(\theta) \, d\theta \propto \left(\frac{E}{k_B T}\right) \sin(\theta) \, d\theta$, pode-se calcular essa magnetização. Com a magnetização de saturação $M_s = \left(\frac{N\mu_B}{V}\right) = \left(\frac{\mu}{V}\right) \int_0^\pi n(\theta) \, d\theta$, torna-se possível calcular a razão M/M_s :

$$M/M_s = \frac{\int_{-1}^{+1} e^{x\beta} \beta \, d\beta}{\int_{-1}^{+1} e^{x\beta} \, d\beta} = \left(\coth x - \frac{1}{x}\right); \text{ com } x = \frac{g\mu_B B}{k_B T} \text{ e } \beta = \cos(\theta) \quad (2-12)$$

onde g é o fator giromagnético, k_B é a constante de Boltzman, T é a temperatura, B é o campo aplicado e μ_B é o magneton de Bohr, o termo entre parênteses é conhecido como a função de Langevin dada por:

$$L(x) = \frac{x}{3} - \frac{x^3}{45} + \frac{2x^5}{945} - \dots \quad (2-13)$$

Para um x pequeno pode-se considerar apenas o primeiro termo da série obtendo uma magnetização:

$$M = \frac{n\mu x}{3} = \frac{ng^2\mu_B^2 B}{3k_B T}; \quad (2-14)$$

lembrando que a susceptibilidade magnética é dada por:

$$\chi = \frac{M}{H} = \frac{C}{T} \quad (2-15)$$

Desta forma, é possível descrever o paramagnetismo através de um modelo clássico, entretanto, este modelo não permite entender a origem do magnetismo neste tipo de material. Para tal, é necessário o entendimento quântico do magnetismo.

2.2 Magnetismo quântico - Interação de troca e campo molecular

Por mais que a teoria de Curie-Weiss fosse uma teoria bem fundamentada, na época, ainda era complicado explicar a origem do campo molecular (COEY, 2010). Isso só foi possível com o advento da mecânica quântica através da modelagem das interações de troca (COEY, 2010; GUIMARÃES, 2009) (mais conhecida como interação *Exchange* em inglês). Através do princípio de exclusão de Pauli em 1928, Heisenberg explicou de forma microscópica o fundamento do ferromagnetismo. A origem desse campo molecular depende da interação coulombiana entre dois elétrons e das suas respectivas orientações relativas entre os spins (HEISENBERG, 1926).

De forma matemática, Heisenberg e Dirac (DIRAC, 1926) descreveram a dinâmica da interação entre dois elétrons através de um fator J e demonstrou que o acoplamento entre eles é descrito pela seguinte hamiltoniana:

$$\mathcal{H} = -2J \vec{S}_i \cdot \vec{S}_j = -2J S_i S_j \cos \theta \quad (2-16)$$

onde S_i e S_j são os spins dos elétrons e θ é o ângulo entre eles.

O ordenamento dos spins depende intimamente do valor do ângulo θ entre os spins e do sinal de J . Se $J > 0$, a energia mínima ocorrerá quando o ângulo for igual a zero, neste estado obtém-se o acoplamento ferromagnético. Para $J < 0$, o mínimo de energia será quando o ângulo for 180° e esse acoplamento é conhecido como antiferromagnético. É importante salientar que essa interação é de curto alcance. Assim, se for considerado um cristal, a interação será apenas entre os primeiros vizinhos.

2.2.1 Função de Brillouin e o Paramagnetismo Quântico

Essa equação descreve o conceito de magnetização para um paramagneto ideal. Em particular, descreve a dependência da magnetização M em um campo magnético aplicado B de acordo com o número quântico de momento angular total J dos momentos magnéticos microscópicos do material. Supondo que \hat{z} seja a direção do campo magnético aplicado a componente azimutal de cada momento angular magnético poderá assumir somente $2J + 1$ valores possíveis de energia. Sendo que essas energias serão diferentes de zero devido ao campo externo B . Assim a energia associada à Hamiltoniana do sistema no eixo azimutal será:

$$E = -mg\mu_B B = -\frac{k_B T \chi m}{J}; \quad \chi = \frac{g\mu_B B J}{k_B T} \quad (2-17)$$

onde, m é a magnetização, g o fator giromagnético, μ_B é o magnéton de Bohr, k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura, J é o momento angular que provém da Hamiltoniana.

Da mecânica estatística, a probabilidade relativa é dada por:

$$P(m) = \frac{e^{-\frac{E}{k_B T}}}{Z} = \frac{e^{\frac{\chi m}{J}}}{Z} = e^{\frac{\chi m}{J}} / \sum_{m'=-J}^J e^{\frac{\chi m'}{J}} \quad (2-18)$$

Desta forma, pode-se calcular o valor médio esperado a partir do valor quântico azimutal m .

$$\langle m \rangle = \sum_{m=-J}^J m e^{\frac{\chi m}{J}} / \sum_{m=-J}^J e^{\frac{\chi m}{J}} \quad (2-19)$$

A resolução dessas somas resulta na função de Brillouin \mathfrak{B}_J :

$$\mathfrak{B}_J(x) = \frac{2J+1}{J} \coth\left(\frac{2J+1}{J}x\right) - \frac{1}{2J} \coth\left(\frac{1}{2J}x\right) \quad (2-20)$$

Assim o valor médio de $\langle m \rangle$ será:

$$\langle m \rangle = J\mathfrak{B}_J(x) \quad (2-21)$$

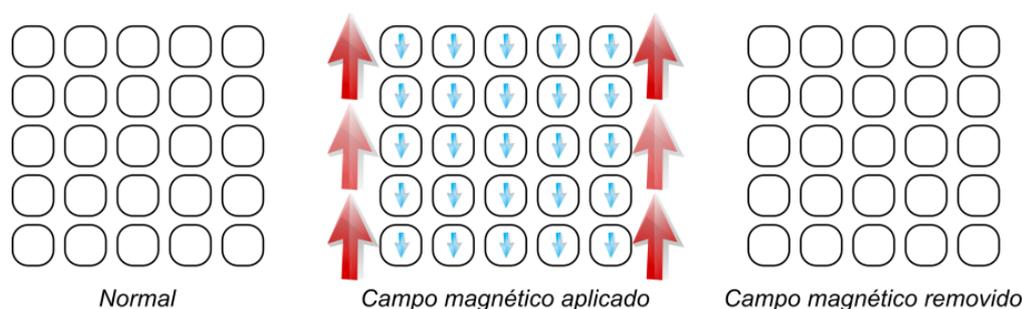
sendo n o número de momentos magnéticos por unidade de volume, a densidade de magnetização será dada por:

$$M = ng\mu_B \langle m \rangle = ng\mu_B J\mathfrak{B}_J(x) \quad (2-22)$$

Vale salientar que para valores elevados de J a função de Brillouin tende a função de Langevin. Além disso, este é o típico caso de um material superparamagnético, onde o J será grande, resultando no comportamento de macrospin do nanomaterial.

2.2.2 Diamagnetismo

Materiais diamagnéticos quando submetidos a um campo externo criam um campo magnético induzido na direção oposta ao campo magnético externo aplicado repelindo este campo externo. Alguns exemplos de materiais diamagnéticos são o bismuto, o antimônio, o cobre, o ouro e os supercondutores. Em suma, é exatamente o efeito contrário ao paramagnetismo. O comportamento diamagnético está descrito na Figura 2.



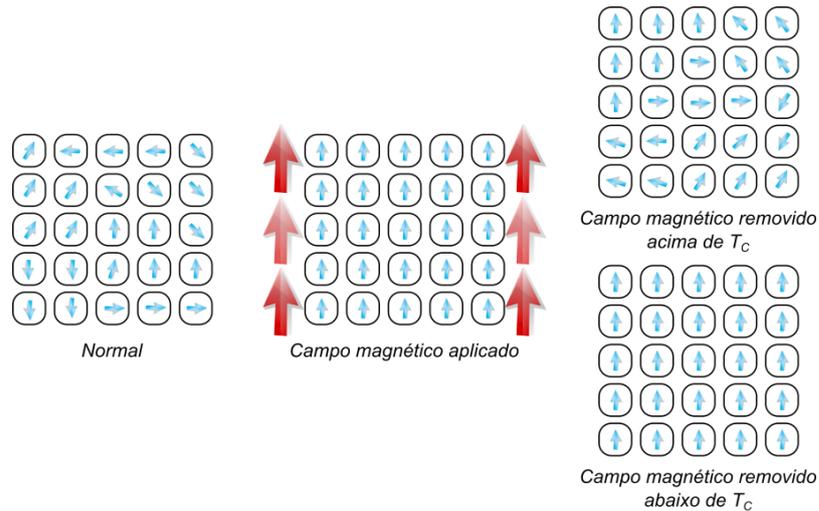
Materiais Diamagnéticos

Figura 2 – Comportamento dos materiais diamagnéticos quando expostos a um campo externo. No primeiro estágio quando não há campo aplicado não há nenhum indício de ordenamento (ausência de setas azuis) dos momentos magnéticos. Quando o campo aplicado (seta vermelha) incide no material, os momentos magnéticos (setas azuis) se orientam no sentido contrário com o campo. Por fim, quando o campo é retirado, os momentos magnéticos ficam desaparecem.

O diamagnetismo é um efeito quântico que ocorre quando a permeabilidade magnética é negativo. Na maioria dos materiais, o diamagnetismo é extremamente fraco. Entretanto, em supercondutores, esse campo externo pode chegar a ser repellido inteiramente abaixo da temperatura crítica, levando ao fenômeno de levitação magnética. Esse efeito de expulsão do campo magnético típico de um supercondutor é conhecido como Meissner Effect (MIT DEPARTMENT OF PHYSICS, 2011).

2.2.3 Ferromagnetismo

O ferromagnetismo é um dos termos mais conhecidos no magnetismo. São materiais que exibem magnetização espontânea, como os ímãs de geladeira, o próprio ferro, o cobalto, o disprósio e o níquel. Do ponto de vista físico, esses materiais apresentam a temperatura de Curie muito bem definida e, acima desta temperatura apresentam um comportamento similar aos materiais paramagnéticos. Entretanto, abaixo da temperatura de Curie, os momentos magnéticos interagem entre si e o resultado dessa interação gera um campo molecular devido ao alinhamento individual dos momentos magnéticos do material tornando-o espontaneamente magnetizado. O comportamento deste tipo de material está exemplificado na Figura 3.



Materiais Ferromagnéticos

Figura 3 – Comportamento dos materiais ferromagnéticos quando expostos a um campo externo. No primeiro estágio quando não há campo aplicado temos alguns indícios de ordenamento dos momentos magnéticos (seta azul). Quando o campo aplicado (seta vermelha) incide no material, ele se orienta fortemente no sentido favorável ao campo; entretanto quando o campo é retirado, a magnetização depende se o material está acima da temperatura de Curie (T_c) ou abaixo dela. Caso a temperatura esteja acima da temperatura de Curie o material apresentará um desordenamento similar a um paramagneto, sendo que alguns domínios magnéticos ainda estarão voltados ao sentido do campo retirado. Caso o material esteja abaixo de T_c , os momentos magnéticos são mantidos mesmo na ausência de campo externo.

Quando se trata de materiais ferromagnéticos é importante introduzir o conceito de domínio magnético. Esses domínios são pequenas regiões do material que estão espontaneamente magnetizados em uma determinada direção. Isso justifica porque muitas vezes um material ferromagnético não está magnetizado, visto que a magnetização de todos os seus domínios pode estar em direções aleatórias, de forma que a soma líquida da magnetização total seja nula, ou em domínios de fechamento, de tal forma que as linhas de magnetização circulam apenas dentro do material. Assim, para se magnetizar o material é necessário realinhar esses múltiplos domínios fazendo com que eles possam ser redirecionados através de um campo externo aplicado.

No ferromagneto, a magnetização se alinha com o campo aplicado durante a aplicação. No entanto, após a remoção deste campo o material apresentará magnetização remanescente (magnetismo que uma substância conserva após a remoção da intensidade do campo aplicado) como visto na Figura 3. O comportamento desta magnetização dependerá intimamente da temperatura de Curie. Acima desta temperatura a agitação térmica o ferromagneto provoca uma leve desorientação dos seus domínios magnéticos, conseqüentemente, ocasionando na perda de

sua magnetização. Entretanto, mesmo após a remoção do campo, haverá uma parcela dos domínios magnéticos os quais ainda estarão ordenados no sentido do campo removido. Caso o material esteja abaixo da temperatura de Curie, o ferromagneto apresentará um forte ordenamento de seus domínios magnéticos na direção do campo removido.

2.2.4 Antiferromagnetismo

No caso dos materiais antiferromagnéticos existe uma tendência de seus momentos magnéticos intrínsecos apontarem em direções opostas conforme esquematizado na Figura 4. O ordenamento dos momentos magnéticos se agrupa aos pares no sentido inverso no caso do antiferromagnetismo. Nestes materiais (como o óxido de manganês, óxido de níquel e cromo), a susceptibilidade magnética tem uma forte correlação com a temperatura. Quando a temperatura diminui a susceptibilidade aumenta até um valor máximo conhecido como temperatura crítica, ou temperatura de Néel, após esta temperatura a susceptibilidade magnética volta a ter seu valor reduzido no antiferromagneto.

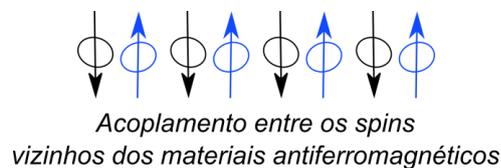


Figura 4 – Acoplamento antiparalelo dos spins com resultante do momento magnético nula de um antiferromagneto.

Acima da temperatura de Néel o comportamento do antiferromagneto é similar à de um paramagneto e obedece à equação de Curie-Weiss. De maneira simplificada, abaixo da temperatura de Néel obtém-se um material magneticamente ordenado e, acima disso, um material desordenado. Análogo ao material ferromagnético.

Estes domínios magnéticos naturalmente dependem da temperatura do sistema e isso afeta diretamente a susceptibilidade do material como pode ser visto na Figura 5. Nos tópicos a seguir serão tratados o comportamento de cada tipo de material magnético, dando ênfase aos materiais superparamagnéticos e ferrimagnéticos que serão discutidos ao longo desta tese.

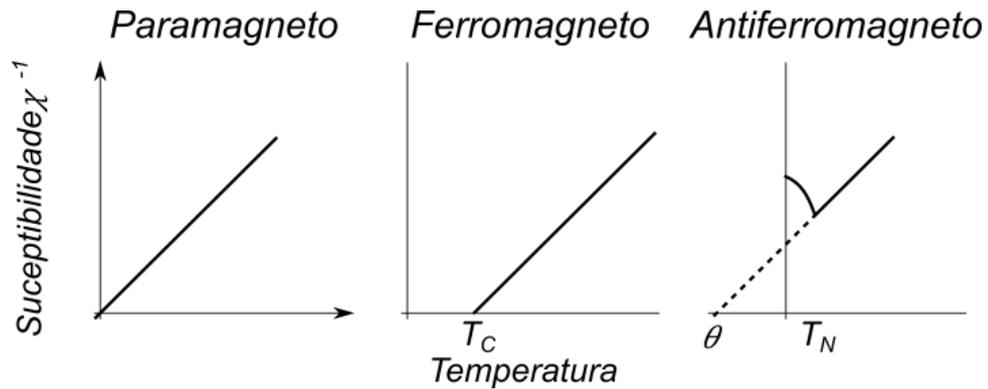


Figura 5 – Comportamento da susceptibilidade magnética contra a temperatura. No primeiro gráfico encontra-se um paramagneto com um comportamento linear típico; no segundo caso um ferromagneto cuja susceptibilidade dependerá da temperatura de Curie T_C e o último caso é o antiferromagnetismo que apresenta uma descontinuidade conhecida como temperatura de Néel.

2.2.5 Ferrimagnetismo

No ferrimagnetismo os spins provenientes dos pares de elétrons vizinhos apresentam uma tendência a se orientar em direções opostas. No entanto, a resultante dos momentos magnéticos não é nula como no antiferromagnetismo. O acoplamento entre esses spins vizinhos está esquematizado na Figura 6. Assim, um ferrimagneto apresenta características parecidas com um ferromagneto, mas com um arranjo similar ao de um antiferromagneto.

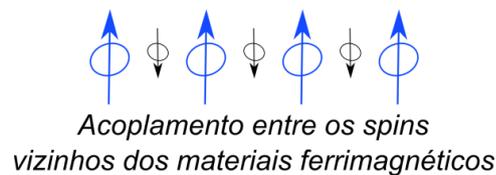
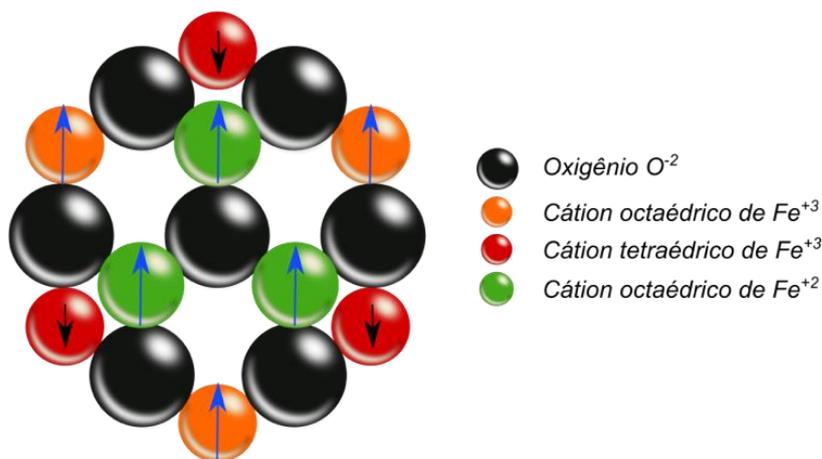


Figura 6 – Em um ferrimagneto os arranjos dos spins se dão de forma alternada com diferenças nos momentos magnéticos entre cada par associado. Esta diferença faz com que a resultante do acoplamento antiparalelo dos spins gere um momento magnético total diferente de zero em um ferrimagneto.

Esse tipo de arranjo é possível devido a estrutura da rede cristalina de determinados materiais. Este arranjo apresenta dois momentos magnéticos que competem entre si, entretanto, em uma dessas direções a magnetização será maior do que na outra. Um exemplo clássico dos materiais ferrimagnéticos são os espinélios de óxido de ferro: magnetita e maghemita.

2.3 Espinélios e Ferrimagnetos

Os espinélios são materiais classificados como minerais e cerâmicas, com a fórmula $A^{2+}B_2^{3+}O_4^{2-}$. Estes materiais apresentam estruturas cristalinas cúbicas. As ferritas magnéticas, em geral, apresentam uma estrutura do tipo $MO(Fe_2O_3)$, em que M é um íon metálico divalente, como ferro, cobalto ou manganês. As estruturas do tipo espinélio têm a base da rede cristalina composta por ânions de oxigênio O^{2-} , os quais ficam localizados bem próximos uns dos outros, formando um arranjo cúbico de face centrada. Desta forma, os cátions metálicos menores ocupam os interstícios entre os oxigênios. Esses interstícios podem se arranjar de duas formas: onde quatro ou seis íons de oxigênio que o cercam ocupam os vértices de um tetraedro ou octaedro, respectivamente. Cada célula unitária possui 56 íons, totalizando 64 sítios tetraédricos e 32 sítios octaédricos, parcialmente ocupados pelos cátions de Fe^{3+} e Fe^{2+} . As propriedades do material dependem intimamente de como esses sítios estão ocupados; essas ocupações estão bem descritas no esquema da Figura 7. Se os íons de Fe^{2+} ocuparem os sítios tetraédricos e os íons de Fe^{3+} ocuparem os sítios octaédricos, teremos um espinélio normal e um material que não é magnético. Entretanto, se os íons de Fe^{2+} ocuparem os sítios octaédricos o momento magnético resultante será diferente de zero, portanto neste caso o material apresentará características magnéticas típicas de um material ferrimagnético.



Materiais Ferrimagnéticos na estrutura de Espinélio

Figura 7 – Esquema de configuração dos momentos dos espinélios magnéticos de uma ferrita. As esferas pretas representam os ânions de Oxigênio, as esferas laranjas representam os cátions octaédricos de Fe^{3+} , as esferas vermelhas representam os cátions tetraédricos de Fe^{3+} , já as esferas laranjas representam os cátions octaédricos de Fe^{2+} .

A magnetização neste tipo de material provém da interação de troca entre o sítio octaédrico com o tetraédrico intermediada pelo Oxigênio entre estes sítios. Essa interação em particular é a mais forte, em geral quando os momentos dos sítios tetraédricos estão paralelos entre si, mas são antiparalelos aos momentos do sítio octaédricos. Este comportamento resulta em um momento magnético o qual dá origem ao ferrimagnetismo na amostra. A seguir serão apresentados as propriedades magnéticas típicas dos óxidos de ferro (COEY, 2010) que serão utilizados durante o trabalho. A magnetita apresenta uma temperatura de Curie $T_c = 853K$ e a magnetização de saturação $M_s = 480kA/m$, já maghemita apresenta um $T_c = 985K$ e $M_s = 380kA/m$. A magnetita quando em contato com o ambiente rico em oxigênio pode oxidar e mudar para a estrutura maghemita, portanto é possível que as duas estruturas coexistam em determinadas condições do ambiente.

2.4 Nanopartículas e o Superparamagnetismo

Nanopartículas (NPs) magnéticas podem ser obtidas através de diversos métodos físico-químicos como a decomposição térmica, coprecipitação, método hidrotérmico e a microemulsão. A síntese por coprecipitação é a mais usada devido a sua versatilidade e simplicidade. Entretanto, quando se busca controle do tamanho e uma baixa polidispersão, a decomposição térmica é uma das melhores opções. A microemulsão apresenta bons resultados de controle (ANWAR *et al.*, 2013; BADRUDDOZA *et al.*, 2013; SHAW, 1980; SUN *et al.*, 2005; ZHANG, YING *et al.*, 2010) sendo uma rota alternativa quando o objetivo almejado é a monodispersão do nanomaterial. O método hidrotérmico propicia a obtenção de morfologias diferenciadas devido a capacidade de controlar a direção dos crescimentos dos compostos nanoparticulados. Entretanto, a polidispersão das partículas obtidas por este método é relativamente alta.

Um domínio magnético é definido pelo equilíbrio/desequilíbrio entre as energias de troca e de anisotropia magnética (SUNGHYUN, 2011) do material de acordo com seu tamanho. Esse conceito pode ser avaliado ao observar as dimensões do material representados na Figura 8. Os domínios magnéticos, de maneira geral, ficam dispostos sob um volume, assim ao reduzir este volume o material será induzido a apresentar apenas um único domínio magnético.

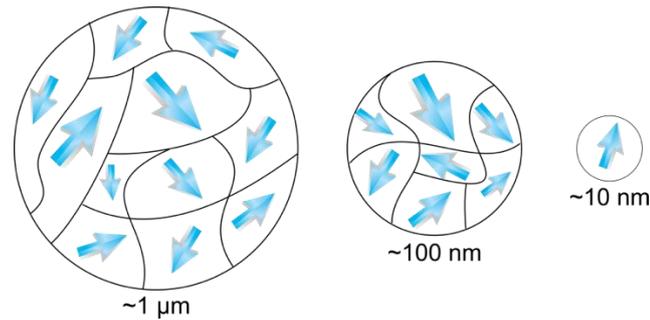


Figura 8 – Representação dos domínios magnéticos de acordo com o tamanho da partícula. A diminuição do tamanho até a escala nanométrica suficientemente pequena ocasiona o efeito de monodomínio magnético conhecido também como macrospin.

Entretanto, quando esse tamanho é reduzido à escala nanométrica suficientemente pequena, a energia para se dividir em domínios magnéticos torna-se maior que a energia necessária para permanecer em um único domínio magnético, ou monodomínio como representado na Figura 9.

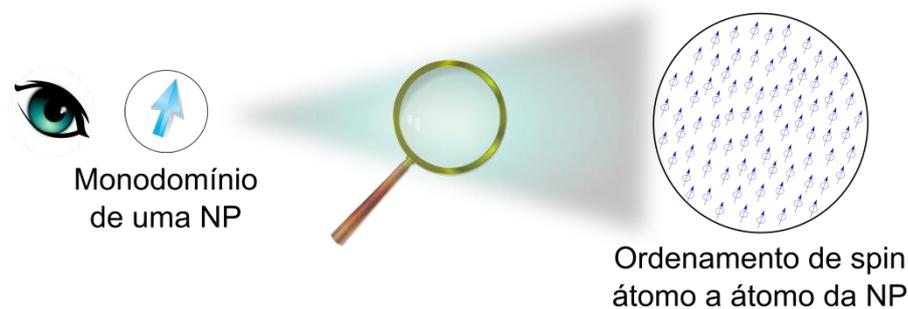


Figura 9 – Esquema simplificado do alinhamento dos spins de um monodomínio de uma NP demonstrando como ordenamento dos spins dos átomos de uma NP se comportam.

Isso ocorre tipicamente em amostras superparamagnéticas. Ao diminuir o tamanho do material até a escala nanométrica diminui-se a energia de associada a anisotropia magnética. Dependendo do volume do nanomaterial esta energia de agitação térmica poderá ser maior que a energia de anisotropia magnética. Nestas condições, tem-se que o tempo de transição de estado (tempo de relaxamento) de um monodomínio magnético é facilmente alterado com as variações de temperatura, similarmente ao comportamento de inversão um spin. Este fenômeno associado à redução de tamanho é conhecido como macrospin (BANDOPADHYAY; CHAUDHURI; JAYANAVAR, 2014); tipicamente de materiais superparamagnéticos. Assim os materiais superparamagnéticos não apresentam magnetização remanescente em determinadas temperaturas devido ao mecanismo de relaxação dos momentos magnéticos

nanomateriais. O estudo das propriedades desses nanomateriais superparamagnéticos fornecem aplicações tecnológicas, biológicas e evolução da ciência básica.

O Superparamagnetismo é, portanto, uma forma de magnetismo presente em nanopartículas ferromagnéticas e ferrimagnéticas que apresentem monodomínios, o qual trata de partículas suficientemente pequenas cuja magnetização possa mudar de direção aleatoriamente devido a influência da temperatura. Em geral, para partículas muito pequenas (abaixo de 15 nm), esse tempo de relaxação entre os “flips” é chamado de tempo de relaxação de Néel. Caso as nanopartículas sejam maiores que esse regime de tamanho elas serão governadas pelo mecanismo da relaxação de Brow. Um material superparamagnético terá um comportamento similar ao de um paramagneto e ao de um ferromagneto, entretanto a sua susceptibilidade magnética apresentada é muito maior do que em um paramagneto comum sendo comparada a materiais ferromagnéticos; com a diferença que a curva de histerese de um superparamagneto não exibirá campo coercitivo nem magnetização remanescente como um ferromagneto.

Néel propôs que nanopartículas abaixo de um diâmetro crítico apresentam momentos magnéticos de alta intensidade que estão rigidamente alinhados em seu interior. Além disso, as variações térmicas podem ser suficientemente fortes para superar a barreira de energia, isto possibilita a rotação dos momentos magnéticos de uma direção de fácil magnetização para uma outra qualquer sem grandes dificuldades. Essa mudança depende intimamente da anisotropia magnética do material cuja nanopartícula se mantém aprisionada. A anisotropia magnética é um efeito que depende da orientação preferencial da magnetização espontânea ao longo de um material com um determinado volume V . Este efeito correlaciona a variação da energia interna de acordo como a magnetização do material se comporta em determinadas direções.

A energia da anisotropia magnética pode aparecer de formas diferentes, portanto é comum associar uma densidade de anisotropia efetiva K_{eff} uniaxial, que nada mais é do que a soma dos efeitos de anisotropia magnetocristalina, da anisotropia de forma e da anisotropia de tensão. A energia de anisotropia também pode sofrer influência de um campo externo, assim, à energia anisotrópica pode ser representada por:

$$E = K_{eff}V(\sin \theta)^2 - mH \cos(\alpha - \theta) \quad (2-23)$$

onde, $m = \mu_0 M_s$ é o momento magnético (conhecido como momento magnético gigante ou macro spin), que será a soma de todos os momentos atômicos contidos na nanopartículas; e

α é o ângulo entre o eixo fácil de magnetização e o campo magnético aplicado H . Através desta equação é possível extrair as condições de equilíbrio: $\theta = 0^\circ$; $H = 0$ e $\theta = 90^\circ$ para um dado campo externo. É importante ressaltar que, sem o campo externo, o momento de cada partícula pode estar em qualquer estado de equilíbrio.

A relaxação de Arrhenius-Néel é originada da energia de agitação térmica das nanopartículas associada à barreira anisotrópica do material e pode ser escrita por:

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad (2-24)$$

onde, τ é o período médio que a magnetização da nanopartículas leva para inverter influenciada pelas flutuações térmicas; τ_0 é o período de tempo característico do material também conhecido como tempo de tentativas, o valor típico que está entre $10^{-9} - 10^{-10}$ s; KV é a barreira de energia associada à movimentação da magnetização a partir do eixo fácil para o plano difícil de magnetização e $k_B T$ é a energia térmica de agitação do material.

A temperatura de bloqueio está associada com o tempo de medida τ_m . Se $\tau_m \gg \tau$, a magnetização das nanopartículas irá inverter diversas vezes durante o tempo de medida, portanto, a média da medida da magnetização será a zero. Agora, caso $\tau_m \ll \tau$, a magnetização não terá tempo de mudar durante a medida e, portanto, apresentará uma magnetização naquele instante no qual será medida. A transição entre o estado superparamagnético e o estado de bloqueio ocorre quando $\tau_m = \tau$. Em muitos experimentos, o tempo em geral é constante, mas a temperatura será variada. Dessa forma, é possível reescrever a equação para essa temperatura de bloqueio:

$$T_{bloq} = \frac{KV}{k_B \ln(\tau_m/\tau_0)} \quad (2-25)$$

Essa temperatura é menor que a temperatura de Curie.

2.5 Curvas de magnetização e histerese M-H

A histerese é um retardo na resposta campo magnético aplicado, assim, nesse caso a relação M-H se refere ao retardo da magnetização com relação ao campo magnético aplicado. Através da curva de histerese magnética, esquematicamente representada na Figura 10, é possível extrair parâmetros magnéticos típicos conhecidos como: magnetização de saturação (M_s), magnetização remanescente (M_r) e campo coercitivo (ou coercitivo) (H_c).

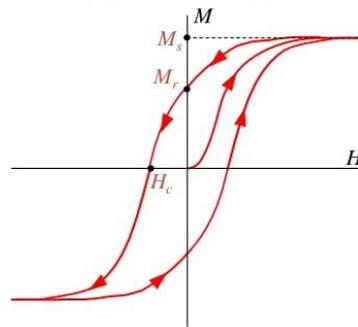


Figura 10 – Loop de histerese entre $M \times H$. Inicialmente quando o campo magnético é aplicado a magnetização acompanha o campo magnético até a magnetização de saturação M_s ; quando o campo é invertido a magnetização sofre um atraso, o valor deste atraso a campo H igual zero é conhecido como magnetização remanescente M_r .

Quando essa magnetização é zero obtém-se o valor do campo coercitivo H_c .

A teoria do magnetismo vem apresentando bons avanços, mas em alguns casos mais complexos como os vórtices magnéticos (BARALDI, 2015; JIA *et al.*, 2008; LIU, XIAO LI *et al.*, 2015) a curva apresenta uma quebra de simetria no loop de histerese e a interpretação da curva de histerese desses materiais ainda estão em estudo. A Figura 11 compara as curvas de histerese do diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo e superparamagnetismo. Esta imagem é uma adaptação do trabalho de Pankhurst (Q. A. PANKHURST *et al.*, 2003).

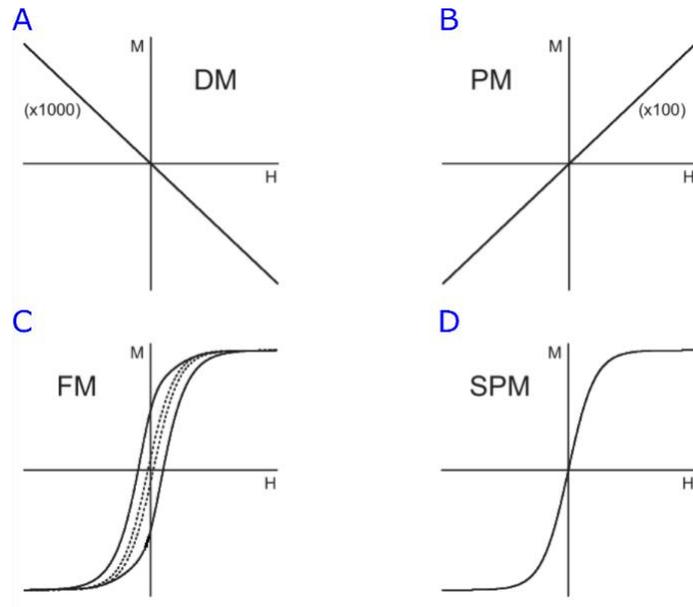


Figura 11 – Figura adaptada da referência (Q. A. PANKHURST *et al.*, 2003). Curvas de histerese de (A) um material diamagnético (DM) com escala ampliada em 1000 vezes sob um alto campo magnético aplicado apresentando uma baixa magnetização, (B) um material paramagnético (PM) com escala ampliada 100 vezes sob um alto campo aplicado e uma boa magnetização de resposta, (C) um material ferromagnético (FM) apresenta um campo coercitivo e magnetização remanescente e (D) um material superparamagnético (SPM) apresentando um comportamento similar ao ferromagneto, porém sem o loop característico da histerese.

É possível observar que o material diamagnético na imagem A da Figura 11 apresenta uma resposta de magnetização contrária ao campo aplicado e a ordem dessa magnetização em geral é bem pequena. Já o material paramagnético na imagem B apresenta uma baixa magnetização de resposta, mas, como apresentando anteriormente, seus momentos de dipolo respondem enquanto o campo é aplicado não havendo, portanto, magnetização remanescente. Por outro lado, os materiais ferromagnéticos apresentam domínios magnéticos bem definidos de tal forma que para mudar esses domínios de sentido têm-se uma maior dificuldade devido a anisotropia magnética do material. Neste caso ferromagnético, o fenômeno gera um atraso na curva magnetização em relação ao campo aplicado que pode ser observado a curva de histerese típica na imagem C da Figura 11. Por fim, o material superparamagnético na imagem D da Figura 11 não apresenta campo coercitivo nem magnetização de saturação devido ao fenômeno de macrospin. É possível um material superparamagnético apresentar histerese, desde que o tempo de medida do equipamento seja sensível o suficiente para detectar o tempo de relaxação de um superparamagneto, ou ainda, ao abaixar a temperatura é possível alterar o tempo de relaxação magnética do material, tornando assim possível a visualização do ciclo de histerese.

Convenientemente, a susceptibilidade magnética é definida por $\chi = \mathbf{M}/\mathbf{H}$ cuja unidade no SI é dada por Am^{-1} . Através da susceptibilidade magnética é possível descrever o comportamento de um material magnético. Para altos valores de susceptibilidade χ obtém-se as condições de um ferromagneto, ferrimagneto ou um antiferromagneto. Estes materiais em geral apresentaram um forte ordenamento dos momentos magnéticos, em alguns casos mesmo sem a influência de um campo externo. Para valores baixos de χ tem-se duas situações possíveis uma onde o $\chi > 0$ são conhecidos como os paramagnetos, de tal forma que os momentos magnéticos estarão alinhados na mesma direção de um campo externo aplicado; e $\chi < 0$ que representa os diamagnetos de tal forma que os momentos serão alinhados contra a direção do campo magnético aplicado.

É importante salientar que todos os materiais apresentam características diamagnéticas. Essa característica é intrínseca aos materiais e dependerá da estrutura do material para definir qual fenômeno irá prevalecer. De qualquer forma, esses diferentes tipos de magnetismo apresentam diferentes comportamentos de magnetização \vec{M} quando o campo magnético externo \vec{H} aplicado é variado.

O superparamagnetismo está relacionado com duas equações de comportamento, que dependem da temperatura em que o material se encontra. Para $T_{bloq} < T$, todos os eixos de orientação fácil estarão orientados paralelamente com o campo externo, o que resulta em:

$$M(H) = nm \tanh\left(\frac{\mu_0 H m}{k_b T}\right); \chi = \frac{n\mu_0 m^2}{k_b T} \quad (2-26)$$

Para $T_{bloq} > T$, a orientação do eixo fácil não terá mais o mesmo valor durante a variação do campo externo, apresentando, portanto, perdas por histerese e sendo este caso muito parecido com um ferromagneto:

$$M(H) = nm L\left(\frac{\mu_0 H m}{k_b T}\right) \quad (2-27)$$

Sendo L e função de Langevin obtemos a susceptibilidade:

$$\chi = \frac{n\mu_0 m^2}{3k_b T} \quad (2-28)$$

2.6 Coloides magnéticos

O primeiro relato de uso dos coloides magnéticos pode ser encontrado em uma patente da NASA (PAPELL, 1965) na década de 60, visto que no espaço eles tinham dificuldade de manipular o transporte de combustível. Neste trabalho foi utilizado magnetita moída estabilizada em surfactante, com a intenção era manipular o combustível magneticamente. Com o avançar dos anos, as sínteses foram ficando mais elaboradas e simples, permitindo a obtenção de compostos magnéticos cada vez menores que pudessem ser suspensos em meios líquidos. Com a evolução dos processos de síntese e o desenvolvimento de outros ferrofluidos (ROSENSWEIG, 2002) foi possível desenvolver coloides magnéticos metálicos do tipo *d-block* (M= Mn, Co, Zn, Cu, Ni). Assim, novos métodos de estabilização foram propostos com o avançar das décadas (LAURENT *et al.*, 2008; REISS; HÜTTEN, 2005; TARTAJ *et al.*, 2009). Dentre as estabilizações encontram-se dois métodos que se destacam: o processo estérico (mecânico) e o método através da estabilização eletrostática, cuja ideia consiste em ajustar as cargas na superfície dos nanomateriais criando uma dupla camada elétrica (em inglês *Electric Double Layered Magnetic*) isolando assim o material através de uma interface via repulsão elétrica.

Ao discutir sobre coloides é importante pensar em distribuição de tamanho do material disperso no meio coloidal, pois de acordo com a morfologia e afinidade química do material, diferentes tipos de estabilizações serão recomendados para cada caso.

2.6.1 Coloide magnético e relaxação de Brown

Ao considerar um coloide magnético é preciso pensar em um modelo onde as partículas esferoides não estejam mais isoladas como no caso de relaxação de Néel. Portanto, a seguir, será descrita a dinâmica de magnetização de um ferrofluido. Esse tipo de problema envolve alguns parâmetros complexos como a relação de anisotropia, campo aplicado, energia térmica e mecânica do fluido envolvido. Deve-se realizar algumas considerações de regime de trabalho para o desenvolvimento teórico a seguir. Primeiramente considere uma partícula com anisotropia uniaxial grande o suficiente se comparada com a energia térmica e ao campo magnético aplicado. Assim, ao aplicarmos um campo externo a partícula irá reagir e girar sobre seu eixo, entretanto isso não afetará a sua polarização das cargas. Além disso, consideraremos que a suspensão das partículas seja realizada em um líquido newtoniano de tal forma que as partículas estejam afastadas o suficiente para se desprezar a interação dipolar entre elas.

2.6.2 Relaxação de Brown

Um movimento Browniano é definido pela mecânica estatística como um movimento aleatório. Dessa forma, as partículas suspensas em fluido apresentam esse modelo de dinâmica e isso se deve a colisão entre as partículas com as moléculas que compõem o fluido. Assim, algumas partículas podem estar magneticamente alinhadas e o movimento browniano fará com que elas percam essa magnetização ao longo do tempo.

Se um campo magnético uniforme é aplicado sobre um coloide magnético, as nanopartículas irão se deslocar de forma a afetar a magnetização resultante. Assim, o único fator a afetar a rotação das partículas será o movimento browniano, isso levará a diminuição da magnetização. Neste regime, apenas a direção do momento magnético das nanopartículas será responsável pela magnetização. Esse problema é usualmente modelado usando a equação de Fick (FICK, 1855) que descreve de forma quantitativa como a matéria se difunde em um meio que não se encontra em equilíbrio.

A variação de fluxo, $\frac{\partial \Phi}{\partial t} = D \nabla^2 \Phi$, é a distribuição estatística dos momentos magnéticos onde D é a constante de difusão deste sistema. Considerando o modelo proposto de uma casca esférica, Φ será função de um ângulo sólido Ω e do tempo t . Através dessa abordagem, um modelo matemático conhecido como solução de harmônicos esféricos é descrito por:

$$\Phi(\Omega, t) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l A_{ml}(t) Y_{ml}(\Omega) \quad (2-29)$$

onde, substituindo e isolando a parte temporal da 2-29 e colocando a solução do harmônico esférico $\nabla^2 Y_{ml}(\Omega) = -l(l+1)Y_{ml}(\Omega)$, obtem-se:

$$\frac{\partial A_{ml}(t)}{\partial t} = -Dl(l+1)A_{ml}(t) \quad (2-30)$$

Integrando essa equação diferencial (2-30) chega-se à solução:

$$A_{ml}(t) = \exp(-Dl(l+1)t)a_{ml} = \exp\left(\frac{-t}{\tau_B}\right)a_{ml} \quad (2-31)$$

onde a_{ml} é uma constante a ser determinada através das condições de contorno e $\tau_B = [Dl(l+1)]^{-1}$ é definido como relaxação de Brown. A análise do primeiro harmônico para $l = 1$ dá a seguinte solução:

$$\tau_B = 1/2D \quad (2-32)$$

Por fim, é necessário considerar a relação de Stokes-Einstein para uma esfera de raio hidrodinâmico R rotacionando em um líquido com viscosidade η , onde obtém-se $D = \frac{k_b T}{8\pi\eta R^3}$, que pode ser substituído na equação (2-32), gerando a equação que segue:

$$\tau_B = \frac{4\pi\eta R^3}{k_b T} = \frac{3\eta V_h}{k_b T} \quad (2-33)$$

Onde, η é a viscosidade, R é o raio, T é a temperatura, k_b é a constante de Boltzmann e V_h é o volume hidrodinâmico. Este volume hidrodinâmico é diferente do volume da NP, que também é diferente do volume magnético do material. Essa equação descreve o tempo de relaxação; em si descreve o tempo da perda de magnetização devido ao movimento Browniano das partículas no fluido.

2.6.3 Tempo de relaxação efetivo

Como foi discutido anteriormente as NPs dispersas em um coloide magnético podem apresentar dois mecanismos de relaxação de momentos magnéticos: o mecanismo de Néel e o de Brown. Dentro do regime superparamagnético existe a competição entre os mecanismos de relaxação dependendo do tamanho do nanomaterial envolvido. Esses processos são independentes e paralelos, portanto o tempo de relaxação efetivo será dado por:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (2-34)$$

onde τ é o tempo de relaxação efetiva, τ_N é o tempo de relaxação de Néel, τ_B é o tempo de relaxação de Brown.

A análise desse sistema indica que o tempo efetivo terá a contribuição maior do termo de relaxação mais curto e isso dependerá exclusivamente do tamanho das nanopartículas utilizada. A Figura 12 é um esboço dos tempos de relaxação inspirado no trabalho de Rosensweig (ROSENSWEIG, 2002) e apresenta a correlação entre o comportamento da relaxação efetiva e cada um de seus termos.

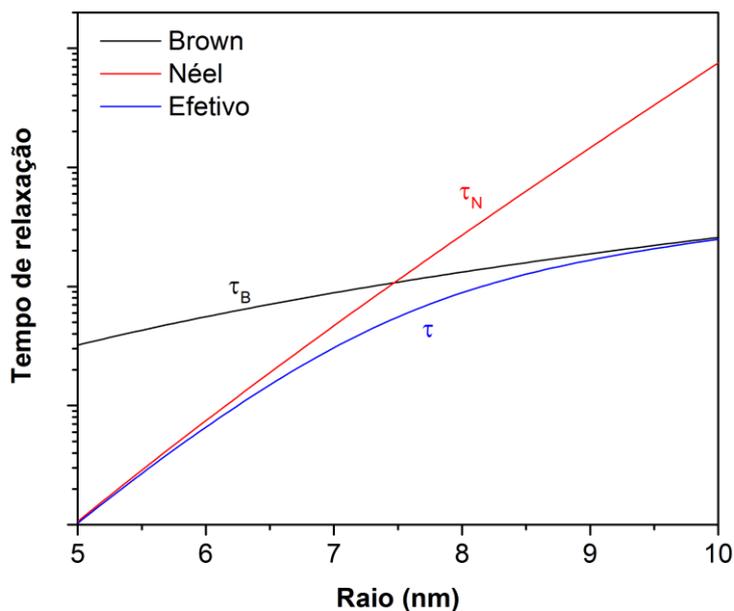


Figura 12 – Esboço do comportamento do tempo de relaxação efetivo (linha azul) comparado com a relaxação de Néel (linha vermelha) e a de Brown (linha azul) de acordo com o raio das NPs de magnetita.

Para a magnetita, abaixo do raio crítico de 7,5 nm as NPs serão governadas pelo regime de Néel, acima desse raio as NPs responderam ao mecanismo de Brown. Em torno desse diâmetro haverá uma competição entre ambos mecanismos. Portanto, o mecanismo de aquecimento dependerá da morfologia do material em estudo.

2.6.4 SAR e a magneto hipertermia das NPs

As NPs magnéticas, quando sujeitas a um campo magnético alternado externo, apresentam aquecimento devido aos mecanismos de aquecimento descritos acima. Nos casos clássicos de ferromagneto a hipertermia magnética é obtida com a liberação de energia na histerese magnética. No caso dos coloides magnéticos, a liberação de calor vem da rotação das partículas superparamagnéticas, que não apresentam perdas por histerese. Já foi visto que a curva de magnetização superparamagnética é completamente reversível, ou seja, o sistema vai e volta pelo mesmo caminho magnético, assim ao aplicar um campo alternado provoca-se uma rotação das NPs, isto, conseqüentemente, gera aquecimento do meio. Este calor produzido pelas NPs é conhecido como “*Specific Absorption Rate - SAR*” (GUARDIA *et al.*, 2012; LAURENT *et al.*, 2008; LIU, XIAO LI *et al.*, 2015; THOMAS *et al.*, 2009; WUST *et al.*, 2002), que é a potência gerada pelas NPs devido ao aquecimento normalizado pela massa. Podemos, portanto, definir o SAR através de:

$$SAR = \frac{W_{hip}}{m} = \frac{1}{m} \left(\frac{dQ}{dt} \right) = c \frac{m_{col}}{m} \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad (2-35)$$

onde, c é o calor específico do sistema coloidal [J/gK], a massa do coloide é descrita por m_{col} , m é a massa nas NPs e dT/dt é a taxa de variação de temperatura pelo tempo. O SAR descreverá o comportamento de aquecimento das NPs e seu valor dependerá do meio ao qual as NPs estão suspensas. Uma alta taxa de aquecimento reduz a quantidade de NPs que devem ser administradas no tecido biológico, entretanto, uma alta taxa de SAR ocasiona um incremento muito rápido de temperatura tornando difícil seu controle. Isso dificulta o uso da hipertermia magnética para fins medicinais. Portanto, deve-se encontrar um equilíbrio entre a produção de calor localizada e o controle da variação deste calor produzido.

2.7 Estabilidade coloidal e recobrimentos

Um coloide é uma mistura onde uma, ou mais substâncias apresentam pelo menos uma de suas dimensões dentro da escala de 1 nm até 1 μ m. Nestes sistemas, as partículas estão dispersas e/ou suspensas em uma outra substância, constituindo assim fases coloidais (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997). Os coloides em geral apresentam aspecto de soluções; especialmente quando são bem-estáveis, os coloides apresentam fases que muitas vezes são difíceis de separar. Em geral, os coloides são identificados e caracterizados pelas suas propriedades físico-químicas. Existem coloides com partículas dispersas em gás, líquido e sólido. No entanto, a restrição da discussão será voltada especificamente para nanopartículas de óxido de ferro magnéticas suspensas em meios líquidos. Ao observar um coloide magnético estável em uma escala macroscópica torna-se difícil separar as suas fases, entretanto em escalas nanométricas ele pode apresentar um caráter bifásico entre as superfícies (MARKINK, 2012; SHAW, 1980) de interação entre a partícula e o meio líquido. Baseado na natureza da interação entre a fase dispersante e o meio de dispersão os coloides podem ser classificados (NEL *et al.*, 2009) como hidrofóbico (repulsão por água) ou hidrofílico (atração por água). O que então permite ou não um coloide ser estável? Os parâmetros que estão intimamente ligados a isso são: a morfologia das nanopartículas, o estado químico superficial das nanopartículas e das interações entre a interface partícula-solvente e partícula-partícula.

A vantagem de um nanomaterial provém da sua grande razão entre a área superficial e o seu respectivo volume. Estas dimensões reduzidas do nanomaterial aumentam a interação entre o meio de estudo de acordo com sua área superficial. Por exemplo, uma esfera perfeitamente metálica de raio igual a 1 m apresenta uma área descrita por $4\pi m^2$, entretanto

caso seu volume seja preenchido com 1000 esferas metálicas menores, que ao todo somem o volume total da esfera maior, seria possível obter uma área superficial cerca de 10 vezes maior com a composição das esferas menores. Com uma área superficial maior a dispersão e interação desses materiais no meio dispersante é muito mais intensa e, por essa razão, as superfícies das nanopartículas são alvo de estudos de funcionalização e/ou recobrimento. Portanto, a busca do entendimento da interface entre nanopartícula-solvente é fundamental para o comportamento coloidal. Nessa interface, pode-se observar reações do tipo ácido-base ou mesmo reações eletroestéricas (íons, moléculas). Essas características também impactam diretamente na estabilidade de uma solução coloidal, pois isso irá ditar como as moléculas vão se repelir através de cargas, ou se separar através de meios mecânicos dentro do coloide. Um ponto bem importante é que a energia de agitação das NPs em um coloide deve ser de tal maneira que a energia de agitação supere a energia gravitacional ($V \cdot \Delta\rho \cdot g \cdot h$) para que não ocorra a sedimentação. $\Delta\rho$ é a diferença entre a massa específica do material magnético e o solvente no qual ela está dispersa, h é a altura e V é o volume da NP a uma aceleração gravitacional g .

Imaginando um sistema com nanopartículas esféricas de volume $V = \pi d^3/6$ pode-se calcular o diâmetro máximo que essas NPs deveriam ter para não sedimentar $d_{max} < \left(\frac{6k_B T}{\pi \Delta\rho h g}\right)^{1/3}$. Esta condição aplicada a um fluido magnético levará a um diâmetro em torno de 15 nm. Entretanto, outras condições além da energia de agitação e do potencial gravitacional devem ser observadas. As NPs estarão relativamente próximas entre si de tal forma a apresentar a interação inter-partícula, portanto essas NPs estarão submetidas às forças de Van der Waals, sendo sempre atrativas entre duas partículas de mesma natureza, ou seja, as NPs podem acabar agregando-se umas às outras aumentando a massa específica do material magnético. A energia de interação inter-partícula com o mesmo diâmetro d e de centro r pode ser dado por:

$$E_{van\ der\ Waals} = -\frac{A}{6} \left(\frac{2}{\gamma^2 - 4} + \frac{2}{\gamma^2} + \ln \frac{\gamma^2 - 4}{\gamma^2} \right) \quad (2-36)$$

$$A = \frac{3}{4} k_B T \left(\frac{\varepsilon_p - \varepsilon_s}{\varepsilon_p + \varepsilon_s} \right)^2 + \frac{3h\nu_c(n_p^2 - n_s^2)}{16\sqrt{2}(n_p^2 - n_s^2)^{2/3}} \quad (2-37)$$

onde $\gamma = 2r/d$ e A é a constante Hamaker (cujo método ignora a influência intermédia entre duas partículas de interação), ε_p é a constante dielétrica da partícula, ε_s é constante dielétrica do solvente, h é constante de Planck, ν_c é a frequência característica de absorção,

n_p e n_s são os índices de refração da partícula e do solvente. A constante de Hamaker é da ordem de $10^{-19}J$ para ferritas do tipo espinélio como a magnetita e a maghemita.

Entretanto ainda há mais um fenômeno importante a ser levado em consideração, fluidos magnéticos apresentam interações dipolares magnéticas, visto que cada partícula de volume V vai carregar um momento magnético $\mu = mV$, em que m é a magnetização de saturação da nanopartícula. Essas interações estão acopladas com a distância das nanopartículas e da orientação de cada momento magnético. Imaginando duas partículas esféricas separadas por uma distância r , o potencial de interação dipolar magnético pode ser dado por:

$$E_{dip.mag} = \mu_0 \left(\frac{\vec{m}_i \cdot \vec{m}_j}{r^3} - \frac{3}{r^5} (\vec{m}_i \cdot \hat{r})(\vec{m}_j \cdot \hat{r}) \right) \quad (2-38)$$

onde μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo, $m = \pi/6 (M_s d^3)$ é o momento dipolar magnético da nanopartículas esférica, M_s é a magnetização de saturação. Pensando em uma estimativa, podemos aproximar a magnitude entre os dois momentos igual ao magnéton de Bohr ($\mu_1 \approx \mu_2 \approx \mu_B$) de tal forma que eles estejam separados por uma distância de aproximadamente $r \approx 0,1 \text{ nm}$. Assumindo esses valores encontra-se um valor aproximado da energia dipolar magnética $U_{dip.mag} \sim 10^{-23}J$, essa energia equivale a aproximadamente à uma pequena variação da temperatura na energia de térmica ($k_B T$). A interação dipolar é muito fraca na maioria dos casos, entretanto, quando nanopartículas magnéticas são avaliadas, obtêm-se $\mu_1 \approx \mu_2 \sim 10^4 \mu_B$. Desta forma, a interação dipolar resulta num considerável ordenamento dos momentos magnéticos das NPs.

Todas essas atrações precisam ser vencidas por algum mecanismo de repulsão para que se obtenha um coloide estável. O mecanismo eletrostático apresentado se desenvolve através da introdução de cargas e isso resulta num aumento da densidade superficial de carga distribuída ao redor da área superficial das NPs. Assim essas NPs irão se repelir devido a força coulombiana entre as cargas. Já o mecanismo estérico dar-se-á adicionando algum aditivo mecânico entre as partículas de tal forma a criar uma barreira mecânica. Essas partículas que carregam a carga são chamadas de macro-íons cujas forças dependem da distribuição das cargas em torno das NPs, ou seja, dependerá da morfologia do material. Através da equação de Poisson-Boltzmann simplificada encontramos a seguinte energia eletrostática:

$$E_{elétro} = 4\epsilon_{liq} d^2 \left(\frac{k_B T}{q} \zeta \right)^2 \frac{\exp 2\kappa(r-d)}{r} \quad (2-39)$$

$$\zeta = \tanh\left(\frac{q\psi_s}{4k_B T}\right) \quad (2-40)$$

onde, κ^{-1} é o comprimento de Debye que está associado ao número de íons com determinada carga por unidade de volume, q é a carga do contra íon da dupla camada elétrica, r é a distância de centro a centro entre as partículas, o fator ε_{liq} representa a permissividade dielétrica do solvente e ψ_s é o potencial Stern ou potencial Zeta.

Olhando para esses fatores verifica-se que as repulsões estão mais ligadas com as características das nanopartículas especialmente às propriedades físico-químicas da amostra (íons, cargas, barreiras mecânicas e pH). Desta forma, o controle destas propriedades garante uma estabilização capaz de contrabalancear a força de atração e a gravitacional das NPs.

Já para os casos das barreiras físicas (mecânicas) conhecidas como estéricas, a seguinte relação energética e descrita:

$$E_{est} = k_B T \begin{cases} \frac{\pi d^2 \xi}{2} \left[2 - \frac{l+2}{t} \ln\left(\frac{1+t}{1+\frac{l}{2}}\right) - \frac{l}{t} \right]; & \text{se } x \leq 2\delta \\ 0; & \text{se } x \geq 2\delta \end{cases} \quad (2-41)$$

onde δ é a espessura da camada de cobertura, ξ é o *grafting* (enxerto), $l = \frac{2x}{d}$ e $t = \frac{2\delta}{d}$.

Para um coloide estável busca-se uma barreira de potencial (E_{total}) suficientemente alta de tal forma que isso não seja vencido pela ordem de alguns $k_B T$ da energia térmica de agitação, caso contrário essas flutuações vencerão a barreira e levará o coloide a sedimentação. Este fenômeno de sedimentação caracteriza-se pela desestabilidade coloidal onde a força gravitacional das NPs supera as forças repulsivas. Neste ponto, é possível observar que a morfologia impacta na estabilização, visto que materiais pequenos apresentam uma massa menor e uma área superficial maior, permitindo assim uma maior distribuição de cargas superficiais. A consequência deste efeito gera uma barreira potencial mais elevada garantindo assim uma blindagem mais eficaz ao material, entretanto um volume mínimo deve ser respeitado, caso contrário não haverá superfície suficiente para as cargas se acoplarem ao material.

2.7.1 Recobrimento via Surfactantes

A palavra surfactante é a contração do termo em inglês “*surface active agent*”, que traduzido ao pé da letra significa agente de atividade superficial. Assim, um surfactante é um composto capaz de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um fluido. O termo interface delimita duas fases imiscíveis. Um exemplo clássico de surfactante é o detergente que age como um agente de limpeza. Um ponto fundamental de um surfactante é sua tendência em formar micelas especialmente em baixas concentrações de água. A micela é um agregado de moléculas de surfactante dispersa em um coloide. A concentração mínima na qual obtém-se a formação de micelas é chamada de concentração micelar crítica. Essa propriedade dos surfactantes permite uma gama de aplicações envolvendo detergentes, emulsificantes, espumantes, lubrificantes, solubilização e dispersão de fase. Entretanto, de maneira geral os surfactantes não apresentam uma boa biocompatibilidade no interior das células sendo relativamente tóxicos (ALKILANY *et al.*, 2009; GRATZER; HARRISON; WOODS, 2006; ITO *et al.*, 2009; ZHANG, YINAN *et al.*, 2012) e isto pode causar danos ou mesmo alterar as estruturas celulares devido as características típicas do detergente de interagir com as superfícies.

Com relação à estrutura os surfactantes podem ser representados como na Figura 13. Eles são em geral compostos orgânicos anfifílicos e apresentam em sua estrutura grupos hidrofóbicos (caudas) e os grupos hidrofílicos (cabeças) em sua cadeia, ou seja, esse tipo de composto contém tanto o componente insolúvel em água como o componente solúvel em água. Essa característica permite uma interface entre misturas que antes eram insolúveis entre si tal como água e óleo tornando o meio difuso.

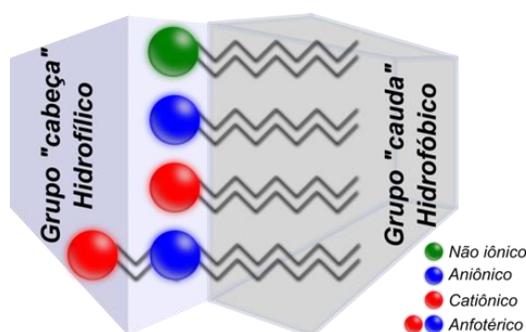


Figura 13 – Esquema da cadeia de surfactantes exemplificando a organização do grupo cabeça hidrofílico e o grupo cauda hidrofóbico.

Os dois agentes surfactantes utilizados no trabalho aqui desenvolvido foram o brometo de cetrimônio (CTAB) e o dodecil sulfato de sódio (SDS). O CTAB ($C_{19}H_{42}BrN$) é um surfactante quaternário de amônia conhecido por ser um agente antisséptico. O cátion de cetrimônio é um poderoso agente antisséptico contra bactérias e fungos. Devido a sua capacidade de interação com as interfaces é largamente usado como agente estabilizante de NPs tais como as de ouro, sílica e óxido de ferro. Além disso, o CTAB é usado em xampus e outros cosméticos, entretanto devido ao seu alto custo são usados apenas em produtos selecionados. O SDS ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) é um surfactante orgânico sintético. Esse surfactante aniônico é usado em produtos de limpeza e higiene em geral. Contendo um sal de sódio e um sulfato orgânico em sua composição. Como resultado da sua cauda de hidrocarboneto e o seu "grupo de cabeça" aniônico, ele tem propriedades anfífilas que permitem formar micelas e, assim, agir como um detergente.

2.7.2 Recobrimento via Polímeros

Os polímeros são utilizados desde a antiguidade pelos chineses que extraíam verniz de uma árvore conhecida por *Rhus Verniciflua* (YUN-YANG *et al.*, 2006). A aplicação desse verniz nos móveis impermeabilizava os objetos aumentando a vida útil do mesmo. Entretanto apenas no advento da industrialização da década de 1920 é que descobertas e pesquisas a respeito dos polímeros obtiveram sucesso. Isso se deve as descobertas relacionadas aos mecanismos de polimerização de moléculas orgânicas. Um polímero é uma macromolécula composta por muitas subunidades (monômeros) repetidas podendo ser tanto um material sintético como um material natural. Essa característica de macromolécula produz propriedades físicas singulares, incluindo dureza, viscoelasticidade e uma tendência para formar estruturas semicristalinas em vez de cristais. Sua ampla gama de aplicações e propriedades faz com que os polímeros estejam presentes no nosso cotidiano através de polímeros naturais e os sintéticos. Os polímeros naturais são materiais encontrados na natureza e que não sofreram ação industrial. Exemplos típicos de polímeros naturais temos o âmbar, lã, seda e a borracha natural. Os sintéticos são polímeros obtidos através de reações de sintetização, assim os polímeros sintéticos são industrializados através das mais diversas matérias primas encontradas na natureza seja ela renovável ou não renovável, como por exemplo, a resina de fenol-formaldeído (baquelite), neoprene, nylon, cloreto de polivinilo (PVC ou vinilo), poliestireno, polietileno glicol (PEG), quitosana (CH), entre outros.

Como as propriedades dos polímeros podem se diversificar de acordo com a sua estrutura vamos nos ater apenas as propriedades do PEG e da CH que são os polímeros utilizados no trabalho.

O PEG ($C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$) é um composto com muitas aplicações voltadas para a indústria e para a medicina. A fórmula química de monômero pode ser vista na Figura 14, além disso o PEG também é conhecido como óxido de polietileno (PEO) ou polioxietileno (POE) dependendo do seu peso molecular médio. Por exemplo, um PEG com um peso molecular médio de aproximadamente 400 daltons é conhecido como PEG 400. Essas informações podem ser conferidas através da espectroscopia de massa. A PEGilação (KURTZ-CHALOT *et al.*, 2014; LAURENT *et al.*, 2008; LEE, NOHYUN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013; LIU, GANG *et al.*, 2013; NEL *et al.*, 2009) é o ato de acoplar o PEG a alguma outra estrutura (proteína ou fosfolípido, como o DSPE por exemplo). O PEG é solúvel em água, metanol, etanol, acetonitrila, benzeno e diclorometano, entretanto é insolúvel em hexano e éter dietílico. Ele também pode ser acoplado a moléculas hidrofóbicas para produzir surfactantes não iônicos. PEGs contém impurezas que podem ser tóxicas em altas concentrações a algumas células, como por exemplo, o composto de óxido de etileno e o 1,4-dioxano etileno glicol não são indicados para aplicações biológicas, visto que seus éteres são nefrotóxicos (tóxico para o rim).

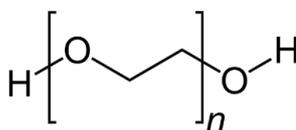


Figura 14 – Cadeia química do monômero de PEG.

Com tudo, se usado na dose correta, o PEG pode e é frequentemente usado em aplicações biomédicas. No entanto, alguns cuidados como a degradação do PEG e a sua concentração devem ser avaliados nos testes pré-clínicos de citotoxicidade para assegurar que o material não contenha agentes que ataquem as células em estudo. De modo geral já encontramos o PEG sendo utilizado junto com laxantes e colírios. A grande chave de se utilizar o PEG (HUNG *et al.*, 2001) é porque ele permite uma depuração retardada da proteína carregada a partir do sangue devido a sua capacidade de adsorção. Isso contribui diretamente para um efeito medicinal prolongado e reduz a toxicidade possibilitando um maior intervalo entre as doses que serão administradas, visto que o medicamento terá seu efeito prolongado se administrado com o PEG.

Já a quitosana (CH) é um polissacarídeo catiônico linear composto por uma distribuição aleatória cuja cadeia está representada na Figura 15. Pode ser produzido por desacetilação da quitina. Sua obtenção provém de um tratamento do exoesqueleto de camarão e conchas de crustáceos através do hidróxido de sódio alcalino em altas temperaturas. A quitosana é geralmente utilizada em produtos biomédicos e comerciais. A aplicação se estende à agricultura para combater fungos, enquanto que em vinhos, o polímero também pode ser utilizado como um agente de refinamento. Na medicina a quitosana pode ser utilizada em bandagens para reduzir as hemorragias, além de ser um agente antibacteriano e antifúngico. Por fim, pode ser ligado a nanoestruturas para fazer entrega de droga endereçada.

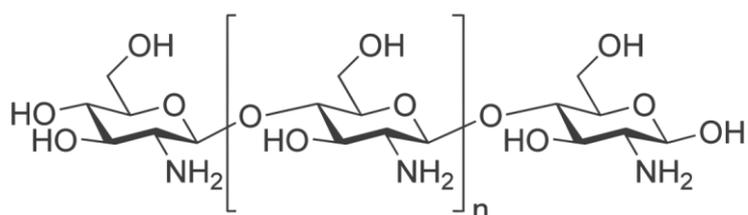


Figura 15 – Cadeia química do monômero da quitosana.

O pKa é uma grandeza que permite saber a força de um ácido. Se o pKa de um ácido é baixo, ele terá uma forte tendência a ionizar-se e, conseqüentemente, o ácido será classificado como forte. O grupo amino da quitosana apresenta um valor de pKa de ~6,5, o que leva a uma protonação em ácido a neutro com a densidade de carga dependendo do pH. Isso torna a quitosana solúvel em água e um composto capaz de se ligar em superfícies negativamente carregadas, tais como membranas mucosas. A quitosana aumenta o transporte de drogas polares através das superfícies epiteliais, sendo um material biocompatível (HUNG *et al.*, 2001) e biodegradável. Entretanto ele ainda não é aprovado pelo FDA para a o endereçamento de drogas, embora já venha sendo usado em aplicações biomédicas.

2.7.3 Recobrimento via Fosfolipídios

Os fosfolipídios são uma classe dos lipídeos que apresentam características anfífilas, sendo que a maior classe é constituída de membranas celulares. O primeiro fosfolipídio em tecidos biológicos foi identificado em 1847 e ficou conhecido como a lecitina ou fosfatidilcolina. Esse fosfolipídio foi encontrado na gema do ovo de galinha pelo químico e farmacêutico francês Theodore Nicolas Gobley. Atualmente os fosfolipídios são purificados e

produzidos comercialmente e apresentam uma vasta aplicação (YUN-YANG *et al.*, 2006) em nanotecnologia e ciência dos materiais.

Os fosfolipídios podem formar bicamadas lipídicas (Figura 16) devido a sua característica anfifílica, isto é, são moléculas que apresentam a característica de possuírem uma região hidrofílica, e uma região hidrofóbica. Muito parecidos com os surfactantes, os fosfolipídios apresentam geralmente duas “caudas” hidrofóbicas de ácidos graxos e uma “cabeça” de fosfato hidrofílica. Essas duas cadeias estão unidas entre si por uma molécula de glicerol. Os fosfolipídios purificados são produzidos comercialmente.

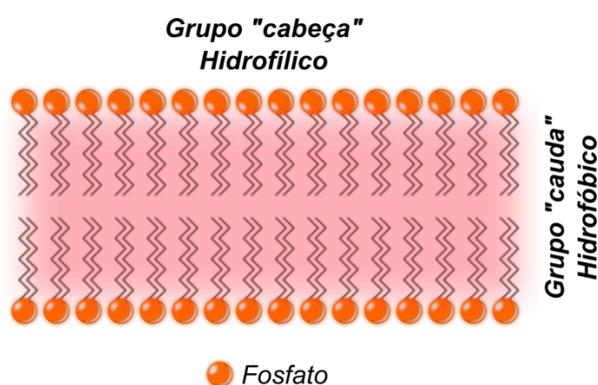


Figura 16 – Dupla camada típica de um fosfolipídio descrito pelo grupo cabeça hidrofílico e pelo grupo cauda hidrofóbico.

O uso dos fosfolipídios está intimamente ligado com a preparação de lipossomas, ethosomas e nanoformulações de drogas, especialmente por causa da sua estrutura ser similar as estruturas celulares. Viabilizando assim, uma maior biodisponibilidade de aplicações com toxicidade reduzida, seguida de um aumento da internalização de medicamentos como o cetoconazol para o tratamento de infecções de origem fúngicas.

DPPC (CHEN *et al.*, 2006) é um fosfolipídio do tipo fosfatidilcolina (PC) e é uma classe de fosfolipídio que incorpora a colina (vitamina) como grupo “cabeça”. É o componente principal de membranas e pode ser obtido através de fontes como a gema do ovo, ou da soja dos quais podem ser extraídos quimicamente utilizando hexano. A estrutura deste fosfolipídio tem a colina como grupo “cabeça” e um ácido fosfoglicérico. A fosfatidilcolina é um lipídio neutro, entretanto carrega uma carga dipolar. Além disso, ela é uma substância vital encontrada em cada célula do corpo humano, isso viabiliza a sua biocompatibilidade (HUNG *et al.*, 2001). Além disso, já foi demonstrado que a suplementação com PC retarda processos relacionados ao envelhecimento, sendo um forte indicativo para melhoria da memória cerebral. Já o DSPE é do tipo fosfatidiletanolamina (PE) que é encontrado em membranas e em tecidos nervosos. Sendo

muito parecido com o caso da PC, a PE contém um grupo cabeça “polar” e tem uma membrana viscosa. PEG-DSPE (WANG *et al.*, 2012) é portanto um fosfolípido PEGado. Ele pode ser aplicado com um lipossoma que consegue prolongar a sua permanência na corrente sanguínea devido a sua viscosidade e supressão da droga pelo sistema do retículo endotelial aumentando o tempo de meia vida de uma possível droga no plasma. Esses, por fim, apresentam uma ótima característica como agentes estabilizadores para nanopartículas em sistemas coloidais.

3 Revisão bibliográfica e o estado da arte

Neste capítulo será discutido o estado da arte dos nanomateriais magnéticos destacando as origens e aplicações biomédicas do mesmo. Também serão discutidos alguns casos clínicos de diagnósticos e as suas possíveis terapias envolvendo a hipertermia magnética relacionando-a com os tratamentos convencionais como a quimioterapia e a radioterapia.

3.1 Nanopartículas magnéticas e a atualidade

Atualmente encontram-se aplicações de nanopartículas magnéticas em diferentes áreas como medicina (BASKAR *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2010) e tecnologia (DA DALT *et al.*, 2011; PAPELL, 1965). A aplicabilidade destes nanomateriais deve-se às suas propriedades físicas e químicas que estão associadas à composição, à cristalinidade, ao tamanho, à forma, à efeitos superficiais e à interação inter-partícula do material. Essas características permitem o desenvolvimento de dispositivos baseados em funcionalizações químicas (KURTZ-CHALOT *et al.*, 2014; WU; HE; JIANG, 2008; ZHANG, J *et al.*, 2008), desenvolvimento de ferrofluidos (ANWAR *et al.*, 2013; ROSENSWEIG, 2002) e de sistemas core-shell (BADRUDDOZA *et al.*, 2013; GONZALES; KRISHNAN, 2005; MALIK *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2005). Tais sistemas podem funcionar como marcadores em análises por imagem através da ressonância magnética nuclear (LEE, NOHYUN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013; ZHANG, YING *et al.*, 2010) (RNM ou MRI) bem como dispositivos em armazenamento de dados (REISS; HÜTTEN, 2005). As aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas se classificam de duas formas: as *in vivo* que consistem na administração dentro do organismo e as externas ao organismo *in vitro*. Esta última consiste em análises e diagnóstico que envolve separação e seleção celular, enquanto que *in vivo* envolve aplicações como a terapia no interior do organismo como, por exemplo, a hipertermia e imageamento de RNM em seres vivos. O trabalho de Shetab (SHETAB BOUSHEHRI; LAMPRECHT, 2015) discute que antes das administrações *in vivo*,

os nanomateriais devem ser submetidos a um conjunto de procedimento de avaliações *in vitro* para assegurar a estabilidade, segurança, conformidade e capacidade para cumprir a missão desejada. Em seu trabalho é discutido principalmente os problemas atuais relacionados às técnicas de avaliação *in vitro* utilizadas para a caracterização de nanotransportadores, tais como a avaliação do tamanho da partícula, a carga superficial, a liberação do fármaco e a toxicidade (KASHEVSKY *et al.*, 2008). Esses detalhes procedimentais *in vitro* são importantes para a previsão de cenários *in vivo*, para assim determinar considerações necessárias para melhorar a correlação entre os dois cenários.

Uma das maiores barreiras que são encontradas na aplicação dos nanomateriais em meio celular está associada com a biocompatibilidade, que em geral está interligada à concentração das NPs, tamanho, forma, composição, estabilidade e tempo de interação entre o nanomaterial e a célula (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007). Assim a biocompatibilidade está intimamente correlacionada com comportamento do nanomaterial em meio celular.

O grande potencial de um nanomaterial está associado à alta razão entre área/volume. Ao alterar a área superficial de uma NP modifica-se a afinidade do nanomaterial, conseqüentemente o seu comportamento com o meio celular e, de maneira geral, tamanhos menores apresentam uma maior facilidade para ser absorvido e eliminado pelas células devido a seletividade da membrana plasmática. Entretanto, devido ao tamanho reduzido de NPs no organismo pode acabar se eliminando o material antes mesmo do tratamento desejado ocorrer; ou ainda o nanomaterial pode acabar aglomerando em regiões indevidas como vasos sanguíneos, especialmente quando o tratamento envolve administração intravenosa de NPs. As literaturas (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012; Q. A. PANKHURST *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2012) têm discutido esses eventuais problemas. Se os nanomateriais acabarem se aglomerando durante a administração intravenosa poderão induzir o entupimento dos vasos sanguíneos e conseqüentemente isso ocasionará eventuais problemas circulatórios. Uma maneira encontrada para superar esses imprevistos são recobrir as nanopartículas através de uma camada protetora; seja ela um surfactante, polímero ou fosfolipídio. Além disso as nanopartículas funcionalizadas podem estar ligadas a antígenos (NAQVI *et al.*, 2010; NEL *et al.*, 2009; Q. A. PANKHURST *et al.*, 2003; WUST *et al.*, 2002), os quais permitem o rastreamento e endereçamento do nanomaterial dentro do interior do organismo vivo. Entretanto essa alta taxa de absorção de nanomaterial pode induzir também efeitos indesejados relacionados à citotoxicidade (KNEIPP, 2008; SINGH *et al.*, 2010) que dependerá da morfologia do material envolvido, da concentração e da interatividade do material com o meio celular envolvido.

3.2 SPIONs e bioaplicações

As propriedades relacionadas ao tamanho e dimensões de macromoléculas biológicas trouxeram vastas aplicações aos nanomateriais superparamagnéticos conhecidos como SPIONs (do inglês *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*). Isso trouxe consigo avanços no desenvolvimento de novos diagnósticos e terapias específicas. Como diagnóstico os SPIONs podem atuar como agente contrastante na RNM (LEE, NOHYUN *et al.*, 2011; ZHANG, YING *et al.*, 2010) que é uma técnica que obtém imagens de tecidos moles e, em geral, essa técnica é realizada com um agente fosfolipídico através de um magnetossomo que pode ser observado na forma de imagens mediante a aplicação de um campo magnético externo. Através do RMN é possível determinar as propriedades de uma substância devido à correlação entre o campo aplicado e a energia absorvida. Esta energia está associada à relaxação das cargas presentes na molécula de água sob a ação de um forte campo magnético estático. Este diagnóstico ocorre após a remoção de um campo oscilatório na faixa de MHz, permitindo assim descrever a evolução das magnetizações em direções distintas conhecido como relaxação magnética. O tempo de relaxação está intimamente relacionado com o tipo do tecido e o agente contrastante tem o papel de alterar o campo da vizinhança do tecido oferecendo assim um melhor detalhamento da imagem. Em geral, o principal agente de contraste é um complexo de íons de gadolínio que apresentam características paramagnéticas (TARTAJ *et al.*, 2009). A desvantagem principal desse complexo é que ele é rapidamente extraído pelo fígado deixando um curto período de tempo para se realizar a imagem. Isso levou a uma busca de agentes de contraste a base de SPIONs sendo o tamanho um fator decisivo na absorção de diferentes tecidos, de tal forma a fornecer mecanismos de diferenciação. Assim é comum encontrar na literatura o termo USPIONs (JORDAN *et al.*, 1999) que apresentam tamanhos inferiores a 50 nm. Outro ponto importante é que as NPs magnéticas podem ser utilizadas com recobrimentos protetores como fosfolipídios; este tipo de técnica aumenta a afinidade do nanomaterial com o meio celular. Isto permite aumentar a gama de materiais a serem utilizados em RNM.

Na área de terapias, uma das funções dos SPIONs é a capacidade de atuar como carregadores de fármacos. O trabalho Yang (YANG *et al.*, 2006) discute especificamente o potencial que as NPs de magnetita apresentam como carregadores de drogas. A vantagem desse processo é que esses nanomateriais respondem ao campo magnético externo aplicado. Assim, o nanomaterial magnético pode ser direcionado magneticamente para o local designado e ativado via aquecimento magnético. Isso viabiliza a quimioterapia/radioterapia apenas da região do tecido tumoral minimizando os eventuais efeitos colaterais e maximizando os danos

produzidos às células tumorais. Em especial, essa propriedade de se aquecer o nanomaterial via campo magnético externo alternado viabiliza a segunda opção de tratamento conhecido como hipertermia magnética (GUARDIA *et al.*, 2012; Q. A. PANKHURST *et al.*, 2003; ROSENSWEIG, 2002; SOENEN; DE CUYPER, 2010; TARTAJ *et al.*, 2009), a qual será detalhada melhor a seguir. É importante lembrar que existem outras ferritas além da magnetita e maghemita, como por exemplo, ferritas a base de cobalto (KASHEVSKY *et al.*, 2008; YUAN *et al.*, 2010) que também apresentam um grande potencial para o tratamento de câncer via hipertermia magnética.

A ideia do tratamento via hipertermia consiste em aquecer o tecido tumoral e provocar o dano através desse incremento de temperatura. Esse tratamento é complementar aos tratamentos convencionais com quimioterapia e radioterapia, mas não é excludente. O estudo (DEWEY, 1994) direcionado à hipertermia celular *in vitro* iniciou-se por volta da década de 1970, que justificou a utilização da hipertermia induzindo células à morte com temperaturas em torno de 41-43 °C. Entretanto, a resposta térmica variava com a dose, tipo de célula envolvida, microambiente e pH (REINHOLD; VAN DEN BERG-BLOK, 1983). Outro fator relevante é que após o stress via aquecimento, a célula passa a apresentar uma termoresistência no intervalo entre 24-48h, ou seja, as células apresentam uma tolerância ao tratamento durante um intervalo que deve ser respeitado entre as seções de tratamento pré-estabelecidos para cada caso. A sinergia de interação entre a dose de calor e radiação já foi testada em estudos pré-clínicos (BULL, 1984; DAHL, 1988). Assim, a combinação da radioterapia com a hipertermia é uma excelente rota de aplicação simultânea, entretanto não é sempre factível em meios clínicos e cada caso deve ser devidamente estudado individualmente.

Assim como os agentes radioterápicos, outros tipos de interações de drogas quimioterápicas com o calor já foram descobertos (URANO, 1999), tal como agentes supra aditivos compostos a base de platina, a doxorrubicina, além de outros compostos independentes como o fluorouracil. O efeito sinérgico dos tratamentos convencionais como a quimioterapia e a radioterapia com a temperatura é um fator importante de caráter auxiliar na aplicação de alguns medicamentos e em muitos casos torna-se vital para o tratamento almejado.

Ao provocar o incremento de temperatura deve-se ater que mais de um alvo será afetado pela hipertermia como a membrana celular, o citoesqueleto, mecanismos de sínteses de macromoléculas, e reparadores de DNA (DIKOMEY; FRANZKE, 1992; ROTI ROTI *et al.*, 1998). Para avaliação do efeito hipertérmico é importante compreender como os fenômenos celulares estão relacionados com a dependência da temperatura e como isso afeta as funções biomoleculares de controle como a apoptose, o ciclo celular e o ciclo de reparação de DNA

(SAKAGUCHI *et al.*, 1995). Estudos relacionados à temperatura mínima para se provocar danos através da hipertermia já foram realizados (VAN DER ZEE *et al.*, 2000), de tal forma que não é necessário atingir o mínimo de 43°C para infligir dano celular. Assim, é possível obter resultados de alterações fisiológicas mesmo em baixas variações de temperaturas. Alguns casos clínicos de hipertermia com pequenas variações de temperatura *in vivo* induziu o aumento da perfusão na região do tumor, isto levou a uma maior concentração de oxigênio no meio (pO₂) (RAU *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 2009). Uma alta perfusão pode aumentar a taxa de entrega de fármacos e a reoxigenação aumentando a eficácia de uma possível radioterapia. De maneira geral, com o incremento da temperatura via hipertermia, os tecidos celulares aumentam o fluxo sanguíneo durante o tratamento e após algumas horas de hipertermia, mas em alguns poucos casos houve uma queda na vascularização do tecido tumoral (VAUPEL; KALLINOWSKI; OKUNIEFF, 1989).

Atualmente é possível encontrar trabalhos que mostram a relação do aquecimento com reações imunológicas de leucócitos humanos (SHEN *et al.*, 1994). Ao estimular sistema imunológico, via hipertermia magnética, os mecanismos de defesa contra doenças tendem a se tornar mais efetivo. Portanto, o estudo da correlação entre dependência dos mecanismos fisiológicos com a variação da temperatura em nível celular abre, um leque de oportunidades de bioaplicações das NPs magnéticas.

Nos dias atuais, existem diferentes testes clínicos que utilizam diversas modalidades de hipertermia, os resultados destes trabalhos estão dispostos na Tabela 1. Nestes ensaios clínicos são discutidas comparações entre radioterapia sozinha e a radioterapia com hipertermia. Em outros casos observa-se as comparações com radioterapia intersticial com e sem hipertermia, bem como casos envolvendo perfusão através de intervenção cirúrgica com auxílio da hipertermia, além de casos de quimioterapia com e sem hipertermia.

Tabela 1 – Tabela adaptada(WUST *et al.*, 2002) de estudos clínicos em hipertermia para diferentes tipos de câncer em diferentes estágios

Ref.	Sítio tumoral	Controle	Experimental	Número de pacientes	Primeiro ciclo de estudo	Hipertermia é indicada (p<0,05)	Benefício de sobrevivência
Hipertermia local							
(DATTA <i>et al.</i> , 1990)	Cabeça e pescoço (primário)	Radioterapia	Radioterapia e Hipertermia local	65	Resposta em 8 semanas	Sim	Não
(DATTA <i>et al.</i> , 2009)	Melanoma (metastático e recorrente)	Radioterapia	Radioterapia e Hipertermia local	68 (128 lesões)	Resposta completa em 3 meses	Sim	Não
(PEREZ, CARLOS A <i>et al.</i> , 1991)	Superficial (cabeça e pescoço, peito, diversos)	Radioterapia	Radioterapia e Hipertermia local	245	Resposta inicial	Possivelmente	Não
(VALDAGNI; AMICHETTI, 1994)	Cabeça e pescoço (N3 primário)	Radioterapia	Radioterapia e Hipertermia local 2-6 vezes	44	Resposta em 3 meses	Sim	Sim
(VERNON <i>et al.</i> , 1996)	Peito (primário avançado e recorrente)	Radioterapia	Radioterapia e Hipertermia local	307 (317 lesões)	Resposta inicial	Sim	Não
(EMAMI, B <i>et al.</i> , 1992)	Superficial (cabeça e pescoço, peito, sarcoma)	Radioterapia e 1x hipertermia local	Radioterapia e 2x Hipertermia local	173 (240 lesões)	Boa resposta	Não	Não
(ENGIN <i>et al.</i> , 1993)	Superficial (cabeça e pescoço, peito, sarcoma)	Radioterapia e 1x hipertermia local	Radioterapia e 2x Hipertermia local	41 (44 lesões)	Resposta inicial	Não	Não
(KAPP <i>et al.</i> , 1990)	Superficial (cabeça e pescoço, peito, sarcoma)	Radioterapia e 2x hipertermia local	Radioterapia e 6x Hipertermia local	70 (179 lesões)	Resposta inicial	Não	Não
Hipertermia intersticial e endocavitária							
(EMAMI, BAHMAN <i>et al.</i> , 1996)	Superficial (cabeça e pescoço, peito, melanoma e outros)	Radioterapia Intersticial	Radioterapia intersticial e hipertermia intersticial	184	Boa resposta	Não	Não
(SNEED <i>et al.</i> , 1998)	Glioblastoma	Radioterapia e radioterapia intersticial	Radioterapia, radioterapia intersticial e hipertermia intersticial	79	2 anos de sobrevivência	Sim	Sim
(BERDOV; MENTESHASHVILI, 1990)	Reto (T4, localmente avançado)	Radioterapia	Radioterapia e hipertermia endocavitária	115	Resposta inicial	Sim	Sim
(KITAMURA <i>et al.</i> , 1995)	Esôfago (estágio I-IV neoadjuvante)	Radioterapia e quimioterapia	Radioterapia, quimioterapia e hipertermia endocavitária	66	Resposta histológica completa	Sim	Sim
(SUGIMACH <i>et al.</i> , 1994)	Esôfago (estágio I-IV neoadjuvante)	Quimioterapia	Quimioterapia e hipertermia endocavitária	40	Resposta inicial	Sim	Não
Perfusão hipertérmica							
(HAMAZOE; MAETA; KAIBARA, 1994)	Estômago (≥ T3, localmente avançado)	Cirurgia	Cirurgia e perfusão hipertérmica Intraoperatória	82	5 anos de sobrevivência	Sim	Sim
(GHUSSEN <i>et al.</i> , 1984)	Melanoma (Estágio I-III)	Cirurgia	Cirurgia e perfusão hipertérmica isolada do membro	107	Sobreviveu livre de doenças	Sim	Sim
(KOOBS <i>et al.</i> , 1998)	Melanoma (Estágio I-III)	Cirurgia	Cirurgia e perfusão hipertérmica isolada do membro	832	Sobreviveu livre de doenças	Não	Não

Estes estudos indicam uma influência positiva quando aplicadas altas doses de variações térmicas melhorando em muitos casos a expectativa de sobrevivência. Esses trabalhos discutem como a abordagem da hipertermia é eficaz e suas respectivas verificações em casos clínicos. Portanto, determinar os parâmetros hipertérmicos em estudos *in vitro* é de extrema importância para posteriores aplicações *in vivo*.

Atualmente o review de Salunkhe (GUIBERT *et al.*, 2015) trata dos recentes avanços no desenvolvimento de potenciais nanopartículas magnéticas para hipertermia de fluidos magnéticos. O trabalho abrange a relação entre diversos tipos de sínteses para obtenção de diferentes morfologias dos nanomateriais. O trabalho discute as propriedades físicas dependentes da dimensão das nanopartículas e as suas respectivas aplicações. No artigo encontra-se uma breve discussão sobre diferentes mecanismos de aquecimento de nanopartículas magnéticas. Este artigo de revisão abrange o progresso recente da aplicação de várias nanopartículas magnéticas, incluindo NPs com sistema *core-shell* para ensaios *in vitro*, *in vivo* e pré-clínicos. Outro estudo importante está relacionado às aglomerações das NPs, neste aspecto pode-se encontrar o trabalho de Guibert (GUIBERT *et al.*, 2015), onde ele trata dos mecanismos de agregação das NPs magnéticas utilizadas em hipertermia. Para resolver esses problemas associados à aglomeração e biocompatibilidade atualmente utiliza-se diversos tipos de recobrimentos diferenciados nas NPs.

3.3 Recobrimentos e Funcionalização dos SPIONs

A funcionalização e o recobrimento têm como principal objetivo alterar a afinidade química dos SPIONs e melhorar a sua biocompatibilidade, isso pode ser visto em vários trabalhos (KURTZ-CHALOT *et al.*, 2014; LAURENT *et al.*, 2008; LEE, JAE-HYUN *et al.*, 2011; WU; HE; JIANG, 2008; ZHANG, J *et al.*, 2008). Enquanto uns trabalhos buscam sistemas de recobrimento, pode-se encontrar também sistemas de *core-shell* de sílica (BADRUDDOZA *et al.*, 2013; LEE, JAE-HYUN *et al.*, 2011; MALIK *et al.*, 2012; NOH *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2005) usando NPs de óxido de ferro como núcleo. A vantagem de se realizar uma funcionalização consiste no ganho de aplicação de fármacos, os quais podem ser ligados aos SPIONs, em virtude desses materiais serem magnéticos isso permite uma administração via intravenosa seguido de um endereçamento ao tecido alvo (HUANG; HAINFELD, 2013).

A busca pela estabilidade dos SPIONs como coloide é extremamente importante para as aplicações bioquímicas. A escolha do recobrimento em geral depende dos seus propósitos,

na literatura encontram-se trabalhos com surfactantes como SDS (MORSY, 2014) e o CTAB (ALKILANY *et al.*, 2009; ZHANG, YINAN *et al.*, 2012), trabalhos com polímeros como PVP (ZHANG, YING *et al.*, 2010), PEG (MARKINK, 2012; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012; ZHANG, J *et al.*, 2008) e CH (SHI *et al.*, 2012; UNSOY *et al.*, 2012) assim como fosfolipídios DPPC (ROSS SMITH; TANFORD, 1972) e DSPE (XIE; SUN, 2011). O endereçamento de drogas (*drug delivery*) em sistemas magnéticos de SPIONs ganha força pelas propriedades de condução do material através de um campo magnético externo. Isso permite que a liberação da droga seja feita de maneira controlada e localizada diminuindo assim efeitos colaterais de possíveis quimioterapias e radioterapias. Se comparado aos tratamentos tradicionais de quimioterapia e radioterapia este tipo de abordagem leva uma grande vantagem, pois minimiza os efeitos colaterais (JORDAN *et al.*, 1999). As funcionalizações (BADRUDDOZA *et al.*, 2013; KURTZ-CHALOT *et al.*, 2014; LEE, NOHYUN *et al.*, 2011; LIONG *et al.*, 2008; NEL *et al.*, 2009) mais conhecidas estão associadas aos anticorpos, lecitinas, proteínas e fosfolipídios, as quais também corroboram com as aplicações utilizando nanomateriais magnéticos.

3.4 O potencial da hipertermia em células

Trabalhos recentes correlacionam o SAR com tamanho das NP. O trabalho do De Wei Wong (WONG *et al.*, 2017) relata um método de apoptose de células de câncer através de um sistema magnético altamente eficiente usando um sistema biaxial magnético pulsado, o que maximiza o torque magnético induzido. Seu efeito foi demonstrado em experimentos de destruição de células *in vitro* com uma redução na viabilidade celular. As nanopartículas magnéticas com grandes também foram encontradas, essas NPs formam um triplo vórtice de magnetização remanente, o que aumenta a sua suscetibilidade ao campo. Isso se traduz em uma força magneto-mecânica maior a baixos campos com 12% maior eficácia na morte celular em comparação com nanopartículas menores.

Outro trabalho que expressa o potencial das NPs magnéticas com o potencial magneto hipertérmico é o Sandre (SANDRE *et al.*, 2017), o qual tem como objetivo demonstrar que as dispersões coloidais de nanopartículas de óxido de ferro magnético estabilizadas com macromoléculas de dextrano colocadas em um campo magnético alternado não só podem produzir calor, mas também que essas partículas podem ser usadas *in vivo* para deposição local e não invasiva de uma dose térmica suficiente para desencadear uma expressão gênica termo induzida.

3.5 NPs e aparatos comerciais

Devido a popularidade das NPs magnéticas, já é possível comprar diversos tipos de NPs magnéticas em diversas formas e condições. Empresas como a Chemicell™ desempenham um papel importante no ramo da biociência desenvolvendo produtos voltados a bioaplicações como: NPs magnéticas, kits para magnetofecção, kits para separação biomagnética, NPs magnéticas fluorescentes, NPs em sistemas core-shell de sílica, dentre outros materiais. Outra empresa também especializada no ramo da nanotecnologia de nanomateriais magnéticos é a mkNANO™ que oferece um serviço específico relacionado a diferentes tipos de recobrimentos de acordo com o tamanho das NPs desejadas. Em sua loja virtual é possível encontrar à venda NPs em solventes não polares, NPs em forma de pó e NPs dispersas em água com os mais diversos tipos recobrimentos como polímeros, fosfolipídios e surfactantes. Entretanto, o foco da empresa mkNANO™ não é somente em NPs magnéticas de óxido de ferro, sendo possível encontrar outros produtos também relacionados à nanotecnologia. A grande procura por NPs magnéticas criou um mercado de empresas no ramo da nanotecnologia, dentre as quais encontra-se também a Sigma-Aldrich™, muito conhecida por ter à disposição diversos tipos de reagentes químicos. A loja virtual da a Sigma-Aldrich™ dispõe de mais de 50 tipos de produtos relacionados a NPs de óxido de ferro.

Apesar da grande praticidade e versatilidade que essas e outras empresas do ramo tecnológico oferecem, o grande problema está relacionado ao preço desses nanomateriais prontos, que em média custam mais de mil reais o frasco contendo 25 g de pó. Em alguns casos de NPs recobertas, ou funcionalizadas, o produto pode chegar a custar até três mil reais uma solução contendo 10 mL do produto.

Assim como é possível encontrar reagentes relacionados a NPs magnéticas, é possível também encontrar empresas que disponibilizam kits prontos para aplicação da hipertermia magnética. Empresas especializadas no ramo como a MSI Automation™ e a NanoScience Laboratories™ desenvolvem instrumentos específicos para o aquecimento de NPs magnéticas aplicadas em campo magnético alternado. A nanoTherics™ apresenta produtos nanoestruturados voltados a aplicações magneto hipertérmicas, estudos calorimétricos e entrega de droga endereçada para aplicações *in vivo* e *in vitro*. Sendo assim, é possível encontrar muitas de empresas que desenvolvem esse tipo de instrumentação, entretanto o grande problema desses dispositivos são os seus respectivos preços que alguns casos chegam a ultrapassar 500 mil dólares.

Portanto, esse trabalho de tese destina-se a estudar aspectos fundamentais da magneto hipertermia *in vitro* em células embrionárias de rim humano HEK293T utilizando NPs magnéticas de óxido de ferro com diferentes recobrimentos. Propondo desta forma resolver os problemas associados à magneto hipertermia *in vitro*, visando o desenvolvimento da aplicação do tratamento hipertérmico em casos clínicos através sínteses e equipamentos mais baratos e acessíveis no mercado.

4 *Materiais e Métodos*

4.1 **Materiais**

Acetilacetato de ferro III ($[\text{Fe}(\text{acac})_3]$) 99,9%, ácido oleico (AO), oleilamina (OAm), etanol, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), quitosana (CH), polietileno glicol (PEG), tripsina, Sal Dihidratado Dissódico (EDTA), Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Meio de cultura DMEM e o Opti-men foram obtidos da ThermoFisher. Clorofórmio, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato dissódico (Na_2HPO_4), fosfato monopotássico (KH_2PO_4) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da MERCK. Hidróxido de amônio foi obtido da Cetus Ltda. e fosfolipídio (DPPC) e fosfolipídio peguilado (PEG-DSPE) foram obtidos da Lipid Ingredients & Technologies. Os testes de viabilidade celular foram realizados utilizando o composto tetrazólio de etossulfato de fenazina (MTS) (PROMEGA, 2010) obtido da Promega e água destilada duplamente filtrada com sistema de purificação ultravioleta nas sínteses. No caso do cultivo celular, a água utilizada é triplamente destilada e esterilizada através da filtração seguida da esterilização via vapor saturado seco por autoclavagem.

4.2 **Síntese das nanopartículas de Fe_3O_4**

O processo adotado para a produção de nanopartículas esféricas de 14 nm foi via decomposição térmica. O processo ocorre em atmosfera de nitrogênio controlada, sob agitação constante e com uma taxa de aquecimento controlada $5^\circ\text{C}/\text{min}$. A síntese transcorre em poucos passos: primeiramente 1,4 g de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ foi dissolvido em 8 mL de ácido oleico e 12 mL de oleilamina. Em seguida, a solução foi misturada e agitada em um frasco de três vias sob um fluxo de nitrogênio a 120°C por 2 h. Depois disso a amostra foi aquecida até 220°C onde se manteve em agitação por 30 min. A amostra foi então aquecida até 300°C e mantida sob agitação por mais 30 min. Após todos esses patamares a amostra foi resfriada até 40°C . Etanol foi adicionado para a remoção do material do frasco e assim o coloide foi transferido para um outro frasco onde foram feitas 8 lavagens com etanol para remover o excesso de óleo da solução, seguidas de agitação, sonicação e utilizando um ímã para fazer separação magnética em cada lavagem. Por fim, os SPIONS foram mantidos na solução de etanol para posterior recobrimento.

4.3 Recobrimento das NPs

Para cada recobrimento foram preparados frascos contendo 6mL de SPIONs. A qual a concentração será determinada pelo termogravimetria. Esta solução foi lavada oito vezes em água destilada através de separação magnética, afim de remover o excesso de etanol.

Recobrimento com CTAB: uma solução de 40 mg de CTAB em 6 mL de água destilada + 100 μ L de clorofórmio foi preparada e adicionada aos SPIONS previamente lavados em água. Em seguida a amostra NP@CTAB foi misturada e sonicada até que a amostra se homogeneizasse. No próximo passo a amostra foi aquecida até 70° C em banho-maria por 25 min para a evaporação do clorofórmio da amostra. Por fim a amostra foi guardada em um frasco para os testes e caracterizações.

Recobrimento com SDS: uma solução de 40 mg de SDS em 6 mL de água destilada foi preparada e adicionada aos SPIONS previamente lavados. Em seguida, a amostra NP@SDS foi misturada e sonicada até que a amostra se homogeneizasse. Por fim a amostra foi guardada em um frasco para os testes e caracterizações.

Recobrimento com PEG: uma solução de 2,8 mL PEG em 3,2 mL de água destilada e 100 μ L de NH_4OH foi preparada e adicionada aos SPIONs previamente lavados. A amostra NP@PEG foi misturada e sonicada até que a amostra se tornasse homogênea. A amostra foi deixada em capela durante a noite para a evaporação do excesso de amônia. Por fim, a amostra foi guardada em um frasco para os testes e caracterizações.

Recobrimento com CH: uma solução de 40 mg de CH em 6 mL de água destilada foi misturada com ácido acético a uma concentração de 0,1 M foi preparada e adicionada aos SPIONs previamente lavados em água. Em seguida a amostra NP@CH foi misturada e sonicada até que a amostra se tornasse homogênea. Por fim a amostra foi guardada em um frasco para os testes e caracterizações.

Recobrimento com DPPC: uma solução de 40 mg de DPPC em 6 mL de água destilada foi preparada e adicionada aos SPIONs previamente lavados em água. Em seguida a amostra NP@DPPC foi misturada e sonicada até que a amostra se tornasse homogênea. O processo o recobrimento não estabilizou a amostra neste caso, ou seja, as nanopartículas sedimentaram rapidamente após o processo descrito inviabilizando, portanto, futuras aplicações biológicas deste material. Em virtude a estes eventos foram realizados alguns testes com esta amostra apenas para verificar algumas propriedades físicas da mesma. Entretanto, essa amostra não foi largamente utilizada nem testadas devido à instabilidade da mesma.

Recobrimento com PEG-DSPE: uma solução de 40 mg de PEG-DSPE em 6 mL de água destilada foi preparada e adicionada aos SPIONs previamente lavados em água. Em seguida a amostra NP@DSPE foi misturada e sonicada até que a amostra se tornasse homogênea. Por fim, a amostra foi guardada em um frasco para os testes e caracterizações.

4.3.1 Processo de secagem das amostras

No processo de secagem as amostras foram submetidas ao forno tubular a vácuo. Para a rampa de aquecimento do forno utilizou-se uma taxa de 5 °C/min de incremento até o patamar de 80 °C de temperatura, onde manteve-se a amostra durante 2h30, em seguida a amostra foi resfriada lentamente até a temperatura ambiente. A amostra foi então armazenada em frascos de vidro com membranas de silicone nas tampas para purgar o frasco com o gás nitrogênio removendo assim grande parte do oxigênio que poderia oxidar as amostras.

A amostra de NP@PEG apresentou problemas durante a secagem, por se tratar de um polímero que normalmente se encontra no estado líquido à temperatura ambiente. A razão disso está associada ao ponto de evaporação do PEG que se inicia aproximadamente aos 300 °C. Portanto, tornou-se inviável a secagem completa desta amostra a 80 °C. O resultado da tentativa da secagem desta amostra apresentou uma textura gelatinosa e isso fez com que as NPs ficassem dispersas no polímero. Este fato, interferiu diretamente na leitura da magnetometria da amostra.

4.4 Cultura de células

Preparação do meio DMEM: Foi medido aproximadamente 90% do volume preparado em água tridestilada e auto clavada; foi adicionado lentamente o pó sob agitador constante. Após a dissolução do pó, adicionou-se por litro de solução 3,7g de bicarbonato de sódio 5,6%. Neste meio foi adicionado uma receita de alta glucose sob as seguintes condições: 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), 100 unidades/ml penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Ao final deve-se checar e ajustar o pH, caso seja necessário a alteração deve-se utilizar as soluções HCl ou NaOH. Por fim, esterilizou-se o meio via filtração em membranas de 0,22 micra utilizando pressão positiva. Esse meio tem validade de 12 meses.

Preparação do PBS: para um litro de solução de PBS foi preparado 8g de NaCl; 0,2g de KCl; 1,44g Na₂HPO₄ e 0,24g de KH₂PO₄, esses compostos devem ser misturados em água tridestilada previamente aquecida a 40 °C para facilitar a solubilização dos compostos. Por fim, verificou-se o pH que estava por volta de 7,4; o próximo passo foi engarrafar e alíquotar as

soluções; estas soluções foram esterilizadas através do processo de filtração seguida de autoclavagem. O período de validade da solução é de 12 meses.

Preparação da tripsina mais EDTA: foi separado 100 mL de PBS previamente preparado, 1,25g de tripsina e 0,098g de EDTA, esses compostos foram misturados sob agitação constante, após o término filtrou-se a solução com uma membrana de 0,22 micra.

5 *Aparatos e procedimentos experimentais*

A seguir estão descritos os princípios básicos de funcionamento dos aparatos experimentais que foram utilizados durante o desenvolvimento do trabalho e o procedimento experimental adotado para preparação das amostras para cada respectivo ensaio.

5.1 **Instrumentação utilizada na caracterização**

Este capítulo descreve detalhes sobre a instrumentação utilizada durante o trabalho. Serão discutidos alguns conceitos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos e microscopia eletrônica usada na caracterização morfológica e estrutural das partículas. Quanto à análise química, foram utilizadas técnicas de espectroscopia UV-VIS, difração de raios X e potencial Zeta que permitiram a compreensão do coloide magnético. No quesito aplicação das partículas, foram empregadas técnicas de magnetometria e quantificação da resposta de hipertermia bem como testes biológicos de citotoxicidade, hipertermia *in vitro* e microscopia óptica confocal.

5.1.1 **Espalhamento de raios-X a baixos ângulos**

Espalhamento de raios-X a baixos ângulos, conhecido por SAXS (do inglês *small angle X-ray scattering*), é uma técnica onde se realiza o estudo do espalhamento elástico de raio-X (comprimento de onda da ordem de 0,1 nm) a baixos ângulos (geralmente entre 0,1° até 10°) (BOLDON; LALIBERTE; LIU, 2015). Através da técnica verifica-se as heterogeneidades da densidade eletrônica de uma amostra com dimensões características na ordem de nanômetros. SAXS tem uma resolução mais modesta se comparada à difração de raios-X e não permite, portanto, avaliar a estrutura atômica do material. No entanto, nessa escala angular consegue-se extrair informações importantíssimas sobre a geometria da amostra como forma, tamanho, distribuições e aglomerações. As amostras podem ser sólidas ou líquidas, ou ainda conter domínios sólidos, líquidos e/ou gasosos do mesmo material. As amostras líquidas podem ser medidas em capilares. Coloides que contenham mais de uma fase podem ser simplesmente medidos através de sua suspensão no feixe de raio-X. Portanto, dentre as amostras que podem ser medidas estão as suspensões de macromoléculas tais como proteínas e algumas cadeias biomoleculares, nanomateriais, polímeros, coloides e estruturas sol-gel. Basicamente a amostra necessita apresentar falta de homogeneidade em sua densidade eletrônica para que possa ser medida.

Conceitualmente, SAXS é um experimento razoavelmente simples, como esquematicamente apresentado na Figura 17, onde a amostra é irradiada com raios-X e os padrões de radiação espalhada são registrados por um detector de raios-X.

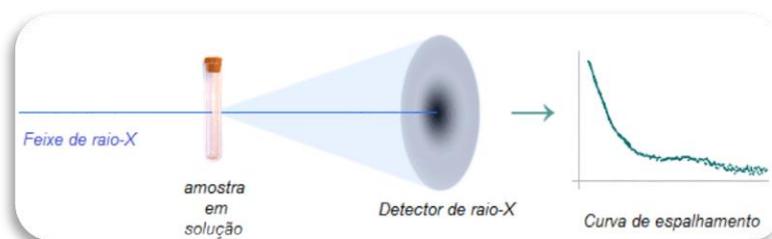


Figura 17 – Esquema adaptado de uma experimento de SAXS (“<http://biosaxs.com/technique.html> - acessado em 16/09/2013”, [S.d.]) desde a produção do feixe, seguido pela a interação com a amostra e o registro do padrão de espalhamento pelos detectores de raio-X.

As medidas de SAXS são realizadas muito próximas do feixe primário (pequenos ângulos espalhados), portanto, é altamente recomendável que se tenha uma intensidade de feixe de fótons de raios-X elevada.

O espalhamento a baixo ângulo está relacionado com existência de inomogeneidades no material, de tal forma que a densidade eletrônica seja mensurada. Assim, os raios-x interagem com a amostra especialmente com os elétrons do material, fazendo-os oscilarem. Por efeito de espalhamento, a radiação de cada elétron é emitida e as ondas secundárias espalhadas interferem umas com as outras. Considerando ângulos pequenos as diferenças de fases serão ínfimas, isso faz com que a intensidade esteja próxima do máximo em $2\theta = 0^\circ$, assim a interferência entre as ondas será de maneira construtiva.

A intensidade do espalhamento do SAXS está associada ao valor do ângulo espalhado e do vetor de espalhamento q , esse parâmetro tem por finalidade investigar o comportamento da densidade eletrônica do material $\rho(r)$, após a captação da informação realiza-se uma análise via transformada de Fourier. Para a análise dos resultados deve-se aplicar um modelo de distribuição de densidade eletrônica que depende intimamente da geometria do material.

Procedimento experimental para medir SAXS de um coloide: a amostra a ser medida foi preparada em uma concentração que permita que os raios-X não sejam completamente absorvidos pela amostra, caso contrário não haverá intensidade suficiente para a leitura da medida. Deste modo, titulou-se a amostra até obter-se uma concentração ótima para a leitura, paralelamente foi preparado uma amostra “branco ou fundo” que constitui a solução base em que o coloide está disperso. Para a amostra em questão foi preparada uma solução de água

destilada. Assim a amostra é inserida no porta amostra específico para medidas em suspensão através de uma seringa. Com o porta amostra preparado inseriu-se o conjunto no feixe da linha de luz síncrotron para espalhamento a baixos ângulos, desta forma a amostra é exposta à radiação síncrotron e esta radiação espalhada é medida pelo detector. Após o término, é possível recuperar parte da amostra através de uma seringa, entretanto de modo geral, devido ao contato com o porta amostra optou-se pelo descarte da amostra.

5.1.2 Espectroscopia Ultravioleta-Visível

A espectroscopia ultravioleta visível (UV-VIS) foi realizada com o equipamento Agilent Technologies Ultraviolet-visible Spectrometer 8453 que pode ser visto na Figura 18. A espectroscopia UV-VIS (OWEN, 1996) tem como princípio a medição da absorção da radiação como função do comprimento de onda devido à interação da luz com a amostra. Nesta faixa de energia as moléculas sofrem transições eletrônicas que dependem intimamente da composição e da morfologia de cada material.

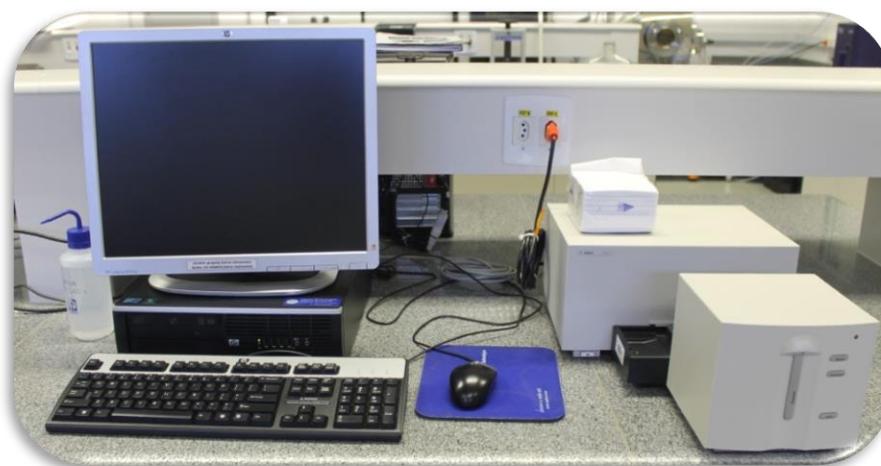


Figura 18 – Espectrofotômetro da Agilent Technologies Ultravioleta Visível que consiste de uma fonte luminosa na faixa UV-VIS, um compartimento para se alojar a cubeta, um detector de absorção e um computador para a aquisição de dados.

A escala do ultravioleta até o visível que o equipamento abrange dar-se-á através de uma fonte luminosa que passa por um monocromador. O monocromador varre através de pequenos passos toda a escala UV-VIS (Figura 19). Na espectroscopia de absorção a intensidade da absorção varia como função da frequência e essa variação descreve o espectro de absorção.

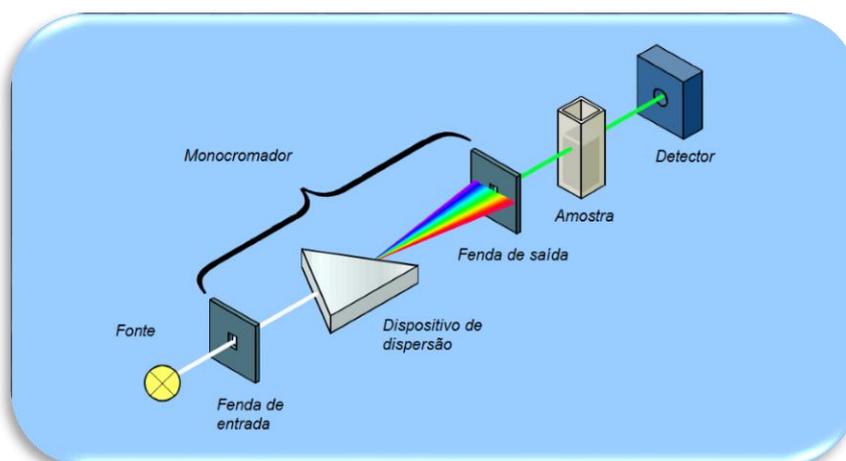


Figura 19 – Esquema adaptado da espectroscopia UV-VIS

(“http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/UV_Vis/Cary50.htm - acessado em 16/09/2013”, [S.d.]). A emissão da luz incide sob o monocromador e em seguida incide sob amostra; após a absorção o detector mede a intensidade que passou pela amostra e compara com a intensidade incidente.

UV-VIS é empregado como análise química para determinar presença de substâncias na amostra, em muitos casos é utilizada para quantificar as substâncias presentes. As linhas de absorção são classificadas pela natureza da alteração induzida nos níveis quânticos principais da molécula ou átomo, conhecidas como linhas eletrônicas. Entretanto, em sistemas nanométricos metálicos, o espectro observado é explicado por uma teoria que leva em consideração um fenômeno conhecido como o plasmon. Neste fenômeno a onda proveniente da oscilação coletiva de elétrons presentes em um composto permite caracterizar o tamanho das nanopartículas metálicas como as de prata, ou ouro, de acordo com seus picos de energia característicos. A seguir estão descritos os procedimentos adotados para as medidas UV-VIS. No caso do MILC (GALIMARD *et al.*, 2012) teste (*metal internalized/adsorbed by living cells*) o objetivo é estipular a massa de ferro diluída da amostra em *HCl* 40%.

Procedimento experimental para medidas convencionais no UV-VIS: a amostra de interesse foi preparada em meio líquido disperso cuja concentração possibilite que a radiação emitida pelo feixe UV-VIS não seja completamente absorvida pela amostra, caso contrário não haverá intensidade suficiente para a leitura da medida. Deste modo, titulou-se a amostra até obter-se uma concentração ótima para a leitura. De maneira prática a amostra apresentou um caráter translucido quando estava pronta para a leitura, paralelamente foi preparado a amostra “branco” que constitui da solução base em que a amostra está dispersa. Por fim, adotou-se a cubeta que apresentava o caminho ótico mais apropriado para cada tipo de medida, isso varia

com a concentração e o tamanho das partículas envolvidas. Assim inseriu-se a alíquota de aproximadamente 100 μL de amostra na cubeta previamente escolhida, em seguida aloca-se a cubeta no local apropriado para a leitura espectroscópica, desta forma a amostra é exposta a radiação UV-VIS e em seguida foi realizada a leitura da absorção da radiação. Após o término, é possível recuperar parte da amostra através de uma pipeta, entretanto de modo geral, devido ao contato com a cubeta optou-se pelo descarte da amostra.

Procedimento MILC teste realizado no UV-VIS: Primeiramente, foi cultivado 50 mil de células de HEK293T por poço em 450 μL de meio DMEM Após 24h de crescimento e fixação incubou-se as células com 50 μL de cada NP e seu respectivo recobrimento. Cada conjunto, continha 1 mg/mL de NP previamente tituladas de tal forma a inserir 50 μg de NP por poço durante a alíquotagem. O teste MILC consistiu em incubar as células com nanopartículas por 24h. Depois realizou-se 3 lavagens com PBS para remoção do excesso de NPs que não foram internalizadas. Por fim, realizou-se a dissociação do conjunto células mais amostra em ácido clorídrico, o qual foi liberado íons de Ferro que podem ser verificados e quantificados de acordo com os padrões no UV-VIS. Para essa quantificação foi realizado um conjunto de medidas espectrais em triplicata: do padrão de células, do padrão da nanopartícula de magnetita e da amostragem realizada. Para o padrão de células foi preparado um conjunto que continha $1,15 \cdot 10^5$ células HEK293T, em seguida essas células foram dissolvidas na solução de *HCl* 40%. Para o padrão de magnetita, foi preparado uma solução contendo de 10 mg/mL de Np dissolvidas em *HCl* 40%. Similarmente, utilizou-se o mesmo procedimento para dissolver em ácido clorídrico todas as amostras em estudo. Então foi realizado cinco séries de agitação e sonicação, logo após este processo as amostras foram deixadas em processo dissociação no ácido por 6h. Por fim, realizou-se a leitura no espectrofotômetro UV-VIS.

5.1.3 Potencial Zeta

O potencial zeta é um termo científico para o potencial eletrocinético em sistemas coloidais, geralmente indicado com a letra grega ζ (zeta). O potencial zeta é o potencial elétrico interfacial na camada dupla, ou seja, o potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a fase estacionária do fluido ligado às partículas dispersas no mesmo. A estabilização das amostras via potencial zeta foi avaliada utilizando um Malvern Zetasizer Nano Series (ZS90) que pode ser visto na Figura 20.

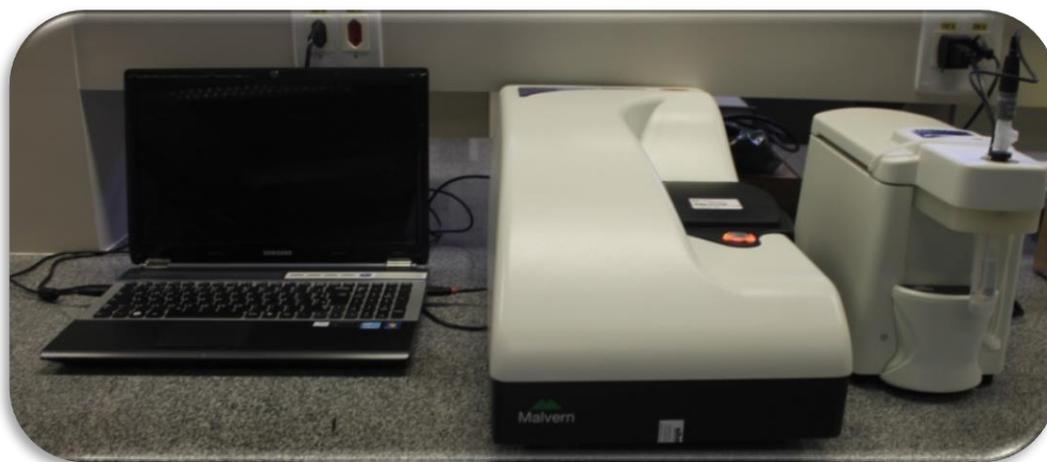


Figura 20 – Aparato do equipamento Malvern Zetasizer para medições do potencial zeta que consiste de um leitor do potencial zeta gerado pelas amostras seguido de um computador para aquisição de dados.

O valor do potencial zeta está ligado à estabilidade das dispersões coloidais (HONARY; ZAHIR, 2013). Basicamente ele indica o grau de repulsão entre as partículas adjacentes carregadas em uma dispersão. Para moléculas e partículas suficientemente pequenas, um elevado potencial zeta conferirá a estabilidade do meio, mostrando se a solução resistirá às agregações. Em suma, em termos eletrostáticos se o potencial zeta for abaixo de $|30\text{mV}|$ à atração excederá a repulsão, desta forma o coloide tenderá a precipitar e este fator também dependerá do pH.

Em termos de estabilidade não importa muito se o potencial é negativo ou positivo, mas sim a magnitude do mesmo. Entretanto, o valor das cargas se tornam um fator importante quando queremos funcionalizar a superfície das nanopartículas, esse fator é conhecido como afinidade eletrônica. Por exemplo, se a superfície das nanopartículas for negativa é mais viável ligar algum revestimento que seja positivo e vice-versa. Os fatores que influenciam no potencial zeta estão associados a condutividade do material de tal forma que quanto maior for a força iônica maior será a compressão da dupla camada elétrica, e isso está ligado intimamente com a concentração de cada componente da amostra.

Procedimento experimental: foi preparado uma amostra suspensa em solução líquida sob uma concentração que permita que a diferença de potencial aplicada sobre o coloide seja mensurada, caso contrário haverá muita queda de tensão e não haverá ddp suficiente para a leitura da medida. Deste modo, titulou-se a amostra até obter-se uma concentração ótima para a medição. De maneira prática a amostra apresentava um caráter translúcido quando estava pronta para a leitura. No setup do equipamento foram informadas algumas características do

coloide tal como o meio no qual as NPs estavam suspensas como as características óticas das NPs em questão e o tipo de cubeta utilizada durante o procedimento. Assim inseriu-se através de uma seringa a alíquota de aproximadamente 1 mL de amostra na cubeta, em seguida lacrou-se e alocou-se a cubeta no local apropriado para a leitura do potencial zeta, ao aplicar tensão sob o material o equipamento medirá o potencial zeta da amostra. Após o término, é possível recuperar parte da amostra através de uma seringa, entretanto de modo geral, devido ao contato com a cubeta optou-se pelo descarte da amostra.

5.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Conhecido também como TEM (do inglês: *transmission electron microscopy* – TEM), ou MET (em português “microscopia eletrônica de transmissão”). A técnica consiste em irradiar uma amostra fina com um feixe de elétrons de densidade de corrente uniforme produzindo uma imagem bidimensional ao transpassar a amostra (essa energia está por volta de 200 KeV). Para os experimentos foi utilizado um JEOL JEM-2100, também conhecido como TEM-MSA localizado no LNNano. A foto do microscópio utilizado é apresentada na Figura 21.



Figura 21 – Microscópio de transmissão eletrônica TEM-MSA nas instalações do LNNano.

O feixe de elétrons provém de um canhão de elétrons. Esses elétrons são acelerados por emissão termiônica (aquecimento de filamento) e interagem com a amostra gerando os padrões de imagem via espalhamento elástico por força coulombiana, retroespalhamento e espalhamento inelástico (WILLIAMS; CARTER, 2009). Este fenômeno pode ser visualizado na Figura 22.

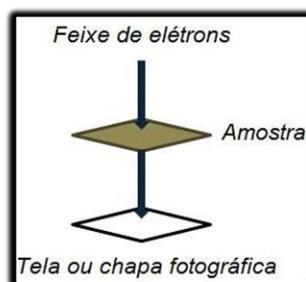


Figura 22 – Esquema simplificado do funcionamento do TEM

(“<http://www.olharnano.com/artigos/4001/18002/MET-e-MEV:-conhe% C3% A7a-os-principais-tipos-de-microsc% C3% B3pios-eletr% C3% B4nicos> - acessado em 16/09/2013”, [S.d.]) constituído pela produção do feixe, interação com a amostra e leitura da imagem por transmissão.

Diferente de um microscópio de varredura o feixe de elétrons interage com a amostra e transpassa por um conjunto de estágios de lentes, por fim esse feixe é medido através de um detector. Basicamente, um TEM é constituído de dois estágios de lentes condensadoras que permitem a variação da abertura de iluminação. Desta forma, é possível controlar a região iluminada, além de um estágio de imagem que é composto por lentes objetivas, lentes intermediárias, uma tela de visualização fosforescente e uma câmera. A resolução máxima de imagem é da ordem de 0,25 nm.

Procedimento experimental: preparou-se uma amostra suspensa em meio líquido sob uma concentração que permita que o nanomaterial fosse fixado em um filme ultrafino de carbono adequadamente. Deste modo, titulou-se a amostra até obter-se uma concentração ótima para a leitura, após este passo foi necessário imergir o filme de carbono sob a amostra previamente titulada por 2 minutos. Neste processo pode-se optar, caso seja necessário, por pipetar alíquotas de 10 μ L sob o filme ao invés da imersão, por conseguinte a amostra foi levada a uma lâmpada infravermelho por 12h onde foi efetuado o processo de secagem. Em seguida, a amostra passou duas vezes pelo desmagnetizador. Este equipamento é constituído de uma bobina que produz um campo magnético alternado, o processo deu-se pelo afastamento da amostra gradativamente do núcleo da bobina para fora do dispositivo. Este passo deve ser

gradativo para que ocorra o amortecimento do campo sob a amostra desmagnetizando assim a amostra. Após isto, inseriu-se com auxílio de uma pinça invertida a amostra no respectivo porta amostra apropriado que foi colocado na câmara de vácuo do microscópio de transmissão. Ao incidir o feixe de elétrons sob a amostra o equipamento mediu a transmissão dessa interação com a amostra resultando na imagem transmitida. Após o término, foi possível recuperar o filme em que se encontrava a amostra, entretanto em alguns casos o feixe de elétrons deteriorou a amostra e acabou por inutilizar o respectivo filme.

5.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Conhecido também por SEM (do inglês: *scanning electron microscopy*) ou MEV (em português “microscopia eletrônica por varredura”) é parecido com a microscopia TEM em termos de interação da radiação com a matéria, entretanto utiliza o feixe de elétrons para varrer a superfície da amostra, gerando elétrons secundários que são captados por um detector (geralmente uma sonda) fornecendo um sinal elétrico que é convertido na imagem. Foi utilizado um microscópio FEI Inspect F50, pertencente as instalações do LNNano. Uma imagem do microscópio é apresentada na Figura 23.

Esta técnica mede basicamente diferença entre as profundidades da superfície, gerando uma imagem topográfica (WILLIAMS; CARTER, 2009).

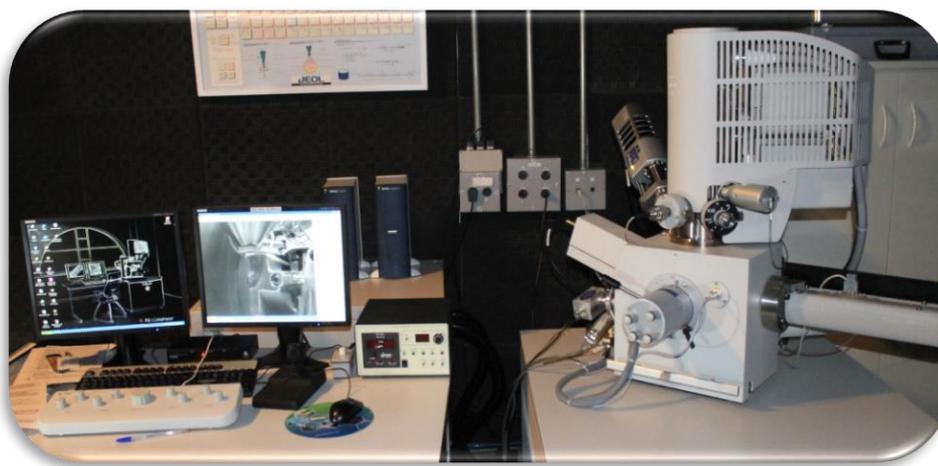


Figura 23 – Microscópio de Varredura eletrônica Inspect nas instalações do LNNano.

Os elétrons são gerados via emissão termiônica, acelerados e focalizados com lentes eletromagnéticas. Na ponta de prova (sonda) onde é feita a varredura contém um par de bobinas

defletoras que variam a posição do feixe de elétrons sobre a amostra, produzindo assim a imagem (Figura 24).

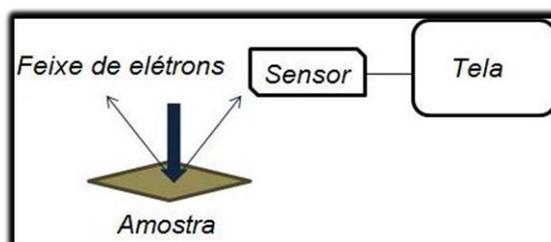


Figura 24 – Esquema simplificado do SEM constituído pela produção do feixe, interação com a amostra e leitura da imagem por retroespalhamento. Fonte (“<http://www.olharnano.com/artigos/4001/18002/MET-e-MEV:-conhe%C3%A7a-os-principais-tipos-de-microsc%C3%B3pios-eletr%C3%B4nicos> - acessado em 16/09/2013”, [S.d.]

A sonda, ao se aproximar de uma porção elevada da amostra se move para cima e volta, essa oscilação realiza uma varredura sobre a área da amostra. Esses padrões de sinais varridos podem ser mapeados, produzindo assim uma imagem justificando, portanto, o nome microscopia eletrônica de varredura. A resolução máxima de imagem dessa técnica é da ordem de 2,5 nm. Todo esse processo de varredura resulta numa competição de espalhamento elástico de elétrons, concomitantemente com a emissão de elétrons secundários via espalhamento inelástico e emissão de elétrons por efeito fotoelétrico. O detector é do tipo Evenhart-Thornley, cuja função é captar os elétrons secundários que a ponta de prova excitou via a penetração dos elétrons primários. Basicamente a quantidade dos elétrons secundários que chegam ao detector dependem da morfologia da amostra, formando assim a imagem local da região varrida. O SEM foi utilizado para avaliar a morfologia dos aglomerados das estruturas dos nanopartículados.

Procedimento experimental: foi preparada uma amostra suspensa em meio líquido sob uma concentração que permitiu que o nanomaterial fosse sobreposto em um espelho de silicato que fora previamente fixado em um porta amostra através de uma fita de carbono. Deste modo, titulou-se a amostra até obter-se uma concentração ótima para a leitura. Após este passo foi necessário pipetar alíquotas de 10 μL sob o substrato de sílica, por conseguinte secou-se a amostra sob uma lâmpada infravermelho durante uma noite inteira. Devido ao fato das amostras serem magnéticas foi necessário acrescentar um filme fino de carbono sob a superfície da amostra para evitar que as NPs se liguem à ponta de prova do microscópio, este processo foi realizado em uma câmara de filme de carbono. Por fim, inseriu-se o porta amostra dentro da câmara de vácuo no microscópio de varredura para a leitura. Ao incidir o feixe de elétrons sob

a amostra o equipamento mediu o espalhamento dessa interação resultando na imagem por varredura. Após o término, foi possível recuperar o porta amostra em que se encontrava a amostra, entretanto em alguns casos particulares o feixe de elétrons deteriorou a amostra inviabilizando-a para futuras repetições de leituras. Todavia, foi possível limpar e recuperar a base de silicato e o porta amostra para reutilizá-los.

5.1.6 Termogravimetria

O TGA (do inglês: *Thermogravimetric analysis*) é uma técnica que registra a variação da massa de uma amostra em função da temperatura sob uma atmosfera muito bem controlada. Através dessa técnica é possível analisar a perda de massa da amostra de acordo com a variação da temperatura. Basicamente a técnica é utilizada para descobrir as proporções da massa dos componentes em um dado solvente ou composto. A Figura 25 pertence ao Perkin-Elmer Thermogravimetric Analyzer Pyris 1 – TGA utilizado nos experimentos de termogravimetria.

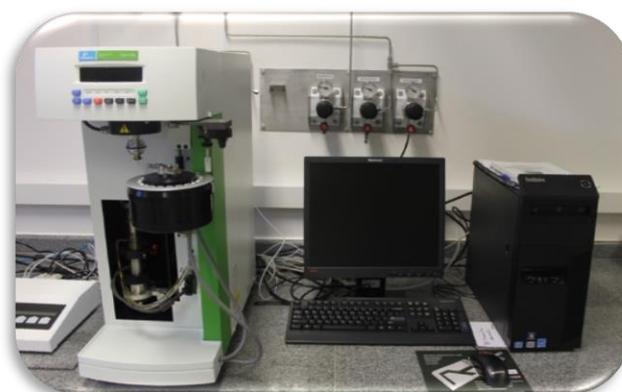


Figura 25 – Aparato do equipamento Perkin-Elmer de TGA que consiste em uma fornalha, um termômetro de precisão, um sistema de controle de fluxo de ar e um computador para aquisição de dados.

Através do TGA pode-se extrair informações físicas de fenômenos de transição, incluindo vaporização, sublimação, absorção, adsorção e dessorção. O TGA foi utilizado para determinar as características de concentração dos materiais pela exibição da perda de massa devido a evaporação dos compostos envolvidos na mistura. Conhecendo os padrões dos pontos de evaporação de cada material é possível estimar o quanto de cada material foi evaporado durante o processo.

O aparato de TGA apresenta um elevado grau de precisão especialmente na variação da massa, da temperatura e na taxa de variação da temperatura. Desta forma, a fornalha pode ser programada com diversas taxas de aquecimento que serão precisamente controladas, o que

também pode ser modificado de tal forma a obter uma taxa de aquecimento para uma perda de massa constante, mas que não convém ao nosso estudo(QI, 2016).

Ao conhecer o padrão das curvas de temperatura do produto, é possível realizar uma breve análise do conteúdo da amostra. Essa análise consiste basicamente em verificar a massa perdida em determinados pontos de temperatura, assim torna-se possível comparar estes valores com a massa inicial do material. Isto permite analisar as curvas de massa x temperatura e verificar através da derivada dessa variação. Nos pontos onde a derivada se aproxima de zero indica que a variação de massa da amostra estabilizou, e, portanto, foi concluída a transição de fase ou queima de algum composto da amostra.

Procedimento experimental: as amostras preparadas para a realização do TGA não apresentavam restrição quanto ao estado físico da amostra, a única exigência foi que a amostra fosse distribuída homogeneamente sob o porta amostra. Deste modo, utilizou-se a sonicação e a agitação das amostras coloidais para homogeneizar a amostra; em seguida colocou-se a alíquota de 30 μ L de amostra sob o porta amostra o qual foi para fornalha. No equipamento foram informadas algumas características tal como o controle do fluxo da atmosfera e a taxa de incremento de temperatura. Para o controle da atmosfera foi utilizado um fluxo de nitrogênio de 10 mL/min evitando assim a oxidação do material durante o processo, por fim escolheu-se a taxa de temperatura de 10°C/min e o ponto final de temperatura que pode ser no máximo 1000°C (limite de operação do equipamento). Após o término, foi possível recuperar parte da amostra, entretanto devido as mudanças de estrutura devido a variação de temperatura optou-se pelo descarte da amostra.

5.1.7 Magnetometria – S.Q.U.I.D.

O magnetômetro S.Q.U.I.D. – Superconducting Quantum Interference Device – é um sistema de medida altamente sensível a pequenas variações do fluxo magnético. O equipamento S.Q.U.I.D. apresentado na Figura 26 foi utilizado no trabalho é o MPMS3 – S.Q.U.I.D. da Quantum Design. Este equipamento se encontra nas instalações do CBPF – Rio de Janeiro.



Figura 26 – Equipamento MPMS3 – S.Q.U.I.D. da Quantum Design utilizado nas instalações do CBPF.

O princípio de funcionamento (SAMPAIO; GARCIA; CERNICCHIARO, 2000) é o efeito Josephson. E efeito consiste na quantização do fluxo magnético em um circuito supercondutor fechado (GALLOP, 1991). O efeito de Josephson é o fenômeno de supercorrente, isto é uma corrente que flui indefinidamente por muito tempo sem qualquer tensão aplicada através de um dispositivo conhecido como uma junção Josephson (JJ), que consiste em dois supercondutores acoplados por um elo fraco. O elo fraco pode consistir de uma fina barreira isolante (conhecida como junção supercondutor-isolante-supercondutor, SIS), uma pequena seção de metal não-supercondutor (SNS) ou uma constricção física que enfraquece a supercondutividade no ponto de contato (SsS). Acima do valor da corrente crítica, a junção transita para um estado normal, e, portanto, passamos a detectar uma tensão diferente de zero. Em suma a corrente crítica será função do fluxo magnético aplicado com um período quantizado de $h/2e$, onde \hbar é a constante de Planck e e é a carga do elétron. Desta forma, podemos equacionar a variação dessa corrente crítica de acordo com a evolução dinâmica.

$$\begin{cases} V(t) = \frac{\hbar}{2e} \frac{\partial \phi}{\partial t} \\ I(t) = I_c \sin(\phi(t)) \end{cases} \quad (5-1)$$

A primeira equação diz respeito a evolução de fase, onde $V(t)$ e $I(t)$ são a tensão e a corrente que passa pela junção e $\phi(t)$ é a diferença de fase através da junção, I_c é a corrente

crítica comentada acima. Portanto determinar a variação dessa corrente crítica permite determinar a variação do fluxo que passa através do S.Q.U.I.D.. Basicamente o S.Q.U.I.D. irá converter a variação do fluxo magnético em variação de corrente elétrica, essa corrente passa por um amplificador e depois será processada.

Existem dois tipos de S.Q.U.I.D.: o primeiro é um S.Q.U.I.D.-RF de radiofrequência que consiste basicamente de um anel contendo apenas uma única junção de Josephson; já o segundo tipo o S.Q.U.I.D.-DC ou de corrente contínua consiste de duas junções de Josephson ligadas em paralelo por um fio supercondutor.

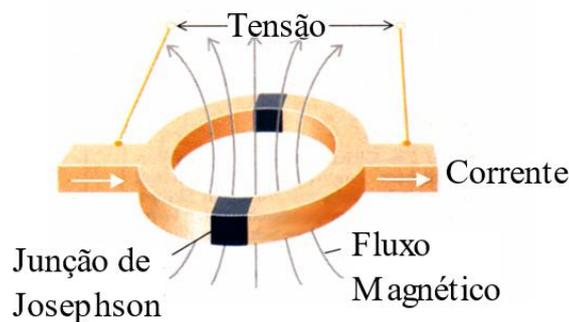


Figura 27 – Esquema da junção de um S.Q.U.I.D.-DC adaptada da referência (“<http://www.engr.sjsu.edu/rkwok/squid.htm> acessado em 19/06/2017”, [S.d.]), onde se circula uma corrente através a junção de Josephson que dependerá do fluxo do campo magnético e da temperatura do experimento, assim mede-se a variação desse sinal em forma de tensão e corrente.

Este tipo de arranjo permite que a corrente elétrica se distribua igualmente pelo dispositivo de Josephson. Desta forma, a corrente elétrica dependerá apenas do fluxo magnético atuando no sistema e da temperatura ao qual o experimento está sendo exposto.

Procedimento experimental: Para este processo as amostras foram submetidas ao processo de secagem já descrito na seção 4.3.1. As medidas de magnetização foram realizadas através do S.Q.U.I.D. no qual as amostras foram submetidas a dois tipos de medidas: a primeira foi de Magnetização x Campo Magnético a diferentes temperaturas 5, 50, 100, 150, 200, 250 e 300K; a segunda medição foi a curva de Magnetização x Temperatura sob as condições de resfriamento com um campo aplicado de 100 Oe (*Field-Cooling* (FC)) e a partir da amostra resfriada campo externo aplicado (*zero-field-cooling* (ZFC)) a fim de determinar o comportamento da temperatura de bloqueio magnético do nanomaterial. No final foi possível recuperar a amostra, entretanto optou-se pelo descarte do material.

5.1.8 SAR e Hipertermia

A definição de hipertermia (GUIMARÃES, 2009) está associada à elevação/manutenção da temperatura do corpo humano ou de organismos vivos, podendo em alguns casos comprometer as suas funções, ou até mesmo levar o organismo à morte.

Para explorar as propriedades do SAR e da hipertermia magnética, o mecanismo de aquecimento adotado é o de dissipação magnética de potência que constam nos fundamentos teóricos. Durante este trabalho, um sistema comercial da Ambrell Easy Heat 4.2 kW composto por uma fonte de corrente alternada (0 – 300 A, 313kHz) que alimenta um solenoide de oito espiras circulares ($diâmetro_{interno} = 25,5\text{ mm}$; $diâmetro_{externo} = 39,5\text{ mm}$; $altura = 37\text{ mm}$) foi utilizado. Todo o conjunto do aparato está exibidos na Figura 28.

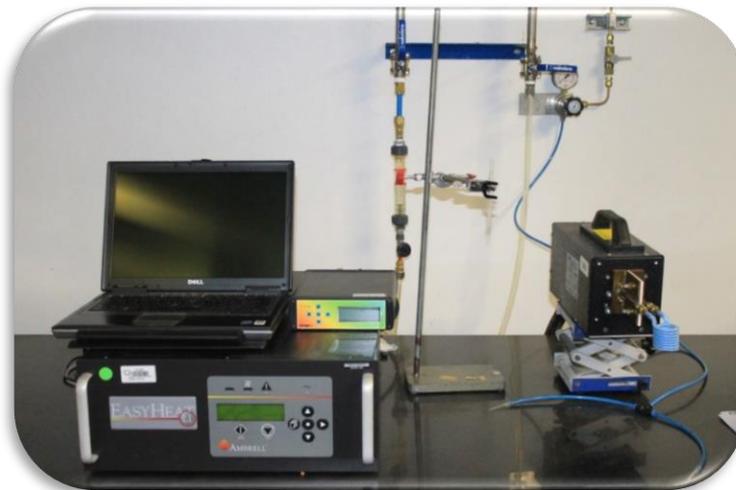


Figura 28 – Aparato experimental do dispositivo da Ambrell designado para hipertermia magnética, composto por um computador que registra as informações do ensaio, uma fonte de corrente, uma bobina e um sistema de arrefecimento líquido.

Este sistema é arrefecido a água que circula no interior da bobina como descrito na Figura 29. Para auxiliar no arrefecimento da bobina adiciona-se ao sistema um conjunto de circulação de duas mangueiras de ar. Este conjunto foi anexado entre as espiras da bobina melhorando assim a circulação de ar entre os vãos das espiras. Pode-se calcular a intensidade do campo induzido na bobina através da equação:

$$H = \frac{\mu_0 Ni}{2R_m} \cdot 10^4 \quad (CGS) \quad (5-2)$$

onde H é o campo induzido dado em Oe, μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo, N é o número de voltas da bobina, i é a corrente que circula na bobina e R_m é o raio médio da bobina. Sob as condições de 200 A a 313KHz na fonte de corrente obtém-se um campo de aproximadamente 200 Oe na região central da bobina.

Separadamente o aparato dispõe de um sensor óptico da Optocon que mede a temperatura no interior da solução e a repassa para o computador que concilia a temperatura com a evolução temporal do sistema.

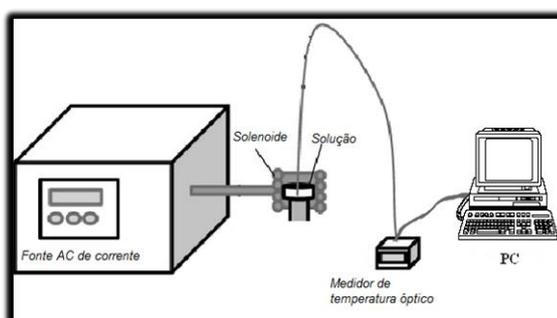


Figura 29 – Esquema da instrumentação para aplicação de hipertermia que consiste na fonte de corrente, bobina, medidor de temperatura e computador para registro de dados

Para mensurar a eficácia da interação das NPs com as células foi desenvolvido um arranjo que permitisse medir o SAR das NPs e aplicar a magneto hipertermia *in vitro*. Devido a limitações experimentais o sistema está sujeito a condução e convecção de calor, portanto para descontar essa contribuição indesejada de calor ao SAR foram realizadas medidas em soluções contendo apenas os respectivos recobrimentos sem NPs. A finalidade dessas medidas é garantir que para o cálculo do SAR seja considerado apenas o aquecimento efetivo produzido pelas NPs com seus respectivos recobrimentos sem a interferência de agentes externos. Entretanto, para aplicações biológicas essa contribuição será inerente ao processo de aquecimento.

Procedimento experimental para o SAR: foram preparadas soluções de NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS e NP@DSPE cada qual com 1 mg de NP suspensa em 1 mL de solução cada recobrimento. O processo de medida consistiu em alojar a amostra no centro da bobina e isolar a amostra termicamente com 7 mm de isopor. Nestas condições aplicou-se o campo de 200 Oe e mediu-se o efeito de aquecimento magnético das NPs, neste processo foi medido também soluções contendo apenas os recobrimentos de cada amostra cuja finalidade

serviu para descontar as contribuições externas de calor. Por fim, calculou-se a derivada destas curvas em intervalos de tempos curtos, onde obteve-se a taxa de aquecimento efetiva que foi utilizada no cálculo do SAR.

Para a hipertermia magnética os ensaios foram realizados em triplicatas, e preparados três conjuntos de amostragem para três condições diferentes de experimento: um conjunto de amostras sem hipertermia, um conjunto de amostras para aplicação da hipertermia por 500 segundos e o terceiro conjunto de amostras para aplicação hipertermia por 1500 segundos.

O procedimento experimental para hipertermia: previamente foi incubado 50 mil células de HEK293T por 24h em poços individuais contendo 450 μ L de meio. Em seguida, adicionou-se aos poços individuais 50 μ L das amostras NP@PEG, NP@CH, NP@SDS e NP@DSPE previamente tituladas de tal forma que a cada respectiva alíquota fornecesse duas quantidades distintas de NPs aos poços de: 100 μ g e 200 μ g de NPs respectivamente. Para a internalização incubou-se as placas na estufa por mais 24h. Para a hipertermia, preparou-se três conjuntos distintos de amostragem: as amostras que não passaram pela hipertermia e as amostras que foram submetidas a 200 Oe de campo na hipertermia magnética por tempos distintos de 500 e 1500 segundos respectivamente. Após o ensaio, contabilizou-se a viabilidade celular.

5.2 Cultura de célula

A cultura celular é o processo pelo qual as células são cultivadas sob condições controladas, geralmente fora do seu ambiente natural (normalmente em estufas controladas). As condições de cultura de células podem variar para cada tipo de célula. Ambientes artificiais consistem de um recipiente adequado com substrato ou meio que fornece os nutrientes essenciais (aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais em alguns casos antibióticos para evitar a contaminação). Fatores de crescimento como hormônios e gases (CO_2 , O_2) regulam o ambiente físico-químico celular (pH, pressão osmótica, temperatura). A maioria das células requer uma superfície ou um substrato artificial (cultura aderente ou monocamada; neste trabalho foi utilizado cultura aderente), enquanto outras podem ser cultivadas flutuando livremente em meio de cultura (cultura em suspensão). No cultivo celular foram utilizados três tipos de soluções: meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, sigma), tripsina e buffer de fosfato-salino (PBS). O DMEM foi preparado para o cultivo celular. As outras soluções utilizadas foram a tripsina para descolar as células fixadas e o PBS para manipulação e lavagens.

O meio DMEM é destinado a células de cultura humanas e de outros animais. Esse meio foi adquirido na forma de pó e conservado em temperatura controlada entre 2-6 °C. As

vantagens de se utilizar esse meio é que ele promove um ótimo crescimento celular, mantém um bom balanço de pH e controle de osmolaridade. Seu aspecto é de um pó cor de rosa homogêneo. O meio DMEM é um composto extremamente higroscópico devendo ser protegido do meio ambiente livre de contaminações. Foi evitado preparações acima da quantidade recomendada devido ao desbalanço de pH seguido da possibilidade de precipitados.

O PBS conhecido como buffer de fosfato-salino é uma solução salina contendo cloreto de sódio e fosfato de sódio, em algumas formulações pode conter cloreto de potássio e fosfato de potássio. Sua finalidade é manter o pH praticamente constante durante a manipulação das células e essa solução se iguala à concentração de sais presentes no corpo humano.

A tripsina é uma enzima que age nas proteínas quebrando-as em peptídeos mais simples. O EDTA é um sal dihidratado dissódico que tem a função de impedir a degradação do DNA inibindo a ação de DNases. De maneira prática, no cultivo celular a tripsina tem a função junto ao EDTA de desprender as células das garrafas e os aglomerados celulares. Para o preparo da tripsina opta-se por uma solução mais concentrada (5x) e congela-se. Essa solução, é utilizada de acordo com a demanda, a escolha desse processo é que ao preparar uma solução mais concentrada e congelar permite uma melhor manipulação, uma vez que a enzima depois de descongelada vai perdendo atividade e em cerca de 3 meses o composto perde a habilidade de desprender as células.

Para a esterilização das amostras, as mesmas foram submetidas à luz ultravioleta por 30 minutos antes de todos os ensaios biológicos. Todos os experimentos biológicos foram desenvolvidos em colaboração com o Laboratório Nacional de Biociências – LNBio. Além disso todos os experimentos foram desenvolvidos na sala de cultura celular que pode ser vista na Figura 30.



Figura 30 – Instalações da sala de cultura celular no LNBio: (A) Capelas para cultura celular (B) Estufas de incubação do cultivo celular.

Para os ensaios biológicos foram utilizados dois tipos de células: célula embrionária de rim (HEK293T) e a osteosarcoma da tíbia feminina (U2OS). Para o cultivo das células foi utilizado o meio de alta glucose *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, sigma). Para a cultura de células também foi utilizado as seguintes condições: 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), 100 units/ml penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco), 37°C dentro de uma estufa úmida a 5% e o ambiente de CO₂/95%.

5.2.1 HEK293T

HEK293T vem do termo inglês *Human embryonic kidney cells*, em português o termo significa células embrionárias de rim humano. Seu formato achatado pode ser visto na Figura 31. O número 293 é devido ao autor precursor dos estudos com essas células Frank Graham(F.L. GRAHAM, 1977), que na época tinha o hábito de enumerar todos os seus experimentos. Assim, as células HEK foram enumeradas como o 293º experimento. Já o T vem da presença do antígeno-T que tem algumas propriedades como resistência a neomicina. Dentre suas funções a HEK tem uma boa taxa de transfecção, permitindo a manutenção episomal do “Simian Vacuoling Vírus 40 – SV40” (CHEN *et al.*, 2006; LUO; BUSILLO; BENOVIC, 2008).

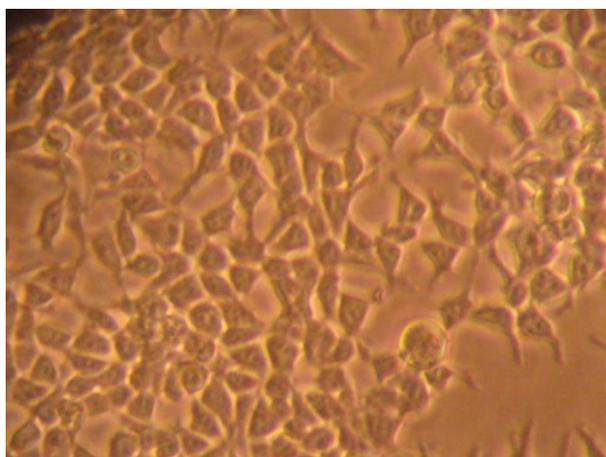


Figura 31 – Imagens da Células HEK293T tiradas do microscópio ótico.

Uma característica das células HEK293T é o seu rápido crescimento em cultura e sua transfecção. A transfecção é o processo de introdução intencional de ácido nucleicos nas células. Muito utilizado em métodos não-virais nas células eucarióticas. O fato da HEK crescer rapidamente auxilia na elaboração dos testes e ensaios com hipertermia, visto que é necessária

uma quantidade significativa de células durante toda a triagem do processo. Portanto, ter a disposição esse tipo de característica otimiza o processo.

5.2.2 U2OS

A linha de células U2OS foi uma das primeiras linhagens de células geradas e é utilizada em várias áreas de investigação biomédica. A U2OS (MUSA; KANNAN; MUSTAFA, 2013; SIGMA, [S.d.]) são células do tipo Epiteliais de Osteosarcoma Ósseo Humano (denominada Linha U2OS). Essa linhagem celular era originalmente conhecida como 2T. A obtenção desse tipo de célula tem sua origem a partir do cultivo do tecido ósseo de uma fêmea humana de quinze anos que sofria de osteosarcoma. Os primeiros estudos iniciaram-se na década de 1964, onde as células originais foram retiradas de um sarcoma moderadamente diferenciado da tíbia e estudadas. As células U2OS exibem morfologia aderente epitelial e sua morfologia por ser observada na Figura 32. Nessa figura é possível observar o seu formato tipicamente oblato, o que não acontece com a HEK que tem um perfil mais arredondado, seu tamanho é consideravelmente maior se comparada a HEK. O fato dela ser maior favorece a observação microscópica em interação com nanomateriais tornando esse tipo de células fundamental para análise de internalização de nanomateriais. Entretanto a taxa de replicação da U2OS é relativamente baixa se comparada a taxa da HEK. Este fato faz com que seu crescimento seja limitado de tal forma que muitas vezes são necessários dias para a preparação do número mínimo de células para que o experimento possa ser realizado.

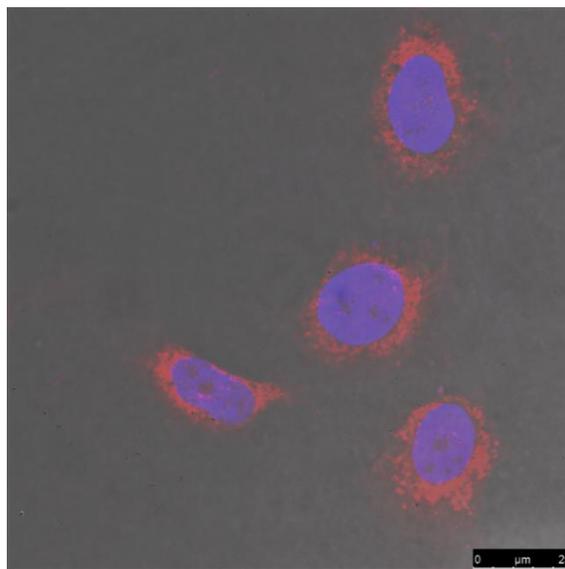


Figura 32 – Imagem das Células de U2OS provenientes da microscopia confocal. O núcleo da célula foi marcado com DAPI (azul) e o citoplasma com mitotracker (vermelho).

Outro fator a ser considerado é que a U2OS apresenta muitas características semelhantes às da HEK293T tais como a taxa de transfecção elevada. Outra vantagem é que esse tipo celular não apresenta infecção pelo adenovírus, possibilitando assim uma boa margem de bioaplicabilidade. Além disso, a U2OS é uma célula cancerígena e pode ser alvo de antígenos-T, portanto se o nanomaterial estiver funcionalizado com anticorpos é possível realizar o endereçamento da droga a esse tipo de tecido.

5.2.3 CellTiter 96[®] - MTS e o Perkin EnSpire Multimode Reader

É um método colorimétrico para determinar o número de proliferação ou citotoxicidade. O reagente da solução contém o tetrazólio (MTS)(PROMEGA CORPORATION, 2012) e um reagente de acoplamento de elétrons etosulfato de fenazina (PES). O PES tem uma boa estabilidade química permitindo ser combinada com o MTS em uma forma de solução estável.

O MTS é bioreduzido pelas células em um produto colorido (490 nm) chamado formazan que também é solúvel no meio de cultura que pode ser lido através de um leitor de placas via absorção. De forma simples, o agente colorimétrico interage com as enzimas metabolizadas pelas células vivas modificando a cor do meio, assim torna-se possível obter o resultado a porcentagem relativa de células vivas no meio. Após a interação do meio com o MTS, deve-se realizar a leitura de absorção da viabilidade celular, para este experimento foi utilizado o espectrofotômetro Perkin EnSpire Multimode Reader situado no Laboratório Nacional de Biociências -LNBio (Figura 33).



Figura 33 – Espectrofotômetro de absorção Perkin EnSpire Multimode Reader que mede a viabilidade celular via MTS; este equipamento encontra-se situado nas dependências do LNBio.

5.2.4 Ensaio de viabilidade celular via MTS

Tanto para HEK como para U2OS, a preparação para o teste de viabilidade seguiu-se o mesmo protocolo. O ensaio consistiu em preparar aproximadamente $1,5 \cdot 10^5$ células por poço em uma placa de 96 poços com 120 μL cada. As células foram colocadas na estufa por 24h para serem fixadas na placa e crescerem em número. A incubação das células foi realizada nas condições pré-estabelecidas como já fora citado. Após 24h o meio foi trocado por um novo meio contendo alíquotas das amostras. Estas amostras foram previamente preparadas sob as seguintes condições: cada solução continha 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amostra; essa amostra foi diluída 20 vezes em meio de cultura; estas novas soluções foram separadas por alíquotas de 0,5 ; 1,0 ; 1,5 e 2,0 μL ; antes de misturar essas amostras com as células, os novos volumes foram completados com água até 2,0 μL de volume para cada amostra e assim ao todo colocando 120 μL de solução em cada poço por mais 24h e 48h de interação com as células. Em seguida as quatro concentrações foram testadas em quadruplicatas. No ensaio de viabilidade foi utilizado o marcador CellTiter 96[®] (MTS) AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega). Para a condução do ensaio de viabilidade celular o meio de cultura de cada poço contendo 120 μL foi trocado por um meio cuja concentração era de 1mL de MTS para cada 5 mL de meio DMEM. Antes da leitura o sistema deve ser mantido por mais 1h em incubação. Por fim as medidas foram realizadas pelo Perkin Enspire.

5.2.5 Citometria de Fluxo

A fim de classificar, contar e examinar as características celulares após o tratamento de hipertermia foi realizada a medida dos eventos em um citômetro de fluxo FACSCanto II – BD Biosciences (Figura 34).

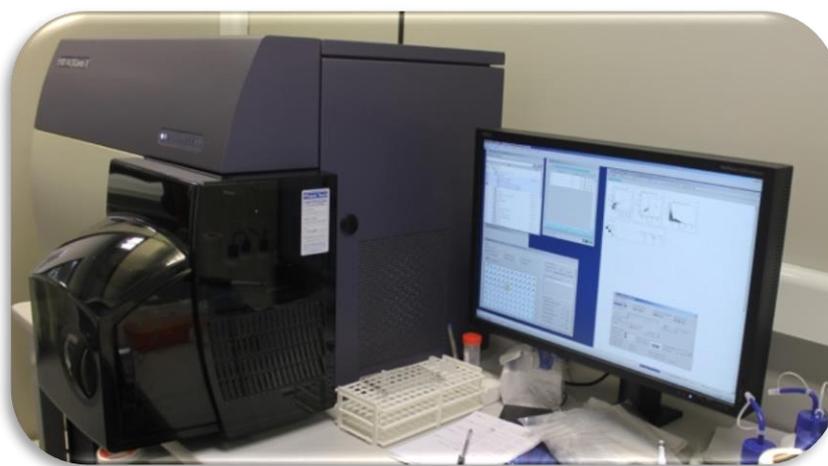


Figura 34 – Citômetro de Fluxo situado nas instalações do LNBio. Composto pelo citômetro de fluxo para a contagem dos eventos celulares e um computador para a aquisição de dados.

A técnica viabiliza a análise de muitos parâmetros celulares simultaneamente (ADAN *et al.*, 2016). Os eventos são registrados através do dispositivo de captação de fótons que permite analisar as características físicas, químicas e biológicas das células de acordo com o marcador utilizado.

A amostra é inserida no set indicado na Figura 35. No sistema de fluidos, a amostra desloca-se para cima do tubo de injeção, assim focalização hidrodinâmica dentro da célula de fluxo força as partículas a se deslocarem em um único pacote de fluxo que passará pelo laser, por fim o laser intercepta esse fluxo no ponto de investigação amostral. O design exclusivo da célula de fluxo permite que as partículas fluam através do centro da célula de fluxo. O aumento da pressão da amostra aumenta o diâmetro do núcleo e conseqüentemente a taxa de fluxo.

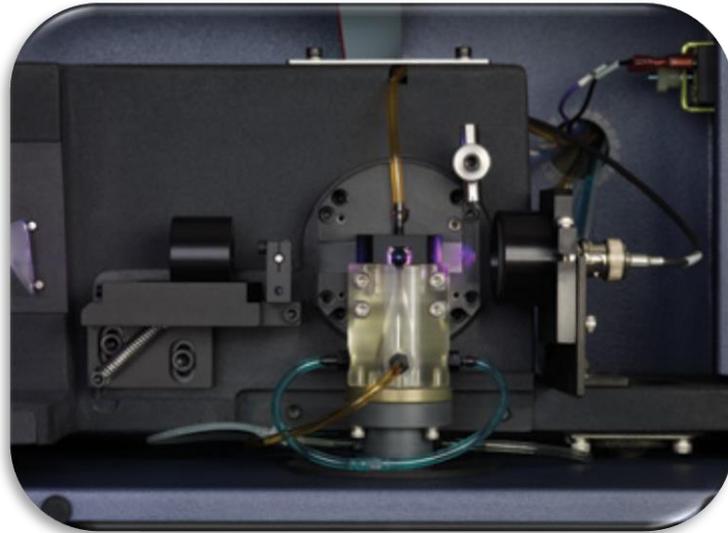


Figura 35 – Setup de leitura da amostra do BD@FACSCANTO-II. Composto por um injetor de amostra, sistema de focalização de fluxo e um laser para a leitura da amostra.

A óptica de excitação consiste em múltiplos lasers de comprimento de onda fixo, fibra óptica até os prismas de formação de feixe e lentes de focalização acromáticas que produzem pontos de feixe espacialmente separados na célula de fluxo. Cada lente focaliza a luz laser na célula de fluxo, que pode ser conferido na Figura 36. Por fim, os eventos são contados pelos detectores e registrados no computador acoplado ao instrumento. Para o experimento foi assegurado uma contagem de 10.000 eventos para cada amostra.

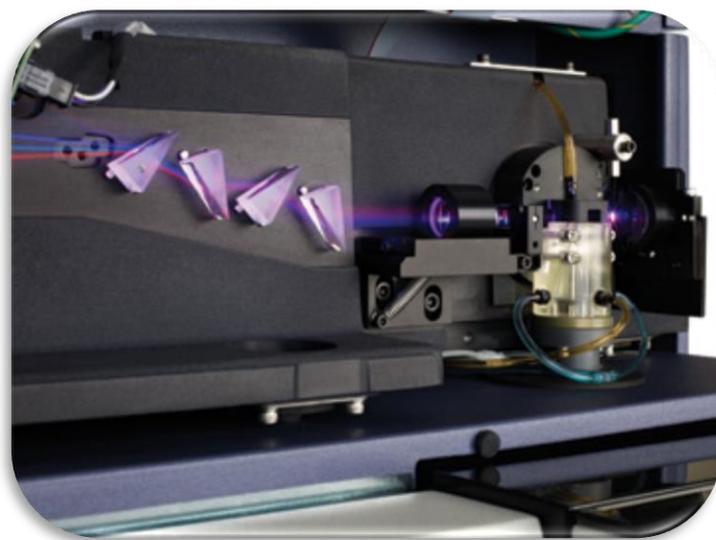


Figura 36 – Setup de interação óptica e leitura dos eventos do BD@FACSCANTO-II composto pelos conjuntos de lentes de focalização acromáticas que produzem um feixe espacialmente separado o qual é aplicado nas células de fluxo.

A técnica é baseada no uso de um feixe de luz laser em geral. Este laser é aplicado em um meio líquido que se encontra em fluxo. O que diferencia cada parâmetro lido são os detectores e seus posicionamentos para a leitura. Por exemplo, o detector na linha do feixe de luz é chamado de *forward scatter* ou FSC e vários perpendiculares a este são chamados de *side scatter* ou SSC além de um ou mais detectores de fluorescência. Por princípio de ótica o feixe que atravessa o líquido dispersa a luz, causa variações na intensidade da luz, assim essas flutuações fluorescentes são registradas pelos detectores. Através da análise é possível correlacionar o FSC com o volume celular e o SSC com a granulosidade/rugosidade da célula em estudo que pode variar de acordo com o estado celular. Em muitos casos são indicados kits com biomarcadores tal como o PI (*Propidium iodide*) para facilitar a fluorescência das células, a função deles é viabilizar a identificação rápida de células mortas ou vivas.

O marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídio (PI) foi utilizado para distinguir células apoptóticas de células necróticas. O iodeto de propídio é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Isso está associado ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o PI, não são passíveis de penetrar na célula intacta em decorrência do seu tamanho, bem como não marcam células apoptóticas sem que estas apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, como ocorre nos estágios finais de apoptose. Todos os ensaios envolvendo a hipertermia magnética seguido de citometria de fluxo foram realizados em triplicatas.

O processo de cultura celular de incubação foi realizado em poços de 500 μL , utilizando CTAB em altas concentrações como controle de mortalidade, desta forma as células foram preparadas em 450 μL de meio DMEM em placas de 24 poços. Para a incubação com a amostra foi realizada a adição de 50 μL da amostra NP@PEG com concentração de 1 mg/mL de NPs, garantindo assim em média 50 μg de NPs para cada poço. Em seguida, os ensaios foram submetidos ao tratamento de hipertermia por 500 e 1500 s. Por fim, as células foram marcadas, fixadas e submetidas a citometria de fluxo.

Procedimento experimental para a leitura no citômetro de fluxo: as células devidamente marcadas foram removidas dos poços com tripsina e centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. Em seguida, efetuou-se o processo de lavagem nas células com PBS apenas uma vez, o próximo passo consistiu em resuspender as células em 2 mL de etanol 70% (preparado em solução de PBS) o qual fixou as células. Posteriormente para que a fixação fosse concluída, as células foram realocadas para um freezer a uma temperatura de -20°C por 1h. Logo após, as células foram lavadas mais uma vez em PBS e resuspendidas em 4,5mL de PBS + 22,5 μL Triton +

28,8 μL de PI + 112,5 μL de RNase. Para o processo de marcação as células foram incubadas por 30 min; para assim ser realizada a leitura no citômetro de fluxo.

5.2.6 Countess® II FL Automated Cell Counter

É mais um tipo de instrumentação utilizada para medida à viabilidade celular, especialmente quando é necessária uma leitura rápida e eficiente no processamento dos dados. O Countess® II FL Automated Cell Counter utilizado encontra-se nas instalações do LNBio e fica situado no interior da sala de cultura de célula.



Figura 37 – Contador automático e de viabilidade celular Countess®.

Através do imageamento por microscopia em campo claro foi utilizado o marcador trypan blue (TP) (GMBH, 2012) que serve para marcar tecido morto, conhecido mais popularmente como marcador de “células azuis”. Células vivas não ficam marcadas, visto que sua membrana celular é altamente seletiva impedindo assim a passagem do TP, o que não acontece na célula morta visto que sua membrana não mantém suas funcionalidades sendo, portanto, marcada pelo TP. Assim, o equipamento basicamente fornece a viabilidade celular baseando-se no funcionamento da membrana celular de células vivas e mortas, utilizando o TP como biomarcador.

Entretanto este tipo de equipamento não se limita somente ao marcador citado, o contador de células também suporta outros tipos de marcadores para outras finalidades tais como o DAPI para avaliação do núcleo celular.

Esse experimento de viabilidade foi realizado através de uma alíquota 10 μ L de células misturada com 0,4% de marcador blue em uma câmara descartável similar a câmara de Neubauer própria para o uso no equipamento. Através dessa câmara foi possível realizar uma rápida leitura e quantificação da viabilidade celular no equipamento.

5.2.7 Microscopia confocal

O microscópio utilizado para os experimentos foi Leica – SP8 que se encontra nas instalações do Laboratório Nacional de Biociencias (LNBio) e pode ser conferido na Figura 38. Essa técnica de microscopia tem como base a microscopia de fluorescência convencional, desta forma a microscopia confocal também se utiliza de marcadores capazes de absorver luz em determinados comprimentos de onda que, por conseguinte, fluorescem em comprimento de ondas maiores.

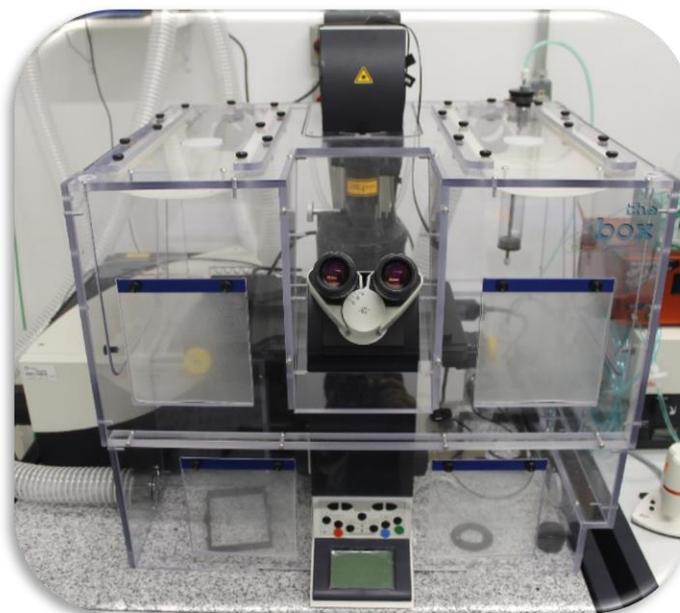


Figura 38 – Foto do microscópio confocal Leica – SP8 nas instalações do LNBio.

Na microscopia convencional de fluorescência o mecanismo de iluminação é homogêneo, isso faz com que toda a amostra fluoresça independente do plano amostral estar focalizada ou não. A vantagem da microscopia confocal provem da utilização de uma fonte de

luz focalizada que possibilita a determinação de um ponto focal no plano focal como pode ser visto na Figura 39.

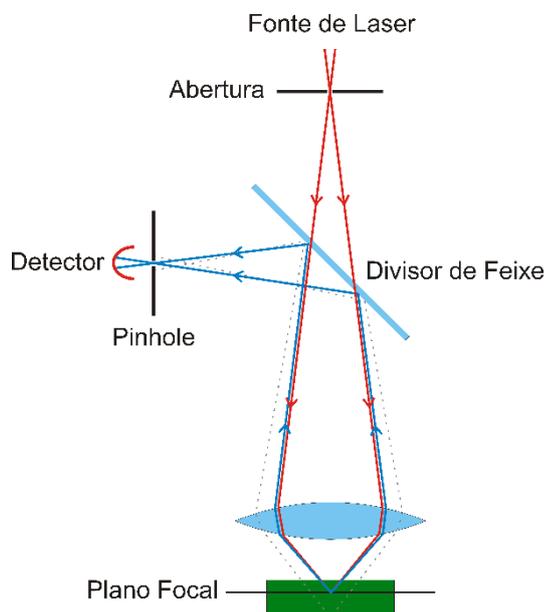


Figura 39 – Princípio de funcionamento da microscopia confocal adaptado, o laser representado pelo feixe vermelho é focalizado na amostra representado pelo retângulo verde e cria a fluorescência representada pelo feixe azul que é separado pelo divisor de feixe o qual redireciona apenas o feixe azul para o pinhole. Por fim, apenas o feixe da fluorescência do plano focal e chega ao detector. Fonte (https://en.wikipedia.org/wiki/Confocal_microscopy#/media/File:Confocalprinciple_in_English.svg acessado em 19/06/2017”, [S.d.]

Esse fenômeno por sua vez concentra a fluorescência no plano cartesiano xy minimizando o sinal de ruído, além disso é inserido um *pinhole*^{*1} antes do detector. A finalidade desse arranjo é permitir o posicionamento do plano focal no eixo cartesiano z , que permite bloquear a fluorescência dos outros planos focais viabilizando, portanto, a construção de imageamento através de planos por varredura.

O microscópio confocal permite também que imagens de transmissão ótica sejam realizadas através de um contraste interferométrico chamado de *Differential Interference Contrast* (DIC). Nesse modo de operação o objeto transparente não modificará o feixe de luz transmitido, entretanto se uma amostra tiver objetos com índices de refração diferentes resultará num caminho ótico distinto, modificando a fase da luz transmitida. Portanto, a imagem DIC se constitui de duas ondas coerentes, mas com polarizações ortogonais que ao interagir com a amostra formam duas imagens via transmissão. Essas duas imagens estão desalinhadas $0,2 \mu\text{m}$

*1 Pinhole é um termo em inglês que significa “buraco de alfinete”, pode ser traduzido como orifício bem pequeno.

entre si, porém são idênticas. A construção da imagem de interferência se dá pela sobreposição dessas imagens rotacionando a polarização de forma a coincidir as duas imagens. O contraste dessa imagem é proporcional ao caminho ótico do feixe de luz transmitido entre os dois pontos que equivale ao desalinhamento de $0,2 \mu\text{m}$ e isso fornece à imagem um contraste superior nas bordas e contornos da amostra.

Os dois marcadores fluorescentes utilizados neste trabalho estão correlacionados com o DNA e com a mitocôndria da célula. O marcador DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) é o marcador de DNA e tem como função marcar o núcleo celular e sua fluorescência é em torno do azul (461 nm). O outro marcador é o MITOTRACKER que se tem a finalidade de se ligar à membrana da mitocôndria sendo um marcador associado ao citoplasma celular e sua fluorescência é em torno do vermelho (599 nm).

Procedimento experimental: para marcar a mitocôndria da célula foi preparado uma solução de $92 \mu\text{L}$ de DMSO; nesta solução foi adicionado o Mitotracker de tal forma que a concentração molar final foi de 1 mM . Em seguida diluiu-se $6 \mu\text{L}$ de Mitotracker em 15 mL de meio Opti-men. Então, foi retirado o meio de cultivo das células que foram marcadas, estas células foram cultivadas sob uma lamela específica para que pudesse ser transportada para o microscópio posteriormente. No próximo passo adicionou-se $500 \mu\text{L}$ da solução de Opti-men preparada anteriormente e as foram incubadas células por 30 minutos em uma estufa de cultura, para evitar o contato com a luz a placa foi enrolada em um papel alumínio. Para marcar o núcleo das células com o DAPI foi preparado uma solução de $0,5 \mu\text{L}$ de DAPI para cada 5 mL de PBS, em seguida, as células foram lavadas cinco vezes com essa solução. Em todas essas operações trabalhou-se com as luzes desligadas, sempre protegendo a cultura das células da luminosidade. Assim, as células foram fixadas com $3,7\%$ de formaldeído por 15 min e as lamelas foram lavadas duas vezes com PBS. Para finalizar, as lamelas foram fixadas sob uma lâmina de vidro através de uma gota de óleo destinado a este procedimento, tomando o cuidado de manter as células viradas para baixo, então selou-se a lamela com um esmalte específico para este propósito. Desta forma, as lâminas de vidro foram inseridas no microscópio confocal, onde se realizou a leitura das imagens.

6 Resultados

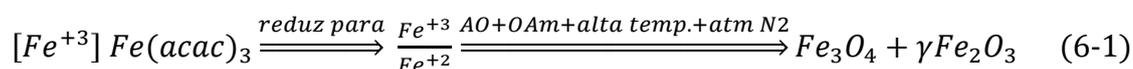
Este capítulo é voltado a discussão dos resultados iniciando-se pelas sínteses e recobrimentos das NPs, seguido pelas caracterizações das amostras relacionando-as através de suas propriedades, buscando as melhores alternativas e condições de rotas para a bioaplicação hipertérmica dos nanomateriais recobertos. Muitos dos resultados deste capítulo foram analisados através do teste t-student ou teste T cujos detalhes constam no anexo desta tese.

6.1 Síntese das nanopartículas de Fe₃O₄

A maior dificuldade em sintetizar nanopartículas é o controle do tamanho em escala nanométrica. Assim a busca deve ser por uma síntese simples e reprodutível, cuja finalidade é garantir a uniformidade em bioaplicações. As nanopartículas magnéticas desejadas devem atender quesitos como: tamanho que deve ser menor que 20 nm de diâmetro, precisam ser estáveis em suspensões aquosas e biocompatibilidade. Por conseguinte, as NPs necessitam de uma boa resposta magnética viabilizando a aplicação em baixas concentrações. Os recobrimentos têm a finalidade de proteger as NPs da degradação e, em alguns casos, dotando as NPs de biocompatibilidade.

Baseando-se nestas condições foi realizado um estudo prévio de três métodos de sínteses: coprecipitação, hidrotérmico e decomposição térmica. A decomposição térmica apresentou resultados de grande interesse, especialmente relacionado a baixa polidispersão e controle de tamanho e o trabalho Yanglong Hou (HOU; XU; SUN, 2007) foi a inspiração da síntese desenvolvida neste trabalho. Este processo, produz nanopartículas esféricas de magnetita/maghemita monodispersas e monocristalinas que apresentam um tamanho de 15 nm de diâmetro, onde o procedimento padrão da síntese decompõe o acetilacetonato de ferro (III) (Fe(acac)₃) em solvente orgânico em alta temperatura na presença de oleilamina (OAm) e ácido oleico (AO).

Um comentário relevante é que a reação de redução do Fe(acac)₃ não é perfeita, desta forma, uma mistura de magnetita e maghemita é produzida. Isso pode ser minimizado utilizando uma atmosfera controlada de N₂ produzindo mais magnetita e deixando apenas resíduos de maghemita.



Nenhum reagente tem papel específico como agente redutor, ou seja, não favorece o crescimento de NPs em nenhuma direção. No entanto, a razão entre eles pode alterar a solubilidade das espécies formadas levando às morfologias e tamanhos distintos de acordo com os patamares de temperatura da reação. A síntese da amostra foi realizada em algumas etapas que se encontram descritas na seção 4.2, onde os reagentes são submetidos a diferentes patamares de temperatura, e/ou concentração de reagentes por diferentes patamares de tempo. A Figura 40 mostra o resultado obtido após o resfriamento da síntese via decomposição térmica.



Figura 40 – Produto da reação por decomposição térmica do $\text{Fe}(\text{acac})_3$ em atmosfera controlada de N_2 resultando em nanopartículas de Fe_3O_4 .

O produto dessa síntese encontra-se em um meio hidrofóbico que foi lavado em etanol para a remoção do excesso de solvente. Em seguida, a amostra foi armazenada em um frasco para posteriores caracterizações e recobrimento das NPs.

6.2 Recobrimento das nanopartículas de oxido de ferro

Logo após a síntese descrita acima, as NPs foram lavadas 8 vezes com água destilada. A finalidade dos recobrimentos é proteger as NPs e torná-las solúveis em água para posteriores testes em meio celular. Para tal feito, foram testados seis tipos de materiais que estão dispostos na Figura 41. As estratégias de recobrimento das NPs estão detalhadas na seção 4.3. Para o recobrimento foi escolhido seis tipos de amostras sendo dois surfactantes: o SDS (MORSY, 2014) e o CTAB (ALKILANY *et al.*, 2009; ZHANG, YINAN *et al.*, 2012), dois polímeros: PEG (MARKINK, 2012; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2012; ZHANG, J *et al.*, 2008) e a CH

(SHI *et al.*, 2012; UNSOY *et al.*, 2012) assim como dois fosfolipídios: DPPC (ROSS SMITH; TANFORD, 1972) e DSPE (XIE; SUN, 2011).

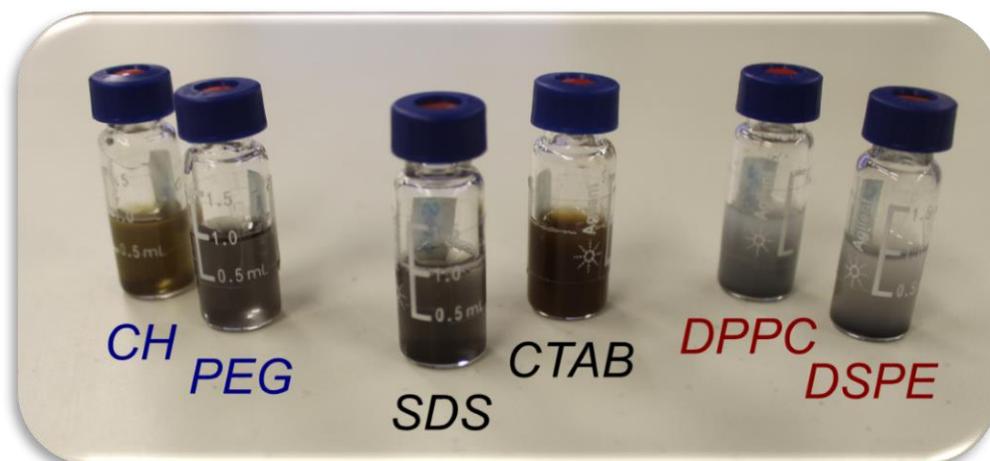


Figura 41 – Soluções de nanopartículas de magnetita suspensas em seus respectivos recobrimentos antes da agitação e sonicação da solução. Da esquerda para direita nomeamos as NPs de acordo com seus respectivos recobrimentos: NP@CH, NP@PEG, NP@SDS, NP@CTAB, NP@DPPC e NP@DSPE.

As amostras foram denominadas de acordo com seus respectivos recobrimentos: NP# (NPs sem recobrimento), NP@CH (NPs recobertas com CH), NP@PEG (NPs recobertas com PEG), NP@SDS (NPs recobertas com SDS), NP@CTAB (NPs recobertas com CTAB), NP@DPPC (NPs recobertas com DPPC) e NP@DSPE (NPs recobertas com DSPE). A importância dessa variedade está associada à finalidade do trabalho que é avaliar como diferentes tipos de recobrimento interagem com as NPs de magnetita, para assim, analisar como esses coloides se comportam em aplicações hipertérmicas *in vitro*.

6.3 Morfologia

Realizou-se uma análise prévia das nanopartículas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (seção 5.1.5). No entanto, o reduzido tamanho das nanopartículas inviabilizou a aquisição das imagens sendo possível apenas a visualização dos aglomerados. Para a micrografia MEV foi submetida apenas a amostra composta de NPs sem recobrimento (NP#) e o resultado pode ser visualizado na Figura 42. O resultado desta imagem não fornece informações precisas a respeito das NPs devido a resolução do instrumento e por isso não foi realizado o imageamento de todas as amostras. Entretanto, é possível observar o tamanho dos aglomerados que estão entre 50 - 150 nm e que provavelmente foram formados durante o processo de secagem da amostra.

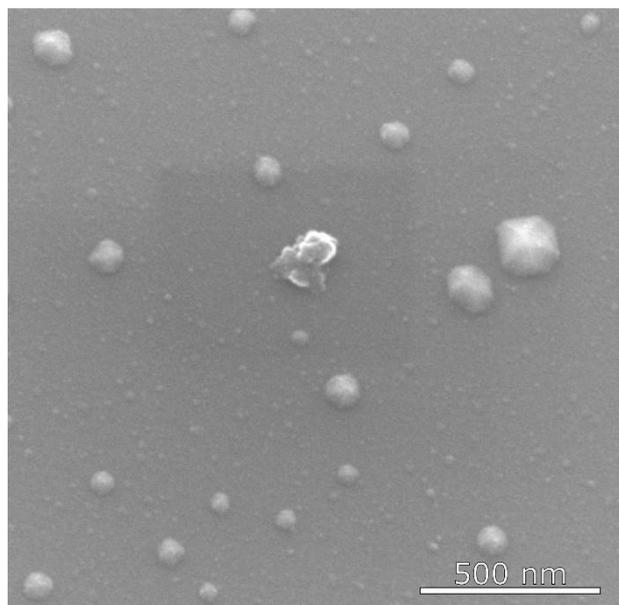


Figura 42 – Nanopartículas de Fe₃O₄ sem recobrimento submetidas a microscopia eletrônica de varredura MEV.

As técnicas microscopia de transmissão (TEM) e de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) descritas nas seções 5.1.1 e 5.1.4 foram utilizadas nas caracterizações morfológicas mais apuradas de acordo com o tamanho do nanomaterial. As medidas de TEM e SAXS foram também realizadas com as NPs sem recobrimento (NP#). A Figura 43A mostra a imagem de TEM de um conjunto de nanopartículas onde pode-se constatar que o nanomaterial apresenta um formato esférico com um diâmetro das nanopartículas em torno de 15 nm. A Figura 43B é uma imagem de alta resolução da amostra e evidencia-se a estrutura dos espinélios de oxido de ferro similar à estrutura que consta no levantamento teórico da seção 2.3 que trata da discussão e características dos espinélios dos óxidos de ferro.

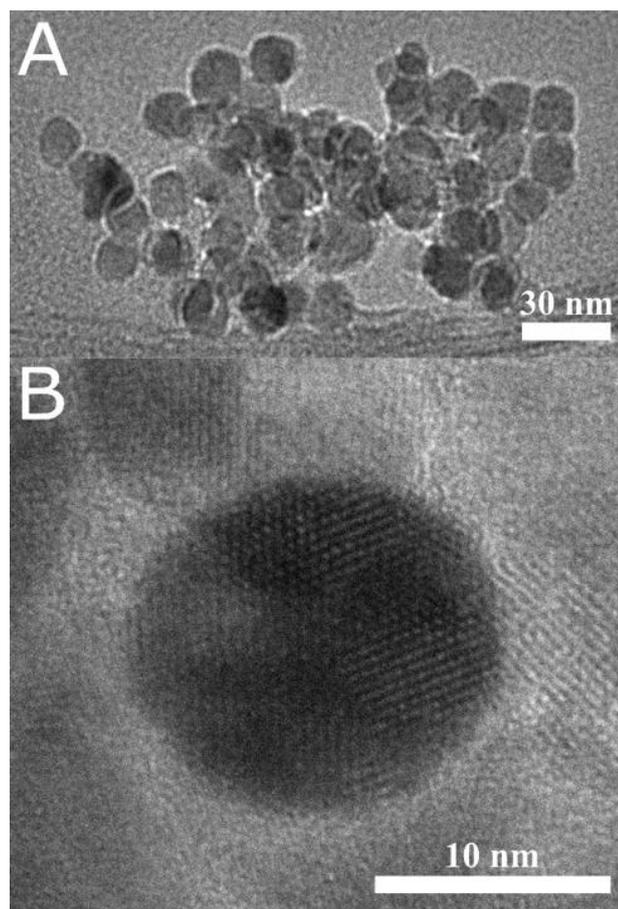


Figura 43 – (A) Imageamento convencional de TEM das NPs sem recobrimento (NP#). (B) Imageamento de alta resolução TEM das NP# detalhando a estrutura do material.

Para um maior detalhamento as imagens de microscopia TEM de todas as amostras encontram-se no Anexo desta tese.

A Figura 44 mostra os dados de SAXS para a amostra sem recobrimento (NP#). Através desse resultado é possível determinar o tamanho das NPs e através de um modelo pode-se delimitar a dispersão de tamanho da amostra. Um fato importante é que o SAXS fornece uma informação global da amostra se comparada à microscopia de transmissão que traz apenas uma informação local.

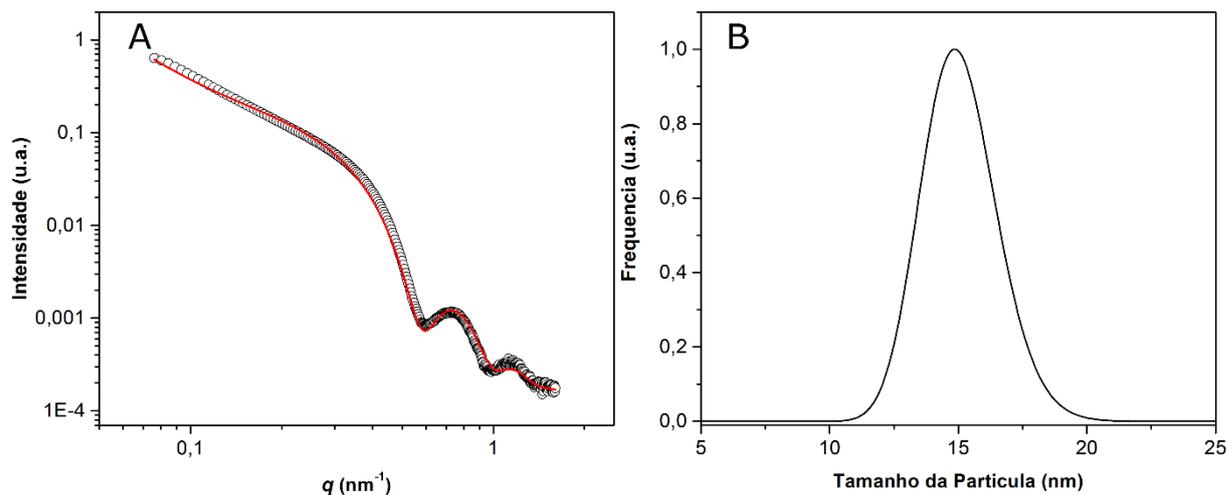


Figura 44 – (A) Espalhamento SAXS das NPs sem recobrimento seguido pelo ajuste (linha vermelha). B) Distribuição do tamanho do diâmetro das NPs esféricas sem recobrimento através do ajuste da curva de SAXS.

De acordo com a morfologia encontrada na microscopia TEM combinada com o resultado da medida SAXS permite o ajuste representado na imagem A da Figura 44. O ajuste do espalhamento permite determinar a distribuição de tamanho das partículas envolvidas, o qual está representado na imagem B da Figura 44. Através deste resultado constatou-se que NPs esféricas apresentaram um diâmetro de $14,9 \pm 1,5 \text{ nm}$. Este o valor está de acordo com o encontrado na literatura (HOU; XU; SUN, 2007) de 14 nm. Analisando tanto o TEM quanto o SAXS confirmou-se que as NPs apresentam um caráter homogêneo em termos de morfologia esférica sem grandes polidispersões de tamanho, tanto em escala local como em escala global da amostra em questão.

6.4 Caracterização física e química do material

6.4.1 Magnetometria

A magnetometria via S.Q.U.I.D. é uma ferramenta importante para o estudo do material superparamagnético. O objetivo é realizar uma caracterização do comportamento magnético da amostra de acordo com a variação da temperatura e do campo magnético aplicado. Esse estudo, deve ser realizado através das curvas de Magnetização contra Campo e desta forma analisa-se os parâmetros de campo coercitivo (H_c), magnetização remanescente (M_r) e magnetização de saturação (M_s). Este tipo de estudo permite demonstrar como as características magnéticas se comportam. De maneira geral, um material superparamagnético deve apresentar ausência de campo coercitivo e magnetização remanescente praticamente nula.

Para a análise da Magnetização contra Temperatura utiliza-se da derivada da curva *zero field cooling* (ZFC) menos a derivada da curva *field cooling* (FC). Através desses parâmetros encontra-se os máximos da derivada que estão intimamente correlacionados com a temperatura média de bloqueio de cada população amostral. Como foi apresentado na seção 2.4 o tamanho das populações de NPs impactam diretamente na temperatura de bloqueio, portanto, conhecendo ao menos um dos pontos da temperatura de bloqueio de acordo com o seu respectivo tamanho amostral pode-se determinar o tamanho das outras populações através de uma associação direta.

Os resultados a seguir serão apresentados em conjuntos. Primeiramente será abordado o conjunto de $M \times H$ que pode ser visto na Figura 45. Entretanto, a escala na Figura 45 não permite uma análise apurada dos parâmetros magnéticos, portanto, para se obter um maior detalhamento dos parâmetros magnéticos, os gráficos de $M \times H$ foram ampliados em torno da região de baixos campos e baixas magnetizações. A análise apurada em torno desta região específica encontra-se na Figura 46. Este procedimento facilita a extração dos parâmetros magnéticos permitindo uma análise mais apurada do comportamento superparamagnético das amostras.

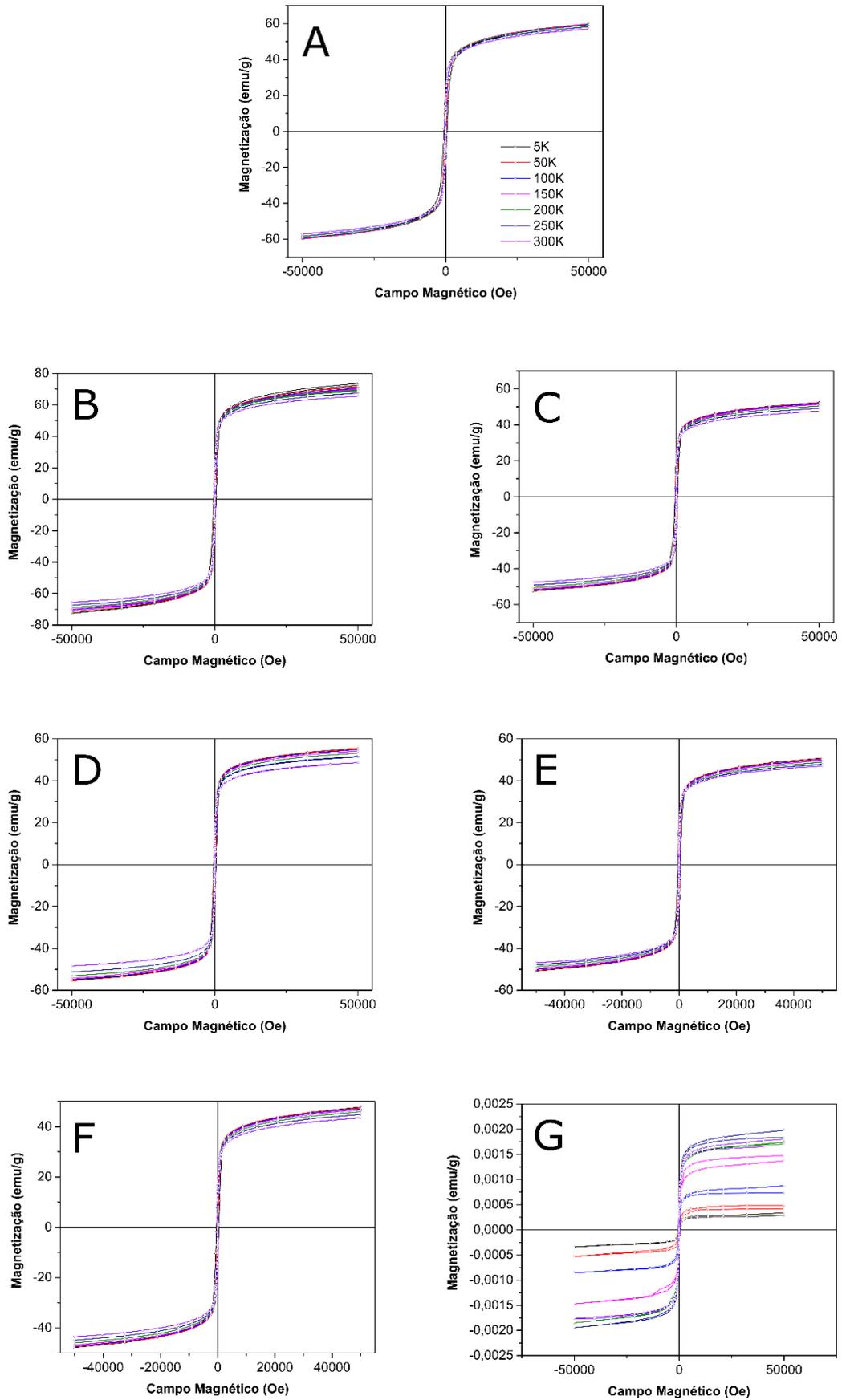


Figura 45 – Magnetização contra Campo Magnético das amostras: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG

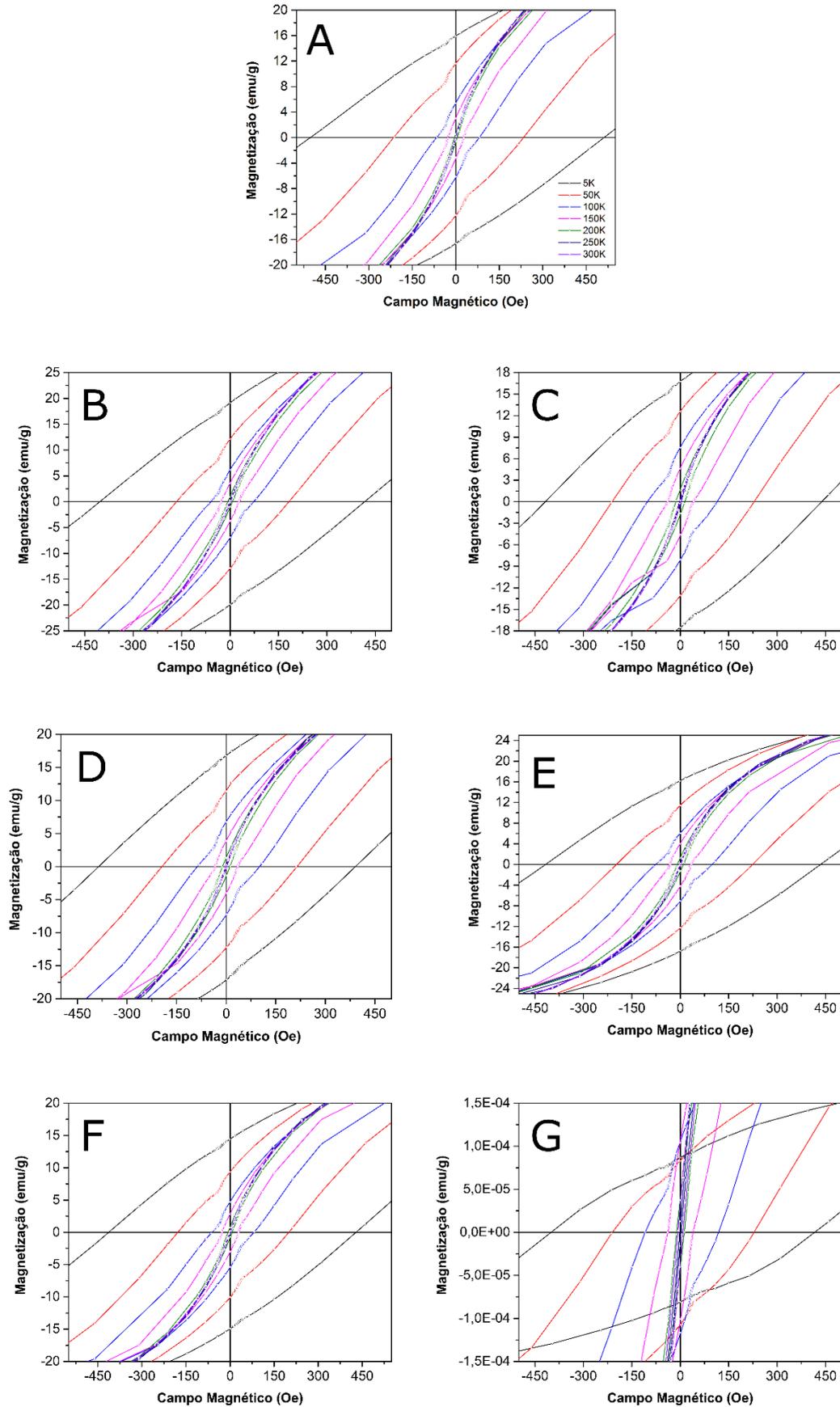


Figura 46 – Magnetização contra Campo Magnético ampliada em a baixos campos: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG

Através dos resultados obtidos da MxH na Figura 45 pode-se constatar que a última medida referente à amostra recoberta com NP@PEG (G) não teve uma boa medida. O motivo está relacionado ao processo de secagem da amostra que consta na seção 4.3.1. Após a secagem, o PEG encontra-se no estado líquido em temperatura ambiente, pois seus compostos orgânicos começam a evaporar somente acima de 300 °C. Portanto, tornou-se inviável a secagem completa desta amostra a 80 °C. A secagem desta amostra apresenta uma textura gelatinosa e isso faz com que as NPs fiquem dispersas pelo polímero reduzindo drasticamente o sinal de magnetização da amostra. Conseqüentemente, isso fez com que concentração de material magnético por volume ficasse reduzida se comparada as demais amostras. Utilizando essa configuração torna-se possível a quantificação do campo coercitivo (H_c), magnetização remanescente (M_r) e magnetização de saturação (M_s); os quais foram discutidos na seção 0. A extração desses parâmetros consiste em registrar os valores positivos e negativos de cada grandeza. Em seguida, deve-se calcular o módulo de cada parâmetro e prosseguir calculando a média entre cada par (positivo e negativo) de cada respectivo parâmetro. Este processo tem por finalidade minimizar os erros experimentais, já que os valores positivos divergem levemente dos valores negativos devido a limitações experimentais. Um ponto importante é que a massa das amostras é constituída pelo recobrimento mais as NPs de magnetita as quais foram sintetizadas em ácido oleico.

Os valores extraídos do campo coercitivo (H_c) para cada respectiva temperatura estão apresentados na Figura 47.

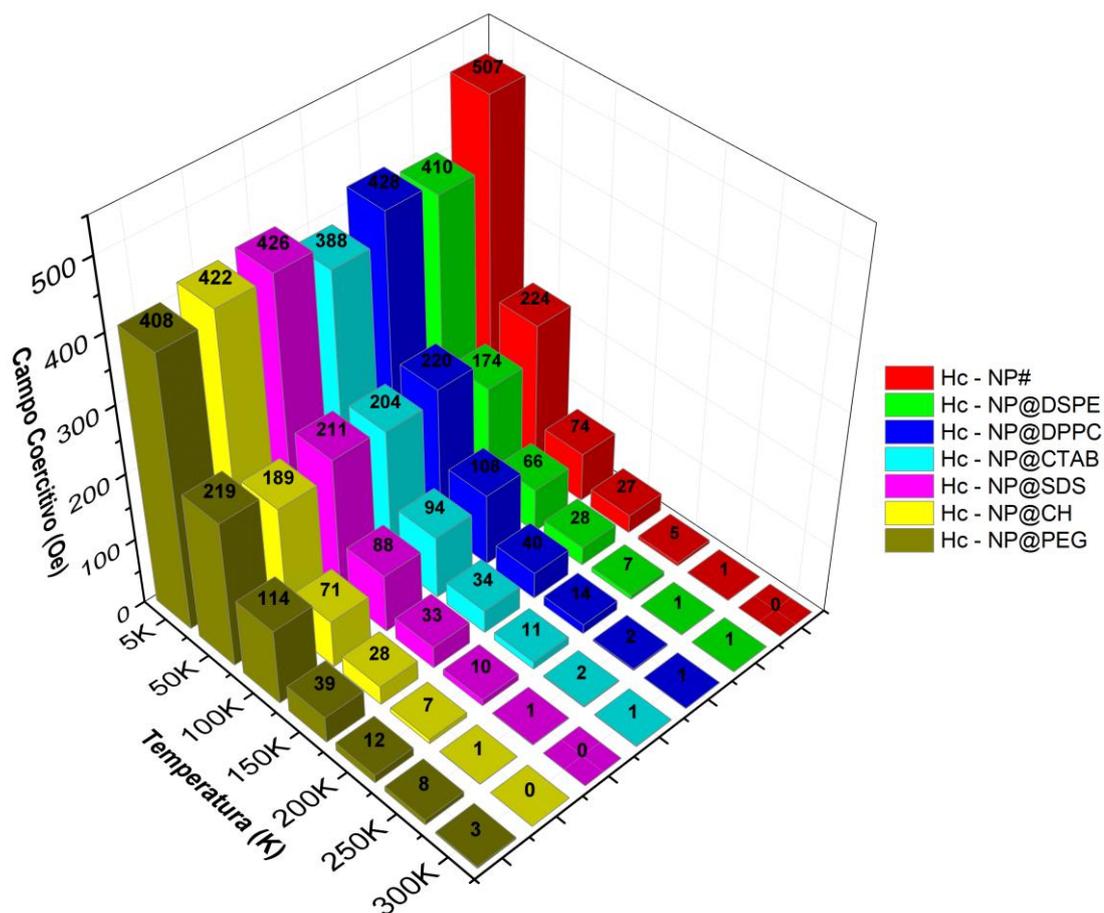


Figura 47 – Resultado dos valores dos Campos Coercitivos extraídos da Figura 46 para todas as amostras com recobrimento e sem recobrimento de acordo com cada temperatura correspondente.

Em termos gerais, o gráfico apresenta uma tendência comportamental homogênea de crescimento entre todas as amostras conforme o parâmetro de temperatura é variado de 300K para 5K. Assim, o campo coercitivo aumenta com a diminuição da temperatura. Pode-se verificar que o campo coercitivo (H_c) está bem próximo de zero nas regiões entre 250K e 300K para cada conjunto de amostra. Esses valores indicam que o estado superparamagnético se mantém nessas condições de temperatura. No entanto, a partir de 200 K observa-se o início do crescimento do campo coercitivo e este valor está associado à temperatura de irreversibilidade T_{irr} que representa o início do bloqueio do estado superparamagnético de cada amostra.

Os valores obtidos de magnetização remanescente (M_r) estão descritos na imagem abaixo (Figura 48).

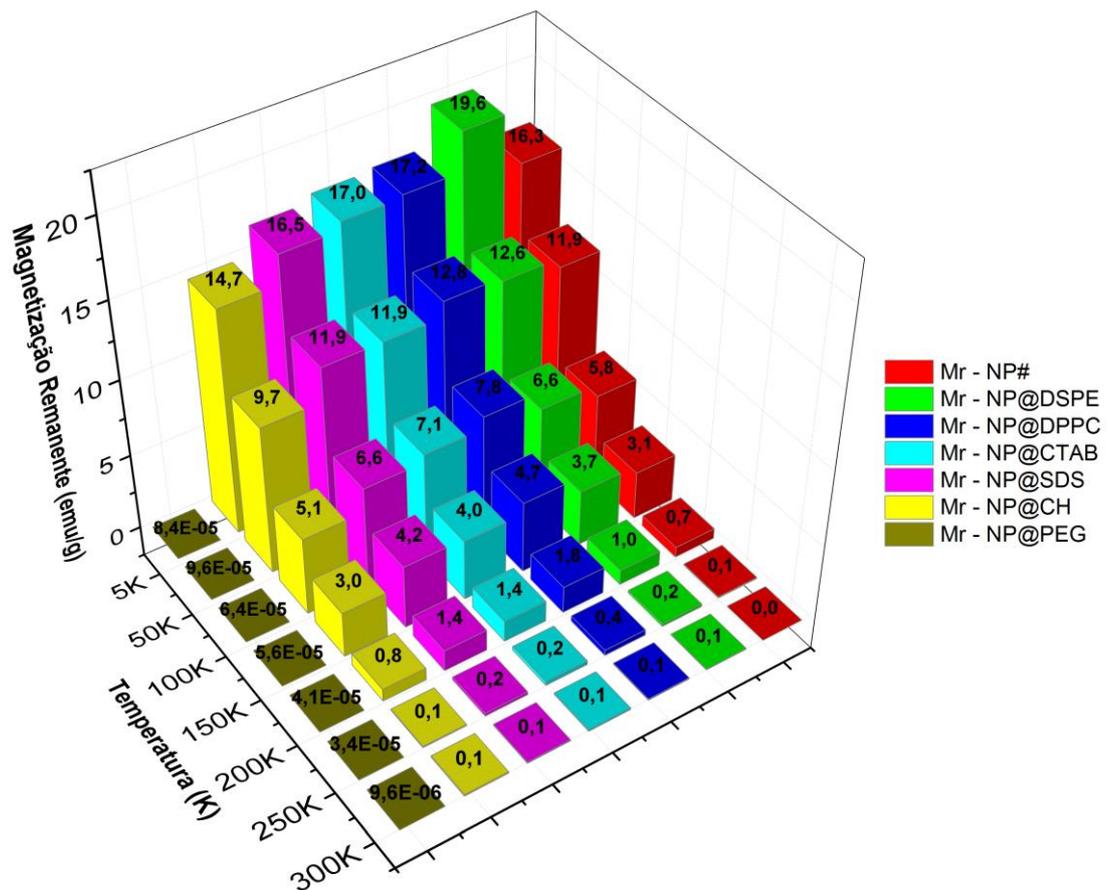


Figura 48 – Resultado dos valores das Magnetizações Remanescentes extraídas da Figura 46 para todas as amostras com recobrimento e sem recobrimento de acordo com cada temperatura correspondente.

Ao analisar o gráfico pode-se observar uma diferença acentuada na magnetização remanescente (Mr) da amostra recoberta com PEG cujos valores de Mr são aproximadamente zero. Similarmente a tendência da medida do campo coercitivo, a magnetização remanescente apresenta a tendência de aumentar a sua intensidade com o decréscimo de temperatura. Os valores de (Mr) estão bem próximo de zero para as temperaturas entre 200 e 300K, indicando que o estado superparamagnético se mantém nessas condições. Aos 200K observa-se o início do aumento da magnetização remanescente, este valor está associado com a temperatura de irreversibilidade T_{irr} . Ao comparar as informações obtidas de campo coercitivo (H_c) e magnetização remanescente (Mr), pode-se dizer que a temperatura de bloqueio está próxima a 250K de temperatura.

Por fim, é possível obter a magnetização de saturação (Ms) a partir dos resultados e os resultados de Ms estão exibidos na Figura 49.

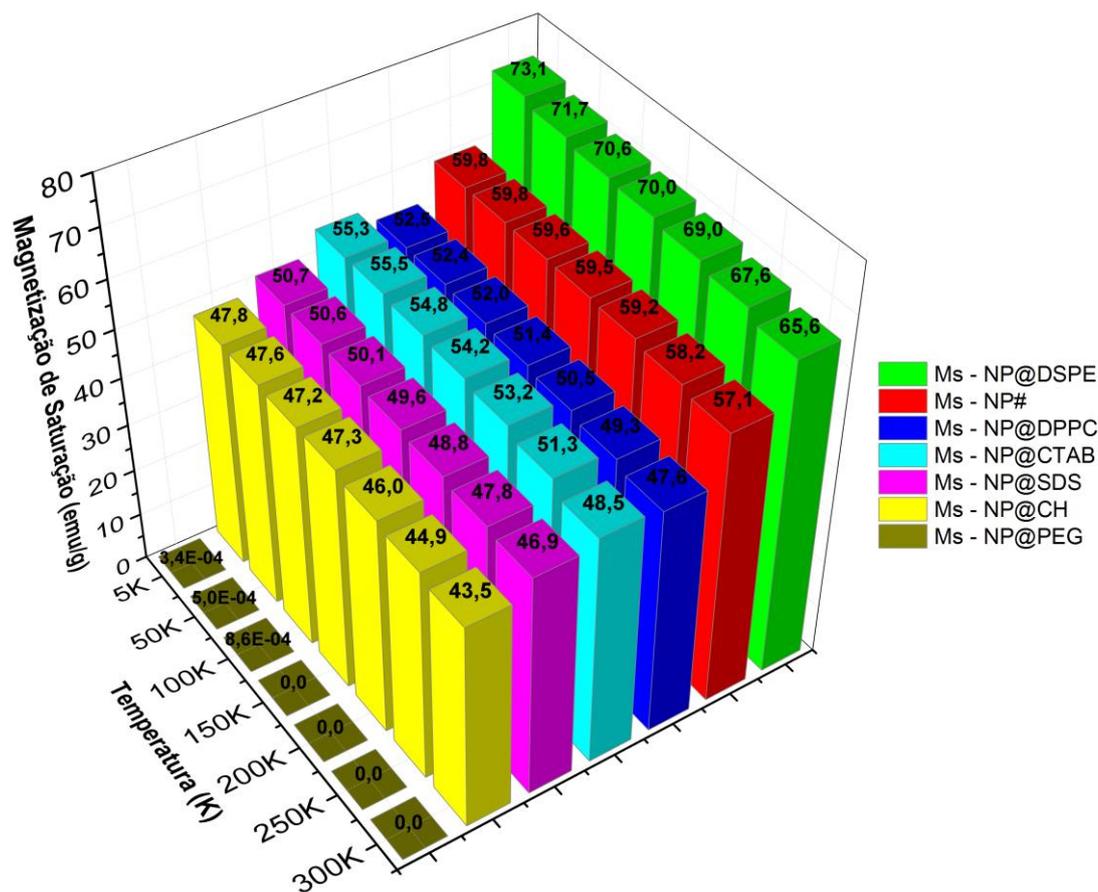


Figura 49 – Resultado dos valores das Magnetizações de Saturações da Figura 45 para todas as amostras*² com e sem recobrimento de acordo com cada temperatura correspondente.

A medida realizada na amostra recoberta com o PEG ficou comprometida por limitações amostrais devido ao processo secagem da amostra. Na Figura 49 observa-se que a magnetização de saturação (M_s) aumenta discretamente seu valor com o decréscimo da temperatura. O valor esperado para a magnetização na magnetita segundo a literatura (GÓRKA-KOSTRUBIEC; SZCZEPANIAK-WNUK, 2017) era para ser em torno 90-92 emu/g. O valor encontrado é mais baixo devido a oleilamina e ácido oleico que ficaram sobre a superfície das NPs após a síntese.

Pode-se ainda observar uma singularidade na NP@DSPE, que indica uma magnetização de saturação mais elevada que a própria amostra sem recobrimento NP#. Geralmente as amostras com NPs magnéticas recobertas tendem a apresentar uma redução na magnetização de saturação quando o respectivo recobrimento não apresenta propriedades magnéticas. Este resultado será justificado através da análise da termogravimetria. Além disso, recomenda-se em

² Na Figura 49 as posições das colunas “NP#” e “NP@DSPE” foram trocadas de posição se comparado as outras imagens da Figura 47 e da Figura 48, isso ocorreu apenas para se obter uma imagem que permita a leitura completa dos resultados extraídos.

um trabalho futuro utilizar diferentes concentrações de DSPE para verificação do impacto do fosfolípido sobre as propriedades magnéticas do material. Esta avaliação é importante, visto que uma maior magnetização de saturação implicará em uma maior taxa de aquecimento para o material, o que, em teoria, favoreceria o tratamento por hipertermia.

Os resultados das medidas realizadas de MxT para as amostras sem recobrimento e com recobrimento estão dispostos na Figura 50. Para estas medidas foram estabelecidas duas condições de medida: (*zero field cooling – ZFC*) – a qual foi realizada a partir de baixa temperatura sendo resfriada sem campo e (*field cooling – FC*) – a qual foi aplicado o campo durante o resfriamento. O esquema de organização dos resultados das medidas é o mesmo apresentado até agora. Para a análise dos resultados foi realizado a subtração das curvas ZFC – FC; o resultado dessa análise encontra-se na Figura 51. Através da subtração das curvas ZFC – FC calcula-se a derivada destas curvas cujos resultados estão dispostos na Figura 52. A finalidade deste processo é encontrar a temperatura de bloqueio média T_B através do máximo da derivada, tornando possível correlacionar os tamanhos dos aglomerados dos nanomateriais envolvidos de acordo com temperatura de bloqueio (PEREZ, N *et al.*, 2008; WINKLHOEER; FABIAN; HEIDER, 1997). Essa análise possibilita a correlação direta do volume do material analisado com a temperatura de bloqueio média do material em questão. As medidas de MxT apresentaram resultados precisos a respeito da temperatura de irreversibilidade T_{irr} . Além disso, através das curvas de MxT, tornou-se possível a extração da temperatura de bloqueio média T_B de forma quantitativa.

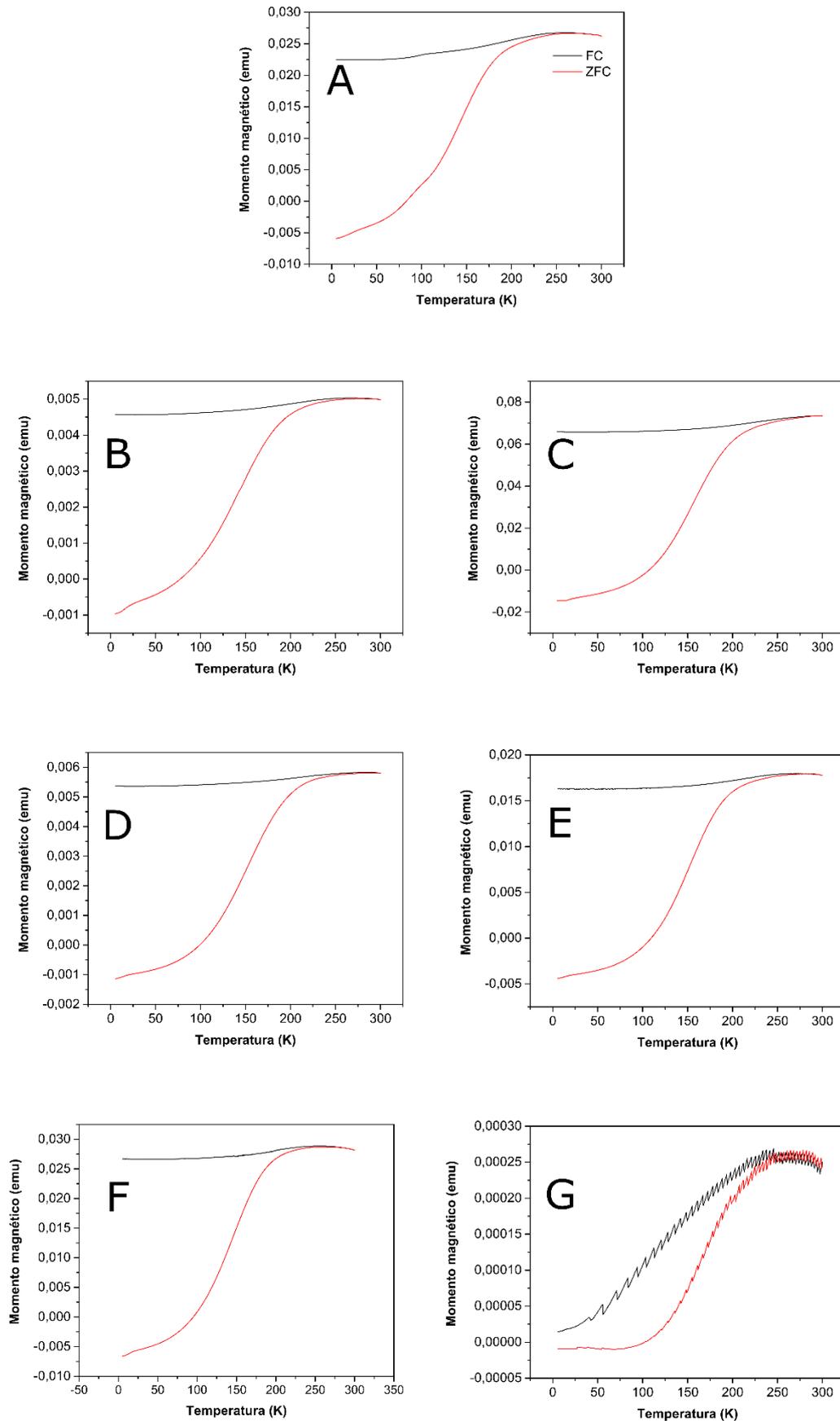


Figura 50 – Curvas de ZFC e FC das amostras: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG

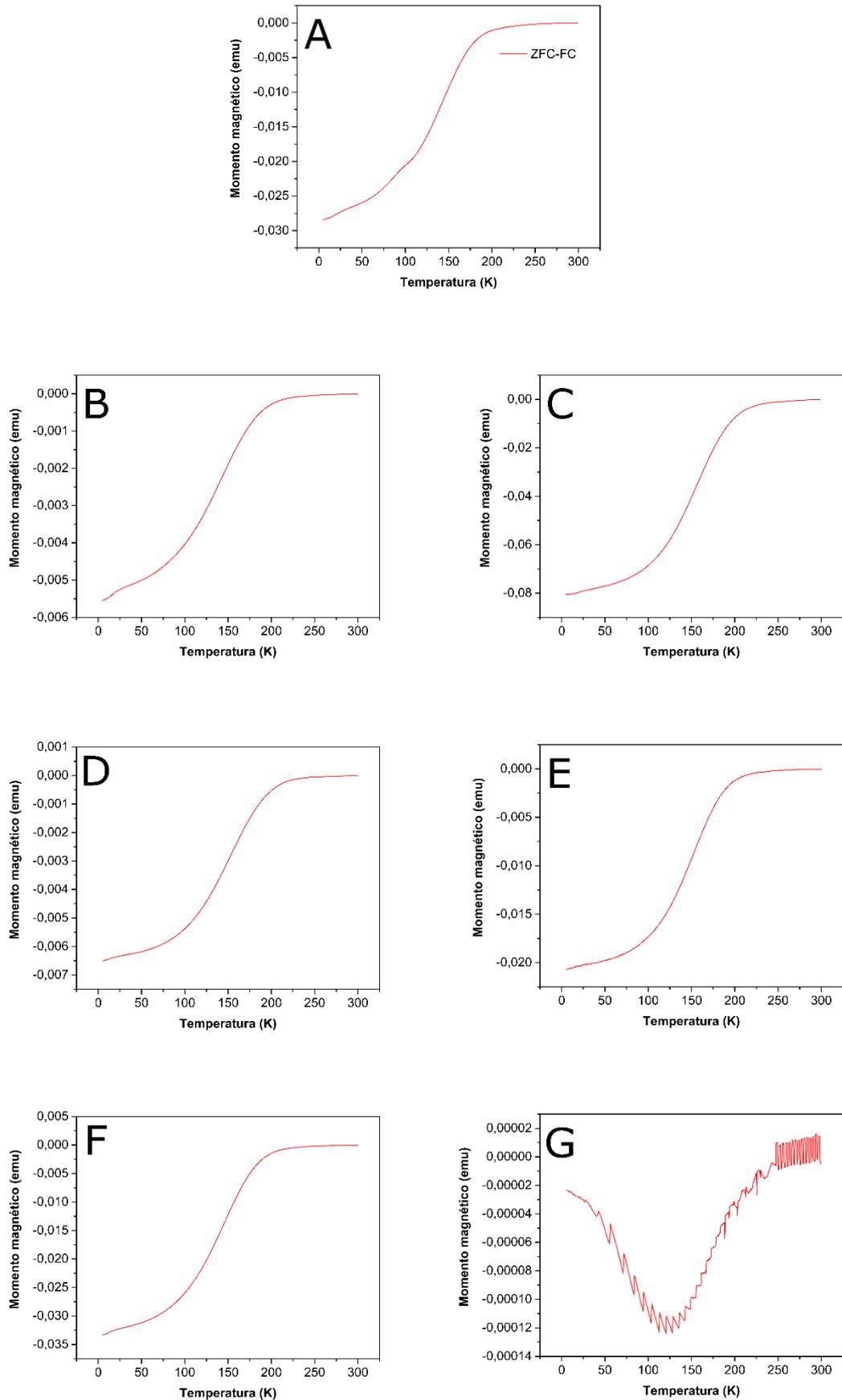


Figura 51 – Resultado da subtração das curvas ZFC – FC para as amostras: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG

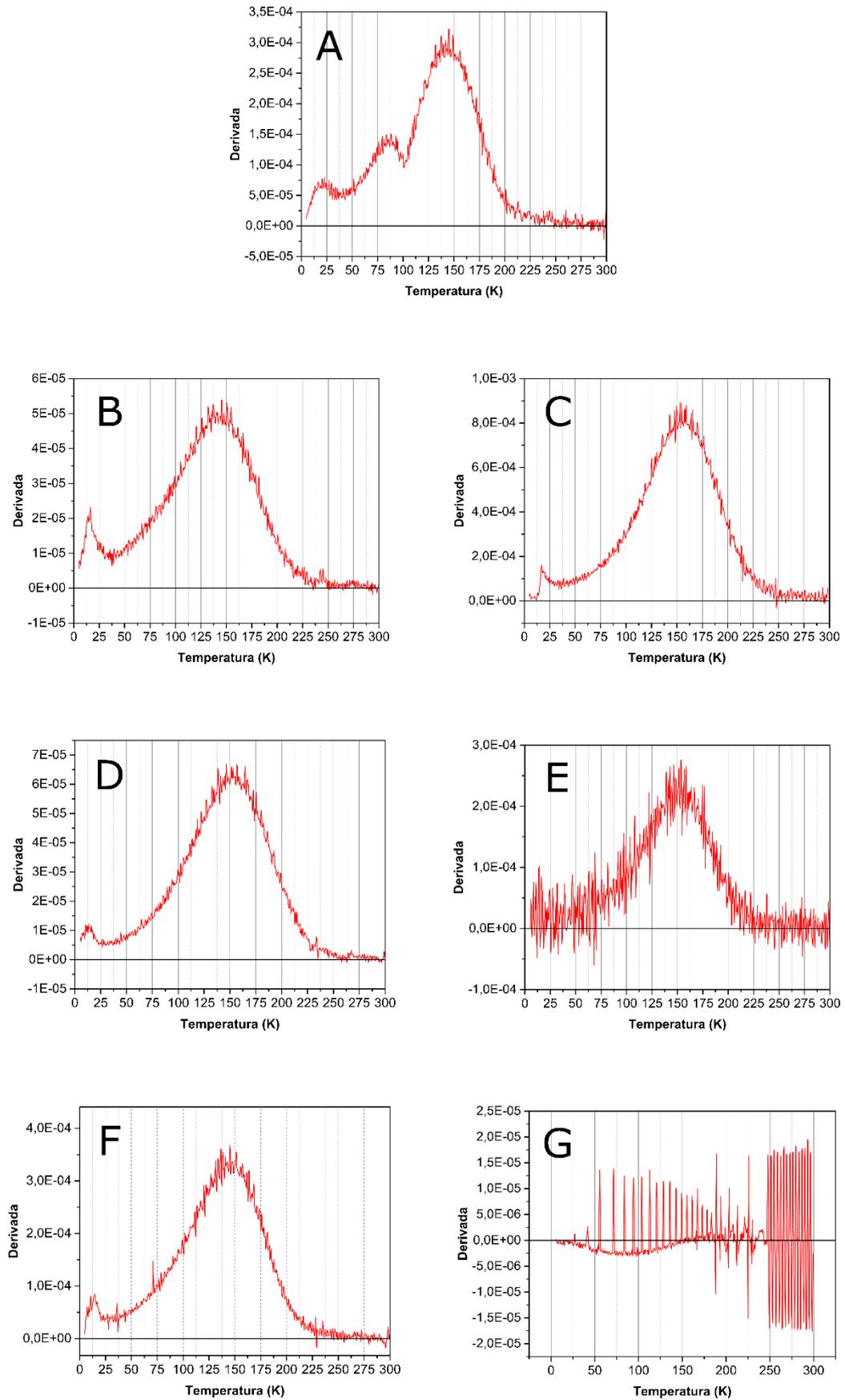


Figura 52 – Derivadas das curvas ZFC – FC para as amostras: (A) NP#; (B) NP@DSPE; (C) NP@DPPC; (D) NP@CTAB; (E) NP@SDS; (F) NP@CH; (G) NP@PEG

Acompanhando os resultados das Figura 50, Figura 51 e Figura 52 pode-se observar que a amostra NP@PEG (representada pela letra G), apresentou problemas de baixa intensidade de sinal. Essa limitação já era esperada devido à secagem a amostra. Neste caso, através da medida MxT tornou-se inviável obter alguma informação para a NP@PEG devido ao seu sinal muito baixo, o que implicou em erros altíssimos. O procedimento para a análise da temperatura de bloqueio consiste em extrair os dados obtidos no S.Q.U.I.D. que constam na Figura 50. Para isto, foi realizada a subtração das curvas ZFC-FC^{55,56,73,143} que podem ser vistas na Figura 51, e por fim calcula-se a derivada para checar a taxa de variação mais elevada (Figura 52), esses pontos elevados indicam exatamente os valores das temperaturas de bloqueio médias. Para finalizar a análise, associa-se os valores dessas temperaturas de bloqueio com os tamanhos das nanopartículas. O primeiro máximo em torno de 18K é referente às nanopartículas de 15 nm de diâmetro. Utiliza-se deste fator para se estabelecer uma referência e, ao fazer isto, é possível estimar o tamanho das outras populações encontradas nas medidas, visto que temperatura de bloqueio média é diretamente proporcional ao volume das NPs. A método de extração dessa informação foi baseado no trabalho realizado por Baumgartner (BAUMGARTNER *et al.*, 2013). O único conjunto de amostra que apresenta mais de uma população é a amostra sem recobrimento NP# que pode ser visto na imagem A da Figura 52. Ao extrair essas informações, encontra-se o valor do tamanho do diâmetro dos aglomerados de acordo com a temperatura de bloqueio média e esses resultados são mostrados na Figura 53.

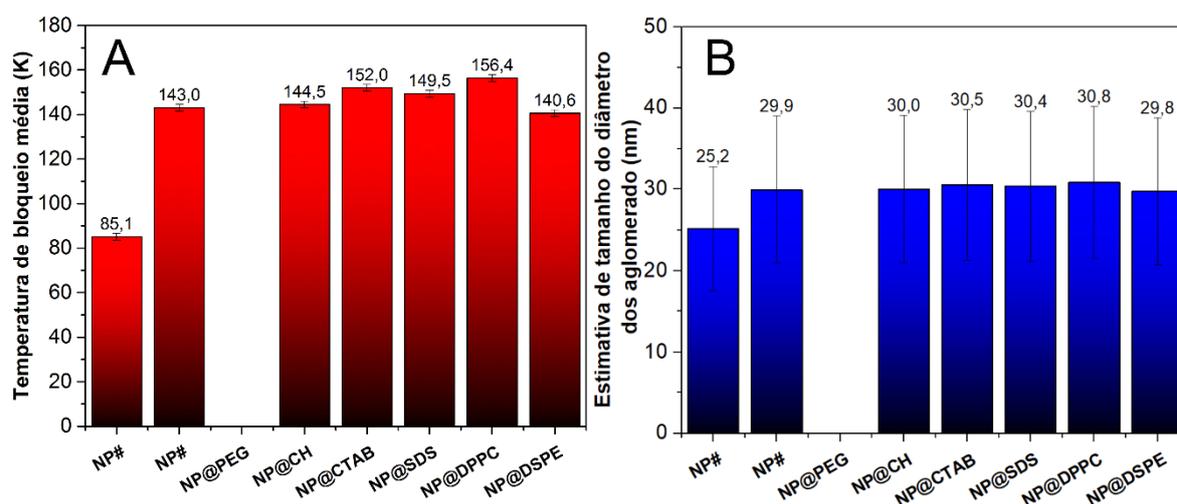


Figura 53 –Análise dos resultados obtidos através da Figura 52. (A) Temperatura de bloqueio média (coluna vermelha). (B) Estimativa de tamanho do diâmetro dos aglomerados (coluna azul) para as amostras: NP#; NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS, NP@DPPC e NP@DSPE. Para a amostra NP# foram obtidas duas populações, já para a amostra NP@PEG não foi possível determinar os parâmetros devido ao baixo sinal de magnetização da amostra.

Auxiliado pelo valor do tamanho obtido na análise da morfologia e através dos resultados obtidos na imagem A da Figura 53 foi possível calcular os resultados obtidos na imagem B da Figura 53. Estes valores fornecem dados a respeito da estimativa dos tamanhos das populações de aglomerados, os quais são encontrados nas amostras deste trabalho. Em seguida, deve-se aplicar um teste estatístico para verificar se há diferença entre os valores médios de acordo com os respectivos desvios padrões associados à cada resultado. Ao aplicar o teste T entre cada coluna associada ao tamanho (azul), observa-se que as diferenças entre os valores das amostras não apresentam uma diferença estatística significativa e que todos os recobrimentos apresentam o mesmo valor estatístico de tamanho de aglomerado, exceto população da amostra NP@PEG, onde não foi possível quantificar o tamanho do aglomerado. Analisando os dados de uma maneira geral, pode-se inferir através da magnetometria que os aglomerados apresentam em média $29,5 \pm 8,9 \text{ nm}$ de tamanho. Portanto, análise conjunta da magnetometria, do SAXS e da micrografia garantiu a validade dos cálculos do tamanho através das medidas de magnetometria.

6.4.2 Potencial ZETA

O resultado do potencial zeta apresentado na Figura 54 diz respeito à estabilidade do coloide de acordo com a dupla camada de carga em solução aquosa de cada respectiva amostra. O módulo desse potencial zeta está associado ao grau de repulsão que as cargas oferecem às partículas nas dispersões coloidais. Para uma solução estável essa repulsão tem que ser forte o suficiente para evitar a sedimentação do material devido a ação da gravidade. Em geral, um alto valor de potencial zeta confere a estabilidade ao ambiente coloidal evitando possíveis agregações e conseqüentemente sedimentações.

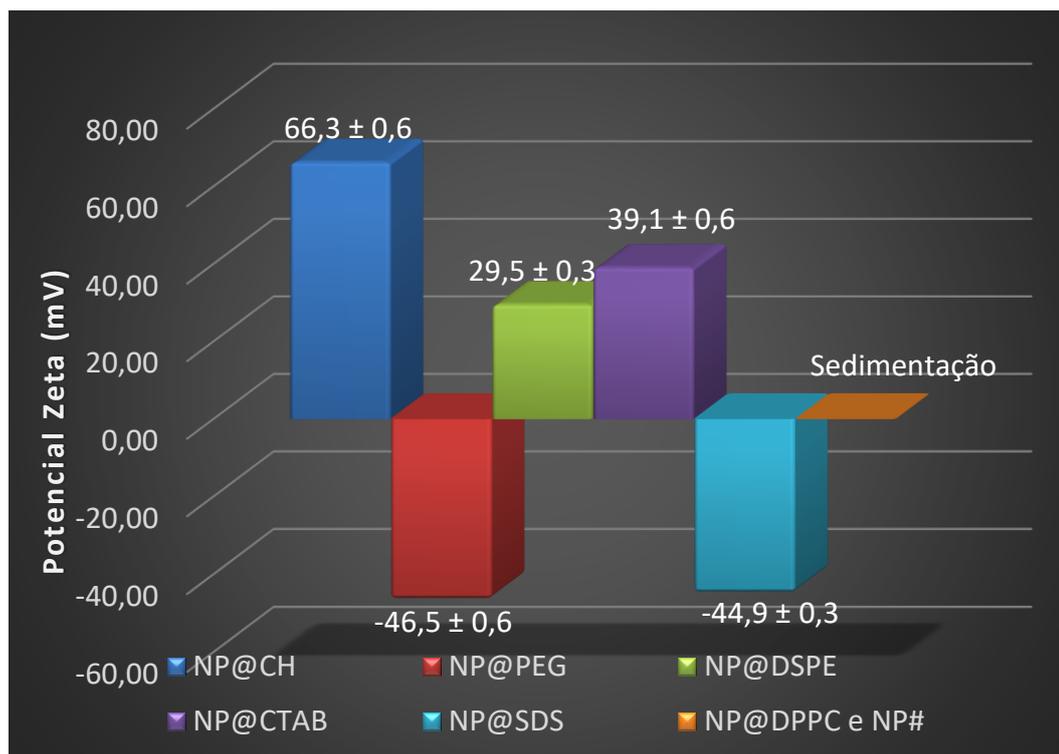


Figura 54 – Potencial Zeta de todas as amostras utilizados com e sem recobrimentos das amostras: NP@CH, NP@PEG, NP@DSPE, NP@CTAB, NP@SDS, NP@DPPC e NP#.

O teste estatístico T revela que os valores das amostras são significativamente diferentes entre si. Para se verificar a estabilidade eletrostática (HONARY; ZAHIR, 2013) de maneira prática deve-se conferir quais valores estão acima do módulo de 30 mV. Avaliando os resultados, pode-se comparar os valores do potencial zeta das amostras do mais eletricamente estável para o menos estável obtendo-se: NP@CH > NP@PEG > NP@SDS > NP@CTAB > NP@DSPE > NP@DPPC e NP#. Além disso, observa-se que os valores do potencial zeta para o NP@PEG e o NP@SDS apresentam cargas negativas, já as amostras NP@CH, NP@CTAB e NP@DSPE apresentam cargas positivas. Outro fato importante é que, apesar do NP@CTAB não apresentar o maior módulo de potencial zeta, esta amostra é o coloide mais estável. Isso acontece devido à barreira estérica que corrobora com a boa estabilidade que o CTAB oferece às NPs, este processo está associado às estruturas de cauda típicas do CTAB. Um processo muito similar acontece com o PEG e com a CH, entretanto os polímeros não apresentam caudas para auxiliar neste processo. Em contrapartida o PEG e a CH apresentam uma larga cadeia carbônica que favorece as forças eletrostáticas; fenômeno que permite a estabilização do coloide. Por fim, as NPs sem o recobrimento (NP#) e a NP@DPPC sedimentaram. Através do valor do potencial zeta do NP@DSPE observa-se que o mesmo se encontra no limiar da estabilização eletrostática e, portanto, um pequeno desequilíbrio de cargas em sua composição

poderia comprometer sua estabilidade coloidal. Já a amostra NP@DPPC não homogeneizou e nem estabilizou as NPs durante a síntese impossibilitando a realização das medidas de potencial zeta. Portanto, para os ensaios que se seguem o recobrimento com DPPC foi descartado.

6.4.3 TGA

O resultado da termogravimetria (TGA) se refere a perda de massa com o incremento da temperatura. As amostras NP# e NP@DPPC não foram submetidas ao TGA, visto que estas amostras não apresentaram uma boa estabilidade nos resultados obtidos no Potencial Zeta. Para assegurar à homogeneidade das amostras antes das medidas, todas elas foram sonicadas e agitadas. A fim de evitar a oxidação das amostras, as medidas foram realizadas em uma atmosfera de gás nitrogênio controlada a uma vazão de 10 mL/min, desta forma evitou-se a interação do oxigênio com as amostras e possíveis erros associados à oxidação. Para efeito de resolução amostral, as medidas foram realizadas com uma taxa de incremento de temperatura de 10°C/min. O gráfico da Figura 55 representa os resultados obtidos do TGA.

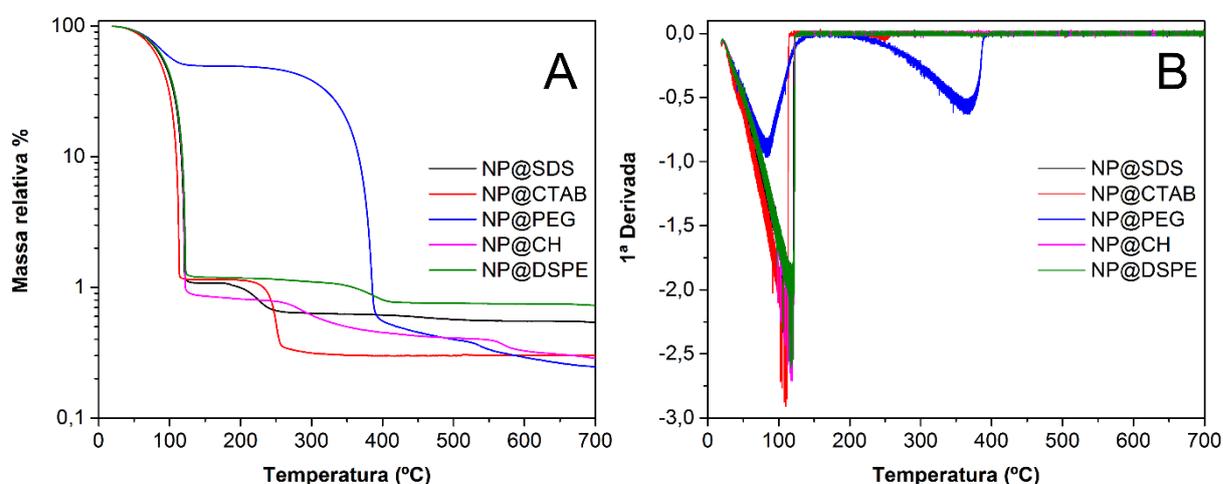


Figura 55 – (A) Resultado do TGA das amostras NP@SDS, NP@CTAB, NP@PEG, NP@CH e NP@DSPE. (B) Análise da primeira derivada do TGA de acordo com a massa relativa de cada respectiva amostra.

O ponto de evaporação/queima de cada composto da amostra (DEAN, 1985; “Handbook of Pharmaceutical Excipients – 7th Edition”, 2013; PATNAIK, 2003; POLYETHYLENE; PEG, [S.d.]) permite determinar em que momento cada componente será evaporado durante o processo. A água evapora em torno de 100°C, e está presente em todas as amostras, enquanto que as cadeias de carbono provenientes dos recobrimentos evaporam na faixa de 200-450°C. No final da curva de termogravimetria existe uma tendência da curva se estabilizar se

aproximando de uma reta e, neste momento em que a curva estabiliza, é possível obter o valor da massa correspondente ao óxido de ferro presente em cada amostra. Ao derivar os resultados da Figura 55 A é possível obter os dados apresentados na Figura 55B. Através da derivada da curva de termogravimetria e conhecendo os pontos de evaporação de cada composto de cada amostra é possível descrever uma razão da massa relativa entre a água, os agentes de recobrimento e a massa de NPs para cada amostra. Os resultados desta análise são apresentados na Figura 56.

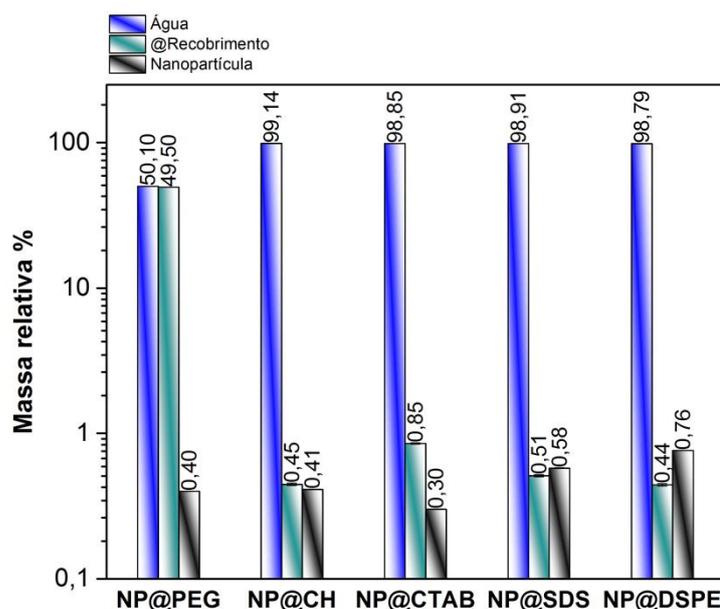


Figura 56 – Resultado da análise do percentual da massa relativa das amostras NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS e NP@DSPE via TGA.

Devido a síntese todas as amostras contém uma parcela expressiva de água em suas respectivas composições. A disparidade do recobrimento com PEG se comparado com as outras amostras é devido ao processo de sua síntese, visto que o PEG corresponde a 49,5% da mistura. Outro fator que precisa ser considerado é que durante o processo de lavagem das amostras uma porcentagem de NPs são descartadas. A termogravimetria permite extrair o valor exato da massa de óxido de ferro em cada amostra, cujo resultado mostra que apesar das alíquotas de NPs serem realizadas da mesma forma para cada recobrimento, sempre haverá uma pequena diferença na quantidade NPs para cada conjunto de amostra que pode estar associado a aglomerações ou mesmo perda durante o processo de lavagem. A razão entre a massa de NPs e massa de recobrimento esta apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Razão entre a massa porcentagem da massa de NP pela massa de recobrimento.

	NP@PEG	NP@CH	NP@CTAB	NP@SDS	NP@DSPE
Razão NP/@Recobrimento	0,8%	91,1%	35,3%	113,7%	172,7%

Neste resultado, pode-se observar que as amostras NP@SDS e NP@DSPE apresentam concentrações maiores de NP/@Recobrimento. A consequência imediata deste processo permite justificar a razão da magnetização de saturação do DSPE ser maior que a das outras amostras na Figura 49. Entretanto, não justifica como este valor é superior ao das NPs sem recobrimento. Para tal seria necessário realizar o TGA da amostra NP# logo após a síntese. A hipótese é que a NP# contenha ácido oleico e oleilamina em sua superfície o que justifica seu valor de M_s inferior encontrado.

A Tabela 3 descreve a normalização da magnetização de saturação pela massa da NP, de acordo com os resultados obtidos no TGA.

Tabela 3 - Normalização da Magnetização de Saturação através dos resultados encontrados na Termogravimetria.

	NP@PEG	NP@CH	NP@CTAB	NP@SDS	NP@DSPE
Ms normalizada pela massa de NP (emu/g)	*	91,2 ± 5,3	179,8 ± 10,5	91,2 ± 5,3	103,5 ± 6,1
*A amostra NP@PEG não obteve resultados de medida expressivo					

Com exceção da amostra NP@CTAB, estes resultados estão próximos do valor esperado (GÓRKA-KOSTRUBIEC; SZCZEPANIAK-WNUK, 2017) para a magnetização de saturação da magnetita 90-92 emu/g. A hipótese para a amostra NP@CTAB é que amostra apresente grandes cadeias de aglomerados de NP, o que deixou a amostra menos homogênea durante a alíquotagem, consequentemente mais NPs que os esperados foram detectadas.

6.4.4 Medidas de SAR

Para as medidas de SAR as soluções devem estar em frascos de vidro como apresentado na Figura 57. Em cada frasco também deve estar inserido um termômetro de fibra ótica para efetuar a leitura da variação da temperatura proveniente do aquecimento magnético das NPs.



Figura 57 – Frasco de vidro contendo NPs suspensas para a medição do SAR. No interior do frasco foi colocado a fibra ótica para a aferição da temperatura.

O fundamento pode ser revisto na seção 2.6.4, cujo tópico trata do que acontece durante o ensaio de hipertermia de acordo com as condições de contorno de cada amostra. O equipamento oferece vários conjuntos de bobinas que podem ser utilizadas caso seja necessário aplicar diferentes campos magnéticos. Para os ensaios que se sucedem, a bobina utilizada é apresentada na Figura 58.



Figura 58 – Submissão das amostras NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS e NP@DSPE ao campo magnético externo oferecido pela bobina do equipamento de hipertermia magnética. Quando submetidos a esse campo as NPs se alinham de acordo com o gradiente axial do campo formando linhas de NPs nas paredes da vidraria conhecidas como needles.

A escolha do tamanho e da forma da bobina foi devido a compatibilidade do tamanho da vidraria utilizada com bobina. Este formato da bobina se adequou tanto para as medidas dos respectivos valores de SAR; como para os ensaios magneto hipertérmicos nas aplicações biológicas. O único problema é que o campo não é perfeitamente uniforme e quanto mais longe estiver do centro da bobina mais distorcido será. Assim nestas situações, o campo apresentará um gradiente axial de tal forma a produzir uma força nesse mesmo sentido. Quando se aplica um campo sob a amostra verifica-se que esse gradiente de campo desloca as NPs em direção à parede do frasco e fazem com que elas se alinhem com as linhas de campo; o formato que se observa na parede são linhas de NPs conhecidas como “*needles**³”. No caso das partículas superparamagnéticas, após a remoção do campo elas voltam ao seu estado de equilíbrio rapidamente sem remanência magnética.

Uma característica das NPs magnéticas é que o mecanismo de suas respectivas taxas de aquecimento dependem intimamente do tamanho, da composição e da estrutura das NPs bem como da frequência e da amplitude do campo magnético aplicado (PIÑEIRO-REDONDO *et al.*, 2011; WEITSCHIES, 2006). Assim, de maneira geral, NPs menores produzem taxas de aquecimento menores se comparadas às NPs maiores. Este comportamento gera vantagem e desvantagem. A vantagem está associada ao fato que uma taxa de variação de aquecimento menor facilita o controle de incremento ou decréscimo de calor no sistema. Entretanto, a desvantagem do tamanho reduzido não possibilita um incremento rápido de temperatura durante um curto intervalo de tempo, assim NPs de tamanhos menores necessitam de um tempo maior para gerar uma quantidade adequada de calor. O ensaio para se medir as de taxas aquecimento foi realizado sob as condições de 313KHz de frequência a uma amplitude de campo magnético de aproximadamente 200 Oe na região central da bobina. Os resultados obtidos foram para as amostras NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS e NP@DSPE com massas de NPs tituladas com 1mg/mL de solução. Os valores estão apresentados na Figura 59.

*³ O termo *needle* vem do inglês que significa agulha ou alfinete.

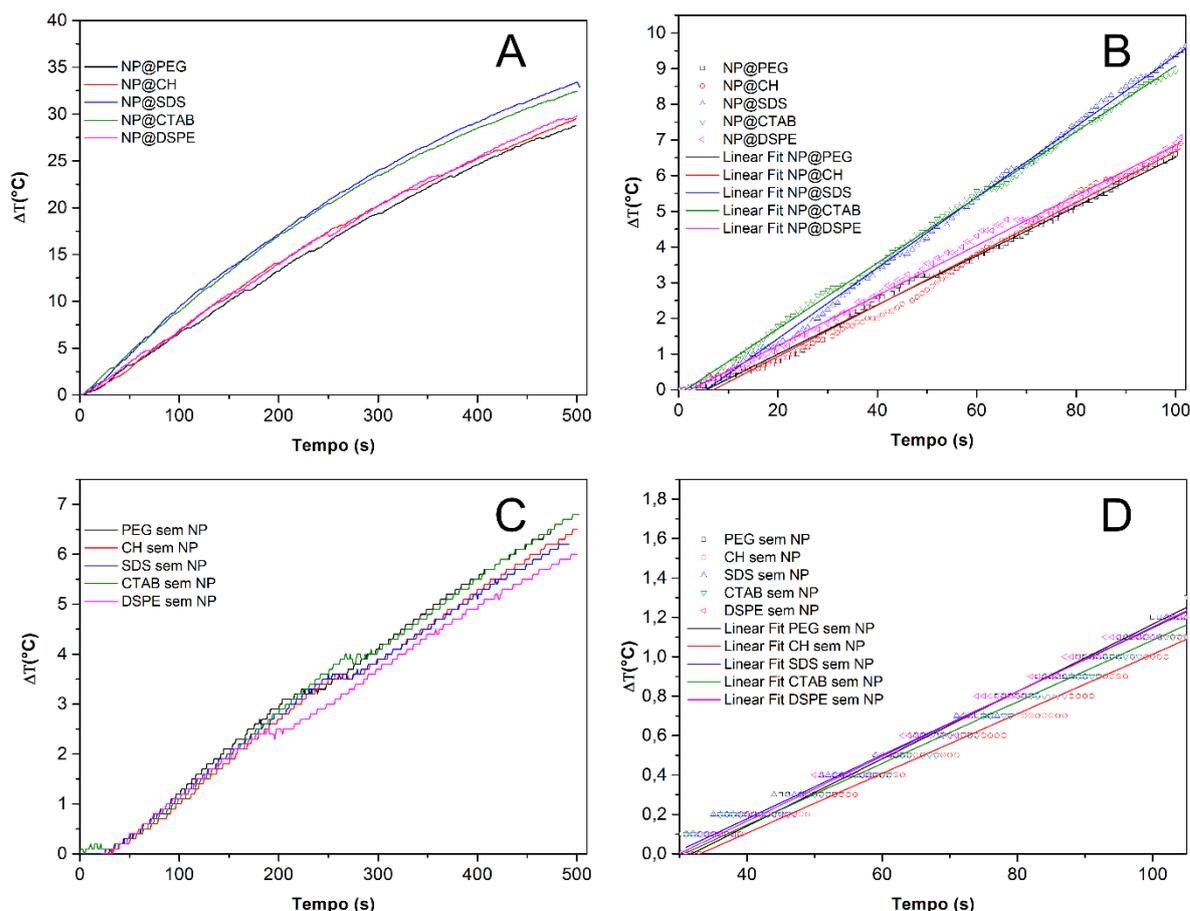


Figura 59 – Conjunto de medidas das taxas de aquecimento sob as condições de 313 kHz de frequência a 2000e de campo magnético aplicado; referente a 1 mg/mL das amostras NP@PEG, NP@CH, NP@CTAB, NP@SDS e NP@DSPE. (A) Comportamento da variação da taxa temperatura de 0 a 500 segundos para o conjunto de NPs com seus respectivos recobrimentos. (B) Comportamento da variação da taxa de temperatura de 0 a 100 segundos para o conjunto de NPs com seus respectivos recobrimentos com ajuste linear realizado. (C) Comportamento da variação da taxa de temperatura de 0 a 500 segundos apenas para os respectivos recobrimentos sem NPs. (D) Comportamento da variação da taxa de temperatura de 0 a 100 segundos apenas para os respectivos recobrimentos sem NPs com ajuste linear realizado.

A Figura 59A é o resultado da variação da taxa de temperatura de 0 a 500 segundos. Neste gráfico é possível observar que o sistema não é adiabático, ou seja, o sistema acaba trocando calor com o ambiente externo fazendo com que a taxa de crescimento não seja linear. Portanto, foi necessário fazer algumas considerações para determinar a taxa de incremento de temperatura linear. Para o cálculo foi considerado um intervalo de tempo curto de 0 a 100 segundos onde a curva de incremento é praticamente linear de acordo com a imagem B e D da Figura 59 seguido de cada respectivo ajuste linear apropriado.

Como o sistema troca calor com o ambiente externo torna-se importante quantificar essa quantidade de calor trocada. Para consideração é indispensável a realização das medidas da

solução dos recobrimentos sem as NPs que constam nas Figura 59 C e D. Essas medidas informam a quantidade calor produzido pelo sistema sem a influência das NPs. Este fenômeno torna-se mais visível em tempos longos. No entanto, esta contribuição de calor externa não tem como ser excluída no momento da aplicação magneto hipertérmica em células devido às limitações experimentais.

A análise da taxa de temperatura dT/dt normalizada pela massa de NP é diretamente proporcional ao SAR. Para o cálculo foi utilizado os ajustes lineares dos resultados obtidos nos gráficos B e D da Figura 59 auxiliado pela análise dos resultados obtidos no TGA. A análise do TGA fornece a quantidade relativa de cada material presente na amostra que impacta diretamente no calor específico da amostra. Para as amostras que apresentaram 99% de água em sua composição, foi considerado uma aproximação do calor específico da amostra igual ao da água:

$$c_{\text{amostra com 99\% de H}_2\text{O}} \cong c_{\text{H}_2\text{O}} = 4,18 \text{ J} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1} \quad (6-2)$$

No entanto, a análise do TGA da amostra NP@PEG apresentou uma massa relativa de 49,5% de PEG em sua composição. Através do calor específico do PEG é $c_{\text{PEG}} = 2,13 \text{ J} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$, foi calculado o calor específico médio da amostra:

$$c_{\text{NP@PEG}} = (\% \text{ da massa de água})c_{\text{H}_2\text{O}} + (\% \text{ da massa de água})c_{\text{PEG}} \quad (6-3)$$

Substituindo os devidos valores obtém-se:

$$c_{\text{NP@PEG}} = 3,17 \text{ J} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1} \quad (6-4)$$

Para realizar os cálculos do SAR utiliza-se a equação (2-29) e deve-se levar em consideração a contribuição de calor proveniente do aquecimento da bobina obtido através do gráfico C da Figura 59. Além disso, deve-se medir a massa total dos respectivos coloides. Os resultados dessa associação e os cálculos do SAR estão dispostos na Figura 60.

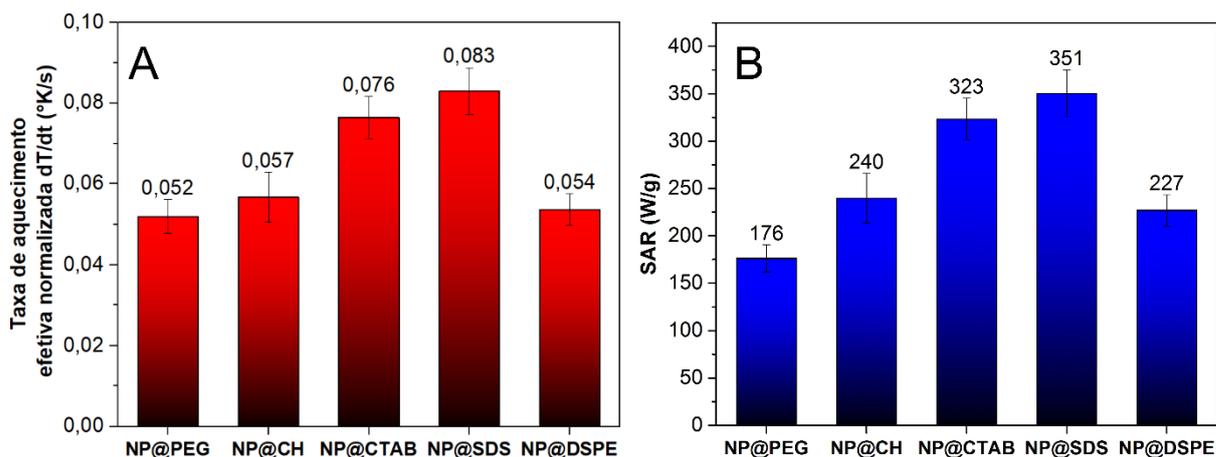


Figura 60 – Resultado das medidas do SAR para 1 mg/mL sob um campo de 200 Oe a 313kHz das amostras: NP@PEG, NP@CH, NP@SDS, NP@CTAB e NP@DSPE. (A) Variação da taxa de temperatura efetiva $\frac{dT}{dt}$ normalizada pela massa de NPs de magnetita. (B) Resultado do cálculo do SAR para cada amostra.

Através dos resultados na Figura 60A é possível calcular SAR obtido na Figura 60B. Os valores do SAR (KUMAR; MOHAMMAD, 2011) esperados para os SPIONs está entre 100-125 W/g. Essa pequena diferença se deve as aglomerações das NPs como foi observado nos resultados de microscopia. Ao aplicar o teste estático T nos resultados do SAR, verifica-se que não há diferença significativa entre os resultados da NP@CTAB e da NP@SDS; e também não há diferença entre a NP@CH e a NP@DSPE; o único resultado que diverge dos outros é a amostra NP@PEG, o qual seu resultado é estatisticamente diferente de qualquer outra amostra. O valor de SAR reduzido para a NP@PEG já era esperado, visto que o calor específico desta amostra é ligeiramente menor que o das outras. Outra comparação relevante é o valor do SAR com os valores obtidos no TGA e o valor da magnetização de saturação o qual podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4 – Comparação dos resultados obtidos na termogravimetria, na magnetometria e no SAR

	NP@PEG	NP@CH	NP@CTAB	NP@SDS	NP@DSPE
Ms normalizada pela					
massa de NP	-	91,2	179,8	91,2	103,5
(emu/g)					
SAR	176	240	323	351	227
(W/g)					
SAR / Ms	-	2,63	1,80	3,85	2,19

Os valores da razão SAR/Ms trazem a informação da eficiência de potência gerada de acordo com a magnetização de saturação de cada amostra. De acordo com este resultado, a ordem de eficiência obtendo-se: NP@SDS > NP@CH > NP@DSPE > NP@CTAB. Devido aos problemas já citados a NP@PEG não pode ser incluída nesta análise.

Baseado nestas análises, pode-se aplicar o teste estatístico T e criar uma escala de eficiência do maior para o menor SAR obtendo: NP@SDS e NP@CTA > NP@CH e NP@DSPE > NP@PEG. Entretanto o valor do SAR para a NP@SDS e a para NP@CTAB não diverge muito da escala dos resultados encontrados para as outras amostras. Este resultado levanta a hipótese que as amostras desenvolverão uma potência de aquecimento relativamente próximas umas das outras. Sendo que a amostra NP@PEG apresentará a taxa de aquecimento mais baixa durante a aplicação biológica magneto hipertérmica.

6.5 Viabilidade e morfologia celular

6.5.1 MTS

É um método colorimétrico para determinar o número de células viáveis. O MTS é composto por reagentes que são bio-reduzidos pelas células mudando a cor do meio de cultura devido à respiração celular, como pode ser visto na Figura 61. Desta forma é possível correlacionar o resultado com o número total de células vivas.

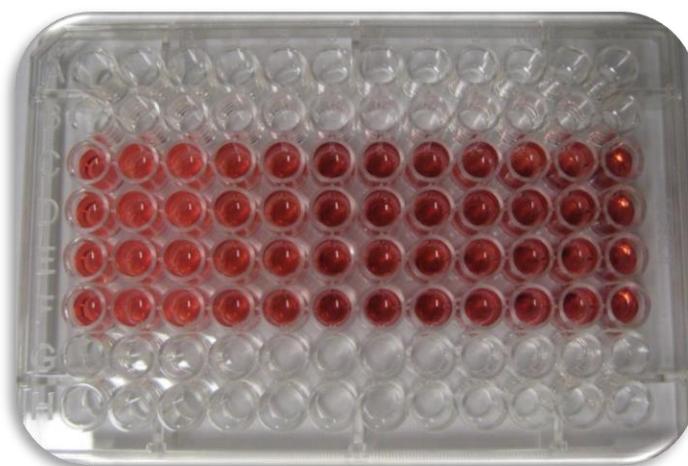


Figura 61 – Células de HEK em uma placa de cultura celular de 96 poços após a interação com o MTS.

Para esses ensaios as amostras foram preparadas de tal forma que cada conjunto apresentasse 5 μg de NPs para cada 1 mL de solução. Em seguida, as amostras foram diluídas 20x e dessa diluição utilizou-se cinco alíquotas diferentes (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 μL) para verificar como as concentrações das amostras interagem com o meio celular. Os resultados da viabilidade celular são apresentados na Figura 62.

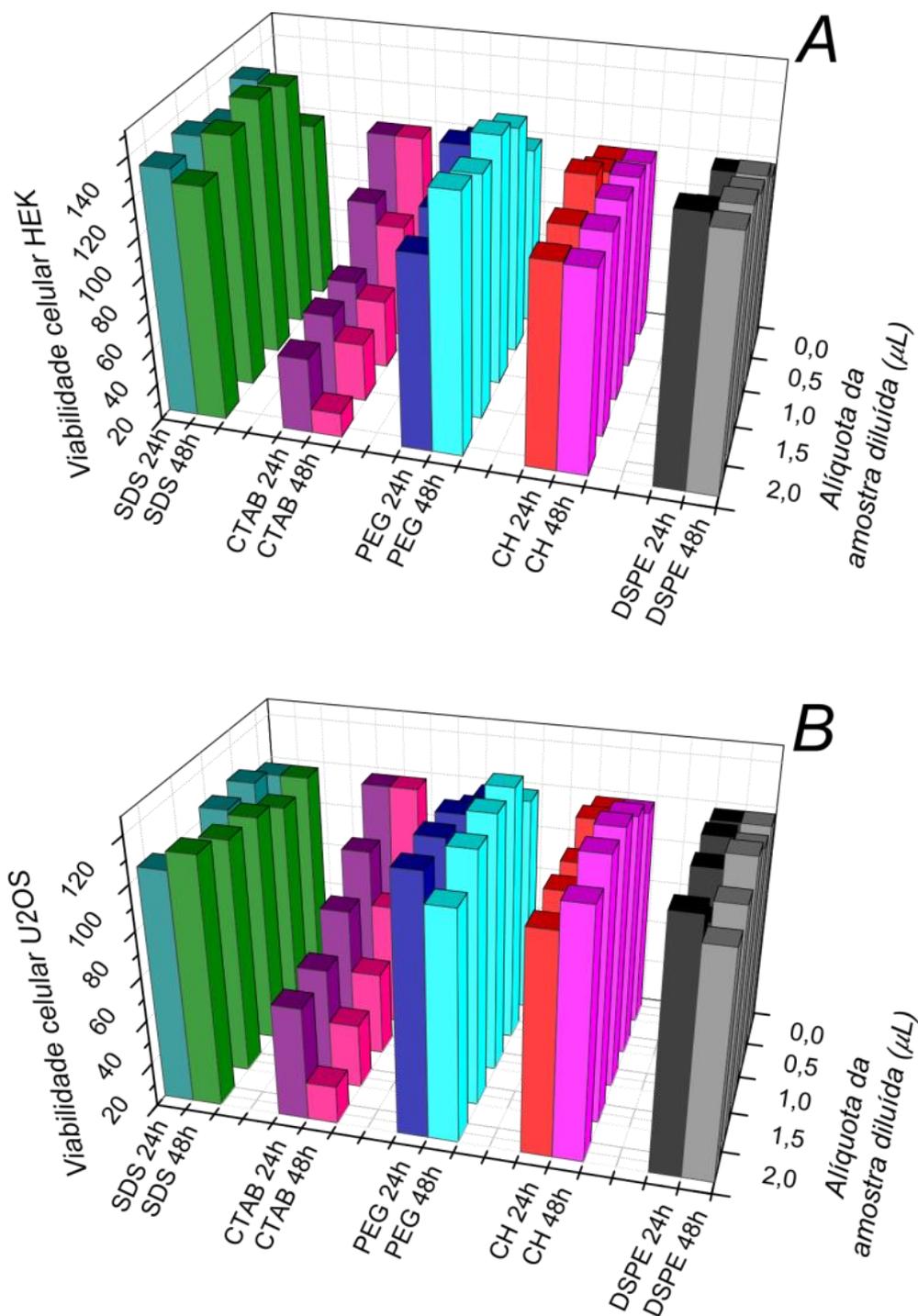


Figura 62 – Resultados da viabilidade celular das amostras incubadas nas células via MTS. Incubação realizada com: (A) Células de HEK293T. (B) Células de U2OS.

Os resultados obtidos tanto pela HEK como pela U2OS referem-se aos valores obtidos para a viabilidade celular de cada amostra com 24 e 48h de incubação, respectivamente. Pode-se verificar que tanto a Figura 62A como a Figura 62B apresentam a mesma tendência comportamental de tal forma que em ambos os casos as amostras recobertas com CTAB inibem a respiração celular. Este fato indica uma alta toxicidade da amostra recoberta com CTAB

inviabilizando o mesmo para tratamentos hipertérmico. Já as outras amostras permanecem com a viabilidade celular próximas aos 100%, não indicando qualquer sinal de toxicidade. Outra observação é que o SDS, apesar de ser também um surfactante, não demonstrou toxicidade nessas concentrações. Porém, devido à sua composição, a hipótese seria que este recobrimento apresentasse algum dano celular (LAURENT *et al.*, 2008; MORSY, 2014). Deste modo, com exceção do CTAB, todos os outros recobrimentos são indicados para o tratamento de hipertermia sob essas concentrações utilizadas.

Ao correlacionar os resultados de viabilidade com os de potencial Zeta verifica-se que as cargas das NPs serem positivas ou negativas não impactam na viabilidade celular. Devido a estrutura da membrana celular ser composta por íons, levantou-se a hipótese de que a carga das amostras deveria apresentar algum efeito que correlacionaria esses eventos alterando diretamente a viabilidade celular, mas não foi o que ocorreu. Isto provavelmente ocorreu desta forma devido à baixa concentração de NPs utilizada. Portanto, a hipótese levantada a respeito das cargas não foi confirmada pelos testes de viabilidade celular utilizados.

6.5.2 UV-VIS e a Internalização das NPs

A espectroscopia UV-VIS foi utilizada para determinar a massa de ferro das NPs que podem ser internalizadas pelas células. A metodologia foi realizada de acordo com teste MILC encontrado na literatura (GALIMARD *et al.*, 2012). Ao estipular a massa de ferro diluída em HCl 40%, torna-se possível comparar esse resultado com a quantidade de NPs que foi internalizada pelas células.

Para o teste foi realizado um conjunto de medidas espectrais em triplicata: do padrão de células HEK, do padrão da nanopartícula de magnetita e da amostragem: NP@CH, NP@PEG, NP@DSPE e NP@SDS todas incubadas com a célula HEK. As médias da triplicatas dos padrões são apresentadas na Figura 63. Esses espectros dos padrões servem como base para quantificar as proporções de massa de ferro presentes nas amostras envolvidas.

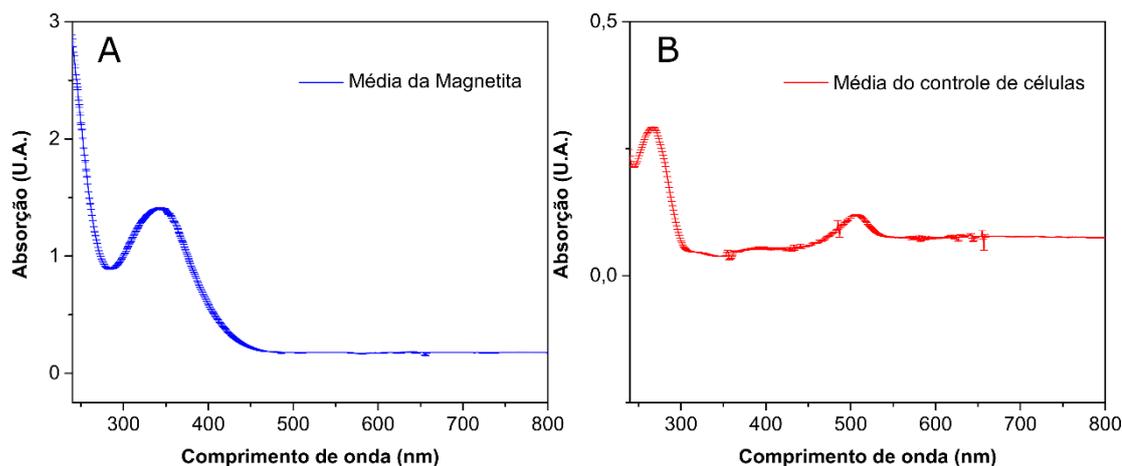


Figura 63 - (A) Espectro UV-VIS médio do ferro da magnetita dissolvido em HCl. (B) Espectro médio do controle de células dissolvido em HCl.

Esses padrões são utilizados na quantificação da massa de ferro presente na célula de acordo com a quantidade de amostra contida no meio baseado na combinação linear do espectro de medida da amostra. De acordo com o procedimento descrito na seção 5.1.2, realizou-se a dissociação em ácido clorídrico das células contendo as NPs e seus respectivos recobrimentos. Em seguida, realizou-se a leitura das amostras e o resultado dessas medidas é apresentado na Figura 64.

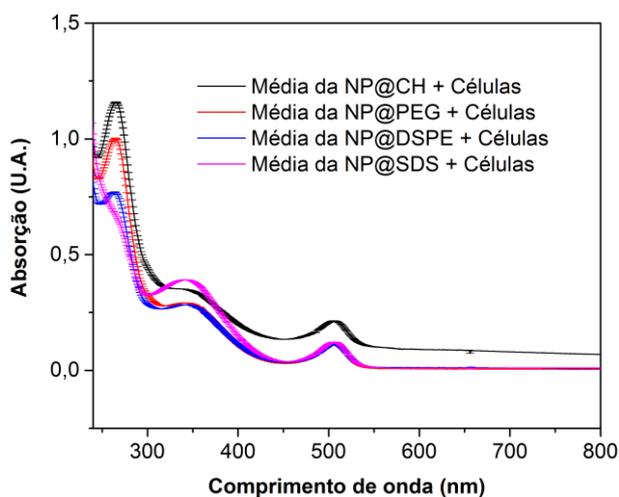


Figura 64 – Espectro UV-VIS da média da triplicata da incubação celular das amostras: NP@CH, NP@PEG, NP@DSPE e NP@SDS dissolvidas em HCl

Através dos resultados obtidos na Figura 63, foi estabelecido um padrão para a massa de ferro do pico característico da célula dissociada (aproximadamente 505 nm) e para a massa de ferro das NPs dissociadas (aproximadamente 345 nm). Estes padrões foram utilizados para quantificar a massa de ferro e o número de células presentes nos espectros obtidos da Figura

64. Todos esses ajustes foram realizados com o software Matemática10®. O resultado dessa combinação fornece a proporção de células e do nanomaterial para cada caso. Por fim, basta realizar a razão dessas proporções para se obter a concentração da massa de ferro por unidade de célula que é apresentado na Figura 65.

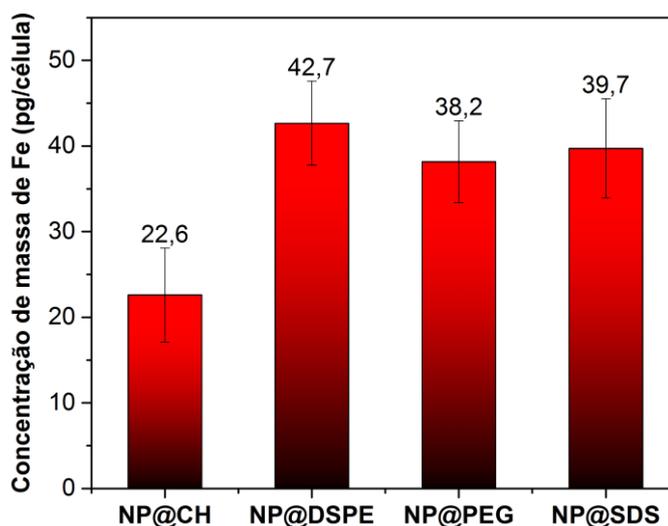


Figura 65 – Concentração da massa de ferro por célula HEK293T (pg/célula) via internalização das amostras NP@CH, NP@PEG, NP@DSPE e NP@SDS incubadas por 24h.

Ao aplicar o teste estatístico do tipo T observa-se que a NP@CH apresentou um resultado muito diferente em relação às outras amostras, entretanto o mesmo teste revela que não há diferença estatística entre os valores das amostras NP@DSPE, NP@PEG e a NP@SDS. Os resultados apresentados levantam a hipótese que a amostra NP@CH apresenta uma baixa taxa de internalização se comparada com as demais amostras, entretanto deve-se observar que a CH é um estimulante do crescimento celular e isso pode mascarar a determinação da proporção NP/célula. O crescimento celular passa a ser proporcional em função da concentração de CH no meio celular. Esse contexto está relacionado com o fator de crescimento populacional celular contra disponibilidade de nanomaterial a ser internalizado.

Analisando a amostra NP@CH com a células observou-se que o pico referente a concentração celular apresentou um valor de 2,4 vezes maior do que as outras amostras, ou seja, neste caso há muito mais células do que nanomaterial disponível. Portanto para comparar esta amostra com as outras faz-se necessário realizar uma estimativa relativa ao número de células excedentes. Nesta estimativa foi descontada a diferença desse crescimento celular excedente; em seguida, foi realizado uma normalização em relação ao número de células obtidos para as outras amostras. O resultado desta estimativa traz o valor de 53,9 pg/célula, ou seja, levando

este fenômeno em consideração a NP@CH apresentaria valores estatísticos mais elevados que os apresentados pelos outros recobrimentos.

O ponto é que ao restringir a disponibilidade de NPs no caso da NP@CH gerou uma diferença expressiva na internalização do nanomaterial. Caso essa disponibilidade fosse maior nesse sistema com a CH, provavelmente a razão de NPs/célula acompanharia a internalização média dos outros regimes. Todavia, é complicado afirmar essa hipótese em sistemas reais, visto que a taxa de crescimento celular e disponibilidade de nanomaterial são parâmetros complexos de se controlar temporalmente. Para testar esse argumento seria necessário adicionar NPs em intervalos de tempo controlados e em diferentes concentrações afim de se estudar esse tipo de dinâmica, o que foge do foco deste trabalho e, portanto, não foi investigado.

6.5.3 Microscopia Confocal

A microscopia confocal revela informações a respeito da morfologia celular e interação com os nanomateriais em estudo. Esse imageamento é realizado em três dimensões através de cortes verticais 2D, sendo possível reconstruir a imagem celular 3D. Portanto, essa técnica fornece informações de profundidade e volume dos objetos envolvidos. A Figura 66 exibe o comportamento da HEK e da U2OS com os respectivos sistemas de recobrimento com uma altura próxima a região central das células no eixo vertical.

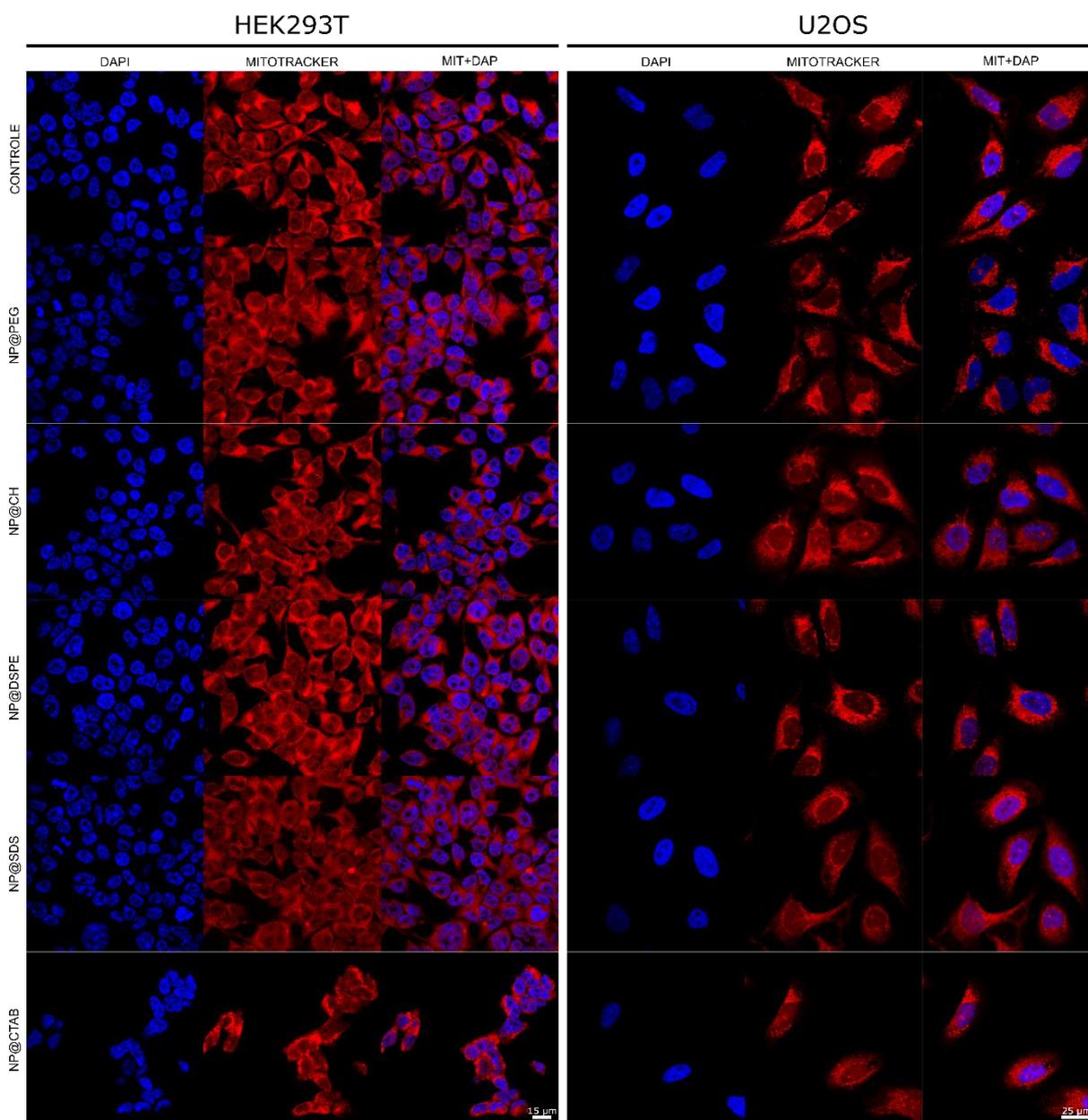


Figura 66 – Microscopia confocal da interação das células HEK293T e U2OS com as amostras: NP@PEG, NP@CH, NP@DSPE, NP@SDS e NP@CTAB.

A respeito da morfologia, pode-se verificar que a HEK apresenta um formato aproximadamente esférico com um diâmetro em torno de 10 μm enquanto que a U2OS apresenta um formato próximo ao oblato e com um diâmetro maior, em torno de 15 μm . Sob a ótica da viabilidade celular, o CTAB gerou um stress celular modificando a densidade de células por área e inclusive reduzindo a quantidade dos grumos celulares. Este resultado confirma a citotoxicidade do CTAB e corrobora com o resultado anterior obtido por MTS.

Uma análise mais detalhada da interação das nanopartículas com as células foi realizada através da ampliação das imagens de microscopia confocal. Na Figura 67 são apresentadas imagens de células nas presenças de NP@DSPE e NP@SDS, onde a imagem DIC claramente destaca a presença de agregados de nanopartículas.

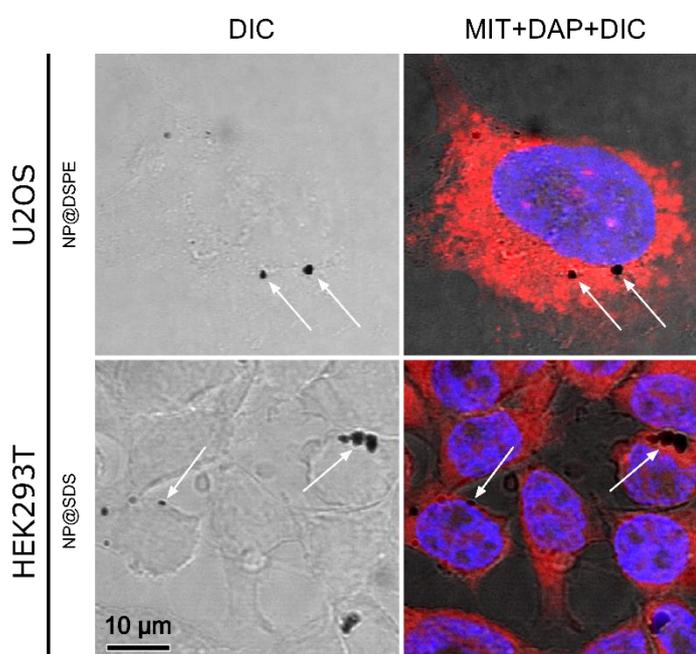


Figura 67 – Ampliação da região de estudo da microscopia confocal das amostras NP@DSPE e NP@SDS nas células HEK293T e U2OS. A ampliação se refere ao imageamento DIC e da composição de imagens do DIC com os biomarcadores DAPI e Mitotracker para avaliação da localização os aglomerados de nanopartículas indicados pelas setas brancas.

Nestas imagens é possível observar somente aglomerados de nanopartículas devido à resolução do microscópio confocal. Através desse resultado, é possível inferir que os aglomerados estão dispersos no citoplasma celular em torno do núcleo celular. Embasado nesta observação, foi montado um esquema de como a NPs pode ser internalizada pela célula, ou estar presa a membrana celular. Este esquema está apresentado na Figura 68.

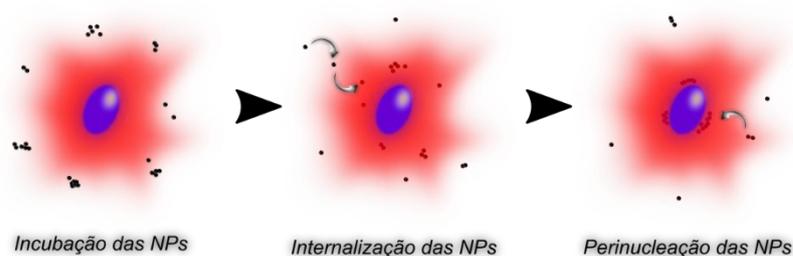


Figura 68 – Esquema do que ocorre na interação das nanopartículas em meio celular durante os estágios de incubação, internalização e perinucleação das NPs.

Este tipo de comportamento sugere que o incremento da temperatura será nas proximidades do núcleo que é o local mais propício para produzir algum tipo de dano celular massivo, visto que o núcleo é responsável por gerenciar as reações químicas celulares e conseqüentemente o funcionamento celular, portanto esse tipo de comportamento melhora a eficiência da condução do calor e conseqüentemente potencializa o tratamento hipertérmico que as NPs podem oferecer.

6.6 Primeiros testes com hipertermia magnética

6.6.1 Citometria

É importante entender o que significa cada parâmetro e como as amostras foram preparadas para a Citometria de fluxo; cujos detalhes se encontram na seção 5.2.5. A compreensão desses parâmetros permite que sejam feitas análises das partículas suspensas em meios líquidos sob fluxo contínuo.

Foram realizados testes preliminares antes dos experimentos de hipertermia e, para estes testes, foi usada a amostra NP@PEG e as NP sem nenhum recobrimento. Para o controle negativo foi utilizado o composto CTAB em altas concentrações como controle de mortalidade. A análise de dados foi realizada por duas rotas: a primeira está associada ao *tamanho x granulosidade* (SSC x FSC) e outra foi método de fluorescência utilizando o *marcador de apoptose* (PerCP-Cy5-5A x FITC-A).

Os primeiros resultados a respeito dos padrões de controle de SSC x FSC estão apresentados na Figura 69

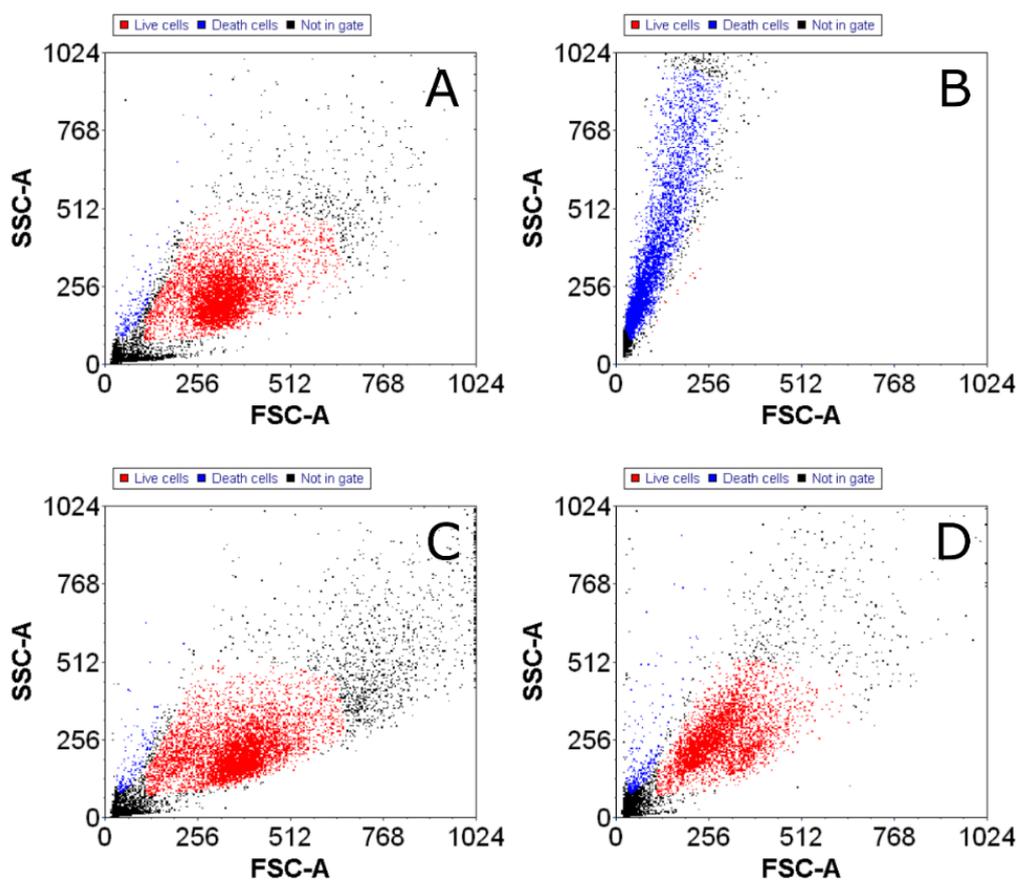


Figura 69 – Citometria das células de controle: pontos vermelhos representam células vivas, pontos azuis células mortas e pontos pretos são eventos como fragmentos celulares. (A) Controle sem hipertermia; (B) Controle de mortalidade em alta concentração de CTAB; (C) Controle com hipertermia após 500 segundos; (D) Controle com hipertermia após 1500 segundos

É possível verificar um pequeno stress celular quando o controle foi submetido a um campo magnético por um longo período. Essa interação foi suficiente para gerar um deslocamento da posição da população que pode ser comparado nas imagens A, B e C da Figura 69. O stress foi suficiente para ser detectado no citômetro, mas não chegou a induzir morte celular.

Para os testes de hipertermia com a NP@PEG, a amostra foi incubada com as células HEK, em seguida foram realizadas duas medidas de tempo para aplicação hipertérmica de 500 e 1500 s. Esta pré-análise é apresentada na Figura 70 e diz respeito ao dano celular que é produzido durante o ensaio de hipertermia.

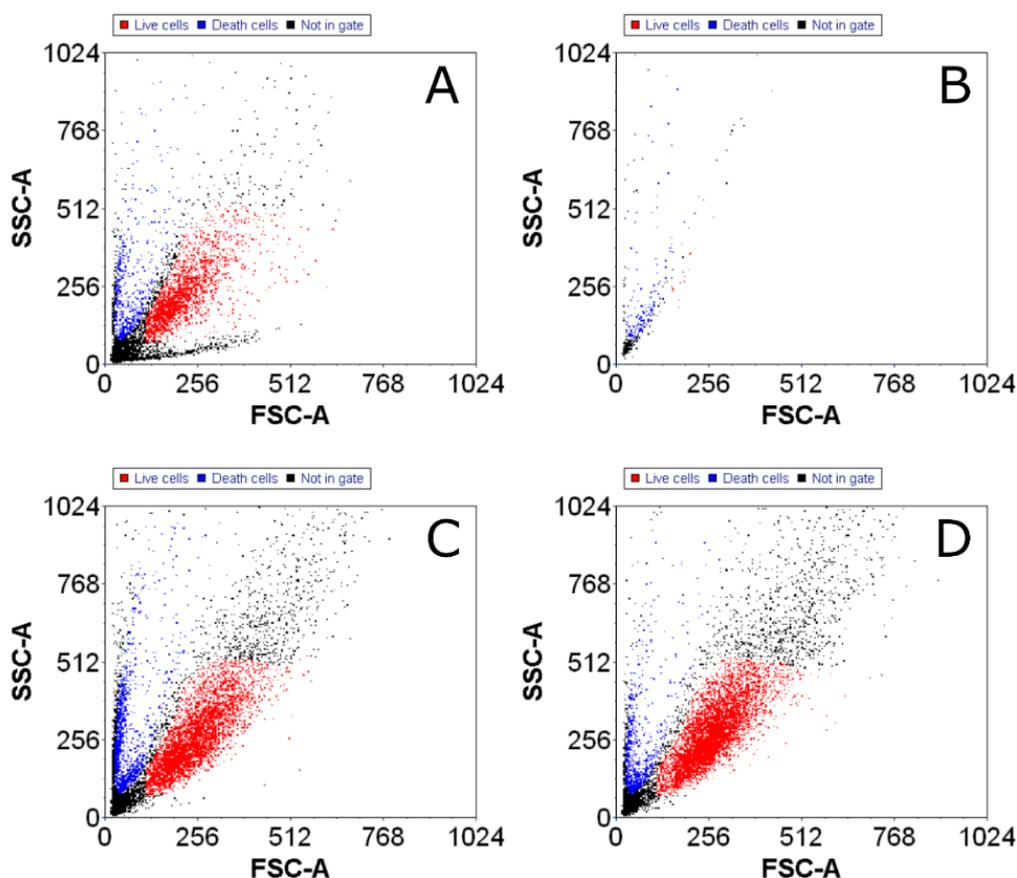


Figura 70 – Citometria das células mais a amostra NP @PEG. (A) Conjunto de células com a amostra NP@PEG sem a realização de hipertermia; (B) NP@PEG junto ao CTAB; (C) Conjunto de células com a amostra NP@PEG seguido da realização de hipertermia a 500 segundos; (D) Conjunto de células com a amostra NP@PEG seguido da realização de hipertermia a segundos

Os gráficos A, C e D de SSC x FSC fornecem informações a respeito de tamanho e granulosidade dos objetos envolvidos antes e depois do processo de hipertermia e, portanto, o fato das nanopartículas se agregarem e se ligarem a outros compostos torna-se passível de observação que as nanopartículas influenciem nesse contexto de granulosidade. Esta observação pode ser confirmada na imagem B onde não deveria ter sido registrado nenhum evento, visto que nesse conjunto não há células para serem contadas. Esse tipo de comportamento dificulta discernir, por exemplo, as nanopartículas do marcador PI de morte celular como pode ser observado nos resultados da Figura 71.

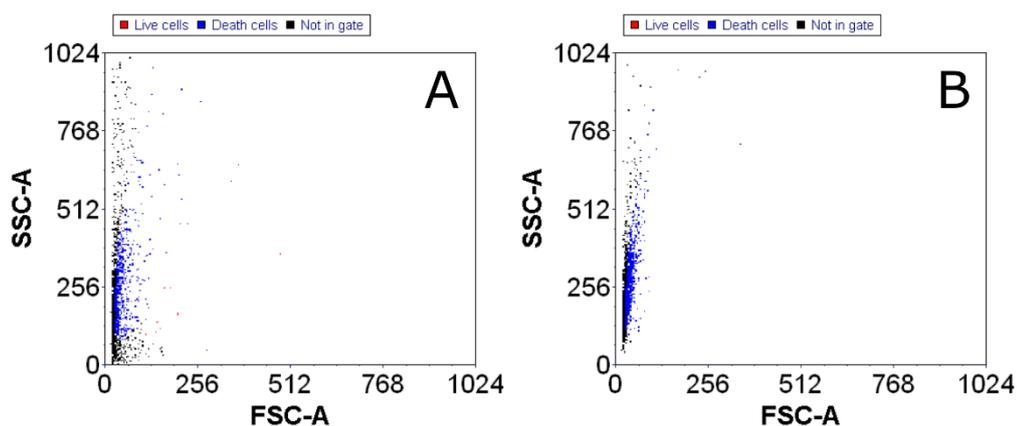


Figura 71 – Citometria de fluxo para a análise da interação das NPs com o marcador de apoptose PI. (A) Citometria de fluxo apenas das NPs; (B) Citometria de fluxo das NPs com o marcador PI.

Assim, com este resultado é praticamente impossível discernir entre as nanopartículas e o marcador PI e, portanto, pode-se levantar a hipótese de que as nanopartículas se ligam ao marcador.

O segundo método de análise consiste em verificar como se comporta os marcadores de morte celular. Para tal foi necessário escolher adequadamente a fluorescência das regiões a serem sondadas com o marcador de PI. A delimitação dessas populações, em tese, separaria as populações vivas das populações mortas. No entanto, os resultados apresentados na Figura 72 para os controles de células vivas e mortas não confirmaram essa hipótese.

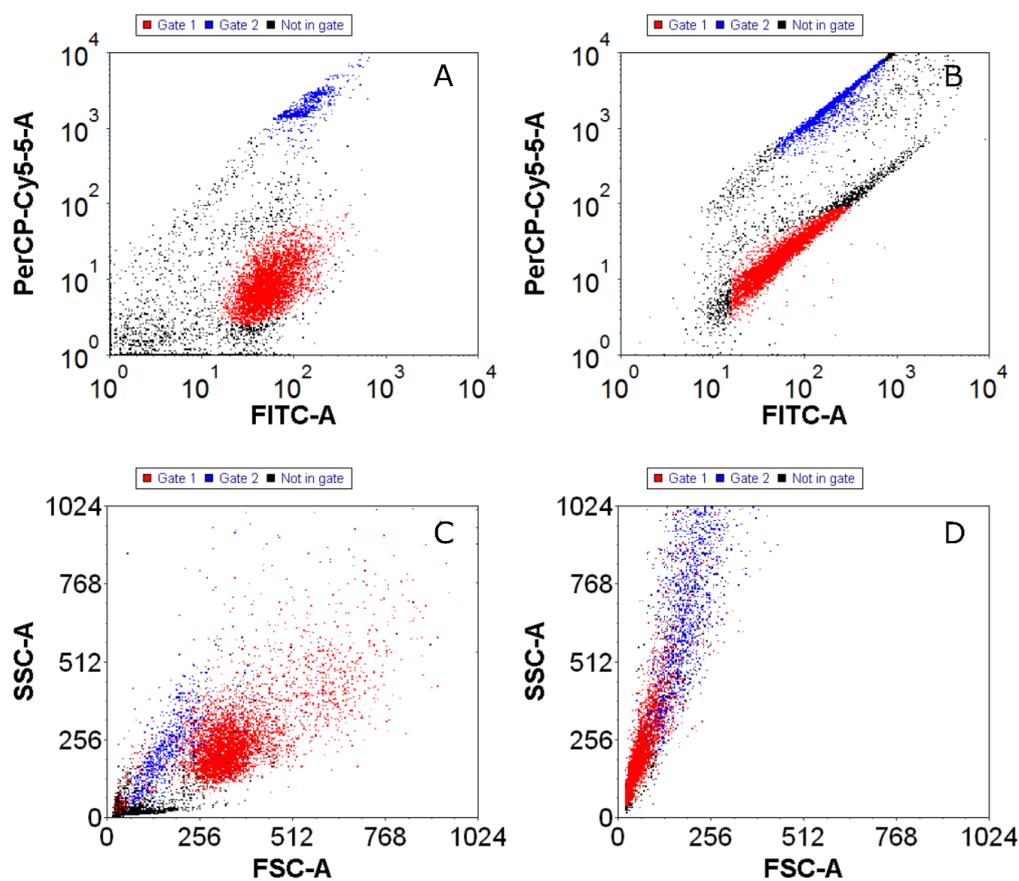


Figura 72 – Citometria de fluxo da interação das nanopartículas com o marcador PI. Azul para mortalidade e vermelho para células vivas. (A) Marcação do controle de células vivas sem hipertermia (B) Marcação PI do controle negativo em CTAB para a quantificação; (C) Resultado aplicado da marcação PI nas células de controle sem hipertermia (D) Resultado aplicado da marcação PI ao controle de mortalidade em alta concentração de CTAB;

O resultado mais diferenciado está associado ao controle de mortalidade na Figura 72D que apresenta marcação de células vivas onde na prática só existem células mortas. Dessa forma, as nanopartículas geram um falso positivo na viabilidade celular e, a citometria mesmo sendo uma ferramenta poderosíssima em termos de quantificação populacional, não viabilizam uma análise assertiva com a utilização dessa abordagem.

Para ficar mais clara a hipótese levantada, foram analisadas as populações de todas as citometrias de fluxo obtidas expressando para cada caso a sua respectiva viabilidade celular. A ideia aqui foi apenas demonstrar como esses eventos de falsos positivos se comportam e como isso inviabiliza a utilização da técnica para este caso em questão. A Figura 73 representa a análise para cada caso investigado em termos das porcentagens relativas a viabilidade celular na citometria através do marcador PI.

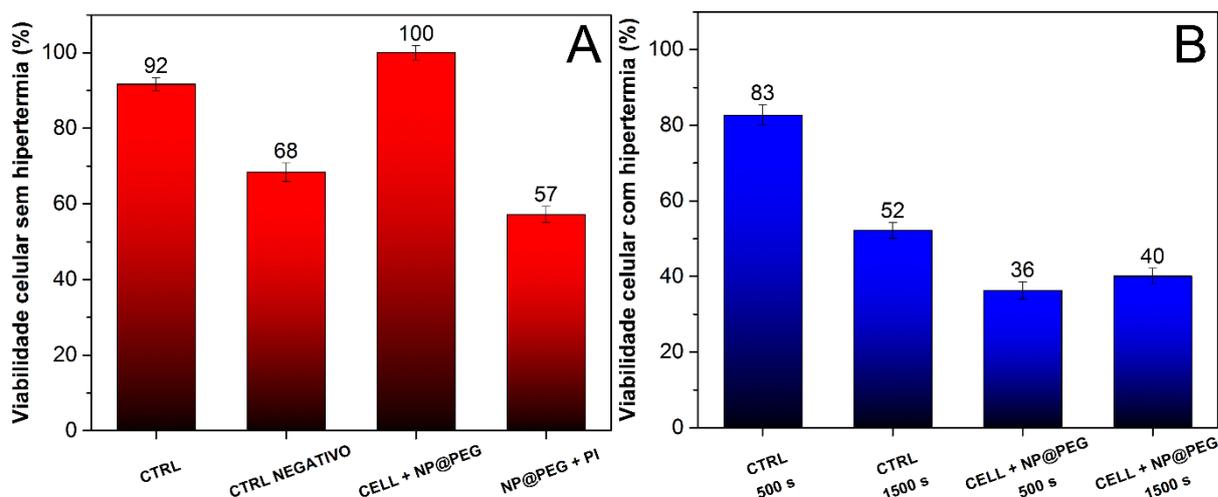


Figura 73 – Análise da viabilidade celular obtida na citometria através do marcador PI. (A) Viabilidade celular sem a aplicação de hipertermia. (B) Viabilidade celular com a aplicação de hipertermia a 500 e 1500 segundos.

De acordo com os resultados apresentados no gráfico A tornou-se possível verificar com mais clareza os valores de falsos positivos, como por exemplo a contagem de viabilidade celular do controle negativo (morte) deveria ser zero, já que nesta condição existe apenas células mortas. Neste resultado é possível verificar um falso positivo de viabilidade celular na amostra NP@PEG junto ao marcador PI, verificando-se, portanto, que o marcador PI se agrupa as NPs produzindo falsos eventos positivos os quais são contabilizados na leitura do citômetro.

Os resultados obtidos na citometria levaram a informações e conclusões equivocadas sobre o conceito de taxa de viabilidade celular. Sendo, portanto, inviável analisar os resultados de viabilidade obtidos durante o ensaio de hipertermia situado na Figura 73B.

Apesar do método de citometria ser um muito bom a respeito da quantificação e identificação populacional celular, ele não é adequado para as amostras em estudo neste trabalho devido aos falsos positivos encontrados.

6.6.2 Countess

O Countess é um equipamento automatizado que apresenta uma estrutura avançada de autofoco e um algoritmo de contagem que permite rapidamente identificar e quantificar o número de células dentro de uma população. Por causa dessa versatilidade foi desenvolvido um teste preliminar para a contabilização da viabilidade após a hipertermia no Countess. Entretanto, os resultados apresentados no pré-teste não foram satisfatórios. O fato da nanopartícula de Fe_3O_4 ser escura ocasionou falsos positivos no momento da contagem de células mortas as quais

estavam marcadas com o *trypan blue*. Assim, durante o fotoprocessamento obteve-se um falso positivo de quase 100% de morte celular e, todavia, na prática, a maior parte das células encontravam-se vivas de acordo com a verificação realizada no microscópio ótico.

Apesar do Countess não ser indicado para a contabilização da viabilidade celular na hipertermia, o equipamento foi extremamente útil durante o andamento e desenvolvimento do trabalho, pois quando era necessária a realização da contagem celular em que não houvessem NPs, o Countess executava a contabilização em segundos. A contagem rápida e precisa de populações celulares facilita e agiliza o processo de repicagem celular, no plaqueamento das células e na contagem das mesmas. Portanto, o Countess apresentou um papel de suporte para o preparo das aplicações biológicas e no desenvolvimento de caracterizações importantes como no caso da quantificação da internalização das NPs via espectroscopia UV-VIS. Entretanto, a possibilidade de se medir a viabilidade no Countess após a hipertermia foi totalmente descartada devido aos falsos positivos que as NPs geram.

6.6.3 MTS Adaptado

Os procedimentos de medida de viabilidade celular via MTS adotados aqui são similares aos já apresentados na seção 5.2.4. Entretanto, para que o ensaio seja voltado para a aplicação em hipertermia algumas adaptações tiveram que ser realizadas. A primeira é que os ensaios foram realizados em poços individuais previamente selados e cortados. O fato do cultivo ter sido realizado em poços individuais impossibilitou levar o material para a leitura de viabilidade no Plate Reader. Contudo, o ensaio de viabilidade via MTS (PROMEGA CORPORATION, 2012) é descrito como forma de quantificação de absorção, ou seja, um teste colorimétrico. Através dessas informações, levantou-se a hipótese que poderia ser possível medir a viabilidade adaptando o método MTS. Para tal seria necessário realocar o fluido que interagiu com o meio celular e o MTS para outra placa. Entretanto, esse processo não deve alterar o valor da viabilidade celular visto que o método MTS é um teste colorimétrico.

Assim, o teste preliminar consistiu em verificar a viabilidade celular já nas condições de contorno que seriam adotadas durante os ensaios de hipertermia e averiguar a hipótese levantada de que não haveria divergência de resultados em termos de viabilidade celular ao realocar o fluido do poço para outra placa. Para o teste foi preparado o seguinte conjunto de amostras: células controle, células + NP@DSPE, células + NP@PEG, células + NP@CH e células + NP@SDS. Foram utilizados 8 poços sob as mesmas condições para cada conjunto de

amostras garantindo assim resultados realizados em quadruplicata, sendo que 4 poços dos 8 terão seus materiais realocados.

Similarmente ao procedimento convencional de viabilidade por MTS, foram cultivadas 50 mil células por poço em 450 μ L de meio DMEM por 24h. Após o crescimento e fixação, as células foram incubadas com 50 μ L de cada respectiva amostra. Cada amostra foi previamente titulada em seu próprio recobrimento garantindo uma concentração de 2 mg/mL de NPs por solução. Em seguida, foi aplicado o procedimento de preparação de medida do MTS. No entanto, devido a adaptação do procedimento após o período de interação das células com o MTS, 4 dos 8 poços foram realocados para poços vazios e, em seguida, foram realizadas as leituras da viabilidade em todos os poços. Os resultados destes procedimentos são apresentados Figura 74.

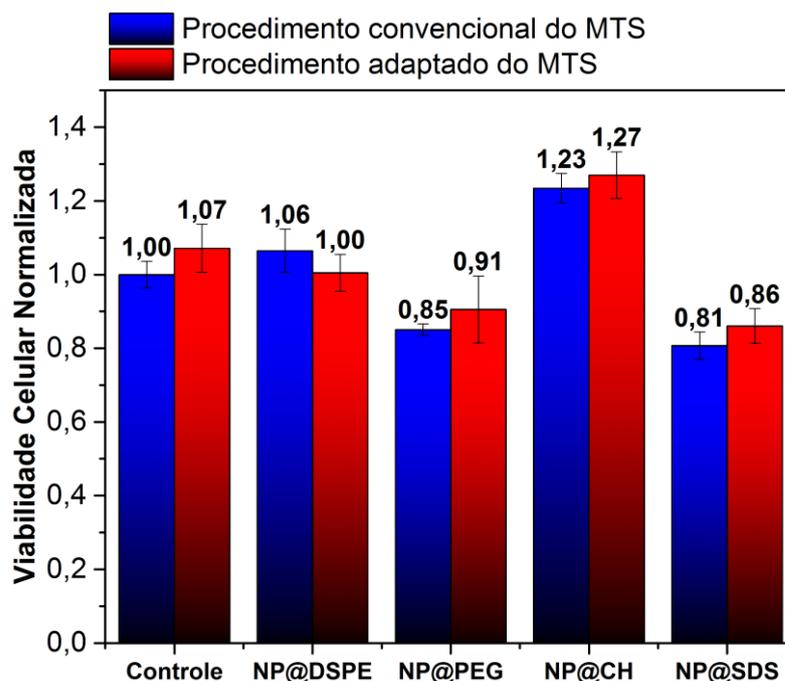


Figura 74 – Teste de viabilidade celular via MTS, a barra azul representa a medida realizada pelo procedimento convencional de leitura e a barra vermelha representa o procedimento adaptado de medida que consiste em realocar o material do poço com células a ser medido para outro poço vazio e realizar a leitura de viabilidade logo em seguida.

Por se tratar de médias estatísticas envolvendo desvios padrões definidos, foi aplicado o teste estatístico do tipo T, afim de comparar o procedimento convencional de MTS com o adaptado. Realizando esse teste nos resultados fornecidos na Figura 74 obteve-se relações compatíveis sem diferença estatística significativa entre cada conjunto amostral. A única

observação é que no procedimento adaptado houve um incremento na barra erro e este aumento está associado ao fato da produção de pequenas bolhas durante o processo de realocação do material nos poços vazios. Consequentemente, isto aumentou a incerteza da leitura da absorção de luz na placa.

Analisando a viabilidade celular, observou-se que nessas quantidades utilizadas a amostra contendo o recobrimento de CH estimulou o crescimento celular em aproximadamente 25% acima do valor das células controle. Outro ponto a considerar é que o SDS apresentou uma ligeira queda entre 14 e 19% na viabilidade celular se comparado ao controle, sugerindo que esta condição está bem próxima do limiar de aplicação biológica. Acima dessa concentração muito provavelmente o SDS apresentará índices de toxicidade indesejados para bioaplicação. Já as amostras contendo os recobrimentos com DSPE e o PEG não apresentaram grandes mudanças e ambas permanecem no regime de aplicabilidade. Assim sendo, fica comprovado a hipótese levantada para este caso permite a utilização do procedimento do MTS adaptado voltado para realização de hipertermia magnética em meios celulares.

6.7 Aplicação hipertérmica

Para explorar as propriedades da hipertermia em células foi feita a escolha de realizar a hipertermia apenas com a célula HEK293T. O principal foco da técnica é imprimir e quantificar o dano hipertérmico nas células via aplicação de um campo magnético externo às NPs previamente internalizadas nas células.

Durante o desenvolvimento do trabalho foram realizadas três tentativas de quantificação de viabilidade celular voltada para a hipertermia: Citometria, Countess e MTS adaptado. A possibilidade de se medir via Citometria e Countess foi descartada de acordo com a inviabilidade e incompatibilidade desses métodos com as amostras utilizadas neste trabalho. Assim, a quantificação do dano celular foi analisada através do método de MTS com algumas adaptações com descrito acima.

Para a aplicação hipertérmica foi necessário realizar uma adaptação, visto que não é possível colocar uma placa inteira dentro da bobina de aplicação hipertérmica. Para isso, foi necessário a elaboração de um protocolo que consiste em selar a placa de 24 poços com filme hidrofóbico esterilizado próprio para manipulação celular e cortar a placa de cultura em poços individuais. A razão de selar a placa serve para evitar possíveis contaminações durante os processos de manipulação dos poços. A imagem do poço individual a ser colocado no interior da bobina pode ser vista na Figura 75.



Figura 75 – Bobina magnética a esquerda e o poço individual de cultura celular previamente cortado a direita.

A escolha do tamanho de poço foi devido aos seguintes motivos: o tamanho deste poço ofereceu uma boa área favorecendo o crescimento celular durante o processo de incubação das respectivas amostras; outra razão é que este tamanho evitou desperdícios de material biológico; e a última razão pode ser acompanhada pela Figura 75 já que este tamanho de poço adequou-se as dimensões da bobina. Todos os ensaios de hipertermia foram realizados em triplicata.

Dessa forma, o procedimento experimental consistiu em três etapas: a primeira consiste em cultivar as células e incubá-las com os respectivos materiais nanoparticulados recobertos que cumpriram todos os requisitos exigidos para aplicação biológica; a segunda etapa consiste em analisar o dano às células via hipertermia magnética e a terceira e última etapa está associada a medir o dano produzido às células devido ao aquecimento celular via hipertermia magnética.

Para a hipertermia magnética foram preparados três conjuntos de amostras que são apresentadas na Tabela 5. Para o primeiro conjunto foram separadas as amostras que não serão submetidas ao tratamento via hipertermia magnética. Para a avaliação da evolução temporal da hipertermia magnética foram preparados o segundo e o terceiro conjunto de amostras, que serão submetidos à hipertermia por 500 e 1500 segundos, respectivamente. Além disso, em cada conjunto foram preparadas amostras com quantidades diferentes de NPs: 100 e 200 μg por poço. Todas essas escolhas servem para a avaliação de como funciona o processo de indução da morte celular no ensaio de hipertermia magnética nas células, de acordo com cada condição analisada.

Tabela 5 – Conjunto de amostras previamente preparadas em células HEK293T para aplicação biológica de acordo com cada configuração

Conjunto	Condição	Conteúdo do poço individual de células HEK293T	
1	Controle – sem aplicação de hipertermia magnética	Padrão de células	
		100 µg de NP por poço	NP@PEG
			NP@CH
			NP@SDS
			NP@DSPE
		200 µg de NP por poço	NP@PEG
			NP@CH
			NP@SDS
NP@DSPE			
2	Com aplicação de hipertermia magnética a 200 Oe por 500 segundos	Padrão de células	
		100 µg de NP por poço	NP@PEG
			NP@CH
			NP@SDS
			NP@DSPE
		200 µg de NP por poço	NP@PEG
			NP@CH
			NP@SDS
NP@DSPE			
3	Com aplicação de hipertermia magnética a 200 Oe por 1500 segundos	Padrão de células	
		100 µg de NP por poço	NP@PEG
			NP@CH
			NP@SDS
			NP@DSPE
		200 µg de NP por poço	NP@PEG
			NP@CH
			NP@SDS
NP@DSPE			

A escolha do tempo utilizado foi baseada em testes preliminares realizados. Onde observou-se que tempos inferiores a 500 segundos não infligia dano celular significativo e tempos superiores a 1500 s oferecia muita influência de calor externo devido ao aquecimento da bobina por efeito Joule. Assim, foram previamente analisadas condições nas quais tornam o

tratamento mais eficiente, sem exceder as condições que uma célula suporta. Embasado nesses motivos, foi adotado 200 A de corrente na fonte, que fornece um campo de aproximadamente 200 Oe para a bobina segundo as especificações do fabricante, para a geometria de bobina utilizada. Através destes resultados preliminares escolheu-se dois intervalos de tempo distintos. O primeiro intervalo foi de 500 s que foi onde iniciou-se o dano infligido à célula de maneira significativa; já o segundo intervalo foi de 1500 s, o qual representou o limiar do dano máximo que o equipamento pode oferecer sem que os efeitos externos influenciassem muito no sistema. Para a realização do ensaio de hipertermia descrito nesta etapa, a amostra foi inserida no interior da bobina de acordo com a Figura 76.



Figura 76 – Arranjo experimental para hipertermia voltado a aplicações biológicas constituído de uma bobina para a indução do campo, o termômetro ótico e o poço individual previamente cortado contendo células com NPs e seus respectivos recobrimentos.

Todos os experimentos de hipertermia foram realizados com uma temperatura ambiente controlada de 25°C. Entretanto, durante a execução do tratamento magneto hipertérmico as amostras aqueciam. Para 500 segundos de tratamento as amostras obtinham em média a temperatura de $(36,0 \pm 1,5)$ °C, enquanto que para 1500 segundos as amostras chegavam a uma temperatura de $(43,0 \pm 2,5)$ °C. Para reduzir a interação de calor por condução da bobina para a amostra foi instalado um fluxo de ar entre os vãos da bobina, buscando garantir, dentro das limitações experimentais, que o dano produzido fosse somente devido ao aquecimento via hipertermia magnética.

Para quantificar o dano produzido no material biológico através da hipertermia magnética foi utilizado o método proposto na seção 6.6.3. O resultado da ação da hipertermia em diferentes tempos e concentrações de nanomaterial é apresentado na Figura 77.

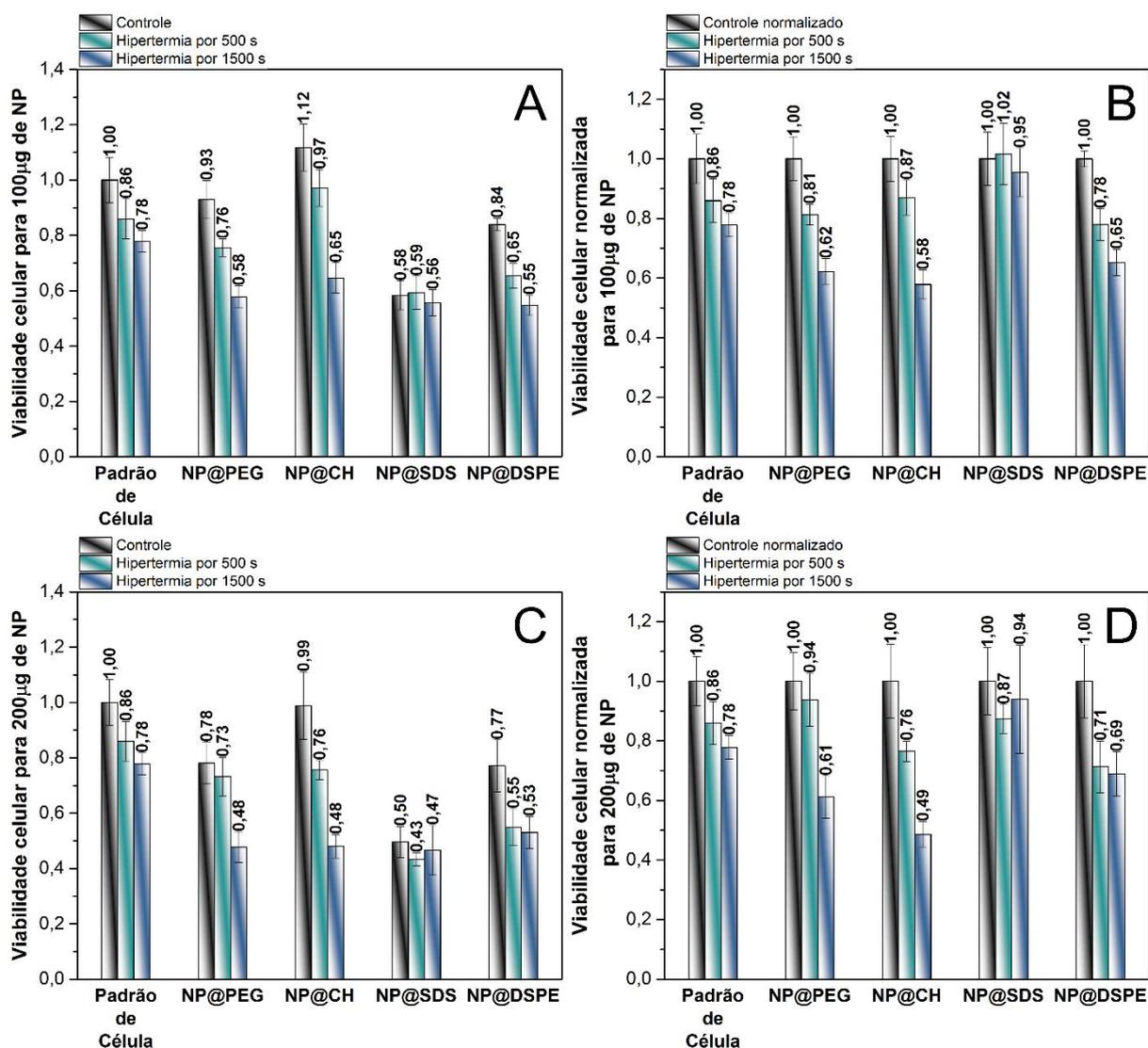


Figura 77 – Resultado da viabilidade celular via MTS adaptado para hipertermia magnética realizada na célula HEK293T com as amostras NP@PEG, NP@CH, NP@SDS e NP@DSPE. (A) Viabilidade celular referente a hipertermia para 100 µg de NP para cada amostra. (B) Viabilidade celular normalizada pelo controle individual de cada recobrimento referente a hipertermia para 100 µg de NP para cada amostra. (C) Viabilidade celular referente a hipertermia para 200 µg de NP para cada amostra. (D) Viabilidade celular normalizada pelo controle individual de cada recobrimento referente a hipertermia para 200 µg de NP para cada amostragem

Analisando os resultados referente à hipertermia de maneira global na Figura 77, observa-se uma tendência de indução à morte celular para todos os sistemas. Além disso, ao aumentar a concentração de NPs aumentou-se significativamente a toxicidade, especialmente

para a amostra NP@SDS, não sendo mais indicada para aplicações biomédicas hipertérmicas sob essas condições. A partir do resultado obtido diretamente da viabilidade celular (imagens A e C da Figura 77) realizou-se uma normalização dos dados, referente ao controle de cada amostra e o resultado dessa normalização são os gráficos B e D da Figura 77. Através dos gráficos B e D da Figura 77 pode-se verificar que as amostras que passam pelo tratamento hipertérmico a 500 s apresentam uma taxa de morte suave se comparado aos seus controles. Por se tratar de médias e envolver desvios deve-se aplicar o teste estatístico T. Como a análise envolve 3 colunas, será realizada uma análise por blocos. A primeira análise será a comparação entre a coluna “Controle” com a coluna “Hipertermia por 500 s” para os dados referentes a imagem B da Figura 77. Os resultados desta análise estatística estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultado do teste estatístico T para a Figura 77B entre as colunas Controle e Hipertermia por 500 s com 100 µg de NPs para cada amostra recoberta.

Teste estatístico T realizado entre o resultado do controle e a hipertermia por 500 s referentes a Figura 77B		Resultado do teste estatístico para 100 µg de NP
Controle do Padrão de células	Hipertermia por 500 s do Padrão de células	A diferença existe, entretanto, esta diferença não é considerada estatisticamente relevante
Controle da NP@PEG	Hipertermia por 500 s da NP@PEG	Não existe diferença estatística relevante
Controle da NP@CH	Hipertermia por 500 s da NP@CH	A diferença existe, entretanto, esta diferença não é considerada estatisticamente relevante
Controle da NP@SDS	Hipertermia por 500 s da NP@SDS	Não existe diferença estatística relevante
Controle da NP@DSPE	Hipertermia por 500 s da NP@DSPE	A diferença é estatisticamente muito relevante

A partir desta análise estatística fica evidente que há uma pequena indução à morte celular via hipertermia por 500 s, sendo que essa taxa é suave para a maioria dos casos e, para a amostra NP@DSPE, a diferença é mais relevante. Os casos onde não houve nenhuma diferença foram a amostra NP@PEG e a amostra NP@SDS. No caso da NP@SDS seus valores de viabilidade celular já são muito baixos, não sendo mais recomendados para bioaplicações sob essas condições.

A segunda análise será repetir o teste estatístico T para o outro bloco de informações comparando coluna “Controle” com a coluna “Hipertermia por 1500 s” para os dados referente a imagem B da Figura 77. Os resultados referentes a análise estatística estão na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultado do teste estatístico T para a Figura 77B entre as colunas Controle e Hipertermia por 1500 s com 100 µg de NPs para cada amostra recoberta

Teste estatístico T realizado entre o resultado do controle e a hipertermia por 1500 s referentes a Figura 77B		Resultado do teste estatístico para 100 µg de NP
Controle do Padrão de células	Hipertermia por 1500 s do Padrão de células	A diferença é estatisticamente relevante
Controle da NP@PEG	Hipertermia por 1500 s da NP@PEG	A diferença é estatisticamente muito relevante
Controle da NP@CH	Hipertermia por 1500 s da NP@CH	A diferença é estatisticamente muito relevante
Controle da NP@SDS	Hipertermia por 1500 s da NP@SDS	Não existe diferença estatística relevante
Controle da NP@DSPE	Hipertermia por 1500 s da NP@DSPE	A diferença é estatisticamente muito relevante

A análise estatística para este caso certifica-se de que existe uma indução à morte celular via hipertermia por 1500 s, relevante para a maioria dos casos, sendo que acontece de maneira expressiva para a amostra NP@DSPE. O único resultado em que não houve diferença foi o resultado com a NP@SDS, cujos motivos já foram discutidos. Ao comparar a hipertermia em 500 s com a realizada durante 1500 s observa-se um incremento significativo na taxa de morte celular, cujo resultado já era esperado, visto que ao aplicar um tempo maior de tratamento amplifica-se o stress hipertérmico sob as células. Outro fator é que ao aumentar a quantidade de NPs de 100 para 200 µg aumenta-se o potencial da hipertermia magnética. Entretanto, essas quantidades estão próximas do limiar tolerado pelo meio celular. Este resultado é observado ao comparar as imagens B e D da Figura 77. Um teste prévio revelou que 1mg de NP para esse tamanho de poço torna o sistema totalmente tóxico para qualquer recobrimento. Este teste foi baseado na literatura (SINGH *et al.*, 2010) que trata da citotoxicidade das nanopartículas de magnetita em meios celulares, portanto é necessário respeitar um regime de operação pré-determinado sem excedê-lo.

A terceira análise consiste em realizar o teste T nos dados pertinentes a Figura 77 D onde são comparados o “Controle” e a “Hipertermia por 500 s” (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultado do teste estatístico T para a Figura 77D entre as colunas Controle e Hipertermia por 500 s com 200 µg de NPs para cada amostra recoberta

Teste estatístico T realizado entre o resultado do controle e a hipertermia por 500 s referentes a Figura 77D		Resultado do teste estatístico para 200 µg de NP
Controle do Padrão de células	Hipertermia por 500 s do Padrão de células	A diferença existe, entretanto, esta diferença não é considerada estatisticamente relevante
Controle da NP@PEG	Hipertermia por 500 s da NP@PEG	Não existe diferença estatística relevante
Controle da NP@CH	Hipertermia por 500 s da NP@CH	A diferença é estatisticamente relevante
Controle da NP@SDS	Hipertermia por 500 s da NP@SDS	Não existe diferença estatística relevante
Controle da NP@DSPE	Hipertermia por 500 s da NP@DSPE	A diferença é estatisticamente relevante

A partir desta análise estatística verifica-se uma indução à morte celular relevante via hipertermia por 500 s para as amostras NP@CH e a NP@DSPE. Os casos em que não houve nenhuma diferença relevante foram para a amostra NP@PEG e para a NP@SDS. A seguir deve-se repetir o teste estatístico T para o outro bloco de informações comparando coluna “Controle” com a coluna “Hipertermia por 1500 s” para os dados referente a imagem D da Figura 77. Os resultados referentes a análise estatística são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultado do teste estatístico T para a Figura 77D entre as colunas Controle e Hipertermia por 1500 s com 200 µg de NPs para cada amostra recoberta

Teste estatístico T realizado entre o resultado do controle e a hipertermia por 1500 s referentes a Figura 77D		Resultado do teste estatístico para 200 µg de NP
Controle do Padrão de células	Hipertermia por 1500 s do Padrão de células	A diferença é estatisticamente relevante
Controle da NP@PEG	Hipertermia por 1500 s da NP@PEG	A diferença é estatisticamente muito relevante
Controle da NP@CH	Hipertermia por 1500 s da NP@CH	A diferença é estatisticamente muito relevante
Controle da NP@SDS	Hipertermia por 1500 s da NP@SDS	Não existe diferença estatística relevante
Controle da NP@DSPE	Hipertermia por 1500 s da NP@DSPE	A diferença é estatisticamente relevante

Os resultados estatísticos para 200 µg de NPs referentes à Figura 77 D apresenta uma tendência parecida com a amostragem de 100 µg de NPs. Entretanto para 200 µg de NPs, pode-se observar que a amostra NP@CH apresentou a estimulação do crescimento celular já observados em outros resultados anteriores os quais envolviam viabilidade celular. Este fenômeno apresentou um alto impacto em aplicações hipertérmicas, pois ao utilizar duas concentrações diferentes de NPs interferiu-se diretamente no fator disponibilidade de NPs. A presença da CH no meio estimulou o aumento do número de células no meio; entretanto, neste caso específico a quantidade de NPs disponível também foi aumentada. Devido a estes fatores combinados, a taxa de internalização de NPs foi maior, conseqüentemente o tratamento hipertérmico foi mais efetivo na amostra NP@CH com 200 µg.

O fator disponibilidade de material para a internalização celular é um ponto importantíssimo neste caso, visto que a amostra NP@CH internalizou muito mais material produzindo assim mais danos às células. Assim é possível inferir que a ordem do maior para o menor dano por recobrimento em 1500s foi: CH > PEG > DSPE > SDS. O SDS nessas condições de concentrações entrou em um regime tóxico não sendo mais indicado para aplicações hipertérmicas. Dentro desse conjunto de medidas é possível assegurar que a NP@CH apresentou os melhores resultados junto as amostras NP@DSPE e NP@PEG. A NP@CH destacou-se especialmente em regimes de alta concentração de NPs com um tempo de aplicação hipertérmica. Outra informação que pode ser extraída é que o aquecimento apenas da bobina para altos tempos provoca um pequeno stress celular que pode ser observado na viabilidade celular no padrão de células HEK.

6.8 Discussão geral dos resultados

Os primeiros resultados do trabalho estão relacionados à síntese dos nanomateriais. De acordo com a síntese adotada (HOU; XU; SUN, 2007), obteve-se NPs de óxido de ferro magnéticas esféricas com 15 nm de diâmetro. O produto da síntese forneceu NPs suspensas em ácido oleico e oleilamina. Nesta condição as NPs apresentaram uma ótima estabilidade, porém sua solução encontrava-se com caráter hidrofóbicos. Para bioaplicações é importante que as NPs sejam solúveis em água. Assim, na primeira etapa do trabalho, buscou-se uma rota para se modificar o recobrimento das NPs seguido da escolha de três classes diferentes de recobrimentos com dois tipos de cada classe conforme ilustração da Figura 78. Dentre as estratégias de recobrimento, a amostra NP@DPPC apresentou problemas relacionados à baixa estabilidade e dispersabilidade em meio aquoso, sendo, portanto, descartada para bioaplicações. A escolha em se realizar o recobrimento desses nanomateriais com diferentes estruturas, ao invés de comprá-los prontos, está baseado no controle de todo o processo/sistema que vai desde a síntese até as bioaplicações, permitindo assim realizar um estudo aprofundado de correlação entre as estruturas do nanomaterial e sua aplicação biológica.

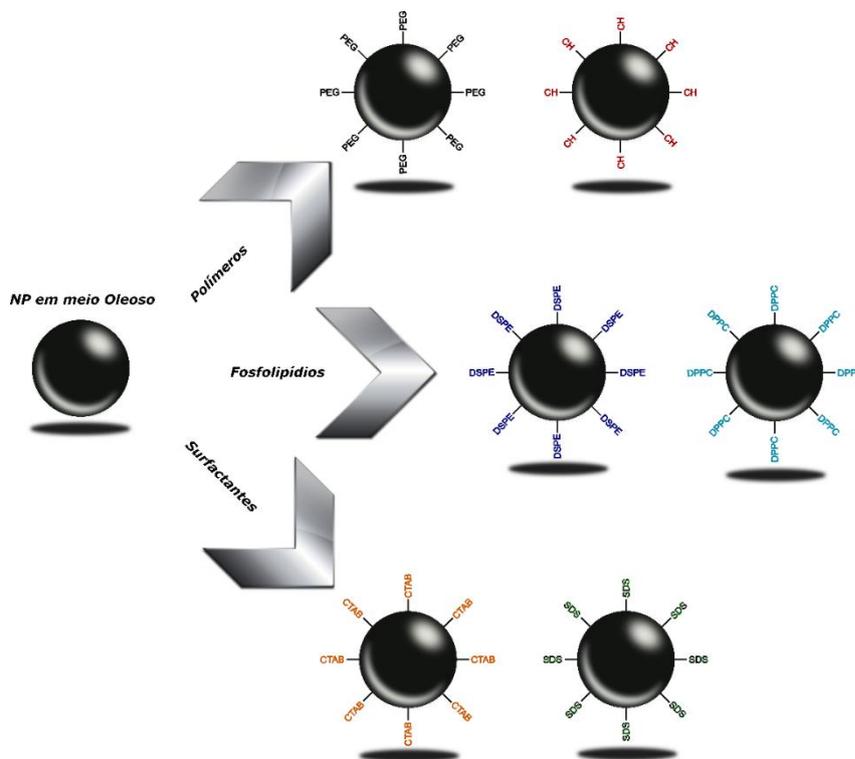


Figura 78 – Esquema dos recobrimentos das NPs de acordo com suas classes e tipos adotados durante o trabalho.

Para os polímeros foram sintetizadas as amostras NP@PEG e NP@CH, para os fosfolipídios obteve-se as amostras NP@DSPE e NP@DPPC e para os surfactantes foram adotadas as amostras NP@CTAB e NP@SDS.

A respeito da morfologia e tamanho, foi possível NPs esféricas de $15 \pm 1,5 \text{ nm}$ de diâmetro. Se comparado ao trabalho de inspiração (HOU; XU; SUN, 2007), onde as NPs apresentavam um diâmetro de 14 nm , verifica-se o sucesso na síntese do nanomaterial. Ainda a respeito da morfologia do nanomaterial, foi encontrado alguns aglomerados que puderam ser observados no imageamento por MEV. Entretanto, esses aglomerados são previstos pela teoria de tal forma que as NPs se aglomeram devido a interação dipolar e devido a força interpartícula. Assim, para minimizar esses efeitos antes de qualquer ensaio ou experimento, as amostras foram submetidas à sonicação seguida de agitação constante por pelo menos 30 min, pois a vibração em nível ultrassônico detém uma energia suficiente para quebrar essas ligações e, conseqüentemente, liberar as NPs dos respectivos aglomerados. Apesar da microscopia de varredura não apresentar resolução suficiente para mostrar o tamanho real das nanopartículas, ela exhibe os maiores tamanhos dos aglomerados observáveis na amostra que se encontram na faixa de 50 – 150 nm.

A caracterização magnética MxH possibilitou o estudo do estado superparamagnético das NPs. Os resultados evidenciaram que acima de 250K de temperatura as amostras encontraram-se no estado superparamagnético. Isto ocorre devido aos monodomínios magnéticos provenientes do tamanho reduzido das NPs. Nestas condições, os monodomínios magnéticos não apresentam estabilidade ao eixo magnético preferencial. Esta instabilidade acontece devido à rápida inversão dos momentos magnéticos dos monodomínios em um curto tempo para este tipo de medida; este fenômeno é conhecido como macrospin. Devido a este fenômeno as amostras apresentaram ausência de magnetização remanescente e campo coercitivo nulo, características típicas do regime superparamagnético. Abaixo de 250K de temperatura observou-se o incremento do campo coercitivo e da magnetização remanescente; pois ao diminuir a temperatura alterou-se o ordenamento magnético do material dificultando a inversão dos momentos magnéticos de cada domínio magnético. Sob essas condições diz-se que as NPs se encontram bloqueadas. O resultado combinado de MxH com o TGA foi, em alguns casos, capaz de encontrar o resultado esperado entre 90 – 92 emu/g para magnetização de saturação M_s , em outros casos isto não foi possível devido a formação de alguns grumos.

As informações obtidas através das curvas de MxT de magnetometria permitiram encontrar a temperatura de bloqueio média T_B e relacionar esses valores com os volumes médios dos aglomerados. A literatura prevê que para 15 nm de NP a temperatura de bloqueio média deve estar em torno de 17K de temperatura (PEREZ, N *et al.*, 2008; WINKLHOEER; FABIAN; HEIDER, 1997). Utilizando essa informação e aplicando-a nas medidas de magnetometria encontra-se o valor aproximado de 18 K para a temperatura de bloqueio. Através

desta associação é possível realizar uma estimativa do tamanho médio dos aglomerados pela magnetometria que está na faixa de 30 nm. O valor do tamanho do diâmetro encontrado das nanopartículas através do SAXS foi primordial para estimar o tamanho dos aglomerados durante a magnetometria. A aglomeração foi também evidenciada pelo imageamento por TEM e, baseando-se nesse resultado, foi elaborado um esquema da aglomeração dessas NPs que pode ser acompanhado na Figura 79.

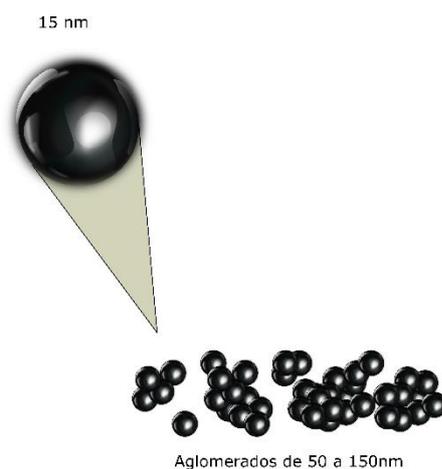


Figura 79 – Esquema da formação de aglomerados através da interação dipolar entre as NPs de magnetita.

O processo de secagem também favoreceu a aglomeração das NPs. Ao ao secar a amostra aproximou-se consideravelmente uma NP da outra. Em alguns casos, este processo pode ter removido a barreira eletrostática e mecânica que protegem o nanomaterial. Portanto, ao secar a amostra, a aglomeração dos nanomateriais é diretamente induzida.

Além disso, não foi possível realizar completamente o processo de secagem da amostra NP@PEG, visto que a temperatura de evaporação do PEG depende de suas ligações carbônicas que queimam nas proximidades 250-400°C segundo os resultados obtidos pelo TGA. Dessa forma, o PEG por ser muito higroscópico na permite a secagem tradicional no vácuo a 80 °C. Para a remoção completa seria necessária uma temperatura muito maior que a utilizada, entretanto esses patamares elevados de temperatura alteram a morfologia das NPs e, por isso, a amostra não foi submetida a esse regime extremo. Por essas razões, as medidas de magnetometria da amostra NP@PEG foram comprometidas apresentando um baixo sinal de magnetização. Porém, mesmo com sinal baixo observa-se a alta sensibilidade do equipamento S.Q.U.I.D. que consegue detectar essas variações mesmo sendo tão sutis.

O TGA também possibilitou uma análise mais precisa e detalhada do cálculo do SAR. Estes resultados evidenciaram que as amostras NP@CTAB e NP@SDS apresentavam os

maiores índices de SAR. No entanto, essas amostras não são indicadas ao tratamento proposto. Sendo assim, as amostras NP@CH e NP@DSPE desempenharam os melhores resultados sendo estatisticamente equivalentes uma a outra em termos de SAR. Já a amostra NP@PEG apresentou o índice mais baixo de SAR e este resultado já era esperado devido à composição da amostra.

Em um coloide magnético cabe avaliar o comportamento dos mecanismos que mantêm a estabilidade da amostra (HONARY; ZAHIR, 2013). A técnica disposta para a avaliação dessa estabilidade eletrostática é o potencial zeta. Em geral valores, em módulo, perto de 30 mV apresentam uma boa estabilidade, e acima de 40 mV garante-se que dificilmente a amostra sedimentará. Entretanto o potencial zeta para amostras NP# e NP@DPPC apresentou sedimentação durante o ensaio, devido à falta de estabilidade coloidal em água. Assim, estas amostras não foram consideradas para os testes biológicos.

NPs recobertas foram testadas sob regime biológico de viabilidade celular em células HEK293T e células U2OS. Ao analisar os resultados é possível observar uma tendência comportamental similar para ambos os casos, de tal forma que a amostra recoberta com o CTAB é altamente citotóxica nas concentrações testadas. Apesar do SDS também ser um surfactante sob baixas concentrações, o mesmo pode ser utilizado em aplicações biológicas em baixas concentrações. No entanto, para altas concentrações, como foi visto no caso da hipertermia magnética, a amostra NP@SDS apresentou altos índices tóxicos à célula HEK293T. Já os polímeros e os fosfolipídios apresentaram alta compatibilidade com as aplicações biológicas.

Para quantificar NPs que são absorvidas pelas células foi aplicado o protocolo MILC (GALIMARD *et al.*, 2012). O interesse deste estudo está associado ao mecanismo de internalização das NPs e como diferentes recobrimentos levam a célula a internalizar as nanoestruturas. O esquema de internalização do nanomaterial por endocitoses celulares está representado na Figura 80.

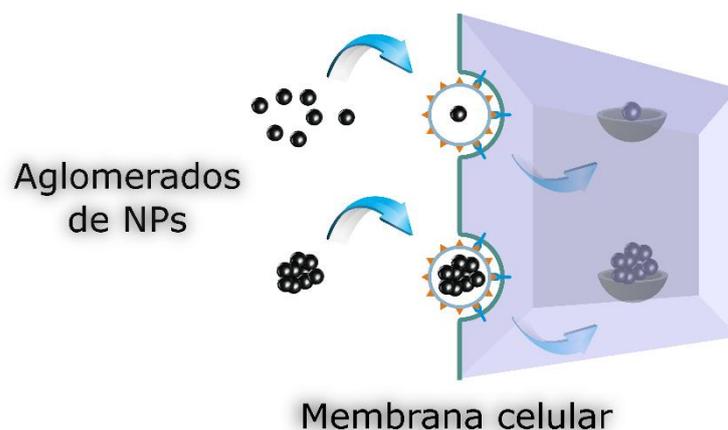


Figura 80 – Esquema da internalização das NPs através da endocitose na membrana celular. Após a endocitose as NPs iniciam o tráfego celular.

Foi observado que essa internalização (RADAIC *et al.*, 2016) de NPs depende do tipo de recobrimento e da disponibilidade de nanomaterial de acordo com a população celular adotada. O destino que o nanomaterial transcorrerá no interior da célula é conhecido como tráfego celular. O percurso no interior da célula dependerá da composição do nanomaterial endocitado. O interesse deste estudo está associado à eficiência da hipertermia. Assim, quanto mais nanomaterial internalizado, maior será o dano durante a hipertermia. A razão disso, é que a maior parte das organelas residem no interior da célula e, portanto, produzir o calor de dentro para fora da célula, em teoria, produziria um dano muito mais significativo. O protocolo MILC consiste em medir de maneira indireta a quantidade de NPs internalizada através da massa de ferro que o ácido clorídrico consegue dissolver de todos os sistemas. Este processo depende intimamente de dois fatores: número de células envolvidas e da disponibilidade de nanomaterial para a internalização. No caso do recobrimento com CH, as células são estimuladas aumentando em número. Esse fenômeno de crescimento celular estimulado já foi observado para algumas concentrações específicas de quitosana contendo NPs na literatura (RODRIGUES *et al.*, 2012). Entretanto o protocolo MILC revelou uma desproporção na razão de internalização de NPs/célula para a amostra NP@CH. No caso em questão, a amostra NP@CH apresentou o menor valor de internalização em termos da massa de ferro se comparada as outras amostras. Este resultado ocorreu devido à baixa quantidade de NPs disponível se comparada ao número de células que foi aumentado pela presença da CH no meio celular.

A microscopia confocal traz informações morfológicas a respeito das células HEK293T e das células U2OS. Além disso, a técnica evidencia como a NP@CTAB é nociva a essas células corroborando com os resultados obtidos via MTS. Em uma análise mais apurada

constata-se que as NPs são encontradas no citoplasma celular, confirmando espacialmente o resultado encontrado no UV-VIS.

Os valores de SAR foram dentro do esperado para amostras superparamagnéticas. O valor baixo de SAR obtido para as amostras está associado mecanismo de aquecimento que elas realizam. Devido ao tamanho reduzido das NPs perto do tamanho crítico (15 nm); o mecanismo de aquecimento está associado à relaxação dos momentos magnéticos pela relaxação de Néel e Browniana ao mesmo tempo, sendo os dois eventos competitivos entre si. Assim, em aplicações biológicas o tempo de submissão ao campo magnético para se produzir um aquecimento efetivo deverá ser relativamente elevado para que se produza algum dano significativo as células. O que justificou os tempos adotados para o tratamento hipertérmico de 500 e 1500 s.

Devido à complexidade do tratamento via magneto hipertermia, foi necessário escolher apenas um tipo de célula para bioaplicação e, na ocasião, foi escolhida a HEK293T. Além disso, houve uma dificuldade durante o processo de quantificação do dano que seria produzido nas células. A ideia central para se quantificar o dano produzido era utilizar a técnica de citometria de fluxo para este propósito, entretanto a técnica apresentou falsos positivos e teve que ser descartada. Buscando resolver o problema, outros testes foram realizados como as medidas de viabilidade celular no Countess utilizando o marcador *trypan blue*. Todavia o Countess foi incapaz de fornecer informações precisas devido a coloração escura das NPs de óxido de ferro inviabilizando a leitura. Estas adversidades foram superadas através do princípio de funcionamento do teste de viabilidade celular pelo método MTS modificado. A hipótese era que devido ao fato do MTS ser um teste colorimétrico não haveria problemas em se realocar o fluido o qual já havia interagido com as células para uma outra placa, para que assim essa placa pudesse ser levada à leitura segundos antes que antecediam as medidas. O passo a passo da aplicação magneto hipertérmica *in vitro* em células HEK293T pode ser acompanhado no esquema da Figura 81. Neste processo, primeiramente as células são incubadas com 100 µg e 200 µg de NPs com seus respectivos recobrimentos durante 24 h. Em seguida, deve-se submeter as células ao tratamento magneto hipertérmico durante os intervalos de 500 e 1500 s e, por fim, o resultado deste processo é medido através do teste de viabilidade celular via MTS adaptado.

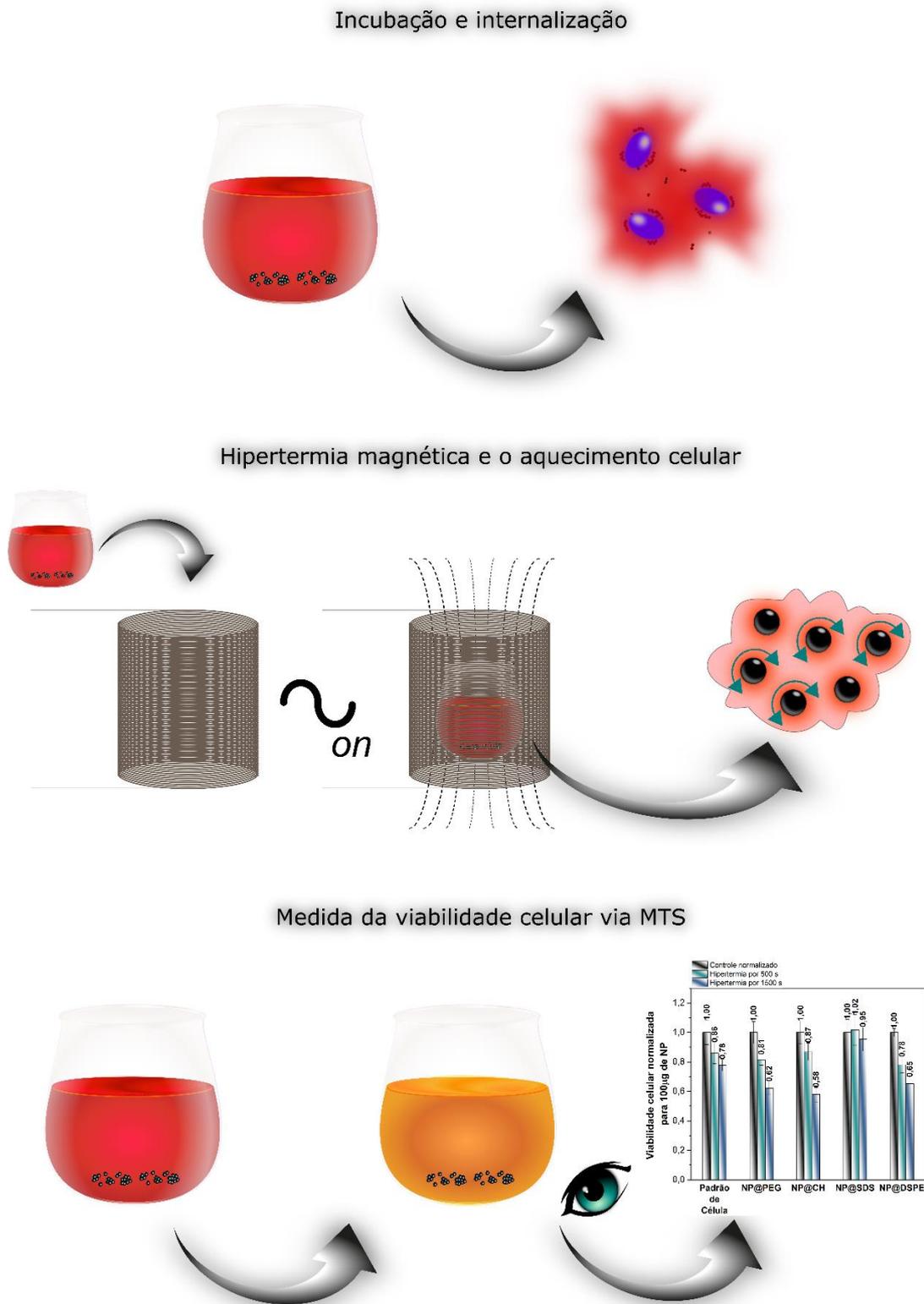


Figura 81 – Esquema do passo a passo do ensaio de hipertermia magnética nas células. O primeiro processo está associado à incubação das amostras com as células em poços individuais. Após 24 h estes poços individuais são levados para a aplicação magneto hipertérmica *in vitro*, onde as NPs no interior do citoplasma serão aquecidas. O último passo consiste no registro do dano celular infligido via MTS adaptado.

O tratamento hipertérmico foi aplicado em apenas quatro recobrimentos: DSPE, PEG, CH e SDS. Entretanto, a NP@SDS não evidenciou um bom resultado durante a aplicação; apresentando altos índices de toxicidade às células. Portanto, apenas as amostras NP@CH, NP@PEG e NP@DSPE atingiram uma boa performance durante o ensaio, sendo possível quantificar o índice de dano celular. A CH se destacou devido à disponibilidade de nanomaterial versus número de células presentes durante o ensaio. De acordo com o resultado do SAR era esperado que as amostras NP@DSPE e NP@CH apresentassem os melhores resultados do que a amostra NP@PEG. Esta hipótese levantada foi confirmada nos testes de SAR. Todavia, a quantidade de nanomaterial disponível versus o crescimento celular estimulado foi determinante para definir que a NP@CH apresentasse a melhor performance durante o tratamento magneto hipertérmico nas células HEK293T.

Conclui-se então que a NP@CH apresentou o melhor resultado especialmente para a amostra contendo 200µg NPs por poço, contudo a NP@PEG e a NP@DSPE também cumpriram os requisitos para testes biológicos em hipertermia, sendo essas três amostras indicadas para futuros testes *in vitro* (Figura 82).

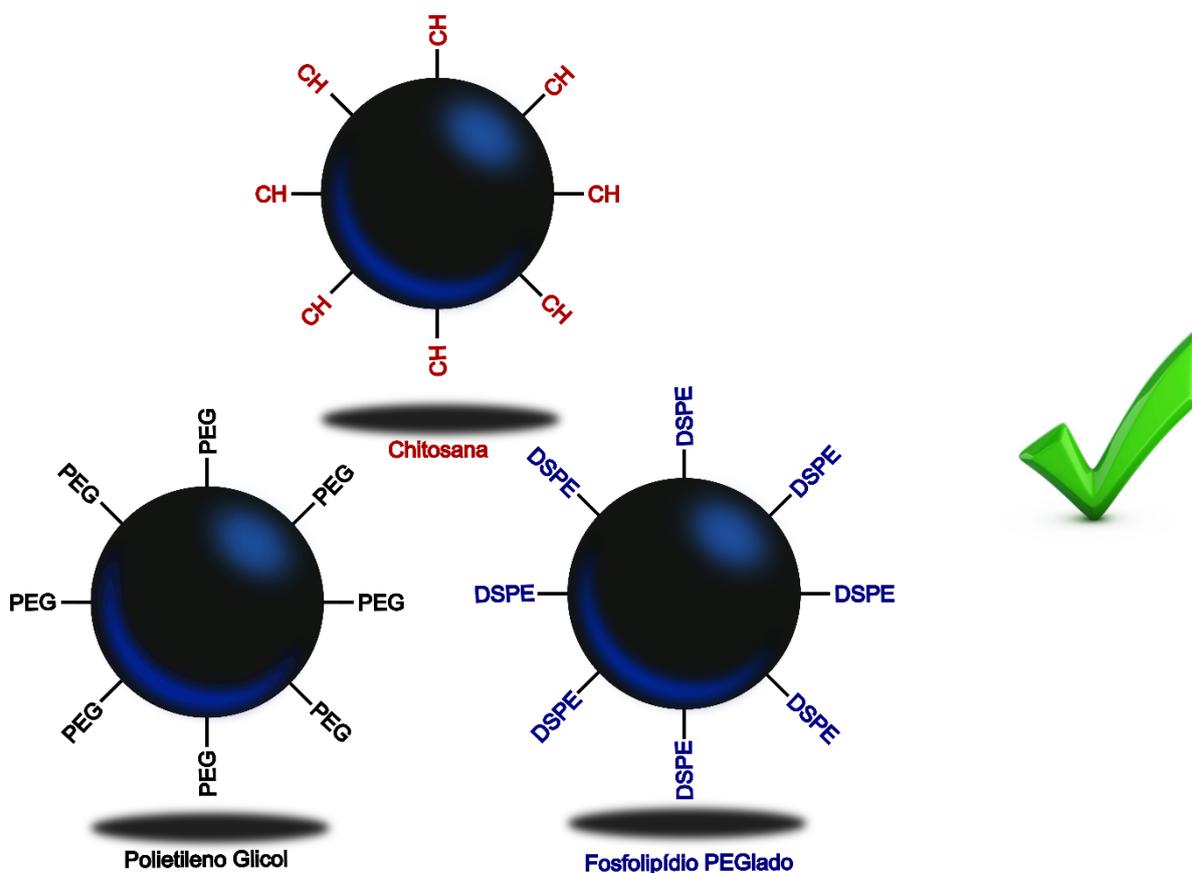


Figura 82 – Conjunto das amostras NP@CH, NP@PEG e NP@DSPE recomendadas para aplicação magneto hipertérmica *in vitro* em células de HEK293T.

7 *Perspectivas Futuras*

Durante o desenvolvimento do trabalho foi realizada uma colaboração com um outro projeto envolvendo o estudo de vórtices magnéticos voltados a aplicação magneto hipertérmicas *in vitro* em células HEK293T. A contribuição para este trabalho foi especialmente na aplicação do conceito de internalização de NPs. O resultado deste estudo gerou um artigo que é apresentado em Anexo.

Uma das perspectivas futuras deste trabalho é realizar o procedimento de hipertermia magnética para as células de U2OS e assim dar continuidade ao trabalho. Será interessante testar diferentes condições de contorno como o tempo de incubação e o tempo de tratamento magneto hipertérmico.

Durante o desenvolvimento do trabalho levantou-se a hipótese que seria possível aplicar esses diferentes recobrimentos a outros sistemas nanoparticulados. Para testar esta hipótese foram utilizados nanoanéis de magnetita desenvolvidos no trabalho tese (BARALDI, 2015) de um dos integrantes grupo de pesquisa. O resultado foi surpreendentemente satisfatório. Mesmo os nano anéis sendo relativamente grandes (acima de 100 nm) se comparados aos SPIONs (15 nm), foi possível estabilizá-los em uma solução coloidal com PEG. A estratégia empregada para os recobrimentos foram as mesmas utilizadas para os SPIONs. No entanto, apenas a amostra com PEG foi bem-sucedida no quesito estabilização. Talvez seja possível aplicar outras estratégias de recobrimento desde que alguns ajustes sejam feitos. Para verificar como o recobrimento aderiu aos nanoanéis, foi realizada a microscopia de varredura incluindo as amostras que não foram estabilizadas e os resultados da microscopia são apresentados na Figura 83.

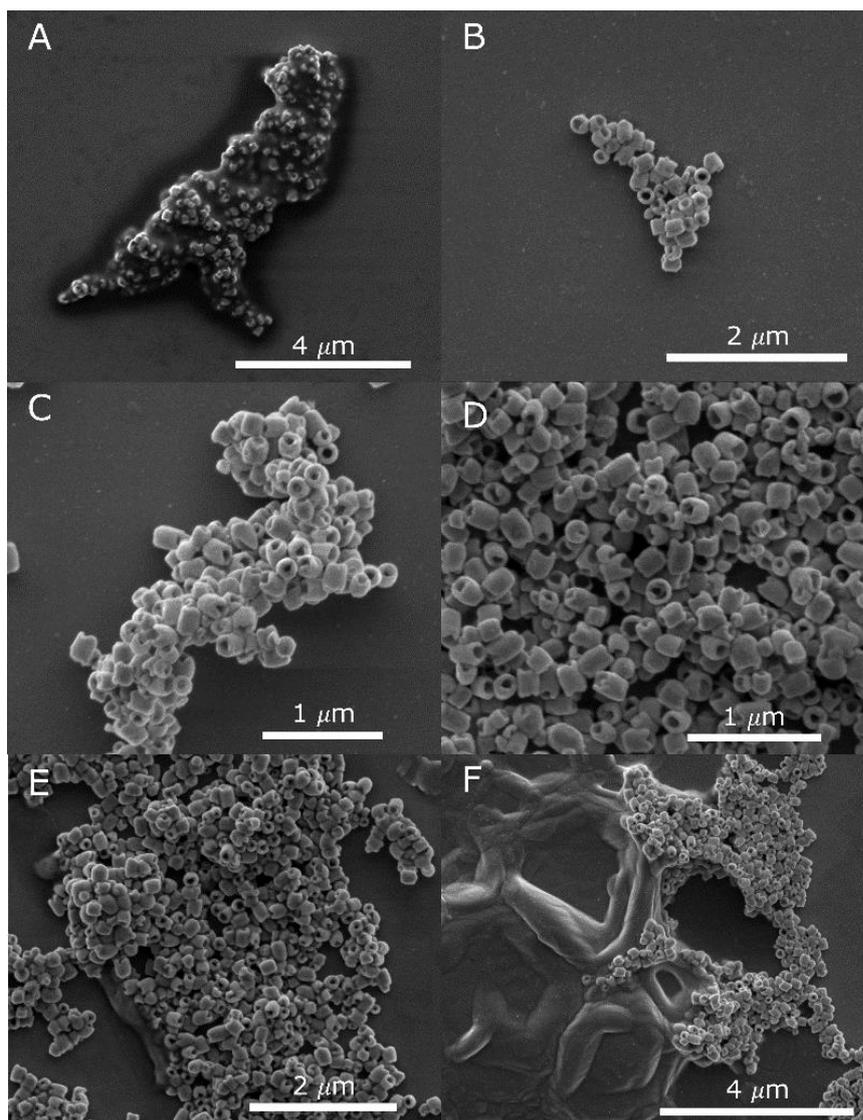


Figura 83 – Microscopia de varredura dos nano anéis recobertos com: (A) PEG; (B) CH; (C) CTAB; (D) SDS; (E) DSPE; (F) DPPC.

Ao observar a imagem A confirmou-se que NPs com PEG estão em um processo de adsorção bem consistente, o que garante a estabilidade eletrostática da amostra. Há alguns indícios de que seria possível atingir essa estabilização em alguns casos, especialmente para o DPPC (imagem F) onde é possível observar o início do processo de adsorção do recobrimento com os nanoanéis. Entretanto alguns ajustes ainda devem ser realizados para que processo seja ideal. Já para os outros casos seria necessário realizar algumas alterações nos processos de recobrimentos buscando modificar a afinidade química da superfície das NPs tornando-as compatíveis com os outros recobrimentos utilizados. Portanto, fica a proposta da união dos resultados obtidos nas duas teses para o desenvolvimento de um novo projeto.

8 Conclusões

Os aspectos apresentados neste trabalho permitiram alcançar o objetivo geral que era desenvolver amostras biocompatíveis e capazes de desempenhar o um bom desempenho durante o tratamento de hipertermia *in vitro*. Para tal, foram realizadas análises e observações de como NPs com diferentes recobrimentos são aplicadas no tratamento magneto hipertérmico *in vitro* em células HEK293T. Além disso, as investigações dos comportamentos desses materiais permitiram o desenvolvimento de sínteses de amostras de NPs recobertas chamadas de NP@CH, NP@PEG, NP@CTAB, NP@SDS, NP@DSPE e NP@DPPC. A obtenção dos resultados foi consistente em cada etapa de caracterização amostral. Isso permitiu uma formulação sólida a respeito das informações físico-químicas e morfológicas de cada amostra. Desta forma, foi possível identificar os materiais que atendem os requisitos de biocompatibilidades exigidos para a utilização do nanomaterial em aplicações *in vitro*.

A síntese das NPs superparamagnéticas e seus respectivos recobrimentos mostraram resultados de acordo com a metodologia empregada. O resultado da síntese de NPs esféricas foi verificado através das técnicas de caracterização morfológicas das amostras TEM e SAXS, o qual foi obtido o tamanho de 15 nm de diâmetro para as nanoesferas sintetizadas. Através do imageamento de alta resolução TEM é possível conferir que as amostras apresentaram uma característica estrutural típica de um espinélio. O S.Q.U.I.D. foi capaz de fornecer informações a respeito do regime superparamagnético da amostra, sendo que o início do bloqueio do regime superparamagnético deu-se em torno de 225 K. Através das curvas de $M \times T$ foi determinado que a temperatura de bloqueio média das NPs estão em torno de 150 K. O resultado do potencial zeta mostrou a relação da estabilidade eletrostática de cada amostra, sendo que a amostra sem recobrimento e a amostra NP@DPPC sedimentaram durante a leitura, mostrando-se instáveis e conseqüentemente não indicadas para o tratamento hipertérmico. A termogravimetria conseguiu revelar a relação de massa entre cada amostra de acordo com cada recobrimento utilizado. Essa análise permitiu constatar que o processo de lavagem durante a síntese das amostras acarreta em pequenas perdas de NPs. Além disso, o resultado obtido por TGA e magnetometria possibilitou uma análise apurada dos resultados obtidos no SAR. As análises do SAR mostram que não há diferença significativa entre os valores obtidos para a NP@CTAB e a NP@SDS. Também não há diferença entre os valores de SAR da NP@CH e da NP@DSPE. O único resultado de SAR, que diverge significativamente dos outros, foi para a amostra NP@PEG o qual seu resultado foi estatisticamente diferente e abaixo de qualquer outra

amostra. Os valores obtidos do SAR estão compreendidos entre 176W/g para a amostra NP@PEG e vai até 351 W/g para a NP@CTAB. Estes valores impactam diretamente na taxa de aquecimento das NPs durante a hipertermia magnética. O ensaio de viabilidade celular via MTS exibiu resultados que permitiram concluir que a amostra NP@CTAB apresenta altos índices de citotoxicidade não sendo indicada para os tratamentos envolvendo a hipertermia. O estudo da internalização das NPs através da medida da massa de ferro via espectroscopia U-VIS forneceu informações enriquecedoras ao trabalho a respeito da concentração do nanomaterial no interior das células HEK293T, levantando a discussão sobre a disponibilidade de nanomaterial contra o número de células no meio. Os conceitos abordados na microscopia confocal também tratam da internalização das nanopartículas em células, com o advento que a técnica também permite a realização de estudos relacionados a morfologia celular, viabilidade celular e o rastreamento das NPs no interior das células. Para a aplicação da hipertermia magnética, alguns testes preliminares foram realizados na citometria de fluxo e a medida de viabilidade utilizando o contador automático de células. Estes equipamentos forneceram falsos positivos, sendo, portanto, inviáveis para a quantificação do dano celular durante a hipertermia magnética. A rota encontrada para se quantificar o dano que o tratamento hipertérmico pode oferecer foi readaptar o protocolo de medida de viabilidade celular via MTS realocando os poços contendo o meio a ser medido segundos antes da leitura ser realizada. Por fim, realizou-se a magneto hipertermia *in vitro* nas células HEK293T incubadas com duas quantidades (100 e 200 μg) para as amostras NP@PEG, NP@DSPE, NP@SDS e NP@CH, por dois patamares de tempos 500 s e 1500 s.

De um modo geral, os resultados de magneto hipertermia indicaram que somente as amostras NP@PEG, NP@DSPE e NP@CH são indicadas para o tratamento hipertérmico. As demais amostras registraram resultados indesejados. A amostra NP@CTAB e a NP@SDS apresentaram altos índices citotóxicos nos regimes de aplicações hipertérmicos não sendo, portanto, indicadas. A amostra NP@DPPC não apresentou solubilidade em água e nem ofereceu uma boa estabilidade ao seu dispersante.

Ao se realizar a magneto hipertermia *in vitro* nas células HEK293T, verificou-se que os fatores fundamentais que regem o processo estão associados: aos valores de SAR de cada amostra, à disponibilidade de nanomaterial versus a quantidade de células disponíveis e ao tempo de exposição ao tratamento. Embasando-se nesses fatores a NP@CH apresentou os melhores desempenhos associado a hipertermia magnética especialmente para 200 μg de NPs por 1500 segundos de tratamento. Isso permitiu que os objetivos propostos fossem alcançados. E também viabilizou a aplicação imediata do trabalho desenvolvido em outros sistemas

nanoestruturados como recobrimento dos nano anéis magnéticos. Dada a importância do assunto, futuramente tornam-se fundamentais testes de magneto hipertermia nas células U2OS, podendo assim viabilizar comparações entre o comportamento de células normais com o das células tumorais, permitindo otimizar esse tratamento para cada caso em estudo.

9 Referências Bibliográficas

ADAN, Aysun *et al.* Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical reviews in biotechnology** v. 8551, n. May, p. 1–14 , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26767547>>.

ALKILANY, Alaaldin M. *et al.* Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects. **Small** v. 5, n. 6, p. 701–708 , 2009.1613-6810.

ANGELO, Margareth; MOREIRA, Patrícia Luciana; RODRIGUES, Patrícia Luciana Moreira 2 Laura Maria Alves. Uncertainties in the childhood cancer : understanding the mother ' s needs. **Esc Anna Nery Rev Enferm** v. 14, n. 2, p. 301–308 , 2010.

ANWAR, M *et al.* Aqueous phase transfer of oleic acid coated iron oxide nanoparticles : influence of solvents and surfactants on stability and pharmaceutical applications of ferrofluid. **Magneto hydrodynamics** v. 49, n. 3, p. 339–343 , 2013.

BADRUDDOZA, Abu Zayed Md *et al.* β -Cyclodextrin conjugated magnetic, fluorescent silica core-shell nanoparticles for biomedical applications. **Carbohydrate polymers** v. 95, n. 1, p. 449–57 , 5 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618292>>. Acesso em: 16 set. 2013.

BANDOPADHYAY, Swarnali; CHAUDHURI, Debasish; JAYANNAVAR, A. M. Macrospin in external magnetic field: Entropy production and fluctuation theorems. **Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment** v. 11002, p. 8 , 2014. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1412.6812>>.

BARALDI, Carlos Sato Dias. **Estudo de vórtice magnético em nanopartículas para aplicações em hipertermia magnética**. Unicamp, 2015. 159 p.

BASKAR, Rajamanickam *et al.* Cancer and Radiation Therapy : Current Advances and Future Directions. **International Journal of Medical Sciences** v. 9 , 2012.

BAUMGARTNER, Jens *et al.* Formation of Magnetite Nanoparticles at Low Temperature: From Superparamagnetic to Stable Single Domain Particles. **PLoS ONE** v. 8, n. 3, p. 1–6 , 2013.1932-6203.

BENZ, Manuel. Superparamagnetism : Theory and Applications. [S.l: s.n.], 2012. p. 27.

BERDOV, B. A.; MENTESHASHVILI, G. Z. Thermoradiotherapy of patients with locally advanced carcinoma of the rectum. **International Journal of Hyperthermia** v. 6, n. 5, p. 881–890 , 9 jan. 1990. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02656739009140970>>.

BOLDON, Lauren; LALIBERTE, Fallon; LIU, Li. Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. **Nano reviews** v. 6, p. 25661 , 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25721341>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4342503>>.2000-5121.

BRANQUINHO, Luis C *et al.* Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: implications for cancer hyperthermia. **Scientific reports** v. 3, p. 2887 , jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3791447&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 ago. 2014.

BULL, J M. An update on the anticancer effects of a combination of chemotherapy and hyperthermia. **Cancer Res** v. 44, n. 10 Suppl, p. 4853s–4856s , 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6205752>>.0008-5472 (Print)n0008-5472 (Linking).

CHEN, X *et al.* Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** v. 103, n. 31, p. 11724–11729 , 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1544237/pdf/zpq11724.pdf>>.0027-8424 (Print)r0027-8424 (Linking).

COEY, J. M. D. **Magnetism and Magnetic Materials**. First ed. Cambridge, NY: Cambridge University Press, 2010. 614 p. .9780521816144 Hardback.

CRUZ, Fernanda Strapazzon Da; ROSSATO, Luciana Grazziotin. Cuidados com o Paciente Oncológico em Tratamento Quimioterápico : o Conhecimento dos Enfermeiros da Estratégia Saúde da Família Care Given to Cancer Patients Undergoing Chemotherapy : Knowledge of Family. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 61, n. 4, p. 335–341 , 2015.

CUYPER, Marcel De; JONIAU, Marcel. Mechanistic Aspects of the Adsorption of Phospholipids onto Lauric Acid Stabilized Fe₃O₄ Nanocolloids. **Langmuir** v. 7, p. 647–652 , 1991.

DA DALT, S. *et al.* Magnetic and Mössbauer behavior of the nanostructured MgFe₂O₄ spinel obtained at low temperature. **Powder Technology** v. 210, n. 2, p. 103–108 , jun. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591011001045>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

DAHL, O. Interaction of Hyperthermia and Chemotherapy. **Application of Hyperthermia in the Treatment of Cancer**. [S.l: s.n.], 1988. p. 157–169. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-83260-4_23>.

DATTA, N. R. *et al.* Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. **International Journal of Hyperthermia** doi: 10.1080/02656730903091986, v. 25, n. 5, p. 323–334 , 1 jan. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02656730903091986>>.

DATTA, N R *et al.* Head and neck cancers: Results of thermoradiotherapy versus radiotherapy. **International Journal of Hyperthermia** v. 6, n. 3, p. 479–486 , 1990. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/02656739009140944>>.

DEAN, John A. **Lange's Handbook of chemistry**. [S.l: s.n.], 1985. Disponível em: <http://journals.lww.com/soilsci/Abstract/1944/07000/Handbook_of_Chemistry.13.aspx>. 0070163847.

DEWEY, W. C. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. **International Journal of Hyperthermia** v. 25, n. 1, p. 3–20 , 9 jan. 1994. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02656730902747919>>.

DIKOMEY, E.; FRANZKE, J. Effect of Heat on Induction and Repair of DNA Strand Breaks in X-irradiated CHO Cells. **International Journal of Radiation Biology** v. 61, n. 2, p. 221–233 , 3 jan. 1992. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09553009214550851>>.

DIRAC, P. A. M. On the Theory of Quantum Mechanics. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences** v. 112, n. 762, p. 661–677 , 1 out. 1926. Disponível em: <<http://rspa.royalsocietypublishing.org/content/176/965/214.short>>.

EMAMI, B *et al.* Combined hyperthermia and irradiation in the treatment of superficial tumors: results of a prospective randomized trial of hyperthermia fractionation (1/wk vs 2/wk). **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics** doi: 10.1016/0360-3016(92)91034-K, v. 24, n. 1, p. 145–152 , 23 maio 1992. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(92\)91034-K](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(92)91034-K)>.

EMAMI, Bahman *et al.* Phase III study of interstitial thermoradiotherapy compared with interstitial radiotherapy alone in the treatment of recurrent or persistent human tumors: A prospectively controlled randomized study by the radiation therapy oncology group. **International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics** v. 34, n. 5, p. 1097–1104 , mar. 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/036030169502137X>>.

ENGIN, Kayihan *et al.* Thermoradiation therapy for superficial malignant tumors. **Cancer** v. 72, n. 1, p. 287–296 , 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/1097->

0142(19930701)72:1%3C287::AID-CNCR2820720150%3E3.0.CO;2-L>.

F.L. GRAHAM, J. Smiley. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by D N A from Human Adenovirus Type 5. **J.gen.Virol** v. 36, n. 2977, p. 59–72 , 1977.

FICK, Adolf. Ueber Diffusion. **Annalen der Physik und Chemie** v. 170, n. 1, p. 59–86 , 1855. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/andp.18551700105>>.

GALIMARD, Aymeric *et al.* Thirty-femtogram detection of iron in mammalian cells. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)** v. 8, n. 13, p. 2036–44 , 9 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508659>>. Acesso em: 16 set. 2013.

GALLOP, J.C. **SQUIDS, the Josephson Effects and Superconducting Electronics**. [S.l.]: CRC Press, 1991. 242 p. .9780750300513.

GAO, Weiwei *et al.* Nanoparticle approaches against bacterial infections. **Wires Nanomedicine and Nanobiotechnology** v. 6, n. 6, p. 532–547 , 2014.

GHUSSEN, F *et al.* A prospective randomized study of regional extremity perfusion in patients with malignant melanoma. **Annals of Surgery** v. 200, n. 6, p. 764–768 , dez. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1250596/>>.

GIRI, Jyotsnendu *et al.* Preparation and characterization of phospholipid stabilized uniform sized magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 293, n. 1, p. 62–68 , maio 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885305001150>>. Acesso em: 5 ago. 2014.

GMBH, Lonza Cologne. Technical Reference Guide Protocol for Performing a Trypan Blue Viability Test. 2012, [S.l: s.n.], 2012. p.2–3.

GONZALES, Marcela; KRISHNAN, Kannan M. Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 293, n. 1, p. 265–270 , maio 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885305001666>>. Acesso em: 5 ago. 2014.

GÓRKA-KOSTRUBIEC, Beata; SZCZEPANIAK-WNUK, Iga. Magnetic study of a mixture of magnetite and metallic iron in indoor dust samples. **Air Quality, Atmosphere & Health** v. 10, n. 1, p. 105–116 , 9 jan. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11869-016-0412-5>>.

GOYA, G. F. *et al.* Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. **Journal of Applied Physics** v. 94, n. 5, p. 3520 , 2003. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/JAPIAU/v94/i5/p3520/s1&Agg=doi>>. Acesso em: 16 set. 2013.

GOYA, G F; MORALES, M P. Field Dependence of Blocking Temperature in Magnetite Nanoparticles. **J. Metastable and Nanocrystalline Materials** v. 20–21, p. 673–678

, 2004.

GRATZER, Paul F; HARRISON, Robert D; WOODS, Terence. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. **Tissue engineering** v. 12, n. 10, p. 2975–2983 , 2006.ten.2006.12.2975.

GUARDIA, Pablo *et al.* Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment. **ACS nano** v. 6, n. 4, p. 3080–91 , 24 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494015>>.

GUIBERT, Clément *et al.* Hyperthermia of Magnetic Nanoparticles: Experimental Study of the Role of Aggregation. **The Journal of Physical Chemistry C** v. 119, n. 50, p. 28148–28154 , 17 dez. 2015. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.5b07796>>.

GUIMARÃES, A.P. **Principles of Nanomagnetism**. 1. ed. Rio de Janeiro: Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas, 2009. 229 p. .9812568921.

GWAMURI, Jephias *et al.* Limitations of ultra-thin transparent conducting oxides for integration into plasmonic-enhanced thin-film solar photovoltaic devices. **Materials for Renewable and Sustainable Energy** v. 4, n. 3 , 2015.4024301500.

HAMAZOE, Ryuichi; MAETA, Michio; KAIBARA, Nobuaki. Intraperitoneal thermochemotherapy for prevention of peritoneal recurrence of gastric cancer. Final results of a randomized controlled study. **Cancer** v. 73, n. 8, p. 2048–2052 , 15 abr. 1994. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/1097-0142%2819940415%2973%3A8%3C2048%3A%3AAID-CNCR2820730806%3E3.0.CO%3B2-Q>>.

Handbook of Pharmaceutical Excipients – 7th Edition. **Pharmaceutical Development and Technology** v. 18, n. 2, p. 544–544 , 14 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10837450.2012.751408>>.0857110276.

HEISENBERG, W. Mehrkörperproblem und Resonanz in der Quantenmechanik. **Zeitschrift for Physik** v. 38, n. 6–7, p. 411–426 , jun. 1926. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01397160>>.

HIEMENZ, Paul C.; RAJAGOPALAN, Raj. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. Third Edit ed. [S.l.]: Marcel Dekker, Inc, 1997. 650 p. .0824793978.

HOLTZ. Raphael Dias. **Monografia - Desenvolvimento, Caracterização em Mecanismos de Ação de Nanopartículas Para Uso em Terapias Químicas (Quimioterapia)**. [S.l: s.n.], 2009.

HONARY, Soheyla; ZAHIR, Foruhe. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano

- Drug Delivery Systems - A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** v. 12, n. 2, p. 265–273, 2013. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/pdf/pr13041>>.1596-5996.

HOU, Yanglong; XU, Zhichuan; SUN, Shouheng. Controlled synthesis and chemical conversions of FeO nanoparticles. **Angewandte Chemie (International ed. in English)** v. 46, n. 33, p. 6329–32, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645273>>. Acesso em: 16 set. 2013.

<http://biosaxs.com/technique.html> - acessado em 16/09/2013.

http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/UV_Vis/Cary50.htm - acessado em 16/09/2013.

<http://www.engr.sjsu.edu/rkwok/squid.htm> acessado em 19/06/2017.

<http://www.olharnano.com/artigos/4001/18002/MET-e-MEV:-conhe%C3%A7a-os-principais-tipos-de-microsc%C3%B3pios-eletr%C3%B4nicos> - acessado em 16/09/2013.

https://en.wikipedia.org/wiki/Confocal_microscopy#/media/File:Confocalprinciple_in_English.svg acessado em 19/06/2017.

HUANG, Hui S; HAINFELD, James F. Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia. **International Journal of Nanomedicine** v. 8, p. 2521–2532, 2013.

HUNG, M C *et al.* Learning behaviour and cerebral protein kinase C, antioxidant status, lipid composition in senescence-accelerated mouse: influence of a phosphatidylcholine-vitamin B12 diet. **British Journal of Nutrition**. [S.l.]: Unicamp, 2001. 86 v. p. 163–171. 0007-1145 (Print)r0007-1145 (Linking).

ITO, Emma *et al.* Potential use of cetrimonium bromide as an apoptosis- promoting anticancer agent for head and neck cancer. **Molecular pharmacology** v. 76, n. 5, p. 969–983, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19654225>>.

JIA, Chun-Jiang *et al.* Large-scale synthesis of single-crystalline iron oxide magnetic nanorings. **Journal of the American Chemical Society** v. 130, n. 50, p. 16968–77, 17 dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053430>>.

JORDAN, Andreas *et al.* Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 201, n. 1–3, p. 413–419, 1999.0304-8853.

JR, Eduardo Schünemann *et al.* Radioterapia e quimioterapia no tratamento do câncer durante a gestação - revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 53, n. 1, p. 41–46, 2007.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan, 2012. .

KAPP, Daniel S. *et al.* Two or six hyperthermia treatments as an adjunct to radiation therapy yield similar tumor responses: results of a randomized trial. **International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics** v. 19, n. 6, p. 1481–1495, dez. 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/036030169090361M>>.

KASHEVSKY, Bronislav E. *et al.* Study of cobalt ferrite nanosuspensions for low-frequency ferromagnetic hyperthermia. **Particuology** v. 6, n. 5, p. 322–333, out. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674200108001089>>.

KITAMURA, Kaoru *et al.* Prospective randomized study of hyperthermia combined with chemoradiotherapy for esophageal carcinoma. **Journal of Surgical Oncology** v. 60, n. 1, p. 55–58, 1995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jso.2930600111>>.

KNEIPP, Katrin. Nanotechnology in Biology and Medicine. Methods, Devices, and Applications. Edited by Tuan Vo-Dinh. **Angewandte Chemie International Edition** v. 47, n. 13, p. 2340–2340, 14 mar. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200785537>>.9780849329494.

KNIGHT, B *et al.* Comparison of the core size distribution in iron dextran complexes using Mössbauer spectroscopy and X-ray diffraction. **Journal of inorganic biochemistry** v. 73, n. 4, p. 227–33, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10376346>>.

KOOPS, H S *et al.* Prophylactic isolated limb perfusion for localized, high-risk limb melanoma: results of a multicenter randomized phase III trial. European Organization for Research and Treatment of Cancer Malignant Melanoma Cooperative Group Protocol 18832, the World Health Organization. **Journal of Clinical Oncology** doi: 10.1200/JCO.1998.16.9.2906, v. 16, n. 9, p. 2906–2912, 1 set. 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1200/JCO.1998.16.9.2906>>.

KUMAR, Challa S.S.R.; MOHAMMAD, Faruq. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 63, n. 9, p. 789–808, ago. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11000597>>.

KURTZ-CHALOT, A. *et al.* Adsorption at cell surface and cellular uptake of silica nanoparticles with different surface chemical functionalizations: impact on cytotoxicity. **Journal of Nanoparticle Research** v. 16, n. 11, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-014-2738-y>>.

LAURENT, Sophie *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. **Chemical Reviews** v. 108, n. 6, p. 2064–2110, 2008.00092665 (ISSN).

LEE, Jae-Hyun *et al.* Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. **Nature nanotechnology** v. 6, n. 7, p. 418–22 , jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21706024>>. Acesso em: 16 set. 2013.

LEE, Nohyun *et al.* Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 108, n. 7, p. 2662–2667 , 2011.

LI, Li *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as MRI contrast agents for non-invasive stem cell labeling and tracking. **Theranostics** v. 3, n. 8, p. 595–615 , jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3741608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 out. 2014.

LIONG, Monty *et al.* Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. **ACS nano** v. 2, n. 5, p. 889–96 , maio 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2751731&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LIU, Gang *et al.* Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)** v. 9, n. 9–10, p. 1533–45 , 27 maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23019129>>. Acesso em: 16 set. 2013.

LIU, Xiao Li *et al.* Magnetic Vortex Nanorings: A New Class of Hyperthermia Agent for Highly Efficient In Vivo Regression of Tumors. **Advanced Materials** p. n/a-n/a , 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201405036>>.

LUO, Jiansong; BUSILLO, Jm; BENOVIĆ, JI. M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. **Molecular pharmacology** v. 74, n. 2, p. 338–347 , 2008. Disponível em: <<http://molpharm.aspetjournals.org/content/74/2/338.short>>.

MAHMOUDI, Morteza *et al.* Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: cell “vision” versus physicochemical properties of nanoparticles. **ACS nano** v. 5, n. 9, p. 7263–76 , 27 set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21838310>>.

MAJEED, Muhammad Irfan *et al.* Highly water-soluble magnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles for drug delivery: enhanced in vitro therapeutic efficacy of doxorubicin and MION conjugates. **Journal of Materials Chemistry B** v. 1, n. 22, p. 2874 , 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tb20322k>>. Acesso em: 16 set. 2013.

MALIK, Vikash *et al.* Colloidal crystallization and structural changes in suspensions of silica/magnetite core-shell nanoparticles. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids** v. 28, n. 41, p. 14777–83, 16 out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22794064>>.

MARKINK, E M. **Relaxation behaviour of spherical and cylindrical magnetic nanoparticles in liquid media**. University of Twente, 2012. 99 p.

MCDONALD, John H. **Handbook of Biological Statistics**. [S.l.: s.n.], 2009. 291 p. This textbook evolved from a set of notes from the authors “Biological Analysis” class at the University of Delaware. The main goal being to teach biology students how to choose the appropriate statistical test for a particular experiment, then apply that test and interpret the results.222222222222222222.

MEHDAOUI, B. *et al.* Influence of a transverse static magnetic field on the magnetic hyperthermia properties and high-frequency hysteresis loops of ferromagnetic FeCo nanoparticles. **Applied Physics Letters** v. 100, n. 5, p. 52403, 2012. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/APPLAB/v100/i5/p052403/s1&Agg=doi>>. Acesso em: 16 set. 2013.

MIT DEPARTMENT OF PHYSICS. **Superconductivity: The Meissner Effect, Persistent Currents and the Josephson Effects**. [S.l.: s.n.], 2011. Disponível em: <<http://web.mit.edu/8.13/WWW/JLExperiments/JLExp39.pdf>>.

MORSY, Smi. Role of Surfactants in Nanotechnology and Their Applications. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci** v. 3, n. 5, p. 237–260, 2014. Disponível em: <<http://www.ijcmas.com/vol-3-5/Salwa M.I. Morsy.pdf>>.

MUKHOPADHYAY, Anindita *et al.* A facile synthesis of PEG-coated magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles and their prevention of the reduction of cytochrome c. **ACS applied materials & interfaces** v. 4, n. 1, p. 142–9, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22111689>>.

MUSA, Marahaini; KANNAN, Thirumulu Ponnuraj; MUSTAFA, Shyamoli. Cell Proliferation Study of Human Osteosarcoma Cell Line (U2OS) using Alamar Blue Assay and Live Cell Imaging. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences** v. 8, n. 2, p. 2279–861, 2013. Disponível em: <www.iosrjournals.org>.

NAQVI, Saba *et al.* Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. **International journal of nanomedicine** v. 5, p. 983–9, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3010160&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 set. 2013.

NEL, Andre E *et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature materials** v. 8, n. 7, p. 543–57 , jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19525947>>. Acesso em: 16 set. 2013.

NOH, Seung-Hyun *et al.* Nanoscale magnetism control via surface and exchange anisotropy for optimized ferrimagnetic hysteresis. **Nano letters** v. 12, n. 7, p. 3716–21 , 11 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22720795>>.

OWEN, Tony. **Principles and applications of UV-visible spectroscopy**. [S.l: s.n.], 1996. 139 p. Disponível em: <<http://web.uni-plovdiv.bg/plamenpenchev/mag/books/spectroscopy/PRIMER.PDF>>. .12-5965-5123E.

PAPELL, Solomon S. *Low Viscosity Magnetic Fluid Obtained By the Colloidal Suspension of Magnetic Particles* .**US patent**. [S.l: s.n.]. , 1965

PARK, Hye Hun *et al.* Magnetic hybrid colloids decorated with Ag nanoparticles bite away bacteria and chemisorb viruses. **Journal of Materials Chemistry B** v. 1, n. 21, p. 2701 , 2013. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c3tb20311e>>. Acesso em: 16 set. 2013.

PATNAIK, Pradyot. **Handbook of Inorganic Chemicals**. [S.l: s.n.], 2003. 1-1125 p. Disponível em: <[ftp://pvictor.homeftp.net/public/Sci_Library/Chem_Library/Handbooks/Patnaik P. Handbook of inorganic chemicals \(MGH, 2003\)\(T\)\(1125s\).pdf](ftp://pvictor.homeftp.net/public/Sci_Library/Chem_Library/Handbooks/Patnaik_P_Handbook_of_inorganic_chemicals_(MGH,2003)(T)(1125s).pdf)>. Here is an invaluable resource for chemists, chemical engineers, laboratory technicians, and environmental engineers. Covering over 2000 of the most popular industrial chemicals, “Handbook of Inorganic Chemical Compounds” details the chemical reactions the subject chemicals undergo either in preparation or naturally--all presented in a dynamic, easy-to-understand style.0070494398.

PEREZ, Carlos A *et al.* Randomized Phase III Study Comparing Irradiation and Hyperthermia with Irradiation Alone in Superficial Measurable Tumors: Final Report by the Radiation Therapy Oncology Group. **American Journal of Clinical Oncology** v. 14, n. 2 , 1991. Disponível em: <http://journals.lww.com/amjclinicaloncology/Fulltext/1991/04000/Randomized_Phase_III_Study_Comparing_Irradiation.8.aspx>.

PEREZ, N *et al.* Surface anisotropy broadening of the energy barrier distribution in magnetic nanoparticles. **Nanotechnology** v. 2, p. 1–15 , 2008.

PIÑEIRO-REDONDO, Yolanda *et al.* The influence of colloidal parameters on the specific power absorption of PAA-coated magnetite nanoparticles. **Nanoscale Research Letters** v. 6, n. 1, p. 383 , 2011. Disponível em: <<http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-6-383>>.1931-7573.

POLYETHYLENE. Carbowax; PEG. Glycol. **Technical Data Sheet -Polyethylene Glycol (PEG) 400.** [S.l: s.n.], [S.d.]. Disponível em: <http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_0887/0901b80380887901.pdf?filepath=polyglycols/pdfs/noreg/118-01798.pdf&fromPage=GetDoc>.

PRESS, Dove. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles : magnetic nanoplatforms as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine** v. 2, p. 3445–3471 , 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/IJN.S30320>>.

PROMEGA. Absorbance, Excitation and Emission Information for Fluorescent and Spectrophotometric Assays. 2010, Madison, USA: PROMEGA, 2010. p.1. 6082744330. .

PROMEGA CORPORATION. CellTiter 96 ® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. 2012, [S.l: s.n.], 2012. p.2014-12–15. Disponível em: <www.promega.com/protocols/>. 6082744330. .

Q. A. PANKHURST *et al.* Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J. Phys. D: Appl. Phys.** v. 36, p. R167–R181 , 2003.

QI, Sheng. Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences. **Thermal Analysis of Pharmaceuticals.** [S.l: s.n.], 2016. p. 413–437. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-4029-5>>. 978-1-4939-4027-1.

RADAIC, Allan *et al.* Como estudar interações entre nanopartículas e sistemas biológicos. **Química Nova** v. 39, n. 10, p. 1236–1244 , 15 ago. 2016. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6504&nomeArquivo=RV20160241.pdf>.

RAU, B *et al.* Preoperative radiochemotherapy in locally advanced or recurrent rectal cancer: regional radiofrequency hyperthermia correlates with clinical parameters. **International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics** v. 48, n. 2, p. 381–391 , set. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301600006507>>.

REINHOLD, H.S.; VAN DEN BERG-BLOK, A. The influence of a heat pulse on the thermally induced damage to tumour microcirculation. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology** v. 19, n. 2, p. 221–225 , fev. 1983. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0277537983904200>>.

REISS, Günter; HÜTTEN, Andreas. Magnetic nanoparticles: Applications beyond data storage. **Nature Materials** v. 4, n. October, p. 725–726 , 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat1494>><http://www.nature.com/doi/10.1038/nmat1494>>.1476-1122.

RODRIGUES, Susana *et al.* Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in

Drug Delivery. **Journal of Functional Biomaterials** v. 3, n. 4, p. 615–641 , 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-4983/3/3/615/>>.2079-4983 (Electronic)r2079-4983 (Linking).

ROSENSWEIG, R.E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 252, p. 370–374 , nov. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885302007060>>.

ROSS SMITH; TANFORD, Charles. The critical micelle concentration of 1- α -dipalmitoylphosphatidylcholine in water and water/methanol solutions. **Journal of Molecular Biology** v. 67, n. 2 , 1972.

ROTI ROTI, Joseph L. *et al.* Nuclear matrix as a target for hyperthermic killing of cancer cells. **Cell Stress & Chaperones** v. 3, n. 4, p. 245 , 1998. Disponível em: <[http://cest.allenpress.com/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1379%2F1466-1268\(1998\)003%3C0245%3ANMAATF%3E2.3.CO%3B2](http://cest.allenpress.com/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1379%2F1466-1268(1998)003%3C0245%3ANMAATF%3E2.3.CO%3B2)>.

SAKAGUCHI, Yoshihisa *et al.* Apoptosis in Tumors and Normal Tissues Induced by Whole Body Hyperthermia in Rats. **The Journal of Cancer Research** p. 5459–5464 , 1995. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/55/22/5459>>.

SAMPAIO, Luiz C; GARCIA, Flavio; CERNICCHIARO, Geraldo R C. Técnicas de Magnetometria. **Revista Brasileira de Ensino de Física** v. 22, n. 3, p. 406–410 , 2000.

SANDRE, Olivier *et al.* In vivo imaging of local gene expression induced by magnetic hyperthermia. **Genes** v. 8, n. 2 , 2017.

SCHERER, C.; NETO, A. M. Fífueiredo. Ferrofluids — Properties and applications. **Brazilian Journal of Physics** v. 35, n. 3, p. 718–727 , 2005.0103-9733.

Search results matching magnetic moment. Disponível em: <http://physics.nist.gov/cgi-bin/cuu/Results?search_for=+magnetic+moment>. Acesso em: 1 jan. 2017.

SHAW, Duncan J. **Introduction to colloid and surface chemistry**. 4. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 1980. .978-0-08-050910-5.

SHEN, Rong-Nian *et al.* Influence of elevated temperature on natural killer cell activity, lymphokine-activated killer cell activity and lectin-dependent cytotoxicity of human umbilical cord blood and adult blood cells. **International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics** v. 29, n. 4, p. 821–826 , jul. 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0360301694905711>>.

SHETAB BOUSHEHRI, Maryam Alsadat; LAMPRECHT, Alf. Nanoparticles as drug carriers: current issues with in vitro testing. **Nanomedicine** v. 10, n. 21, p. 3213–3230 , nov. 2015. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/nnm.15.154>>.

SHI, Si-Feng *et al.* Biocompatibility of chitosan-coated iron oxide nanoparticles with osteoblast cells. **International Journal of Nanomedicine** v. 7, p. 5593–5602, 2012.

SIGMA. U2OS GFP-NUP98. [S.d.], St. Louis, USA: SIGMA ALDRICH, [S.d.]. p.2–7.

SINGH, Neenu *et al.* Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). **Nano Reviews** v. 1, n. 0, p. 1–15, 2010. Disponível em: <<http://www.nano-reviews.net/index.php/nano/article/view/5358>>.2000-5121 (Electronic)r2000-5121 (Linking).

SNEED, Penny K. *et al.* Survival benefit of hyperthermia in a prospective randomized trial of brachytherapy boost \pm hyperthermia for glioblastoma multiforme. **International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics** v. 40, n. 2, p. 287–295, jan. 1998. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360301697007311>>.

SOENEN, Stefaan J H; DE CUYPER, Marcel. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. **Contrast media & molecular imaging** v. 4, n. 5, p. 207–19, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19810053>>. Acesso em: 16 set. 2013.

SOENEN, Stefaan J H; DE CUYPER, Marcel. Assessing iron oxide nanoparticle toxicity in vitro: current status and future prospects. **Nanomedicine (London, England)** v. 5, n. 8, p. 1261–75, out. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21039201>>.

SONG, C. W. *et al.* Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures. **International Journal of Hyperthermia** v. 25, n. 2, p. 91–95, 9 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02656730902744171>>.

SUGIMACH, K. *et al.* Chemotherapy combined with or without hyperthermia for patients with oesophageal carcinoma: a prospective randomized trial. **International Journal of Hyperthermia** v. 10, n. 4, p. 485–493, 9 jan. 1994. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02656739409009352>>.

SUN, Yongkang *et al.* An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 285, n. 1–2, p. 65–70, jan. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030488530400767X>>. Acesso em: 16 set. 2013.

SUNGHYUN, Yoon. Determination of the Temperature Dependence of the Magnetic Anisotropy Constant in Magnetite Nanoparticles. **Journal of the Korean Physical Society** v. 59, n. 5, p. 3069, 15 nov. 2011. Disponível em: <http://www.kps.or.kr/jkps/abstract_view.asp?articleid=0523B5F9-5F26-4979-8844-

4DA2782547C2>. Acesso em: 16 set. 2013.

TARTAJ, Pedro *et al.* Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics** v. 42, n. 22, p. 224002 , 2009.0022-3727.

THAKUR, M *et al.* Interparticle interaction and size effect in polymer coated magnetite nanoparticles. **Journal of Physics: Condensed Matter** v. 20, n. 14, p. 149801–149801 , 9 abr. 2008. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0953-8984/20/i=14/a=149801?key=crossref.6c684f570b34a2f15d3c660566f0378a>>.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. **Nanoparticulate drug delivery systems**. [S.l: s.n.], 2007. 1829–1841 p. 166 v. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:nanoparticulate+drug+delivery+system#0>>.9780849390739.

THOMAS, Luanne a. *et al.* Carboxylic acid-stabilised iron oxide nanoparticles for use in magnetic hyperthermia. **Journal of Materials Chemistry** v. 19, n. 36, p. 6529 , 2009. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b908187a>>. Acesso em: 16 set. 2013.

ULLAH, Zobair. Nanotechnology and Its Impact on Modern Computer. **Global Journal of Researches in Engineering** v. 12, n. 4 , 2012.

UNSOY, Gozde *et al.* Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. **Journal of Nanoparticle Research** v. 14, n. 11, p. 964 , 6 out. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-012-0964-8>>. Acesso em: 4 nov. 2014.1105101209648.

URANO, M. Invited Review: For the clinical application of thermochemotherapy given at mild temperatures. **International Journal of Hyperthermia** v. 15, n. 2, p. 79–107 , 9 jan. 1999. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/026567399285765>>.

VALDAGNI, R; AMICHETTI, M. Report of long-term follow-up in a randomized trial comparing radiation therapy and radiation therapy plus hyperthermia to metastatic lymph nodes in stage IV head and neck patients. **International journal of radiation oncology, biology, physics** v. 28, p. 163 , 1994.

VAN DER ZEE, Jacoba *et al.* Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. **The Lancet** v. 355, n. 9210, p. 1119–1125 , abr. 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600020596>>.

VAUPEL, Peter; KALLINOWSKI, Friedrich; OKUNIEFF, Paul. Blood Flow , Oxygen and Nutrient Supply , and Metabolic Microenvironment Human Tumors : A Review. **Cancer Res** v. 49, n. 23, p. 6449–6465 , 1989.

VERNON, Clare C *et al.* Radiotherapy with or without hyperthermia in the treatment of superficial localized breast cancer: Results from five randomized controlled trials. **International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics** doi: 10.1016/0360-3016(96)00154-X, v. 35, n. 4, p. 731–744 , 23 maio 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016\(96\)00154-X](http://dx.doi.org/10.1016/0360-3016(96)00154-X)>.

WANG, Rongrong *et al.* Application of poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE) block copolymers and their derivatives as nanomaterials in drug delivery. **International Journal of Nanomedicine** v. 7, p. 4185–4198 , 2012.

WEITSCHIES, Gunnar Glöckl and Rudolf Hergt and Matthias Zeisberger and Silvio Dutz and Stefan Nagel and Werner. The effect of field parameters, nanoparticle properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia. **Journal of Physics: Condensed Matter** v. 18, n. 38, p. S2935 , 2006. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0953-8984/18/i=38/a=S27>>.

WILLIAMS, David B.; CARTER, C. Barry. **Transmission Electron Microscopy - A Textbook for Materials Science**. [S.l.]: Springer, 2009. 760 p. .9780387765006.

WINKLHOËER, Michael; FABIAN, Karl; HEIDER, Franz. Magnetic blocking temperatures of magnetite calculated with a three-dimensional micromagnetic model. **Journal of Geophysical Research** v. 102, p. 695–709 , 1997.

WONG, De Wei *et al.* Magneto-actuated cell apoptosis by biaxial pulsed magnetic field. **Scientific Reports** v. 7, n. 1, p. 10919 , 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-11279-w>>.

WU, Wei; HE, Quanguo; JIANG, Changzhong. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale research letters** v. 3, n. 11, p. 397–415 , jan. 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3244954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16 set. 2013.1167100891.

WUST, P *et al.* Review Hyperthermia in combined treatment of cancer. **The Lancet Oncology** v. 3, p. 487–497 , 2002.

XIE, Jin; SUN, Shouheng. Monodisperse Magnetic Nanoparticles : Chemical Synthesis and Surface Modification. **John Wiley & Sons, Ltd. -Encyclopedia of Inorganic Chemistry**

v. 1, p. 1–13 , 2011.9781119951438.

YANG, J *et al.* Preparation of poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. **International Journal of Pharmaceutics** v. 324, n. 2, p. 185–190 , 6 nov. 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517306004534>>.

YUAN, Hong Lei *et al.* Low-Temperature Preparation of Superparamagnetic CoFe₂O₄ Microspheres with High Saturation Magnetization. **Nanoscale Research Letters** v. 5, n. 11, p. 1817–1821 , 11 nov. 2010. Disponível em: <<http://www.nanoscalereslett.com/content/5/11/1817>>.

YUN-YANG, Wan *et al.* Purification and characterization of hydrosoluble components from the sap of Chinese lacquer tree *Rhus vernicifera*. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 38, n. 3–5, p. 232–240 , maio 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813006000808>>.

ZHANG, J *et al.* On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles. **Acta biomaterialia** v. 4, n. 1, p. 40–8 , jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681499>>. Acesso em: 16 set. 2013.

ZHANG, Yinan *et al.* Effect of size, shape, and surface modification on cytotoxicity of gold nanoparticles to human HEP-2 and Canine MDCK Cells. **Journal of Nanomaterials** v. 2012 , 2012.16874110 (ISSN).

ZHANG, Ying *et al.* Synthesis of PVP-coated ultra-small Fe₃O₄ nanoparticles as a MRI contrast agent. **Journal of materials science. Materials in medicine** v. 21, n. 4, p. 1205–10 , abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20140698>>. Acesso em: 16 set. 2013.

10 Anexo

10.1 TEM de todas as amostras

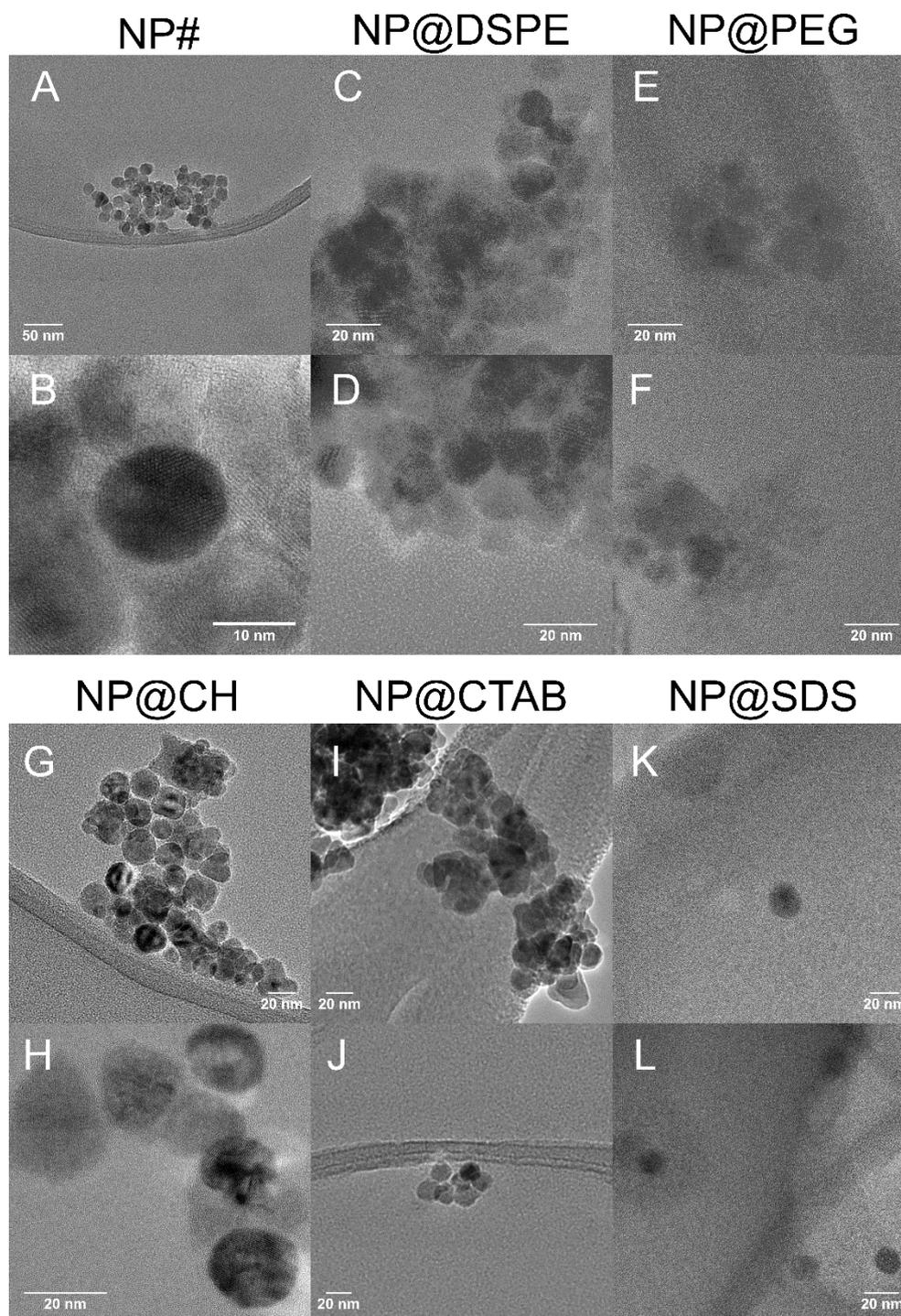


Figura 84 - Microscopia de transmissão de todas as amostras. (A,B) – NP sem recobrimento; (C,D) – NP recoberta com DSPE; (E,F) – NP recoberta com PEG; (G,H) – NP recoberta com CH; (K,L) – NP recoberta com SDS.

10.2 Teste estatístico T ou T-Student

A estatística T foi introduzida em 1908 por William Sealy Gosset, químico da cervejaria Guinness em Dublin, Irlanda ("student" era seu pseudônimo). O teste estatístico adotado é o teste tipo T que pode ser encontrado na literatura (MCDONALD, 2009). Este teste compara as médias de dois grupos e verifica se há ou não diferença entre esses valores, e diz o quão relevante é a diferença entre estes valores. Os casos a serem abordados nesta tese serão de variâncias desconhecidas e diferentes. Para isto considera-se a variável tal que:

$$T = \frac{(\bar{X} - \bar{Y}) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)}} \sim t_v \quad (10-1)$$

Onde, \bar{X} e \bar{Y} são a média do conjunto de amostra X e da amostra Y, μ_1 e μ_2 são as médias das respectivas populações, S_1 e S_2 são os respectivos desvios padrões e n_1 e n_2 são os respectivos números de populações. A variável T dada pela equação tem distribuição t - Student com v graus de liberdade dado por:

$$v = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}} \quad (10-2)$$

Calculando-se sobre hipótese obtém-se

$$T_{obs} = \frac{(\bar{x} - \bar{y})}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}} \quad (10-3)$$

Desta forma é possível calcular o intervalo de confiança através da fórmula:

$$IC(\mu_1 - \mu_2, 1 - \alpha) = \left((\bar{X} - \bar{Y}) \pm t_{(v, \alpha/2)} \sqrt{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)} \right) \quad (10-4)$$

Onde, α é a significância. Se $T_{obs} < t_{(v, \alpha/2)}$, rejeita-se a hipótese nula, ou seja, estatisticamente as médias não são iguais. Este teste será amplamente utilizado durante a discussão dos resultados apresentados nesta tese, justamente para dar credibilidade às análises realizadas.

10.3 Artigo submetido

Shape Tailored Magnetic Nanorings for Intracellular Hyperthermia Cancer Therapy

Carlos S. B. Dias^{1,2}, Talita D. M. Hanchuk^{1,3}, Heberton Wender⁴, Willian T. Shigeyosi^{2,5}, Jörg Kobarg¹, André Linhares Rossi⁶, Marcelo N. Tanaka⁶, Mateus B. Cardoso^{2,7}, and Flávio Garcia^{6*}*

1 - UNICAMP – State University of Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, CEP 13083-970, Brazil

2 - LNLS – Brazilian Synchrotron Light Source, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Brazil

3 - LNBio – Brazilian Bioscience National Laboratory, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Brazil

4 - UFMS – Federal University of Mato Grosso do Sul, Cidade Universitaria, Campo Grande, CEP 79070-900, Brazil

5 - UFSCar – Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, s/n, São Carlos, CEP 13565-905, Brazil

6 - CBPF – Brazilian Center for Research in Physics, Rua Doutor Xavier Sigaud, 150 Rio de Janeiro, CEP - 22290-180, Brazil

7 - LNNano – Brazilian Nanotechnology National Laboratory, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Brazil

Address correspondence to

Mateus B. Cardoso

cardosomb@lnnano.cnpem.br

Flávio Garcia

fgarcia@cbpf.br

KEYWORDS: hyperthermia; magnetic vortex; nanoring; nanoparticles cytotoxicity; *in vitro*

hyperthermia

This work exploits a new class of vortex/magnetite/iron oxide nanoparticles designed for magnetic hyperthermia applications. These nanoparticles, named Vortex Iron oxide Particles (VIPs), are an alternative to the traditional

Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) since VIPs present superior heating power while fulfill the main requirements for biomedical applications (low cytotoxicity and nonremanent state). In addition, the present work demonstrates that the synthesized VIPs also promotes an internalization and aggregation of the particles inside the cell, resulting on a highly localized hyperthermia in the presence of an alternated magnetic field. Thereby, we demonstrate a new and efficient magnetic hyperthermia strategy in which a small, but well localized, concentration of VIPs can promote an intracellular hyperthermia process.

INTRODUCTION

Over the last decades, cancer became the second major cause of death in the world^{1,2}. Facing this, several therapies were developed and are still under continuous improvement³⁻⁹. In this scenario, one of the most promising cancer therapies is based on the use of magnetic nanomaterials^{10,11} which can be specially designed for localized hyperthermia^{12,13}. This strategy explores the magnetic induction heating through an alternating magnetic field together with the fact that tumor cells are more heat sensitive than healthy cells¹⁴. This approach created a demand for the development of highly specialized nanoparticles (NPs), which could be selectively absorbed by the tumor tissue and generate the targeted heating. Currently, most of the NPs used for magnetic hyperthermia are small iron oxide (magnetite or maghemite) spheres with sizes smaller than 15 nm which are functionalized with organic compounds such as PEG or Dextran to reduce their cytotoxicity¹⁵. These NPs are commonly called Superparamagnetic Iron Oxides Nanoparticles or SPIONs¹⁶ and have already been tested in clinical trials¹⁷ for various cancer types, such as brain and prostate cancers^{7,18-20}. Recently, MagForce® Nanotechnologies AG²¹, a company from Germany, received the European approval to use SPIONs for human magnetic hyperthermia cancer therapy.

Until recently, the concept of a superparamagnetic NPs has been the backbone on the development of magnetic hyperthermia¹². It has been widely optimized in terms of size, saturation magnetization and magnetic anisotropy²²⁻²⁴ aiming the highest response under usual conditions of applied magnetic field (amplitude and frequency). Nonetheless, the work from Liu²⁵ introduced a new class of iron oxide based nanoparticles presenting an improved magnetic hyperthermia response when compared to standard SPIONs while preserving low cytotoxicity. It was demonstrated that these characteristics are due to the unusual shape and size of these particles which explore a peculiar configuration known as magnetic vortex²⁶. The peculiarity of such magnetic states comes from their distinct magnetic moment configuration. In this case, the magnetic moments from the

iron oxide curls in concentric circles confining the magnetic flux within the particle hence creating a particle with no magnetic pole, a micromagnetic ouroboros.

In the present work, we have synthesized a new class of nanoparticles named as Vortex Iron oxide Particle, or simply VIPs, with distinct dimensions in the nanometer range while their magnetic dynamics and vortex states were characterized through a combination of micromagnetic simulations and magnetization measurements. *In vitro* experiments demonstrated that the synthesized nanoparticles were not cytotoxic and could further be used to evaluate their magnetic hyperthermia in the presence of mammalian cells. Magnetic hyperthermia experiments showed evidences of a very localized response, promoting cell death with no environmental heating. Finally, images from Confocal microscopy and Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) showed that the VIPs had been internalized by the cells. The internalization phenomena of the VIP, usually not seen with SPIONs, resulted on a so-called intracellular hyperthermia and allowing us to conclude that the VIP when compared to traditional SPION would be a much more localized and efficient particle for magnetic hyperthermia.

RESULTS AND DISCUSSION

Three distinct Vortex Iron-oxide Particles, hereafter denominated VIP1, VIP3 and VIP6, were synthesized by using a methodology previously reported^{27,28}. The VIPs morphology was investigated by field emission scanning electron microscopy (FESEM) and the particle size distribution was obtained by measuring the height, internal and external diameter of at least 400 particles. **Figure 1** presents a collection of SEM images of three distinct samples while the histograms for VIP1, VIP3 and VIP6 are provided in **Figure S1** (Supporting Information).

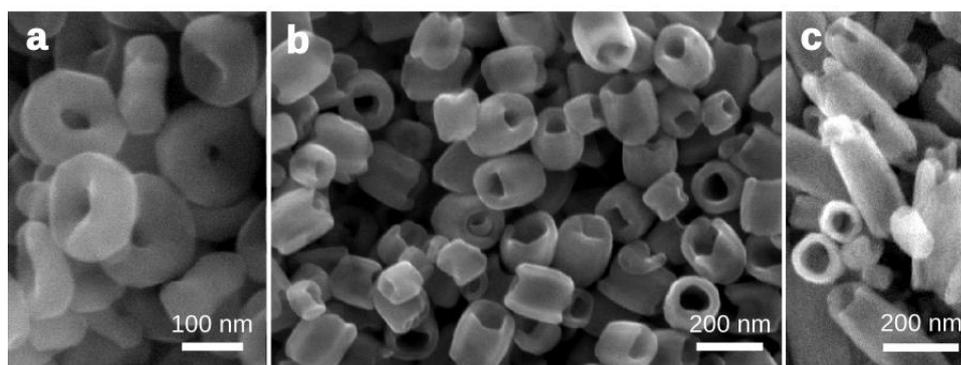


Figure 1. SEM image of iron oxide nanoparticles prepared by hydrothermal reaction: (a) VIP1 (nanoring-like particles); (b) VIP3 (aspect-ratio close to 1); and (c) VIP6 (nanotube-like particle).

These three samples were synthesized in order to investigate the aspect ratio influence (here defined as the VIP's height divided by the its external diameter) on the magnetic, physicochemical and biological properties of the samples. X-ray diffraction (XRD) and X-ray absorption near edge spectroscopy (XANES) experiments were performed to probe the crystallographic structure and chemical composition along the VIP synthesis. These results are presented in the Supporting Information (**Figures S2** and **S3**) and indicate that the obtained VIPs are mostly composed by magnetite. Magnetic characterization was performed at different temperatures and all samples were measured in the dried state. **Table 1** presents the saturation magnetization measured from **Figure S4**. It is possible to observe that the process of NPs reduction was not equally efficient for all nanoparticles. Nevertheless, the saturation magnetization results, corroborates that the VIPs are mostly composed of magnetite. The hyperthermia measurements were performed and **Table 1** summarizes the *SAR* values calculated for the three studied particles together with their respective magnetization of saturation (M_s). VIP1 is the one presenting the highest *SAR* value (426 W g^{-1}) and the largest saturation magnetization (102 emu g^{-1}). The third column normalizes the measured *SAR* by the M_s indicating that the samples are consistent and that the morphology can play an important role on the hyperthermic response.

Table 1. *SAR* values calculated for 200 Oe applied field. Saturation Magnetization is also presented for comparison.

Nanoparticle	<i>SAR</i> at 200Oe (W g^{-1})	Saturation Magnetization (emu g^{-1})	Normalized <i>SAR</i> (W/emu)
VIP1	426	102	4.2
VIP3	368	79	4.6
VIP6	401	81	4.9

In addition, series of micromagnetic simulations were done to confirm the existence of magnetic vortex within the three morphologically (size and shape) distinct VIPs. **Figure S5** presents a representative image of the simulated nanoparticle where NP height (*H*), NP outer diameter (*ExtD*) and NP inner diameters (*IntD*) are presented.

Thus, sweeping across different series of (*H*, *ExtD*, *IntD*) trios, the results were used to compose a 3-D micromagnetic phase diagram. In **Figure 2** two sections from the diagram at *IntD* = 50 nm and *IntD* = 70 nm while *ExtD* and *H* varied from 80 to 210 nm and from 5 to 400 nm, respectively, show the regions of the synthesized VIPs. Together the magnetic states depicted on the phase diagram as green, blue and red colors

represent the Vortex, Bamboo and 2xVortex states illustrated with the streamlines following the magnetic flux within the particle.

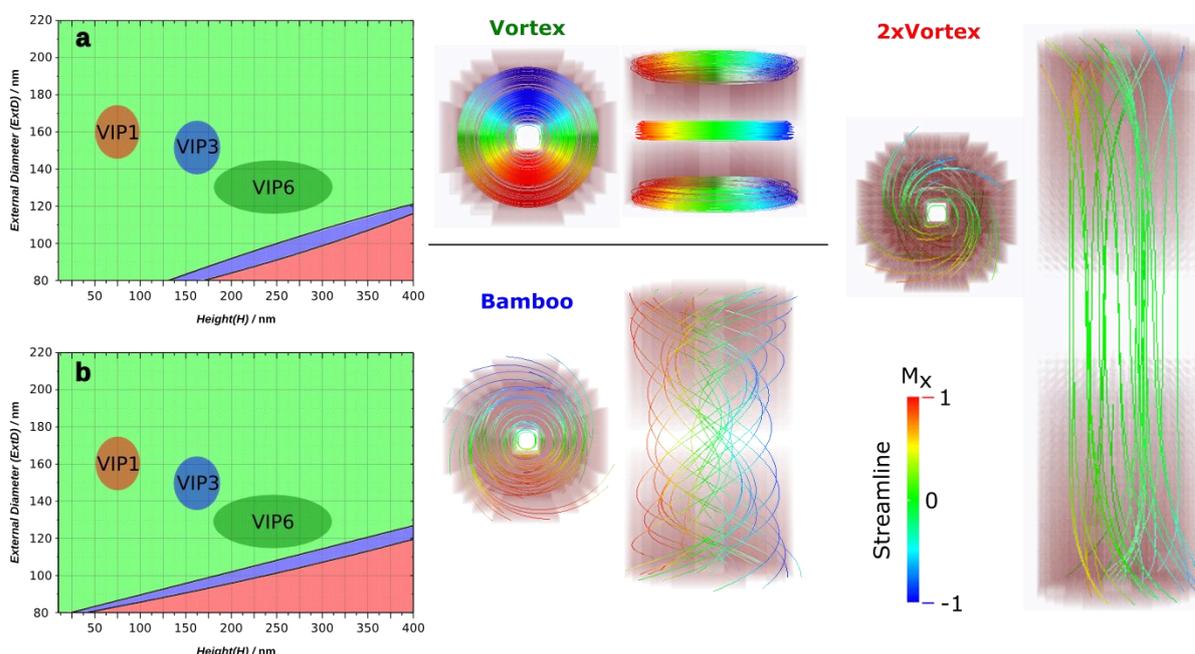


Figure 2. Sections of the 3-D phase diagrams for a fixed internal diameter of a) 50 nm and b) 70 nm. Vortex (green), Bamboo (blue) and 2xVortex (red) states are presented. The three regions identified as VIP1, VIP3 and VIP6 are the morphologic position within the phase diagram of the respective nanoparticles with respect to their standard deviations. As for the rest of the phase diagram, it has been omitted for a matter of space restrictions.

Also, in **Figure 2**, the regions identified as VIP1, VIP3 and VIP6 representing the size distributions within the micromagnetic phase diagram with respect to their standard deviations shows that the NPs are within the magnetic vortex region indicating that the synthesized particles can indeed be classified as Vortex Iron oxide Particles. Furthermore, it is worth note that the observed magnetic states are in agreement with similar nanoparticles and their micromagnetic phase diagram^{27,29}, at the same time, part of the presented micromagnetic phase diagram are new and also represent a unpublished contribution to the study of the current knowledge regarding the VIP shape and micromagnetic state .

Following, the cytotoxicity of these particles was evaluated due to their possible application as a bioengineered material^{30–33}. Human Embryonic Kidney (HEK293) cells were exposed to different concentrations of the VIPs for 24 and 48 h (**Figure S7**) and no cytotoxic effect was observed. In fact, a small increase in cell proliferation was seen, indicating that the nanoparticles may be affecting the cell metabolism. However, the reasons for this proliferation increase are out of the scope of this work and the cytotoxicity absence indicates that the synthesized nanoparticles can be potentially used for biomedical applications.

Further *in vitro* experiments with mammalian cells were performed to evaluate the potential of these nanoparticles for hyperthermia applications. This experiment was performed on HEK293T previously incubated with VIPs for 24 h. After being exposed to magnetic field, cell viability was measured by Flow Cytometry (FC) through cell staining with propidium iodide (PI). It is known that PI is a membrane impermeant fluorescent molecule that binds to the DNA of non-viable cells and, therefore, PI positive cells are considered dead cells.

Figure 3 summarizes the FC results, which quantifies the number of non-viable cells. Different colors were used to distinguish between the control group and the three distinct VIPs. The symbol on top of each bar indicates the exposure times results that are statistically different in accordance to a Students t-test.

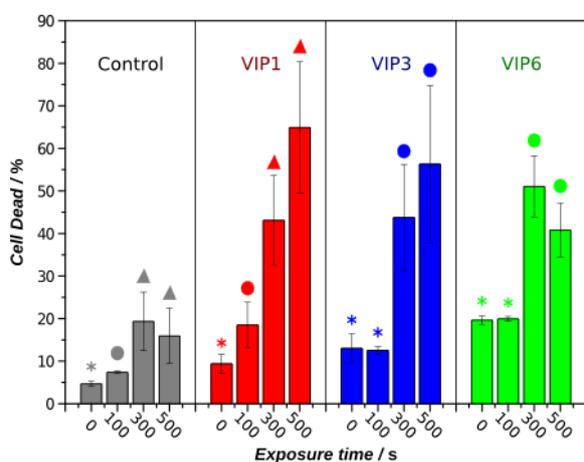


Figure 3. Effects of *in vitro* hyperthermia experiments on cell death rates after nanoparticle treatments. HEK293 cells were treated with indicated nanoparticles (24 h of incubation in the presence of $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of nanoparticles). The control cells are shown in gray and VIP1, VIP3 and VIP6 nanoparticles treated cells are shown in red, blue and green, respectively. Cell death was assessed by Flow Cytometry using determination of dead cells by PI incorporation and the gating is show in **Figure S8**. Statistical analysis was performed by Students t-test and the symbols in common denote a lack of statistical difference within the same particle or control group.

Firstly, it is important to point out that the *in vitro* hyperthermia experiment has been carried outside of the cell culture environment. Consequently, it was not possible to guarantee a stress free environment for the cells resulting in significant cell stress for longer treatment times. Besides, even working below the accepted biologic limits, there are no guaranties that the magnetic field is not affecting the cells. The consequences of these effects are observed with the control group (gray) shown in **Figure 3**. Another important point to be highlighted is the

absence of observable sample heating correlated with a magnetic field exposure during the experiment. This was somehow expected, since the NPs concentration was considerably low compared to the culture medium in which the cells were initially incubated with the VIPs. In a typical experiment, the SAR measurements presented in **Table 1** were performed using a 1 mg/mL VIP aqueous suspension. On the other hand, for the *in vitro* experiments, the cells were initially incubated with 0.1 mg/mL VIP suspensions and then washed in order to remove any free non-internalized VIP. This procedure resulted in a concentration at least 10 times smaller in the *in vitro* experiment which is too small for generating an observable environmental heating.

Therefore, it is clear that the VIPs in the presence of magnetic field induced cell death. Moreover, the two samples statistical t-test allowed distinguishing common behaviors for all three nanoparticles. Firstly, we can observe that most of the inflicted damage in the cells leading to the cell death occurs after 100 s of applied magnetic field. This is supported by the comparison between VIP groups and the control one. On the other hand, the statistical tests shown in **Figure 3** indicate that the amount of dead cells is not significantly different when 300 and 500 s are compared.

Figure 4 shows a set of confocal images for the control as well as VIP6 treated cells for 24 h as a tentative to better understand the biological effect associated to these particles.

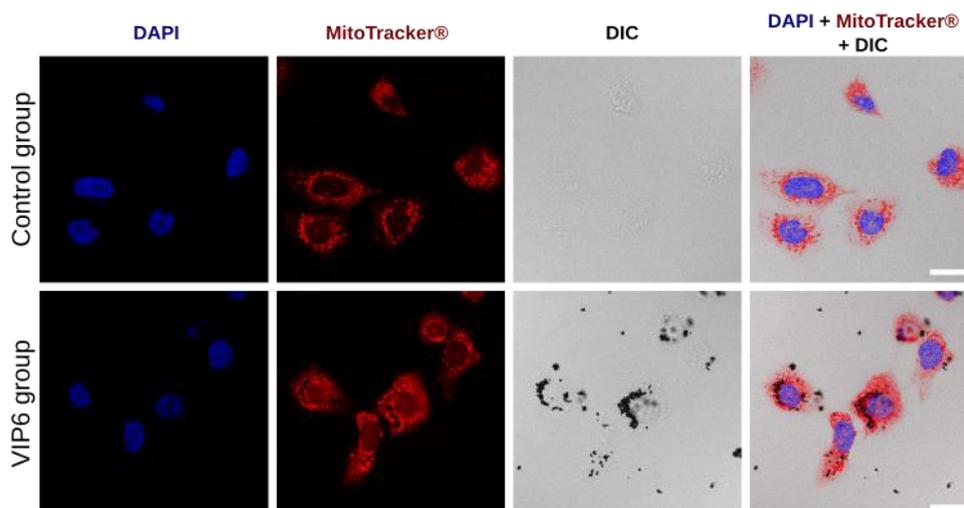


Figure 4. Confocal images of U2-OS fixed control cells and cells treated for 24 h with VIP6. Fluorescent signals of Hoechst-nuclei marker (blue) and Mitotracker®-mitochondria marker (red) indicates nucleus position and cell boundaries, respectively. DIC image shows VIP6 agglomerations. Combination of all fluorescent and DIC images indicates VIP6 localization within the cells. Scale bar is 20 μ m.

Nuclei of U2-OS cells were stained in blue with Hoechst while mitochondria were labeled in red with Mitotracker® deep red. The mitochondria labeling was used as an indicative of cell boundaries. Differential Interference Contrast (DIC) allowed the visualization of magnetite nanorings agglomerates due to the low light transmission property of the material resulting on dark contrast regions within the DIC image. Ultimately, the superposition of all images of the sample group allows the observation that the nanoparticles are mainly located close to the nuclei. Similarly, conventional optical images were taken for HEK293T cells after the treatment with all three nanoparticles of interest. The HEK293T results are not shown since the cytoplasm of these cells are considerably smaller than U2-OS and, consequently, NPs location is less evident.

Once individual nanoparticles are too small to be seen using an optical microscope, we can only assume that the dark spots observed on the DIC images corresponds to nanoparticles agglomerates inside the cells. Due to the fact that the presented confocal technique is not able to discriminate between agglomerates creating some uncertainty on where the nanoparticles are inside or on the surface of the treated cells, HEK293T cells were fixed, dehydrated, embedded in resin, sliced using an ultramicrotome and further imaged by STEM (**Figure 5**).

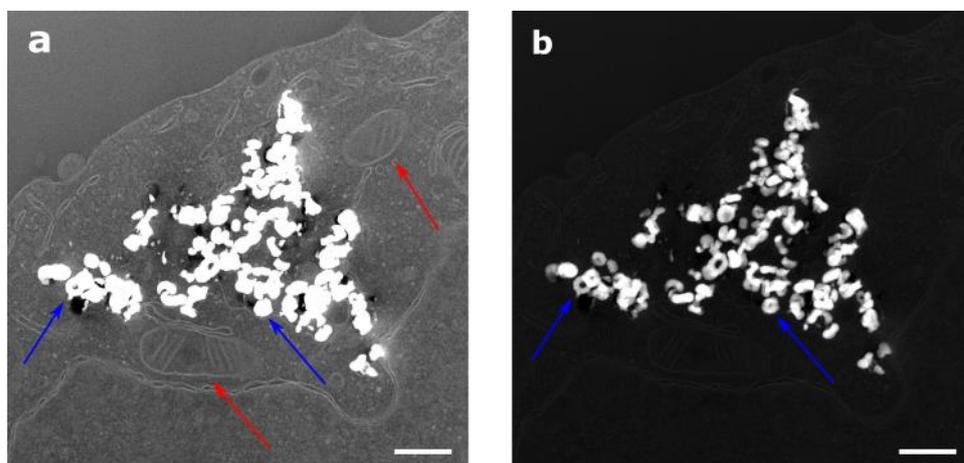


Figure 5. STEM dark field images of VIP1 treated HEK cells ultrathin section. The HEK cells were treated following the same procedures as if would be expose to the magnetic field. a) STEM ADF imaging for detailing cell mitochondria (red arrows), but saturated VIP with indistinctive ring-shape structure (blue arrows); b) STEM HAADF for detailing VIP1 structure with distinctive ring-shape structure (blue arrow). Scale bar is 500 nm

Images were obtained in scanning mode (STEM) using low and high angular annular dark field (ADF and HAADF, respectively) detection modes. For a better cells contrast, lower angle collection was selected using ADF. Afterward, keeping the same field of view, HAADF was selected increasing the nanoparticle contrast. All observations were performed using minimal dose to prevent sample radiation damage. These images allowed the observation of individual nanoparticle within the cell structure, confirming that the VIPs were duly internalized by the cells. Finally, we can argue that the distinctive flow cytometry backscattering signal observed (**Figure S8**) for all VIP treated cells are correlated to the presence of internalized VIP within the cell. Therefore, STEM images together with the flow cytometry measurements strongly suggest that the VIPs are internalized and working in favor of an intracellular hyperthermia effect.

A modified MILC protocol presented by Galimard et al³⁴ was employed to estimate the nanoparticle mass concentration inside the cells. Briefly, after incubation, the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) to remove the non-internalized nanoparticles. Following, the cells were trypsinized, re-suspended in DMEM and aliquots were taken for cell counting while the remaining cells were centrifuged to form a pellet. Finally, the pellets were dissolved in hydrochloric acid resulting in a yellow color solution which was analyzed by UV–Vis spectroscopy and compared to the references. The amount of iron absorbed by the cells was used to estimate the nanoparticle concentration per volume (Table 2).

Table 2. Intracellular VIP mass concentration obtained from the MILC protocol. m_{FE} is the mass of iron oxide divided by the number of cells and M_{FE} is the concentration of iron oxide inside a mammalian cell considering an average cell volume of 10 pL³⁵. Also, the iron oxide concentration used during the nanoparticles *in vitro* incubation for the hyperthermia experiments is presented for comparison.

Nanoparticle Name	m_{FE} (pg/cell)	M_{FE} (mg/ml)*
VIP1	106 ± 19	11 ± 2
VIP3	80 ± 15	8 ± 2
VIP6	81 ± 16	8 ± 2
<i>in vitro</i> incubation	-	0.1

* Estimated value for a mammalian cell with 10 pL volume³⁵.

As one can observe, the presence of the VIP inside the HEK293T cells are in a concentration at least 80 times larger than the initially administered during incubation. So the observed cell death is a consequence from an

intracellular hyperthermia process. In this scenario, only the cells with internalized VIPs are affected by the magnetic field and the majority of affected cells are killed up to 300 s. After 300 s, the statistical t-test showed that all nanoparticles presented a similar cell viability results. This behavior corroborates with the proposed scenario of the VIP concentration being insufficient to generate environmental heating, as well as keeping the heat localized within the cells. As such, this behavior would be twice as effective because would only effect cell with internalized VIPs and spare VIP free cells from the hyperthermia induced dead.

Taking the VIPs dimension (as large as 100 nm) into consideration, we believe that the internalization is driven through active mechanisms, such as, phagocytosis or endocytosis, since for this size range the osmotic mechanism can be excluded. Such internalization mechanisms associated to these NPs were out of the scope of this work and is still open for discussion increasing the possibility for optimization and control on the process. Individually, VIP1 nanoparticle presented the best performance when compared to the other two particles studied. It presented best SAR values (**Table 1**) in addition to more stable vortex state shown by the micromagnetic simulations. Besides, the *in vitro* hyperthermia experiment of VIP1 had the most consistent results, with a tendency of promoting cell death for an exposure time of only 100 s.

CONCLUSION

In the present paper we demonstrated that mammalian cells have a tendency to internalize the synthesized VIPs with no significant cytotoxicity effect. Furthermore, the observed concentration of the VIP inside the cells promoted a much more efficient path to cell dead through magnetic hyperthermia. We observed that, although the overall concentration was unable to promote environmental heating, most of the VIP were found to be inside the cells. After quantifying the concentration within the cells we noticed that it was at least 80 times greater than the overall concentration used for the entire experiment. Thanks to this greater intracellular concentration, the magnetic field was able to promote a localized heating which resulted in a much more efficient path to cell death. Such a process was named intracellular hyperthermia that, to our knowledge, is an unusual phenomenon despite their significance on the development of magnetic hyperthermia nanoparticle. It is common to most hyperthermia procedures, to ignore any intracellular hyperthermia phenomena since the majority of the works on the field focus on environmental heating targeting entire tissues with no selectivity at the cellular level. Those procedures would target tissues and cells indiscriminately denning the benefits of a more selective targeting in cellular levels. As a result, we believe the intracellular hyperthermia presented in this work is the natural next step for magnetic hyperthermia. The presented strategy would have a better selectiveness and a much more

efficiency, at the same time the synthesized nanoparticles would also provide new forms of drug delivery and intracellular targeting to be further exploited in the future.

EXPERIMENTAL METHODS

Materials: Iron (iii) chloride (FeCl_3), monosodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) and sodium sulfate (Na_2SO_4) were purchased from Sigma-Aldrich. All chemicals were used without further purification. The H_2/He (5 %) gas mixture was prepared using H_2 (99.99 %) and He (99.99 %) by mass controllers with set points of 2.5 mL min^{-1} and 47.5 mL min^{-1} , respectively.

Synthesis of the Iron Oxide Nanorings: The iron oxide particles were synthesized by a two-step process. First, hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanorings were prepared following the procedure reported by Jia et al.^{27,28} In a typical experiment (for sample VIP1), a solution of FeCl_3 (0.02 M), NaH_2PO_4 (0.1 M) and Na_2SO_4 (0.55 M) were mixed at room temperature. Different concentrations of NaH_2PO_4 were tested in order to investigate their influence over the NPs morphologies. The samples were named as VIP β for a respective NaH_2PO_4 concentration of $\beta \cdot 10^{-4} \text{ M}$. In all cases, a total volume solution of 80 mL was transferred to a Teflon-lined autoclave reactor (100 mL) that was closed and maintained at $220 \text{ }^\circ\text{C}$ for 48 h. After cooling down to room temperature, a red powder was precipitated by centrifugation and dried at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ under vacuum conditions, corresponding to $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles (hematite). The second step consisted in reducing the as-cast hematite nanoparticles in order to convert them to magnetite. The system was then annealed for 1 h at $420 \text{ }^\circ\text{C}$ in an H_2/He (5 %) 50 mL min^{-1} flux atmosphere.

Characterization: The morphology of the samples was investigated in a FEI Inspect F50 field emission scanning electron microscope (FESEM, 1.2 nm resolution, operated at 10-30 KV, secondary electrons detector, at the Brazilian Nanotechnology Laboratory). All samples were prepared by deposition of dried nanoparticles on a carbon tape on top of a Si (100) substrate. The corresponding particle size distribution was obtained by measuring the height as well as internal and external diameters of more than 400 particles duly aligned to the main electron beam axis.

Hyperthermia Measurements: The experimental SAR determination was done using an inducing heating system (Ambrell, Easy Heat 4.2 kW) with eight round water-cooled coils operating at an alternated magnetic field of 300 kHz and amplitude up to 40 kA m^{-1} . A known volume (2 mL) of suspended magnetic nanoparticles in water (1 mg mL^{-1}) were placed into a cylindrical glass vial which was thermally isolated preventing any heating

arising from the coil while mitigating the losses to the environment. Measurements were done along 180 s in which the temperature was probed by a fiber optic thermometer (Optocon, DE) at every 1 s with a resolution of 0.1° C. The SAR results were obtained from the slope curve following the expression shown in Equation 1.

In vitro hyperthermia: In vitro hyperthermia was performed on individual wells containing about 5×10^4 HEK293T cells in DMEM supplemented with serum and penicillin/streptomycin and maintained at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere for 24 h. Then, nanoparticles suspended in complete medium ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were added to each well, which were incubated at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere for 24 h. It is worth to highlight that the concentration used during *in vitro* hyperthermia experiments is 10 times lower than those one used on NP's SAR characterization, i.e., without cells. After incubation, each well was washed with DMEM in order to remove any free nanoparticle and leaving only those that actually interact with the cells. Each well was then exposed to the alternating magnetic field of 200 Oe and 300 kHz for different times (0, 100, 300, 500 seconds). Finally, cells were evaluated using flow cytometry using propidium iodide as label for dead cells. All measurements were done on triplicate.

Flow cytometry: Flow cytometry was carried out in a Flow Cytometry FACSCanto II - BD Biosciences. After magnetic field exposure the cells were trypsinized and stained with Propidium Iodide for 15 minutes at room temperature in the dark. Following, the cells were analyzed by the flow cytometry where PI positive cells were considered dead cells and PI negative were considered viable cells. All measurements were composed for at least 15000 events. Data of measurement size, cytotoxicity and cell dead are represented as the mean \pm standard error of the mean. Cell dead data were analyzed using Student-t test and a value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Statistical analysis: Data of measurement size, cytotoxicity and cell dead are represented as the mean \pm standard error of the mean. Cell dead data were analyzed using Student-t test and a value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Confocal optical microscopy: Confocal microscopy was performed using U2-OS cells. Cells were seeded over a microscope cover slip into a 24 cell culture wells at 5×10^4 cells per well in DMEM and maintained at 37 °C in a 5 % CO₂ atmosphere for 24 h. Then, the cells were incubated with suspended VIP1, VIP3 or VIP6 ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Untreated wells were used as control. Thereafter, mitochondria were stained with Mitotracker® Deep Red (Life Technologies) and then cells fixed with paraformaldehyde and

the nuclei stained with Hoechst. Finally, microscope slides were taken to a Leica SP-8 confocal microscope for imaging (LNBio-CNPEM).

TEM sample preparation: Following the same procedure described above, HEK cells were incubated for 24h on the presence of the nanoparticle. After the cell culture were gently washed with medium to remove free nanoparticles, following the adherent cells were removed from the well by scraping and fixed in 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 7.4). The samples were rinsed several times with cacodylate and then treated with 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide in the same buffer. The samples were rinsed and dehydrated in a ethanol series (30 to 100%), embedded in epoxy resin and then polymerized at 60 °C for 48h. Ultrathin sections < 150 nm were obtained in an RMC ultramicrotome.

STEM Images: Scanning transmission electron microscopy (STEM) was performed on a JEOL 2100F instrument operated at an accelerating voltage of 200 kV with a 0.7 nm spot size. STEM dark field images were obtained using a JEOL low or high angular annular dark field (ADF and HAADF, respectively) detector.

Milc Protocol: Iron taken by the HEK cells were quantified using the MILC protocol³⁴. After incubation the well was washed with phosphate buffered saline (PBS) in order to remove any free nanoparticle and leaving only those that actually interact with the cell. Following the cells were trypsinized and re-suspended in DMEM. Aliquots were taken for numbering using a Countess® II FL Automated Cell Counter and the rest centrifuged to get a pellet. Finally, the pellets are dissolved in hydrochloric acid (35%) overnight ending with the yellow color characteristic of tetrachloroferrate ions FeCl_4^- . The tetrachloroferrate solution UV-Vis absorption were taken on an 8453 Agilent Ultraviolet-Visible Spectrometer and the amount of iron were defined with the help of a reference solutions. All measurements were done on triplicate

Micromagnetic simulations: The micromagnetic simulations were performed using the OOMMF package³⁶. This package provides the total energy of a simulated magnetite nanoparticle as the sum of independent energy terms: the exchange energy, the self-magnetostatic energy, the surface anisotropy energy and the Zeeman energy. The magnetite magnetic parameters used for the simulations were the following: saturation magnetization $M_s = 485 \text{ kA m}^{-1}$; exchange stiffness $A = 13.2 \text{ pJ m}^{-1}$; magneto crystalline anisotropy constant $K_1 = -136 \text{ } \mu\text{J m}^{-3}$; cubic anisotropy with z axis defined along the axe of symmetry of the cylinder; and damping factor $\alpha = 0.5$ (chosen based on a reasonable time to reach the equilibrium magnetization state). The system was discretized on cubic cells of $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$ which is in agreement with the magnetite exchange length (4.9 nm).

Supporting Information.

Supporting information includes size distribution for the height, internal diameter and external diameters of the synthesized nanoparticles (VIP1, VIP3 and VIP6); X-ray diffraction patterns of VIP3; X-ray absorption near edge spectroscopy of VIP3; magnetization measurement of synthesized VIPs; representative image of a simulated nanoparticle; simulated magnetic hysteresis for a monodisperse ensemble of randomly oriented VIP; representative image of simulated magnetic phases found; in vitro cytotoxicity assay after 24 and 48 hours of incubation in the presence of VIPs; and representative flow cytometry measurement. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

ACKNOWLEDGMENT

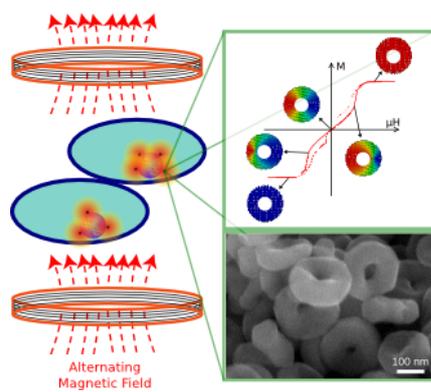
The authors would like to thank LNLS for the use of the synchrotron facility (XAFS1 and XAFS2), LNBio for the use of the confocal microscope and LabNano/CBPF for the transmission electron microscopy facility. Silvio Consonni is acknowledged for his assistance during confocal microscopy and fruitful discussions. The authors also would like to thank LMBT group at IFGW-Unicamp for the magnetic characterizations. Dr. Adelino Coelho and Dr. Ricardo Reis are acknowledged for their assistance during SQUID measurements. LNNano is acknowledged through the projects Inspect14936 and Inspect13251. This work was supported by Brazilian agencies CNPq through a PhD fellowship and research project 481790/2013-6 and FAPESP through the projects 2011/17402-9, 2011/18647-5, 2011/21954-7 and 2015/25406-5.

1. Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 69–90 (2011).
2. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
3. Riehemann, K. *et al.* Nanomedicine-Challenge and Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 872–897 (2009).
4. Rozhkova, E. A. Nanoscale Materials for Tackling Brain Cancer: Recent Progress and Outlook. *Adv. Mater.* **23**, H136–H150 (2011).
5. *Magnetic nanoparticles.* (Wiley-VCH-Verl, 2009).
6. Lewinski, N., Colvin, V. & Drezek, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* **4**, 26–49 (2008).

7. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **112**, 5818–5878 (2012).
8. Selvan, S. T., Patra, P. K., Ang, C. Y. & Ying, J. Y. Synthesis of Silica-Coated Semiconductor and Magnetic Quantum Dots and Their Use in the Imaging of Live Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 2448–2452 (2007).
9. Vivero-Escoto, J. L., Slowing, I. I., Trewyn, B. G. & Lin, V. S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery. *Small* **6**, 1952–1967 (2010).
10. Ling, D. & Hyeon, T. Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. *Small* **9**, 1450–1466 (2013).
11. Rosen, J. E., Chan, L., Shieh, D.-B. & Gu, F. X. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **8**, 275–290 (2012).
12. Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O. & Mahmoudi, M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **166**, 8–23 (2011).
13. Salunkhe, A. B., Khot, V. M. & Pawar, S. H. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 572–594 (2014).
14. Storm, F. K., Harrison, W. H., Elliott, R. S. & Morton, D. L. Normal tissue and solid tumor effects of hyperthermia in animal models and clinical trials. *Cancer Res.* **39**, 2245–2251 (1979).
15. Liu, G., Gao, J., Ai, H. & Chen, X. Applications and Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Small* **9**, 1533–1545 (2013).
16. Qiao, R., Yang, C. & Gao, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. *J. Mater. Chem.* **19**, 6274 (2009).
17. Jordan, A. *et al.* Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **225**, 118–126 (2001).
18. Johannsen, M. *et al.* Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* **21**, 637–647 (2005).
19. van Landeghem, F. K. H. *et al.* Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **30**, 52–57 (2009).

20. Müller, S. Magnetic fluid hyperthermia therapy for malignant brain tumors--an ethical discussion. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **5**, 387–393 (2009).
21. MagForce AG. Available at: <http://www.magforce.de/en/home.html>. (Accessed: 13th July 2016)
22. Noh, S. *et al.* Nanoscale Magnetism Control via Surface and Exchange Anisotropy for Optimized Ferrimagnetic Hysteresis. *Nano Lett.* **12**, 3716–3721 (2012).
23. Guardia, P. *et al.* Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment. *ACS Nano* **6**, 3080–3091 (2012).
24. Martinez-Boubeta, C. *et al.* Learning from Nature to Improve the Heat Generation of Iron-Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Applications. *Sci. Rep.* **3**, (2013).
25. Guimarães, A. P. *Principles of Nanomagnetism*. (2009).
26. Jia, C.-J. *et al.* Large-Scale Synthesis of Single-Crystalline Iron Oxide Magnetic Nanorings. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16968–16977 (2008).
27. Jia, C.-J. *et al.* Single-Crystalline Iron Oxide Nanotubes. *Angew. Chem.* **117**, 4402–4407 (2005).
28. Fan, H.-M. *et al.* Single-Crystalline MFe_2O_4 Nanotubes/Nanorings Synthesized by Thermal Transformation Process for Biological Applications. *ACS Nano* **3**, 2798–2808 (2009).
29. Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M. A. & Hosseinkhani, M. Toxicity Evaluations of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Cell ‘Vision’ *versus* Physicochemical Properties of Nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 7263–7276 (2011).
30. Soenen, S. J. & De Cuyper, M. Assessing iron oxide nanoparticle toxicity *in vitro* : current status and future prospects. *Nanomed.* **5**, 1261–1275 (2010).
31. Naqvi *et al.* Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *Int. J. Nanomedicine* 983 (2010). doi:10.2147/IJN.S13244
32. Soenen, S. J. H. & De Cuyper, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 207–219 (2009).
33. Galimard, A. *et al.* Thirty-Femtogram Detection of Iron in Mammalian Cells. *Small* **8**, 2036–2044 (2012).
34. Bionumbers. Available at: <http://bionumbers.hms.harvard.edu/KeyNumbers.aspx>. (Accessed: 21st July 2016)
35. M.J. Donahue & D.G. Porter. OOMMF User’s Guide, Version 1.0. (1999).

TOC



Supporting Information

Engineered magnetic nanorings for hyperthermia cancer therapy

Carlos S. B. Dias^{1,2}, Talita D. M. Hanchuk^{1,3}, Heberton Wender⁴, Willian T. Shigeyosi^{2,5}, Jörg Kobarg¹, André Linhares Rossi⁶, Mateus B. Cardoso^{2,7*}, and Flávio Garcia^{6*}

1 - UNICAMP – State University of Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, CEP 13083-970, Brazil

2 - LNLS – Brazilian Synchrotron Light Source, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Brazil

3 - LNBio – Brazilian Bioscience National Laboratory, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Brazil

4 - UFMS – Federal University of Mato Grosso do Sul, Cidade Universitaria, Campo Grande, CEP 79070-900, Brazil

5 - UFSCar – Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, s/n, São Carlos, CEP 13565-905, Brazil

6 - CBPF – Brazilian Center for Research in Physics, Rua Doutor Xavier Sigaud, 150 Rio de Janeiro, CEP - 22290-180, Brazil

7 - LNNano – Brazilian Nanotechnology National Laboratory, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, CEP 13083-970, Caixa Postal 6192, Brazil

Address correspondence to

Mateus B. Cardoso

cardosomb@Innano.cnpem.br

Flávio Garcia

fgarcia@cbpf.br

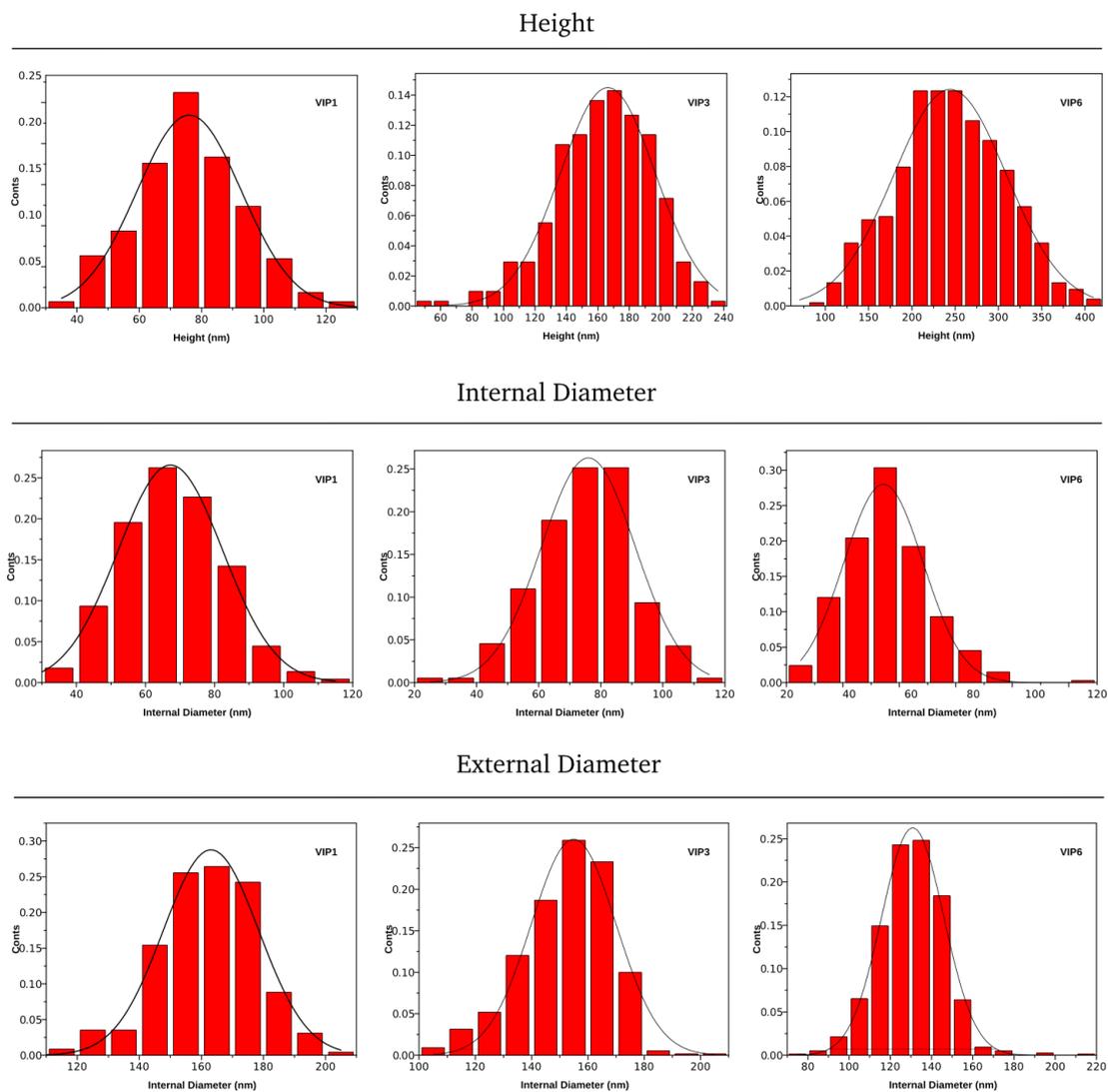


Figure S1. Histograms for VIP1, VIP3 and VIP6 morphology.

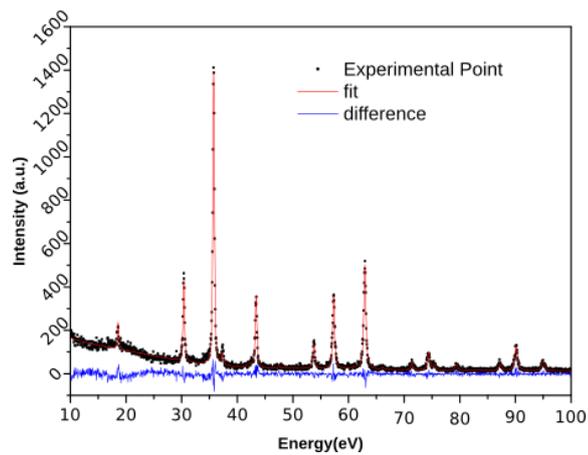


Figure S2. XRD measurement of VIP3 particles.

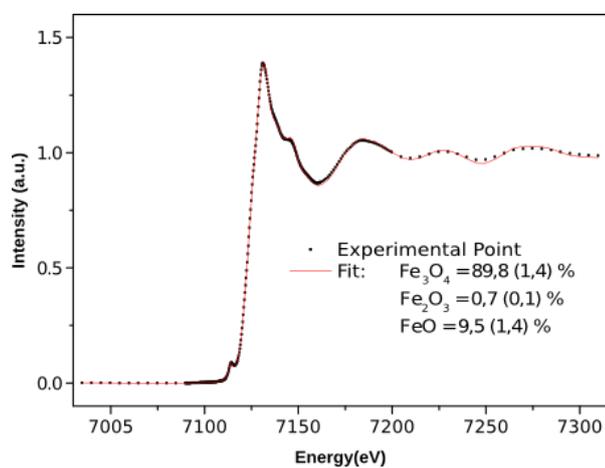


Figure S3. XANES measurement of VIP3 particles.

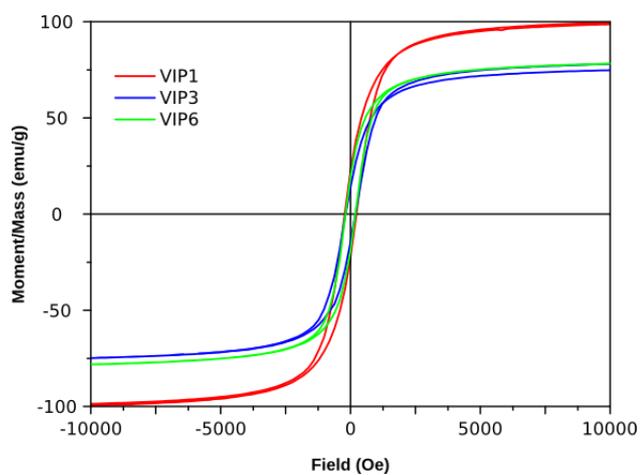


Figure S4. Magnetization curve measured for VIP1 (red), VIP3 (blue) and VIP6 (green).

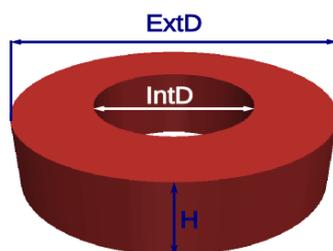


Figure S5. Representative image of a simulated nanoparticle used for the phase diagram composition.

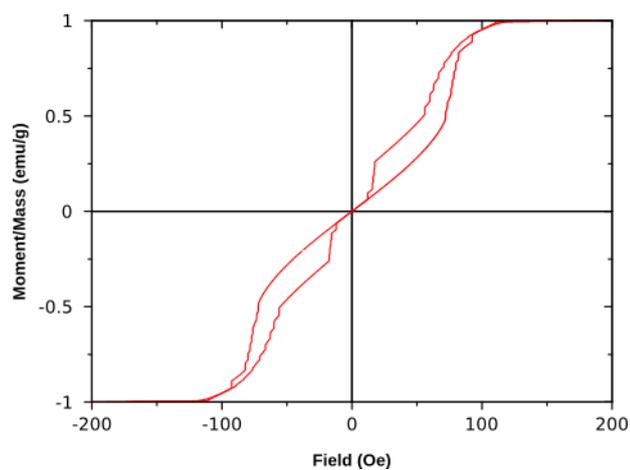
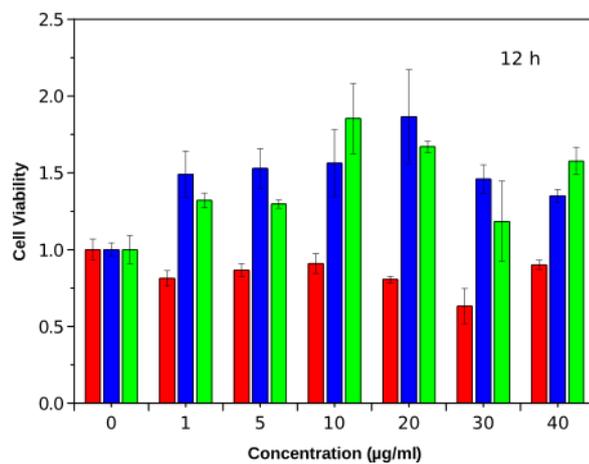


Figure S6. Simulated magnetic hysteresis for a monodisperse ensemble of randomly oriented nanorings.



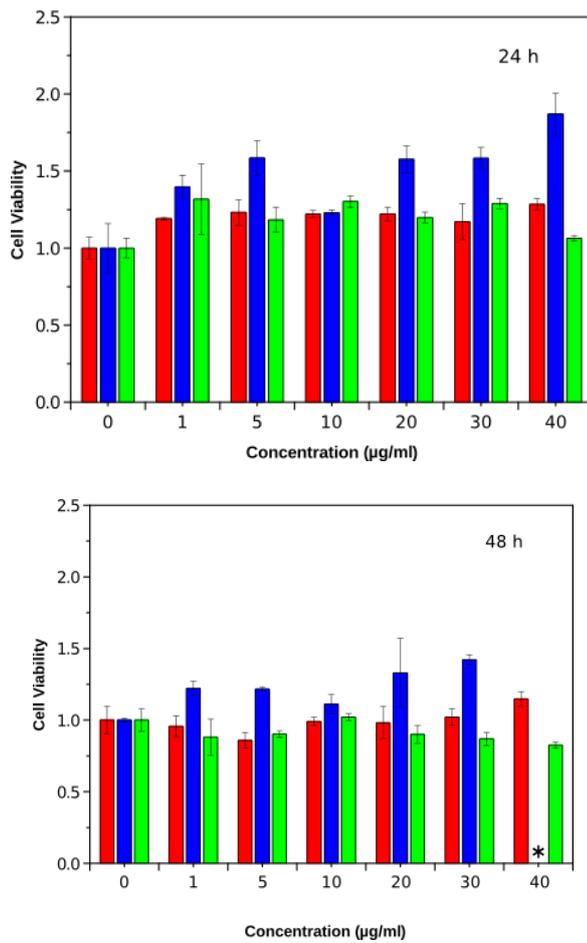


Figure S7. Cytotoxicity tests for 12, 24 and 48 hours of nanoparticle incubation.

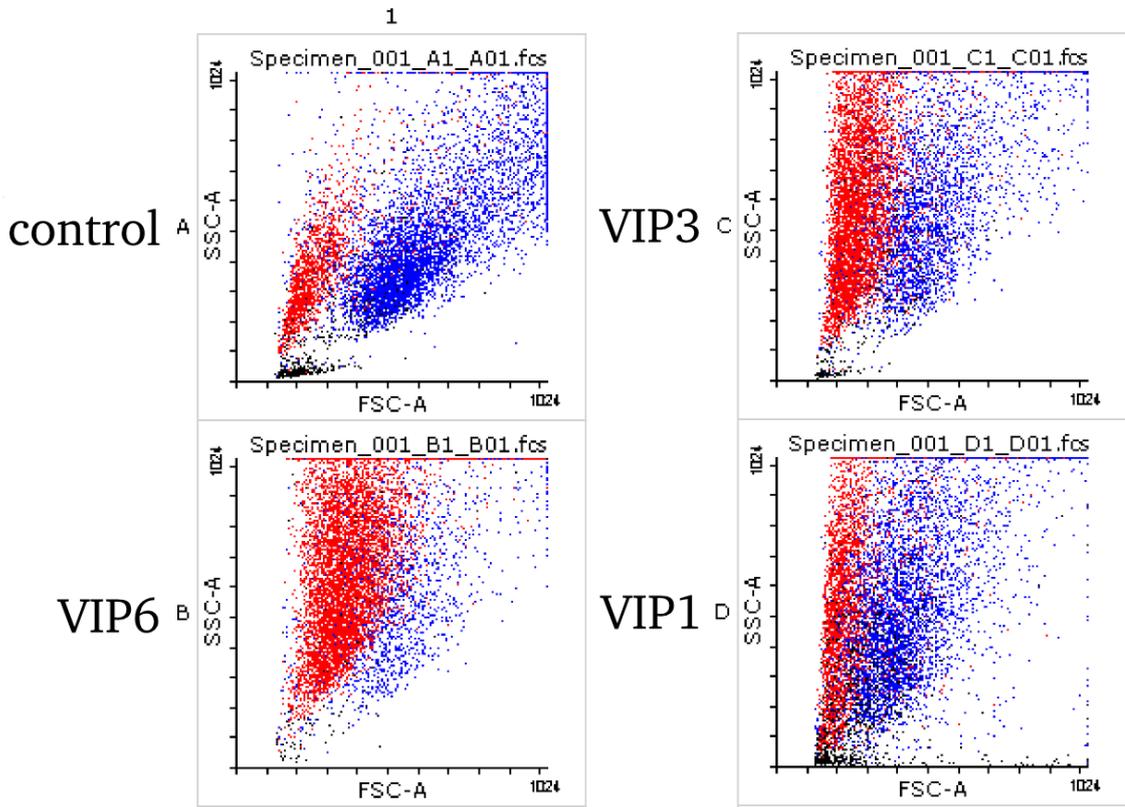


Figure S8. Flow Cytometry measurements: Side Scattering signal (SSC) vs Forward Scattering signal (FSC). All red points refer to dead cells and blue to live cells.