



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

ARYANE TOFANELLO DE SOUZA

**Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de
óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo
citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical
humano (células HeLa)**

São José do Rio Preto, 2011

Aryane Tofanello de Souza

Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, Área de Concentração – Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto
2011

Souza, Aryane Tofanello de.

Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa) / Aryane Tofanello de Souza. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

111 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: José Geraldo Nery

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Física nuclear. 2. Nanopartículas magnéticas. 3. Carcinoma cervical. 4. Células HeLa. I. Nery, José Geraldo. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 539.1

Aryane Tofanello de Souza

Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, Área de Concentração - Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Nonato Costa
USP – Ribeirão Preto

São José do Rio Preto
30/setembro/2011

Dedico este trabalho a meus pais, Ari e Ivete, e ao meu irmão, Leonardo, por toda compreensão, carinho, incentivo e auxílio à minha formação. Sou o que sou porque vocês existem.

Agradecimentos

Aproveito a oportunidade para agradecer a todos que, com seus conhecimentos, incentivos, compreensão e críticas colaboraram para que eu ultrapassasse mais uma etapa. Em especial agradeço:

A Deus, essa misteriosa fonte de vida e energia.

Aos meus pais, Ari e Ivete, por tudo que de melhor eu pude receber e aprender com vocês. Todo amor e gratidão!

Ao meu amado irmão, Leonardo, simplesmente pela sua existência.

A minha família, por todo companheirismo, apoio e infindáveis momentos de alegria.

Ao prof. Dr. José Geraldo Nery, base da minha formação científica. Obrigada pela orientação, confiança, profissionalismo, competência e tempo dedicado.

A prof. Dr. Paula Rahal e ao prof. Dr. Sebastião Taboga pela fundamental parceria. Obrigada por toda a contribuição que suas experiências acrescentaram em meu projeto.

A Natalia Maria Candido e a Dra. Marília Calmon, porque muito deste trabalho é mérito e esforço de vocês.

A prof. Dr. Irene Raposo do IGc-USP por disponibilizar seu laboratório para a realização de algumas medidas. Obrigada pela cooperação. Grandes avanços se fazem de pequenas atitudes como a sua.

Aos professores e funcionários responsáveis pela minha formação, obrigada pelos conhecimentos transmitidos.

Aos irmãos que pude escolher pelo caminho: Soraia Perez, Juliana Theodoro, Adriano Matrangolo, Danubia Batista, Bruno Zechmeister, Leticia Zanphorlin, Lilian Ribeiro, Vinicius Brancati, Luana Caetano e Fabio Ferreira. Obrigada por fazerem do meu mundo um lugar mais bonito e aconchegante!

Aos outros amigos, que mesmo distantes, comemoram comigo cada conquista.

Aos companheiros de laboratório. Obrigada por tornarem meus dias mais agradáveis e pela rica troca de experiências.

Aos professores presentes nesta banca, que farão orientações para a melhora do meu trabalho. Obrigada pela disposição de vocês.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Obrigada, obrigada, obrigada a todos!

Resumo

Nanopartículas magnéticas (NPMs) têm sido alvo de inúmeras investigações por seu grande potencial de aplicação nos mais diferentes campos tecnológicos. Dentre tantos, elas destacam-se na área biomédica, seja no diagnóstico ou tratamento de diversas doenças. Neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas magnéticas (NPMs) de óxido de ferro (magnetita) pelo método de coprecipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio alcalino. O objetivo central foi estudar as características morfológicas, estruturais, magnéticas e o comportamento biológico desses compostos em células cancerígenas, visando futuras aplicações biomédicas. Inicialmente as nanopartículas magnéticas foram avaliadas em função dos parâmetros físico-químicos que influenciam diretamente as características finais do produto (pH, molaridade, temperatura e tipo de base) para se observar as melhores condições de síntese e a influência de cada um nas características do produto. As nanopartículas foram caracterizadas por difratometria de raios-X, microscopia eletrônica de varredura, potencial zeta e magnetometria. Desse primeiro estudo concluiu-se que a coprecipitação produz partículas com polidispersão de tamanhos alta e que os parâmetros de síntese influenciam drasticamente as propriedades dos materiais, no entanto, todas as amostras exibiam características magnéticas. Depois de estabelecida esta etapa, as NPMs foram submetidas à transfecção em cultura celular de carcinoma cervical humano (células HeLa) e a testes biológicos como coloração com Azul da Prússia e hematoxilina-eosina, ensaio de MTT e ensaio de apoptose para averiguação da citotoxicidade. A principal observação vinda desses resultados foi que as nanopartículas magnéticas sintetizadas, salvo algumas adaptações de síntese, constituem uma classe de nanocompostos com enorme potencial para fins terapêuticos e/ou de diagnóstico. O trabalho reúne informações que vão desde a síntese das nanopartículas até seu comportamento no interior celular, enfatizando as melhores condições para cada procedimento.

Palavras-chave: nanopartículas magnéticas, coprecipitação, células HeLa, ensaios biológicos

Abstract

Magnetic nanoparticles (MNPs) have been the subject of numerous investigations because of its great potential application in many different fields of technology. Among many, they stand out in the biomedical area, either in diagnosis or treatment of various diseases. In this work were synthesized magnetic nanoparticles (MNPs) of iron oxide (magnetite) by the coprecipitation method of Fe^{2+} and Fe^{3+} in an alkaline medium. The main objective was to study the morphological, structural, magnetic and biological behavior of these compounds in cancer cells, in order to future biomedical applications. Initially the magnetic nanoparticles were evaluated against the physical and chemical parameters that directly influence the final characteristics of product (pH, molarity, temperature and type of base) to observe the best synthesis conditions and influence of each characteristics. The nanoparticles were characterized by X-ray diffraction, scanning electron microscopy, zeta potential and magnetometry. In this first study showed that coprecipitation produces particles with high polydispersity of sizes and that the synthesis parameters dramatically influence the properties of materials, however all samples exhibited magnetic characteristics. After you make this step, the MNP were subjected to transfection in cell culture of human cervical carcinoma (HeLa) and biological tests such as staining with Prussian blue and hematoxylin-eosin, MTT assay and apoptosis assay to investigate cytotoxicity. The main observation was that these results coming magnetic nanoparticles synthesized, except for some adjustments in short, constitute a class of nanocomposites with enormous potential for therapeutic and / or diagnosis. The work brings together information ranging from the synthesis of nanoparticles to their behavior inside the cells, emphasizing the best conditions for each procedure.

Keywords: magnetic nanoparticles, coprecipitation, Hela cells, biological tests

Índice

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xii
Lista de Siglas e Abreviaturas	xiii
Preâmbulo	xiv
Justificativas e objetivos	xv
Capítulo 1. Fundamentação Teórica	1
1.1. Nanopartículas Magnéticas	1
1.2. Aplicações Biomédicas	3
1.2.1 Hipertermia.....	7
1.2.2. Contraste para Imagem por Ressonância Magnética (IRM).....	10
1.3. Nanopartículas magnéticas e Câncer	12
1.3.1. Expansão e manutenção de cultura celular de câncer cervical.....	14
1.4. Síntese de nanopartículas magnéticas	17
1.4.1. Método de coprecipitação – fundamentos	17
1.4.2. Método de coprecipitação – óxidos magnéticos.....	20
1.5. Magnetismo	24
1.5.1. Propriedades Magnéticas	24
1.5.2. Superparamagnetismo	27
1.5.3. Curva de Histerese	27
1.5.4. Estrutura cristalina – partículas magnéticas	32
Capítulo 2. Procedimentos Experimentais	35
2.1. Síntese geral de nanopartículas magnéticas	35
2.1.1. Influência da temperatura	37
2.1.2. Influência do cátion formador da base	38
2.1.3. Influência da molaridade das bases.....	38
2.1.4. Influência do tipo de base	39

2.2. Técnicas e Instrumentação.....	40
2.2.1. Difração de raios-X (DRX)	40
2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
2.2.3. Magnetometria.....	43
2.2.4. Potencial Zeta.....	44
2.3. Cultivo de linhagem celular de câncer	44
2.4. Métodos de avaliação da citotoxicidade das nanopartículas magnéticas <i>in vitro</i>	45
2.4.1. Transfecção das nanopartículas magnéticas na linhagem celular de câncer cervical humano (células HeLa).....	45
2.4.2. Análise da eficiência da transfecção pela coloração Azul da Prússia	47
2.4.3. Ensaio MTT	48
2.4.4. Ensaio de apoptose	49
Capítulo 3. Resultados e Discussões	50
3.1. Aspectos da síntese	50
3.1.1. Difração de raios-X.....	50
3.1.1.1. Influência da temperatura.....	50
3.1.1.2. Influência do cátion formador da base.....	52
3.1.1.3. Influência da molaridade das bases	54
3.1.1.4. Influência do tipo de base.....	57
3.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	60
3.1.3. Medidas de magnetização – curvas de histerese	65
3.1.3.1. Influência da molaridade das bases	65
3.1.3.2. Influência do cátion formador da base.....	70
3.1.3.3. Influência do tipo de base.....	71
3.1.4. Potencial Zeta.....	71
3.2. Avaliação da citotoxicidade das NPMs <i>in vitro</i>	75
3.2.1. Nanopartículas magnéticas sintetizadas com base inorgânica (KOH)	75
3.2.1.1. Análise da eficiência da transfecção pela coloração com Azul da Prússia	75
3.2.1.2. Ensaio de apoptose.....	81
3.2.1.3. Ensaio MTT	85
3.2.2. Nanopartículas magnéticas sintetizadas com base orgânica (DABCO)	90
3.2.2.1. Análise da eficiência da transfecção pela coloração com Azul da Prússia	90
Capítulo 4. Conclusões.....	94
4.1. Conclusões gerais	94

4.2. Proposições futuras	96
Capítulo 5. Referências Bibliográficas	98
Anexo 1	109
Anexo 2	111

Lista de Figuras

Figura 1: Nanopartícula magnética (NPM) funcionalizada	4
Figura 2: Mecanismos de estabilização de nanopartículas: (a) estabilização por efeito estérico e (b) estabilização eletrostática	5
Figura 3: Mapa da incidência de câncer cervical a cada 10^5 mulheres no ano de 2010....	15
Figura 4: Mecanismo de formação de partículas em solução – (curva I): nucleação simples e crescimento uniforme por difusão explicado pelo modelo de LaMer e Dinegar; (curva II): nucleação, crescimento e agregação de subunidades; (curva III): evento de nucleação múltipla e amadurecimento de Ostwald	18
Figura 5: Mecanismo de reação de coprecipitação em solução aquosa para formação de magnetita.....	23
Figura 6: Possíveis produtos formados na formação de óxidos de ferro	23
Figura 7: Representação esquemática de spin atômico em estrutura (a) ferromagnética, (b) ferrimagnética e (c) antiferromagnética (d) estrutura de domínios	26
Figura 8: Esquema representativo do regime superparamagnético: a) efeito do tamanho; b) propriedades magnéticas e c) distribuição de domínios	29
Figura 9: Ciclo de histerese de material magnético: linha contínua – comportamento de material ferromagnético, linha tracejada – comportamento de material superparamagnético	30
Figura 10: Curvas de histerese (a) material massivo ferromagnético (b) material em regime superparamagnético	31
Figura 11: Estrutura da magnetita: a) cristal natural, b) rede cristalina – espinélio invertido	33
Figura 12: estrutura de espinélio, com representação espacial dos sítios octaédricos e tetraédricos.....	33
Figura 13: Fluxograma do procedimento de obtenção de magnetita e aparato experimental para síntese de NPMs pelo método de coprecipitação	37
Figura 14: Representação estrutural da molécula de DABCO-etano	40
Figura 15: Difratograma típico de amostra de magnetita (Fe_3O_4 – JCPDS#75-0033) e maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$ – JCPDS#39-1346) com ângulos e intensidades relativas aos picos de magnetita	41
Figura 16: Esquema representativo da transferência da solução contendo meio de cultura e NPMs para os poços da placa, antes da incubação	47
Figura 17: Difratograma de nanopartículas magnéticas de ferro sintetizadas com NaOH 8M a diferentes temperaturas: a) $50^\circ C$, b) $75^\circ C$ e c) $100^\circ C$	52

Figura 18: Difratoograma de nanopartículas magnéticas de ferro sintetizadas com diferentes bases a 8M na mesma temperatura: a) NPM-5 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$); b) NPM-4 (KOH); c) NPM-6 (NH_4OH)	54
Figura 19: Difração de raios-X para amostras sintetizadas com a mesma base a diferentes molaridades: a) NPM-7 / KOH 0,5M; b) NPM-8 / KOH 1M; c) NPM-9 / KOH 2M; d) NPM-10 / KOH 4M; e) NPM-11 / KOH 6M e f) NPM-12 / KOH 8M.....	55
Figura 20: Difração de raios-X para amostras sintetizadas com a mesma base a diferentes molaridades: a) NPM-13 / NH_4OH 0,5M; b) NPM-14 / NH_4OH 1M; c) NPM-15/ NH_4OH 2M; d) NPM-16 / NH_4OH 4M; e) NPM-17 / NH_4OH 6M e f) NPM-18 / NH_4OH 8M.....	57
Figura 21: Difração de raios-X para amostras sintetizadas com bases orgânica e inorgânica: a) NPM-19 (DABCO 0,048M), b) NPM-20 (DABCO 0,12M) e c) NPM-10 (KOH 4M)	59
Figura 22: Comparativo da difração de raios-X das amostras sintetizadas com bases orgânica e inorgânica: a) NPM (DABCO 0,048M), b) NPM (DABCO 0,12M), c) NPM (KOH 0,5M), d) NPM (KOH 1M), e) NPM (KOH2M).....	60
Figura 23: Micrografia eletrônica da amostra de NPM-KOH 4M (ampliado 100000x)	62
Figura 24: Histograma referente a amostra NPM-KOH4M com indicação do diâmetro médio	62
Figura 25: Micrografia eletrônica da amostra de NPM-KOH 8M (ampliado 50000x)	63
Figura 26: Histograma referente a amostra NPM-KOH8M com indicação do diâmetro médio	63
Figura 27: Micrografia eletrônica da amostra de NPM-DABCO2 (ampliado 100000x)	64
Figura 28: Histograma referente a amostra NPM-DABCO2 com indicação do diâmetro médio	64
Figura 29: Curvas de magnetização dos precipitados obtidos com hidróxido de potássio: a) NPM-10 (KOH 4M), b) NPM-12 (KOH 8M)	66
Figura 30: Curvas de magnetização dos precipitados obtidos com hidróxido de amônio: a) NPM-16 (NH_4OH 4M) e b) NPM-18 (NH_4OH 8M)	69
Figura 31: Curvas de magnetização dos precipitados obtidos com hidróxidos de diferentes cátions: a) NH_4OH , b) NaOH e c) KOH.....	71
Figura 32: Curvas de magnetização dos precipitados obtidos com hidróxidos orgânico (DABCO-etano) e inorgânico (KOH).....	73
Figura 33: Imagens de microscopia óptica da linhagem celular HeLa em meio DMEM coradas com Azul da Prússia e HE sob aumento de 400x: (a,b) na ausência de NPMs – placa controle; (c,d) transfectadas com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NPMs; (e,f) com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e (g,h) com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	80
Figura 34: Eficiência da transfecção das nanopartículas magnéticas nas concentrações de 10, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio de cultura DMEM na linhagem celular de câncer cervical HeLa	81
Figura 35: Fotomicrografias do ensaio de apoptose e das mudanças morfológicas das células HeLa coradas com Laranja de acridina e Alumen férrico, sob aumento de 400x em microscópio de fluorescência: (a,b) na ausência de NPMs; (c,d) transfectadas com	

10µg/mL de NPMs; (e,f) com 50µg/mL e (g,h) com 100µg/mL. Setas azuis: corpos apoptóticos. Seta vermelha: vesícula hipercromática 84

Figura 36: Microscopia óptica de células HeLa: (a) na ausência de NPMs; (b) após 24 horas de exposição às NPMs na concentração de 10; (e) 50 e (g) 100µg/mL em meio de cultura DMEM antes do tratamento com MTT; (b,d,f,h) ausência, 10, 50 e 100µg/mL respectivamente, depois do tratamento com MTT. 87

Figura 37: Microscopia óptica de células HeLa: (a1,a2) na ausência de NPMs; (c1,c2) após 48 horas de exposição às NPMs na concentração de 10; (e1,e2) 50 e (g1,g2) 100µg/mL em meio de cultura DMEM antes do tratamento com MTT; (b1,b2,d1,d2,f1,f2,h1,h2) ausência, 10, 50 e 100µg/mL respectivamente, depois do tratamento com MTT. 88/89

Figura 38: Imagens de microscopia óptica da linhagem celular HeLa em meio DMEM coradas com Azul da Prússia e HE sob aumento de 400x: (a,b) na ausência de NPM-DABCO – placa controle; (c,d) transfectadas com 10µg/mL de NPM-DABCO; (e,f) com 50µg/mL e (g,h) com 100µg/mL. Setas amarelas: células em processo de divisão. Seta preta: célula em processo apoptótico 93

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características físico-químicas e magnéticas dos óxidos de ferro.....	7
Tabela 2: Principais óxidos de ferro	32
Tabela 3: Relação dos reagentes utilizados durante o processo de síntese do nanomaterial	35
Tabela 4: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer para as amostras sintetizadas a diferentes temperaturas	52
Tabela 5: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer para as amostras sintetizadas com diferentes hidróxidos	54
Tabela 6: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer... ..	56
Tabela 7: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer ..	57
Tabela 8: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer... ..	59
Tabela 9: Valores de magnetização de saturação (M_{sat}), campo coercivo (H_c) e magnetização de remanência (M_R) das amostras de KOH 4M e KOH 8M.....	66
Tabela 10: Valores de magnetização de saturação (M_{sat}), campo coercivo (H_c) e magnetização de remanência (M_R) das amostras de NH_4OH 4M e NH_4OH 8M.....	69
Tabela 11: Valores de magnetização de saturação (M_{sat}), campo coercivo (H_c) e magnetização de remanência (M_R) das amostras NPM-NaOH, NPM-KOH e NPM- NH_4OH , todas a 8M.....	71
Tabela 12: Valores de magnetização de saturação (M_{sat}), campo coercivo (H_c) e magnetização de remanência (M_R) das amostras NPM-KOH, NPM-19 e NPM-20	72
Tabela 13: Valores de potencial zeta e condutividade do meio.....	74
Tabela 14: Contagem das nanopartículas magnéticas no processo de transfecção	81
Tabela 15: Valores, média e desvio padrão obtidos a partir dos experimentos realizados com células HeLa após transfecção com NPMs a diferentes concentrações durante 24 e 48 horas, com e sem troca do meio de cultura (DMEM)	90
Tabela 16: Efeito das NPMs no crescimento de células HeLa visualizado pela taxa de viabilidade celular após exposição a diferentes concentrações e por diferentes períodos de tempo, com troca e sem troca do meio de cultura DMEM após transcorridas 24 horas da transfecção.....	90

Lista de Siglas e Abreviaturas

B	Indução magnética
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	Soro Fetal Bovino
Fe	Ferro
Fe ₂ O ₃	Magnetita
H	Campo magnético
H _c	Campo coercivo
HeLa	Células de carcinoma cervical humano
HPV	Papilomavírus humano
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
M	Magnetização
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M _R	Magnetização remanente
M _s	Magnetização de saturação
MTT	Brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difeniltetrazólio
NPMs	Nanopartículas magnéticas
RES	Retículo endotelial
SDA	Structure Direct Agent (Agente Direcionador de Estrutura)
T _B	Temperatura de bloqueio
VSM	Vibrating Sample Magnetometer (Magnetômetro de Amostra Vibrante)
XRD	X-ray diffraction (Difração de raios-X)
μ	Permeabilidade magnética
μ_B	Magnéton de Bohr
χ	Susceptibilidade magnética

Preâmbulo

Na tentativa de romper barreiras e unir conhecimentos de duas Ciências distintas - a Nanotecnologia e a Biologia - a profa. Dra. Paula Rahal lidera um projeto sobre o comportamento de nanopartículas magnéticas em algumas culturas celulares com aplicações em tratamento de neoplasias sob financiamento da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), número 2010/14001-0. Devido à complexidade e interdisciplinaridade que envolve esse tipo de pesquisa, o projeto foi dividido em duas partes principais. O foco biológico é dado pelo grupo da profa. Dra. Paula Rahal do Departamento de Biologia da UNESP-IBILCE (Genoma), enquanto que a síntese de novos materiais na escala nanométrica foi desenvolvida no laboratório do prof. Dr. José Geraldo Nery (Departamento de Física), seu colaborador.

Assim, esta dissertação de Mestrado, intitulada *Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)*, apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual Paulista (UNESP) é fruto inicial dessa colaboração.

Justificativas e objetivos

Com o advento da Nanotecnologia, grandes avanços em Ciência e Tecnologia foram alcançados. Na Medicina, esses avanços abriram um leque enorme de aplicações, com especial atenção para o uso na terapêutica do câncer, um conjunto de patologias de incidência crescente que demanda novas formas de tratamento, uma vez que as terapias convencionais têm efeitos adversos muito agressivos. Dentre essas novas formas, foi proposto neste trabalho que o uso de nanopartículas magnéticas (NPMs) para o diagnóstico e tratamento dessa patologia apresentou resultados promissores. Para tanto, a fim de que essas alternativas na melhora da saúde humana possam chegar à prática clínica, esses materiais foram produzidos e avaliados segundo técnicas físico-químicas e testes *in vitro*. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar nanopartículas magnéticas (NPMs) de óxido de ferro sob diversos parâmetros de síntese e avaliar sua citotoxicidade em cultura celular de carcinoma cervical humano (células HeLa).

Como objetivos específicos, primeiramente estudou-se a influência dos parâmetros de síntese, como temperatura de reação, natureza e molaridade da base nas características estruturais, morfológicas e magnéticas das nanopartículas. Esta etapa é crucial na fabricação de NPMs para fins biomédicos com controle de morfologia, cristalinidade, diâmetro médio, distribuição, entre outras coisas.

Alguns testes biomédicos foram feitos para relacionar e comparar as características físico-químicas desses materiais com a eficiência de uso e toxicidade em células cancerígenas (HeLa). Esses testes preliminares auxiliam no estudo das possíveis aplicações médicas que as NPMs podem ter (biocompatibilidade), indicando a taxa de internalização das nanopartículas nas células, viabilidade celular, concentração crítica de NPMs, entre outros resultados. A partir desse conjunto de dados é possível prever o grau de aplicabilidade dessas nanopartículas. Ao mesmo tempo, esse estudo fornece base para observar alguns parâmetros passíveis de melhora, que provavelmente serão abordados em futuros trabalhos.

Capítulo 1 – Fundamentação Teórica

1. Fundamentação Teórica

1.1 Nanopartículas Magnéticas

Muito dos comportamentos observados na escala microscópica (materiais tridimensionais) não se aplicam integralmente na escala nanométrica. O controle do tamanho está diretamente ligado às características intrínsecas do próprio material, que tornam-se dominantes na escala nanométrica. Os novos fenômenos observados se devem principalmente em razão da combinação do efeito de tamanho finito, predominância de fenômenos de interface (relação superfície/volume) e fenômenos quânticos [1].

Da redução das três dimensões obtemos as nanopartículas e os pontos quânticos (*quantum dots*). Em especial falaremos das nanopartículas magnéticas, que têm se tornado alvo de inúmeras pesquisas, principalmente na área de Biomedicina e Nanomedicina, devido às potencialidades que apresentam.

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são materiais nanoestruturados entre 1 e 100 nm de diâmetro que direcionam sua movimentação na presença de campo magnético [1,2]. De maneira geral, a composição básica de uma NPM é um metal (M) diretamente ligado a um óxido de ferro, que pode ser exemplificado como MFe_2O_4 . Assim, os sistemas magnéticos nanoparticulados podem ser dispostos em duas classes: as nanopartículas constituídas de metais de transição (Mn, Co, Ti) e as nanopartículas de óxidos metálicos ($FeO.Fe_2O_3$, NiO, FeO). Dentre os óxidos metálicos nanoparticulados, a magnetita, de estrutura molecular Fe_3O_4 , pode ser considerado seu principal representante e objeto central desse trabalho [3]. Isto acontece porque esse material apresenta uma série de características que o tornam base para a construção de sistemas mais complexos e com aplicações nas mais diferentes vertentes tecnológicas.

Nanopartículas magnéticas possuem propriedades físico-químicas diferenciadas que estão diretamente correlacionadas com a estrutura cristalina, morfologia e tamanho das partículas; que por sua vez estão correlacionadas com o método de síntese escolhido e o controle de seus parâmetros (pH, temperatura, concentração de reagentes) [4]. Ainda nesta escala, efeitos de tamanho e de

superfície passam a ter grande influência nas propriedades dos sistemas magnéticos, ampliando o caminho na busca de novos materiais [5].

Nanopartículas magnéticas com diâmetro crítico (D_c) menor do que 20 nanômetros formam um único domínio magnético, enquanto que acima desse valor elas tendem a se dividir em múltiplos domínios na tentativa de diminuir a energia magnetostática [6]. Domínios são regiões de magnetização uniforme separadas por uma região de transição (parede de domínio) que minimizam a energia magnética interna livre e assim, conforme as dimensões das partículas são reduzidas, o tamanho dos domínios também diminui, alterando a estrutura e a largura das paredes que os delimitam. Conseqüentemente, NPMs com tamanho inferior ao seu diâmetro crítico se apresentam com todos os momentos magnéticos alinhados na mesma direção, ou seja, como se fossem um monodomínio magnético, constituindo a configuração mais favorável e com características de superparamagnetismo [6]. O processo de magnetização se dá pelo deslocamento das paredes de domínio ou pela rotação dos momentos magnéticos dentro de cada domínio. Além de determinar certas características magnéticas, o diâmetro das nanopartículas pode agir no tempo de permanência no organismo, na velocidade com que ultrapassam a barreira endotelial e no reconhecimento pelo sistema fagocitário quando administrada a um ser vivo, seja por via endovenosa, intraperitoneal ou diretamente injetada na área neoplásica.

Somado a capacidade de formação de monodomínios, que as tornam extremamente estáveis, a diminuição do tamanho faz com que grande parte dos átomos que constituem o material se concentre na superfície. Nanopartículas magnéticas apresentam efeitos de superfície devido a quebra de simetria da rede cristalina e concentram grande parte dos momentos magnéticos nessa camada. Dessa forma, a razão superfície/volume é aumentada, afetando as propriedades químicas e magnéticas, característica favorável para funcionalizá-las com os mais diferentes compostos [7].

A percepção de que essas características se refletem em propriedades singulares, principalmente em relação às magnéticas, incentivou o investimento nos setores científico e tecnológico. Dentre tantos, destacam-se em termos de investimentos, resultados e aplicabilidade as áreas de catálise, energia, gravação

magnética, meio ambiente, automobilística, têxtil e principalmente aplicações biomédicas [8,9].

Para controlar o tamanho, morfologia, distribuição, cristalinidade e conseqüentemente as propriedades magnéticas das NPMs, faz-se necessário a uniformização dos parâmetros físicos envolvidos na síntese. Além disso, o controle ajuda também no estudo do desempenho dessas nanopartículas, ficando mais plausível prever e até modelar o comportamento das NPMs em sistemas complexos.

1.2 Aplicações biomédicas de Nanopartículas Magnéticas

Uma das áreas de interesse da Nanotecnologia utiliza materiais magnéticos nanoestruturados em aplicações terapêuticas e de diagnóstico. Estes sistemas podem ser distribuídos de duas formas: em meio sólido, como nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou em meio líquido (ferrofluido) [4,10]. A escolha de qual sistema utilizar acontece após minucioso estudo das propriedades que se quer obter, do tipo de tratamento, de qual sistema biológico se quer atingir, entre outros.

As nanopartículas magnéticas têm despertado grande interesse na área biotecnológica porque seu tamanho médio é menor ou comparável com o de vírus (20 a 450 nm), proteínas (5 a 50 nm) e genes (2 nm de largura e de 10 a 100 nm de comprimento) [11]. Além disso, a capacidade de serem manipuladas por um gradiente de campo magnético externo para transporte e imobilização *in vivo* de modo não-invasivo as tornam candidatas promissoras para muitos estudos.

Para atribuir uma variedade grande de aplicações às NPMs, elas geralmente são funcionalizadas, contendo basicamente um núcleo magnético envolvido por uma camada polimérica que pode conter sítios ativos ancorando compostos orgânicos seletivos ou metais [11-14,4].

Para uso *in vivo*, o recobrimento das NPMs é um fator determinante, uma vez que possibilita a estabilidade das partículas e suas interações com o organismo. Quando dispersas em solução, elas tendem a formar aglomerados sob duas formas diferentes: através da floculação (pequenos agregados) ou coagulação (agregados mais densos), dependendo do tempo que permanecem em repouso. Nesse sentido, o recobrimento impede essa aglomeração, aumentando a estabilidade das NPMs,

assim como pode torná-las solúveis em água, com baixa toxicidade, biocompatíveis, prover grupos funcionais à superfície para favorecer a derivação, evitar a captação (*uptake*) imediata pelo sistema reticulo endotelial e finalmente evitar a ligação do ferro com componentes do sangue [15]. Outra característica importante advinda do recobrimento é a funcionalização da superfície com agentes biologicamente ativos (Figura 1), como íons específicos, anticorpos, nucleotídeos, peptídeos, vitaminas, hormônios, antibióticos e outras moléculas que possam guiar as NPMs a um alvo específico (célula, tecido ou órgão) [16,17].

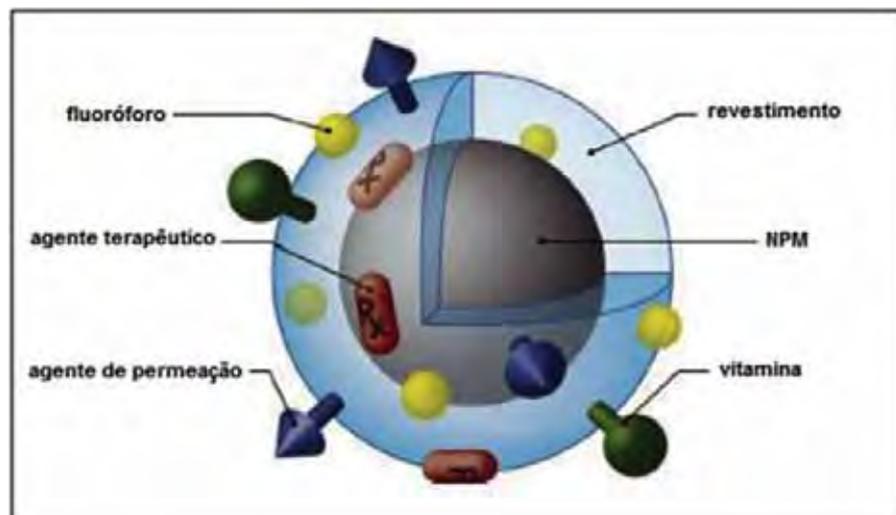


Figura 1: Nanopartícula magnética (NPM) funcionalizada (Adaptado de [18])

Basicamente a estabilização das NPMs em meio líquido pode ocorrer de duas formas principais: estérica e eletrostática [18]. Na estabilização estérica, uma camada de revestimento evita o contato das nanopartículas, conseguido através do uso de surfactantes, polímeros ou outras espécies orgânicas (Figura 2). Já na estabilização eletrostática, as NPMs se repelem por possuírem superfícies com a mesma carga (repulsão Coulombiana).

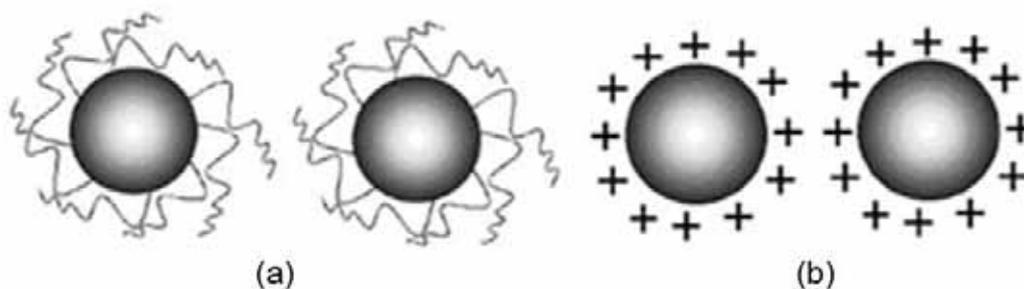


Figura 2: Mecanismos de estabilização de nanopartículas: (a) estabilização por efeito estérico e (b) estabilização eletrostática

Não somente as características de superfície são fatores cruciais que determinam o sucesso das partículas *in vivo*, mas também o tamanho delas. Para aplicações *in vivo*, as NPMs devem ter tamanho menor do que 150 nm e altas magnetizações para permitir que sejam guiadas dentro dos vasos sanguíneos por meio de campos magnéticos externos e para atravessarem as barreiras biológicas [33]. Os mais utilizados como revestimentos das nanopartículas magnéticas são a dextrana (polissacarídeo de glucose), o PVA (álcool polivinílico), a levana, o PEG (polietilenoglicol), entre muitos outros.

Quanto às propriedades magnéticas, NPMs com comportamento superparamagnético a temperatura ambiente apresentam melhores respostas a aplicação de campos magnéticos e, por isso, podem ser ministradas em doses menores. Por serem superparamagnéticas, após a retirada do campo magnético elas perdem magnetização e contribuem na dispersão das partículas em solução ou até mesmo em órgãos [19].

Visando às aplicações clínicas, as nanopartículas magnéticas devem apresentar baixos níveis de toxicidade, elevado momento de saturação magnética que permita minimizar as doses eletromagnéticas requeridas quando outras técnicas são utilizadas em conjunto (radioterapia e quimioterapia), além de serem esféricas, monodispersas (estreita distribuição de tamanho), cristalinas, portanto mais estáveis, e com valores de magnetização altos [19].

Ainda para essas aplicações, as nanopartículas magnéticas devem atravessar a barreira endotelial e se acumularem especificamente nas células-alvo, sem danos às células normais. Para isso, devem estar recobertas com polímeros biocompatíveis (dextrana, PEG, PVA, quitosana, amido) [19], ou na forma de um

fluido magnético ou ainda encapsuladas em lipossomos, vesículas que, similares a estruturas celulares, apresentam características adequadas para aplicações biomédicas [20,21]. Lembrando que o sistema retículo-endotelial¹ (RES) é responsável pela fagocitose de corpos estranhos ao nosso organismo, o tamanho das NPMs torna-se então fator crucial na distribuição *in vivo*. Assim sendo, a diminuição do tamanho das partículas atenua a captação imediata (*uptake*) pelo RES, permite a difusão das NPMs nos espaços intercelulares, aumenta o tempo de circulação na corrente sanguínea e ainda oferece uma melhor distribuição efetiva [6,22].

Especificamente, a magnetita ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3 - \text{Fe}_3\text{O}_4$) nanoparticulada é particularmente interessante para os mais variados propósitos médicos porque apresenta comportamento superparamagnético, magnetização de saturação e susceptibilidade magnéticas relativamente altas (Tabela 1), biocompatibilidade, além de ser menos sensível à oxidação que outros metais de transição como cobalto e níquel. Somado a isso, a magnetita pode ainda sofrer modificações quando em contato com sistemas biológicos, culminando na utilização de seus metabólitos para a formação de hemoglobina, sem maiores preocupações quanto a sua permanência no organismo [23]. No entanto, a magnetita tende a se agregar em grandes “clusters” devido à atração anisotrópica dipolar, perdendo suas propriedades específicas associadas às estruturas de monodomínio magnético e ainda pode sofrer rápida degradação em ambientes biológicos devido a sua alta reatividade [22].

Na área biomédica, as NPMs podem ser aplicadas para aumentar o contraste nos exames de imagem por ressonância magnética (MRI) [11], tratamento de câncer por hipertermia [12,13], direcionamento de drogas [14], terapia gênica, separação magnética, entre outros. Para posteriores aplicações, nos atentaremos no diagnóstico/prevenção e tratamento de neoplasias através do aumento de contraste nos exames de MRI e no processo de hipertermia, respectivamente.

¹ O retículo-endotelial (RES) é formado pelas células de Kupfer no fígado, células de poeira nos pulmões e por macrófagos livres no baço e linfonodos.

Tabela 1: Características físico-químicas e magnéticas dos óxidos de ferro (adaptado de [24])

<i>Propriedades</i>	Hematita	Magnetita	Maghemita
Fórmula molecular	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Fe_3O_4 ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$)	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Densidade (g/cm^3)	5.26	5.18	4.87
Tipo de magnetismo	Antiferromagnético	Ferromagnético	Ferrimagnético
Temp. de Curie (K)	956	850	820-986
M_S a 300K (emu/g)	0.3	92-100	60-80
ΔG_f^0 (kJ/mol)	-742.7	-1012.6	-711.1
Sistema cristalográfico	Romboédrico ou hexagonal	Cúbico	Cúbico ou tetraédrico

1.2.1 Hipertermia

“Quae medicamenta non sanat; ferrum sanat. Quae ferrum non sanat; ignis sanat. Quae vero ignis non sanat; insanabilia reportari oportet.” Hippocrates

(As doenças que os medicamentos não curam, a cirurgia cura. Aquelas que a cirurgia não pode curar, o fogo cura. E aquelas que o fogo não cura podem ser consideradas como inteiramente incuráveis.)

Como Hipócrates (460-370 aC) descreveu em seu aforismo, ele acreditava que inúmeras patologias podiam ser curadas, em última estância, com o aquecimento do corpo do paciente. Essa ideia persistiu por muitos séculos, e munidos de técnicas e embasados por resultados e teorias, alguns estudiosos sugeriram a indução de calor (hipertermia artificialmente induzida) como uma alternativa promissora no tratamento de alguns cânceres. Os primeiros relatos de sucesso datam de 1866 quando o médico alemão W. Busch constatou o desaparecimento de um sarcoma facial por 2 anos em paciente que apresentou

febre alta secundária a dois episódios de erisipela [25]. Já em 1918, Rohdendurg publicou um trabalho de revisão sobre 166 casos de câncer com regressão espontânea. Verificou que 72 pacientes (43%) haviam desenvolvido febre alta ou recebido aplicações de calor local. Após essa data, surgiram na literatura trabalhos descrevendo os efeitos do calor em culturas de células, em animais de experimentação e em pacientes com câncer [13,20,26].

O grande desafio da indução de calor (aumento de temperatura) em pacientes com câncer baseava-se na dificuldade de aplicar ou gerar calor localmente. Nesse sentido, a Nanotecnologia, associada às propriedades das nanopartículas magnéticas, constituiu nas últimas décadas o maior avanço no tratamento de câncer por hipertermia [27]. O método é baseado no princípio da geração de calor por nanopartículas magnéticas devido à perda de histerese na presença de um campo magnético alternado [21], proporcionando aumento de temperatura em uma região do corpo que esteja afetada por uma neoplasia, com o objetivo de causar a lise das células cancerosas [26,28].

Tumores são geralmente primitivos e caóticos, o que pode resultar em áreas que são destituídas de nutrientes, de baixas concentrações de oxigênio (hipóxia), altamente ácidas e as células que existem nestas condições são, em geral, mais sensíveis ao efeito citotóxico do calor [29]. A hipertermia destrói preferencialmente as células tumorais em relação às células saudáveis porque a dissipação de calor ocorre por meio da corrente sanguínea [30], principalmente nas células ácidas, que contêm membrana celular mais frágil e com possível alteração de permeabilidade [31]. Sendo assim, o aumento de temperatura (de 41 a 46°C) altera a síntese de DNA e RNA, enfraquece os sistemas enzimáticos celulares necessários para o metabolismo e para a divisão celular, desestabiliza algumas proteínas celulares e assim levam a morte celular [31,32].

O aumento de temperatura requerido pela hipertermia pode ser atingido pela dispersão de nanopartículas magnéticas no tecido doente e posterior aplicação de campo magnético alternado. Quando submetidas à ação de um campo magnético externo de frequência alternada, os momentos magnéticos das NPMs tentam se reorientar e a energia oriunda dessa perda de fase é dissipada para o meio na forma de calor. A reorientação das NPMs na direção do campo magnético ocorre através da relaxação de Néel (rotação do momento dentro da partícula) e da relaxação de

Brown (rotação da partícula em si), fazendo com que elas vibrem, o que resulta na elevação local da temperatura [33] e subsequente lise das células tumorais.

O efeito do aquecimento na hipertermia depende do tamanho, forma e permeabilidade das nanopartículas e na frequência e magnitude do campo magnético aplicado. Há certas restrições sobre esses parâmetros: nanopartículas maiores que 500 nm não ultrapassam a rede vascular, a magnitude do campo magnético a que um ser humano pode ser exposto é limitada e a citotoxicidade pode ser letal para o uso em seres humanos.

Como os tratamentos convencionais – radioterapia e quimioterapia – são mais eficientes na destruição de células cancerígenas em normóxia (oxigenação normal) e as células em hipóxia são mais sensíveis às variações de temperatura, o processo de hipertermia combinado a eles resulta em expectativas promissoras [29,34]. A hipertermia passou então de simples especulação teórica para tratamento complementar desde que a síntese de NPMs se tornou foco de muitos estudos. Além disso, essas combinações podem melhorar a eficácia de fármacos antineoplásicos sem aumentar o seu potencial citotóxico, sendo também favorável a aumentar a resposta clínica na radioterapia, imunoterapias e terapia gênica, isto porque a ação térmica aumenta a permeabilidade da membrana celular, deixando a célula mais vulnerável ao ataque por substâncias químicas [32-34].

A eficácia do tratamento está baseada na escolha de nanopartículas magnéticas com alta magnetização, que são capazes de responder bem ao campo magnético externo aplicado e com possível controle da intensidade e da frequência do campo usado para gerar o calor. O uso de campos magnéticos de altas intensidades e frequências devem ser limitados, pois podem provocar respostas indesejadas ao organismo como a estimulação de músculos periféricos e esqueléticos, estímulo cardíaco com possível arritmia e também o aquecimento de tecidos não desejados [11,22].

As partículas introduzidas no tumor produzem uma quantidade de energia térmica após a aplicação de campo magnético alternado e o calor gerado no tecido é quantificado pela taxa de absorção específica, SAR, que é a energia eletromagnética absorvida por unidade de massa do material biológico, dada pela equação (1.1):

$$\text{SAR} = \frac{4,18.P}{m} = \frac{C.\Delta T}{\Delta t} \quad (1.1)$$

no qual P.....potência da fonte emissora da onda eletromagnética absorvida pela amostra

m.....massa da amostra

C.....capacidade calorífica da amostra

ΔTvariação de temperatura (K)

Δtintervalo de tempo (s)

Um dos maiores desafios deste tipo de tratamento são a síntese adequada e a obtenção da quantidade suficiente de partículas magnéticas que aqueça o tecido tumoral, usando-se um campo magnético alternado em condições clinicamente aceitáveis. Alguns estudos sugerem que o controle ideal da aplicação de NPMs no tecido tumoral é obtido usando frequências entre 100 e 1000 KHz [11].

Considerando que do o ponto de vista de sua produção as nanopartículas magnéticas possam ser obtidas a baixo custo, sua fabricação na topologia de nanoesferas (NPMs revestidas) e com as características desejadas para bioaplicabilidades são intrinsecamente problemáticas, pois a elevada relação superfície/volume faz com que os efeitos da desordem superficial sejam dominantes. Nessa linha de pensamento, o estudo e otimização de processos de síntese de nanopartículas magnéticas revestidas é de fundamental importância para a obtenção de sistemas implantáveis para o tratamento de tumores pelo processo de hipertermia.

1.2.2 Contraste para Imagem por Ressonância Magnética (RMI)

A imagem por ressonância magnética (RMI) teve origem num fenômeno físico conhecido desde 1946, a ressonância magnética nuclear, e foi inicialmente utilizada para aplicações na área da química e da bioquímica, permitindo a obtenção de informações sobre as estruturas das moléculas ou ainda da taxa de reação das substâncias. Ela é uma técnica de imagem médica usada para visualizar estruturas internas e função de alguns tecidos [17].

O princípio de funcionamento da ressonância magnética consiste na aquisição de imagens internas do corpo através do aproveitamento dos numerosos

átomos de hidrogênio que ele possui (água e gorduras principalmente), sendo adequada para a visualização de estruturas do tecido mole, como cérebro ou medula espinhal [17]. Colocados sob um potente campo magnético, os átomos orientam-se numa mesma direção, seguidamente são excitados por ondas de radiofrequência durante um intervalo de tempo curto, sendo colocados em ressonância, e quando esse estímulo pára, os átomos restituem a energia acumulada produzindo um sinal que posteriormente é tratado para a obtenção das respectivas imagens. O processo pelo qual partículas em geral, nesse caso os prótons, retornam ao seu estado inicial é chamado de fenômeno de relaxação, que podem acontecer de duas maneiras: relaxação longitudinal, que tem sua eficiência determinada pela constante de tempo (T_1) e relaxação transversal, que tem sua eficiência determinada pela constante de tempo (T_2). Em muitos casos o sinal produzido pela técnica não é o ideal para se fazer diagnósticos médicos, sendo necessário o uso de agentes que potencializem o contraste das imagens, conhecidos como agentes de contraste [19].

Nos últimos anos, inúmeras pesquisas estão sendo feitas no sentido de desenvolverem materiais capazes de fornecerem um contraste mais eficaz e ao mesmo tempo serem usados pela capacidade de gerarem calor ao se aplicar campo magnético alternado, destruindo localmente o tecido maligno [6,27,35]. Isso possibilita que um único material seja usado sequencialmente no diagnóstico e terapia de inúmeras patologias [36,37]. Quem se destaca para esses propósitos são as nanopartículas magnéticas por sua propriedade de superparamagnetismo e pelo fato de gerarem calor ao serem excitadas.

A principal vantagem delas em relação aos outros agentes de contraste é o aumento do sinal obtido devido à redução dos tempos de relaxação T_1 e T_2 , explicados por dois mecanismos principais. A redução do tempo T_1 envolve a troca de energia entre os spins nucleares excitados e o ambiente molecular não-ressonante. Nas NPMs muitas vezes essa troca pode ser impedida pela espessura do revestimento. O efeito na redução de T_2 deve-se à grande diferença de susceptibilidade que existe entre as partículas magnéticas e a vizinhança, levando a um gradiente de campo magnético microscópico. A difusão dos prótons através deste gradiente de campo magnético resulta em uma perda irreversível da coerência de fase, diminuindo o valor de T_2 . Em síntese, o processo T_1 é uma consequência

da translação e rotação de núcleos vizinhos que fazem surgir flutuações locais de campo magnético [37], enquanto o tempo T_2 é a perda de coerência de fase causada pelas interações entre os momentos magnéticos adjacentes.

Sendo assim, os tecidos que contêm óxidos de ferro aparecem na imagem do pulso de radiofrequência mais contrastados (relativamente mais escuros que os tecidos vizinhos), mesmo quando usados em menor quantidade se comparado aos agentes de contraste comerciais à base de gadolínio [38,10]. Para tanto, a aplicação das NPMs como agente de contraste requer que elas sejam biocompatíveis, que tenham características superparamagnéticas e que não se agreguem dentro do nosso organismo afim de não serem reconhecidas pelo sistema imune (*uptake* imediato).

1.3 Nanopartículas magnéticas e câncer

O corpo humano é formado por milhões de células que se reproduzem e se multiplicam através de divisões celulares. Em condições normais, esse processo é ordenado e controlado, sendo responsável pela formação, crescimento e regeneração dos tecidos em geral. No entanto, existem situações nas quais as células, por razões variadas, perdem a capacidade de limitar e controlar o seu próprio crescimento passando, então, a se dividirem rapidamente, muitas vezes de forma agressiva e incontrolável, caracterizando uma neoplasia. O resultado desse evento anormal e desordenado de crescimento celular é a produção em excesso de determinados tecidos, que podem ocasionar processos inflamatórios, infecciosos ou mesmo crescimento celulares benignos (massa localizada de células), formando o que se conhece como tumor. Existem tumores benignos, classificados pelo seu comportamento biológico e histogênese, que tendem a apresentar crescimento lento e expansivo, determinando a compressão de tecidos vizinhos. Há também os tumores malignos, que possuem crescimento rápido, desordenado, infiltrativo e destrutivo, mais conhecidos como cânceres [39,40].

No geral, câncer é um termo utilizado para designar inúmeras patologias que têm em comum o crescimento desordenado e proliferação anormal de células que podem invadir órgãos e tecidos e se espalharem para outras regiões do corpo (metástase), num acúmulo de anormalidades genéticas e epigenéticas que levam à

disfunção celular. Ele pode ser fatal ao organismo devido à invasão destrutiva de órgãos normais por estas células, por extensão direta ou por disseminação à distância que pode ocorrer através do sangue, linfa ou superfície serosa. Normalmente o comportamento anormal das células cancerosas é espelhado por mutações genéticas, expressões de características ontológicas ou secreção anormal de hormônios e enzimas (fatores endógenos) ou por etiologia adquirida, como o tabagismo, sedentarismo, vírus, dieta desequilibrada, radiação, entre outros fatores.

Existem três tipos considerados básicos para o tratamento do câncer: quimioterapia, radioterapia e cirurgia. No entanto, alguns profissionais da saúde podem sugerir ainda a hormonioterapia, a terapia oral ou a terapia alvo dependendo do tipo de célula que é acometida a neoplasia. É importante saber que a eficiência destes tratamentos não depende apenas dos agentes antineoplásicos utilizados, mas também da maneira como são entregues aos tecidos e células cancerígenas alvos [41,42], já que algumas terapias podem danificar consideravelmente os tecidos normais [43].

Nesse raciocínio, uma estratégia que tem se mostrado promissora no tratamento do câncer é o uso de nanopartículas, especialmente as magnéticas. Elas vêm demonstrando vantagens sobre outros carreadores devido às suas propriedades singulares, como a elevada relação superfície/volume, porosidade, capacidade de retenção de outros compostos, maior estabilidade, capacidade de controlar a liberação da droga utilizada [44,45], entre outras vantagens. Além disso, seu tamanho facilita sua permanência na circulação sem que haja remoção por órgãos como baço e fígado, bem como possibilita sua passagem indetectável pelo sistema imune e torna possível que essas nanopartículas sejam direcionadas por campos magnéticos externos [46].

Alguns estudos têm sido realizados com essas nanopartículas e observaram-se algumas limitações quanto a sua presença no organismo. Foram relatadas alterações na morfologia celular, função mitocondrial [47], permeabilidade da membrana plasmática e apoptose de células após a exposição a diversos tipos de nanopartículas de óxidos metálicos, sendo que os representantes de óxido de zinco foram considerados os mais agressivos [48] e as nanopartículas de Fe_3O_4 e TiO_2 mostraram-se muito menos tóxicas [47,49]. O teste de citotoxicidade representa a fase inicial do teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações

médicas, sendo utilizado como uma pré-seleção para detectar se o material em questão é conveniente para o uso e comercialização além de analisar seus possíveis efeitos a nível celular.

Dessa forma, é indiscutível a necessidade de padronização de protocolos para o estudo da citotoxicidade das NPMs antes de sugerir qualquer possível aplicação biomédica. Para isso, diferentes ensaios são usados na investigação de tais preocupações, sendo geralmente testes *in vitro*, uma vez que são mais simples, rápidos e não levantam problemas éticos em comparação a estudos *in vivo* [50]. Contudo, vale ressaltar que os estudos *in vivo* são necessários e devem ser implementados antes de qualquer aplicação em humanos.

1.3.1 Expansão e manutenção de cultura celular de câncer cervical

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2010 o câncer foi a principal causa de morte no mundo (aproximadamente 7 milhões de pessoas), seguido por doença cardíaca e derrame, com um gasto econômico de quase US\$3 bilhões.

O câncer cervical, ou câncer do colo do útero, constitui a neoplasia mais frequente nas mulheres em idade reprodutiva em todo o mundo. No Brasil, estima-se que este tipo tumoral seja o terceiro mais frequente na população feminina (quarta causa de morte por câncer), representando 10% de todas as neoplasias, superado apenas pelo câncer de pele (excluindo-se o melanoma) e pelo de mama [49]. A Figura 3 ilustra um mapa da incidência do câncer cervical na população brasileira no ano de 2010 a cada 100.000 mulheres.

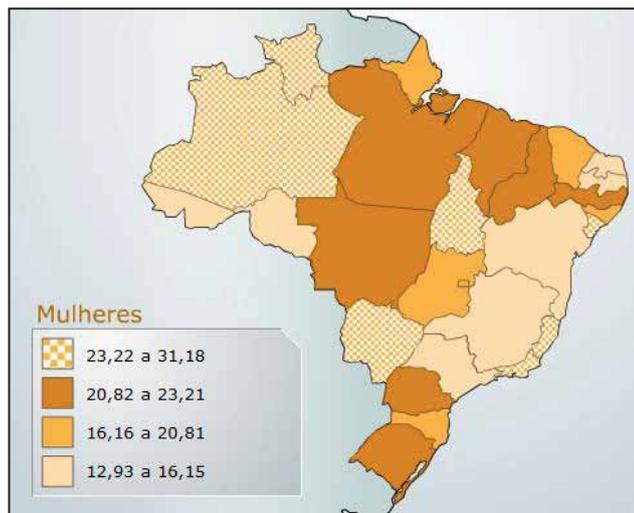


Figura 3: Mapa da incidência de câncer cervical a cada 100.000 mulheres no ano de 2010 (Fonte: INCA, 2010 [51])

A etiologia do câncer do colo do útero está ligada a diversos fatores de risco, tais como má higiene pessoal, uso prolongado de contraceptivos orais, pluralidade de parceiros sexuais, tabagismo, entre outros [52,53]. No entanto, quase que na totalidade dos casos ele é provocado por alterações celulares induzidas pelo Papilomavírus humano (HPV) e o Herpesvírus Tipo II (HSV), transmitido durante as relações sexuais [54,55]. Tais infecções precedem o desenvolvimento de lesões malignas e têm sido associadas a danos precursores de câncer cervical.

Na tentativa de encontrar estratégias eficientes para o tratamento e combate desta patologia tão ofensiva em nosso país, estudos que visem averiguar o padrão envolvido na carcinogênese deste tipo tumoral e a ação de novas terapias por meio de avaliações *in vitro* são um dos passos principais desse caminho. Neste contexto, as culturas de células revelam-se um interessante modelo, considerando o amplo espectro de metodologias disponíveis para avaliação toxicológica. Estudos da citotoxicidade fornecem um excelente panorama entre o aperfeiçoamento de métodos alternativos, como por exemplo, o uso de NPMs, e a elucidação de mecanismos de ação tóxica, mesmo tendo em vista que estas abordagens tem toxicidade reduzida se comparada aos testes *in vivo*.

Dessa forma, um estudo será feito com linhagem celular derivada de carcinoma cervical humano, conhecida como linhagem de células HeLa, para averiguação direta dos efeitos das NPMs no ambiente celular. A responsável por esta etapa do trabalho foi a profa. Dr. Paula Rahal e suas alunas Marília F. Calmon e Natalia M. Candido.

A linhagem de células HeLa é o clássico exemplo de linhagem celular imortalizada decorrente de atividade alterada da telomerase, sendo utilizada em diferentes tipos de experimentos que investigam a biologia do câncer [56]. Essas células epiteliais crescem e se dividem de modo indefinido *in vitro* enquanto as condições ideais de manutenção são sustentadas, sendo que suas propriedades são transformadas pela presença do HPV18². Além disso, tratam-se de células aderentes que perderam a capacidade de inibição por contato, tendo o potencial de desenvolver células oncogênicas, acumulando-se em densidades superiores à da monocamada visualizada em outras linhagens celulares normais [57].

Por isso as garrafas que contêm tais células devem ser repicadas conforme a necessidade, cerca de uma vez por semana, a fim de prevenir a formação de aglomerados instáveis e indesejados e manter o cultivo apto à utilização. É também necessário reiniciar o cultivo periodicamente a partir de um estoque de células com um baixo número de passagens, já que as células são acrescidas de hormônios, indutores químicos, entre outros nutrientes para estabelecer as condições ideais do estado *in vivo* e estes compostos podem muitas vezes acarretar em mudanças no estado celular inicial. Finalmente, em todos os procedimentos que envolvem o uso de linhagens, devem ser tomadas as devidas precauções para evitar contaminantes habituais como fungos, bactérias e micoplasmas por meio de condições de assepsia na tentativa de não ocorrer perda das características fenotípicas [58].

Iremos utilizar cultivos de cultura de células porque eles apresentam uma série de vantagens quando comparados a outros tipos de metodologias empregadas para fins de pesquisa, podendo ser mantidos em meios controlados de variáveis físico-químicas (pH, temperatura, pressão osmótica, nível de O₂, CO₂, tensão superficial) e fisiológicas (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular, por exemplo). Fora isso, a caracterização e distribuição uniforme das amostras são bem estabelecidas, sendo que as células em cultivo geralmente são homogêneas, com morfologia e composição uniformes, o que permite obter com facilidade um número elevado de réplicas idênticas, superando o grave problema da heterogeneidade. Outro fator importante é que o emprego de culturas de células em microtécnicas

² O HPV (papilomavírus humano), vírus da família *Papillomaviridae*, está quantificado em mais de 200 subtipos. Boa parte produz verrugas pelo corpo, mas cerca de 20 a 30 tipos se alojam na área genital. Dois deles, o HPV-16 e o HPV-18 estão diretamente relacionados ao câncer de colo uterino e foram relacionados com o carcinoma de células escamosas e da região perianal.

permite economia no uso de reagentes ou drogas ao serem realizados experimentos em volumes pequenos e possibilita ainda o estudo de fenômenos inacessíveis em tecidos intactos e o conhecimento do comportamento e função de uma população isolada de células [58].

1.4 Síntese de nanopartículas magnéticas

1.4.1. Método de coprecipitação - fundamentos

Os avanços na utilização de nanopartículas magnéticas em aplicações biomédicas estão correlacionados com o aperfeiçoamento e otimização do método de síntese química escolhido. Normalmente o método de obtenção representa o passo primordial, sendo nesse trabalho o desafio mais importante – é ele que determina as características estruturais, morfológicas e magnéticas – para a continuidade dos estudos posteriores.

Existem diversos métodos de síntese para obtenção de óxidos de ferro nanoparticulados, destacando-se: coprecipitação por hidrólise alcalina em meio aquoso [59-61], em microemulsão [62] e em micelas reversas [63] e os métodos de decomposição térmica e sonoquímica de compostos de coordenação [64]. No entanto, daremos enfoque para a coprecipitação, método prático, de aparelhagem simples, de baixo custo e com resultados satisfatórios para nossas exigências.

O processo de coprecipitação a temperatura ambiente resulta na formação de sólidos (cristalinos ou amorfos), nos quais as propriedades físico-químicas estão diretamente ligadas aos parâmetros utilizados durante a síntese [41]. Os principais parâmetros são:

- 1) pH final da solução de precipitação;
- 2) ordem e velocidade de adição dos reagentes;
- 3) razão molar e concentração dos metais;
- 4) tipo de ânion;
- 5) temperatura de precipitação,
- 6) agitação da solução.

É importante atentarmos que estas variáveis afetam significativamente o tamanho, morfologia, homogeneidade e comportamento magnético das partículas formadas [64-66].

Em suma, o método de coprecipitação, segundo LaMer e Dinegar [67], divide-se em duas etapas principais: a nucleação, no qual há a formação dos cristais induzido pela saturação de monômeros na solução e o posterior crescimento das partículas. O método de coprecipitação tende a exibir as seguintes características: (i) os produtos das reações de precipitação são espécies geralmente pouco solúveis, formados sob condições de supersaturação, (ii) tais condições ditam que a nucleação será um passo-chave do processo de precipitação e que um grande número de pequenas partículas serão formadas. (iii) processos secundários como o amadurecimento de Ostwald (crescimento de partículas maiores através da dissolução de partículas menores) e a coalescência (agregação das partículas) vão afetar significativamente o tamanho, morfologia e propriedades dos produtos, (iv) as condições necessárias para induzir a precipitação são o resultado da interação dos parâmetros que influenciam a reação química, ditando as características finais do produto [68,69]. O mecanismo geral de formação de partículas em solução pode ser observado na curva da Figura 4.

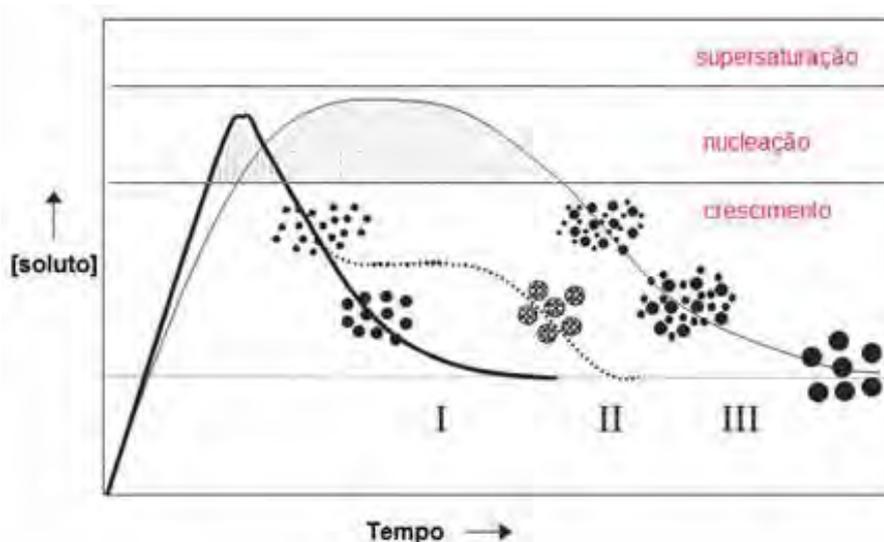


Figura 4: Mecanismo de formação de partículas em solução – (curva I): nucleação simples e crescimento uniforme por difusão explicado pelo modelo de LaMer e Dinegar; (curva II): nucleação, crescimento e agregação de subunidades; (curva III): evento de nucleação múltipla e amadurecimento de Ostwald (retirado de [70])

Quando a precipitação se inicia, um enorme número de cristalitos (núcleos) é formado devido a supersaturação de íons na solução, daí o nome de nucleação. No entanto, esses núcleos tendem a se agregar de forma muito rápida formando cristais maiores e mais estáveis termodinamicamente, que caracteriza a etapa de crescimento. Nessa etapa a difusão é um fator dominante e as variações de concentração e temperatura tornam-se predominantes na velocidade da reação [65,71].

O processo de crescimento das nanopartículas sob condições de difusão normal mantém a mesma cinética ao longo do caminho, já em difusões anômalas, o crescimento pode variar entre caminhos diferentes com velocidades ainda mais diferentes. Quando a velocidade de agitação aumenta, o número de colisões também aumenta, ocasionando uma maior quantidade de locais de nucleação, com consequente redução do tamanho médio das partículas [67,71].

Tendo que a velocidade de nucleação é regida pelo grau de supersaturação dos reagentes e a velocidade de crescimento pela difusão dos mesmos até a semente do cristal, parâmetros como a velocidade de agitação, temperatura e velocidade de adição da base, concentração de reagentes e pH tornam-se fatores decisivos no controle de formação e crescimento da nanopartícula [67,72].

Lembrando que a simples precipitação de um composto não garante a formação de produtos nanoparticulados ou monodispersos, o ideal para sínteses com formação de produtos nessa escala seria que a etapa de nucleação fosse relativamente rápida e a de crescimento relativamente lenta. A formação de partículas com uma distribuição de tamanho estreito exige ainda que os núcleos de todas as espécies se formem simultaneamente e sem posterior nucleação de partículas menores [18]. Além disso, como resultado de sua grande área superficial e de forças como van der Waals e dipolo-dipolo, NPMs são termodinamicamente instáveis e tendem a se aglomerar devido às forças de atração, mesmo a distâncias consideráveis [46]. Assim sendo, é quase inevitável o uso de um agente estabilizante (surfactantes, polímeros) que diminua a atração entre elas, fazendo com que as etapas finais do processo de precipitação envolvam a terminação do crescimento e a estabilização das partículas.

1.4.2. Método de coprecipitação – óxidos magnéticos

Óxidos de ferro (magnetita, maghemita, goetita) podem ser sintetizados através da mistura de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} em ambiente aquoso seguido de precipitação com hidróxido. O método é relativamente simples, porém o produto formado pode resultar num largo espectro de tamanho [70]. O controle de tamanho, forma e composição das NPMs depende do tipo de sal utilizado (cloretos, sulfatos, nitratos), razão entre os íons de Ferro ($\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$), pH e velocidade de agitação.

Convencionalmente, magnetita é preparada adicionando-se base a uma mistura aquosa de sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} numa razão molar de 1:2:8, sob atmosfera inerte, livre de O_2 , a temperatura ambiente ou a temperatura elevada. A obtenção de magnetita com alto grau de pureza é diretamente influenciada pela razão estequiométrica dos íons ferro e pH entre 9 e 14 [6,72].

A fórmula da magnetita $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ (Fe_3O_4) mostra que são necessários 2 mols de íons Fe^{3+} para cada mol de íon Fe^{2+} , e a equação 1.2 descreve o processo de formação:



Imediatamente após a adição da base, a coloração que antes era alaranjada tona-se escura, um precipitado negro. Nos casos nos quais a razão 1:2 de mols de ferro não é mantida, pode-se obter como produto da síntese duas fases distintas, como oxihidróxido férrico ($\text{FeO}\cdot\text{OH}$) e outra constituída de magnetita não estequiométrica, com coloração marrom. Já pequenos valores dessa razão levam a formação de goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$) [73]. A precipitação completa da magnetita ocorre em pH entre 8,5 e 10 em ambiente não oxidante [74,75].

Apesar da simplicidade como foi mostrada, a síntese da magnetita não acontece em uma única etapa como descreve a equação 1.2. Primeiramente ocorre a coordenação das moléculas de água (solvente) pelos cátions metálicos (M), formando espécies do tipo:



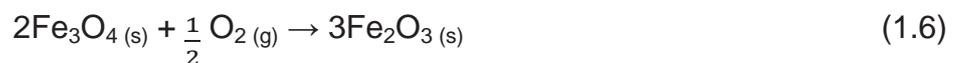
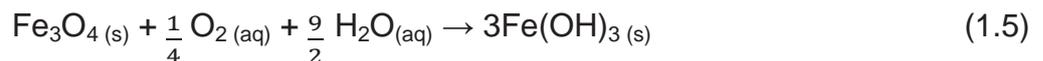
as quais sofrem hidrólise e formam compostos do tipo:



Estes compostos dimerizam com a liberação de água, obrigando os oxigênios dos grupos OH⁻ formarem pontes entre os metais (–OH–). Posteriormente, as espécies hidrolisadas continuam se associando e condensam-se através de pontes ol (–OH–) e oxo (–O–) em regiões ausentes de prótons, dando origem à estrutura do tipo espinélio, uma vez que tratamos de cátions Fe²⁺ e Fe³⁺ [73]. Os processos de nucleação e crescimento do cristal acontecem concomitantemente ao processo anterior, conhecido como condensação hidrolítica.

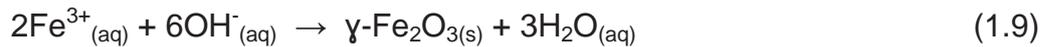
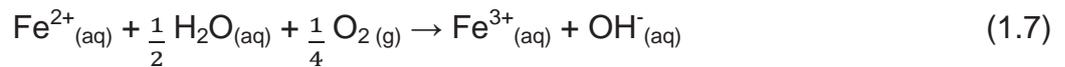
A quantidade de partículas primárias de Fe₃O₄ formada relaciona-se com a taxa relativa de nucleação e crescimento. Para obter partículas com tamanho homogêneo é necessário que as etapas de nucleação e crescimento sejam separadas, de modo que a nucleação ocorra primeiramente e só depois o crescimento [71,73]

Na presença de oxigênio a magnetita pode sofrer oxidação e posteriormente ser transformada em maghemita (γ-Fe₂O₃), como observado nas equações (1.5) e (1.6), respectivamente [76]. Além da oxidação, outros mecanismos podem ser responsáveis pela transformação de magnetita em maghemita, como por exemplo, os processos de transferência de íons ou elétrons dependentes do pH da suspensão que estão envolvidos na oxidação. Em meios ácidos e anaeróbicos os íons Fe²⁺ da superfície das partículas são desorvidos, formando complexos hexaaqua (íons metálicos solvatados com seis moléculas de água em coordenação octaédrica que podem ser desprotonados) em solução. Em meio básico a oxidação da magnetita envolve a oxi-redução da superfície [6,76].

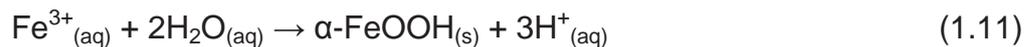
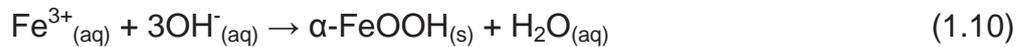


Como curiosidade, a formação de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ocorre apenas em condições de desidratação térmica.

Pequenas quantidades de O_2 presentes na água (meio de solução) podem facilmente oxidar a espécie de Fe^{2+} em Fe^{3+} (equação 1.7) e assim tornar a reação favorável para a formação de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, como descrito nas equações (1.8) e (1.9). Nessas fases, a formação dessas espécies é altamente dependente da cinética da reação e da temperatura.



Por fim, conforme o valor do pH da solução que contém os ions de Fe^{3+} aumenta, ainda é possível a formação de goetita, seguindo as equações (1.10) e (1.11), esta última por hidrólise:



De forma geral e simplificada, as Figuras 5 e 6 indicam as rotas de formação de óxidos de ferro através dos parâmetros pH e relação do número de mols das espécies de ferro e os possíveis produtos formados nesse mecanismo, respectivamente.

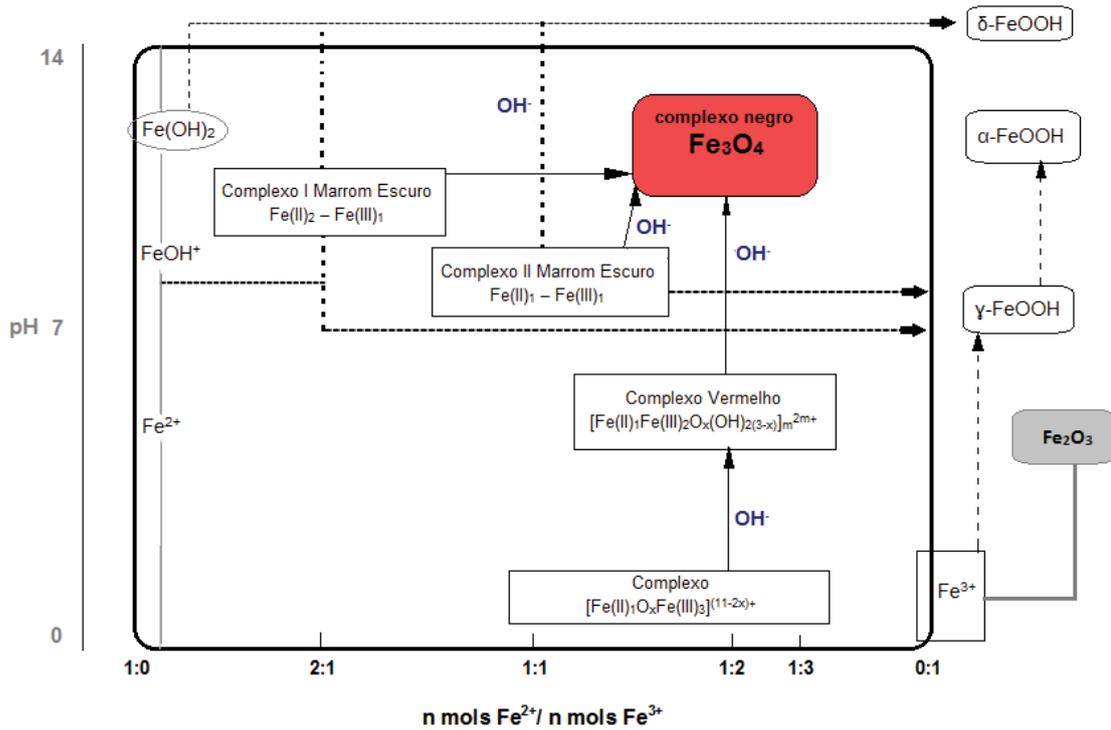


Figura 5: Mecanismo de reação de coprecipitação em solução aquosa para formação de magnetita. As linhas sólidas indicam caminhos de oxidação demorados e as linhas tracejadas indicam caminhos rápidos de oxidação (Adaptado de [77]).

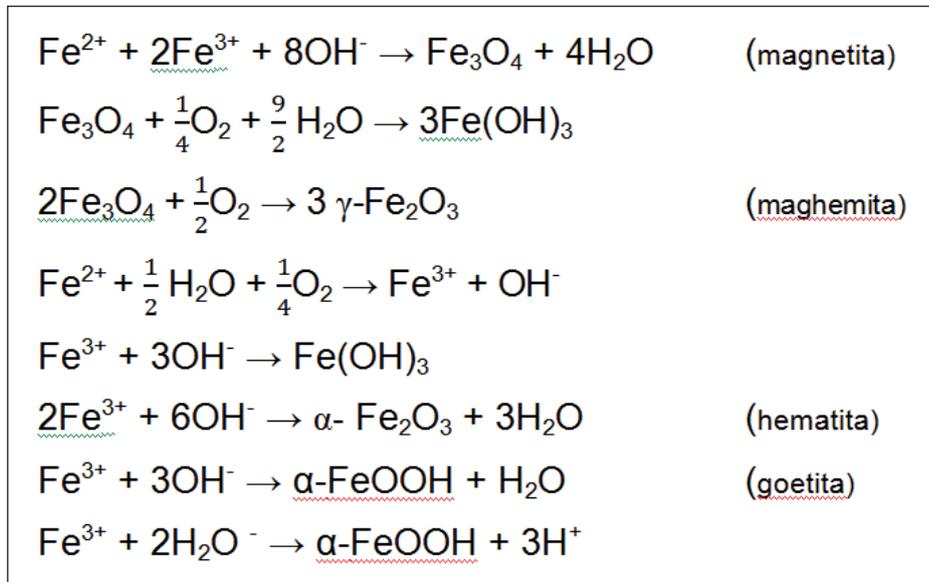


Figura 6: Possíveis produtos formados na síntese de óxidos de ferro e oxi-hidróxidos

1.5 Magnetismo

1.5.1 Propriedades Magnéticas

Todas as substâncias sejam elas sólidas, líquidas ou gasosas, exibem características magnéticas a uma determinada temperatura, uma vez que o magnetismo está relacionado com o movimento das cargas elétricas no interior dos átomos. Há casos em que essa propriedade física é bem mais evidenciada, sendo essas substâncias conhecidas como materiais magnéticos [78].

O magnetismo advém do movimento das partículas elétricas, que ocorre tanto para cargas em movimento dado pelo momento angular orbital, quanto para elétrons girando em torno do núcleo de um átomo dado pelo momento de spin. Ele está relacionado com a estrutura eletrônica de cada material, com a capacidade que os elétrons têm de se acoplarem.

Os materiais apresentam diferentes tipos de comportamentos magnéticos e são classificados de acordo com a resposta que apresentam diante da aplicação de um campo magnético externo. Os principais tipos de magnetismo são o diamagnetismo, o paramagnetismo, o ferromagnetismo, antiferromagnetismo e o ferrimagnetismo.

O *paramagnetismo* manifesta-se em substâncias cujos átomos possuem subcamadas não preenchidas completamente e, portanto, apresentam momento de dipolo resultante diferente de zero. Esses materiais apresentam susceptibilidade magnética positiva, isto é, a magnetização induzida tem a mesma direção do campo aplicado [78,79].

Se os momentos atômicos magnéticos estão alinhados e sua estrutura cristalina permite interações de acoplamento entre os momentos, temos um material *ferromagnético*. Os materiais ferromagnéticos distinguem-se dos paramagnéticos devido às diferentes interações entre os átomos: as substâncias ferromagnéticas são caracterizadas por possuírem uma magnetização (espontânea) que pode persistir mesmo na ausência de um campo magnético e são caracterizadas por mudanças drásticas a uma determinada temperatura crítica, chamada temperatura de Curie. Abaixo da temperatura de Curie um material ferromagnético possui uma magnetização espontânea, isto é, todos os momentos magnéticos numa região de escala microscópica (domínios) estão alinhados; acima da temperatura de Curie a

ordenação magnética dos spins é quebrada pela energia térmica e o material passa a ter comportamento paramagnético [79]. Na presença de campo externo os dipolos magnéticos se alinham na direção do campo aplicado, exibindo valores altos e positivos de susceptibilidade magnética. Outra importante característica de materiais ferromagnéticos é a presença de domínios magnéticos, que são pequenas regiões orientadas ao acaso umas às outras nas quais os momentos de dipolo encontram-se alinhados em uma mesma direção (Figura 7d).

Já se cada domínio apresentar magnetizações espontâneas em direções distintas e com intensidades diferentes, diz-se que a substância é *ferrimagnética*. Os átomos de substâncias ferromagnéticas e ferrimagnéticas apresentam elevado momento magnético devido à existência de elétrons desemparelhados nos orbitais d.

Quando os materiais têm momentos magnéticos alinhados em direções opostas, ocasionando uma magnetização nula, ocorre o *antiferromagnetismo*. Quando expostos a um campo magnético externo, os momentos alinham-se na direção do campo apresentando valores baixos e positivos de susceptibilidade magnética [78].

O *diamagnetismo* é uma forma muito fraca de magnetismo, sendo observada somente na presença de campo magnético externo alto. Os átomos de materiais diamagnéticos apresentam subníveis eletrônicos completos nos quais os momentos estão emparelhados e se cancelam, portanto não possuem magnetização. Uma substância diz-se diamagnética quando tem susceptibilidade magnética negativa, ou seja, os spins se opõem à penetração de um campo magnético no material. Os átomos ou moléculas dessas substâncias não têm momento angular resultante e a resposta a um campo magnético aplicado é a criação de correntes atômicas circulares.

As diferentes orientações dos spins para alguns tipos de comportamento magnético estão representadas na Figura 7.

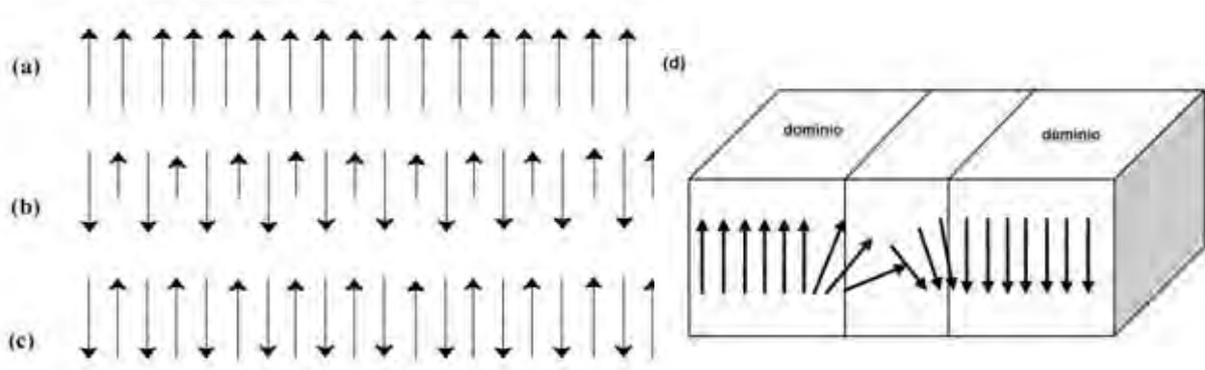


Figura 7: Representação esquemática de spin atômico em estrutura (a) ferromagnética, (b) ferrimagnética e (c) antiferromagnética (d) estrutura de domínios

Partículas ferromagnéticas ou ferrimagnéticas com diâmetros na escala nano podem apresentar flutuações térmicas espontâneas do momento magnético (quebra da ordem a longo alcance) que se comportam como íons paramagnéticos com spin gigante e apresentam comportamento de superparamagnetismo [80].

Ao estudarmos o magnetismo, três grandezas principais conseguem descrever as propriedades da matéria: o campo magnético (H), a indução magnética (B) e a magnetização (M).

Quando um campo magnético externo (H) é aplicado a um material e ele responde suscetivelmente, ocorre um alinhamento dos seus momentos magnéticos elementares e então o material adquire magnetização [10]. A magnetização (M) é a soma de todos os momentos magnéticos elementares (m), que corresponde ao número total de átomos (n) que possuem elétrons desemparelhados multiplicado pelo momento magnético elementar μ_B (magnéton de Bohr) dividido pelo volume que ele ocupa, dado pela equação (1.12):

$$M = \frac{m}{V} = \frac{n \cdot \mu_B}{V} \quad (1.12)$$

A magnetização é dada em Am^2 no sistema internacional (SI), equivalente a 10^3emu .

A indução magnética (B) é o campo proveniente da própria magnetização do material e do campo externo aplicado, sendo dada pela equação (1.13):

$$\vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{M}) \quad (1.13)$$

O campo magnético pode ser expresso em Tesla (T), Gauss (G) ou Oersted (Oe), na proporção de $1\text{T}=10^4\text{G}$, $1\text{G}=1\text{Oe}$ ou ainda $1\text{Oe}=79,6\text{A/m}$.

Outras propriedades magnéticas importantes são a susceptibilidade e a permeabilidade magnética. A susceptibilidade magnética, χ , é a medida da efetividade com que um campo magnético externo induz o dipolo magnético no material. A permeabilidade magnética, μ , é a razão entre a indução magnética e a intensidade do campo magnético. As duas relações são exibidas nas equações (1.14) e (1.15), respectivamente.

$$\chi = \frac{M}{H} \quad (1.14)$$

$$\mu = \frac{B}{H} \quad (1.15)$$

Os materiais podem se classificados ainda em termos da susceptibilidade magnética, que fornece a magnetização de saturação em termos do campo H , equação (1.14). Materiais com valores de susceptibilidade magnética entre 10^{-6} e 10^{-3} são classificados como diamagnéticos e aqueles com χ entre 10^{-6} e 10^{-1} são materiais paramagnéticos, pois apresentam resposta magnética fraca e somente na presença de campo. Já outros materiais podem exibir magnetismo na ausência de campo magnético externo e são conhecidos como ferromagnéticos, ferrimagnéticos ou antiferromagnéticos [80].

1.5.2 Superparamagnetismo

Na escala nanométrica, alguns materiais podem exibir propriedades magnéticas diferentes das encontradas em sua forma *bulk* (macroescala). Uma delas é o superparamagnetismo, termo introduzido por Bean e Livingston em 1959 para descrever o comportamento magnético de NPMs [80].

O superparamagnetismo ocorre devido à influência das flutuações térmicas sobre o momento magnético, ou seja, enquanto o campo magnético tende a alinhar os momentos, as flutuações térmicas tendem a desalinhá-los. Esta característica surge quando as nanopartículas tem um diâmetro menor que o chamado diâmetro

crítico³, D_c , e apresentam magnetização espontânea à temperatura ambiente. Para diâmetros menores do que o D_c , a energia associada a anisotropia⁴ diminui até que a energia térmica seja suficiente para superar a orientação preferencial do momento da partícula.

Nanopartículas superparamagnéticas possuem um único domínio magnético, e sua magnetização é considerada como um grandioso momento magnético, soma de todos os momentos magnéticos individuais carregados pelos átomos que a constitui [81,10]. Nelas, os momentos magnéticos atômicos estão alinhados paralelamente numa só direção e por isso não há histerese. Assim, a magnetização remanente M_r e o campo coercivo H_c são nulos (Figura 8).

O superparamagnetismo pode ser identificado através de curvas de magnetização, que devem apresentar três características simultaneamente [80]:

- i. coercividade nula,
- ii. magnetização remanente nula,
- iii. temperatura de bloqueio

Os sistemas superparamagnéticos possuem ciclo de histerese com ausência de coercividade, pois a desmagnetização não está relacionada ao campo magnético e sim a temperatura. Após a remoção do campo externo, os momentos magnéticos de cada partícula orientam-se aleatoriamente de modo a que o momento total seja nulo, ou seja, a amostra não apresenta magnetização de remanência [48]. E por fim, devem exibir ausência de histerese acima da temperatura de bloqueio (T_B), temperatura na qual ocorre uma transição e os momentos são bloqueados, ou seja, incapazes de relaxar. Acima da T_B as partículas são superparamagnéticas, abaixo, podem ser ferrimagnéticas ou não, dependendo de sua estrutura cristalina [4]. A T_B é determinada através das curvas de magnetização em função da temperatura [47].

³ Diâmetro crítico é aquele no qual as partículas são monodomínio (múltiplos domínios são energeticamente desfavoráveis) e seu momento magnético total é bem representado por um único vetor. Para NPM, esse valor deve ser menor do que 25 nm [76-78].

⁴ Os monocristais dos materiais ferromagnéticos se caracterizam por sua anisotropia magnética, ou seja, a facilidade de magnetização varia de acordo com a direção do campo magnético aplicado (direção preferencial).

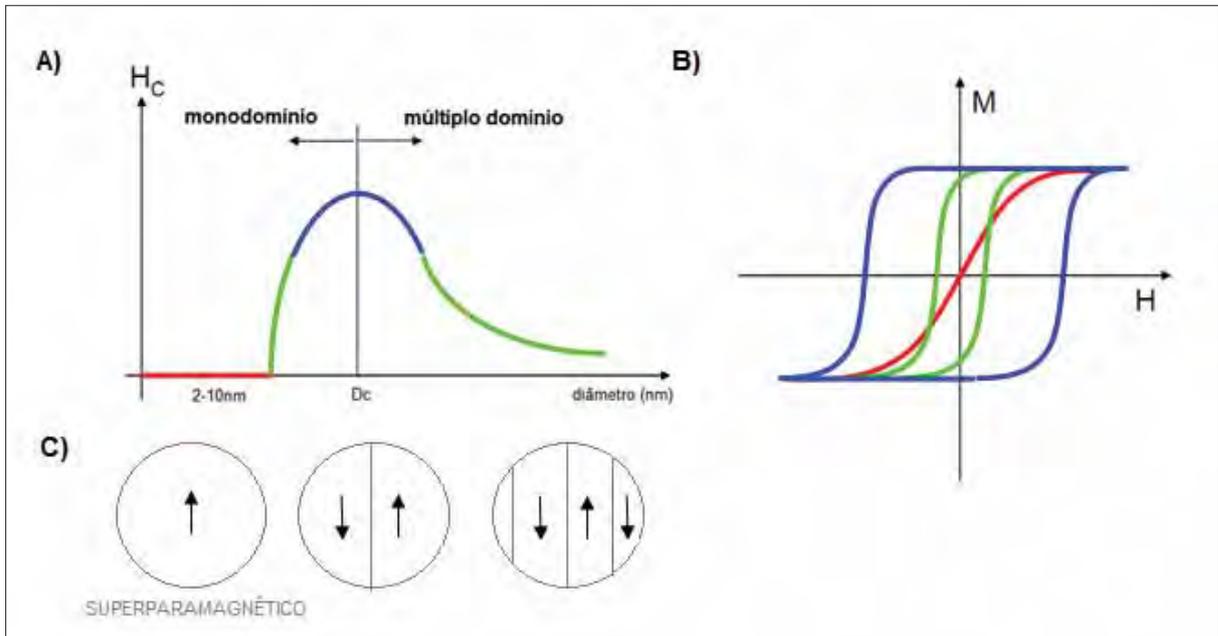


Figura 8: Esquema representativo do regime superparamagnético: a) efeito do tamanho; b) propriedades magnéticas e c) distribuição de domínios

1.5.3 Curva de histerese

De modo geral, quando um material ferromagnético é submetido a saturação em ambos os sentidos do campo magnético H , obtemos a curva completa de histerese. Ela resume, de certa forma, as principais propriedades magnéticas de materiais magnéticos.

Ao submeter um material ferromagnético a um ciclo de campo magnético H , um rearranjo da distribuição dos momentos magnéticos ocorre para tentar manter reduzida a energia do sistema. Dois mecanismos são cruciais para compensar o efeito causado pelo campo externo: o movimento das paredes que separam os domínios e a rotação dos momentos. O movimento das paredes acontece para aumentar as regiões nas quais as direções de magnetização estão mais alinhadas com o campo magnético, extinguindo as demais paredes do domínio. Quando este mecanismo chega a seu limite, ocorre a rotação dos momentos magnéticos que tendem ao alinhamento com o campo magnético externo [82].

Os spins dos materiais superparamagnéticos estão randomicamente orientados por todo o material e se cancelam, resultando em uma magnetização mínima ou nula. Aplicando-se um campo magnético externo H suficientemente

grande, os momentos magnéticos em cada domínio giram até se alinharem na direção do campo aplicado e a magnetização aumenta até atingir um valor máximo, conhecido como magnetização de saturação (M_s) [83]. Em materiais ferromagnéticos, a estrutura de múltiplos domínios e as interações entre eles fazem com que o valor da magnetização não seja nulo, mesmo após a retirada do campo. Esse valor é denominado magnetização remanente ou remanência (M_r), para o qual o campo magnético H é nulo. Para que a magnetização M se anule, é necessária a aplicação de outro campo magnético em sentido contrário, conhecido como campo coercivo ou coercividade (H_c). Variando-se novamente o módulo do campo, chega-se a uma região de saturação e repetindo-se o ciclo no sentido inverso obtém-se a curva fechada, que é o ciclo de histerese, ilustrado na Figura 9 [52].

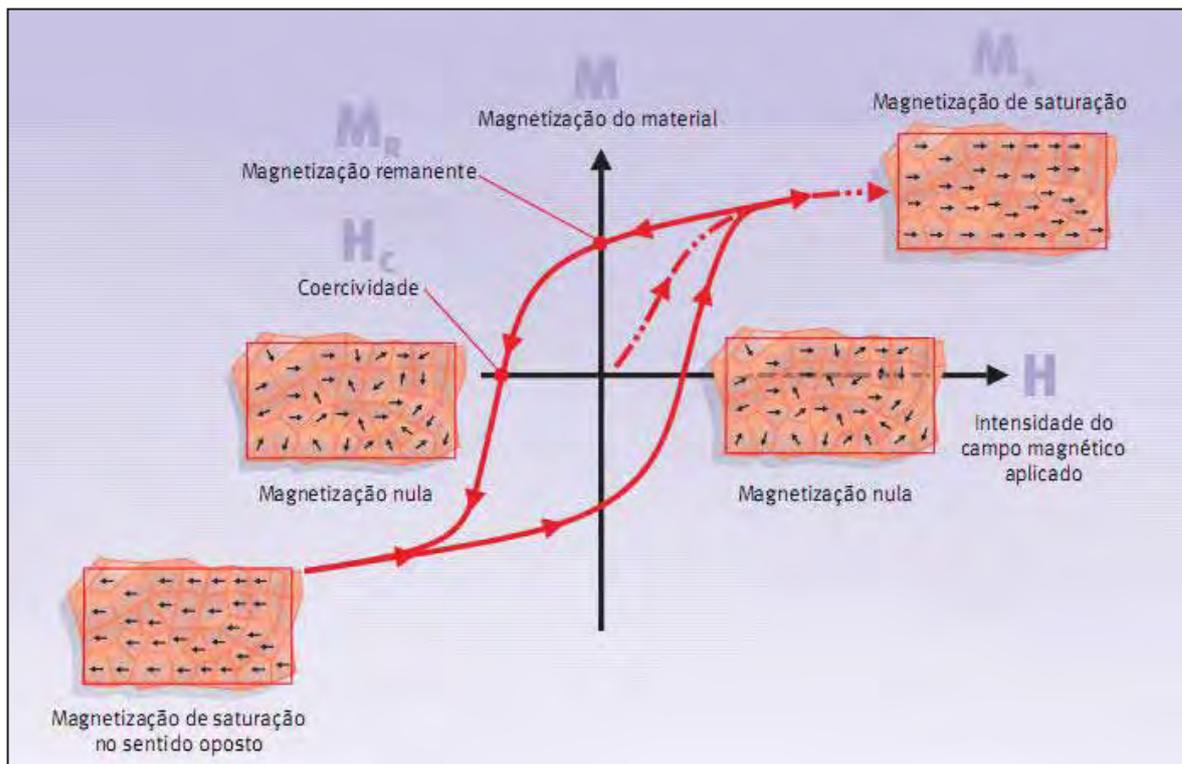


Figura 9: Ciclo de histerese de material magnético: linha contínua – comportamento de material ferromagnético, linha tracejada – comportamento de material superparamagnético (retirado de [50])

Em linhas gerais, o ciclo de histerese mostra o quanto um material se magnetiza sob a influência de um campo magnético externo e o quanto de magnetização permanece nele após a retirada do mesmo [84]. Além disso, a área

interna da curva de histerese representa a energia dissipada para completar esse ciclo, maneira usual de se calcular o valor das perdas magnéticas e da permeabilidade (B/H).

A área sob a curva $H \times M$ corresponde ao trabalho magnético (W_h) relacionado ao alinhamento/desalinhamento dos pólos magnéticos no material. Neste caso, através do cálculo de integração da área de histerese magnética, obtém-se a energia magnética W_H , como mostra a equação 1.14.

$$W_H = \oint H \cdot dB. \quad (1.14)$$

Diferentemente dos materiais massivos, que apresentam magnetização remanente diferente de zero, em regime superparamagnético, por outro lado, há ausência de histerese e por isso $H_c=0$ e $M_r=0$, como exemplificado na Figura 10. O valor de magnetização de saturação pode ser obtido através da curva de magnetização versus o inverso do campo, extrapolando o valor de magnetização para o valor de $1/H = 0$.

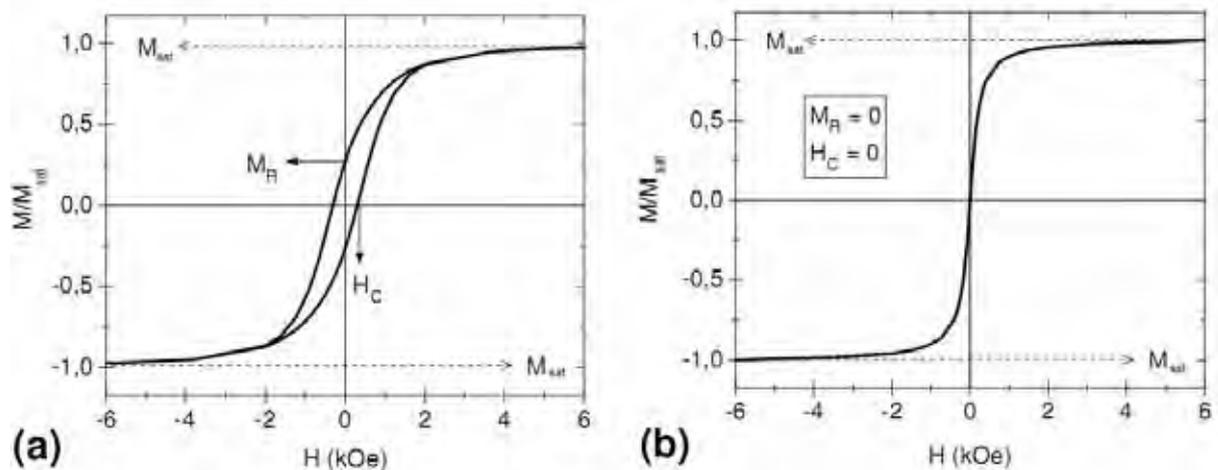


Figura 10: Curvas de histerese (a) material massivo ferromagnético (b) material em regime superparamagnético (retirado de [85])

A magnetização de saturação (M_s) depende da temperatura e também das características da superfície das NPMs. Em geral, devido ao ambiente assimétrico dos átomos da superfície, há um efeito de inclinação oblíqua nesses spins. A curvatura da superfície é muito maior na escala nano, o que pode gerar uma região

de desorientação cristalina e defeitos, resultando num decréscimo significativo da M_s [1,86]. Deste modo, valores de M_s em materiais nanoestruturados são geralmente menores do que em materiais massivos, sendo comum observar para a magnetita bulk $M_s = 92$ emu/g, enquanto que para o mesmo material entre 20 e 30 nm observa-se $M_s = 30-60$ emu/g [87,88].

1.5.4. Estrutura cristalina – partículas magnéticas

As partículas magnéticas estudadas neste trabalho são em sua maioria óxidos de ferro. Ao todo, existem dezesseis diferentes fases de óxidos de ferro já identificadas e as oito principais estão listadas na Tabela 2 [24,83,86,88]. Através de processos de oxidação ou tratamentos térmicos é possível passar de uma fase a outra.

Tabela 2: Principais óxidos de ferro [83]

Mineral	Fórmula química	Resposta magnética
Goetita	α -FeOOH	Antiferromagnético
Hematita	α -Fe ₂ O ₃	Ferrimagnetismo fraco
Magnetita	Fe₃O₄	Ferrimagnético
Maguemitita	γ -Fe ₂ O ₃	Ferrimagnético
Ferrihidrita	Fe ₅ (HO) ₈ 4H ₂ O	Antiferromagnético
Ferroxihita	γ' -FeOOH	Ferrimagnético
Lepidocrocita	γ -FeOOH	Antiferromagnético
Acaganeita	β -FeOOH	Antiferromagnético

Do grupo citado na Tabela 2, a magnetita será o objeto de estudo desse trabalho por ser mais apropriada para aplicações biomédicas. Normalmente partículas magnéticas destinadas para esse fim apresentam estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio, que lhe garantem suas características magnéticas.

A estrutura cristalina característica de espinélio é do tipo cúbica de face centrada (fcc) empacotada de ânions, que apresenta os íons oxigênio regularmente distribuídos em posições cúbicas ao longo do eixo [111], pertencente ao grupo espacial Fd3m. De forma geral, pode ser descrita como AB₂O₄, no qual A e B

representam átomos metálicos de diferentes valências [83,87,89,90]. Cada célula unitária é constituída pelo arranjo de fórmula $A_8B_{12}O_{32}$. No caso da magnetita, óxido dúctil de coloração escura, os cátions divalentes (Fe^{2+}) e os cátions trivalentes (Fe^{3+}) ocupam os espaços entre os íons oxigênio, sendo estes espaços de dois tipos, os sítios tetraédricos e os octaédricos (Figura 11).

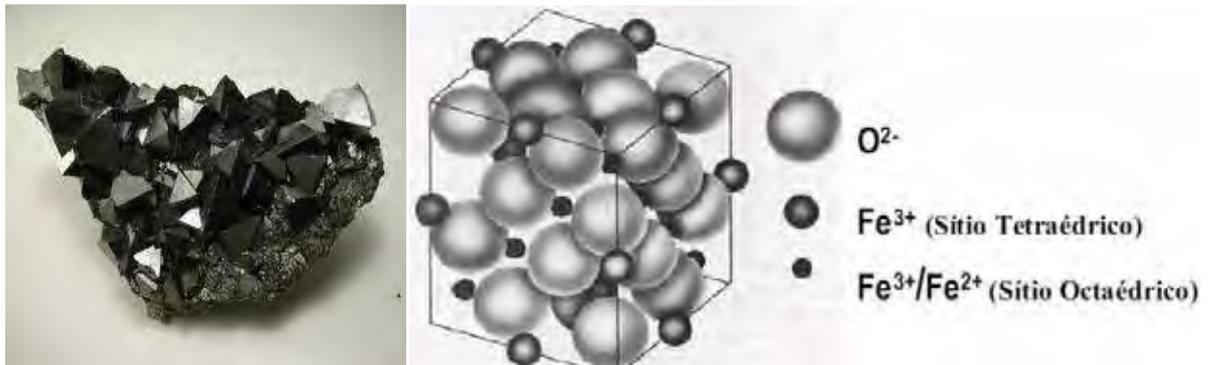


Figura 11: Estrutura da magnetita (a) cristal natural, (b) rede cristalina - espinelho invertido

O sítio tetraédrico é assim chamado porque o cátion encontra-se no centro do tetraedro que tem como vértices os íons oxigênio. O outro é conhecido como sítio octaédrico porque neles os oxigênios circundam o cátion ocupando os vértices do octaedro, como ilustrado na Figura 12.

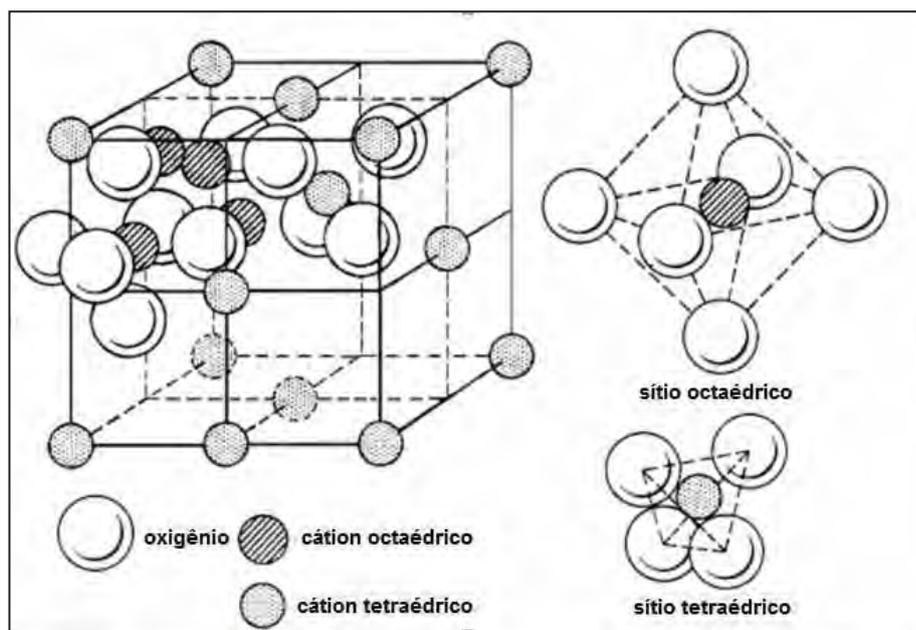


Figura 12: Estrutura de espinelho, com representação espacial dos sítios octaédricos e tetraédricos

As estruturas do tipo espinélio podem apresentar algum grau de inversão devido à alta eletronegatividade do oxigênio, que sustenta ligações de caráter iônico forte entre os cátions di e trivalentes. Assim sendo, podemos classificá-las como estrutura espinélio normal ou invertida.

Na estrutura espinélio normal, os 8 cátions divalentes ocupam os 8 sítios tetraédricos e os cátions trivalentes ocupam os 16 sítios octaédricos, originando uma célula unitária de fórmula $A_8B_{16}O_{32}$, equivalente a oito unidades de AB_2O_4 . Já na distribuição totalmente invertida, 8 íons trivalentes e 8 íons divalentes encontram-se igualmente distribuídos nos sítios octaédricos, enquanto que os 8 íons trivalentes restantes encontram-se no sítio tetraédrico.

A magnetita, de fórmula química ideal Fe_3O_4 e com parâmetros de célula unitária cúbica $a_0 = 8,394 \text{ \AA}$, tem os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} presentes em igual número no sítio octaédrico [83,88]. A distribuição dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} é a principal causa do caráter magnético nesses compostos (magnetização espontânea). À temperatura ambiente, os spins dos sítios tetraédricos e octaédricos estão alinhados de forma antiparalela, mas como em sítios octaédricos há duas vezes mais átomos do que em sítios tetraédricos, um momento magnético líquido diferente de zero é esperado [89,90]. Como consequência, a magnetita apresenta caráter ferrimagnético.

Capítulo 2 – Procedimentos Experimentais

2. Procedimentos experimentais

2.1 Síntese geral de nanopartículas magnéticas

As amostras de nanopartículas magnéticas de ferro foram sintetizadas pelo processo de coprecipitação, segundo os trabalhos de Maver et al. e Martínez-Mera et al. [91,60]. Os reagentes utilizados não tiveram tratamento prévio e suas propriedades constam na tabela 5. As sínteses foram divididas em grupos, conforme o hidróxido (base) utilizado.

Tabela 3: Relação dos reagentes utilizados durante o processo de síntese do nanomaterial

REAGENTE	FUNÇÃO	GRAU DE PUREZA	PROCEDÊNCIA
sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	fonte de ferro	99%	Sigma-Aldrich
cloreto férrico hexahidratado (FeCl ₃ .6H ₂ O)	fonte de ferro	97%	Sigma-Aldrich
água (H ₂ O)	solvente	bi-destilada	-
hidróxido de potássio (KOH)	fonte alcalina	85%	Sigma-Aldrich
hidróxido de amônio (NH ₄ OH)	fonte alcalina	28-30% (diluído)	Sigma-Aldrich
hidróxido de sódio (NaOH)	fonte alcalina	99%	Sigma-Aldrich
hidróxido de cálcio (Ca(OH) ₂)	fonte alcalina	99%	Sigma-Aldrich
DABCO (1,4-diazobicyclo[2.2.2]octano)	fonte alcalina	-	sintetizado
ácido cítrico anidro (C ₆ H ₈ O ₇)	surfactante	99,5%	Sigma-Aldrich
resina hidroxilada (AG 1-X8)	troca iônica	-	Bio-Rad Laboratories

O aparato experimental utilizado em todas as sínteses está ilustrado na Figura 13, consistindo basicamente de balão de fundo redondo, agitador magnético, termômetro e condensador.

Inicialmente foram preparadas duas soluções de 25mL de FeSO₄.7H₂O e FeCl₃.6H₂O de diferentes concentrações molares a temperatura ambiente. As soluções alcalinas utilizadas durante este estudo foram preparadas também a

temperatura ambiente a partir da dissolução dos hidróxidos para a obtenção das diferentes concentrações molares requeridas.

As soluções de ferro foram adicionadas num balão de fundo redondo a temperatura ambiente, sob atmosfera de N_2 e agitação magnética constante de 800 rpm numa relação molar $Fe^{2+}:Fe^{3+}=1:2$. A solução tinha coloração alaranjada e permaneceu nessas condições por 30 minutos.

Em seguida, a solução alcalina foi rapidamente adicionada ao balão até que o pH ficasse entre 9,5 e 11,0. Um precipitado preto (partículas de magnetita) imediatamente foi formado e a reação prosseguiu nas mesmas condições por mais 60 minutos. Geralmente as sínteses são realizadas na presença de moléculas de recobrimento (ligantes ou surfactantes) para evitar a aglomeração das partículas, então, decorrido este tempo, 60mL de ácido cítrico 0,02g/mL foram adicionados e o sistema foi aquecido a 80°C por 30 minutos [91]. As únicas sínteses que não utilizaram o ácido cítrico foram as com KOH 0,125M e 0,25M porque a presença do ácido pode dissolver os óxidos de ferro formados. Para obter uma estreita distribuição de tamanhos, é importante que a agitação do sistema se mantenha vigorosa, evitando assim gradientes de temperatura ou concentração na solução.

Depois do resfriamento, as partículas foram decantadas magneticamente e o sobrenadante tratado e devidamente descartado. As partículas foram então lavadas diversas vezes com água destilada a fim de se retirar os íons Cl^- e SO_4^{2-} presentes na solução. Elas foram secas em estufa a 40°C por aproximadamente 4 horas e armazenadas em frascos de vidro sob atmosfera de ar.

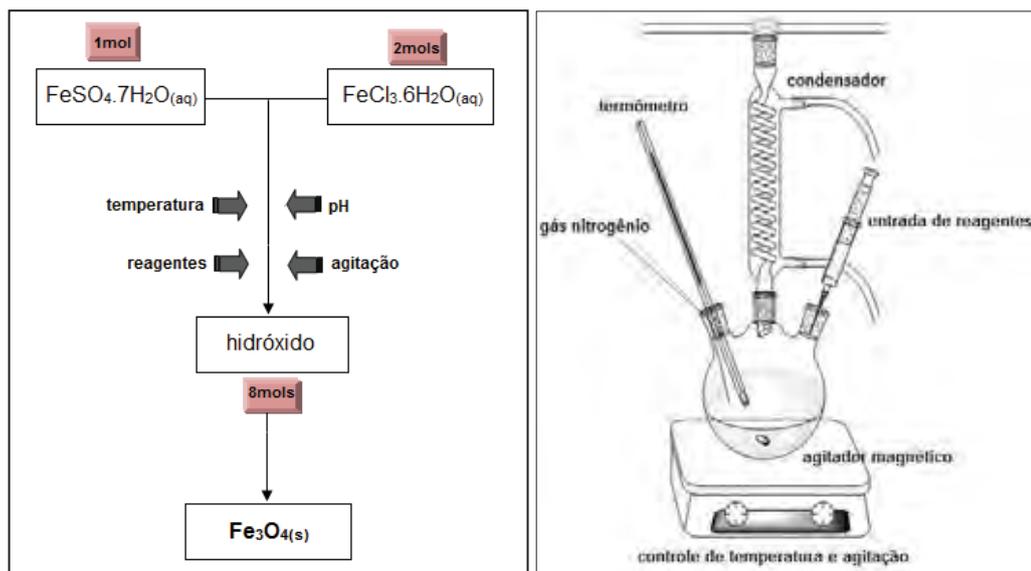


Figura 13: Fluxograma do procedimento de obtenção de magnetita e aparato experimental para síntese de NPMs pelo método de coprecipitação

A preparação das amostras envolve diversos parâmetros cruciais de síntese, tais como temperatura, pH, tipo de base, agitação vigorosa e tempo de envelhecimento. Alguns deles foram melhores estudados e são listados a seguir.

2.1.1 Influência da temperatura

Primeiramente foram adicionadas 25 mL de solução de cloreto férrico (0,96 mol/L) e 25 mL de solução de sulfato ferroso (2,18 mol/L) num balão de fundo redondo, sob atmosfera de N_2 e agitação constante de 800 rpm. Uma solução de NaOH 8M foi adicionada numa razão de $\text{Fe}^{2+} : 2\text{Fe}^{3+} : 8\text{OH}^-$ até o pH atingir um valor de 11,3 e um precipitado negro se formou. Mantiveram-se a atmosfera inerte, a agitação constante e todo o sistema a 40°C por 60 minutos. Em seguida, 50 mL de ácido cítrico 0,02g/mL foi adicionado para prevenir a aglomeração das partículas [91]. Após o resfriamento, o precipitado foi decantado magneticamente e o sobrenadante tratado e devidamente descartado. As partículas foram então lavadas diversas vezes com água destilada a fim de se retirar os íons Cl^- e SO_4^{2-} presentes na superfície. Elas foram secas em estufa a 40°C por aproximadamente 4 horas e armazenadas em frascos de vidro sob atmosfera de O_2 . Essa amostra foi denominada **NPM-1**.

A fim de se estudar o parâmetro temperatura, o mesmo procedimento foi repetido mais quatro vezes, agora com 80°C , 100°C , 120°C e 150°C , denominadas **NPM-2**, **NPM-3**, **NPM-4** e **NPM-5**, respectivamente.

2.1.2 Influência do cátion formador da base

Primeiramente foram adicionadas 15 mL de solução de cloreto férrico (1,0 mol/L) e 15 mL de solução de sulfato ferroso (2,1 mol/L) num balão de fundo redondo, sob atmosfera de N_2 e agitação constante de 800 rpm. Uma solução de base 8M foi adicionada numa razão de $Fe^{2+}:2Fe^{3+}:8OH^-$ até o pH atingir um valor de 10,9 e um precipitado negro se formou. Nesse caso as bases foram: KOH, NaOH, NH_4OH e $Ba(OH)_2$. Mantiveram-se a atmosfera inerte, a agitação constante e todo o sistema a $90^\circ C$ por 60 minutos. Em seguida, 50 mL de ácido cítrico 0,02g/mL foi adicionado para prevenir a aglomeração das partículas [91]. Após o resfriamento, o precipitado foi decantado magneticamente e o sobrenadante tratado e devidamente descartado. As partículas foram então lavadas diversas vezes com água destilada a fim de se retirar os íons Cl^- e SO_4^{2-} presentes na superfície. Elas foram secas em estufa a $40^\circ C$ por aproximadamente 4 horas e armazenadas em frascos de vidro sob atmosfera de O_2 . Essas amostras foram denominadas **NPM-6**, **NPM-7**, **NPM-8** e **NPM-9**, segundo a ordem de citação das bases.

2.1.3 Influência da molaridade da base

Primeiramente foram adicionadas 25 mL de solução de cloreto férrico (0,29 mol/L) e 25 mL de solução de sulfato ferroso (0,14 mol/L) num balão de fundo redondo, sob atmosfera de N_2 e agitação constante de 800 rpm por 30 minutos. Uma solução de KOH 0,125M foi adicionada numa razão de $Fe^{2+}:2Fe^{3+}:8OH^-$ até o pH atingir um valor de 11,2 e um precipitado negro se formou. Mantiveram-se a atmosfera inerte, a agitação constante e todo o sistema a temperatura ambiente por 60 minutos. Após o resfriamento, o precipitado foi decantado magneticamente e o sobrenadante tratado e devidamente descartado. As partículas foram então lavadas diversas vezes com água destilada a fim de se retirar os íons Cl^- e SO_4^{2-} presentes na superfície. Elas foram secas em estufa a $40^\circ C$ por aproximadamente 4 horas e armazenadas em frascos de vidro sob atmosfera de O_2 . Essa amostra foi denominada **NPM-10**. Para efeito de comparação, o mesmo procedimento foi adotado, porém a molaridade da base mudou para 0,25M, 0,5M, 1M, 2M, 4M, 6M e 8M, denominadas **NPM-11**, **NPM-12**, **NPM-13**, **NPM-14**, **NPM-15**, **NPM-16** e **NPM-17**. Ainda assim, outro estudo foi feito da mesma forma, só que usando NH_4OH

como base de concentração molar acima de 0,5M, denominadas **NPM-18, NPM-19, NPM-20, NPM-21, NPM-22, e NPM-23.**

2.1.4 Influência do tipo de base

Primeiramente foram adicionadas 25 mL de solução de cloreto férrico (0,013 mol/L) e 25 mL de solução de sulfato ferroso ($5,75 \cdot 10^{-3}$ mol/L) num balão de fundo redondo, sob atmosfera de N_2 e agitação constante de 800 rpm.

Nesta etapa do procedimento abre-se um parêntese para explicar detalhadamente o processo de síntese utilizando uma base orgânica como meio alcalino. A molécula escolhida foi um derivado do DABCO (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octano), o DABCO-etano, representada na Figura 14, que foi sintetizada no laboratório do prof. Dr José Geraldo Nery pelo aluno Wesley Cardoso Muscelli [92].

Sugere-se neste estudo o uso da molécula orgânica DABCO-etano como meio alcalino da síntese de coprecipitação. Ela é um agente direcionador de estrutura, SDA, (do inglês, Structure Direct Agent) e foi sugerida porque a sua utilização está intimamente ligada às diferenças ocorridas na estrutura, no arranjo e nas dimensões do material no qual ela está presente, atuando como *templates* nas sínteses de materiais inorgânicos estruturados (zeólitas). Os SDAs se relacionam com a formação do material, atuando nos processos de nucleação e crescimento, muitas vezes direcionando uma determinada estrutura cristalográfica [93]. Dessa forma, acredita-se que as NPM sintetizadas com DABCO possuam características diferentes das NPM sintetizadas com bases inorgânicas.

Primeiramente 50mL de solução DABCO 0,048mol/L (pH=3,34) foram misturadas a 5g de resina hidroxilada (AG 1-X8) sob agitação constante de 400rpm *overnight* para realizar troca iônica. Resinas de troca iônica são produtos sintéticos que em solução podem liberar hidroxila e captar anions. No fim desse procedimento o pH final da solução com DABCO, já filtrada, era de 13,47.

Assim, a solução de DABCO 0,048mol/L foi adicionada até um precipitado negro se formar. Mantiveram-se a atmosfera inerte, a agitação constante e todo o sistema a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, 15 mL de ácido cítrico 0,02g/mL foi adicionado para prevenir a aglomeração das partículas [91]. Após o resfriamento, o precipitado foi decantado magneticamente e o sobrenadante tratado e devidamente descartado. As partículas foram então lavadas diversas vezes com água destilada. Elas foram secas em estufa a 40°C por aproximadamente 4 horas e armazenadas em frascos de vidro sob atmosfera de O₂. Essa amostra foi denominada **NPM-24**.

Para efeito de comparação, o mesmo procedimento foi adotado, porém a nova solução de DABCO era de 0,12 mol/L (2,5 vezes maior que a primeira). Foi denominada de **NPM-25**.

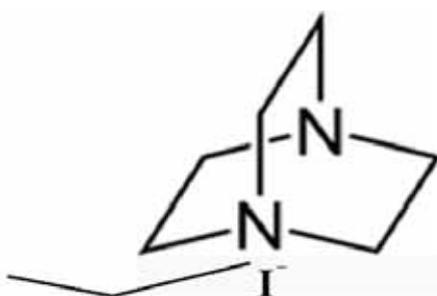


Figura 14: Representação estrutural da molécula de DABCO-etano

2.2 Técnicas e Instrumentação

Inúmeras técnicas podem ser utilizadas na caracterização físico-química das nanopartículas magnéticas a fim de fornecer informações sobre a natureza do composto, composição química das partículas, identificação do tipo de cristal, comportamento magnético, diâmetro e dispersão em tamanho das partículas, entre outros. Destacam-se brevemente as mais recorrentes e utilizadas neste trabalho.

2.2.1 Difração de raio-X (DRX)

O termo sólido cristalino é utilizado para definir substâncias cujas partículas constitutivas estão distribuídas regularmente no espaço, isto é, um sólido constituído microscopicamente por uma repetição ordenada tridimensional. Cada arranjo atômico de um sólido cristalino apresenta picos característicos de difração,

referentes a determinados planos cristalinos, que formam a figura de difração observada num experimento de raios-X (difratograma). A difração de raios-X é uma técnica importante na caracterização estrutural de sólidos, na identificação dos parâmetros de rede, de fases e do tamanho do cristal. Todos os materiais cristalinos apresentam um padrão de difração (raios-X difratados pelos planos hkl quando a condição de Bragg é obedecida) característico.

Sendo as NPMs sólidos cristalinos, elas apresentam padrões de DRX característicos, os quais podem ser utilizados qualitativamente para identifica-las e quantitativamente para determinar o grau de pureza e/ou cristalinidade e os parâmetros de cela unitária. Sabe-se que a estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio inverso apresenta os planos cristalográficos (220), (311), (400), (422), (511), (440), (620) e (533) bem definidos [94], como indica a Figura 15.

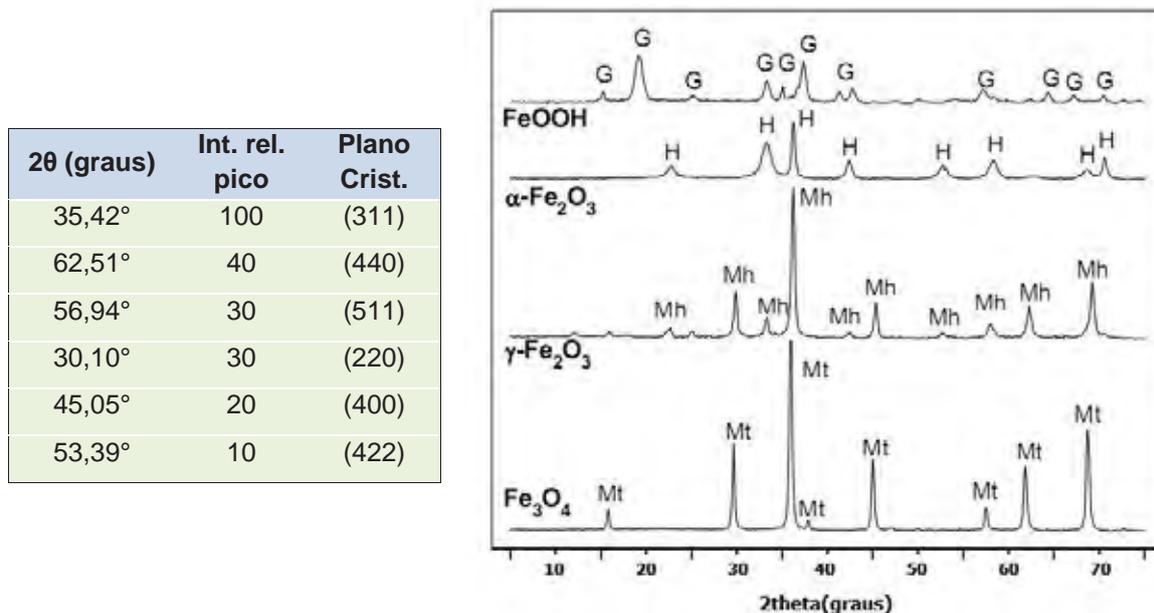


Figura 15: Difratogramas típicos de amostra de magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e goetita (FeOOH) segundo os padrões JCPDS, com ângulos e intensidades relativas aos picos de magnetita na tabela (Retirado de [95])

Os difratogramas de raios-X desse estudo devem mostrar picos consideravelmente alargados devido à dimensão nanométrica dos cristalitos, ocasionando a redução no número de planos cristalinos.

A cristalinidade de uma amostra pode ser estimada através do alargamento das linhas de difração, que pode ser causado pelo pequeno tamanho de cristalito,

pela distorção estrutural ou pela presença de fases com reflexões sobrepostas. Se a amostra é formada de nanopartículas cristalinas menores que 50 nm, o alargamento dos picos de difração de Bragg poderá ser grande o suficiente para misturar-se ao background do sinal.

Os tamanhos médios das partículas podem ser calculados a partir das medidas da largura a meia altura do pico mais intenso que corresponde ao plano hkl 311 dos difratogramas, segundo a equação de Debye-Scherrer⁵ (equação 3.1), válida somente para materiais na escala nanométrica [94].

$$d_{(hkl)} = \frac{k \cdot \lambda}{\Delta\theta \cdot \cos\theta} \quad (3.1)$$

no qual $d_{(hkl)}$tamanho médio de cristalito

kfator de forma (normalmente utiliza-se $k=0,9$ para partículas esféricas)

λcomprimento de onda do raio-X em nm

$\Delta\theta$abertura a meia altura do pico mais intenso e característico da fase cristalina (em radianos)

$\cos\theta$ângulo de Bragg (difração)

Os padrões de difração de raios X foram obtidos em um instrumento da RIGAKU modelo Rotaflex RU200B (Tokyo, Japão), usando uma placa plana de geometria Bragg-Brentano, operando com radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), 50 kV e 100 mA, equipado com um monocromador de grafite. Os difratogramas coletados no depto. de Física da USP - São Carlos foram obtidos pelo método de pó e medidos na região de 3 a 80°(2 θ) com velocidade de varredura de 4°/minuto e dados medidos a cada 0,02°.

2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um equipamento versátil que permite a obtenção de informações de superfícies de amostras diversas. Um feixe fino de elétrons de alta energia incide na superfície da amostra na qual, ocorrendo uma

⁵ Em 1916, junto com Peter Debye, Paul Scherrer desenvolveu um trabalho experimental que consistia na determinação da estrutura e tamanho de cristais através do método de difração de raios-X, correlacionando o pico de difração com o tamanho da partícula [95].

interação, parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de BSE (ou ERE) - imagem de elétrons retroespalhados - ou nesta interação a amostra emite elétrons produzindo a chamada imagem de ES (elétrons secundários). Ocorre também a emissão de raios X que fornece a composição química elementar de um ponto ou região da superfície, possibilitando a identificação de praticamente qualquer elemento presente através da análise de EDS (Sistema de Energia Dispersiva).

As micrografias eletrônicas foram obtidas utilizando um instrumento Phillips XL30 FEG, operando com um feixe de elétrons regulável para tensões de 5 a 25 kV, pertencente ao DEMa (Depto. Engenharia de Materiais)/UFSCar. Antes da realização das análises, uma fina camada de ouro e carbono sublimado é depositada sobre as amostras. Esse procedimento se faz necessário para a uniformização, dispersão e espalhamento eletrônico na superfície do material.

2.2.3 Magnetometria

Os diferentes óxidos de ferro podem ser caracterizados pelas suas propriedades magnéticas, medidas através de um magnetômetro. De um modo geral, o magnetômetro é formado por um conjunto de equipamentos (fonte, eletroímã, sensor de campo magnético e sistema de movimentação) usados para medir o momento magnético de uma amostra para um determinado valor de campo aplicado, gerando a curva de histerese. A fonte fornece corrente elétrica para as bobinas do eletroímã que geram um campo magnético na amostra. Em geral, um magnetômetro é baseado em algum tipo de sensor que converte campo magnético em sinal elétrico.

O VSM (do inglês, *Vibrating Sample Magnetometer*) detecta um campo AC produzido pela vibração da amostra através de bobinas que atuam como sensor de leitura [96].

As curvas de histerese foram obtidas através de um magnetômetro de amostra vibrante VSM da marca Molspin, com campo variante de até 1000 mT, pertencente ao Laboratório de Anisotropias Magnéticas do IGc-USP da profa. Dra. Maria Irene B. Raposo.

2.2.4 Potencial Zeta

Do ponto de vista teórico, todos os materiais macroscópicos ou nanoparticulados em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície. Dessa maneira, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido, que difere do *bulk* da solução. O potencial zeta (ξ) é a medida do potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento e prevê a estabilidade de suspensões coloidais, consideradas eletrostaticamente estabilizadas na faixa de potencial de $\pm 30\text{mV}$. Se o potencial da solução estiver fora dessa faixa, então a solução pode ser considerada estável. As medidas de potencial zeta dependem não somente da superfície da partícula, mas do dispersante. Pode ser afetado pelo pH ou força iônica do meio, valores de condutividade, entre outros fatores.

O potencial zeta (PZ) foi determinado em um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument). As nanopartículas foram separadas em dois grupos: no primeiro elas foram suspensas em água deionizada e homogeneizadas com ultrassom durante 20 minutos, no segundo elas foram suspensas em meio essencial mínimo modificado Dulbeco (DMEM) e também homogeneizadas com ultrassom durante 20 minutos.

2.3 Cultivo de linhagem celular de câncer

Toda a parte que requer conhecimentos biológicos, e nela encontram-se desde o cultivo celular até a investigação da viabilidade, foram feitos sob alguns protocolos presentes no Anexo sob a supervisão da prof. Dr. Paula Rahal e suas colaboradoras.

A transfecção das nanopartículas magnéticas (incorporação das NPMs pela célula) foi realizada em cultivo de linhagem celular contínua proveniente de carcinoma cervical uterino humano (HeLa) em meio essencial mínimo modificado Dulbeco (DMEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 100U de penicilina por mL, 100 μg de estreptomicina por mL, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (GIBCO-BRL). O cultivo foi realizado em garrafas de poliestireno de 75 cm^2 com dispositivo de aeração acoplado à tampa com filtro (TPP[®]).

A repicagem das células acontecia conforme a necessidade, o meio de cultura das garrafas era descartado e o tapete celular lavado com PBS (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA). Em seguida, eram adicionados aproximadamente 2mL de tripsina por garrafa e as culturas eram mantidas em estufa a 37°C na presença de 5% de CO₂. As monocamadas foram monitoradas ao microscópio de luz invertido para verificar o desprendimento das células. Posteriormente, a solução de tripsina foi misturada ao meio de cultura completo e houve homogeneização da suspensão. Parte da solução resultante foi devolvida à garrafa e o volume foi completado com meio de cultura fresco. Finalmente, as garrafas foram incubadas em estufa e utilizadas nos experimentos até atingirem cerca de 20 passagens.

2.4 Métodos de avaliação da citotoxicidade das nanopartículas magnéticas *in vitro*

2.4.1 Transfecção das nanopartículas na linhagem celular de câncer cervical humano (células HeLa)

Para os experimentos de coloração com Azul da Prússia e para o ensaio de apoptose, foram inseridas nas placas de microtitulação de 6 poços (TPP®) uma lamínula por poço, que foi lavada em álcool 70% e água milliQ, seca e esterilizada em luz UV a fim de se evitar qualquer tipo de contaminante que pudesse interferir nos resultados experimentais.

As células foram semeadas nestas placas com uma densidade de 2×10^5 células por poço. Esta densidade foi conseguida retirando-se todo o meio de cultura da garrafa contendo a linhagem celular, que foi lavado com PBS e incubado em estufa de CO₂ a 37°C por cerca de 3 minutos com tripsina (semelhante ao procedimento de repique). Após desprendimento das células da garrafa, adicionou-se meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e esta solução foi transferida para um tubo de polipropileno de 15 mL.

A fim de se separar o meio contendo tripsina das células, realizou-se uma centrifugação, o sobrenadante foi retirado, um meio de cultura fresco foi adicionado e a homogeneização foi então feita.

Separou-se num tubo do tipo *ependorf* cerca de 50 μ L do conteúdo do tubo de polipropileno e foram acrescentados também outros 50 μ L de Azul de Tripán (Vetec) diluído em PBS, com o cuidado de não transferirmos para a placa de microtitulação células em processos apoptóticos ou inviáveis, uma vez que se pretendia conhecer a taxa de viabilidade dessa cultura. Posteriormente à incubação e em temperatura ambiente por cerca de 3 minutos, parte do conteúdo foi transferido para a câmara de Neubauer para efetuar a contagem das células. No microscópio de luz foi focalizada a área demarcada da câmara de Neubauer com a objetiva de menor aumento. O volume total desejado da câmara com a lamínula colocada corresponde a 0,1 mm³, sendo assim, a contagem das células nas quatro áreas de um lado da câmara foi realizada e a média foi obtida. Como a suspensão foi inicialmente diluída a 1/2, o número de células contadas foi igual à média multiplicada pelo fator de diluição, no caso 2. Para se obter o número de células/mL, multiplicou-se o valor obtido por 10000 para correção (1mL=1cc) e desta forma encontramos que 1cc=10x10x10mm=1000mm³.

Na câmara de Neubauer, obtemos o número de células por 0,1mm³, que foi então multiplicado por 10, portanto 10x1000=10000 e finalmente o volume desejado foi obtido:

$\frac{\text{média da câmara de Neubauer} \cdot \text{fator de diluição} \cdot 10^4}{2 \times 10^5} = \frac{1 \text{ mL de solução}}{X \text{ mL}}$

Após transferir o volume X para os poços da placa de microtitulação e completá-los com meio específico para cada linhagem celular até o volume final de 2 mL, a placa foi então incubada em estufa de CO₂ a 37°C, 24 horas antes da transfecção.

Finalizado esse período, quando as células atingiram cerca de 80% de confluência, 500 μ L de meio de cultura com as diferentes concentrações de nanopartículas (10, 50 e 100 μ g/mL) foram submetidas à sonicação (ondas de ultrassom) (Sonicador Marconi MA610/9A) por cerca de 3 horas para redução do tamanho e desagregação das NPMs. Finalizado este procedimento, foram adicionados 500 μ L de meio de cultura ao tubo do tipo *ependorf* (Figura 16), no qual foi feita homogeneização e o conteúdo foi transferido para uma seringa de 5mL acoplada a um filtro 0,22mm de membrana PVDF (Millipore) para evitar a passagem

de possíveis contaminantes e agregados de nanopartículas. A solução resultante foi levada aos poços e a cada um foi adicionado 1 mL de meio de cultura. Seguiu-se incubação na estufa de CO₂ a 37°C e os testes foram realizados após 24 horas.



Figura 16: Aparato experimental utilizado durante o cultivo celular (esquerda). Esquema representativo da transferência da solução contendo meio de cultura e NPMs para os poços da placa, antes da incubação (direita).

2.4.2 Análise da eficiência da transfecção pela coloração Azul da Prússia

As linhagens celulares foram semeadas nas placas de microtitulação sobre lamínulas esterilizadas e, após a transfecção das nanopartículas, descrita anteriormente, as células foram fixadas em 2mL da solução Karnovsky (partes iguais de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4% em tampão fosfato Sorensen) por cerca de 1 hora. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com água destilada e a solução de Azul da Prússia foi aplicada sobre a amostra por cerca 20 minutos. O corante Azul da Prússia é um ferrocianeto que tem como função reagir com o ferro em tecidos biológicos resultando em um precipitado azulado.

Após três lavagens com água destilada, realizou-se contracoloração com hematoxilina-eosina, na qual aproximadamente 2mL do corante foram adicionados aos poços por 10 minutos. Seguiu-se lavagem com água destilada e incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Etanol 80% foi ministrado por 1 minuto, retirado e 2 mL de eosina foram acrescentados por cerca de 4 minutos. O excesso foi lavado com etanol 95% duas vezes e posteriormente etanol 100% foi adicionado. As lamínulas foram removidas dos poços com auxílio de uma pinça, secas em papel-

filtro à temperatura ambiente e para a montagem da lâmina, 2 gotas de meio de entellan (Merck) foram colocadas antes de posicionar a lamínula. Os experimentos foram realizados em duplicata e para a captura de imagens, utilizou-se o analisador de imagem DP71 acoplado ao microscópio Olympus BX60. Após a visualização das fotomicrografias, foram contadas 500 células das lâminas (em diferentes campos sob o mesmo aumento no microscópio) e quantificadas aquelas nas quais havia ocorrido internalização das magnetitas, a fim de calcular a média e o desvio padrão das duplicatas e conseqüentemente encontrar a eficiência final de transfecção.

2.4.3 Ensaio MTT

A citotoxicidade foi analisada por meio do ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio), que avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT após a incubação das culturas celulares por 24 e 48 horas juntamente às nanopartículas em placas de microtitulação de 96 poços.

As células foram semeadas numa densidade de 1×10^4 células por poço em um volume total de 200 μ L de meio de cultura específico para cada linhagem celular suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) sendo incubadas em estufa de CO₂ a 37°C 24 horas antes da transfecção das nanopartículas como descrito anteriormente no item 2.4.1. Para os testes de 48 horas, foram separadas triplicatas nas quais se realizou troca do meio de cultura todos os dias e triplicatas nas quais permaneceu intacto o meio de cultura proveniente da transfecção com as nanopartículas a fim de verificar se o meio de cultura afetaria ou não a viabilidade celular.

Nos momentos selecionados (24 e 48 horas pós-transfecção), o meio de cultura foi removido de cada poço e trocado por 100 μ L de meio de cultura fresco e específico de cada linhagem. Posteriormente, foram adicionados a cada poço 10 μ L de solução MTT 12mM do Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen) previamente preparada pela adição de 1mL de PBS a 5mg de MTT seguida de agitação por vortex (Fisher Scientific). A placa foi então incubada por 4 horas a 37°C, depois foram removidos 85 μ L do volume de sobrenadante de cada poço e os cristais de que se formaram foram dissolvidos em 50 μ L de dimetilsulfóxido 100%

(DMSO) (Sigma). Finalmente, a placa foi incubada novamente a 37°C por 10 minutos e as amostras foram misturadas antes da realização da leitura da absorbância. Como controle, foram utilizadas linhagens celulares desprovidas de nanopartículas.

A absorbância foi determinada pelo leitor de ELISA (ThermoPlate modelo TP reader tipo B) sob comprimento de onda de 570nm, sendo que as células não tratadas foram tomadas como controle com 100% de viabilidade. A viabilidade celular relativa (%) em relação ao controle foi calculada e todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

2.4.4 Ensaio de apoptose

O procedimento inicial de fixação das células nas lamínulas seguiu o protocolo descrito para a coloração por Azul da Prússia (item 2.4.2). A metodologia baseou-se em adicionar a cada poço aproximadamente 2mL de Alumen férrico 4% por cerca de 4 minutos e depois de retirada a solução e as lamínulas bem lavadas com água destilada, foram empregados 2mL de alaranjado de acridina por 10 minutos. O corante foi removido e as lamínulas lavadas com água destilada foram colocadas para secar em ambiente livre de poeira. A montagem da lâmina foi realizada com glicerina somente antes da visualização no analisador de imagens DP71 acoplado ao microscópio Olympus BX60 para captura de fotomicrografias, análise da morfologia e verificação de morte celular, sendo que os experimentos foram realizados em duplicata.

Capítulo 3 – Resultados e Discussões

3. Resultados e Discussões

Neste capítulo apresentamos os resultados e discussões acerca de duas investigações distintas envolvendo NPMs. A primeira parte trata da influência dos parâmetros de síntese na formação do produto e suas caracterizações através das técnicas de DRX, MEV e curvas de histerese. A segunda discute alguns resultados obtidos *in vitro* da aplicação das NPMs em linhagem celular de câncer cervical (células HeLa).

3.1 Caracterização dos materiais

3.1.1 Difração de raios-X

As amostras sintetizadas foram caracterizadas por difração de raios-X e a partir dos dados obtidos foi possível distinguir as fases presentes e o tamanho médio das partículas. Os diâmetros médios foram calculados a partir da equação de Debye-Scherrer e estão apresentados nas Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8.

Por comparação com os valores de 2θ fornecidos pelo padrão JCPDS (Figura 15, página 41), pôde-se inferir dos difratogramas obtidos se a fase predominante correspondia à estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio inversa característica de magnetita. Todavia, em alguns casos houve a formação de fases competitivas, muito características desse meio reacional, que serão discutidas ao longo deste capítulo e que foram mencionadas no item 1.4.2 (Figura 06).

Nos itens a seguir, apresentam-se as discussões dos difratogramas em termos de diversos parâmetros, como temperatura, cátion, molaridade e tipo de base.

3.1.1.1 Estudo da influência da temperatura

Na Figura 17 estão plotados os difratogramas das amostras NPM-1, NPM-2, NPM-3, NPM-4 e NPM-5. As amostras contêm picos característicos de magnetita, indicados pelos índices hkl {311}, {440}, {511}, {220}, {400} e {422} em sua maioria.

Há também a presença de picos de maghemita (equivalente oxidado da magnetita) e goetita, indicados pelas setas vermelhas como fases concorrentes; e alguns outros, resultado da precipitação de hidróxido de potássio ou espécies mais complexas. A observação de picos alargados e de baixa intensidade confirma a presença de material cristalino em nanoescala.

Quando a temperatura da síntese é aumentada, o movimento das partículas torna-se mais rápido, acelerando a nucleação secundária (fragmentos de cristais que podem transformar-se em novos núcleos), facilitando o crescimento de partículas menores [97,98,99]. Com relação ao aumento de temperatura, notamos que não há mudanças significativas nos difratogramas de raios-X, significando que a temperatura, nesse caso, não favorece o aparecimento de nenhuma fase na formação das NPMs. Além disso, o acréscimo na temperatura não foi suficiente para aumentar significativamente o diâmetro médio das partículas, afirmação observada pela semelhança na largura dos picos e corroborada pela equação de Debye-Scherrer, que dentro de um erro de 10% mantém todos os valores num mesmo intervalo (Tabela 4).

Da Figura 17, nota-se que houve formação de fase majoritária de magnetita em todos os difratogramas. Porém, é importante salientar a presença de picos característicos não correspondentes à magnetita, assinalados no difratograma como fases concorrentes. A investigação dessas outras fases foi feita a partir da observação da Figura 15, com a identificação de picos (2θ) no intervalos de 15° a 20° , 30° a 40° e acima de 70° , da qual podemos supor a presença de maghemita (γ - Fe_2O_3) e até goetita (α - FeOOH) em algumas amostras. Baseado nos padrões JCPDS da magnetita, maghemita e outros óxidos de ferro, supomos a presença de pelo menos duas fases nesta amostra: magnetita e maghemita. Provavelmente o aparecimento desta fase pode ter acontecido pela presença de oxigênio em algum instante da síntese.

Desse estudo conclui-se que o aumento da temperatura de síntese favorece a formação da fase pura do material. Em contrapartida, a existência de maghemita na amostra não pôde ser atribuída exclusivamente ao parâmetro temperatura.

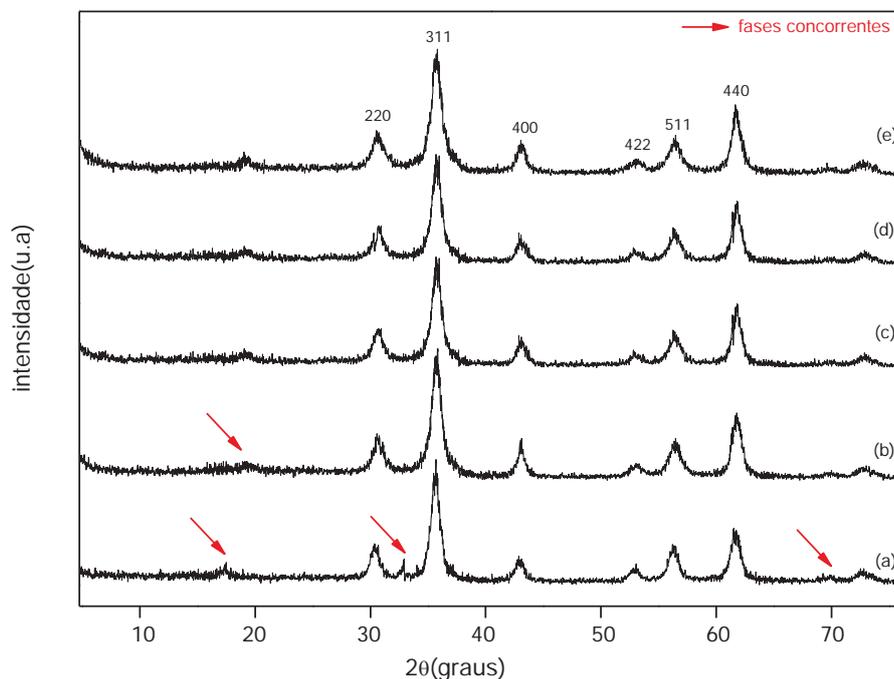


Figura 17: Difratoograma de nanopartículas magnéticas de ferro sintetizadas com KOH 8M a diferentes temperaturas: a) 40°C, b) 80°C, c) 100°C, d) 120°C e e) 150°C. Seta vermelha: fases concorrentes.

Tabela 4: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer para as amostras sintetizadas a diferentes temperaturas

Amostra	Diâmetro (nm)
NPM-1 (40°C)	89,4 ± 8,8
NPM-2 (80°C)	96,1 ± 9,3
NPM-3 (100°C)	95,9 ± 8,7
NPM-4 (120°C)	98,2 ± 9,5
NPM-5 (150°C)	102,0 ± 9,5

3.1.1.2 Influência do cátion formador da base

No estudo da influência do cátion formador da solução alcalina utilizada nas sínteses, observou-se que os produtos obtidos com KOH (NPM-6), NaOH (NPM-7) e NH₄OH (NPM-8) apresentaram difratogramas (Figura 18) com picos característicos de magnetita – assinalados com triângulo vermelho - e maghemita, com comportamento magnético quando próximos de um ímã forte. Já os produtos obtidos

com o uso de hidróxidos de cálcio (Ca(OH)_2) e bário (Ba(OH)_2) mostraram alguns picos de magnetita e outras fases competitivas, assinaladas com quadrados verdes no difratograma.

Não se esperava que a diferença de carga dos cátions formadores da base (monovalente e divalente) pudesse deslocar o equilíbrio de formação da reação no sentido do aparecimento de novas fases ou fases preferenciais, como podemos inferir da observação da Figura 15. No entanto, foi perceptível pelo difratograma apontar cátions que favoreceram o aparecimento de muitos óxidos de ferro concorrentes.

Quando utilizados hidróxidos de cátions monovalentes (K^+ , Na^+ e NH_4^+), não notamos a influência da carga no sentido de formação de espécies concorrentes, visto que no meio reacional elas se formam, porém logo se dissociam. Contrariamente, no caso das bases divalentes (Ba^{2+} e Ca^{2+}) existe uma competição pelas hidroxilas no meio reacional, levando à formação e não dissociação de espécies de ferro concorrentes. Observa-se que com o uso de uma base com cátion divalente (Ca^{2+} , Ba^{2+}), o produto final é uma mistura de óxidos de ferro e de ferritas de cálcio ($n\text{CaO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) e bário ($n\text{BaO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$), respectivamente. Íons divalentes nesse meio reacional reagem formando estruturas do tipo ferritas, já que a solubilidade dos hidróxidos de cálcio e bário são bem menores se comparadas aos outros hidróxidos utilizados.

De modo geral, os difratogramas da Figura 18 mostram prevalência de picos de magnetita para bases monovalentes e presença de fases concorrentes (ferritas) para bases divalentes.

Além disso, devemos notar que outra diferença ocorrida pela mudança de base pôde ser observada nos difratogramas pela intensidade e largura de cada pico. O hidróxido de sódio favoreceu a diminuição do diâmetro médio das partículas (Tabela 5) [69], assim como apresentou um produto final mais cristalino, enquanto que o hidróxido de bário apresentou mais impurezas e fases concorrentes.

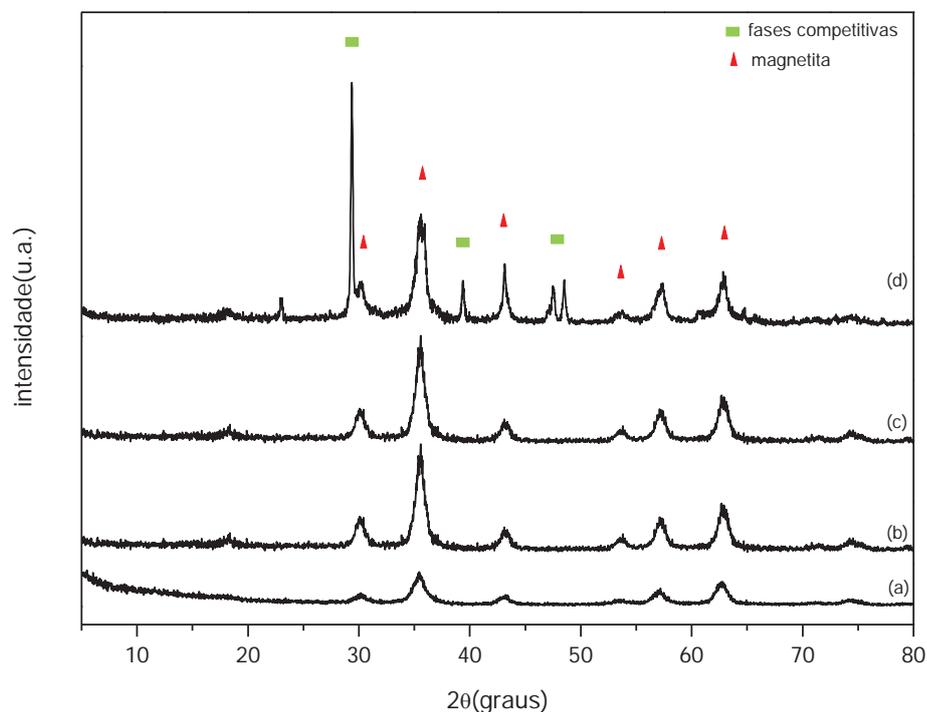


Figura 18: Difratograma de nanopartículas magnéticas de ferro sintetizadas na mesma temperatura com diferentes bases a 8M: a) NaOH; b) KOH; c) NH_4OH , d) $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Tabela 5: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer para as amostras sintetizadas com diferentes hidróxidos

Amostra	Diâmetro (nm)
NPM-6 (NaOH)	$65,5 \pm 5.7$
NPM-7 (KOH)	$86,4 \pm 8.8$
NPM-8 (NH_4OH)	$89,8 \pm 9.3$
NPM-9 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$)	$100,8 \pm 8.5$

3.1.1.3 Influência da molaridade das bases

A) Base forte – KOH

No estudo da influência da molaridade da base observou-se pelos difratogramas que houve a formação de magnetita na maioria das sínteses.

Na Figura 19 plotaram-se as curvas de uma série de experimentos feitos com condições idênticas, porém com diferentes concentrações molares de KOH, que vão

de 0,125M a 8M (NPM-10 a NPM-17). Pode-se notar que a influência está no sentido de que quanto maior a molaridade, maior a pureza e cristalinidade da amostra.

No gráfico podemos observar que os difratogramas com padrão de difração semelhante ao de magnetita são os acima de 2M. As curvas a e b (0,125M e 0,25M), por exemplo, apresentam muitas fases competitivas e impurezas, sinalizadas respectivamente pelos quadrados vermelhos e setas verdes. Esse comportamento pode ter ocorrido porque apesar de mantida a proporção de 1:2:8, a quantidade de íons hidroxila (alcalinidade) presente na reação não foi suficiente para a formação somente de magnetita [65, 67, 68, 73-77]. Nesse caso, o pH final pode não ter ficado na faixa que garante somente a formação dessa espécie, entre 8,5 e 10. As inúmeras fases são consequência de fatores como presença de oxigênio na síntese, excesso ou falta de algum reagente (reação não estequiométrica), entre outros.

Na tabela 6 encontram-se os valores dos diâmetros obtidos e seus respectivos erros, sinalizando que o aumento da molaridade da base, neste caso, não foi significativo na redução do tamanho. Todavia, o aumento da molaridade favoreceu o não aparecimento de inúmeras fases competitivas, extremos que podemos notar nas curvas a e h da Figura 19.

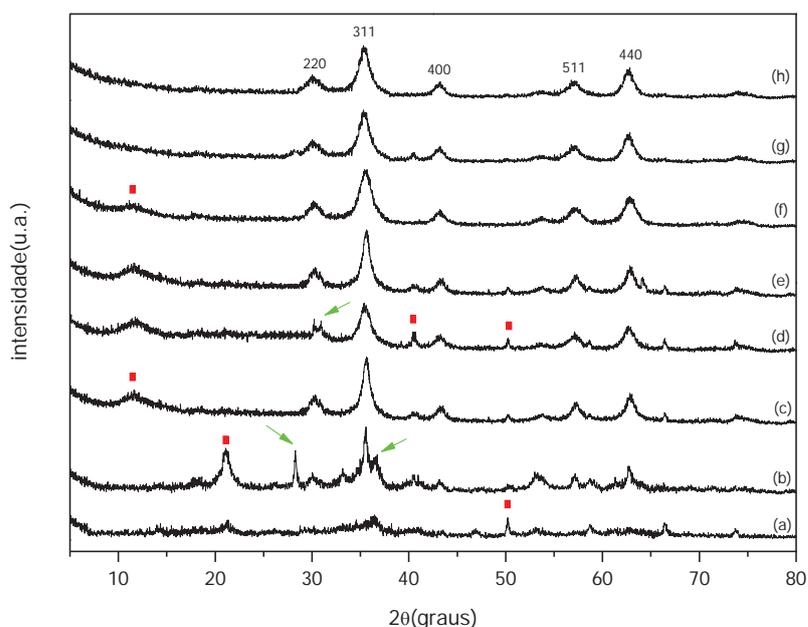


Figura 19: Difração de raios-X para amostras sintetizadas com KOH a diferentes molaridades: a) 0,125M; b) 0,25M; c) 0,5M; d) 1M; e) 2M; f) 4M; g) 6M; h) 8M

Tabela 6: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer para as amostras sintetizadas com hidróxido de potássio

Amostra	Diâmetro (nm)
NPM-10 (KOH 0,125M)	-
NPM-11 (KOH 0,25M)	-
NPM-12 (KOH 0,5M)	95,0 ± 9,3
NPM-13 (KOH 1M)	89,8 ± 7,1
NPM-14 (KOH 2M)	88,8 ± 8,5
NPM-15 (KOH 4M)	92,3 ± 9,6
NPM-16 (KOH 6M)	89,7 ± 7,7
NPM-17 (KOH 8M)	91,1 ± 9,4

B) Base fraca – NH₄OH

O mesmo estudo foi feito utilizando-se uma base fraca (NH₄OH) na síntese e os difratogramas obtidos estão dispostos na Figura 20. Nota-se que a cristalinidade das amostras aumentou consideravelmente comparando-a com os dados anteriores (Fig.19) e segundo a equação de Scherrer, os valores obtidos para o diâmetro médio das partículas são maiores (picos estreitos) também se comparados (Tabela 7).

Segundo alguns resultados reportados na literatura, era-se esperado que as NPMs sintetizadas com NH₄OH exibissem diâmetros menores do que as sintetizadas com KOH [60,71]. As diferenças no tamanho entre elas são devido às diferenças nos processos de nucleação e crescimento do grão durante a síntese. O hidróxido de amônio, por ser uma base fraca, produz um menor número de núcleos de magnetita, favorecendo o crescimento do cristal e a maturação de Ostwald, resultando em uma maior quantidade de partículas com tamanhos menores. Quando se utiliza uma base forte, ocorre o processo inverso, ou seja, a formação de um maior número de núcleos, favorecendo seu crescimento. Uma das hipóteses mais aceitas para a divergência dos diâmetros das NPMs sintetizadas com NH₄OH pode estar no fato da alta rotação (>2000rpm) não ter sido alcançada.

Nota-se ainda, que com o NH₄OH a cristalinidade e pureza das amostras são alcançadas desde molaridades baixas (Fig. 20, curva a), diferentemente das NPMs sintetizadas com KOH que apresentaram esse comportamento somente acima de 2M.

Tabela 7: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer

Amostra	Diâmetro (nm)
NPM-18 (NH ₄ OH 0,5M)	103,7 ± 9,8
NPM-19 (NH ₄ OH 1M)	101,3 ± 10,1
NPM-20 (NH ₄ OH 2M)	99,4 ± 9,5
NPM-21 (NH ₄ OH 4M)	97,6 ± 9,4
NPM-22 (NH ₄ OH 6M)	96,6 ± 8,4
NPM-23 (NH ₄ OH 8M)	95,5 ± 8,2

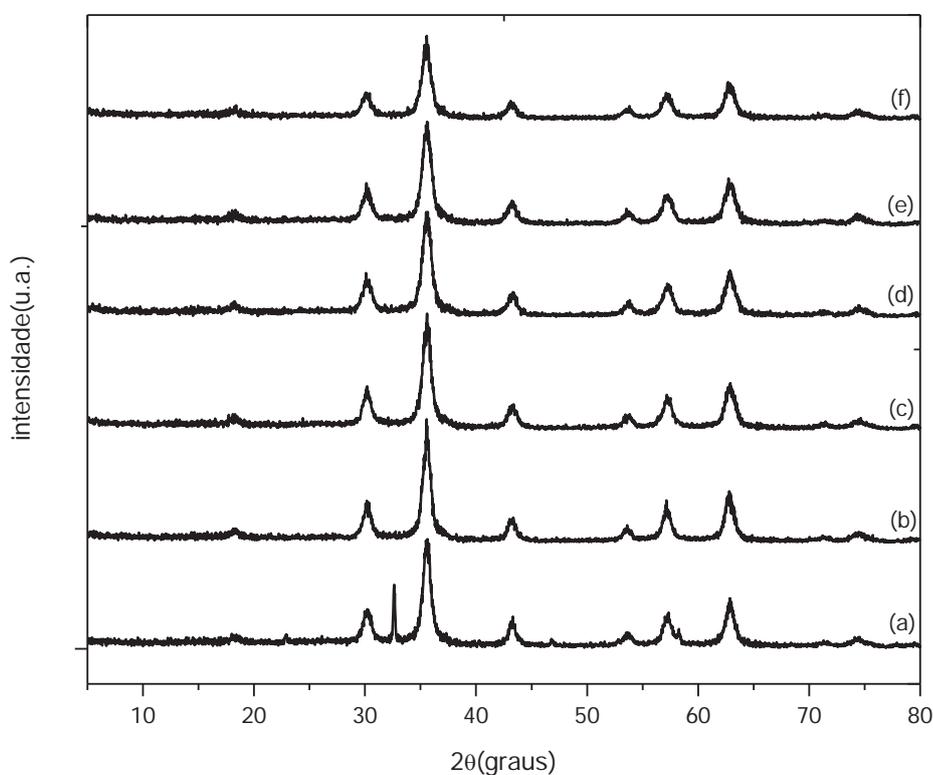


Figura 20: Difração de raios-X para amostras sintetizadas com a mesma base a diferentes molaridades: a) NPM-13 / NH₄OH 0,5M; b) NPM-14 / NH₄OH 1M; c) NPM-15/ NH₄OH 2M; d) NPM-16 / NH₄OH 4M; e) NPM-17 / NH₄OH 6M e f) NPM-18 / NH₄OH 8M

3.1.1.4 Influência do tipo de base

Para o estudo da influência do tipo de base na formação das NPMs, duas sínteses com base orgânica e uma com base inorgânica foram realizadas e seus resultados estão dispostos na Figura 21. Observa-se através dos difratogramas que houve a formação de magnetita tanto nas sínteses com base orgânica derivada da

molécula de DABCO (DABCO-etano) como nas com base inorgânica (KOH). Isto indica que as hidroxilas são o fator determinante para a formação do material, e não do tipo de base da qual elas provem. Nesse sentido, o importante é controlar a alcalinidade da solução que age como agente precipitante e não necessariamente o tipo de base que fornece o aumento dela.

Este resultado é bastante interessante, visto que é conhecido da literatura que o DABCO atua como agente direcionador de estrutura e sua utilização está intimamente ligada às diferenças ocorridas na estrutura, no arranjo e nas dimensões do material no qual ele está presente [93]. Dessa forma, acreditava-se que as NPMs sintetizadas com DABCO possuísem características diferentes das NPMs sintetizadas com base inorgânica, com possíveis alterações estruturais ou de diâmetro médio.

Nos difratogramas referentes às NPMs sintetizadas com DABCO (Figura 21 a e b), todos os picos característicos de magnetita estão presentes e assinalados com pontos vermelhos. No entanto, um pico de difração em $2\theta=11,6^\circ$ (ponto verde) foi associado a uma fase não identificada, que especulava-se ser a molécula de DABCO. Por observação da Figura 19, um pico muito próximo a este valor de ângulo apareceu em determinadas molaridades (curvas c, d, e), colocando em questão se a contribuição do pico $2\theta=11,6^\circ$ era realmente da molécula orgânica ou era resultado de um comportamento estrutural quando pouca quantidade de hidroxila estava presente na solução de formação do precipitado. No entanto, para molaridades ainda mais baixas, como 0,125M e 0,25M o comportamento esperado não se repetiu, como podemos observar na Figura 22. Ficou claro desse resultado que a concentração molar da base influenciou o aparecimento de fases competitivas.

Além disso, pelos difratogramas obtidos das NPMs sintetizadas com DABCO-etano, observa-se que a intensidade e a largura são características de material na escala nanométrica (Figura 21, curvas a e b). Com isso, é bem provável que exista uma coordenação da molécula de DABCO com o ferro, no sentido de formação de uma fase competitiva, talvez maghemita, com a influência orgânica. Para confirmar essa hipótese o melhor seria realizar um tratamento térmico na amostra para validar a coordenação entre as duas espécies e aprofundar os dados sobre essa fase ainda não identificada.

Ainda dos difratogramas é possível inferir que nas duas amostras de NPM-DABCO houve a formação de magnetita, porém, na maior concentração (0,12M) a cristalinidade é mais alta.

Tabela 8: Valores médios do diâmetro obtidos segundo a equação de Debye-Scherrer

Amostra	Diâmetro (nm)
NPM-15 (KOH 4M)	92,3 ± 9,6
NPM-25 (DABCO 0,048M)	-
NPM-26 (DABCO 0,12M)	166,6 ± 9.8

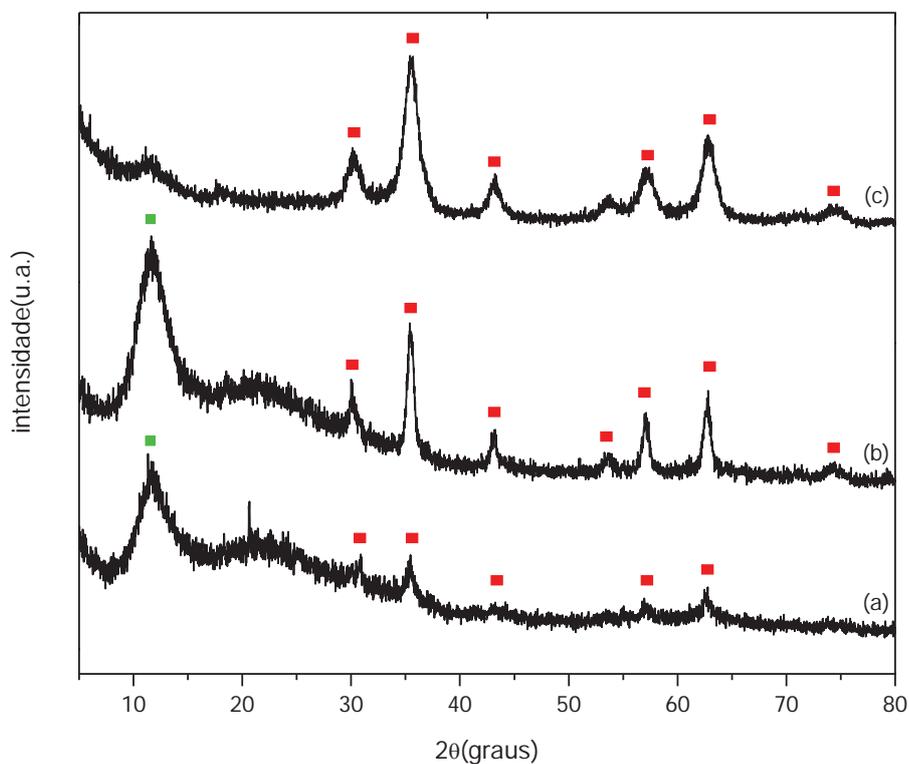


Figura 21: Difração de raios-X para amostras sintetizadas com bases orgânica e inorgânica: a) NPM (DABCO 0,048M), b) NPM (DABCO 0,12M) e c) NPM (KOH 4M)

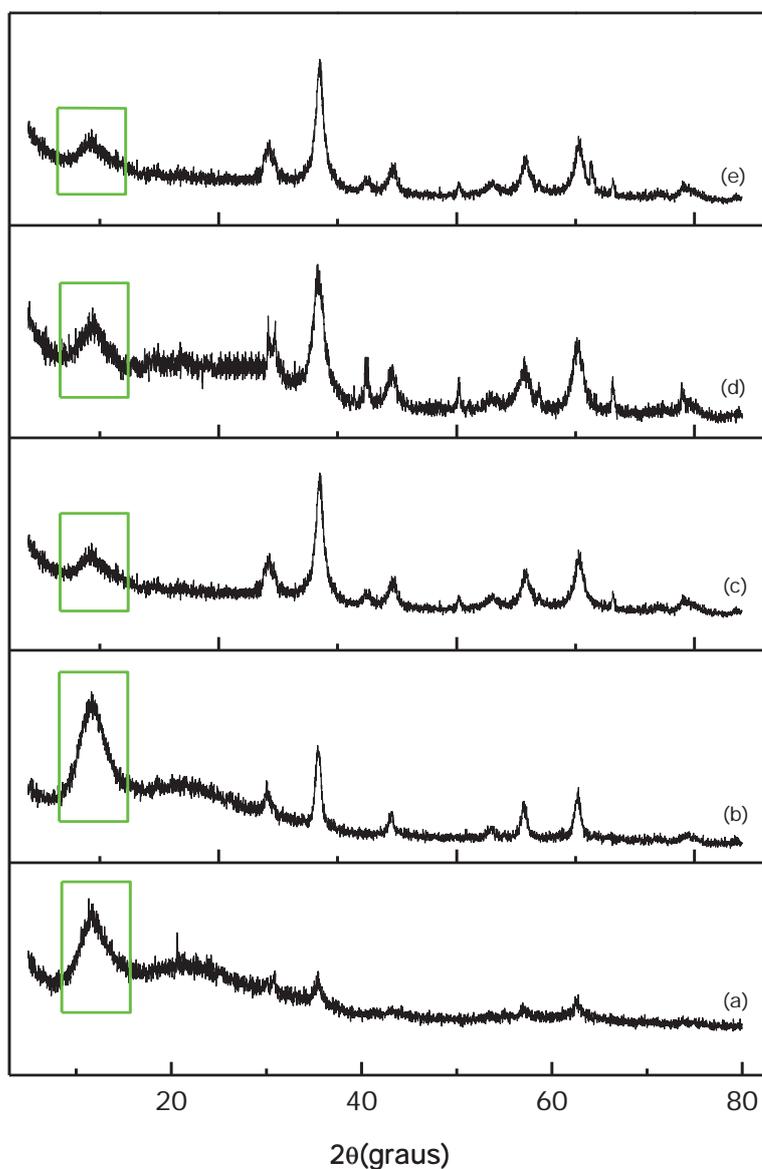


Figura 22: Comparativo da difração de raios-X das amostras sintetizadas com bases orgânica e inorgânica: a) NPM (DABCO 0,048M), b) NPM (DABCO 0,12M), c) NPM (KOH 0,5M), d) NPM (KOH 1M), e) NPM (KOH2M)

3.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise da morfologia e distribuição de tamanho das NPMs foi possível através de imagens de microscopia eletrônica das amostras NPM-15 (KOH 4M), NPM-17 (KOH 8M) e NPM-26 (DABCO-etano). Nelas, observou-se que as partículas estão ligeiramente aglomeradas, provavelmente devido à falta de recobrimento e às próprias forças de interação (Figuras 23 e 25). Em relação à morfologia, pode-se

dizer que as partículas são esféricas, como observado em alguns trabalhos científicos [2, 60, 6, 10].

Pelos histogramas das Figuras 23 e 25, obtidos pelo programa *ImageJ*⁶, observamos uma larga distribuição de tamanhos, caracterizando a polidispersão de diâmetros das amostras (Figuras 24 e 26). No entanto, uma estimativa indica que as partículas tem diâmetro médio de 91 ± 10 nm para a amostra sintetizada com KOH 4M e $83 \pm 9,4$ nm para a sintetizada com KOH 8M, mas podem chegar até 250 nm. A amostra de NPM 4M demonstra que a maior quantidade de partículas está acima dos 75nm, enquanto que a amostra NPM 8M tem a maioria de suas partículas entre 30 e 100nm. Os valores de tamanhos obtidos pelo tratamento dos dados da técnica de MEV estão de acordo com os obtidos pela técnica de DRX.

A amostra NPM-26 (DABCO) também foi analisada segundo a técnica de MEV, uma vez que pela técnica de difração de raios-X ela não apresentou as diferenças esperadas por um SDA. No entanto, a micrografia da amostra sintetizada com DABCO-etano indica as mesmas características morfológicas das sintetizadas com base inorgânica, podendo-se afirmar que ela também possui morfologia esférica (Figura 27). A condição de aglomeração é devido a falta de recobrimento nas partículas. Em alguns estudos do método de coprecipitação que utilizaram sais de cobalto para a síntese de nanopartículas magnéticas, observou que a mudança da base alterava de forma direta a morfologia da partícula [100,101]. O mesmo não vale para as sínteses contendo sais de ferro e diferentes bases (orgânica e inorgânica). Um aspecto importante que deve ser ressaltado é a distribuição do tamanho das partículas - a presença da base orgânica favoreceu uma distribuição menos dispersa de diâmetros (Figura 28). Então, pela análise das micrografias eletrônicas, percebe-se que a adição do DABCO-etano na síntese das NPMs não influenciou nas características morfológicas do material, mas sim numa distribuição mais homogênea de tamanhos. Interessantemente, nota-se que das três amostras analisadas por MEV, as NPMs sintetizadas com DABCO são as que mais se aproximam de uma gaussiana perfeita.

⁶ *Image J* é um processador de imagem em linguagem Java criado por Wayne Rasband em 1997 pelo National Institute of Mental Health. O programa é de domínio público e foi inspirado no programa *NIH Image*.

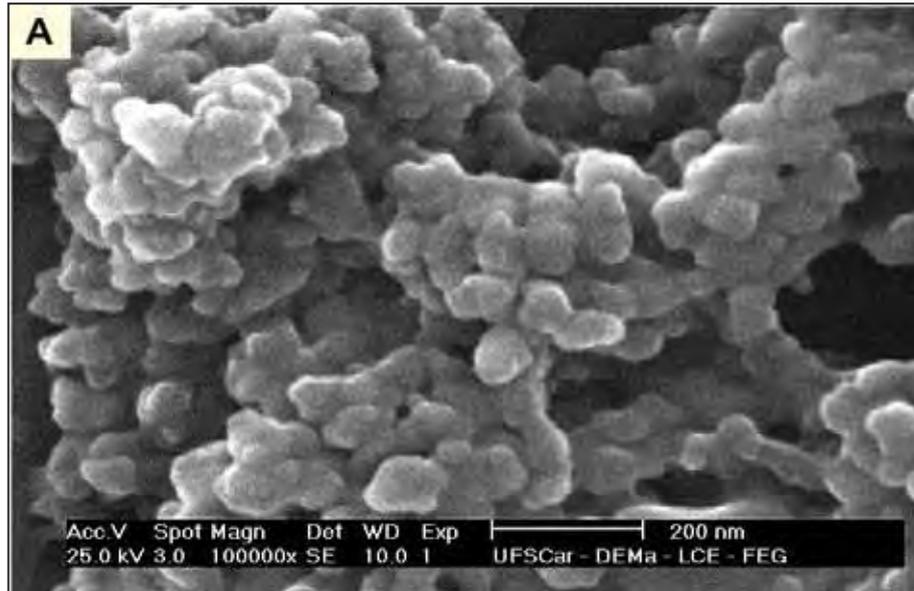


Figura 23: Micrografia eletrônica da amostra de NPM-KOH 4M (ampliado 100000x)

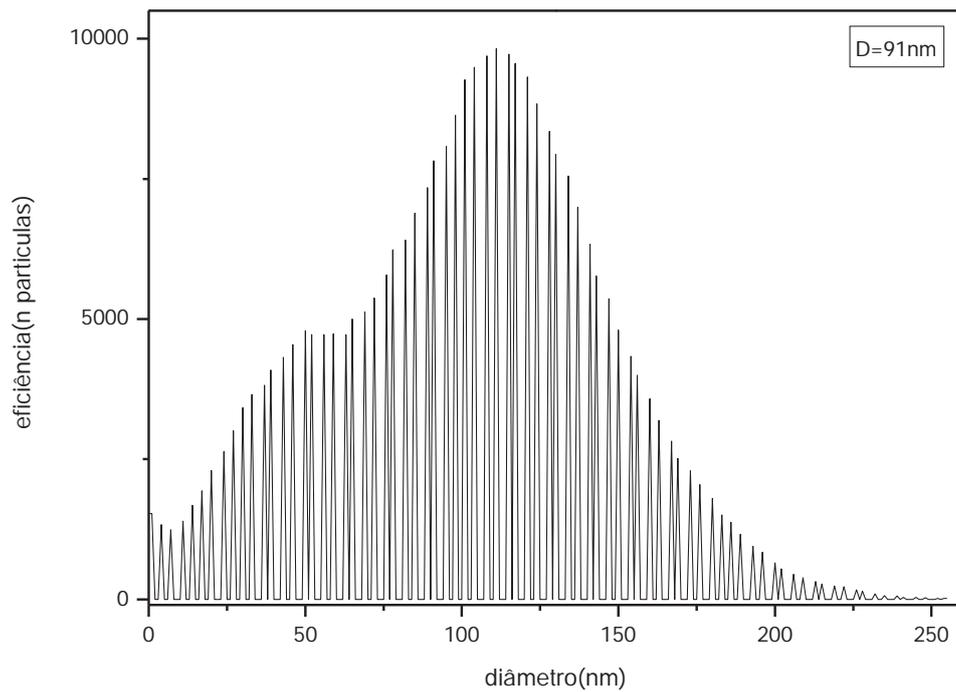


Figura 24: Histograma referente a amostra NPM-KOH 4M com indicação do diâmetro médio

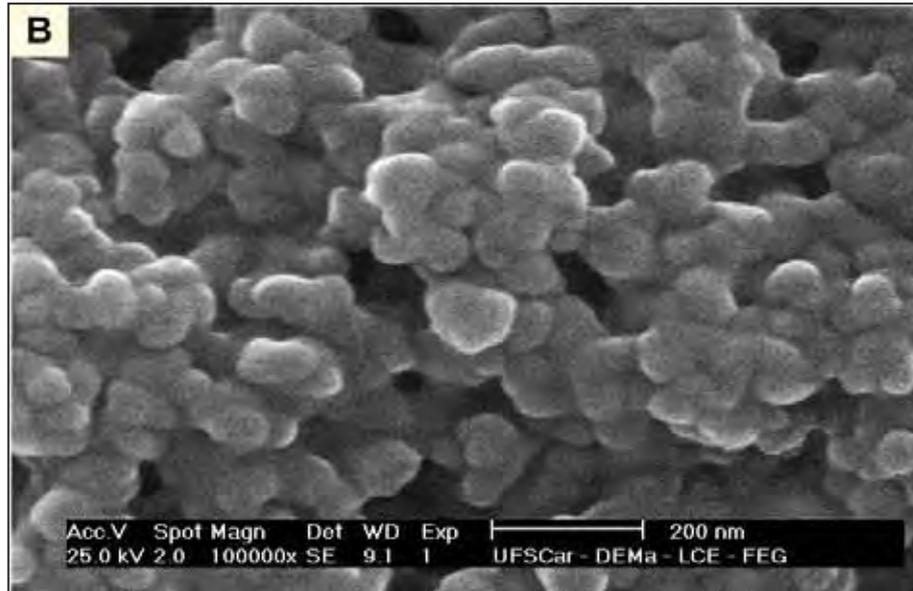


Figura 25: Micrografia eletrônica da amostra de NPM-KOH 8M (ampliado 50000x)

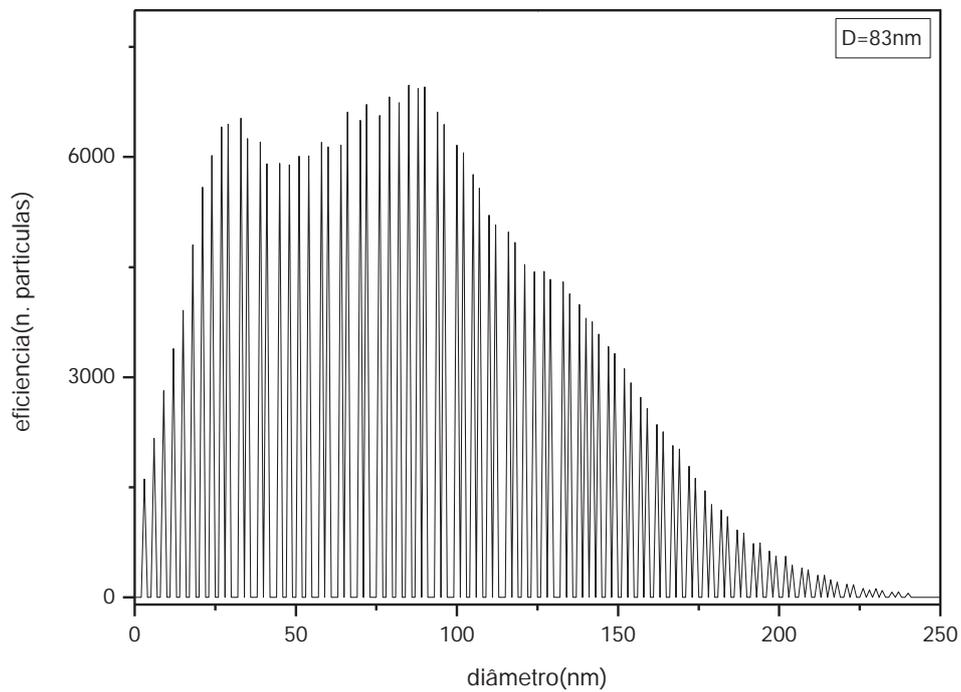


Figura 26: Histograma referente a amostra NPM-KOH 8M com indicação do diâmetro médio

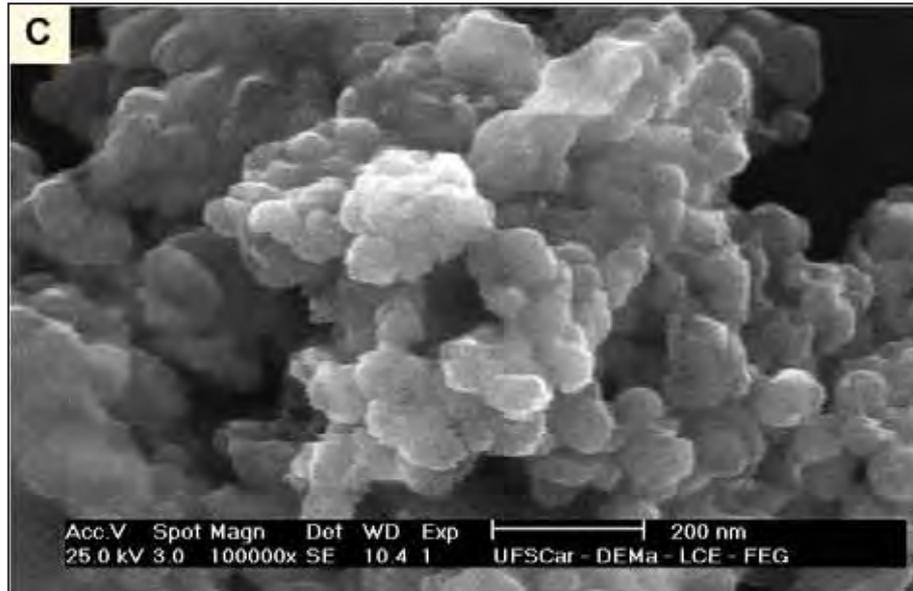


Figura 27: Micrografia eletrônica da amostra de NPM-DABCO 0,12M (ampliado 100000x)

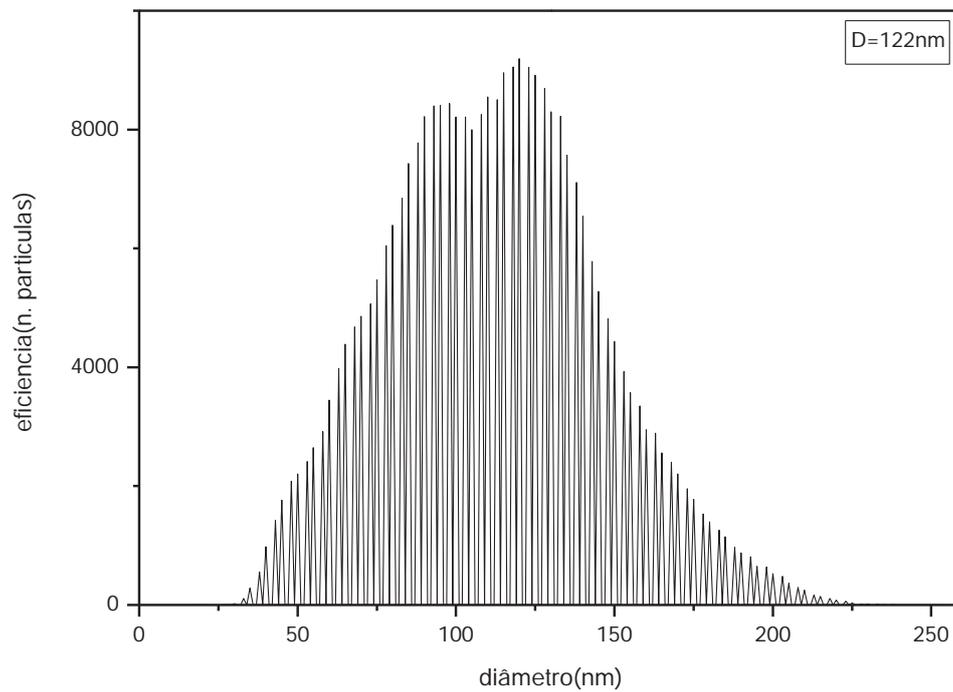


Figura 28: Histograma referente a amostra NPM-20 com indicação do diâmetro médio

3.1.3 Medidas de magnetização – curvas de Histerese

Após caracterizações cristalográficas, morfológicas e dimensionais, analisou-se o comportamento magnético das NPMs. As medidas foram feitas a temperatura ambiente (298K) e todas as amostras apresentaram valores de remanência e coercividade baixos. Nos tubos com pouca amostra foi adicionado Al_2O_3 (óxido de alumínio), que aumenta a quantidade em massa e não interfere nas medidas de magnetização. Os resultados de cada amostra fornecem valores de remanência (H_r), coercividade (H_c) e magnetização de saturação (M_{sat}) para cada quadrante, além da média de cada um deles.

3.1.3.1 Influência da molaridade das bases

A) Base forte

A fim de analisar a influência da concentração molar de base utilizada na síntese das NPMs sobre seu comportamento magnético, o gráfico da Figura 28 apresenta uma comparação entre as amostras NPM-14 (KOH 4M) e NPM-16 (KOH 8M). Com as caracterizações físico-químicas anteriores (DRX e MEV) não foi possível observar nenhuma diferença macroscópica estrutural. No entanto, ao serem submetidas às medidas de histerese, as amostras exibiram valores de magnetização diferenciados.

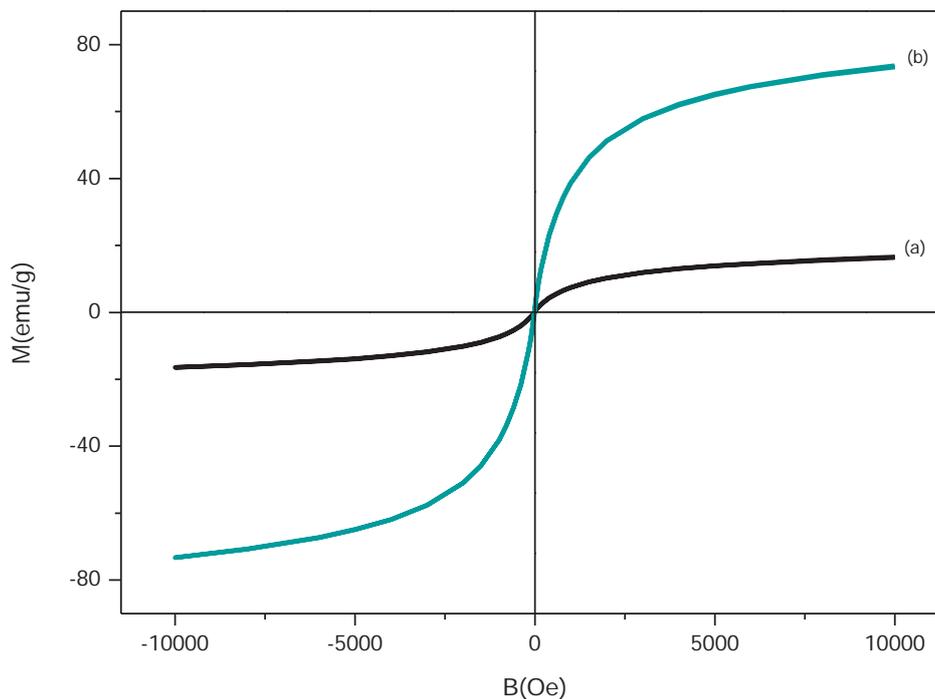


Figura 29: Curvas de magnetização dos precipitados obtidos com hidróxido de potássio: a) NPM-14 (KOH 4M), b) NPM-16 (KOH 8M)

Tabela 9: Valores de magnetização de saturação (M_{sat}), campo coercivo (H_c) e magnetização de remanência (M_R) das amostras de KOH 4M e KOH 8M

Amostra	Massa(g)	M_{sat} (emu/g)	H_c (Oe)	M_R (emu/g)
NPM-10 (KOH 4M)	$0,381 \pm 0,001$	16,3	0	0,04
NPM-12 (KOH 8M)	$0,312 \pm 0,001$	73,7	0	0,25

As amostras exibiram curvas com comportamento típico de material ferrimagnético a 298K. Os valores de coercividade (H_c) e remanência (M_R) são pouco expressivos em relação aos valores de magnetização de saturação (Tabela 9). O valor de coercividade ($H_c=0$) situa-se dentro do intervalo reportado pela literatura, que é abaixo de 50Oe quando a amostra é medida a aproximadamente 300K [87]. Para os fins sugeridos neste trabalho, o ideal seria que tanto o H_c como o M_R fossem nulos para que no fim da aplicação do campo magnético as NPMs não tivessem comportamento de ímã.

Observou-se que os valores de magnetização de saturação (M_S) aumentaram conforme a concentração molar de KOH aumentou, indicando talvez que a

quantidade de íons OH^- presente na síntese sugerisse um aumento na magnetização. No entanto, como não existem diferenças na cristalinidade e na competição de fases das duas amostras, não podemos afirmar nada nesse sentido sobre a relação com este aumento. Enquanto a concentração molar da base durante a síntese do material determina suas características estruturais, nenhum estudo conclusivo informou o mesmo sobre o caráter magnético (disposição dos spins). Além disso, vale lembrar que uma medida de histerese avalia o processo de magnetização de um material sob a influência de um campo magnético externo, sendo determinada pela orientação dos momentos magnéticos.

Os valores da magnetização de saturação foram 16,3 emu/g para a amostra de 4M e de 73,7 emu/g para a de 8M. O dobro do aumento da concentração de hidróxido de potássio aumentou drasticamente ($\approx 6,2$ vezes) a magnetização de remanência, porém manteve nulo o campo coercivo. Comparando os dois sistemas estudados, verificamos um aumento na magnetização de saturação de aproximadamente 4,5 vezes, mostrando que não há uma relação fixa proporcional entre aumento de molaridade e da magnetização de saturação. Porém, nos mostra que o uso de uma base de concentração molar maior favoreceu a formação de óxidos de ferro magnéticos (com estrutura de espinélio), amplificando as características magnéticas do material.

Para a amostra de KOH 4M o valor da M_{sat} corresponde a somente 17,7% do valor esperado. Isso pode ser explicado lembrando que ambas as amostras não são composta apenas de magnetita em sua fase pura. A presença de outras fases, como a maghemita e a goetita, faz com que o material tenha sua magnetização de saturação diminuída em função da própria distribuição dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} nos sítios octaédricos e tetraédricos [102]. Para a amostra de 8M esse valor aumenta para 80,1%, lembrando que a maior quantidade de íons hidroxila presente no meio reacional contribui para a manutenção da estrutura de espinélio, no maior equilíbrio na distribuição dos cátions, gerando um maior valor de magnetização.

Os dois sistemas apresentaram um valor menor de magnetização de saturação (M_{sat}) se comparado a magnetita *bulk* [87,88,102]. Este resultado pode ser justificado, também, considerando-se a existência de uma camada magneticamente desordenada na superfície das partículas, na qual os spins estão aleatoriamente orientados ou ainda a presença de uma camada bem fina ($\sim 1\text{nm}$) magneticamente

inativa [87]. A origem desta desordem é ainda controversa, porém alguns estudos têm associado este comportamento à presença de vacâncias, ligações rompidas e a anisotropia com intensidade e direção definida para cada sítio na superfície das partículas [103,104]. Em materiais macroscópicos este efeito não é tão pronunciado, porém, com a redução do tamanho das partículas, a relação área/volume aumenta significativamente, tornando os momentos magnéticos das camadas superficiais tão importantes quanto os momentos ordenados do interior da partícula. Geralmente as partículas sintetizadas por coprecipitação exibem estes defeitos devido às baixas temperaturas empregadas durante o processo de síntese [103,104].

B) Base fraca

O mesmo estudo foi feito com hidróxido de amônio e resultados pouco semelhantes ao anterior ocorreram, como observados na Figura 29.

À temperatura ambiente as amostras indicaram comportamento ferrimagnético, com valores de coercividade (H_C) e remanência (M_R) pouco expressivos, ou seja, neste caso, inferiores a 0,009% do valor total de magnetização.

Assim como no caso anterior, o aumento da molaridade da base aumentou a magnetização de saturação do material, porém de forma menos significativa (Tabela 10). Enquanto o KOH quase quintuplicou o valor da M_{sat} , o NH_4OH , por ser uma base mais fraca, só aumentou em 1,2 vezes esse valor. O hidróxido de amônio produziu partículas de magnetita com valor baixo de magnetização porque em solução, fornece uma quantidade menor de hidroxilas disponíveis (menor grau de dissociação) para a formação do espinélio.

Para NPMs sintetizadas a 4M o valor da M_{sat} corresponde somente a 11,8% do esperado (92emu/g) e para as sintetizadas a 8M esse resultado passou para 14,3%, mostrando que nenhuma das amostras obteve nem 20% do valor de magnetização reportado pela literatura. Como normalmente as partículas sintetizadas por coprecipitação exibem defeitos devido às baixas temperaturas empregadas durante o processo de síntese [103,104] e o K_d (constante de dissociação) é menor se comparado aos de base forte, explica-se a diminuição da magnetização das amostras quando utilizou-se o hidróxido de amônio.

Desse comparativo, é possível deduzir que a força da base e a sua concentração (OH^- disponíveis em solução) interferem nas características magnéticas do produto formado. Todavia, as curvas de histerese não inferem resultados nesse sentido, elas apenas indicam o comportamento da amostra perante uma variação de campo magnético.

Tabela 10: Valores de magnetização de saturação (M_{sat}), campo coercivo (H_c) e magnetização de remanência (M_R) das amostras de NH_4OH 4M e NH_4OH 8M

Amostra	Massa(g)	M_{sat} (emu/g)	H_c (Oe)	M_R (emu/g)
NPM-16 (NH_4OH 4M)	$0,374 \pm 0,001$	29,2	0	0,13
NPM-18 (NH_4OH 8M)	$0,256 \pm 0,001$	51,6	0,5	0,24

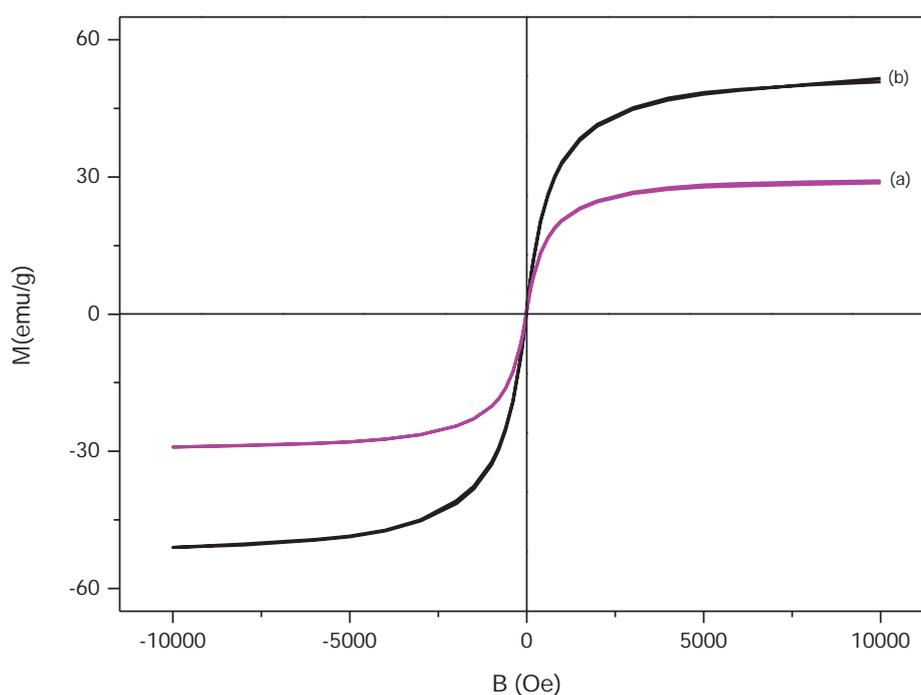


Figura 30: Curvas de magnetização dos precipitados obtidos com hidróxido de amônio: a) NPM-16 (NH_4OH 4M) e b) NPM-18 (NH_4OH 8M)

3.1.3.2 Influência do cátion formador da base

A fim de analisar a influência do tipo de base utilizada na síntese das NPMs sobre seu comportamento magnético, o gráfico da Figura 30 apresenta uma comparação entre as amostras que levaram como base os hidróxidos de sódio, potássio e amônio nas mesmas condições de síntese.

Pelas curvas de histerese observamos que as amostras inferem comportamento ferrimagnético a temperatura ambiente (298K) (Figura 30).

Pode-se observar que os valores de magnetização de saturação aumentam na ordem crescente: $M_{\text{sat}(\text{NH}_4\text{OH})} < M_{\text{sat}(\text{NaOH})} < M_{\text{sat}(\text{KOH})}$ quando as NPMs foram preparadas pelo método de coprecipitação. Síntese de NPMs pelo método hidrotérmico com irradiação contínua de microondas foi reportado na literatura, apresentando resultados diferentes: nesse caso as NPMs de NaOH exibiram valores menores de M_{sat} porque os íons Na^+ aumentam a eletropositividade da solução, evitando o contato entre os íons de ferro que poderiam afetar a formação do óxido de ferro (Fe_3O_4) [105].

Nota-se que o hidróxido de potássio é o melhor candidato para a obtenção de NPMs com valores mais altos de magnetização de saturação e é o que mais se aproxima do regime superparamagnético ao apresentar valores próximos de zero para H_C e M_R . Na comparação entre as partículas precipitadas com NH_4OH e NaOH, a primeira, apesar de apresentar o menor valor de M_{sat} , é a que tem valores de H_C e M_R mais próximos do comportamento superparamagnético (Tabela 11). Esses resultados podem ser explicados através do grau de dissociação de cada base no meio reacional.

A magnetização de saturação da amostra com KOH é aproximadamente 73,7emu/g de NPMs, correspondente a quase 80% do valor teórico da magnetita (92emu/g) [87,88]. Para a amostra com NaOH o valor da magnetização de saturação representa quase 57,7% (53,1emu/g) do esperado e para a amostra com NH_4OH o valor é 46,3% (42,6emu/g) do valor esperado.

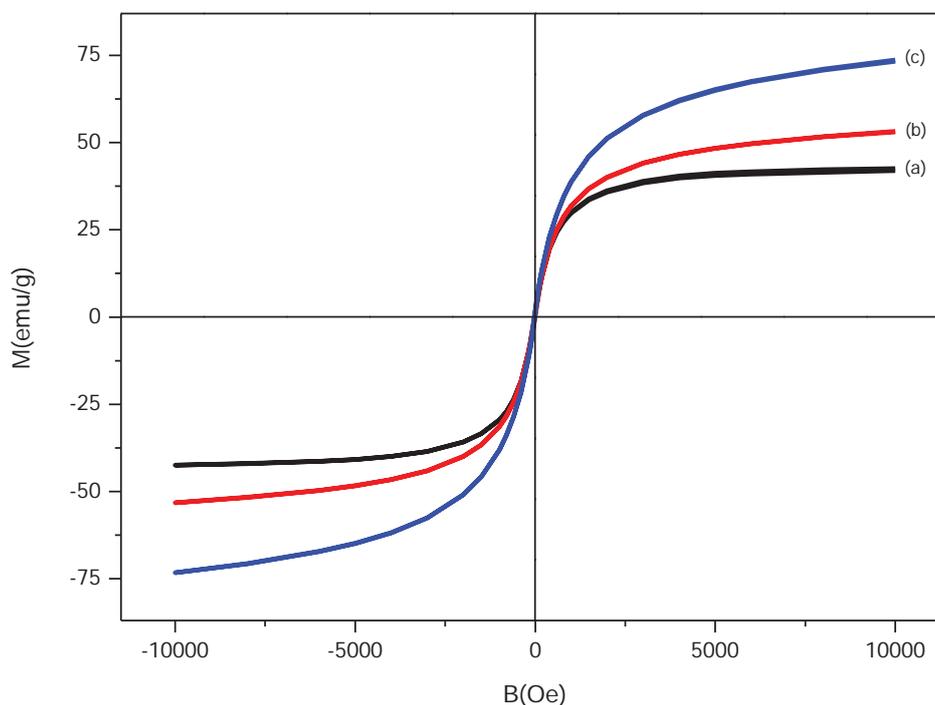


Figura 31: Curvas de magnetização dos precipitados obtidos com hidróxidos de diferentes cátions: a) NH_4OH , b) NaOH e c) KOH

Tabela 11: Valores de magnetização de saturação (M_{sat}), campo coercivo (H_c) e magnetização de remanência (M_R) das amostras NPM- NaOH , NPM- KOH e NPM- NH_4OH , todas a 8M

Amostra	Massa(g)	M_{sat} (emu/g)	H_c (Oe)	M_R (emu/g)
NH_4OH	$0,256 \pm 0,001$	51,6	5	0,24
NaOH	$0,306 \pm 0,001$	53,1	1	0,42
KOH	$0,312 \pm 0,001$	73,7	0	0,25

3.1.3.3 Influência do tipo de base

A fim de analisar a influência do tipo de base utilizada na síntese das NPMs sobre seu comportamento magnético, o gráfico da Figura 31 apresenta uma comparação entre as amostras que levaram como base os hidróxidos orgânico (DABCO-etano) e inorgânico (KOH).

Pelas curvas de histerese observamos que as todas as amostras inferem comportamento ferrimagnético a temperatura ambiente (298K).

Pode-se observar que os valores de magnetização de saturação são maiores nas NPMs sintetizadas com base inorgânica. Nota-se que a diferença na concentração molar de DABCO-etano presente na síntese influenciou os valores de magnetização, da mesma forma como ocorreu no estudo só com bases inorgânicas (Figura 31).

A magnetização de saturação da amostra com KOH é aproximadamente 73,7emu/g de NPMs, correspondente a quase 80% do valor da magnetita nanoparticulada. Para a amostra NPM-DABCO1 o valor da magnetização de saturação representa somente 5% do valor total e a amostra NPM-DABCO2 representa 3% do valor esperado. Com base nisso, nota-se uma enorme diferença nas características magnéticas dos produtos formados com base orgânica e inorgânica (Tabela 12).

Desse resultado, observa-se que a presença de DABCO na síntese das NPMs e sua incorporação na estrutura favoreceu a diminuição do valor de magnetização, ou seja, tornou o material menos impróprio para os propósitos biomédicos citados anteriormente. Apesar disso, a molécula de DABCO não alterou a estrutura de espinélio que garante as características magnéticas do material, provando que as mudanças não ocorrem nesse âmbito.

Tabela 12: Valores de magnetização de saturação (M_{sat}), campo coercivo (H_c) e magnetização de remanência (M_R) das amostras NPM-KOH, NPM-19 e NPM-20

Amostra	Massa(g)	M_{sat} (emu/g)	H_c (Oe)	M_R (emu/g)
KOH	0,312 ± 0,001	73,7	0	0,25
NPM-19 (DABCO)	0,239 ± 0,001	4,7	0,01	0,004
NPM-20 (DABCO)	0,133 ± 0,001	2,9	0,01	0,002

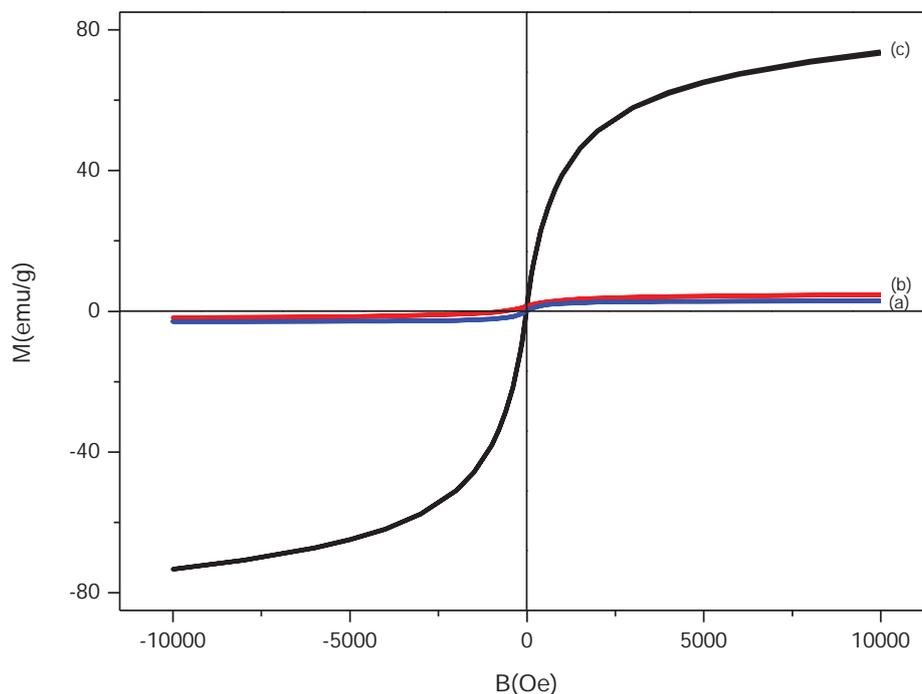


Figura 32: Curvas de magnetização dos precipitados obtidos com hidróxidos orgânico: (a) DABCO-etano 0,048M, (b) DABCO-etano 0,12M e (c) inorgânico KOH 4M

3.1.4. Potencial Zeta

Com o propósito de obter os valores de carga superficial das partículas e estudar a influência do mesmo na internalização das NPMs nas células HeLa, o potencial zeta foi medido para dois grupos distintos, como mostra a Tabela 13. No primeiro grupo as medidas foram feitas com $1\mu\text{g}$ de NPM diluídas em 1mL de água deionizada. Já o segundo grupo, para tentar simular com satisfatória eficiência as interações ocorridas *in vitro*, foram feitas com a diluição de $1\mu\text{g}$ de NPM em 1mL de meio de cultura (DMEM).

Em meio aquoso, as nanopartículas de magnetita estão hidratadas e sua superfície encontra-se completamente coberta por grupos FeOH. Estes sítios hidroxilados podem dissociar-se liberando H^+ ou OH^- , deixando a superfície carregada negativa ou positivamente:



Pelos resultados obtidos, nota-se que as NPMs sintetizadas com KOH e DABCO exibiram potencial negativo de superfície, enquanto que as NPMs sintetizadas com NH_4OH exibiram potencial superficial positivo.

Em meio de cultura celular suplementado (DMEM), as nanopartículas de magnetita estão hidratadas e também em contato direto com penicilina, estreptomicina, aminoácidos não essenciais e soro fetal bovino. Isto confere ao sistema uma configuração diferente de cargas na superfície (o pH no meio é variável), porém mais próxima do real. Pelos resultados obtidos, percebe-se que os valores do potencial zeta são todos negativos e muito próximos ($[-18,5;-15,4]$) e a condutividade se mantém constante. Comparado aos valores medidos em solução aquosa, nos quais o potencial zeta e até mesmo a condutividade não são constantes, são bem distintos dos medidos no meio biológico. De certa forma, é razoável supor que o meio de cultura estabiliza o valor da condutividade, independente do tipo de nanopartícula presente, levando a uma conseqüente estagnação do valor de potencial zeta. Assim sendo, as medidas feitas em água não fornecem a situação efetiva do que acontece *in vitro*. Supostamente a célula cria um mecanismo no qual reconhece as NPMs todas com a mesma carga de superfície, fazendo com que a posterior internalização das mesmas ocorra de formas bem equivalentes.

Tabela 13: Valores de potencial zeta e condutividade do meio

	Amostra	DMEM	Água
Potencial zeta	KOH	$-15,4 \pm 2,9$ mV	$-65,9 \pm 1,3$ mV
Condutividade		17,5 mS/cm	0,23 mS/cm
Potencial zeta	NH_4OH	$-18,5 \pm 1,4$ mV	$+28,9 \pm 1,3$ mV
Condutividade		17,5 mS/cm	0,0306 mS/cm
Potencial zeta	DABCO	$-15,8 \pm 0,5$ mV	$-30,1 \pm 0,7$ mV
Condutividade		17,4 mS/cm	0,024 mS/cm

3.2 Avaliação da citotoxicidade das NPMs *in vitro*

Apesar das críticas sobre o uso das células em cultura como modelo biológico com função fisiológica, muitas vezes, pelo fato de manterem o genoma e os mecanismos fundamentais de proliferação (mitoses), acabam representando um modelo experimental vivo considerado substituto do modelo animal, preservando primordialmente a vida e as espécies em diversas situações experimentais. Por essas e outras razões anteriormente citadas, e após validada a síntese das partículas requeridas para este trabalho, iniciou-se a etapa de aplicabilidade do material, com experimentações *in vitro* na linhagem celular HeLa. Os experimentos foram primeiramente realizados expondo a linhagem celular aos nanocompostos em diferentes concentrações pela Dr. Marília de Freitas Calmon e sua aluna Natalia Maria Candido, sob a supervisão da prof. Dr. Paula Rahal no laboratório Genoma, campus da UNESP de São José do Rio Preto. As micrografias foram todas obtidas com o prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, neste mesmo Instituto. Nessa parte do trabalho, a grande contribuição na análise e interpretação dos resultados veio da colaboração com o grupo citado.

Estes procedimentos servem no mecanismo de padronização dos experimentos que serão realizados posteriormente nas linhagens de câncer oral e nos testes *in vivo*.

3.2.1 Nanopartículas magnéticas sintetizadas com base inorgânica (KOH)

3.2.1.1 Análise da eficiência de transfecção pela coloração com Azul da Prússia

Depois de atingida a confluência de aproximadamente 80% na garrafa de cultivo celular, as células foram transferidas para as placas de microtitulação sob densidade de 2×10^5 células por poço, seguida da transfecção das nanopartículas magnéticas de acordo com o item 2.4.1. A amostra usada em todos os procedimentos biológicos deste trabalho foi a NPM-17 (KOH 8M). Posteriormente, foi realizada a coloração com Azul da Prússia e o contraste por hematoxilina-eosina (HE) como descrito no item 2.4.2.

Nas placas controle, na qual as células não foram transfectadas com NPMs, houve expansão normal da linhagem celular, como pode ser observado nas

micrografias confocais que mostram processos de divisão celular e morfologia inalterada das células (Figuras 33A e 33B).

Nas células transfectadas com diferentes concentrações de NPMs (10, 50 e 100µg/mL), foi possível observar nanopartículas no interior celular em todos os casos (Figuras 33C a 33H). As NPMs são coradas em azul devido à interação dos íons ferrocianeto do Azul da Prússia com seus próprios íons de ferro.

Na placa transfectada com 10µg/mL, as células não sofreram nenhuma alteração nos processos de divisão celular e apoptose - morte celular programada, caracterizada por um processo natural de eliminação de células (Figura 33C e 33D, respectivamente). A presença dessa quantidade de nanopartículas magnéticas não foi citotóxica.

Já nas células transfectadas com a concentração de 50µg/mL, as micrografias confocais indicam que a internalização acarretou alterações morfológicas e de desenvolvimento (Figuras 33E e 33F). Isso foi verificado pela presença de células multinucleadas que não mantiveram um desenvolvimento similar às demais células desta linhagem, tornando-se maiores e apresentando um marcado caráter proliferativo diferente do demonstrado pela placa controle e até mesmo pela placa transfectada com 10µg/mL. É possível notar também que a maioria das NPMs transfectadas posiciona-se distante da membrana e mais próximas ao núcleo, fato visível na figura 33E.

Por fim, nas células transfectadas com a concentração máxima desse estudo (100µg/mL), foi verificada a presença de vesículas hipercromáticas (aumento na concentração de DNA e na relação núcleo/citoplasma), observado na Figura 32F. Esse fato pode ser explicado devido à elevada quantidade de nanopartículas a que as células foram expostas e que, conseqüentemente, tornaram o meio tóxico e impediram que a maior parte das NPMs fossem internalizadas pelas células, excedendo sua capacidade de absorção. O aparecimento dessas vesículas sugere uma provável defesa celular em situações de estresse e toxicidade, muitas vezes devido as mudanças locais de funções proteicas ou do equilíbrio iônico [48]. Além disso, nessa concentração, a morfologia celular foi modificada, notando-se a presença de expansões globosas (*blebs*), características de sofrimento celular. É possível dizer, nesse caso, que a concentração de 100µg/mL já pode ser considerada tóxica às células.

A captação das NPMs pelas células é visto como um processo de duas etapas: primeiro ocorre a associação (ou adsorção) das nanopartículas na superfície celular através de interações eletrostáticas e, segundo, a célula as internaliza via endocitose [106,110,111]. O processo de transfecção (internalização) de nanopartículas pelas células pode acontecer por mecanismos distintos. Algumas nanopartículas realizam sua internalização por meio da invaginação da membrana, estimulação da polimerização da actina na ligação com a superfície celular [108,109,111]. Outra forma de internalização pode ser por meio de modificações no citoesqueleto, bem como mudanças nos parâmetros da cinética dos compartimentos internos pelo mecanismo ciclina-dependente ou por macropinocitose [106,107] com implicações na regulação de redes de sinalização em câncer [110] e no uso no desenvolvimento de medicamentos.

No caso das NPMs, a hipótese mais provável é a de que ocorram ligações entre as nanopartículas e a membrana plasmática e a internalização aconteça via receptores de clatrina com consequente transporte por uma organela celular, como os lisossomos [22,106-113]. É possível também que a presença do vírus HPV18 possa estar relacionada a alterações na membrana celular que acabam por facilitar ou impedir a entrada das NPMs [115]. É fato então que o sucesso da eficiência da transfecção das NPMs tornou-se um passo imprescindível para averiguar seus efeitos *in vitro*.

Para a realização da contagem das células, antes da transfecção foi utilizado o corante Azul de Tripán, substância internalizada apenas em células com membranas permeabilizadas (inviáveis), não sendo tóxico em concentrações até 0,3% [116]. Após entrar na célula, ele atravessa o invólucro nuclear e acaba por se localizar nos núcleos que ficam corados de azul, possibilitando a distinção das células endoteliais inviáveis e viáveis passíveis de manuseio experimental [106,116,117]. Após a realização da transfecção das NPMs na linhagem HeLa, sua eficiência foi avaliada por meio de microscopia óptica, bem como foram feitas análises qualitativas da morfologia celular a partir da coloração Azul da Prússia, utilizada a fim de localizar o óxido de ferro (magnetita) intracelular. Como contraste foi empregado a combinação de corantes Hematoxilina-eosina, destacando o núcleo basófilo corado pela hematoxilina do citoplasma eosinófilo e seus compartimentos corados pela eosina [118].

A partir das imagens por microscopia, pôde-se afirmar que as concentrações de 10 e 50µg/mL de NPMs apresentaram boa eficiência no processo de transfecção, sem alterações no perfil de desenvolvimento e morte celular da linhagem. Essas análises ainda puderam confirmar que o aumento da quantidade de nanopartículas disponíveis no meio de cultura é diretamente proporcional à sua taxa de internalização pelas células, mesmo quando há a formação de aglomerados devido ao seu caráter magnético [48], que acarreta um aumento de diâmetro e impossibilita sua total passagem pelo filtro de 0,22mm utilizado no procedimento da transfecção.

É provável que essas adversidades no processo de transfecção não fossem observadas caso se utilizasse um agente de transfecção, como a lipoctamina ou o sulfato de protamina para facilitar a absorção e a internalização das NPMs pelas células [106,108,112,113]. Apesar disso, ficou provado pelos experimentos que o uso desse tipo de agente não foi imprescindível no processo da transfecção, ele apenas aumentaria a eficiência do processo.

Pode-se concluir, portanto, que os efeitos diretos causados pelas NPMs dependem da concentração de nanopartículas internalizadas pelas células. Vale mencionar que as principais alterações ocasionadas com o aumento da concentração de NPMs são: a condensação celular, a presença de vesículas contendo material acidófilo no citoplasma, acúmulo de material filamentososo, agregação celular, diminuição do número de células aderidas e ocorrência de “*blebs*” na superfície celular, sugerindo sofrimento celular [106,108].

Após o processo de transfecção comparada, com investigação sobre o caráter morfológico e de desenvolvimento celular, uma análise foi feita com 500 células para quantificar a eficiência da transfecção das nanopartículas na linhagem celular. Esta análise, feita em duplicata, revelou o que já fazia lógica: o aumento da quantidade de NPMs disponíveis para o processo de transfecção foi diretamente proporcional à taxa de internalização pelas células (Tabela 14). A eficiência passou de 44% a 50% e finalmente a 74% conforme as concentrações de NPMs foram elevadas de 10 a 50 e por fim a 100µg/mL, respectivamente (Figura 34). Este fato confirma que esta linhagem celular é capaz de internalizar NPMs de maneira mais eficaz conforme a concentração das partículas é aumentada. No entanto, nenhum estudo foi realizado para avaliarmos a concentração máxima de NPMs suportadas

pelas células HeLa. No geral, os experimentos de transfecção foram bem sucedidos para as concentrações avaliadas.

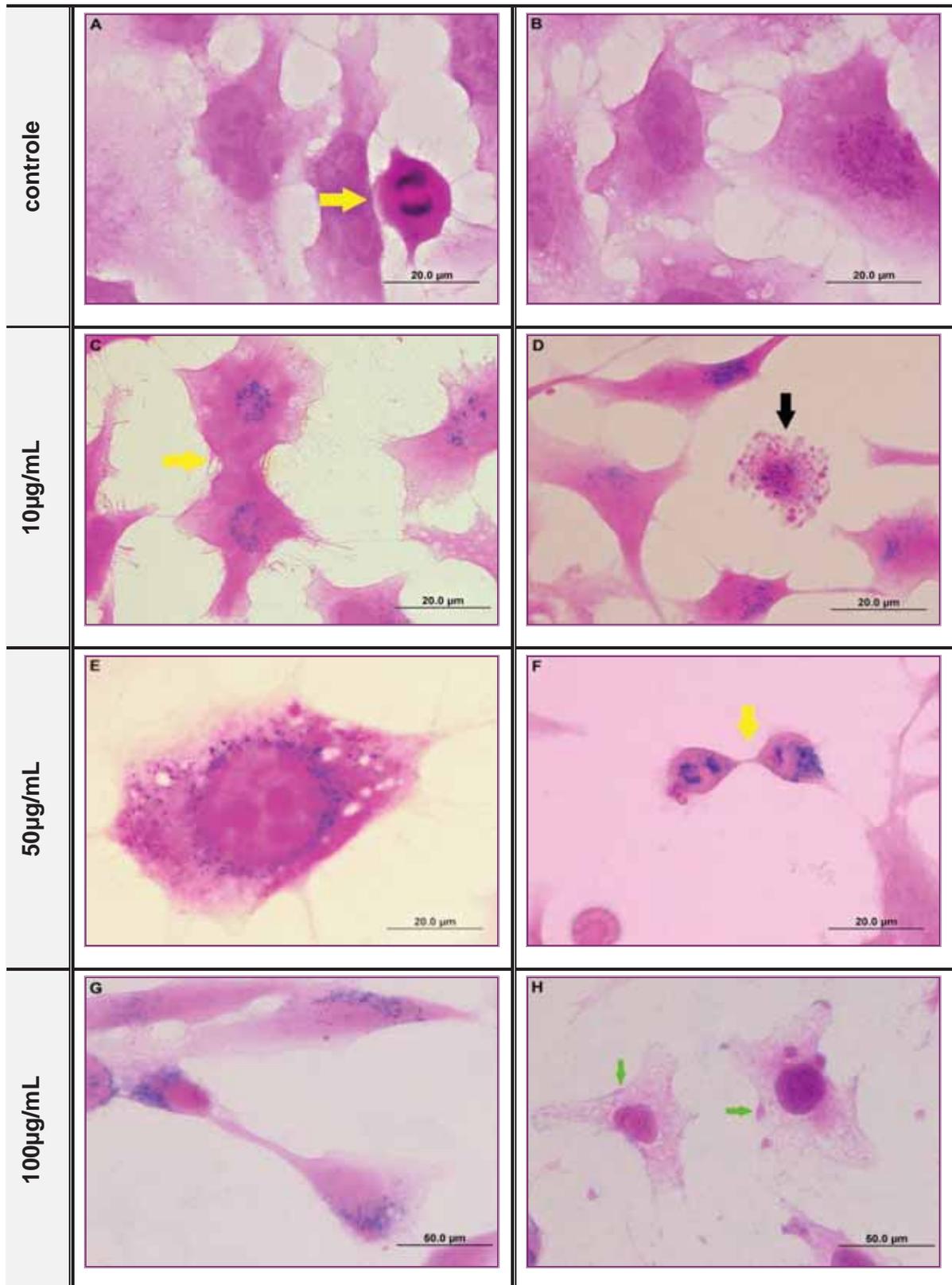


Figura 33: Imagens de microscopia óptica da linhagem celular HeLa em meio DMEM coradas com Azul da Prússia e HE sob aumento de 400x: (a,b) na ausência de NPMs – placa controle; (c,d) transfectadas com 10 μg/mL de NPMs; (e,f) com 50 μg/mL e (g,h) com 100 μg/mL. Setas amarelas: células em processo de divisão. Seta preta: célula em processo apoptótico. Seta verde: vesículas hiper cromáticas.

Tabela 14: Contagem das nanopartículas magnéticas no processo de transfecção

Concentração (µg/mL)	Num. células positivas/500 células	Média	Desvio padrão
10	222	220,5	2,12
10	219		
50	258	251	9,89
50	244		
100	399	370	41,01
100	341		

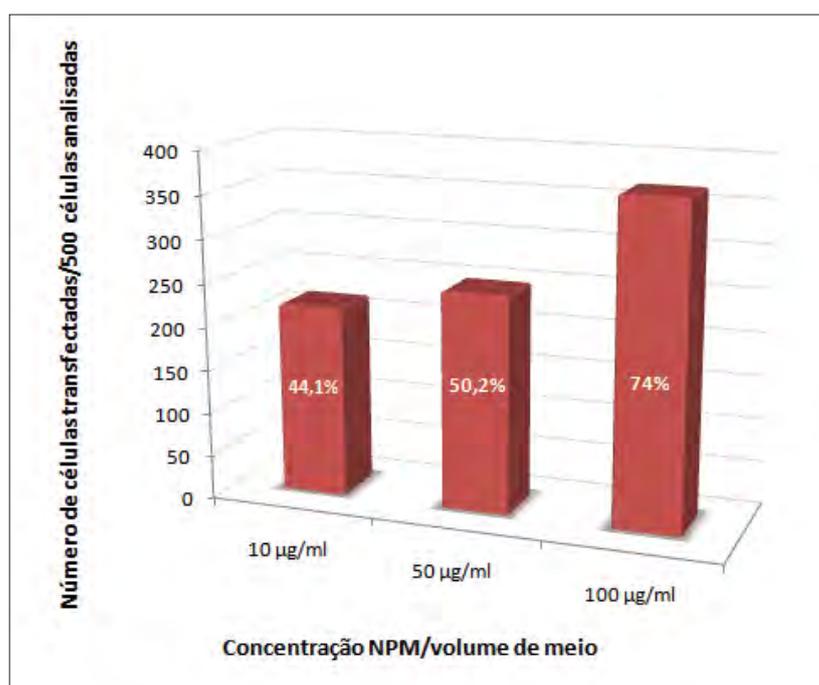


Figura 34: Eficiência da transfecção das nanopartículas magnéticas nas concentrações de 10, 50 e 100µg/mL de meio de cultura DMEM na linhagem celular de câncer cervical HeLa.

3.2.1.2 Ensaio de apoptose

Depois das análises sobre o processo de transfecção, as culturas de célula HeLa foram investigadas quanto ao seu perfil de morte celular programada (apoptose). Os mesmos procedimentos e condições da transfecção foram mantidos para esse estudo.

O processo de apoptose possui papel importante durante os processos de diferenciação, crescimento e desenvolvimento dos tecidos adultos normais e alterados. No âmbito fisiológico, a apoptose é um dos fenômenos participantes ativos da homeostase, no controle do equilíbrio entre a taxa de proliferação e morte celular, ajudando na manutenção do tamanho dos tecidos e órgãos - a perda deste equilíbrio promove o aparecimento de lesões proliferativas e atróficas [119,120]. As mudanças morfológicas que definem a apoptose são a picnose (condensação da cromatina) e a cariorrexia (fragmentação nuclear) [120].

As análises para detecção e quantificação de células em apoptose foram realizadas por meio de parâmetros de cor, aspecto morfológico do núcleo e condensação e fragmentação da cromatina. O teste utilizou alaranjado de acridina (AA), corante seletivo para ácidos nucleicos empregado na avaliação da viabilidade endotelial, bem como o corante Azul de Tripán (AT). O AA penetra e identifica células apoptóticas ligando-se ao RNA e DNA unicatenário corando-os de laranja e ao DNA bicatenário contrastando-o de verde. Já o corante AT penetra somente nas células não viáveis com alterações de membrana. Pela observação das micrografias, células vivas e sadias possuem núcleo uniforme corado de verde e células em fase inicial de apoptose apresentam membrana intacta, porém o núcleo não está corado uniformemente de verde devido a condensações de cromatina, clivagem do DNA ou fragmentação nuclear [121]. Por fim, células em processo avançado de apoptose apresentam condensação da cromatina, presença de corpos apoptóticos e perda da integridade da membrana [122].

Na placa controle foi observado processo de apoptose, resultado de um mecanismo natural de reciclagem celular (Figura 34A e 34B). Além disso, não foi visualizada alteração no desenvolvimento das células, e conseqüentemente, elas se dividiram e morreram de acordo com condições semelhantes às de manutenção e expansão da linhagem celular em condições normais.

As células transfectadas com diferentes concentrações de NPMs demonstraram mudanças morfológicas características de células apoptóticas, como arredondamento celular, formação de bolhas na membrana e fragmentação do núcleo em corpos apoptóticos (Figuras 35C a 35H).

Mais especificamente, quando administrada a maior concentração de NPMs (100µg/mL), foram observadas alterações na coloração do citoplasma e a formação

de vesículas hipercromáticas, provavelmente devido ao aumento da citotoxicidade do meio celular combinado à elevada quantidade de nanopartículas [106] (Figuras 35G e 35H).

Foi possível inferir também que os índices de apoptose aumentaram gradualmente de maneira dose-dependente, corroborando com o resultado observado nos testes da eficiência de transfecção [98]. O aumento da taxa de apoptose pôde ser observado pelo fato das células terem se desprendido dos poços da placa de microtitulação e terem ficado boiando no meio de cultura no momento da realização da análise, aumentando a área vazia, na qual deveriam estar as células viáveis aderidas nas lamínulas [106].

O estudo da apoptose é importante, visto que esse fenômeno pode ser desencadeado por fatores presentes ou ausentes no meio de cultura, como hormônios, toxinas, ausência de fatores de crescimento ou agentes quimioterápicos. Assim, ao analisarmos o progresso da apoptose, podemos corrigir a cultura celular no sentido de induzir ou amenizar esse ciclo.

Dessa forma, é interessante que os materiais nanoparticulados em estudo tenham seus efeitos voltados para a indução de apoptose, uma vez que agentes antineoplásicos com grande potencial de indução de apoptose combinado à mínima toxicidade para as células normais são requeridos para utilização no diagnóstico e tratamento de patologias como o câncer [122].

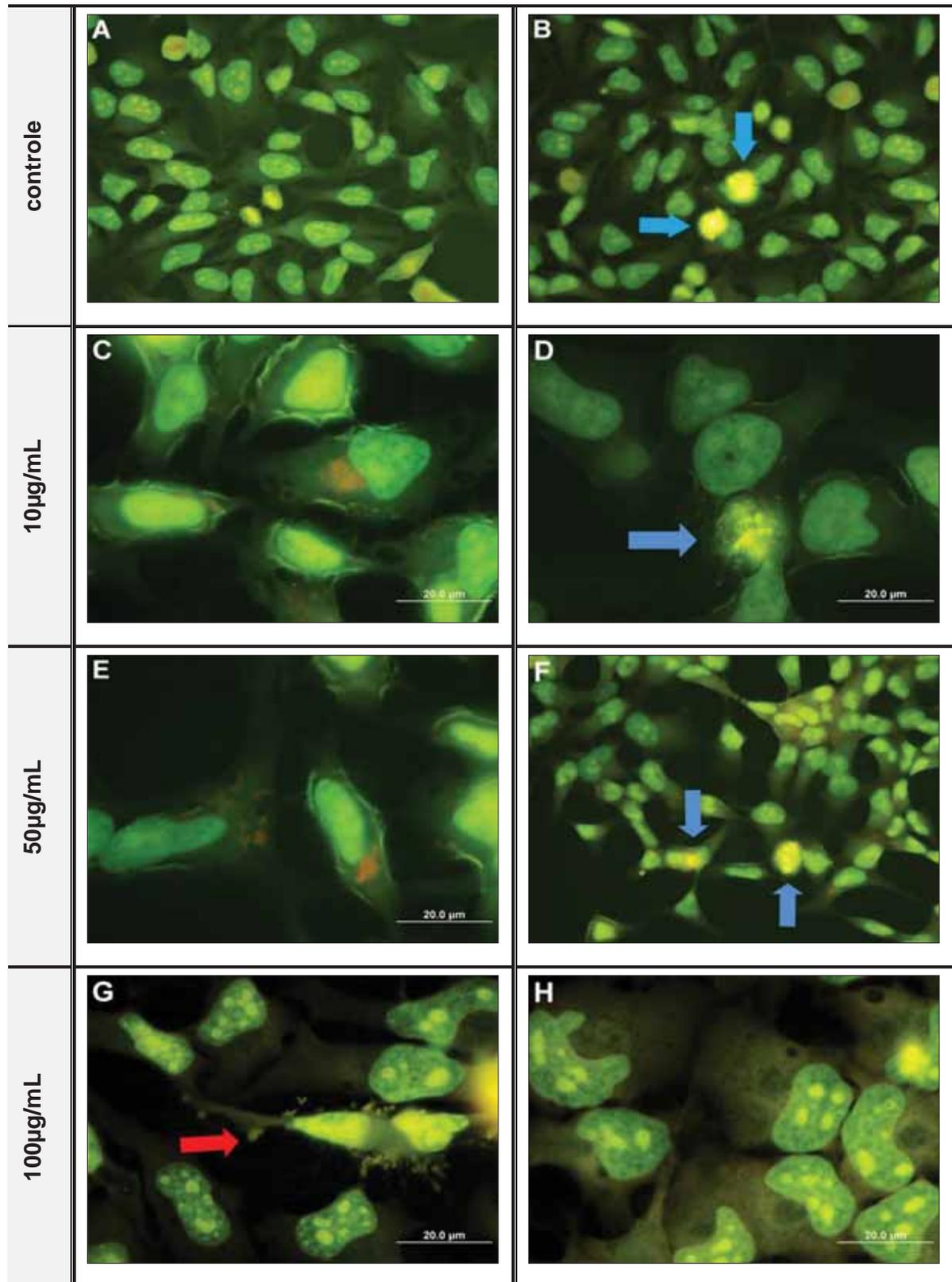


Figura 35: Fotomicrografias do ensaio de apoptose e das mudanças morfológicas das células HeLa coradas com Laranja de acridina e Alumen férrico, sob aumento de 400x em microscópio de fluorescência: (a,b) na ausência de NPMs; (c,d) transfetadas com 10µg/mL de NPMs; (e,f) com 50µg/mL e (g,h) com 100µg/mL. Setas azuis: corpos apoptóticos. Seta vermelha: vesícula hiper cromática.

3.2.1.3 Ensaio MTT

O ensaio MTT foi usado para quantificar metabolicamente as células viáveis após a transfecção das nanopartículas magnéticas. Nele, a absorbância da solução colorimétrica (MTT amarelo reduzido a formazan roxo nas mitocôndrias das células viáveis) foi quantificada pela medição em comprimento de onda de 570nm por um leitor de ELISA (espectrofotômetro). Tal redução ocorre somente quando enzimas redutases mitocondriais estão ativas e, portanto, a conversão pode ser diretamente relacionada ao número de células viáveis [123].

Foram semeadas células HeLa numa densidade de 1.10^4 por poço, transfectadas NPMs como descrito no item 2.4.1 e empregada a metodologia do ensaio MTT como descrito no item 2.4.3.

No controle do experimento, no qual NPMs não foram transfectadas, observou-se que a linhagem se proliferou normalmente, sendo a quantidade de células em processo de divisão celular foi superior a taxa de mortalidade das mesmas. Os valores médios de leitura foram 0,5383 nas primeiras 24 horas após a transfecção, 0,637 após 48 horas com troca do meio de cultura e 0,647 após 48 horas sem troca de meio (Tabela 15). O meio de cultura foi trocado porque as células competem pelos nutrientes presentes no meio e morrem por causa disso. No entanto, a análise demonstrou que nessa linhagem esse não foi um fator determinante, uma vez que os valores medidos com e sem troca do meio foram muito próximos.

Nas placas transfectadas com as três diferentes concentrações de NPMs ocorreu diminuição nos valores das leituras, no entanto, não houve variação significativa entre as viabilidades celulares obtidas nas triplicatas, dado observado pelos desvios padrões (DP) inferiores a 0,067. O experimento torna-se então confiável, uma vez que após o teste T-student apenas valores menores do que 0,01 são bastante significativos (Anexo 2).

Quando observada a taxa de viabilidade em relação ao controle (Tabela 16), nota-se que ocorreu diminuição do número de células viáveis conforme a concentração de NPMs aumentava, corroborando os resultados anteriores sobre a especulação do fator dose-dependente tanto para a transfecção quanto para a apoptose e agora para ensaio de MTT. Somado a isso, pode-se observar também que a viabilidade celular diminui a medida que o tempo de exposição às NPMs

aumentou. A viabilidade variou de 67% para 38% na concentração de 10µg/mL, de 53% para 50% na de 50µg/mL e de 40% para 38% na de 100µg/mL (Tabela 15).

As figuras 36 e 37, que ilustram a exposição das células HeLa com as diferentes concentrações de NPMs, mostram a supressão da proliferação celular de maneira dose dependente – quanto maior a quantidade de nanopartículas disponíveis no meio, menor a viabilidade celular. Não foram verificadas mudanças significativas quanto a troca ou não do meio de cultura transcorridas 48 horas da transfecção de NPMs, mostrando que não ocorreu alteração mitocondrial da linhagem celular [106]. Conclui-se que o meio de cultura com as NPMs não internalizadas pelas células não teve influência na toxicidade e conseqüentemente na viabilidade celular, descartando a possibilidade desse fator ter contribuído nas alterações celulares. Além disso, essa análise confirmou a hipótese de que as NPMs que deveriam ser internalizadas pelas células já haviam sido após 24 horas da transfecção [107].

Maiores danos ao DNA em células transfectadas com NPMs podem estar relacionados a efeitos de oxidação das nanopartículas por falta de revestimento: o MTT foi aplicado em todas as amostras e os resultados confirmam isto no meio de cultura DMEM. Dessa forma, o passo seguinte de aperfeiçoamento de síntese de NPMs para aplicações biomédicas é investigar o revestimento mais útil para os propósitos que queremos, já que a avaliação do perfil citotóxico das nanopartículas demonstrou grande eficiência.

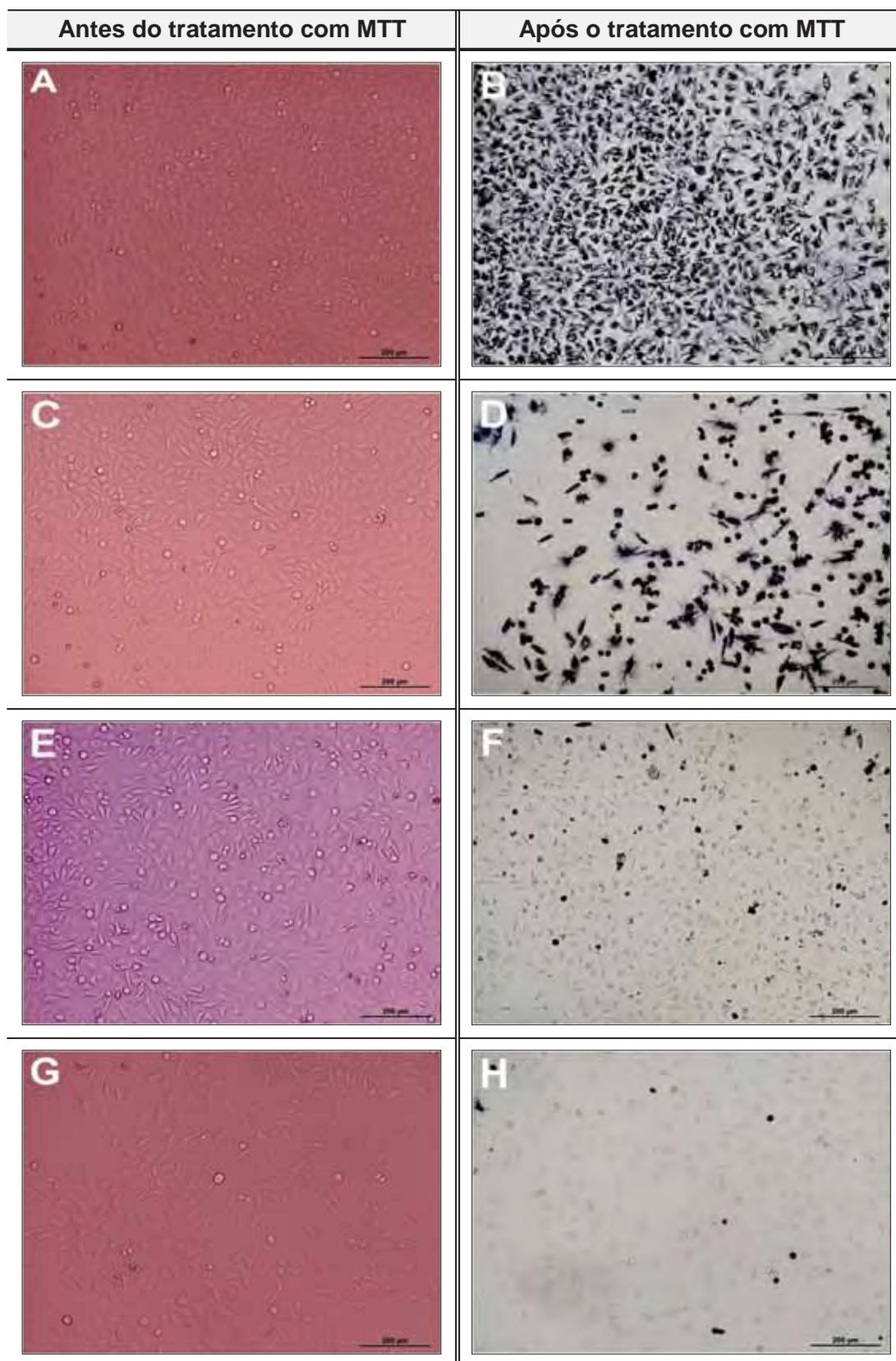


Figura 36: Microscopia óptica de células HeLa: (a) na ausência de NPMs; (c) na concentração de $10\mu\text{g/mL}$; (e) $50\mu\text{g/mL}$ e (g) $100\mu\text{g/mL}$ em meio de cultura DMEM antes do tratamento com MTT; (b,d,f,h) ausência, 10, 50 e $100\mu\text{g/mL}$ respectivamente, depois do tratamento com MTT. Todas as imagens estão sob aumento de 100x. Barra de medida: $200\mu\text{m}$.

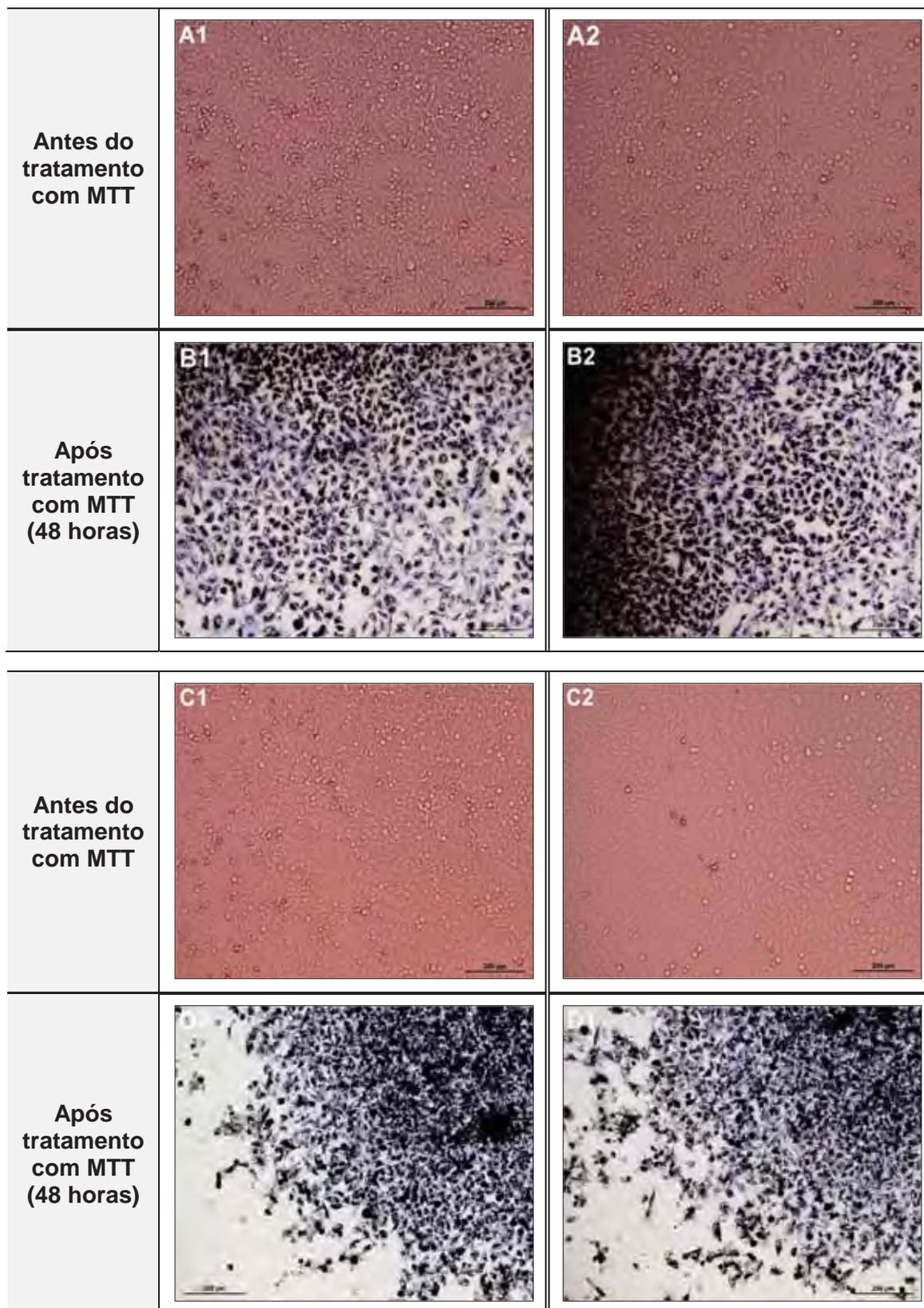


Figura 37: Microscopia óptica de células HeLa: (a1,a2) na ausência de NPMs; (c1,c2) na concentração de 10; (e1,e2) 50 e (g1,g2) 100µg/mL em meio de cultura DMEM antes do tratamento com MTT; (b1,b2,d1,d2,f1,f2,h1,h2) ausência, 10, 50 e 100µg/mL respectivamente, depois de 48 horas do tratamento com MTT. Todas as imagens estão sob aumento de 100x. Barra de medida: 200µm.

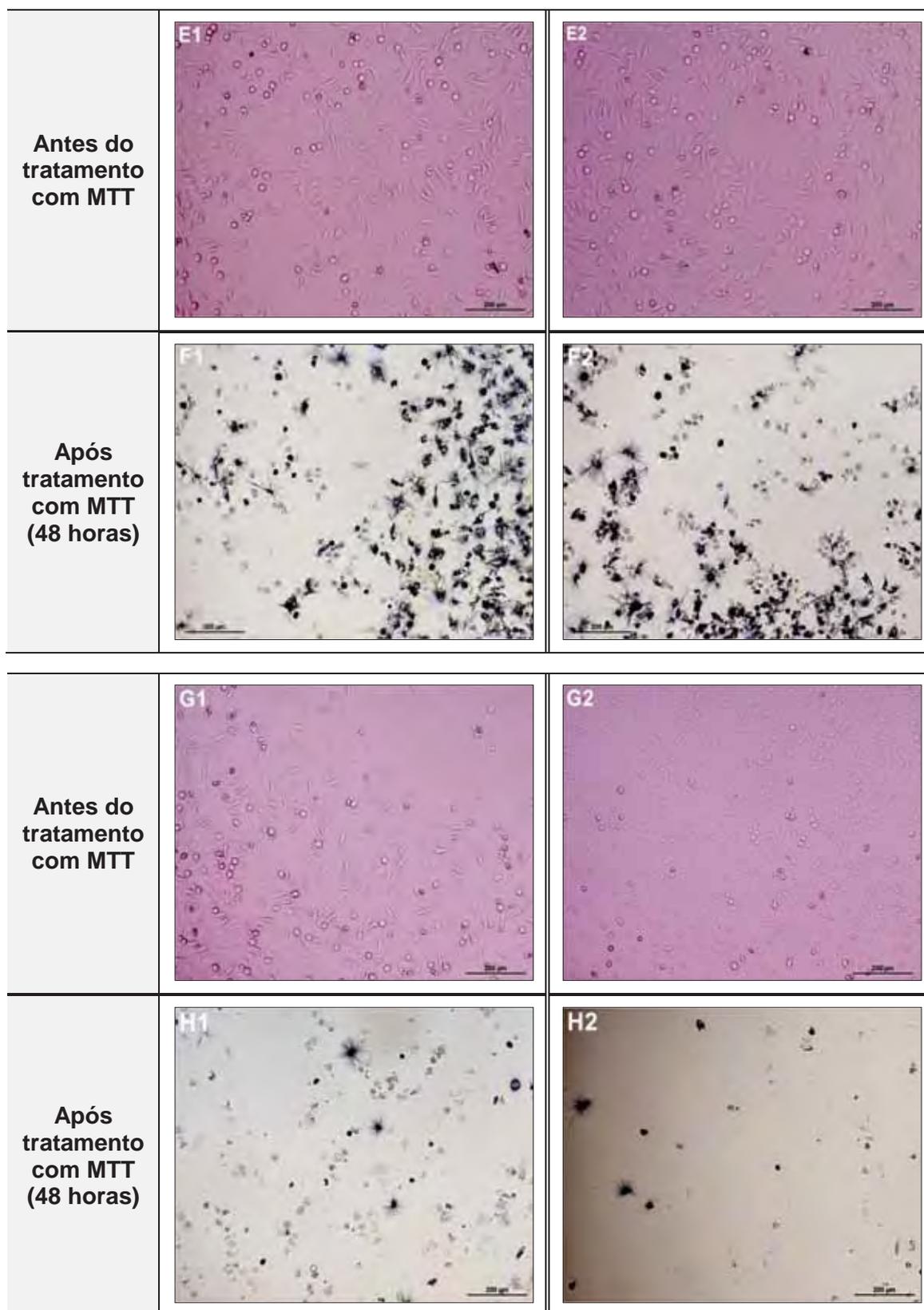


Figura 37: Microscopia óptica de células HeLa: (a1,a2) na ausência de NPMs; (c1,c2) na concentração de 10; (e1,e2) 50 e (g1,g2) 100µg/mL em meio de cultura DMEM antes do tratamento com MTT; (b1,b2,d1,d2,f1,f2,h1,h2) ausência, 10, 50 e 100µg/mL respectivamente, depois de 48 horas do tratamento com MTT. Todas as imagens estão sob aumento de 100x. Barra de medida: 200µm.

Tabela 15. Valores, média e desvio padrão obtidos a partir dos experimentos realizados com células HeLa após transfecção com NPMs a diferentes concentrações durante 24 e 48 horas, com e sem troca do meio de cultura (DMEM)

	48 horas									
	Com troca de meio					Sem troca de meio				
	Valores			Média	DP	Valores			Média	DP
Controle	0,515	0,575	0,601	0,563	0,0441	0,637	0,672	0,632	0,647	0,0218
10µg/mL	0,180	0,271	0,251	0,234	0,0478	0,277	0,233	0,233	0,2310	0,0034
50µg/mL	0,291	0,251	0,273	0,271	0,0200	0,290	0,321	0,354	0,3217	0,0320
100µg/mL	0,246	0,235	0,213	0,231	0,0168	0,217	0,254	0,260	0,2437	0,0230

Tabela 16. Efeito das NPMs no crescimento de células HeLa visualizado pela taxa de viabilidade celular após exposição a diferentes concentrações e por diferentes períodos de tempo, com troca e sem troca do meio de cultura DMEM após transcorridas 24 horas da transfecção.

	24 horas	48 horas	
		Com troca de meio	Sem troca de meio
10µg/mL	66,6%	41,5%	35,7%
50µg/mL	53,4%	48,2%	49,7%
100µg/mL	40,4%	41%	37,6%

3.2.1 Nanopartículas magnéticas sintetizadas com base orgânica (DABCO)

3.2.2.1 Análise da eficiência de transfecção pela coloração com Azul da Prússia

Depois de atingida a confluência de aproximadamente 80% na garrafa de cultivo celular, as células foram transferidas para as placas de microtitulação sob densidade de 2×10^5 células por poço, seguida da transfecção das nanopartículas magnéticas sintetizadas com DABCO de acordo com o item 2.4.1. Posteriormente,

foi realizada a coloração com Azul da Prússia e o contraste por hematoxilina-eosina (HE) como descrito no item 2.4.2.

Nas placas controle, na qual as células não foram transfectadas com NPM-DABCO, houve expansão normal da linhagem celular, como pode ser observado nas micrografias confocais que mostram processos de divisão celular, apoptose e morfologia inalterada das células (Figuras 38A e 38B).

Nas células transfectadas com diferentes concentrações de NPMs (10, 50 e 100µg/mL), não foi possível observar grande quantidade de nanopartículas no interior celular (Figuras 38C a 38G). O mais comum foi observar as NPM-DABCO dispersas no meio de cultura. Este fato pode estar relacionado com o valor de potencial zeta encontrado, que sugeriu uma baixa eficiência de internalização.

Nas células transfectadas com a concentração de 50µg/mL, as micrografias confocais indicam que a baixa internalização acarretou alterações morfológicas e de desenvolvimento (Figuras 38E e 38F). Isso foi verificado pela presença de células multinucleadas que não mantiveram um desenvolvimento similar às demais células desta linhagem, tornando-se maiores e apresentando um marcado caráter proliferativo diferente do demonstrado pela placa controle.

Por fim, nas células transfectadas com a concentração máxima desse estudo (100µg/mL), foi verificado que a maioria das NPM-DABCO não foram internalizadas pelas células, mantendo-se dispersas no meio de cultura. Nessa concentração também ocorreu a formação de aglomerados de NPMs (*cluster*) devido a interação entre as partículas (Figura 38H).

Para tentar explicar a pouca eficiência na internalização das NPM-DABCO pelas células HeLa devemos lembrar que o processo de transfecção celular é mediado por diversos parâmetros. Cada linhagem celular demonstra uma susceptibilidade diferenciada para endocitar os mais variados compostos [48,124]. A endocitose regula a sinalização dos eventos que envolvem a motilidade celular e a determinação do destino das estruturas internalizadas. A internalização das nanopartículas em geral é um processo influenciado por propriedades físico-químicas, tais como diâmetro médio, morfologia, revestimento, solubilidade e carga elétrica que elas apresentam [125-127]. Baseado no fato de que os parâmetros de síntese das NPMs com base orgânica e inorgânica foram os mesmos e que a caracterização físico-química demonstrou diâmetros e morfologias extremamente

parecidos, duas possíveis explicações seriam a carga elétrica superficial das NPMs ou a pouca magnetização exibidas por essas nanopartículas.

É comprovado que as células podem apresentar a habilidade de definir a identidade eletrostática das nanopartículas magnéticas: a interação eletrostática entre a NPM carregada positivamente e a membrana plasmática carregada negativamente é decisiva na internalização das nanopartículas nas células [128,129] e que as NPMs com potencial de superfície negativo demonstram alta afinidade por sítios catiônicos na superfície celular.

De modo geral, as NPMs de óxidos de ferro, como a magnetita, estão frequentemente carregadas negativamente – excesso de íons hidroxila na superfície – e por isso, quando dispersas no meio de cultura, estão susceptíveis a adsorção protéica, sendo passíveis de internalização pelas células. A carga superficial total das partículas é uma das propriedades que mais influenciam a biocompatibilidade e a capacidade das NPMs de ultrapassarem algumas das barreiras físicas (internalização) [130].

No caso das NPMs sintetizadas com DABCO, mesmo após a troca iônica, a base continuou carregada positivamente devido a cadeia orgânica, e dessa forma a transfecção tornou-se dificultada. Além disso, a magnetização dessas partículas é tão baixa comparada às NPMs sintetizadas com base inorgânica que podemos imaginar que essa diferença tenha tido influência no processo de internalização. O ideal para situações como essa é usar um agente de transfecção que facilite e aumente a eficiência da internalização das NPMs pelas células.

Assim, o conhecimento do comportamento das nanopartículas quando interagem com as células é uma etapa importante para o desenvolvimento de novas aplicações biomédicas e para a avaliação de sua eficiência.

De acordo com os resultados da transfecção, partiu-se do princípio que esse tipo de nanomaterial não serve para os propósitos desse trabalho pelo fato de não ter tido significativa eficiência na internalização e por isso, os testes biológicos seguintes não foram realizados. Nossa proposta se baseia no fato das nanopartículas serem internalizadas pelas células para eventuais aplicações no tratamento de câncer por hipertermia ou ainda como agente de contraste para IRM. Caso o material não obedeça ao primeiro pré-requisito (eficiência na transfecção), podemos descartá-lo por hora, retomando seus estudos num próximo momento.

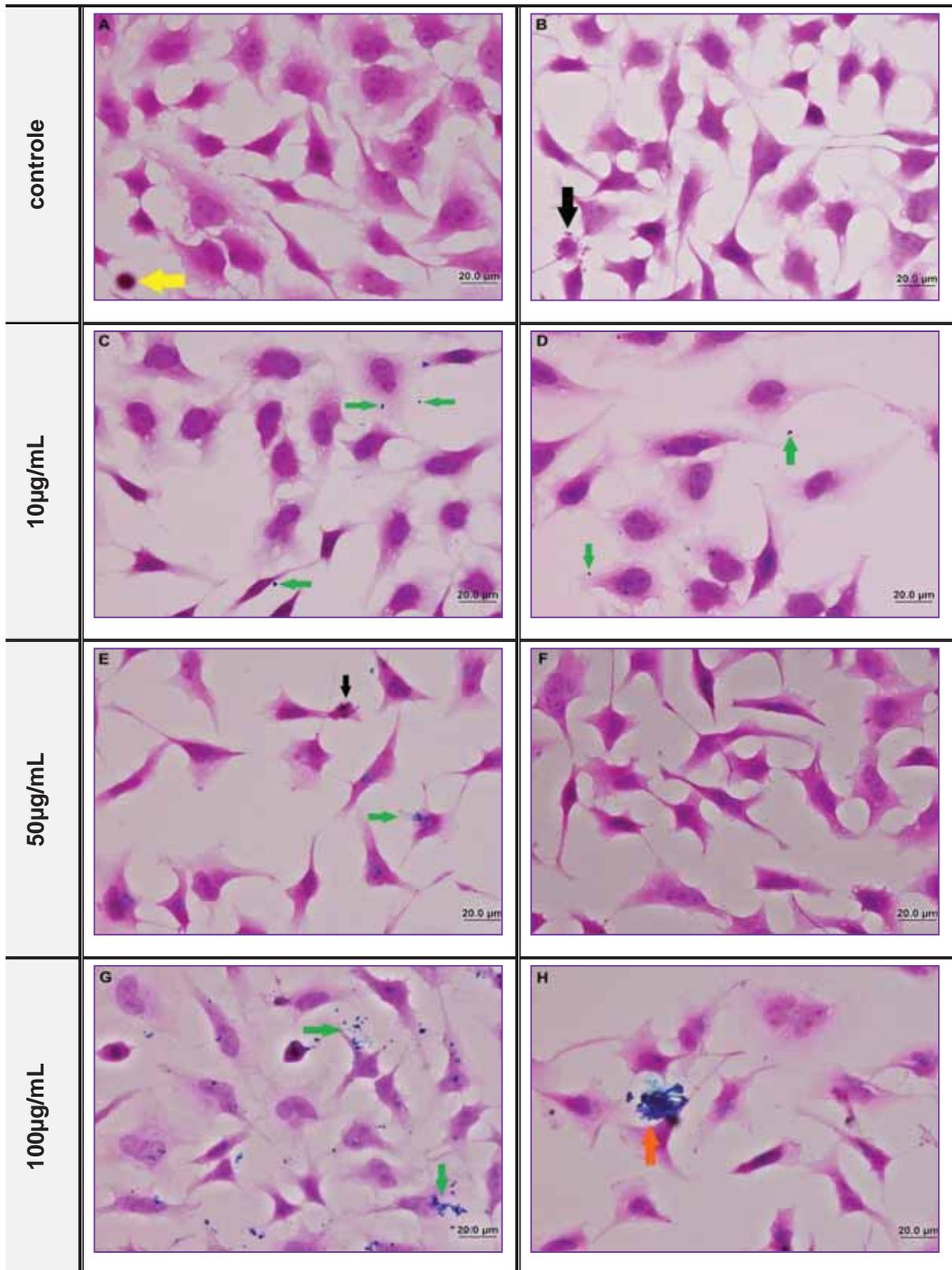


Figura 38: Imagens de microscopia óptica da linhagem celular HeLa em meio DMEM coradas com Azul da Prússia e HE sob aumento de 400x: (a,b) na ausência de NPM-DABCO – placa controle; (c,d) transfetadas com 10 μg/mL de NPM-DABCO; (e,f) com 50 μg/mL e (g,h) com 100 μg/mL. Setas amarelas: células em processo de divisão. Seta preta: célula em processo apoptótico. Seta verde: NPM-DABCO não internalizadas. Seta laranja: formação de *cluster* de NPMs.

Capítulo 4 – Conclusões Gerais

4.1 Conclusões Gerais

Com a intenção de produzir um material que atenda às aplicações biomédicas descritas no Capítulo 1, as nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas com considerável sucesso.

A natureza do óxido de ferro (Fe_3O_4) foi confirmada através da identificação dos picos de difração na análise de DRX. De forma geral, pode-se considerar que os produtos formados são cristalinos e constituem-se majoritariamente de magnetita. As outras fases encontradas (fases competitivas e/ou impurezas) foram marcadas e discutidas segundo os parâmetros estudados. As medidas dos diâmetros médios das nanopartículas foram conseguidas através do método de Debye-Scherrer, encontrando como resultados valores médios acima de 70nm para quase todos os estudos, corroborando com os resultados obtidos pelas microscopias eletrônicas de varredura (MEV). Com este resultado sinalizamos a necessidade de aperfeiçoamento da síntese no sentido de obtenção de partículas menores. Isto será conseguido, principalmente, com o aumento da rotação (acima de 2000 rpm) utilizada durante a coprecipitação através da montagem de um reator com esta especificação. No entanto, no processo de coprecipitação deve-se atentar ao fato de que quanto maior a agitação menor o diâmetro das partículas e, portanto, maior a energia superficial das mesmas, favorecendo a aglomeração. Pensando no conjunto das influências, com a otimização das condições de síntese, as partículas terão diâmetro menor, porém deverão ser revestidas com algum biopolímero.

As microscopias eletrônicas além do tamanho médio permitiram fazer uma análise morfológica do material, confirmando a forma esférica esperada das nanopartículas.

As medidas de magnetização mostraram o caráter ferrimagnético das amostras sintetizadas com qualquer dos parâmetros. Elas indicaram também que as nanopartículas obtidas tendem ao regime superparamagnético, porque apresentam valores quase desprezíveis de campo coercivo (H_c) e magnetização remanente (M_r). A expectativa de se alcançar as características superparamagnéticas também se encontra no fato de aumentarmos a agitação da solução e conseqüentemente

obtermos partículas menores, pois o superparamagnetismo só ocorre quando as NPMs possuem diâmetro médio abaixo de seu diâmetro crítico (~25 nm). Na comparação entre a magnetização das NPMs sintetizadas com bases inorgânicas (KOH, NaOH, NH₄OH) e com base orgânica (DABCO) notou-se uma redução no valor. No entanto, essa redução não se torna um impedimento para a aplicação dessas nanopartículas. Ao contrário, pois os valores de coercividade quase nulos e os consideráveis valores de magnetização fazem das NPMs boas candidatas para uso em bioaplicações, uma vez que podem ser aplicadas em doses menores ao paciente. Além disso, a não retenção de magnetização após a retirada do campo magnético aplicado é essencial para evitar a formação de aglomerados (*clusters*) e, assim, contribuir para a estabilidade das amostras.

Da observação das medidas de potencial zeta, tanto em meio aquoso quanto em meio de cultura, como já se era esperado, as NPMs sintetizadas com KOH exibiram a melhor eficiência de transfecção. Quando analisadas em meio aquoso, as NPMs-KOH obtiveram o valor mais alto de potencial zeta (PZ), o que garante ao sistema excelente estabilidade eletrostática.

Desse apanhado de resultados, conclui-se que pelos parâmetros estudados podemos observar que as melhores condições de síntese para o método de coprecipitação são conseguidas através da temperatura de síntese abaixo de 70°C, uma vez que acima desta temperatura a formação de magnetita pode ser prejudicada, obtendo-se produtos com menor grau de pureza; agitação o mais vigorosa possível; concentração molar da base em 8M, sendo o KOH a mais eficiente e pH ajustado no intervalo entre 9 e 11. Os demais parâmetros estudados pouco afetaram as características físico-químicas das NPMs sob as condições de síntese desse trabalho.

Num segundo momento, quando as NPMs passaram a ser testadas *in vitro*, os resultados foram bem promissores, visto que o grau de citotoxicidade foi relativamente baixo e a eficiência de transfecção foi relativamente alta, confirmando a biocompatibilidade. Esses resultados são passíveis de melhora, uma vez que o recobrimento das NPMs por um material biologicamente compatível diminuirá ainda mais a toxicidade intracelular e o uso de um agente de transfecção aumentará a eficiência da internalização das partículas pelas células (é até possível que as NPMs sintetizadas com DABCO sejam internalizadas). Outra característica importante é

atentarmos ao fato de que os resultados são dose-dependentes, ou seja, quanto maior a concentração de NPMs, maior a internalização, porém maior a toxicidade.

Apesar das dificuldades encontradas durante a realização desse trabalho, pode-se, através dos resultados obtidos, concluir que o material apresenta potencial para aplicações biomédicas (biocompatibilidade), gerando ótimas perspectivas para o futuro. Com o aprimoramento dos métodos de produção e análises mais sofisticadas e específicas de caracterização do material, espera-se que as nanopartículas magnéticas possam representar o futuro dos sistemas de liberação de fármacos, tratamento do câncer por hipertermia, como agente de contraste para IRM, entre tantas outras finalidades.

4.2 Proposições Futuras

Com o objetivo de se utilizar, de fato, as nanopartículas magnéticas sintetizadas em aplicações biomédicas, faz-se necessário aprofundar os conhecimentos sobre o processo de síntese e seu comportamento *in vitro* e *in vivo*. Espera-se que esta dissertação forneça as ferramentas iniciais para o desenvolvimento de sistemas mais complexos e versáteis quanto ao seu tipo de aplicação na área biomédica. O dueto tempo/instrumentação nos privou de respostas a um conjunto de perguntas que surgiram após as respectivas análises dos resultados obtidos e que apresentamos aqui como perspectivas para trabalhos futuros:

- i. Aperfeiçoar e padronizar as condições de síntese através da construção de um reator que atenda de fato as especificações requeridas para o propósito do trabalho: controle de todos os parâmetros influenciáveis, como agitação, pH, temperatura, entre outros;
- ii. Investigar mais a fundo o papel da base utilizada na síntese no processo de internalização das nanopartículas pelas células HeLa e observar se esse comportamento acontece em outras linhagens celulares;
- iii. Recobrimento das nanopartículas por um material biocompatível, a fim de se evitar a aglomeração das partículas e diminuir a citotoxicidade;

-
- iv. Analisar de forma mais completa o comportamento *in vitro* das nanopartículas com o objetivo de se investigar a biocompatibilidade e biodegradabilidade em outras culturas celulares;
 - v. Avaliar a eficácia *in vivo* dessas nanopartículas através de testes de hipertermia ou liberação de fármacos utilizando camundongos,
 - vi. Tentar aperfeiçoar todos os processos citados acima a fim de despertar ainda mais o interesse acadêmico para este campo promissor e futuramente passar a comercializar esse produto.

Capítulo 5 – Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

- [1] Batlle, X., Labarta, A., Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 35, 15–42, 2002
- [2] Gubin, S.P. et al., Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. *Russian Chemical Reviews*, 74 (6), 489-520, 2005
- [3] Sun, S. et al., Monodisperse MFe_2O_4 (M= Fe,Co,Mn) Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 1, 2004
- [4] Lu, A., Salabas, E. L., Schth F., Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 1222–1244, 2007
- [5] Knobel, M., Os superpoderes do nanomagnetos. *Ciência Hoje*, 27, 159, 2006
- [6] Gupta, A. K., Gupta, M., Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 3995–4021, 2005
- [7] Lacava, L.M., et al., Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 272–276, 2434–2435, 2004
- [8] De, M., Ghosh, P. S., Rotello, V. M., Applications of Nanoparticles in Biology. *Adv. Mater.*, 20, 4225–4241, 2008
- [9] Zhang, W., Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. *Journal of Nanoparticle Research*, 5, 323–332, 2003
- [10] Huber, D. L., Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. *Small*, 1, 5, 482 –501, 2005
- [11] Pankhurst, Q.A., et al., Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36, 167–181, 2003
- [12] Dave, S. R., Gao, X., Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Nanobiotechnology*, 1, 583–609, 2009

- [13] Andreas, J. et al., The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 78, 7–14, 2006
- [14] Rinaldi, C. et al., Applications of Magnetic Nanoparticles in Medicine: Magnetic Fluid Hyperthermia. *Magnetic Fluid Hyperthermia PRHSJ*, 28, 3, 2009
- [15] Gao, J., Xu B., Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today*, 4, 37–51, 2009
- [16] Da Silva, M. F. et al. Quantification of maghemite nanoparticles. In: Shütt, W. et al. (Ed.). Scientific and clinical applications of magnetic carriers: an overview. New York : Plenum, 171, 1997
- [17] Sun, C.; Lee, J. S. H.; Zhang, M., Magnetic nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1252-1265, 2008
- [18] Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L., and O'Connor, C. J., Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.*, 104, 3893–3946, 2004
- [19] Laurent, S. et al., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.*, 108, 2064–2110, 2008
- [20] Yanase, M. et al., Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: ex vivo study. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 630-632, 1997.
- [21] De C., Joniau, M., Magnetoliposomes: formation and characterization. *Eur. Biophys. J.*, 15, 311-319, 1988
- [22] Berry, C. C., Curtis, A.S. G., Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36, 198, 2003
- [23] Weissleder, R. et al., Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *Am. J. Roentgenol.*, 152, 167, 1989
- [24] Teja, A. S., Koh Pei-Yoong, Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials*, 55, 22-45, 2009
- [25] Laskar, S., New Aspects in Hyperthermic Science. *Indian Association for Hyperthermic Oncology and Medicine*, 2, 1, 2004

- [26] Rohdenburg, G. L.: Fluctuations of the Growth Energy of Malignant Tumors in Man with Especial Reference to Spontaneous Regression. *J. Cancer Res.*, 3, 193, 1918
- [27] Ito, A. et al., Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 1, 1-11, 2005
- [28] Cherukuri, P., Glazera, E. S., Curley S. A., Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 339–345, 2010
- [29] Rolf, D. Issels, Hyperthermia adds to chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 44, 2546 – 2554, 2008
- [30] Mornet, S. et al., Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.*, 14 , 2161–2175,2004
- [31] Guffy, M.M. et al., Sensitivity in Cultured L1210 Murine Leukemia Cells Effect of Cellular Fatty Acid Alteration on Hyperthermic Sensitivity in Cultured L1210 Murine Leukemia Cells. *Cancer Research*, 42, 3625-3630, 1982
- [32] Kettering, M. et al, Magnetic nanoparticles as bimodal tools in magnetically induced labelling and magnetic heating of tumour cells: an in vitro study. *Nanotechnology*, 18, 175101, 2007
- [33] Shinkail, M. et al. Development of anticancer drugs-encapsulated magnetoliposome and its combination effect of hyperthermia and chemotherapy. *Jnp. J. Oncol.*, 14, 14-21, 1998
- [34] Franckena, M., Hyperthermia dose-effect relationship in 420 patients with cervical cancer treated with combined radiotherapy and hyperthermia, *European Journal of Cancer*, 45, 1969 – 1978, 2009
- [35] Veiseh, O., Gunn, J. W., Zhang, M., Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews Adv.*,8; 62, 3, 284–304, 2010
- [36] Cormode, D. P. et al., Nanotechnology in Medical Imaging: Probe Design and Applications, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 29, 992-1000, 2009
- [37] Neumaier, C. E. et al., MR and iron magnetic nanoparticles. Imaging opportunities in preclinical and traslational, *Tumori*, 94, 225-232, 2008

- [38] Caravan, P., Ellison, J.J, McMurry, T.J, Lauffer, R.B., Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics and applications. *Chem. Rev.*, 2293-2352, 1999
- [39] Tsiftoglou, A. S., Tumor biology: regulation of cell growth, differentiation and genetics in cancer. New York, Springer, 1996
- [40] Cooper, G. M. The molecular cell approach. Ed. Sinauer. 2° ed., 2000.
- [41] Alexiou, C. et al., Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Research*, 60, 23, 6641-6648, 2000
- [42] Alexiou, C. et al., Magnetic drug targeting: biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *Drug Target*, 11, 3, 139-149, 2003
- [43] Tseng, H. U. et al., Hyperthermia cancer therapy utilizing superparamagnetic nanoparticles. *2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, 2007
- [44] Li, S. D.; Huang, L. Nonviral is superior to viral gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 123, 181-183, 2007
- [45] Mundargil, R. C. et al., Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(dilactidecoglycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, 125, 3, 193-209, 2008
- [46] Balakrishnan, S.; Bonder, M. J.; Hadjipanayis G. C. Chemical reduction synthesis and ac field effect of iron based core-shell magnetic nanoparticles. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42, 24, 1-6, 2009
- [47] Hussain, S. M. et al., In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology In Vitro*, 19, 975-983, 2005
- [48] Jeng, H. A.; Swanson, J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Science and Health, part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 41, 12, 2699-2711, 2006
- [49] Veranth, J. M et al., Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle and Fibre Toxicology*, 4, 2, 1-18, 2007

- [50] Mahmoudi, M. et al, A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1, 300-309, 2010
- [51] INCA. Brasil - Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2006: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer/utero.html>>. Acesso em 12/01/2011.
- [52] Hausen, H. zur, Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1288, 55-78, 1996
- [53] Schiffman, N. M. H. New epidemiology of human papillomavirusinfection and cervical neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 18, 1345-1347, 1995
- [54] Thomison, J., Thomas, L. K.; Shroyer, K. R. Humanpapillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspectsrelated to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Human Pathology*, 39, 2, 154-166, 2008
- [55] Pinto, A. P.; Tulio, S.; Cruz, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Associação Brasileira de Medicina*, 48, 1, 73-78, 2002
- [56] Lai, C. W. et al., J. K. Iridium-complex-functionalized Fe₃O₄/SiO₂ core/shell nanoparticles: A facile three-in-one system in magnetic resonance imaging, luminescence imaging, and photodynamic therapy. *Small*, 4, 2, 218-224, 2008
- [57] Goodwin, E. C.; Dimaio, D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97, 23, 12513-12518, 2000
- [58] Freshney, R. I. Introduction. Culture of animal cell: A manual basic technique, 2^a ed., Welly-Liss, New York, 1987
- [59] Kang, Y. S. et al., Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and Fe₂O₃ particles. *Chem. Mater.*, 8, 2209, 1996
- [60] Martínez-Mera, I. et al., Synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles without surfactants at room temperature. *Materials Letters*, 61, 4447–4451, 2007
- [61] Fong-Yu, C. et al, Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications, *Biomaterials*, 26 , 729–738, 2005

- [62] Sun, J., et al., Synthesis and characterization of biocompatible Fe₃O₄ nanoparticles, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80, 2, 333-341, 2007
- [63] Rondinone, A. J., Samia, A. C. S., Zhang, Z. J., A chemometric approach for predicting the size of magnetic spinel ferrite nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 104, 7919, 2000
- [64] Li, S., John, V. T., O'Connor, C., Carpenter, Harris, V. E., Cobalt ferrite nanoparticles: structure, cation distributions and magnetic properties. *J. Appl. Phys.*, 87, 6223, 2000
- [65] Song, O., Zhang, Z.J., Shape control and associated magnetic properties of spinel cobalt ferrite nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 6164-6168, 2004
- [66] Janasi, S.R. et al., The effects of synthesis variables on the magnetic properties coprecipitated of barium ferrite powders. *J. Magn. Magn. Mater.* 238, 168-172, 2002
- [67] LaMer, V.K, Dinegar, R.H., Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (11), 4847- 4848, 1950
- [68] Murray, C.B., Kagan, C.R., Bawendi, M.G., Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 30, 545–610, 2000
- [69] Vayssières, L. et al., Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 205, 205–212, 1998
- [70] Tartaj, P. et al., The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36, 182–197, 2003
- [71] Zhang, X. et al., Influence of precipitator agents NaOH and NH₄OH on the preparation of Fe₃O₄ nano-particles synthesized by electron beam irradiation, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 270, 2, 285–289, 2006
- [72] Kim, D.K. et al., Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater*, 225, 30-35, 2001
- [73] Jolivet, J.P., et al., Influence of Fe(II) on the formation of the spinel iron oxide in alkaline medium. *Clays and Clay Minerals*, 40, 5, 531-539, 1992

[74] Takaaki, T. et al., Hydrothermal Growth of Fatty Acid Stabilized Iron Oxide Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C*, 113, 839–843, 2009

[75] Gribanov, N.M. et al., Physico-chemical regularities of obtaining highly dispersed magnetite by the method of chemical condensation. *J. Magn. Magn.Mater.*, 85, 7-10, 1990

[76] Yamaura, M. et al., Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 279, 210–217, 2004

[77] Shen, T., Superparamagnetic contrast agents for magnetic resonance imaging. Harvard University-Massachusetts Institute of Technology, Tese, 1994

[78] Sinnecker, J.P., Materiais magnéticos doces e materiais ferrimagnéticos amorfos. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 22, 3, 2000

[79] Ribeiro, G. A. P. As propriedades magnéticas da matéria: Um primeiro contato. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 22, 299-305, 2000.

[80] Bean, C. P., Livingston J. D. Superparamagnetism. *Journal of Applied Physics Supplement to*, 30, 4, 1959

[81] Cullity, B. D., Graham C. D., Introduction to magnetic materials. Second edition, Wiley, , 14-22, 2009

[82] Camilo R. L., Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriétoxissilano para uso como material híbrido em Nanotecnologia, Tese, IPEN, USP, 2006

[83] Cornell, R. M., The Iron Oxides, U. Schwertmann, *VCH Publishers*, 1996

[84] Knobe, I M., Aplicações do magnetismo, *Ciência Hoje*, 36, 215, 18-26, 2006

[85] Alves, T. M. M. T., Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro para aplicações biomédicas, Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Física Gleb Wataghin, Dissertação, 2007

[86] Morales, M. P. et al., Surface and Internal Spin Canting in $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ Nanoparticles. *Chem. Mater.*, 11, 3058, 1999

[87] Sato, T. et al., Magnetic properties of ultrafine ferrite particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 65, 252-256, 1987

- [88] Thapa, D., Properties of magnetite nanoparticles synthesized through a novel chemical route. *Tata Institute of Fundamental Research*, Mumbai 400, India, 2005
- [89] Reitz, J. R et al., Fundamentos da Teoria Eletromagnética, Campus, 1982
- [90] Ngo, A.T., Bonville, M., Pileni, M.P., Spin canting and size effects in nanoparticles of nonstoichiometric cobalt ferrite. *J. Appl. Phys.*, 89, 6, 15, 2001
- [91] Maver, U. et al. Incorporation and release of drug into/from superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Magn Magn Mater.*, 321, 3187–3192, 2009
- [92] Muscelli, W.C. Síntese de agentes direcionadores de estruturas zeolíticas derivados do 1,4 diazobicyclo[2,2,2] octano, Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual Paulista UNESP, 2010
- [93] Coué, V. et al., Synthesis, Characterization, and Photochromic Properties of Hybrid Organic–Inorganic Materials Based on Molybdate, DABCO, and Piperazine. *Inorg. Chem.*, 46, 2824–2835, 2007
- [94] Patterson, A. L., The Scherrer formula for X-ray particle size determination. *Physical Review*, 56, 978-982, 1939
- [95] Magalhães, F, Síntese e Caracterização de Óxidos de Ferro e Compósitos para Aplicações no Tratamento Redox de Efluentes Aquosos, Tese, UFMG, 2008
- [96] Sampaio, L.C. et al., Técnicas de Magnetometria. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 22, 3, 2000
- [97] Fang, J. et al., Nanoneedles of maghemite iron oxide prepared from wet chemical route. *Matter. Res. Bull.*, 38, 461, 2003
- [98] Yu, Wen-Guang et al., Effects of synthetical conditions on octahedral magnetite nanoparticles. *Materials Science and Engineering B*, 136, 101–105, 2007
- [99] Gnanaprakash, G. et al., Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 103, 168–175, 2007
- [100] Xu, R., Zeng, H.C., Mechanistic Investigation on Salt-Mediated Formation of Free-Standing Co₃O₄ Nanocubes at 95 °C. *J. Phys. Chem. B*, 107, 926-930, 2003
- [101] Ozkaya, T. et al, Reflux synthesis of CoO nanoparticles and its magnetic characterization, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 2145–2149, 2009

[102] Harisson, R. J., Putnis, A., Magnetic properties of the magnetite-spinel solid solution: Saturation magnetization and cation distributions. *American Mineralogist*, 80, 213-221, 1995

[103] Coey, J.M.D., Noncollinear spin arrangement in ultrafine ferrimagnetic crystallites. *Physical Review Letters*, 27, 1140-1142, 1971

[104] Kodama, R.H., Berkowitz, A.E., McNiff, E.J. and Foner, S., Surface spin disorder in NiFe₂O₄ nanoparticles. *Physical Review Letters*, 77, 394-397, 1996

[105] Hong, R.Y. et al, Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles without inert gas protection used as precursors of magnetic fluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 320, 1605-1614, 2008

[106] Wilhelm, C. et al., Interaction of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles with Cells: Kinetic Analyses of Membrane Adsorption and Subsequent Internalization. *Langmuir*, 18, 21, 8148–8155, 2002

[107] Candido, N.M., Estudo da ação de nanopartículas magnéticas de ferro em câncer, Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual Paulista UNESP, 2010.

[108] Mailänder, V., Landfester K., Interaction of Nanoparticles with Cells. *Biomacromolecules*, 10, 2379–2400, 2009

[109] Mayor, S.; Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 603-612, 2007

[110] Sandvig K. et al., Clathrin-independent endocytosis: From nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochemistry and Cell Biology*, 129, 3, 267-276, 2008

[111] Mahmoudi, M., et al. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chem. Rev.*, 111, 5, 3407–3432, 2011

[112] Hsiao, J. K. et al., Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: Cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5T magnetic resonance at the single cell level. *Magnetic Resonance in Medicine*, 58, 4, 717-724, 2007

[113] Hsiao, J. K. et al., Magnetic nanoparticle labeling of cultured cancer cell line without transfection agent. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, 20, 4, 259-265, 2008

- [114] Goodwin, E. C.; Dimaio, D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 97, 23, 12513-12518, 2000
- [115] Marback, E. F. et al., Anterior capsule staining using 0.025% trypan blue in cataracts without red reflex. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 64, 4, 333-335, 2001
- [116] Malta, J. B. N. S. et al., Risco de contaminação do corante azul de tripano após primeira utilização. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 69, 1, 27-31, 2006
- [117] Marques, D. M. V.; Marques, F. F.; Osher, R. H. Three-step technique for staining the anterior lens capsule with indocyanine green and trypan blue. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 30, 1, 13-16, 2004
- [118] Junqueira, L. C.; Carneiro, J. *Histologia básica*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004
- [119] Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 4, 239-257, 1972
- [120] Kroemer, G., Galluzzi L., Brenner C., Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev*, 87, 99–163, 2007
- [121] Takahashi, A. et al., High-let radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of P53 status, *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 60, 2, 591–597, 2004
- [122] Siripong, P.; Induction of apoptosis by rhinacanthone isolated from *Rhinacanthus nasutus* roots in human cervical carcinoma cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32, 7, 1251-1260, 2009
- [123] Sladowski, D. et al., An improved MIT assay. *Journal of Immunological Methods*, 157, 1, 203-207, 1993
- [124] Wittrup, A. et al., Magnetic nanoparticle-based isolation of endocytic vesicles reveals a role of the heat shock protein GRP75 in macromolecular delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 107, 30, 13342-13347, 2010

- [125] Dobrovolskaia, M.A, McNeil S.E., Immunological properties of engineered nanomaterials, *Nature Nanotechnology*, 2, 469 – 478, 2007
- [126] Dobrovolskaia, M. A. et al., Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Molecular Pharmaceutics*, 5, 4, 487–495, 2008
- [127] Dobson, J., Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 3, 2008
- [128] Petri-Fink, A. et al., Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials*, 26, 2685-2694, 2005
- [129] Alke, Petri-Fink et al., Effect of cell media on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Colloidal stability, cytotoxicity, and cellular uptake studies, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68, 129–137, 2008
- [130] Jörg, Kreuter, Influence of the Surface Properties on Nanoparticle-Mediated Transport of Drugs to the Brain. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4, 5, 484-488, 2004

ANEXO 1

Linhagens celulares contínuas HeLa, Huh-7 e HCT 116

1. Início dos experimentos – semear a cultura celular na placa

Um dia antes, colocar as lamínulas no álcool 70% e trocar a água milliQ

Descontaminar o fluxo laminar (limpeza com álcool 70% e ligar a luz UV)

Esquentar a tripsina, PBS e o meio de cultura no banho-maria

Descontaminar todos os reagentes com álcool 70%

Montar a placa de 6 wells com as lamínulas, retirando-as do álcool 70% e lavando-as na água milliQ, retirando o excesso de água num papel filtro

Aspirar todo o meio de cultura da garrafa

Lavar com PBS

Aspirar toda a solução

Adicionar até 3 mL de tripsina, dependendo do tamanho da garrafa e da linhagem celular em questão

Encubar na estufa de CO₂ por aproximadamente 4 minutos,

Pegar um falcon de 15 mL e identificá-lo

Passar todo o conteúdo para ele, deixando apenas algumas gotas na garrafa para que continue crescendo normalmente e completar com meio de cultura (até 10 mL no caso da garrafa maior e 5 mL na menor)

Centrifugar o falcon por 5 minutos a 25°C e 700 rpm

Retirar todo o líquido, deixando o pellet formado

Adicionar 10 mL de meio e homogeneizar bem

Separar num eppendorf 50 uL da solução e adicionar 50 uL (tornando o fator de diluição igual a 2)

Inserir na câmara de Neubauer a mistura (o líquido é direcionado por capilaridade por baixo da lamínula da câmara)

A contagem das células viáveis é feita no microscópio de luz e posteriormente é feita a média (dos 4 ou 8 quadrados)

A partir daí são feitas os seguintes cálculos:

Média da câmara de Neubauer x fator de diluição x 10⁴ --- 1 mL de solução

2x10⁵* --- X mL

*Após testes para verificar a melhor densidade para os experimentos (variando desde 8x10⁴, 10⁵, 2x10⁵, 5x10⁵, 7x10⁵ e 10⁶), observamos que a densidade de 2x10⁵ atingia melhor confluência após 48 horas

Adicionar o volume encontrado no cálculo anterior em cada poço e completar para 2 mL com meio de cultura

Identificar a placa com as densidades da linhagem celular em questão e dar uma leve homogeneizada na placa antes de colocá-la na estufa

2. Transfecção das nanopartículas na linhagem celular

Após 24 horas fazer o mesmo procedimento de descontaminação, lembrando dos eppendorfs também (começar pelo menos 2 horas antes do experimento)

Colocar 0,5 mL de meio em cada eppendorf, identificá-los e levá-los para sonicação, já que as nanopartículas são magnéticas e têm tendência para se aglomerarem

Isso é feito já no meio de cultura afim de não haver influência externa de qualquer outro reagente

Aspirar todo o meio de cultura dos poços

Acoplar as seringas sorológicas de 5 mL aos filtros Millipore (0,22 com membrana de PVDF*)

Adicionar nos eppendorfs mais 0,5 mL de meio e homogeneizar bem

Inserir a solução na seringa (segurando bem o filtro para que a pressão feita pelo êmbolo não o desacople) e passar o conteúdo, distribuindo-o em cada lamínula de cada poço

OBS: toda vez que as np's ficarem aderidas aos filtros, deve-se trocá-los para evitar que todas fiquem retidas ali

Adicionar meio até completar 2 mL em cada poço

Dar uma leve homogeneizada na placa antes de encubá-la na estufa

* Tentamos usar outro filtro 0,22µm, mas este tinha membrana de PES que fez com que o sulfeto interagisse com as cargas das NPMs, retendo-as no filtro.

3. Coloração das lamínulas

Após 24 horas, dá-se início aos protocolos de coloração.

3.1. Fixação (Karnovsky*)

Retirar todo o meio dos 6 poços

Adicionar aproximadamente 2 mL da solução Karnovsky (paraformaldeído e glutaraldeído) e deixar em repouso por cerca de 45 minutos (pode variar de 30 a 60, sendo que não há restrições para o tempo de fixação)

*Karnovsky: Partes iguais de paraformol 4% e glutaral 4%

Soluções

Glutaraldeído

15,75 mL tampão fosfato Sörensen

0,625 mL gluta 25%

Paraformol

0,4 mL PFA

10 mL água destilada

Aquecer 6 mL de água destilada a 60°C e colocar o PFA. Manter a temperatura e adicionar NaOH 0,2 M (gota a gota até ficar transparente). Em seguida, completar o volume com água destilada

3.2. Coloração

Lavar bem as lamínulas com água destilada (ainda na placa)

Misturar 5 mL de ácido clorídrico 20% e 5 mL de ferrocianeto de potássio 10% (previamente preparados) e cobrir as lamínulas com a solução resultante

Esperar 20 min

Lavar 3X com água destilada

Contracoloração com HE

-aproximadamente 2 mL de hematoxilina por 5 min (melhor por 10 min)

-retirar toda a solução e lavar bem com H₂O

-deixar +/- 2 mL de água por 10 min

-retirar toda a água

-adicionar 2 mL de etanol 80% (1 min) – senão a eosina não cora

-retira-se todo o álcool e adicionar 2 mL de eosina (3 min), depois retirá-la (melhor por 4 min)

-lavar bem para tirar o excesso de eosina com etanol 95% (2x)

-deixar secar no papel-filtro

Soluções

Ferrocianeto de potássio 10%

1g de ferrocianeto em pó para 10 mL de água milliQ

Ácido hidrocloreídrico 20%

$C_i V_i = C_f V_f$

$37\% \times V_i = 20\% \times 20 \text{ mL}$

$V_i = 10,80 \text{ mL de ácido hidrocloreídrico } 37\%$

E portando, 9,20 mL H₂O milliQ

Misturar as duas soluções imediatamente antes de usá-las, caso contrário, ela precipita

3.3. Montagem da lâmina

Colocar ~2 gotas de meio de entellan na lâmina e virar a lamínula suavemente sobre ela.

Posteriormente, pode ser realizada a observação no microscópio.

Obs: Na microscopia eletrônica, foi realizado o mesmo procedimento para semear as células e para inserção das nanopartículas nas mesmas, exceto pelo fato de trocar as lamínulas no fundo dos pocinhos por uma membrana de PVDF da Millipore usada para blotting.

ANEXO 2

Teste T-student

24 horas	
controle-10	0,00015
controle-50	0,0006
controle-100	0,0011
10ug-100	0,72
10ug-100	0,06
50ug-100	0,05

48 horas	
controle-10	0,0007
controle-50	0,0005
controle-100	0,0002
10ug-100	0,05
10ug-100	0,17
50ug-100	0,85

24-48 horas	
controle-controle	0,894
10ug-10	0,0063
50ug-50	0,05
100ug-100	0,5159

24 horas								
	Valores						Média	DP
10µg/mL	0,384	0,352	0,34	0,317	0,327	0,285	0,334167	0,033463
50µg/mL	0,36	0,274	0,228	0,434	0,403	0,379	0,346333	0,079228
100µg/mL	0,217	0,211	0,224	0,403	0,149	0,075	0,213167	0,108978
Controle	0,561	0,546	0,508	0,664	0,766	0,478	0,587167	0,108119

24 horas								
	Valores						Média	DP
10µg/mL	0,18	0,271	0,251	0,073	0,099	0,156	0,171667	0,079362
50µg/mL	0,291	0,251	0,273	0,24	0,236	0,248	0,2565	0,021249
100µg/mL	0,246	0,235	0,213	0,309	0,347	0,156	0,251	0,068308
Controle	0,515	0,575	0,601	0,444	0,717	0,718	0,595	0,109225



Coordenadoria Geral de Bibliotecas

C@thedra - Biblioteca Digital de Teses e Dissertações

AUTORIZAÇÃO PARCIAL

Nome do autor: Aryane Tofanello de Souza

CPF:315734338-61 **Telefone:** (11) 4479-3485

E-mail do autor: anetofanello@hotmail.com

Autoriza a divulgação deste endereço eletrônico na C@thedra? Sim Não

Dissertação de Mestrado
Livre-Docência

Tese de Doutorado

Tese de

Título: Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)

Palavras-chave: nanopartículas magnéticas, coprecipitação, células HeLa, ensaios biológicos

Campus: Ibilce – São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação: Biofísica Molecular

Área de Concentração: Física e Biologia

Linha de Pesquisa: Biofísica Molecular

Orientador: José Geraldo Nery

Banca: prof. Dr. José Geraldo Nery, profa. Dra. Paula Rahal, profa. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

Data da defesa: 30/09/2011

(X) AUTORIZO a Universidade Estadual Paulista (UNESP), a publicar em ambiente digital institucional, sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto parcial (resumo, introdução e conclusão) da obra acima citada, em formato PDF, até a data 30/09/2014 após este período o arquivo poderá ser inserido na íntegra a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade, em conformidade com o estabelecido pela CAPES (**PORTARIA No- 13, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2006**).

Data: 30/10/2011.

Assinatura do(a) autor(a)