

RODOLFO FINI

Sistemas híbridos orgânico-inorgânicos contendo nanopartículas magnéticas: Aplicações em hipertermia magnética e liberação controlada de fármacos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Sandra Helena Pulcinelli
Co-orientador: Dr. Bruno Leonardo Caetano

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

F498s Fini, Rodolfo
Sistemas híbridosorgânico-inorgânicos contendo nanopartículas magnéticas: aplicações em hipertermia magnética e liberação controlada de fármacos / Rodolfo Fini. – Araraquara : [s.n.], 2017
97 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Sandra Helena Pulcinelli
Coorientador: Bruno Leonardo Caetano

1. Processo sol-gel. 2. Tecnologia de liberação controlada. 3. Nanopartículas. 4. Materiais compostos. 5. Magnetismo.
I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

RODOLFO FINI

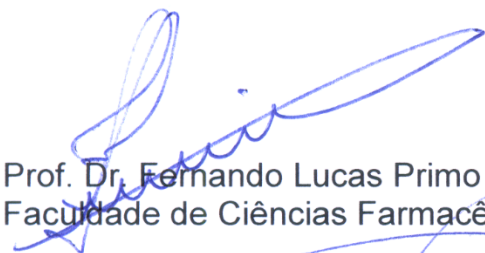
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 23 de fevereiro de 2017.

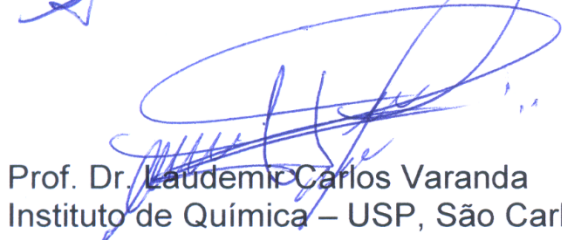
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Sandra Helena Pulcinelli
Instituto de Química - UNESP – Araraquara - SP



Prof. Dr. Fernando Lucas Primo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda
Instituto de Química – USP, São Carlos - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rodolfo Fini

Nome em citações bibliográficas: R, Fini.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Rua Prof. Francisco Degni, 55.

Bairro: Quitandinha

CEP:14800-060 - Araraquara, SP

Email: rodolfo_fini@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2011-2014: Graduação em Química na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Araraquara

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2014: Treinamento da Base de Dados Reaxys. (Carga horária: 2h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2015: Fenômenos emergentes em magnetismo e supercondutividade. (Carga horária: 60h). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

2016: 5th School of small angle x-ray scattering data analysis. (Carga horária: 31h). Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CMNPEN, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

CAETANO, B. L. et al. Magnetic hyperthermia-induced drug release from ureasil-PEO-[gamma]-Fe₂O₃ nanocomposites. RSC Advances, v. 6, n. 68, p. 63291-63295, 2016.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

FINI, R; SILVA, M. N.; SUZANA, A. F.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. Estudo da estabilidade térmica de híbridos siloxano-pmma contendo nanopartículas de óxido de zinco. 22 Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2016, Natal. Materiais Poliméricos - Degradação de Materiais.

FINI, R; SANTILLI, C. V.; CAETANO, B. L.; PULCINELLI, S. H. Híbridos ureasil-polieter carregados com nanopartículas magnéticas para liberação controlada de fármaco e hipertermia magnética. 22º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2016, Natal. Materiais Poliméricos - Materiais Magnéticos.

SOUZA, W. M. O.; FINI, R; CAETANO, BRUNO LEONARDO ; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V. Estudo de matrizes ureasil-polieter contendo CoFe_2O_4 para aplicações biomédicas: liberação controlada de fármaco e hipertermia magnética. XXVIII Congresso de iniciação científica da UNESP, 2016, Bauru. XXVIII Congresso de iniciação científica da UNESP- 2ª fase, 2016.

FINI, R; CAETANO, B.L.; MENAGER, C.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. The potential of biocompatible hybrid system loaded with magnetic nanoparticle for biomedical applications: magnetohyperthermia and controlled drug release. XIV Brazil MRS Meeting, 2015, Rio de Janeiro. Sol-gel materials: from fundamentals to advanced application, 2015.

LEAL, T.; FINI, R.; CAETANO, BRUNO LEONARDO; SILVA, M. N.; SUZANA, A. F.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. Nanocompósitos Siloxano-PMMA contendo nanopartículas de ZnO: estabilidade térmica e proteção contra corrosão e radiação UV. In: XXVII Congresso de iniciação científica da UNESP, 2015, Araraquara. XXVII Congresso de iniciação científica da UNESP, 2015.

FINI, R; SILVA, M. N.; HAMMER, P.; SANTOS, F. C.; HARB, S. V.; SANTILLI, C. V. ; PULCINELLI, S. H. Influência da adição de ZnO em revestimentos híbridos siloxano-PMMA. 21º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2014, Cuiabá. Materiais compósitos.

AGRADECIMENTOS

Principalmente a minha mãe, Maria Isabel Gadotti Fini, meu pai, Aparecido Gilberto Fini, e meu irmão, Pablo Gilberto Fini. Eles me acompanham, confiam, e me suportam desde 1992. A toda minha Família, FINI e GADOTTI.

Aos amigos que compartilharam comigo o ônus e o bônus de estudar/trabalhar longe de casa, neste amável ambiente hostil.

Aos amigos da república etanóis, que me acolheram durante o horário do almoço e jantar (e em muitas e muitas outras ocasiões).

Ao co-orientador deste trabalho, Bruno Leonardo Caetano, pela amizade e ensinamentos.

À minha orientadora, Sandra Helena Pulcinelli, pelos bons conselhos e orientação que recebi nestes últimos anos, e também pela oportunidade de participar do GFQM. Ao professor Celso V. Santilli e ao Professor Peter Hammer pelos conselhos.

Gostaria também de agradecer aos colaboradores deste trabalho: à Professora Christine Ménager por nos ceder as partículas de maguemita, ao professor Sébastien Abramson por ceder as partículas de ferrita de cobalto, por realizar as medidas de SQUID, e microscopias de transmissão dos nanocompositos, à Bruna Galdorfini Chiari por realizar os ensaios de citotoxicidade, e finalmente ao professor Marlus Chorilli por nos ceder o fármaco curcumina.

Obrigado a todos!

The 2nd Law

“All natural and technological processes proceed in such a way that the availability of the remaining energy decreases. In all energy exchanges, if no energy enters or leaves an isolated system the entropy of that system increases! Energy continuously flows from being concentrated to becoming dispersed, spread out, wasted, and useless. New energy cannot be created and high-grade energy is being destroyed...An economy based on endless growth is unsustainable.

The fundamental laws of thermodynamics will place fixed limits on technological innovation and human advancement!

In an isolated system, the entropy can only increase... A specie set on endless growth is unsustainable” - **Matthew James Bellamy**

RESUMO

Neste trabalho foram preparados dispositivos híbridos ureasil-poliéter via processo sol-gel, contendo nanopartículas magnéticas (MNP) de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) ou maguemitita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que apresentam propriedades magnéticas como superparamagnetismo, podendo ser aplicados em terapia de hipertermia e em sistemas de liberação controlada. A proposta foi sintetizar e caracterizar estes dispositivos visando a possível aplicação como agentes de liberação controlada de fármaco sob presença de um campo magnético alternado (AMF – alternated magnetic field). Assim, a combinação apropriada destas duas terapias pode proporcionar uma alternativa para eliminar células cancerígenas. Os resultados indicam que as nanopartículas de maguemitita, com tamanho médio de 12 nm foram introduzidas e dispersas na matriz híbrida. A dispersão foi comprovada pelo patamar de Guinier presente nas curvas de espalhamentos de raios X a baixo ângulo (SAXS). Por outro lado, as partículas de CoFe_2O_4 , de tamanho médio 8,7 nm, apresentaram a formação de agregados na matriz. Os valores de perda de energia específica (SLP - *specific loss power*) para as amostras contendo MNP evidenciam a capacidade de aplicação em hipertermia magnética. Os ensaios de liberação de fármaco foram realizados utilizando dois fármacos modelo, o diclofenaco de sódio (DCFNa) e a curcumina (CMN). A liberação de DCFNa foi monitorada a partir dos nanocompósitos carregados com maguemitita, enquanto nos ensaios com curcumina foram usados para os nanocompositos de ferrita de cobalto. Nas liberações de DCFNa foi possível observar a influência da temperatura na liberação de fármaco, bem como a influência da aplicação de um AMF. A liberação de CMN se mostrou cerca de seis vezes menor para a amostra contendo CoFe_2O_4 em relação a amostra sem MNP, o que evidencia uma possível interação entre as nanopartículas de ferrita de cobalto e a curcumina, indicando que a liberação pode ser modulada com a concentração de MNP de ferrita de cobalto.

Palavras Chave: Hipertermia magnética. Liberação controlada. Nanopartículas magnéticas. Híbridos orgânico-inorgânicos.

ABSTRACT

In this work the sol-gel approach was used to synthesize organic inorganic hybrids loaded with magnetic nanoparticles (MNP), i.e., cobalt ferrite (CoFe_2O_4) or maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) which present magnetic properties such as superparamagnetism. Therefore, these materials can be used in hyperthermia therapy as well as in controlled release systems. We synthesize and characterize these devices aiming their application as agents of controlled drug delivery systems under the presence of an alternating magnetic field (AMF). Thus, the appropriate combination of these two therapies may provide an alternative to kill cancer cells. The results indicate that the maghemite particles with mean size of 12 nm were introduced and dispersed in the hybrid matrix, which good dispersion was verified by the Guinier plateau present in the small angle X-ray scattering curves (SAXS). Otherwise, the particles of CoFe_2O_4 , 8.7 nm average size, are present as aggregates in the matrix. The values of specific loss power (SLP) for samples containing MNP make evident their capacity in magnetic hyperthermia application. Drug release assays were performed using two model drugs, sodium diclofenac (DCFNa) and curcumin (CMN). The DCFNa release was monitored from maghemite-loaded nanocomposites while for curcumin assays cobalt ferrite nanocomposites were used. The DCFNa release shows the influence of temperature on drug release, as well as the influence of the application of an AMF. The release of CMN was about six times smaller for the sample containing CoFe_2O_4 than that of the sample without MNP. This behavior may be due to a possible interaction between cobalt ferrite nanoparticles and curcumin, indicating that curcumin profile can be modulated by the MNP concentration.

Keywords: Magnetic hyperthermia. Controlled release. Magnetic nanoparticles. Organic-inorganic hybrids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferentes áreas de aplicação de materiais híbridos orgânico-inorgânicos	19
Figura 2 - Representação esquemática de duas classes de HO-I	20
Figura 3 - Diferentes propriedades da classe de HO-I ureasil-poliéter, agrupado à seus diversos ramos de aplicação	22
Figura 4 - Diferentes alcóxidos de silício utilizados para a preparação de HO-I via processo sol-gel	23
Figura 5 - Diversidade de aplicações das nanopartículas magnéticas	25
Figura 6 - Ilustração esquemática de (A) multidomínios magnéticos, (B) um grupo de monodomínios magnéticos apontando para uma única direção, (C) a curva de histerese para partículas ferromagnéticas, e (D) a curva de histerese de partículas com comportamento superparamagnético	26
Figura 7 - Apresentação esquemática da aplicação direta das MNP em células cancerígenas (células em vermelho) em um rato, no interior de uma bobina, onde o campo magnético é gerado pela aplicação de uma corrente alternada	28
Figura 8 - Mecanismos de perda de energia devido ao processo de desmagnetização	29
Figura 9 - Dependência do SLP em relação à magnetização (a), tamanho da partícula (b) e anisotropia magnética (c)	30
Figura 10 - Representação gráfica do tempo de relaxação em função do tamanho de partícula	31
Figura 11 - Representação esquemática dos diferentes tipos de resposta quando os nanosistemas são estimulados com o aquecimento das nanopartículas	33
Figura 12 - Estrutura molecular da curcumina, 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) - 1,6-heptadieno-3,5-diona	34
Figura 13 - Estrutura molecular do diclofenaco de sódio	35
Figura 14 - Esquema de síntese dos materiais	42
Figura 15 - Foto do equipamento para medidas de hipertermia, DM100 Series,	

NanoScale Biomagnetics Corp., instalado nas dependência do GFQM do IQ/UNESP	47
Figura 16 - (a) TEM do γ -Fe ₂ O ₃ (3,2) isolado a partir da suspensão coloidal; (b) Curva de distribuição Gaussiana das γ -Fe ₂ O ₃ (3,2) determinada a partir da TEM; (c) Cryo-TEM do nanocompósito U-PEO:Fe ₂ O ₃ (5); (d) Curva de distribuição Gaussiana das γ -Fe ₂ O ₃ determinada a partir da imagem do nanocompósito U-PEO: γ -Fe ₂ O ₃ (5)	52
Figura 17 - Curva de magnetização para a suspensão coloidal γ -Fe ₂ O ₃ (3,2) e para o nanocompósito U-PEO: γ -Fe ₂ O ₃ (5), ambos ajustados pela função de Langevin (linha vermelha contínua)	53
Figura 18 - Curvas de SAXS para a matriz pura U-POE (preta), U-POE: γ -Fe ₂ O ₃ (5) pH 3,7 (vermelho pontilhado), suspensão coloidal γ -Fe ₂ O ₃ (3,2) pH 1,7 (verde), U-POE: γ -Fe ₂ O ₃ (5) pH 1,7 (azul), U-POE: γ -Fe ₂ O ₃ (5):DCFNa pH 1.7 (rosa)	54
Figura 19 - Evolução temporal do aumento de temperatura sob aplicação de AMF, amplitude de 14,9 kA·m ⁻¹ e frequência de 420 e 280 kHz para as amostras com diferentes concentrações de γ -Fe ₂ O ₃ . (a) e (c) suspensão coloidal; (b) e (d) nanocompósitos	56
Figura 20 - Evolução temporal do aumento de temperatura sob aplicação de AMF, amplitude de 14,9 kA m ⁻¹ e frequência de 420 kHz nos primeiros 30 segundos de aplicação de AMF para as amostras com diferentes concentrações de γ -Fe ₂ O ₃ . (a) suspensão coloidal; (b) nanocompósitos	57
Figura 21 - Dependência da temperatura com a concentração de γ -Fe ₂ O ₃ após aplicação de AMF, 14,9 kA·m ⁻¹ e frequência de 420kHz, para (a) suspensão coloidal contendo diferentes quantidades de γ -Fe ₂ O ₃ em massa (3,2, 0,32, 0,032 and 0,0032% em massa); e (b) nanocompósitos U-PEO contendo diferentes quantidades de γ -Fe ₂ O ₃ em massa (5, 0.5, 0.05 and 0.005%). Dados extraídos da Figura 20(a) e 20(c), respectivamente, em tempos determinados	58
Figura 22 - (a) Exemplo de cálculo de Δy na curva de DSC; (b) capacidade calorífica específica da safira calculada por DSC	60

Figura 23 - Curvas DSC do U-PEO, mostrando a temperatura de fusão, (T_f) e o grau de cristalinidade (D_c)	61
Figura 24 - Representação esquemática das regiões cristalina e amorfa do poli(óxido de etileno)	61
Figura 25 - (a) Espectros de absorção no UV-vis do diclofenaco de sódio. (b) Curva de calibração para o DCFNa realizada em meio tampão fosfato, pH 7,2	63
Figura 26 - Condições experimentais utilizadas para o ensaio de liberação do DCFNa por aplicação de AMF. Liberação cumulativa de DCFNa (preto), amplitude do AMF (azul), temperatura da solução tampão fosfato contendo o nanocompósito (vermelho)	63
Figura 27 - Resultados da Liberação de DCFNa medidas por UV-vis a 276 nm para amostra U-POE: γ -Fe ₂ O ₃ (5):DCFNa a 0, 25, 37 e 50 °C e sob aplicação de AMF.....	64
Figura 28 - Comparação entre a diferença de DCFNa liberado nos ensaios de liberação realizados a 50 °C e sob AMF com o ensaio realizado à (a) 0 °C, (b) 25 °C, (c) 37 °C, e comparação entre os ensaios realizados a (d)50 °C e AMF	66
Figura 29 - . (a) Espectros FTIR dos híbridos contendo diferentes quantidades de ferrita de cobalto, (b) ampliação dos espectros na região de baixos valores de número de onda	69
Figura 30 - Esquema estrutural da molécula representativa do material híbrido	70
Figura 31 - (a) Curvas de DSC e (b) capacidade calorífica específica à 25 °C para os híbridos contendo ou não diferentes concentrações de ferrita de cobalto. A curva do padrão, safira, foi incluída para fins de comparação	71
Figura 32 - Perfil de difração das amostras UPEO, U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (2,14), e CoFe ₂ O ₄	73
Figura 33 - Cella unitária de uma estrutura tipo espinélio	73
Figura 34 - Espectros de XANES para a amostra U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (2,14) e para a suspensão coloidal de CoFe ₂ O ₄ , na borda K de absorção do (a) ferro e do (b) cobalto. O insert mostra a ampliação da pré borda de absorção	74
Figura 35 - Curvas de SAXS para as suspensões coloidais de CoFe ₂ O ₄ e para	

os híbridos contendo ou não CoFe_2O_4	75
Figura 36 - Esquema da distância de correlação (ξ_0) entre os grupos ureasil	75
Figura 37 - Apresentação dos resultados de microscopia eletrônica de transmissão para a ferrita de cobalto: (a) imagem com escala de 100 nm, em (b) a distribuição log-normal a partir da imagem (a). Em (c) ferrita de cobalto com escala de 10 nm, e em d) é apresentado o espectro de EDS destas partículas	77
Figura 38 - Apresentação dos resultados de microscopia eletrônica de transmissão para a amostra $\text{U-PEO:CoFe}_2\text{O}_4(1,45)$. Imagem com escala de (a) 0,5 μm , (b) 200 nm, e ambas imagens (c) e (d) com a escala de 100 nm	78
Figura 39 - Curva de magnetização típica à $T = 298\text{K}$ e $T = 5\text{K}$ de um material nanocompósito magnético ($\text{U-PEO:CoFe}_2\text{O}_4$) obtida por magnetometria SQUID	79
Figura 40 - Apresentação das curvas de hipertermia em diferentes concentrações e frequências	81
Figura 41 - Viabilidade celular da linhagem HepG2 após incubação. Dados referem-se a média de três experimentos independentes (Média $\pm$ desvio padrão)	83
Figura 42 - (a) Espectro de absorção na região do UV-vis (entre 600 e 300 nm) da curcumina em diferentes concentrações. (b) curva de calibração da curcumina utilizando sua absorção máxima em 426 nm	84
Figura 43 - (a) Perfil de aquecimento durante a aplicação do campo, juntamente com AMF aplicado. (b) Perfil de liberação da curcumina	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras preparadas com diferentes quantidades de CoFe_2O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e curcumina	43
Tabela 2 - Valores de $(dT/dt)_{\text{max}}$ para nanocompósitos com maguemitita	57
Tabela 3 - Valores de SLP para nanocompósitos com maguemitita	62
Tabela 4 - Valores obtidos para a temperatura de fusão (T_f), porcentagem de cristalinidade (D_c), e capacidade calorífica específica a 25 °C para os nanocompósitos	71
Tabela 5 - Apresentação das inclinações nas duas regiões lineares das curvas de SAXS	76
Tabela 6 - Parâmetros magnéticos dos nanocompósitos	80
Tabela 7 - Apresentação dos valores de SLP e ILP calculados em diferentes frequências	82
Tabela 8 - Valores de absorvância das três medidas, das médias e do desvio padrão	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ξ_0 : distância de correlação

$(dT/dt)_{\max}$: taxa máxima de aquecimento

ΔH_f : entalpia de fusão

AMF: *alternated magnetic field* (campo magnético alternado)

C_m : capacidade calorífica mássica

CMN: curcumina

d_0 : diâmetro

D_c : grau de cristalinidade

DCFNa: diclofenaco de sódio

DRX: difração de raios X

DSC: calorimetria diferencial exploratória

EDS: espectroscopia de raios X por dispersão em energia

FTIR: espectroscopia na região do infravermelho

H_c : coercividade magnética

HO-I: híbridos orgânico-inorgânicos

ICPTES: 3-isocianato propiltrietoxi silano

ILP: *intrinsic loss power* (perda de energia intrínseca)

K: constante de anisotropia de forma

LNLS: Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

M: magnetização

MHT: magnetohipertermia

m_{MNP} : massa de nanopartícula magnética

MNP: nanopartículas magnéticas

MOF: *metal-organic framework* (Estrutura metal-orgânica)

M_r : magnetização remanente

m_s : massa da amostra

M_s : saturação da magnetização

PBS: *Phosphate Buffer Saline* (tampão de fosfato)

PEO1900: O,O'-bis(2-aminopropil) –poli(óxido de etileno oxide) de massa molar 1900 g·mol⁻¹

PEO: óxido de polietileno

PPO: óxido de polipropileno

PSG: processo sol-gel

R_g : raio de giro médio

SAXS: espalhamento de raios X a baixo ângulo

SLP: *specific loss power* (perda de energia específica)

SQUID: *Superconducting Quantum Interference Device* (Dispositivo Supercondutor de Interferência Quântica)

TEM: microscopia eletrônica de transmissão

T_f : temperatura de fusão

XANES: *X ray absorption Near Edge Structure* (absorção de raios X próximo à borda de absorção)

ΔH_p : entalpia de fusão para uma amostra de PEO1900 100% cristalina

σ : polidispersão

χ_0 : susceptibilidade magnética

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	MATERIAIS HÍBRIDOS ORGÂNICOS INORGÂNICOS CONJUGADOS COM NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS	18
1	<i>Híbridos orgânico-inorgânicos</i>	19
2	<i>Híbridos ureasil-poliéter e o processo sol-gel</i>	22
3	<i>Nanopartículas magnéticas (MNP)</i>	25
3.1	Hipertermia Magnética (MHT)	27
3.2	MNP usadas como plataforma para entrega de fármacos e MHT	32
4	<i>Liberção controlada de fármacos</i>	33
4.1	Curcumina	34
4.2	Diclofenaco de Sódio	35
CAPÍTULO 2	JUSTIFICATIVAS e OBJETIVOS	36
1	<i>Justificativas</i>	37
2	<i>Objetivos</i>	38
CAPÍTULO 3	EXPERIMENTAL	39
1	<i>Materiais</i>	40
2	<i>Parte experimental</i>	40
2.1	Síntese do precursor U-PEO1900	40
2.2	Síntese das nanopartículas de maguemita (γ -Fe ₂ O ₃)	40
2.3	Síntese das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe ₂ O ₄) ..	41
2.4	Síntese dos nanocompósitos	41
3	<i>Técnicas de caracterização</i>	43
3.1	Caracterização da estrutura molecular e comportamento térmico	44
3.1.1	Espectroscopia na região do infravermelho (IR)	44
3.1.2	Calorimetria diferencial exploratória (DSC)	44
3.2	Caracterização estrutural e nanoestrutural	44
3.2.1	Difração de raios X (DRX)	44
3.2.2	Epectroscopia de Absorção de raios X na região de XANES	45

3.2.3	Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)	45
3.2.4	Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	45
3.3	Caracterização magnética	46
3.3.1	Curvas de magnetização, SQUID	46
3.3.2	Hipertermia magnética	47
3.4	Ensaio de liberação controlada de fármacos e viabilidade celular	48
3.4.1	Citotoxicidade	48
3.4.2	Ensaio de liberação de fármaco	49
CAPÍTULO 4	ESTUDO DE SISTEMAS NANOCOMPÓSITOS U-PEO:γ-Fe₂O₃	51
1	<i>Comportamento térmico, caracterização magnética e nanoestrutural</i>	52
2	<i>Ensaio de liberação controlada de fármaco e comportamento térmico</i>	62
3	<i>Conclusões</i>	67
CAPÍTULO 5	ESTUDO DE SISTEMAS NANOCOMPÓSITOS U-PEO:CoFe₂O₄	68
1	<i>Caracterização da estrutura molecular e comportamento térmico</i>	69
2	<i>Caracterização estrutural e nanoestrutural</i>	72
3	<i>Caracterização magnética</i>	78
4	<i>Ensaio de liberação controlada de curcumina e viabilidade celular</i>	82
5	<i>Conclusões</i>	86
CAPÍTULO 6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
	REFERÊNCIAS	91

CAPÍTULO 1

MATERIAIS HÍBRIDOS ORGÂNICOS INORGÂNICOS CONJUGADOS COM NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS

1 Híbridos orgânico-inorgânicos

Híbridos orgânico-inorgânicos (HO-I) são materiais preparados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos, onde estas duas fases estão misturadas em níveis moleculares. Quando as características desejadas não são encontradas em um único constituinte, a combinação adequada destas duas fases pode gerar materiais que apresentem algumas das características das fases separadas, além de apresentar possíveis características novas. Portanto, a modificação de polímeros orgânicos e macromoléculas com componentes inorgânicos permite obter materiais com várias novas propriedades, constituindo uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações. No cenário atual estes compostos deixaram de representar apenas uma classe de materiais e compostos de interesse acadêmico, pois o constante avanço nesta área de pesquisa tornou possível o desenvolvimento de materiais com importantes aplicações industriais.^{1,2} A Figura 1. Diferentes áreas de aplicação de materiais híbridos orgânico-inorgânicos. de maneira esquemática.

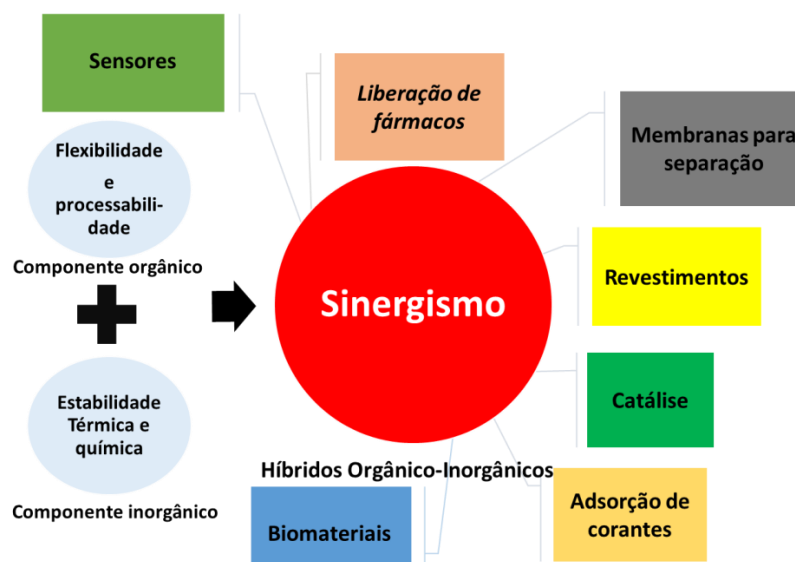


Figura 1. Diferentes áreas de aplicação de materiais híbridos orgânico-inorgânicos.

Fonte: autor

O termo híbrido é usado para diferentes sistemas em diferentes áreas, isto é, compostos amorfos preparados via sol-gel, polímeros de coordenação, conhecidos como *metal organic framework* (MOF's), e materiais com ou sem interação entre as

fases orgânica e inorgânica. Desta forma o termo híbrido acaba entrando em conflito com o termo nanocompósito, que é utilizado se uma das unidades estruturais, orgânica ou inorgânica, possui tamanhos definidos da ordem de 1 a 100 nm, o que pode se confundir com a escala da mistura entre as fases nos híbridos. Formalmente, são chamados de híbridos quando a unidade da fase inorgânica é formada *in situ* a partir de precursores moleculares pelo processo sol-gel, por exemplo. ³Outra distinção entre essas duas classes de materiais é que em um nanocompósito não se faz necessário a presença de uma fase orgânica e uma inorgânica, ou seja, um nanocompósito pode ser uma misturas de compostos de apenas uma classe de compostos.

Os híbridos podem ser divididos em duas classes. Os híbridos de classe I apresentam interação do tipo Van der Waals, eletrostática ou ligação de hidrogênio, entre as fases orgânica e inorgânica. Já nos híbridos de classe II as duas fases estão conectadas através de ligações químicas covalentes ou de coordenação. A Figura 2 mostra um esquema das duas classes, sendo que nos híbridos de classe I as duas fases se encontram desunidas, apenas interagindo uma com a outra; no segundo caso, híbridos de classe II, as duas fases estão conectadas através de ligações químicas. ⁴



Figura 2. Representação esquemática de duas classes de HO-I.
Fonte: adaptado da referência 4.

Nos próximos parágrafos serão apresentadas algumas pesquisas recentes na área de HO-I, em diferentes áreas de aplicação, como forma de exemplo da grande multidisciplinaridade destes materiais. Em 2013 Wang et al. ⁵mostraram a habilidade de nanomateriais unidimensionais (1D) em formato de fios – compostos

por óxido de zinco como fase inorgânica, recobertos com CuTCNQ (TCNQ=7,7,8,8-Tetracianoquinodimetano), como fase orgânica – organizados em estruturas bidimensionais (2D), serem utilizados como *sensores* de umidade. Nesse trabalho o HO-I formava heterojunções do tipo p-n, distribuídas em uma grande área superficial, de forma que os nanomateriais apresentavam excelentes propriedades de diodos do tipo p-n e foram aplicados como sensores de umidade de ultra alta sensibilidade, resposta rápida e boa capacidade de recuperação a temperatura ambiente.

Gu et al. ⁶publicaram em 2013, na revista *Nano Letters*, um método fácil de preparação de membranas HO-I assimétricas para serem aplicadas em *processos de separação* de PEO de diferentes massas moleculares. Essas membranas híbridas são compostas por uma fração de um tri-polímero, composto por Poli(isopreno-b-estireno b-4-vinilpiridina) juntamente com nanopartículas de óxido de titânio, exibindo assimetria estrutural com uma fina camada de microporos na camada superior e macroporos na camada inferior. Estas propriedades estruturais contribuíram para a boa seletividade e alta permeabilidade do analito em questão.

HO-I preparados a partir de poli(metil metacrilato) e siloxano reforçados com nanotubos de carbono ou óxido de grafeno, foram preparados pelo método sol-gel no trabalho de Harb et al., ⁷publicado em 2016 na revista *ACS Applied Materials & Interfaces*. Esse trabalho sugere que tanto óxido de grafeno quanto nanotubos de grafeno podem ser utilizados para melhorar propriedades mecânicas e térmicas de matrizes híbridas a base de poli(metil metacrilato) e siloxano, que possuem por si só alta capacidade anticorrosiva, com valores de módulo de impedância que chegam a 10 GΩ.cm².

Em 2011, Cabrero-Antonino et al. ⁸prepararam um catalisador mesoporoso a base de dimetiletilenodiamina, funcionalizado com grupos silano via processo sol-gel. A adição de sais de cobre (II) a este material, que se complexa com os grupos diaminas presentes na estrutura, originou um HO-I ativo como catalisador para a S- arilação de iodetos e brometos de arilo com tiofenóis e dissulfetos. Adicionalmente, os híbridos mostram atividade catalítica para a reação de cicloadição entre azidas e fenilacetilenos.

Allo et al ⁹estudaram biomateriais HO-I com intuito de promover regeneração óssea. Este híbrido composto de Poli (ε-caprolactona) e vidro bioativo mostrou

biocompatibilidade e elevada resistência mecânica, além de acrescentar novas informações importantes relativas à formação da hidroxiapatita.

2 Híbridos ureasil-poliéter e o processo sol-gel

Na área de aplicação biomédica destaca-se a classe de materiais híbridos orgânico-inorgânicos baseados em ureasil-poliéter.¹⁰ Estes materiais transparentes são sintetizados a baixa temperatura, possuem alta estabilidade térmica,^{11,12} textura de borracha, são flexíveis, mecanicamente resistentes e insolúveis em água. Estas características associadas à sua biocompatibilidade tornam estes materiais um candidato versátil para a síntese de sistemas de liberação controlada de fármacos.¹² Híbridos ureasil-poliéter também apresentam potenciais aplicações farmacêuticas, tais como formulações oftálmicas (lentes de contato), transdérmicas (adesivos) e implantáveis (tecido mole).¹³ A Figura 3 esquematiza as diferentes características dos híbridos ureasil-poliéter.

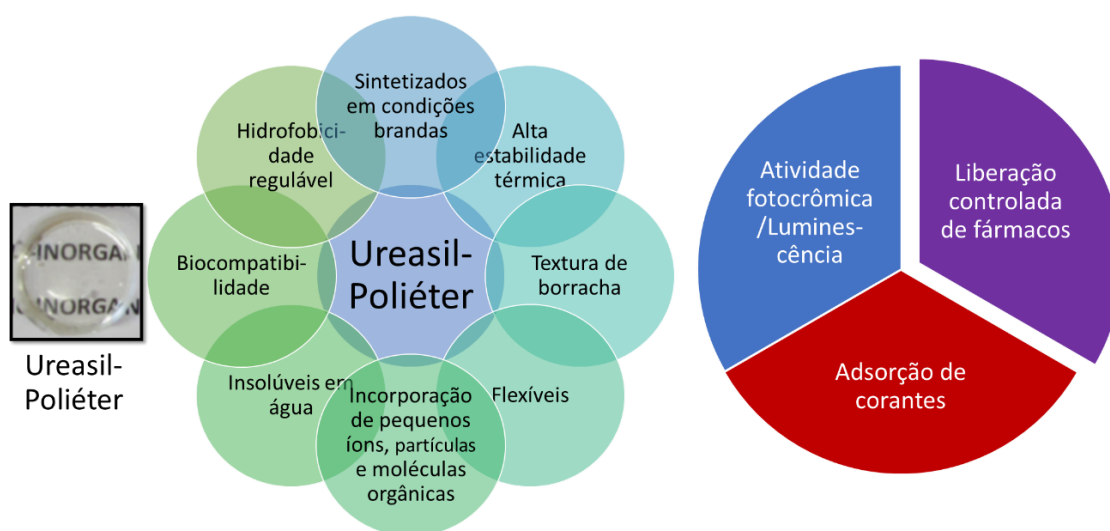


Figura 3. Diferentes propriedades da classe de HO-I ureasil-poliéter, agrupado à seus diversos ramos de aplicação.

Fonte: autor.

Híbridos ureasil-poliéter podem ser preparados pela rota de síntese conhecida como processo sol-gel (PSG). Este processo é regido por reações de hidrólise e policondensação, nas quais pequenas moléculas formam estruturas poliméricas através da perda de substituintes, formando, geralmente, redes tridimensionais. O

fato de pequenas moléculas serem usadas como precursores para a formação de redes sólidas numa reação via úmida introduz algumas vantagens em relação a uma via seca, como por exemplo, alto controle da pureza e da composição do material final e condições de sínteses mais brandas. ¹⁴

Antes de abordar os fundamentos do PSG é preciso lembrar alguns conceitos. Uma suspensão coloidal é aquela na qual a fase dispersa é formada por partículas tão pequenas, em torno de 1 a 1000 nm, que a força gravitacional não é capaz de sedimentá-las, e as interações entre as partículas são de curto alcance, como interações de Van der Waals e eletrostáticas. Um sol é definido como sendo uma suspensão coloidal de partículas sólidas em um líquido. A partir destas suspensões é possível preparar materiais poliméricos, a partir de monômeros, ou materiais cerâmicos a partir de nanopartículas de óxidos, por exemplo, em suspensão.

No PSG os precursores dos coloides podem ser sais dos metais/semi-metais, como por exemplo, Na_2SiO_3 , ou metais/semi-metais organicamente modificados, como o $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$, sendo estes últimos os mais utilizados no PSG convencional. Alguns exemplos de alcóxi silanos são apresentados na Figura 4 ¹⁵ a baixo.

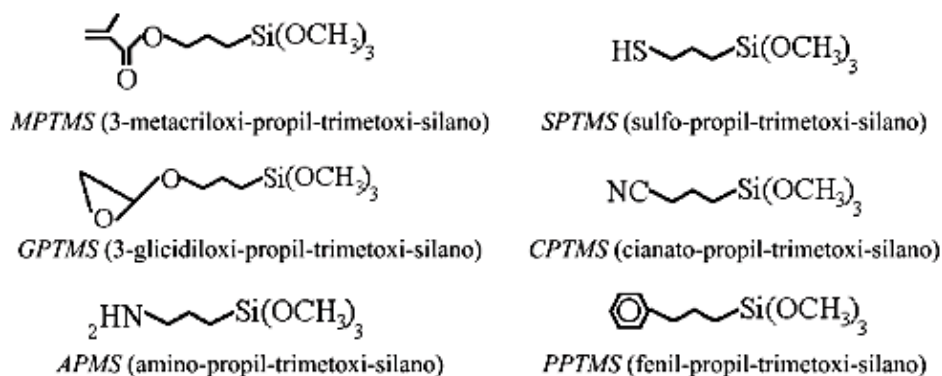
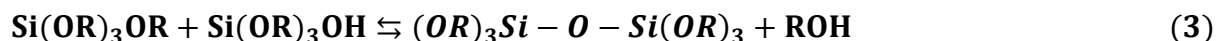
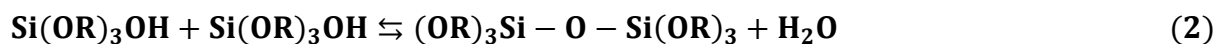


Figura 4. Diferentes alcóxidos de silício utilizados para a preparação de HO-I via processo sol-gel.
Fonte: adaptado da referência 15.

Alcóxidos de metais são precursores muito úteis porque reagem facilmente com água em uma reação chamada de hidrólise, onde um grupo hidroxila irá se ligar ao metal, como sugere a reação descrita na Equação 1:



Dependendo da quantidade de água e catalisador desta reação a hidrólise pode ser completa, $n=4$, ou incompleta se $n<4$. Independentemente se a hidrólise foi completa ou não, duas moléculas parcialmente hidrolisadas podem sofrer reações de condensação de dois modos distintos. Esta etapa de condensação pode continuar e produzir moléculas cada vez maiores de sílica, num processo chamado de polimerização. ¹⁴A condensação pode ocorrer por duas rotas, sendo elas, seguida de formação de água, ou álcool, Equação 2 e Equação 3, respectivamente.



Durante o PSG muitos fatores são importantes e devem ser levados em conta, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração dos reagentes, entre outros. Todos estes parâmetros influenciam nas características finais do produto, como densidade de reticulação, homogeneidade, porcentagem de hidrólise e condensação. O catalisador tem um papel fundamental na cinética de reação e na estrutura final do gel. ^{16,17}Se a hidrólise for catalisada por base, a reação deve se processar através de uma substituição nucleofílica e a velocidade de hidrólise será maior que a velocidade de condensação, levando à formação de cadeias mais ramificadas no início do processo. Se a hidrólise for catalisada por ácido, vai ocorrer uma reação eletrofílica e a velocidade da condensação será maior que a da hidrólise, levando à formação de cadeias mais longas e menos ramificadas no início do processo. No PSG as reações de condensação levam a formação de géis poliméricos, que podem ser classificados em dois tipos: géis químicos ou poliméricos (ligação covalente) e géis físicos ou coloidais (interação física). Os materiais sintetizados pelo método sol-gel são muito versáteis, podendo ser obtidos na forma de monolitos, pós, fibras, filmes e poros ordenados. ¹⁸

A partir do PSG, portanto, é possível associar características de um polímero hidrofílico e semicristalino, como o óxido de polietileno - PEO que exhibe características de hidrogéis, com um polímero hidrofóbico e amorfo, como o óxido de

polipropileno – PPO. A polaridade específica da ligação ureia foi recentemente usada para promover a dissolução de diferentes drogas modelo e a eficiência do uso deste material como sistema de liberação controlada de fármacos foi avaliada.^{10,13} Recentemente foi mostrado também que híbridos ureasil-poliéter são sensíveis a estímulos externos, mostrando inchamento ou retração como resposta.¹⁹

3 Nanopartículas magnéticas (MNP)

Durante as últimas décadas a síntese de nanopartículas superparamagnéticas foi estudada intensamente devido ao grande potencial em aplicações de alto interesse socioeconômico. Dentre as áreas de aplicação destes materiais podemos citar o melhoramento de armazenamento de mídia, biosensores, além da área de medicina.²⁰ Na área de aplicações biomédicas, as nanopartículas magnéticas são uma importante classe de biomateriais usadas como agentes de contraste para geração de imagem por ressonância magnética²¹ para elaboração de diagnósticos, marcação celular,^{22,23} separação e rastreamento celular,²⁴ e também para propósitos terapêuticos, como hipertermia^{25,26} e liberação controlada de fármacos.²⁷ A Figura 5 apresenta algumas da ampla gama de aplicações das nanopartículas magnéticas.²⁸

Quando voltamos nossa atenção para o uso terapêutico das nanopartículas magnéticas é de grande interesse conhecer algumas das grandezas relacionadas às propriedades magnéticas, sendo elas, a magnetização (M), a coercividade magnética (H_c) e a constante de anisotropia magnética de forma (K).^{29,30} O ponto de saturação da magnetização (M_s) é onde há o máximo de nanopartículas sob influência do campo magnético aplicado e a magnetização remanente (M_r) é a magnetização remanente das MNP após a remoção do campo magnético. A coercividade magnética do material (H_c) está relacionada com a força necessária do campo magnético aplicado para levar a magnetização das nanopartículas a zero e a constante de anisotropia magnética de forma (K) é uma propriedade que reflete a existência de uma direção preferencial de magnetização dependente da forma da partícula.

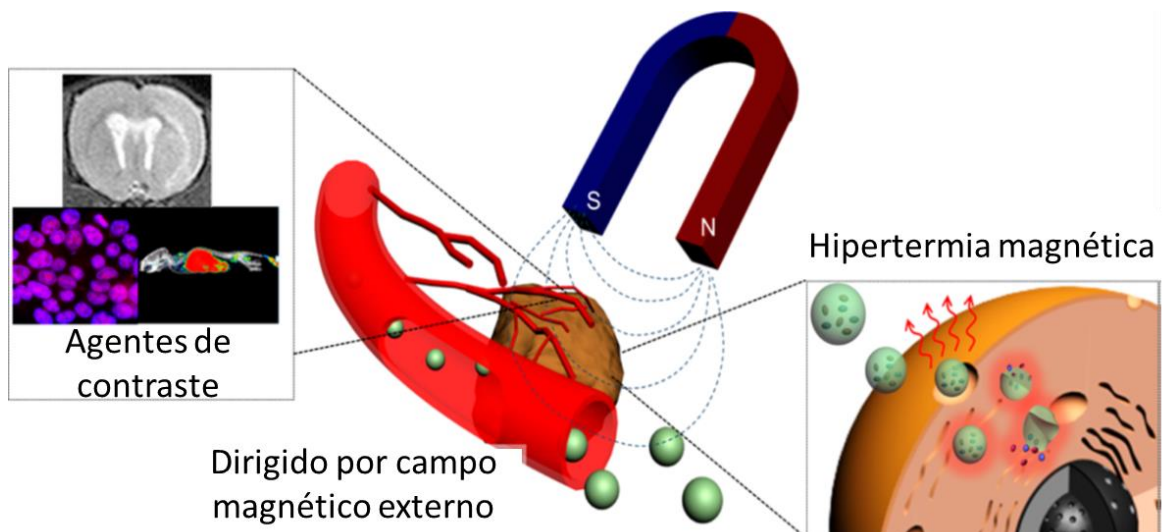


Figura 5. Diversidade de aplicações das nanopartículas magnéticas.

Fonte: adaptado da referência 28.

O comportamento magnético das partículas também está relacionado com o seu tamanho. Partículas originalmente ferromagnéticas com tamanho inferior a 20 nm apresentam comportamento superparamagnético.³¹ Estas nanopartículas superparamagnéticas não vão apresentar valores de H_c e M_r e por apresentarem interações de dipolos magnéticos mais fracos são facilmente dispersas em um meio líquido, sendo portanto mais interessantes em aplicações biomédicas.³² Na Figura 6 estão representadas os multidomínios magnéticos de partículas ferromagnéticas (A) e sua curva típica de histerese (C); os monodomínios magnéticos das nanopartículas menores que 20 nm (superparamagnéticas) (B) e sua curva típica de histerese (D) também estão representadas.

Visando o uso terapêutico destas nanopartículas, é importante considerar os materiais que possuam alto valor de M_s , como o Fe, Co, e Ni, ou óxidos de ferro, como a magnetita (Fe_3O_4), maguemita ($\gamma-Fe_2O_3$) e a ferrita de cobalto ($CoFe_2O_4$). Embora metais possuam um valor maior de M_s , eles também são extremamente tóxicos e sensíveis a oxidação em meio fisiológico. Por outro lado, nanopartículas dos óxidos citados apresentam diversas características que as tornam uma classe de materiais com aplicações na área biomédica, como a estabilidade em meio

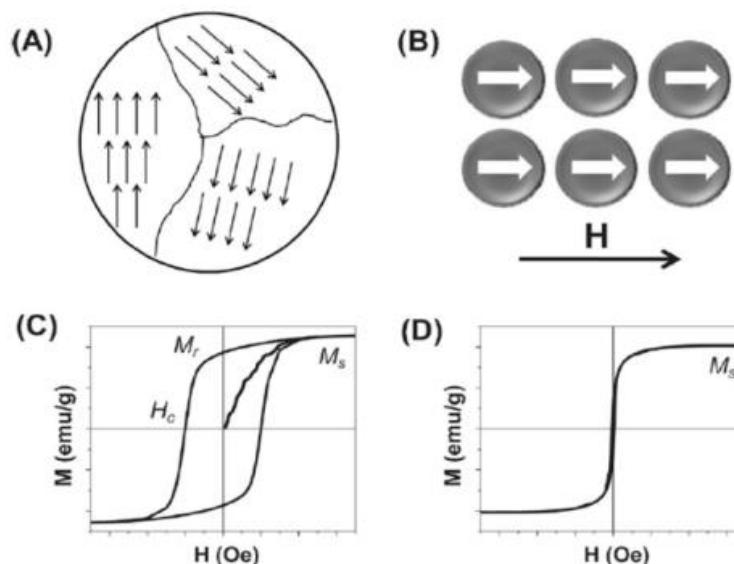


Figura 6. Ilustração esquemática de (A) multidomínios magnéticos, (B) um grupo de monodomínios magnéticos apontando para uma única direção, (C) a curva de histerese para partículas ferromagnéticas, e (D) a curva de histerese de partículas com comportamento superparamagnético.

Fonte: adaptado da referência 32.

fisiológico, já que são menos sensíveis a oxidação e portanto suas propriedades magnéticas são mais estáveis.³³ De fato, estas partículas vêm sendo aplicadas há mais de 50 anos para geração de diagnósticos *in vitro*³⁴ e, devido à relativa baixa toxicidade e elevada biocompatibilidade, são aplicadas em terapia de hipertermia e em sistemas de liberação controlada.^{20,31}

3.1 Hipertermia Magnética (MHT)

Sob a aplicação de um campo magnético alternado (AMF – *Alternated magnetic field*) nanopartículas magnéticas (MNP – magnetic nanoparticles) geram calor devido ao processo de perdas relacionado à magnetização reversa.³¹ Pesquisadores ao redor do mundo já encontraram diversas aplicações para estes processos de aumento da temperatura das MNP.³⁵⁻³⁸ Uma vertente de extrema importância dos usos destas MNP é na terapia conhecida como hipertermia magnética induzida por um AMF,²⁶ chamado de magnetohipertermia (MHT).

A MHT é uma técnica que pode ser utilizada no tratamento de um dos problemas mais desafiadores da medicina moderna, o câncer.³¹ A técnica se baseia no aumento de temperatura de uma determinada região do corpo, entre 42-44 °C,³⁹ visando impedir o crescimento e causar a necrose das células tumorais, já que

estas são mais sensíveis ao aumento de temperatura que a células normais. ⁴⁰Este procedimento é frequentemente utilizado em conjunto com alguma outra terapia, como por exemplo, a radioterapia e a quimioterapia, sobretudo por potencializar a ação dos agentes terapêuticos utilizados nesses tratamentos, sem aumentar o seu potencial citotóxico. ⁴¹Temperaturas acima de 50 °C também podem ser utilizadas para destruir a célula cancerígena, num processo chamado termoablação. Apesar do alto dano que a célula cancerígena sofre, há preocupações quanto aos efeitos colaterais, tal como síndrome do choque tóxico, devido à grande quantidade de células necrosadas liberadas no meio e inflamações internas. ⁴²

Para realização da MHT, as MNP são aplicadas diretamente nas células tumorais. Conforme está bem estabelecido na literatura, é aplicado um AMF cujo produto da intensidade máxima do campo (H_{max}) pela frequência aplicada (f), $H_{max} \cdot f$, tem que ser menor que $5 \cdot 10^9 \text{ A} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ com o valor mínimo de frequência igual a 50kHz. ^{32,43}O calor gerado pelo processo incessante de magnetização e desmagnetização das MNP é a base da magnetohipertermia. A Figura 7 ilustra o aquecimento localizado gerado pelas MNP, sob um AMF, causando a morte das células cancerígenas.

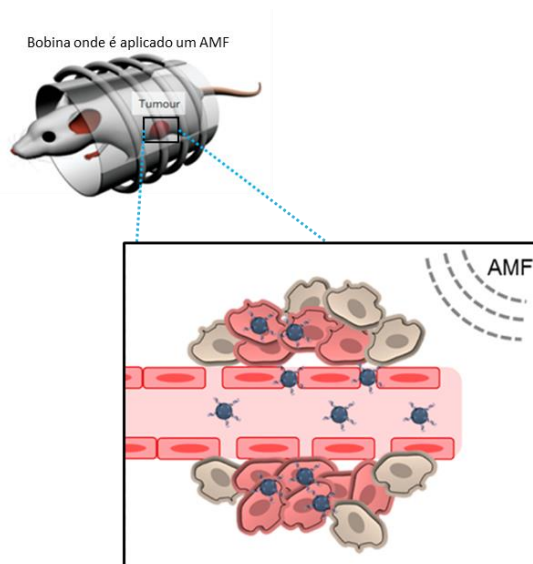


Figura 7. Apresentação esquemática da aplicação direta das MNP em células cancerígenas (células em vermelho) em um rato, no interior de uma bobina, onde o campo magnético é gerado pela aplicação de uma corrente alternada.

Fonte: adaptado da referência 28.

No estudo da hipertermia magnética é de grande interesse conhecer qual o tipo de processo de perda magnética que ocorre durante a reversão da magnetização: i) histerese (para partículas ferromagnéticas); ii) relaxação de Néel, iii) relaxação Browniana (para partículas superparamagnéticas).

O processo de perda por histerese é característico de nanopartículas (com multidomínios magnéticos) ferri e ferromagnéticas e a quantidade de energia dissipada por esse processo pode ser medida integrando a área da curva de histerese a cada ciclo de magnetização.³¹ Os processos de perdas por relaxação de Néel ou Browniana ocorrem para nanopartículas menores que 20 nm (domínio magnético único) que apresentam comportamento superparamagnético. A relaxação de Néel é caracterizada pela magnetização reversa das MNP, num processo onde a mudança de orientação dos spins magnéticos dissipa energia. Já o processo de perda por relaxação Browniana é resultado da rotação física das partículas, que dissipa energia devido a fricção que existe entre as partículas e o meio onde elas estão.^{31,40} A Figura 8 mostra um esquema dos tipos de perda apresentados.²⁶

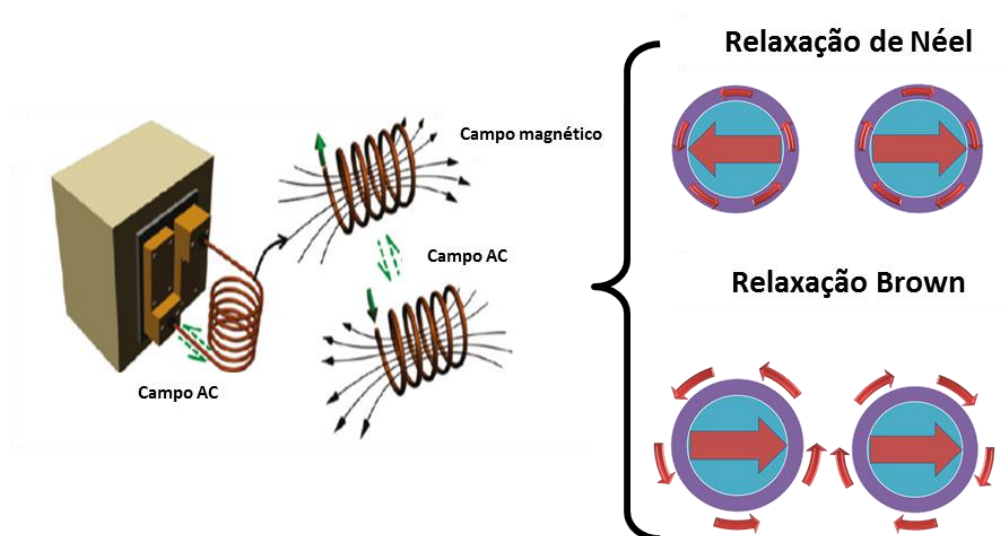


Figura 8. Mecanismos de perda de energia devido ao processo de desmagnetização.

Fonte: adaptado da referência 26.

Para a caracterização de materiais utilizados no processo de hipertermia magnética é de fundamental importância conhecer a perda de energia específica (SLP - *specific loss power*). O SLP é definido como sendo o poder de dissipação

térmica dividido pela massa de material magnético e é expresso da maneira descrita na Equação 4.

$$SLP = C_m \times \frac{m_s}{m_{MNP}} \times \frac{dT}{dt_{max}} \quad (4)$$

onde C_m é o calor específico mássico da amostra, m_s é a massa da amostra, e m_{MNP} é a massa de material magnético na amostra e $(dT/dt)_{máx}$ é a taxa de aquecimento máxima.⁴⁴ O valor de SLP depende de fatores relacionados ao tamanho da partícula, a anisotropia magnética de forma (K) e também ao valor de saturação da magnetização M_s ,²⁶ sendo que a maneira como cada um destes fatores afetam o SLP está apresentada na Figura 9.²⁸

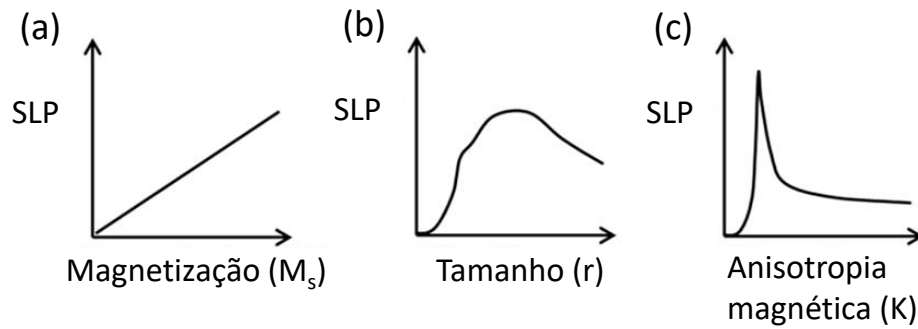


Figura 9. a) Dependência do SLP em relação à magnetização, b) tamanho da partícula, c) e anisotropia magnética.

Fonte: adaptado da referência 28.

A dissipação de calor de partículas magnéticas é causada pelo atraso no momento de relaxação do momento magnético através da rotação do momento magnético dentro da partícula (Neél) ou a rotação da partícula (Browniano), quando eles são expostos a um AMF. Os tempos de relaxação magnética Neél (τ_N), Browniano (τ_B) e tempo de relaxação efetivo (τ) de uma partícula são dadas pelas Equações 5, 6, e 7, respectivamente:

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV_{MNP}}{kT}\right) \quad (5)$$

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{kT} \quad (6)$$

$$\tau = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_N + \tau_B} \quad (7)$$

onde τ_0 é o tempo de relaxação efetivo, igual a 10^{-9} s, V_{MNP} o volume de partícula, k constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade do meio, V_H é volume hidrodinâmico da MNP e τ é o tempo de relaxação efetivo. A partir das equações acima, é claro que o tempo de relaxação depende do diâmetro da partícula. Quando as partículas são expostas a um AMF com tempo de inversão magnética menor do que os tempos de relaxação magnético das partículas, o calor é dissipado. Os tempos de orientação do momento magnético em função do tamanho de partícula é apresentado na Figura 10. Como podemos ver a partir da Equação 5, o tempo de relaxação de Néel varia exponencialmente com o V_{MNP} e K , enquanto que o tempo de relaxação browniano, Equação 6, varia com a η e V_H . Na Figura 10 o tempo de relaxação efetivo, τ , é representado pela linha pontilhada, sendo que no intervalo de frequência de excitação de 100 kHz a 1 MHz, ocorrem os dois tipos de mecanismos de excitação para maguemita em água (maiores de 15 nm), por exemplo, sendo neste ponto a dissipação de calor altamente eficaz. ⁴⁴

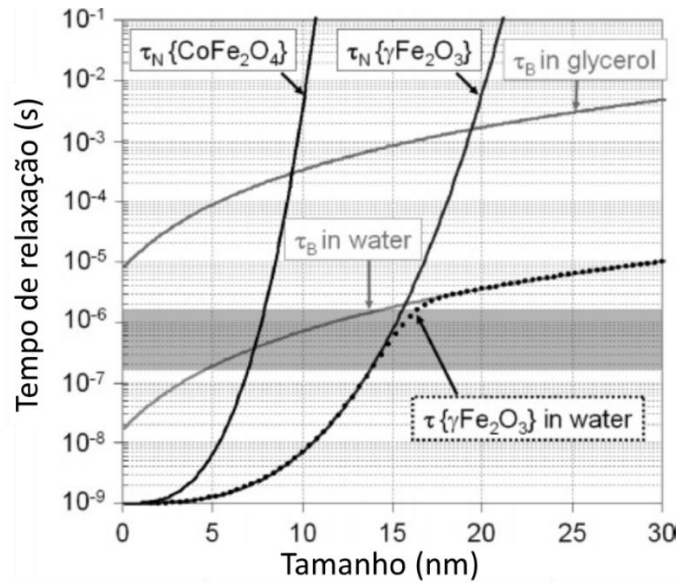


Figura 10. Representação gráfica do tempo de relaxação em função do tamanho de partícula.
Fonte. adaptado da referência 44.

3.2 MNP usadas como plataforma para entrega de fármacos e MHT

Outro processo no qual a geração de calor por hipertermia magnética pode auxiliar é a liberação controlada de fármacos a partir da aplicação de um campo magnético alternado. Brulé e colaboradores ⁴⁵prepararam matrizes de alginato com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro incorporadas e propuseram uma terapia combinada de hipertermia e quimioterapia, na qual a presença do campo magnético alternado também influencia na taxa de liberação do fármaco quimioterápico utilizado.

Além deste trabalho, também podemos citar outros sistemas que envolvem a energia gerada pelas MNP sob a influência de um AMF, como é o caso do trabalho de Derfus et al ⁴⁶que utilizaram ligantes termo lábeis ligados a nanosistemas core-shell para promover a entrega de fitas de DNA em locais específicos a partir da aplicação de um AMF (Figura 11(a)). Podemos citar também Zhang et al. ⁴⁷que utilizaram um polímero termo sensível, que passa por uma mudança de fase em uma temperatura específica, para realizar uma entrega “programada” de um fármaco (Figura 11(b)). Sistemas conjugados sílica mesoporosa e MNP foram estudados por Thomas, ⁴⁸onde os mesoporos eram “fechados” com moléculas orgânicas e após a aplicação de um AMF estes grupos orgânicos “abriam” passagem para a liberação de fármacos (Figura 11(c)). Amstad et al ⁴⁹mostraram como a desmontagem de sistemas de micelas ou lipossomos, carregados com nanopartículas magnéticas, podem reagir ao estímulo exterior do aumento de temperatura. Estes sistemas “desmontam” com o aumento de temperatura, promovendo assim a liberação de fármaco que estava previamente encapsulado no interior destes nanosistemas (Figura 11(d)).

Sob a influência de um AMF, esses dispositivos em nanoescala fornecem uma promissora plataforma de terapia intratumoral não invasivo, com a liberação de fármaco com controle espaço-temporal, que pode potencialmente aumentar a seletividade e minimizar quaisquer efeitos colaterais. O desenvolvimento contínuo de sistemas contendo nanopartículas responsivas é de fundamental importância para a melhoria da qualidade de vida das pessoas. Neste trabalho, nós propomos utilizar o híbrido ureasil-poliéter como matriz onde serão incorporadas nanopartículas de ferrita de cobalto e maguemitita com o objetivo de avaliar, e

caracterizar os processos de hipertermia magnética e liberação de fármacos induzida por campo magnético.

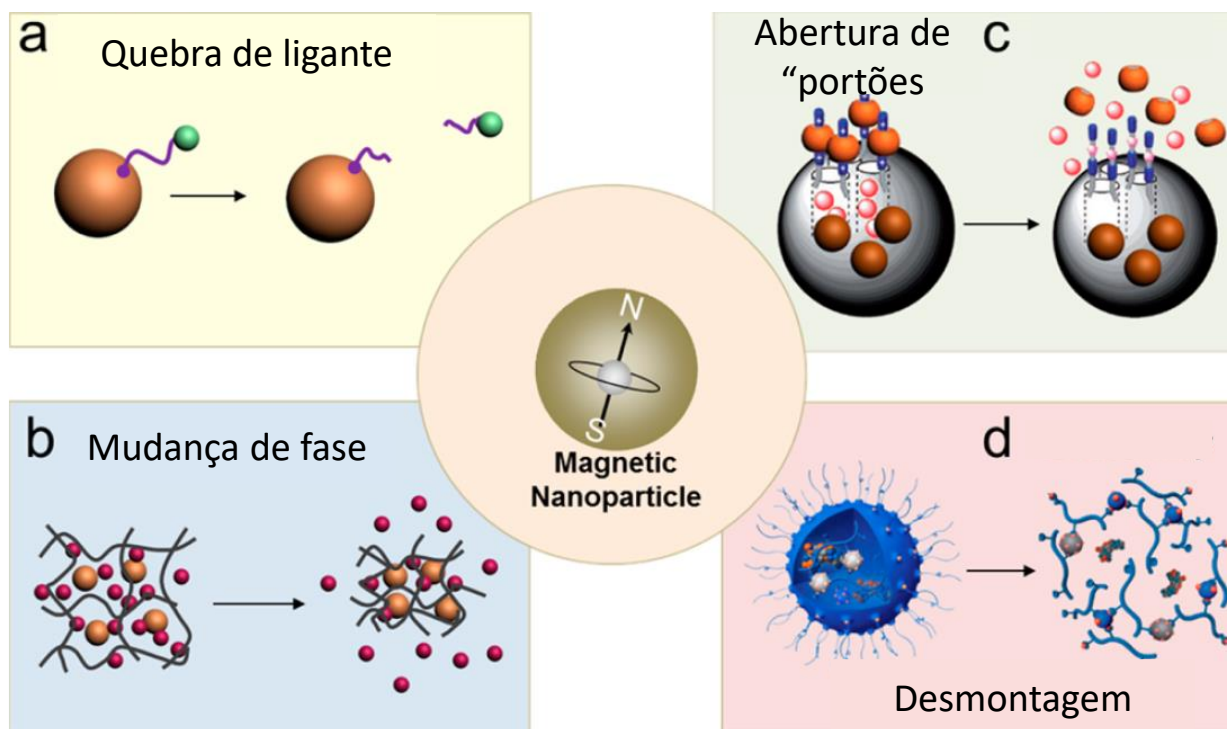


Figura 11. Representação esquemática dos diferentes tipos de resposta quando os nanosistemas são estimulados com o aquecimento das nanopartículas.

Fonte: adaptado da referência 28.

4 Liberação controlada de fármacos

A pesquisa sobre sistemas de liberação controlada foi motivada primeiramente pelo melhoramento da qualidade de vida, tendo como objetivo minimizar os efeitos colaterais dos agentes terapêuticos, uma vez que otimizado, um sistema de liberação ideal mantém a concentração do fármaco em níveis ideais. A liberação controlada também melhora a biodisponibilidade, pois previne a degradação prematura do fármaco, além de melhorar sua absorção. Outra importante característica destes sistemas é a possibilidade da criação de uma interface característica entre a célula alvo e o fármaco, reduzindo ainda mais os efeitos colaterais decorrentes de um tratamento.^{50,51}

4.1 Curcumina

Nas últimas décadas houve um rápido aumento na busca por produtos naturais para serem utilizados em diversas terapias. O crescente desenvolvimento se deu principalmente devido à grande quantidade de efeitos colaterais apresentados pelos fármacos sintéticos face a esperança de que os produtos de origem natural sejam melhor tolerados que os sintéticos. A curcumina se insere neste cenário.⁵²

A curcumina, que possui o nome IUPAC 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona, é uma molécula com propriedades medicinais extraída do açafrão-da-terra (cúrcuma), sendo a responsável pela cor, sabor e também pela maioria das propriedades químicas e biológicas deste produto natural. Usado principalmente em culturas asiáticas, o açafrão-da-terra era macerado e utilizado no tratamento de infecção ocular, queimaduras, picadas de insetos e qualquer doença relacionada com a pele. O polifenol natural encontrado na cúrcuma, que possui propriedades antioxidantes, possui fórmula estrutural apresentada na Figura 12, a temperatura ambiente se apresenta como um sólido amarelo-dourado e possui propriedades hidrofóbicas. Como atividade biológica principal, ela inibe a sobrevivência de células cancerígenas e sua proliferação, induzindo a apoptose celular.⁵³

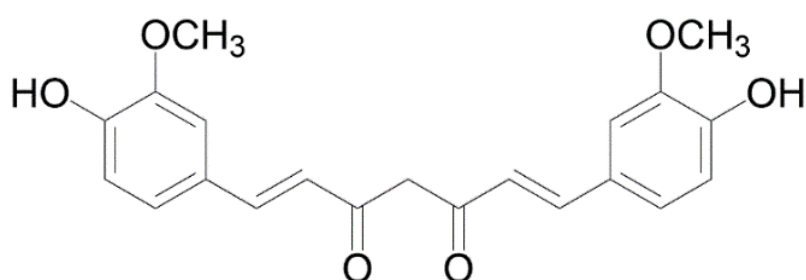


Figura 12. Estrutura molecular da curcumina, 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3,5-diona.

Fonte: referência 53.

Devido à sua característica hidrofóbica, seu uso como fármaco é limitada pois sua biodisponibilidade é baixa. Para superar este obstáculo existem sistemas de liberação de fármacos sendo estudados para entrega de fármacos em sítios

específicos, e portanto, capazes de aumentar a biodisponibilidade da curcumina no local desejado, além de coadministração com outros fármacos que inibem a metabolização prematura da curcumina. ^{54,55}

4.2 Diclofenaco de Sódio

O diclofenaco de sódio (DCFNa) é bem conhecido como anti-inflamatório e muito utilizado como droga modelo em sistemas de liberação de fármaco ^{10,12}apresentando propriedades antipiréticas, analgésicas e anti-inflamatórias. ⁵⁶A molécula de DCFNa, apresentada na Figura 13, apresenta solubilidade limitada em água, especialmente no suco gástrico, além de ser instável em solução aquosa. Este limite de solubilidade causa problemas na disponibilidade oral sendo esta desvantagem a maior motivação para o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada de DCFNa. Devido a esta característica, sistemas de liberação controlada deste fármaco proporcionam uma alternativa para otimizar sua biodisponibilidade.

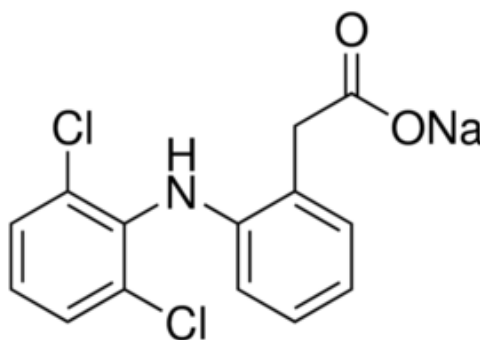


Figura 13. Estrutura molecular do diclofenaco de sódio.
Fonte: referência 56.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICATIVAS e OBJETIVOS

1 Justificativas

Na literatura existem poucos trabalhos que abordam sistemas híbridos ureasil-poliéter contendo nanopartículas magnéticas. Em 2003, L. D. Carlos e colaboradores estudaram híbridos ureasil-poliéter dopados com Fe^{2+} e com Fe^{3+} . O sistema contendo Fe^{2+} mostrou comportamento paramagnético, enquanto o sistema com íons Fe^{3+} mostrou irreversibilidade térmica e de campo.⁵⁷ Embora estes materiais tenham apresentado comportamento magnético, eles não mostraram potencial para o desenvolvimento de dispositivos para liberação controlada de fármacos usando estímulos magnéticos, ou potencial para hipertermia magnética. Recentemente Santilli e colaboradores¹⁰ sintetizaram híbridos ureasil-poliéter contendo nanopartículas de magnetita incorporados na matriz, mas embora o material tenha apresentado uma maior velocidade e eficiência na liberação do fármaco durante a aplicação de um campo magnético alternado, estas nanopartículas estão agregadas no interior da matriz. Uma caracterização estrutural detalhada é fundamental para a compreensão dos mecanismos de liberação em presença de um campo, sendo esta uma das propostas deste trabalho.

O Grupo de Pesquisa de Físico-Química de Materiais (GFQM) do Instituto de Química (IQ) UNESP-Araraquara, coordenado pelos professores Dr. Sandra Helena Pulcinelli e Dr. Celso Valentim Santilli, trabalha com materiais híbridos ureasil-poliéter voltados para aplicações biomédicas, principalmente para liberação controlada de fármacos. Vários trabalhos focalizando estes materiais foram realizados nos últimos anos.^{10,12,13,19,58-62}

Nesta dissertação nanopartículas magnéticas foram adicionadas aos híbridos ureasil-poliéter devido aos seguintes motivos:

- Híbridos ureasil-poliéter foram estudados extensamente e mostraram grande potencial para o uso em dispositivos para liberação controlada de fármacos;
- Nanopartículas magnéticas apresentam comportamento superparamagnético e podem ser utilizadas para hipertermia magnética;^{20,27,31,37,40,63,64}
- Este sistema apresenta potencial para terapia combinada de hipertermia e liberação de fármaco, como mostrado por Brulé e colaboradores.⁴⁵

2 Objetivos

Como objetivo geral deste trabalho foi proposto o desenvolvimento de novos materiais com potencial de aplicações biomédicas, baseados em sistemas híbridos ureasil-poliéter contendo nanopartículas superparamagnéticas de ferrita de cobalto ou maguemita, homogeneamente distribuídas. A ideia central foi a conjugação das propriedades individuais dessas duas classes de materiais, unindo o superparamagnetismo e a liberação controlada por estímulos externo.

A união destas propriedades em um mesmo sistema possibilita utilizar as propriedades magnéticas da ferrita de cobalto para gerar hipertermia *in situ*, a qual pode ser combinada com a liberação controlada de fármacos incorporados na matriz híbrida ureasil-poliéter.

Neste sentido as seguintes metas específicas foram buscadas:

- i. Preparação dos dispositivos híbridos ureasil-poliéter;
- ii. Incorporação das nanopartículas magnéticas nas matrizes híbridas;
- iii. Incorporação de curcumina ou diclofenaco de sódio nas matrizes;
- iv. Caracterização das propriedades estruturais das matrizes obtidas avaliando adequação entre a estrutura do suporte, as nanopartículas magnéticas e os fármacos;
- v. Avaliação das propriedades magnéticas das nanopartículas, tanto na matriz quanto em suspensão e monitoramento da liberação *in vitro* dos fármacos sob aplicação de campo magnético externo.

CAPÍTULO 3

EXPERIMENTAL

1 Materiais

Os materiais utilizados para a síntese do precursor foram o O,O'-bis(2-aminopropil)-poli(óxido de etileno oxide) (PEO1900), com massa molar de 1900 g·mol⁻¹ (Sigma-Aldrich); 3-isocianato propiltrietoxi silano (ICPTES) (95% ,Sigma-Aldrich), e etanol anidro (99,8%, Synth). Para a síntese das nanopartículas de CoFe₂O₄ e γ-Fe₂O₃ foram utilizados nitrato de cobalto(II) hexa-hidratado (98%, Sigma-Aldrich), nitrato de ferro(III) nona-hidratado (98%, Sigma-Aldrich), nitrato de ferro(II) hexa-hidratado (98%, Sigma-Aldrich) uma solução de 10 mol·L⁻¹ de hidróxido de sódio, ácido nítrico (65%, Sigma-Aldrich). Como fármaco foi utilizada a curcumina (CMN) (≥95% Sigma-Aldrich) e o diclofenaco de sódio (DCFNa) (Sigma-Aldrich).

2 Parte experimental

2.1 Síntese do precursor U-PEO1900

Na primeira etapa da síntese foram preparados os precursores híbridos a partir da reação entre os grupos amina terminais da macromolécula de PEO1900, com o agente reticulador ICPTES, na razão de 1:2. Estes reagentes foram agitados em etanol anidro, sob refluxo durante 6 h a 78 °C, resultando em uma solução precursora híbrida com uma concentração de ~ 0,21 mol·L⁻¹. Este precursor obtido foi armazenado a temperatura ambiente em um dessecador para evitar qualquer nova reação de hidrólise.

2.2 Síntese das nanopartículas de maguemita (γ-Fe₂O₃)

As nanopartículas de maguemita γ-Fe₂O₃ foram sintetizadas e cedidas pelo grupo da Professora Christine Ménager (Laboratoire Phenix, Pierre and Marie Curie University (UPMC)). A síntese foi realizada em duas etapas, utilizando o método de co-precipitação de íons de Fe(II) e Fe(III) em meio alcalino, descrito por Massart⁶⁵ seguido de um processo de oxidação. Através da co-precipitação de íons de ferro (II) e ferro (III) foram obtidas partículas de magnetita (Fe₃O₄), que posteriormente foram oxidadas a maguemita a partir da adição de nitrato de ferro (III) e ácido nítrico.

As nanopartículas assim obtidas são estáveis em meio ácido (pH 1,5). A função do ácido nesta suspensão é gerar uma carga superficial nas nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, formando grupos Fe-OH_2^+ , que são contrabalanceados por NO_3^- . Este procedimento é necessário para impedir a precipitação das nanopartículas e assim mantê-las em suspensão. Este sistema (ferrofluido) já foi extensivamente estudado pelo grupo francês colaborador do projeto na qual denominamos com um ferrofluido. As amostras foram diluídas em pH 1,5 para obtermos $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(x)$, onde x é porcentagem em massa, e pode ser 3,2, 0,32, 0,032, e 0,0032%.

2.3 Síntese das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4)

A suspensão coloidal de nanopartículas de ferrita de cobalto foram cedidas pelo pesquisador Sébastien Abramson, do Laboratoire de Physicochimie des Electrolytes, et Nanosystèmes Interfaciaux, PHENIX, da UPMC. A síntese foi realizada a partir de uma solução de cobalto(II) e nitrato de ferro(III) de concentração total $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A esta solução foi adicionado hidróxido de sódio para o ajuste do pH para 13. Após este processo a solução foi agitada e então adicionada a um autoclave de teflon a 200°C por 120h. O processo hidrotérmico foi utilizado para o fornecimento de energia suficiente para inclusão dos íons de cobalto na estrutura espinélio. Posteriormente a suspensão foi resfriada naturalmente a 25°C e o precipitado foi ressuspensionado em uma solução aquosa de ácido nítrico pH 2. A suspensão resultante continha 14,5% em massa de ferrita de cobalto. A partir desta suspensão foram preparadas outras suspensões, mais diluídas, com 1,45, 0,145, e 0,0145% em massa, cuja amostras serão denominadas $\text{CoFe}_2\text{O}_4(x)$, onde x é a porcentagem em massa de ferrita de cobalto na suspensão. ⁶⁶

2.4 Síntese dos nanocompósitos

Os monolitos foram obtidos a partir das reações de hidrólise e condensação dos grupos $-\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$, que estão presentes nas macromoléculas dos precursores híbridos. A Figura 14 esquematiza, de maneira geral, a preparação dos nanocompósitos apresentados neste trabalho.

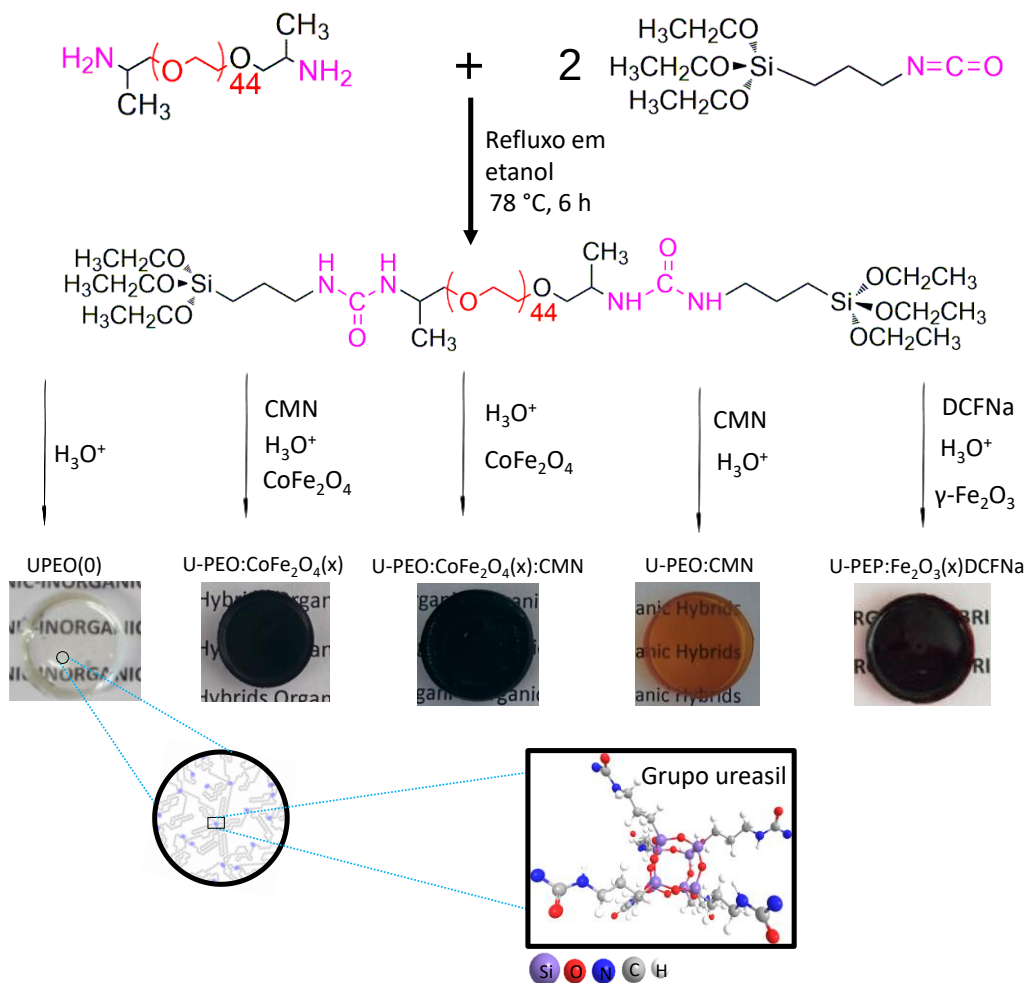


Figura 14. Esquema de síntese dos materiais.

Fonte: autor.

As reações de hidrólise e condensação foram inicializadas pela adição de 0,075 mL de solução de HNO_3 ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a 0,5 mL de solução precursora, seguido pela adição de 0,295 mL de solução HNO_3 de pH ~ 2 no caso da amostra sem nenhum tipo de MNP. Para a síntese dos nanocompósitos contendo MNP, a solução ácida de pH ~ 2 foi substituída por um volume igual de suspensão coloidal de CoFe_2O_4 (pH ~ 2) em concentrações diferentes (14,5; 1,45; 0,145; e 0,0145% em massa de CoFe_2O_4), resultando em amostras com ~21,4; 2,14; 0,214; e 0,0214% em massa de CoFe_2O_4 , respectivamente, em relação a massa final de material obtido. Para as sínteses dos híbridos contendo MNP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ foram utilizados os mesmos volumes de solução de ácido nítrico, solução precursora e de suspensão de diferentes concentrações de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (3,2, 0,32, 0,032, e 0,0032%), resultando em

nanocompósitos de concentração final de 5, 0,5, 0,05 e 0,005% em relação a massa final de material. Na etapa final, xerogéis cilíndricos de cerca de 20 mm de diâmetro e 0,5 mm de altura, pesando ~ 0,2 g foram obtidos após secagem a temperatura ambiente durante 48 h. Os materiais contendo CoFe_2O_4 foram nomeados como U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(x)$, onde o x representa a porcentagem em massa de MNP no nanocompósito e os materiais contendo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ foram nomeados U-PEO: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(x)$, onde x representa a porcentagem em massa de maguemita. Os nanocompósitos contendo CMN e DCFNa foram preparados utilizando o mesmo esquema descrito acima, porém foi incorporado CMN e DCFNa no material antes da hidrólise. Um resumo das amostras preparadas é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Amostras preparadas com diferentes quantidade de CoFe_2O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e curcumina.

Amostras	Porcentagem em massa de CoFe_2O_4 (%)	Porcentagem em massa de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (%)	Massa de DCFNa (μg)	Massa de CMN (μg)
U-PEO:SDCF	-	-	5000	-
U-PEO:CMN	-	-	-	500
U-PEO: $\text{Fe}_2\text{O}_3(0,0032)$	-	0,0032	-	-
U-PEO: $\text{Fe}_2\text{O}_3(0,032)$	-	0,032	-	-
U-PEO: $\text{Fe}_2\text{O}_3(0,32)$	-	0,32	-	-
U-PEO: $\text{Fe}_2\text{O}_3(3,2)$	-	3,2	-	-
U-PEO: $\text{Fe}_2\text{O}_3(3,2)$ DCFNa	-	3,2	5000	-
U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(0,0214)$	0,0214	-	-	-
U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(0,214)$	0,214	-	-	-
U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(2,14)$	2,14	-	-	-
U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(21,4)$	21,4	-	-	-
U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(2,14)$ CMN	2,14	-	-	500

Fonte: autor.

3 Técnicas de caracterização

Foram empregadas diversas técnicas, possibilitando caracterizar o material dentro de uma ampla gama de níveis estruturais, além de ensaios que mostram a potencialidade dos nanocompósitos para a aplicação em sistemas de liberação de fármaco e hipertermia magnética.

3.1 Caracterização da estrutura molecular e comportamento térmico

3.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IR)

Como caracterização da estrutura molecular foi realizado IR com transformada de Fourier (FTIR) para determinação dos principais grupos presentes na rede do nanocompósito e também presentes na CoFe_2O_4 , que apresentam bandas de vibração na região analisada no espectro. Os espectros FTIR foram coletados num equipamento Frontier IR Dual Range da PerkinElmer, instalado no IQ/UNESP. A faixa de número de onda foi de $350 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, embora o espectro seja apresentado apenas a faixa de $350 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ para melhor visualização dos principais eventos.

3.1.2 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As medidas de calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizadas utilizando um calorímetro TA Instruments modelo Q100, instalado no GFQM/IQ/UNESP. Aproximadamente 20 mg de amostra foram removidos dos xerogéis híbridos e colocados em uma panela de alumínio de 40 μL . Cada amostra foi aquecida de -30°C a 120°C , a uma taxa de aquecimento (dT/dt) igual a $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob fluxo de gás N_2 , fornecido a $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

3.2 Caracterização estrutural e nanoestrutural

3.2.1 Difração de raios X (DRX)

A técnica de difração de Raios X foi utilizada para caracterização estrutural das nanopartículas de CoFe_2O_4 , e também dos híbridos contendo, ou não, CoFe_2O_4 . Para tanto foi utilizado o equipamento de Difração de Raios X, marca SIEMENS, modelo D5000, DIFFRAC PLUS XRD Commander, instalado no Departamento de Físico-Química. Tal equipamento foi operado utilizando a geometria BRAGG –

BRENTANO, θ -2 θ , Radiação Cu K α , com detector de Cintilação e Monocromador de Grafite. A varredura de 2 θ foi feita de 10° a 80°, com passo de 0,02°/3 s.

3.2.2 Espectroscopia de Absorção de raios X na região de XANES

Espectros de absorção de raios X na região de XANES (X ray absorption Near Edge Structure) foram obtidos a temperatura ambiente no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os espectros foram coletados com um passo de 0,2 eV, três espectros por amostra, a fim de verificar a reprodutibilidade das características espectrais. As amostras tiveram suas intensidades normalizadas utilizando um polinômio, com o auxílio do software Athena.⁶⁷ A calibração da energia também foi realizada para cada espectro a partir da medida da borda de absorção K das folhas de ferro e cobalto metálicas, ambas medidas simultaneamente durante as medidas das amostras. Os espectros foram coletados entre 7568-8700 eV para a borda do cobalto (Co K edge), e entre 6950-7677 eV para a borda do Ferro (Fe K edge), porém, apenas a região de XANES será apresentada e discutida.

3.2.3 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).

A nanoestrutura dos nano compósitos de cobalto e suspensões coloidais foram analisadas por espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS), na linha de luz SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). As medidas foram realizadas com um feixe de comprimento de onda, λ , igual a 1,55 Å, um detector CCD bidimensional localizado a uma distância de 0,9 m da amostra, o que nos garantiu uma faixa de vetor de espalhamento, q , de $0,1 < q < 5 \text{ nm}^{-1}$. A nanoestrutura dos nanocompósitos de maguemitita foram analisadas por (SAXS) na linha de luz SWING do laboratório de luz síncrotron francês SOLEIL. As medidas foram realizadas a uma energia de 7,7 KeV, com um detector de CCD bidimensional localizada a uma distância de 3,5 m e/ou 1 m a partir da amostra, a fim de alcançar uma grande região de vetor de espalhamento (q), variando de $0,1 < q < 5 \text{ nm}^{-1}$.

3.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das MNP de CoFe_2O_4 foram adquiridas com um instrumento da PHILIPS, modelo CM 200 SUPER TWIN. As imagens de TEM das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ foram obtidas, pela professora Christine Ménager em um microscópio Jeol-100 CX instalado no laboratório de microscopia eletrônica da *Faculté de Chimie de l'Université Pierre et Marie CURIE* (UPMC). Uma gota de suspensão diluída foi depositada sobre uma grelha de cobre revestida com carbono. A análise do tamanho das nanopartículas foi realizada com auxílio do software ImageJ. Durante as aquisições das imagens também foram realizadas medidas de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) para a suspensão coloidal de CoFe_2O_4 .

Imagens de TEM para os nanocompósitos foram adquiridas no *Institute de Chimie et de Matériaux de Paris-EST*, pelo professor Sébastien Abramson em um microscópio FEI Tecnai F20 operando a 200 keV. As amostras foram preparadas em primeiro lugar por meio de um ultra micrótomo, Cryo Ultra Microtome Leica Ultracut, a fim de obter fatias finas com uma espessura de 100 nm, sendo as amostras cortadas com a utilização de uma lâmina de diamante.

3.3 Caracterização magnética

3.3.1 Curvas de magnetização, SQUID

As caracterizações magnéticas dos materiais híbridos na presença de CoFe_2O_4 foram feitas num magnetômetro SQUID (aparelho da Quantum Design MPM-5S), instalado no laboratório de medidas magnéticas *Mesures Physiques à Basse Température* (MPBT), na UPMC. As análises foram realizadas a $T = 298\text{ K}$ e $T = 5\text{ K}$. Para obter curvas de magnetização-desmagnetização completas com ciclos inteiros de histerese, o campo magnético externo H foi primeiro aumentado durante as medições de 0 a 50000 Oe, então foi diminuído até -50000 Oe antes de ser re-aumentado até 50000 Oe. A curva de magnetização da célula foi também registrada

e subtraída das curvas de magnetização das amostras permitindo a remoção da contribuição diamagnética da célula.

3.3.2 Hipertermia magnética.

Para a caracterização do comportamento dos materiais frente a aplicação de um campo magnético alternado (AMF) foram realizadas medidas de hipertermia magnética, magnetohipertermia, utilizando um equipamento comercial (DM100 Series, *NanoScale Biomagnetics Corp.* instalado nas dependências do GFQM do IQ/UNESP, Figura 15) capaz de aplicar um AMF com frequência, f , e intensidade máxima do campo (H_0), reguláveis. As medidas de aquecimento induzido por um campo magnético alternado foram efetuadas a frequências de 420 kHz e 280 kHz, com a amplitude máxima de $14,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$. Foram utilizados 1 ml de suspensão coloidal de CoFe_2O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, e 0,2 g de $\text{U-POE}:\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(\text{x})$ e $\text{U-POE}:\text{CoFe}_2\text{O}_4(\text{x})$, que foram colocadas em suportes adequados para materiais líquidos e sólidos para a realização do experimento. O suporte de amostras foi posicionado no centro da bobina de cobre e a temperatura foi medida com um sensor de temperatura de fibra óptica. O aquecimento da bobina foi evitado por um banho mantido a temperatura controlada por termostato entre $\sim 10\text{-}15^\circ\text{C}$. Uma massa equivalente de amostras líquidas e sólidas, sem $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ou CoFe_2O_4 foram medidas para confirmar que nenhum aquecimento induzido pela bobina ocorreu no porta amostras na ausência das nanopartículas.

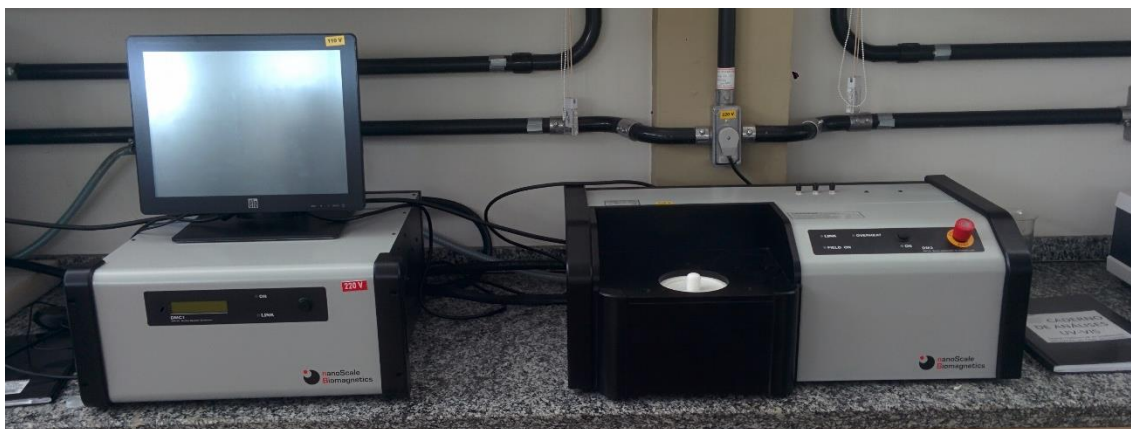


Figura 15. Foto do equipamento para medidas de hipertermia, DM100 Series, NanoScale Biomagnetics Corp., instalado nas dependências do GFQM do IQ/UNESP.

Fonte: Autor

3.4 Ensaios de liberação controlada de fármacos e viabilidade celular

3.4.1 Teste de Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados pela Dr. Bruna Galdorfini Chiari, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, utilizando o método do MTT. Este método tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), formando cristais insolúveis de formazana, de coloração violeta.⁶⁸

Para isto, as células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram mantidas a $37\pm 2^\circ\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . As células com confluência de 80 a 90% após a 3ª passagem foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos e, então, semeadas em placas de 96 poços. Para a neutralização da tripsina, foi utilizado o meio de cultura com soro fetal bovino. A densidade celular para os ensaios de citotoxicidade (MTT) foi de 2×10^5 células/mL. As placas foram incubadas por 24 horas para adesão completa das células às placas de 96 poços.

Considerando o caráter insolúvel das formulações, estas foram mantidas em contato por 24 horas com o meio de cultura. Foram adicionadas porções de, aproximadamente, 0,19 g das amostras em 7,5 mL de DMEM, de acordo com metodologia descrita pelo *International Standards Organization*. Desta forma, foi possível avaliar a toxicidade dos resíduos liberados pelo material no meio de cultura.⁶⁹ O tratamento foi realizado com as amostras, após preparo, diretamente em contato com as culturas celulares. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas delicadamente com tampão fosfato⁷⁰ e 100 μL de MTT (1 mg/mL em PBS) foram adicionados em cada poço. As células na microplaca foram incubadas a $37\pm 2^\circ\text{C}$, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violeta de formazana (3 a 5 horas).

Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 μL de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 595 nm, foi realizada, em leitor de placas.

A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, em seguida foi determinada também a porcentagem de células vivas. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em três experimentos independentes.

3.4.2 Ensaio de liberação de fármaco

Foi utilizado o espectrômetro Cary 60 UV-Vis, da Agilent Technologies, instalado no GFQM do IQ/UNESP para acompanhar os testes de liberação identificando a concentração liberada do fármaco em função do tempo sem e com a presença de campo magnético.

- *Diclofenaco de sódio*

Para quantificar a quantidade de DCFNa liberado foi usado ~ 0,2 g do nanocompósito e 50 mL de solução tampão de fosfato (pH = 7,2). Durante o experimento os monólitos ficaram imersos no tampão fosfato. Foram coletadas cerca de 4 mL da solução de liberação a cada 5 min durante 30 min, e após este período as amostras eram coletadas a cada 30 min e realizadas medidas de espectroscopia na região do UV-Vis para quantificação. Para realização da quantificação, foi determinado o coeficiente de absorvidade do DCFNa a partir de uma curva de calibração, utilizando concentrações entre 0,112 e $1,12 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Após a medida, cerca de 2 minutos, a solução foi despejada novamente no meio de liberação. O ensaio foi realizado durante 8 h.

Cinco experimentos foram realizados em diferentes temperaturas do tampão: 0, 25, 37, 50 °C e um experimento teve início a 37 °C num sistema de banho-maria, e então o sistema de liberação foi inserido no equipamento de hipertermia, sendo aplicado um AMF de $14,9 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ e frequência de 420 kHz.

- *Curcumina*

Num primeiro momento fez-se necessária a construção de uma curva de calibração da curcumina, utilizando-se um meio constituído de etanol, polisorbato 80,

propilenoglicol, e tampão fosfato pH7,2 na razão volumétrica 5:1:15:79(v/v). Os espectros foram coletados na região de 600-300 nm, monitorando-se a absorbância máxima que ocorre em 426 nm. Foram preparadas 5 amostras de concentração variada entre 2,01 e 9,96 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que cada amostra foi preparada três vezes para garantia da reprodutibilidade da curva.

Os ensaios de liberação foram realizados com o mesmo tampão utilizado para a curva de calibração, sempre a 37°C. Primeiramente foram adicionados 50 mL de solução de tampão em um bequer, que foi inserido no banho termostatizado. Após o equilíbrio térmico entre o banho e o bequer as amostras foram inseridas nestas soluções, e alíquotas coletadas durante 9 horas de experimento tiveram suas absorbâncias medidas em 426 nm, no mesmo espectrofotômetro citado acima. A amostra escolhida para a realização do experimento foi a U-PEO:CoFe₂O₄(2,14)CMN e U-PEO:CMN. Para a amostra U-PEO:CoFe₂O₄(2,14)CMN o experimento também foi realizado sob AMF (37 °C + AMF), aplicando um campo de frequência de 420 kHz e amplitude máxima de 14,9 kA.m⁻¹.

CAPÍTULO 4

ESTUDO DE SISTEMAS NANOCOMPÓSITOS

U-PEO:γ-Fe₂O₃

1 Comportamento térmico, caracterização magnética e nanoestrutural

A Figura 16 mostra a imagem de microscopia eletrônica de transmissão (a) e a curva de distribuição (b), para as nanopartículas monodispersas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(3.2)$ com um diâmetro médio de 12,7 nm e uma polidispersão com $\sigma = 0,32$. A imagem de crio-microscopia eletrônica assim como a curva de distribuição de tamanho Log-normal das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ dispersas no U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$ são mostradas na Figura 16c e Figura 16d, as MNP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ tem diâmetro médio de 12,0 nm e $\sigma = 0,75$. Estas imagens mostram a ausência de agregação e uma distribuição uniforme das MNP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

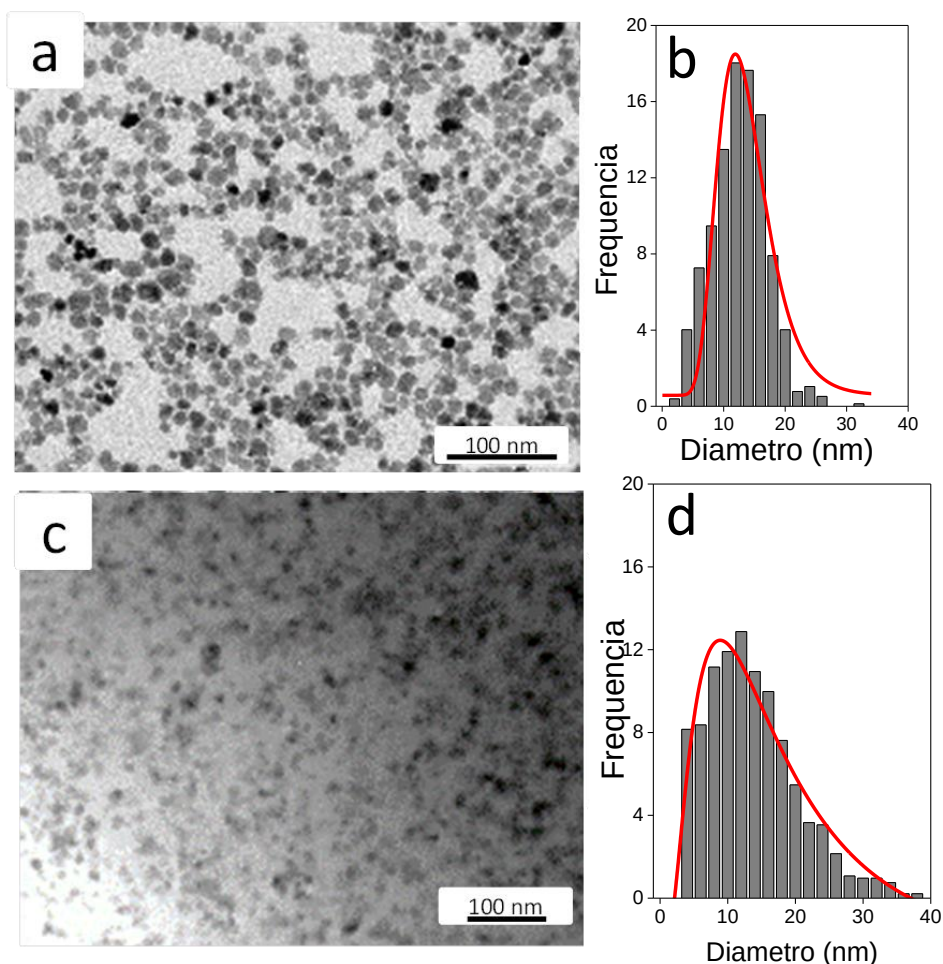


Figura 16. (a) TEM do $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(3.2)$ isolado a partir da suspensão coloidal; (b) Curva de distribuição Gaussiana das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(3,2)$ determinada a partir da TEM; (c) Cryo-TEM do nanocompósito U-PEO: $\text{Fe}_2\text{O}_3(5)$; (d) Curva de distribuição Gaussiana das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ determinada a partir da imagem do nanocompósito U-PEO: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$

Fonte: autor.

A Figura 17 apresenta as curvas de magnetização para a suspensão coloidal de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(3.2)$ assim como para o nanocompósito U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$. Usando a fórmula de Langevin modificada podemos ajustar a curva experimental por uma distribuição de tamanho Gaussiana determinando assim o diâmetro magnético de 10,9 nm e $\sigma = 0,33$ tanto para a suspensão de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(3.2)$ como para o nanocompósito U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$. Estes resultados corroboram os obtidos por TEM, além de confirmar a boa dispersão das nanopartículas.

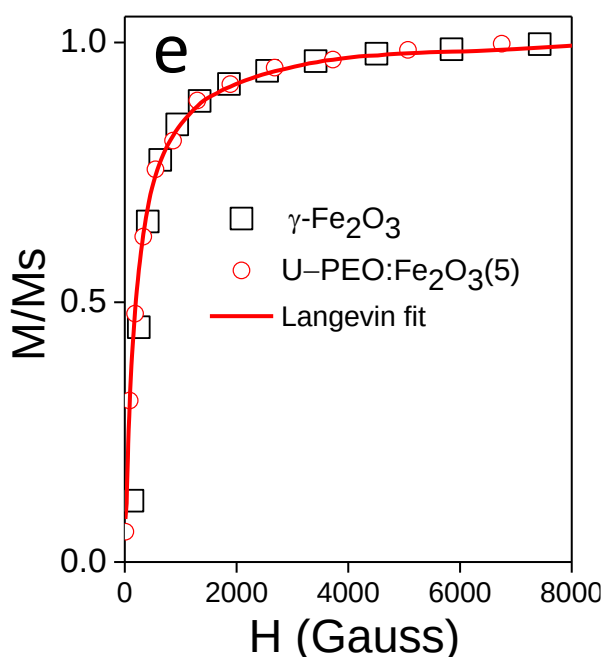


Figura 17. Curva de magnetização para a suspensão coloidal $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(3,2)$ e para o nanocompósito U-PEO: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$, ambos ajustados pela função de Langevin (linha vermelha contínua)

Fonte: autor.

É importante salientar que esta dispersão das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ foi conseguida sempre em pH ácido $\sim 1,7$. Então a síntese sol-gel dos nanocompósitos U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(x)$ dever ser feita em pH inferior a ~ 2 para manter a dispersão adequada de nanopartículas na matriz híbrida. Este comportamento fica evidente na Figura 18 que compara as curvas de SAXS do U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$ preparado em pH 1,7 (azul) e pH 3,7 (linha pontilhada vermelha). Para a curva de SAXS da amostra preparada em pH 3,7 observa-se a presença de uma dependência linear em baixos valores de q com valor de inclinação de -1,9, evidenciando a presença de agregados

fractais. Observa-se também a presença de um pico largo centrado em $\sim 0,34 \text{ nm}^{-1}$, evidenciando a interação entre as nanopartículas devido a coexistência de agregados densos de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

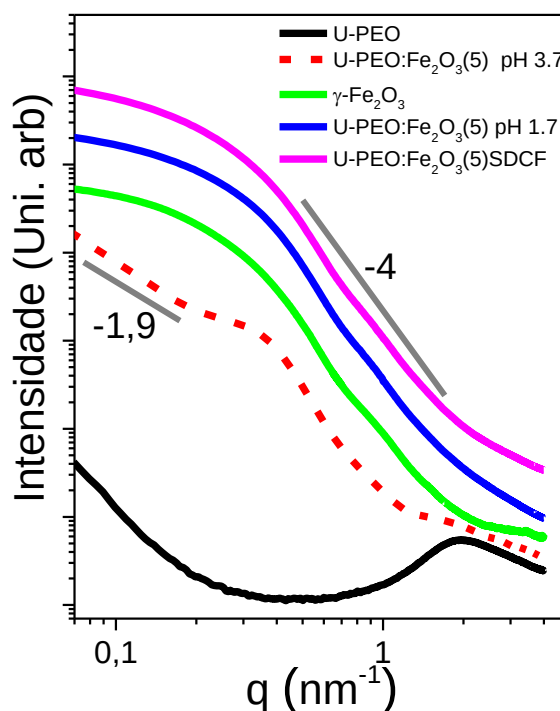


Figura 18. Curvas de SAXS para a matriz pura U-POE (preta), U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$ pH 3,7 (vermelho pontilhado), suspensão coloidal $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(3.2)$ pH 1,7 (verde), U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$ pH 1,7 (azul), U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$:DCFNa pH 1.7 (rosa).

Fonte: autor.

Por outro lado a curva de SAXS da amostra preparada em um pH inferior a 2 (curva azul) é característica de um sistema diluído de partículas evidenciando assim uma excelente dispersão da nanopartículas na matriz híbrida. A dispersão das nanopartículas em matrizes é essencial para a aplicação médica, pois não é recomendada aplicação direta de nanopartículas ácidas. Além disso, aplicação direta destas nanopartículas em meios biológicos pode levar agregação das mesmas causando riscos ao paciente, além disto, a aplicação de campo magnético pode causar a agregação das mesmas. Uma maneira de superar este problema é através da incorporação de nanopartículas em matrizes como o U-POE.

As curvas de SAXS apresentadas na Figura 18 mostram outras informações importantes do nosso sistema. Por exemplo, a curva de SAXS da matriz pura U-POE

exibe um pico largo em torno de 2 nm^{-1} , característico da distância de correlação entre os grupos siloxano. Com a incorporação das MNP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ na matriz este pico de correlação não é mais observado devido ao aumento do contraste eletrônico entre as MNP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e o U-POE. Observa-se também que todas as curvas das amostras contendo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ preparadas em pH inferior a 3 apresentam perfis semelhantes indicando que a suspensão coloidal $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nestas amostras são comparáveis. De forma mais detalhada, nota-se que as curvas de SAXS da suspensão coloidal $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ apresenta um decaimento gaussiano em valores elevados de q e um patamar a baixos valores. Este patamar, também conhecido como região de Guinier, é característico de uma dispersão diluída, ou seja, por um conjunto de partículas sem interação.⁷¹ O mesmo comportamento pode ser observado para as amostras U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$ e U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$:DCFNa, as duas amostras preparadas em pH inferior a 2. Em altos valores de q as curvas exibem uma dependência linear com uma inclinação de valor -4. Este comportamento está de acordo com a lei clássica de Porod ($I(q) \propto q^{-4}$), indicando que o modelo de duas densidades eletrônicas foi satisfeito e também que a interface entre as nanopartículas e a matriz é bem definida, com ausência de heterogeneidades, evidenciando que cada nanopartícula pode ser considerada como um único objeto. Sob tais condições, a intensidade de espalhamento na região de baixos valores de q ($q.R_g \approx 1$) pode ser aproximado pela lei de Guinier que permite determinar o raio de giro médio (R_g) das nanopartículas dispersas ou de agregados⁷¹. Os valores de R_g encontrados para as $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ em suspensão coloidal ou dispersas na matriz foram $\sim 10,5 \text{ nm}$. Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos por TEM e pelas curvas de magnetização, confirmando a dispersão adequada das $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ na matriz U-POE.

As medidas de hipertermia magnética foram realizadas para as suspensões coloidais contendo (3,2, 0,32, 0,032 e 0,0032% em massa de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e para os nanocompósitos U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(x)$:DCFNa sendo x (5, 0,5, 0,05 e 0,005% em massa). Todos os nanocompósitos aqui analisados continham 3 % em massa de DCFNa. Primeiramente as amostras foram termostatizadas a 25°C , sendo posteriormente aplicado o AMF com uma amplitude máxima de $14,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ e uma frequência de 420 ou 280 kHz.

A Figura 19(a) e Figura 19(b) apresenta a evolução temporal do aumento de temperatura para as suspensões coloidais e para os nanocompósitos, respectivamente, aplicando um AMF de amplitude de $14,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ e 420 kHz . A Figura 19(c) e Figura 19(d) apresenta a evolução temporal do aquecimento para as mesmas amostras aplicando um AMF de amplitude de $14,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ e frequência de 280 kHz .

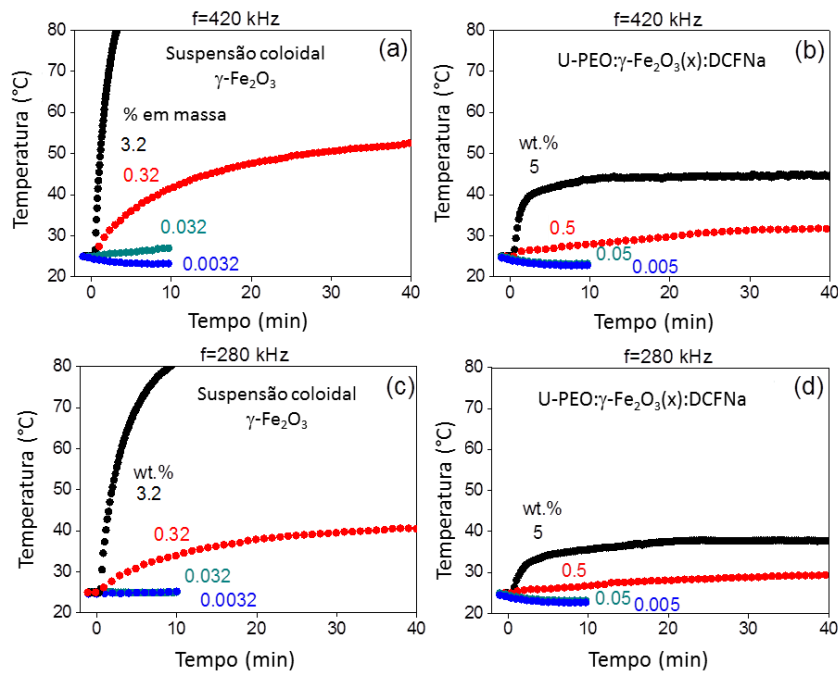


Figura 19. Evolução temporal do aumento de temperatura sob aplicação de AMF, amplitude de $14,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ e frequência de 420 e 280 kHz para as amostras com diferentes concentrações de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. (a) e (c) suspensão coloidal; (b) e (d) nanocompósitos.

Fonte: autor

A partir das curvas de aquecimento em função do tempo a taxa de aquecimento máxima $(dT/dt)_{\text{máx}}$ foi calculada, através de um ajuste linear no primeiros 30 segundos de aplicação do AMF. A Figura 20(a) mostra como foi a região em que o ajuste linear foi realizado para as suspensões de maguema, enquanto a Figura 20(b) mostra a região em que o ajuste linear foi realizado para os híbridos.

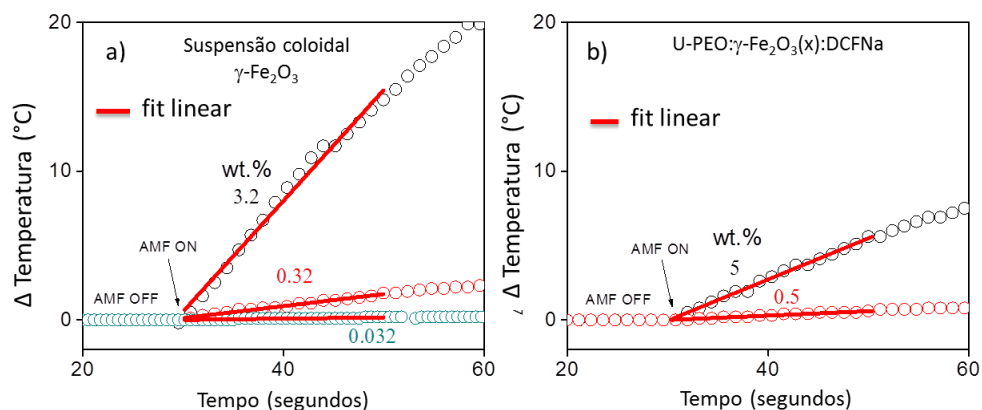


Figura 20. Evolução temporal do aumento de temperatura sob aplicação de AMF, amplitude de 14,9 kA m⁻¹ e frequência de 420 kHz nos primeiros 30 segundos de aplicação de AMF para as amostras com diferentes concentrações de γ-Fe₂O₃. (a) suspensão coloidal; (b) nanocompósitos

Fonte: autor.

Os valores de $(dT/dt)_{\max}$ obtidos a partir destas curvas foram utilizados para o cálculo do SLP, Equação 4, e estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de $(dT/dt)_{\max}$ para nanocompósitos com maguemita.

Amostras	% massa de γ-Fe ₂ O ₃	$(dT/dt)_{\max}$ (°C·s ⁻¹)
γ-Fe ₂ O ₃	0.032	0.00845
	0.32	0.0809
	3.2	0.746
U-POE:γ-Fe ₂ O ₃ (x):DCFNa	0.5	0.0298
	5	0.277

Fonte: autor.

A Figura 21 apresenta as imagens das amostras estudadas juntamente com as curvas de aumento de temperatura em função da concentração de γ-Fe₂O₃, sendo que cada curva representa um tempo de exposição ao campo. Estes dados foram extraídos a partir das curvas de aquecimento mostradas na Figura 19(a) e Figura 19(b) (frequência 420 kHz).

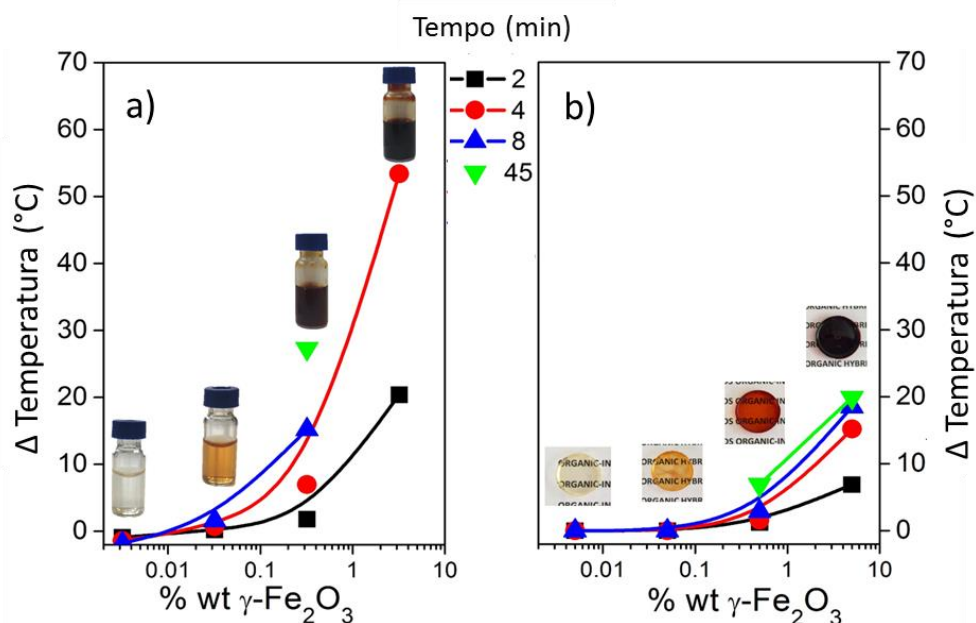


Figura 21. Dependência da temperatura com a concentração de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ após aplicação de AMF, $14,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ e frequência de 420 kHz, para (a) suspensão coloidal contendo diferentes quantidades de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ em massa (3,2, 0,32, 0,032 and 0,0032% em massa); e (b) nanocompósitos U-PEO contendo diferentes quantidades de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ em massa (5, 0,5, 0,05 and 0,005%). Dados extraídos da Figura 20(a) e 20(c), respectivamente, em tempos determinados

Fonte: autor

Independentemente da natureza da amostra as curvas mostram um aumento mais intenso da temperatura com o aumento da concentração de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Este efeito é menor para os nanocompósitos U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$:DCFNa. Para as suspensões coloidais o aparecimento de aquecimento ocorre para a amostra com concentração $\geq 0,032\%$ de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Para os nanocompósitos o aparecimento de aquecimento é verificado para a amostra 15 vezes mais concentrada em nanopartículas (0,5% em massa de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

A Figura 21(a) mostra que a suspensão coloidal contendo 3,2 % de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ apresenta um aumento rápido e contínuo da temperatura, atingindo 80°C após 4 min de aplicação de AMF. Para a amostra 10 vezes menos concentrada verifica-se um aumento contínuo de temperatura após aplicação do AMF sendo que depois de 10 minutos o valor de temperatura se torna praticamente constante, atingindo uma temperatura de 53°C após 50 min de exposição ao AMF. Para a amostra U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (5):DCFNa, observa-se um aumento rápido na temperatura de 25°C até um patamar constante de 44°C , mantendo-se estável durante todo o tempo de

aplicação. Para a amostra dez vezes menos concentrada, o U-POE:γ-Fe₂O₃(0,5)DCFNa, uma temperatura constante de 32°C é obtida após 25 minutos de exposição ao AMF (Figura 21(b)). Conforme esperado quando realizamos os mesmos experimentos, mas com uma frequência menor, o aumento de temperatura é menor; estes dados estão apresentados na Figura 19(c) e Figura 19(d).

Os patamares de temperatura obtidos para as amostras U-POE:γ-Fe₂O₃(5 e 0,5%) indicam que estes nanocompósitos são capazes de alcançar temperaturas na faixa da terapia de hipertermia magnética. Temperaturas entre 40 °C e 45 °C levam à inativação de processos celulares normais, enquanto acima de 45 °C, ocorre necrose. Para a aplicação clínica da hipertermia magnética, o aquecimento local excessivo pode ser evitado escolhendo sistemas que alcancem uma temperatura pré-estabelecida e controlável. ⁴³Fato importante a ser destacado é que o aumento de temperatura é uma propriedade extensiva dependente das características das amostras como: concentração de nanopartículas magnéticas, viscosidade da matriz, interações nanopartículas matriz etc, e também da capacidade de transferência de calor para o porta amostras. Em contrapartida, o aumento local da temperatura é independente de transferência de calor circundante e da geometria da amostra, então o valor máximo da taxa de aquecimento (dT/dt)_{max} foi um dos parâmetros usados para calcular a perda de potência específica (SLP) dada pela Equação 4

Para utilização da Equação 4 é necessário o conhecimento da capacidade calorífica mássica (C_m) do material em questão. Este parâmetro pode ser extraído das curvas de DSC, usando a Equação 8:

$$C_m = \frac{K \times \Delta y_{\text{sample-BL}}}{\frac{dT}{dt} \times m_{\text{sample}}} \quad (8)$$

onde K é a sensibilidade do calorímetro, Δy_{sample-BL} é a diferença de fluxo de calor entre o sinal da amostra e a linha base, dT/dt é a taxa de aquecimento, e m_{sample} é a massa de amostra. A linha de base foi determinada em condições de operação igual a das amostras (dT/dt = 10 °C·min⁻¹, atmosfera N₂), usando uma panela de alumínio vazia de 40 μL. A sensibilidade do calorímetro (K) foi determinada a partir da DSC da amostra padrão de safira.

A Figura 22(a) mostra como o valor de $\Delta y_{\text{sample-BL}}$ foi encontrado. Após encontrarmos o valor de K, igual a 1,15, a capacidade calorífica da safira foi recalculada em diversas temperaturas e então foram comparadas com a capacidade calorífica da safira descrita na literatura. Como podemos ver na Figura 22(b) há uma boa concordância entre os valores.

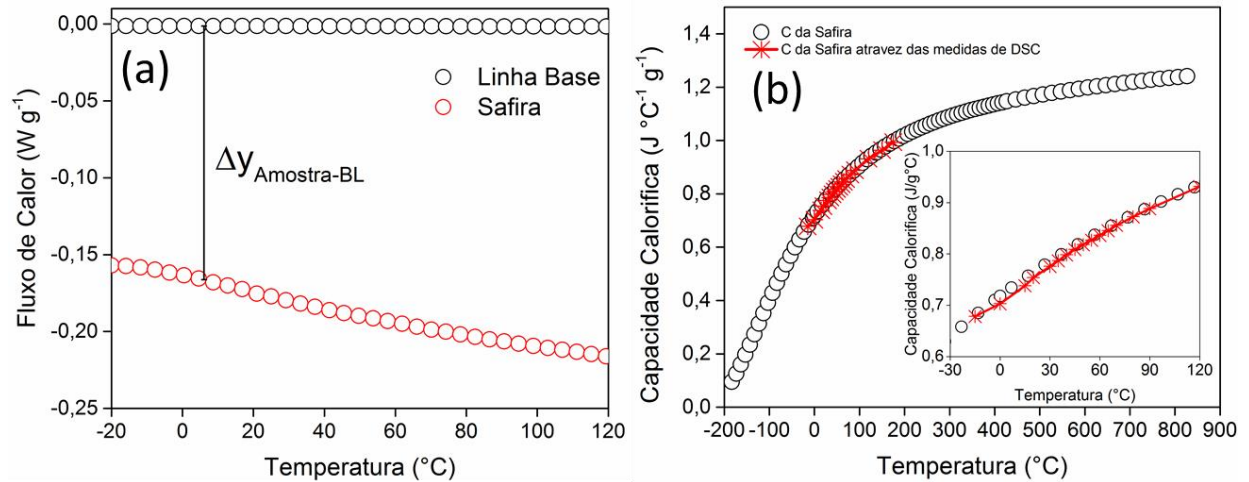


Figura 22. Exemplo de cálculo de Δy na curva de DSC; b) capacidade calorífica específica da safira calculada por DSC

Fonte: autor

As curvas de DSC para as amostras são mostradas na Figura 23, juntamente com seus respectivos valores de temperatura de fusão máxima (T_f), grau de cristalinidade (D_c). A partir do pico endotérmico que todas curvas apresentam é possível extrair as informações citadas acima (T_f, D_c). A T_f pode ser obtida a partir do mínimo do pico endotérmico, enquanto o D_c pode ser calculado utilizando a Equação 9, relacionando a entalpia de fusão de PEO semi-cristalino (ΔH_f) na amostra e a entalpia de fusão para uma amostra de PEO1900 100% cristalina ($\Delta H_p=188,9 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$).

12

$$D_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_p} \times 100 \quad (9)$$

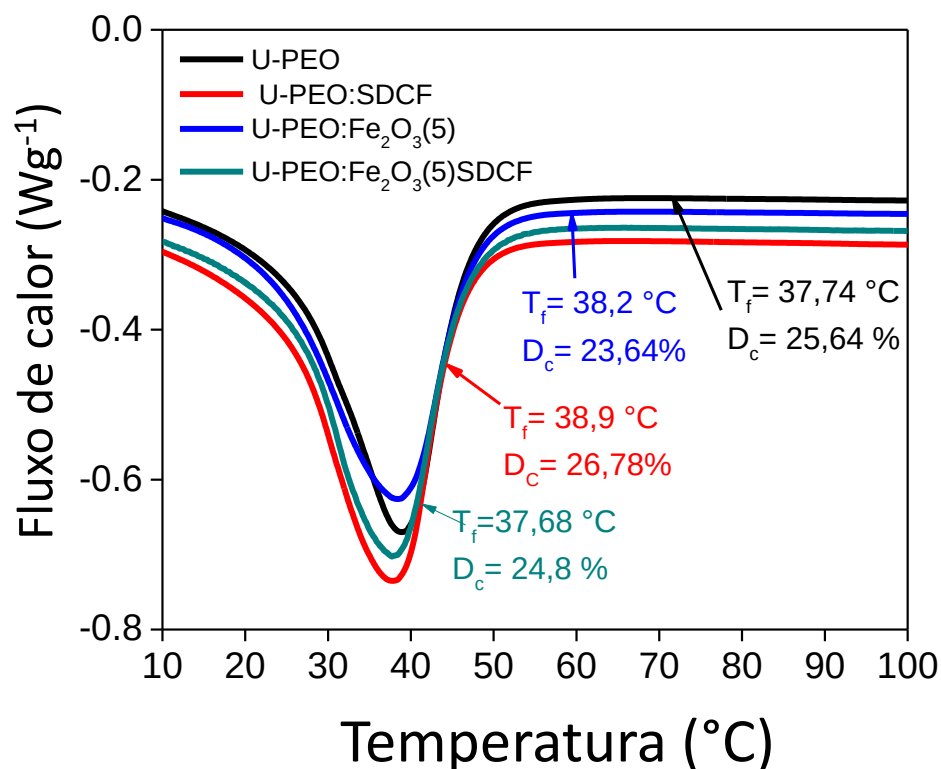


Figura 23. Curvas DSC do U-PEO, mostrando a temperatura fusão, (T_f) e o grau de cristalinidade (D_c).

Fonte: autor

A Figura 24 apresenta a estrutura tipo esferulita do PEO semicristalino.⁷² Esta estrutura é composta de duas regiões, uma amorfa, onde as cadeias de PEO não assumem nenhum arranjo espacial, enquanto na região cristalina o PEO se organiza em forma de lamelas, sendo que estas lamelas se desfazem acima da temperatura de fusão

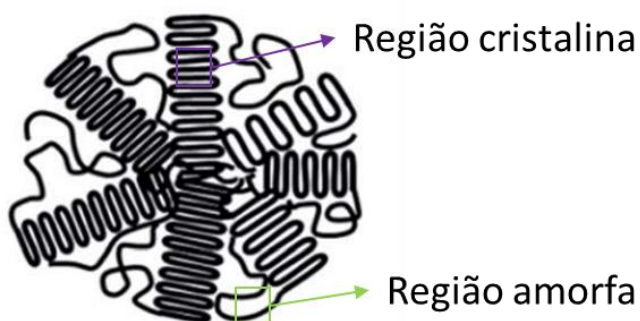


Figura 24. Representação esquemática das regiões cristalina e amorfa do poli(óxido de etileno).

Fonte: adaptado da referência 72.

Os SLPs foram calculados apenas para as amostras com o aumento de temperatura mensurável, utilizando o valor médio de C_m de $2,12 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot^\circ\text{C}^{-1}$, calculado pela Equação 4. Neste caso para as suspensões coloidais de concentrações 3,2 0,32, e 0,032% em massa de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, os valores obtidos 97, 106 e $110 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, são praticamente invariável. Para os nanocompósitos obteve-se o mesmo valor de SLP de $13,3 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ para as amostras U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(0.5)$ e U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$, sendo os valores determinados 8 vezes menores que os valores obtidos para as suspensões coloidais. Este fato pode ser explicado pela maior viscosidade da matriz semi-cristalina U-POE, quando comparada a suspensão coloidal em meio aquoso. A maior viscosidade da matriz híbrida impede a rotação das nanopartículas magnéticas anulando a geração de calor por relaxação Browniana. Na Tabela 3 estão resumidos os valores de SLP, com os respectivos valores de $(dT/dt)_{\text{max}}$ encontrados.

Tabela 3. Valores de SLP para nanocompósitos com maguemita

Amostras	% massa de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	SLP ($\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$)
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	0.032	110.38
	0.32	105.67
	3.2	97.45
U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(x)$:DCFNa	0.5	13.80
	5	12.80

Fonte: autor.

2 Ensaios de liberação controlada de fármaco e comportamento térmico

Para os testes de liberação de DCFNa usamos a amostra U-POE: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$:DCFNa. Para a quantificação de DCFNa liberado durante os experimentos foi realizada uma curva de calibração de DCFNa em meio de tampão fosfato, apresentado na Figura 25.

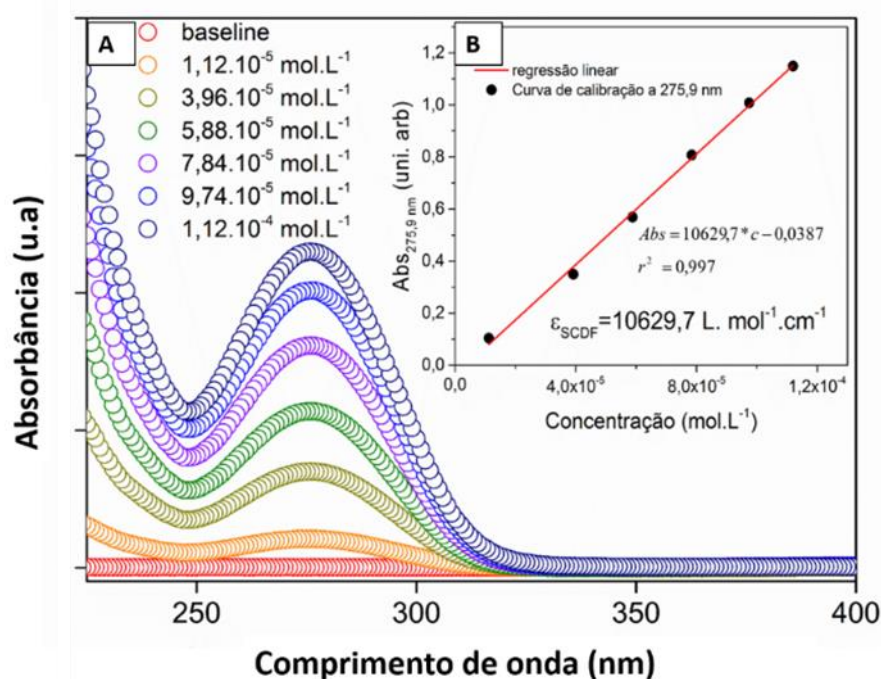


Figura 25. (a) Espectros de absorção no UV-vis do diclofenaco de sódio. (b) Curva de calibração para o DCFNa realizada em meio tampão fosfato, pH 7,2.

Fonte: autor

Os testes de liberação de DCFNa foram realizados em solução tampão fosfato (pH = 7,2) durante 8 horas. Foram realizados quatro experimentos em diferentes temperaturas (0, 25, 37, 50 °C). Um quinto teste foi realizado com a solução tampão com temperatura inicial de 37°C aplicando um AMF de $14,9 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ e frequência de 420 kHz. O AMF foi aplicado durante 45 minutos, levando a um aumento da temperatura da solução tampão para 57 °C. Em seguida o AMF era desligado e aguardava-se o retorno da temperatura do meio a 37 °C (~ 20 min), sendo este ciclo repetido 8 por vezes. Estes resultados estão apresentados na Figura 26.

Os resultados mostraram que a taxa de liberação aumenta com o aquecimento da amostra, seja em um banho contendo solução tampão, seja utilizando AMF. Estes dados estão apresentados na Figura 27.

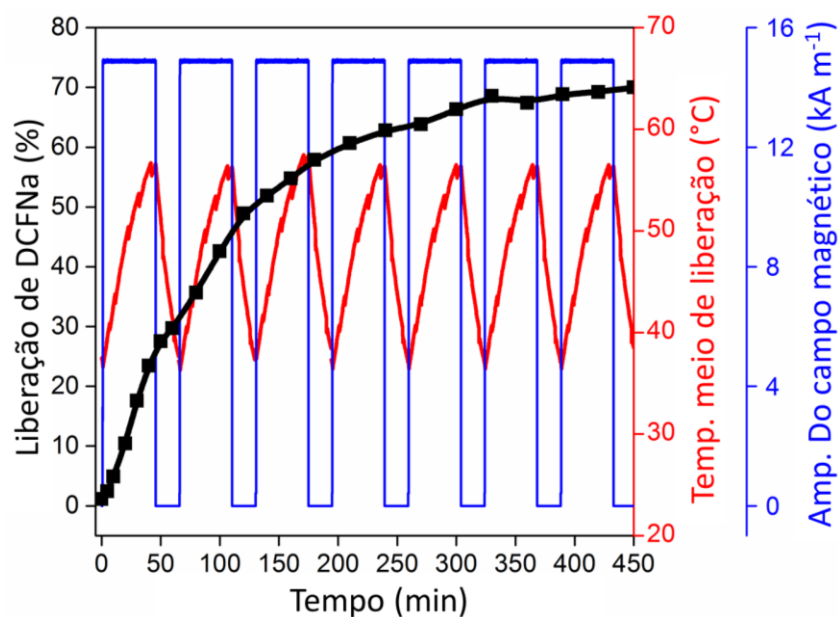


Figura 26. Condições experimentais utilizadas para o ensaio de liberação do DCFNa por aplicação de AMF. Liberação cumulativa de DCFNa (preto), amplitude do AMF (azul), temperatura da solução tampão fosfato contendo o nanocompósito (vermelho).

Fonte: autor

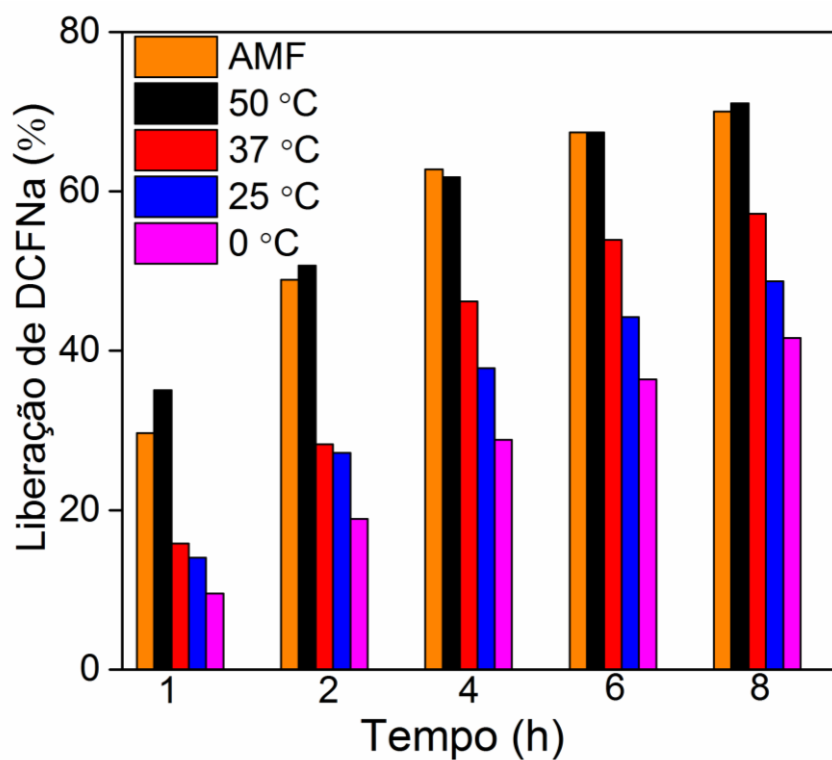


Figura 27. Resultados da Liberação de DCFNa medidas por UV-vis a 276 nm para amostra U-POE:γ-Fe₂O₃(5):DCFNa a 0, 25, 37 e 50 °C e sob aplicação de AMF.

Fonte: autor

Podemos observar pelos dados apresentados na Figura 27 que independentemente do tempo de experimento, a quantidade liberada de DCFNa seguiu a tendência de $0\text{ }^{\circ}\text{C} < 25\text{ }^{\circ}\text{C} < 37\text{ }^{\circ}\text{C} < 50\text{ }^{\circ}\text{C} \cong \text{AMF}$. Esta sequência pode ser explicada pela diminuição progressiva da cristalinidade do U-POE devido ao relaxação das cadeias do polímero induzida por absorção de água e a fusão dos domínios cristalinos U-POE $\sim 38\text{ }^{\circ}\text{C}$, encontrado para estas amostras (vide DSC).

O primeiro processo, que depende da difusão de água através da matriz U-POE que possui propriedades de hidrogéis, é mais lento a temperaturas menores, o que resulta em uma quantidade menor de DCFNa liberada. Perfis semelhantes de liberação foram observados para os experimentos conduzidos a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com aplicação de AMF. Podemos observar também que durante as duas primeiras horas de experimento a quantidade de DCFNa liberada para o experimento conduzido a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob aplicação de AMF é cerca de duas vezes maior que a quantidade de DCFNa liberada para o experimento a 37°C sem aplicação de AMF. Portanto, a taxa de liberação de DCFNa é significativamente maior quando o material é submetido a AMF. De fato, com aplicação de AMF a difusão e solubilidade do medicamento aumentam devido a fusão dos domínios cristalinos da matriz U-POE, facilitando a liberação do DCFNa. Estes resultados indicam fortemente o uso deste sistema para liberação deste fármaco, conjugado com uma fonte de hipertermia, que permite a fusão dos domínios cristalinos do U-POE pela aplicação de AMF, resultando num efeito de resposta a estímulos na faixa de temperaturas adequada para aplicação biomédica.

Outra forma de analisarmos a influência da temperatura na quantidade de DCFNa liberado é comparando a diferença da quantidade de DCFNa liberada pelo sistema U-POE: γ -Fe₂O₃(5):DCFNa em temperaturas acima da T_f dos domínios cristalinos, com os resultados obtidos as amostras testadas em temperaturas inferiores. A Figura 28(a) mostra a diferença obtida para os ensaios de liberação realizado à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e AMF com os dados de liberação a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Como pode ser observado a média da diferença de liberação foi superior a 25%. Esse valor médio cai para aproximadamente 20% quando a comparação é realizada com a amostra testada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, Figura 28(b). Realizando a mesma comparação para o ensaio realizado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, Figura 28(c), o valor médio encontrado está em torno de 15 %. A tendência observada a partir destas comparações é outro indício de que a

quantidade de domínios cristalinos influencia na quantidade de DCFNa liberado. A comparação realizada para os ensaios realizados a 50 ° e AMF são apresentadas na Figura 28(d) que apresentou uma diferença média de 1,4 %, mostrando que quando se trabalha acima do T_f do PEO a liberação é semelhante.

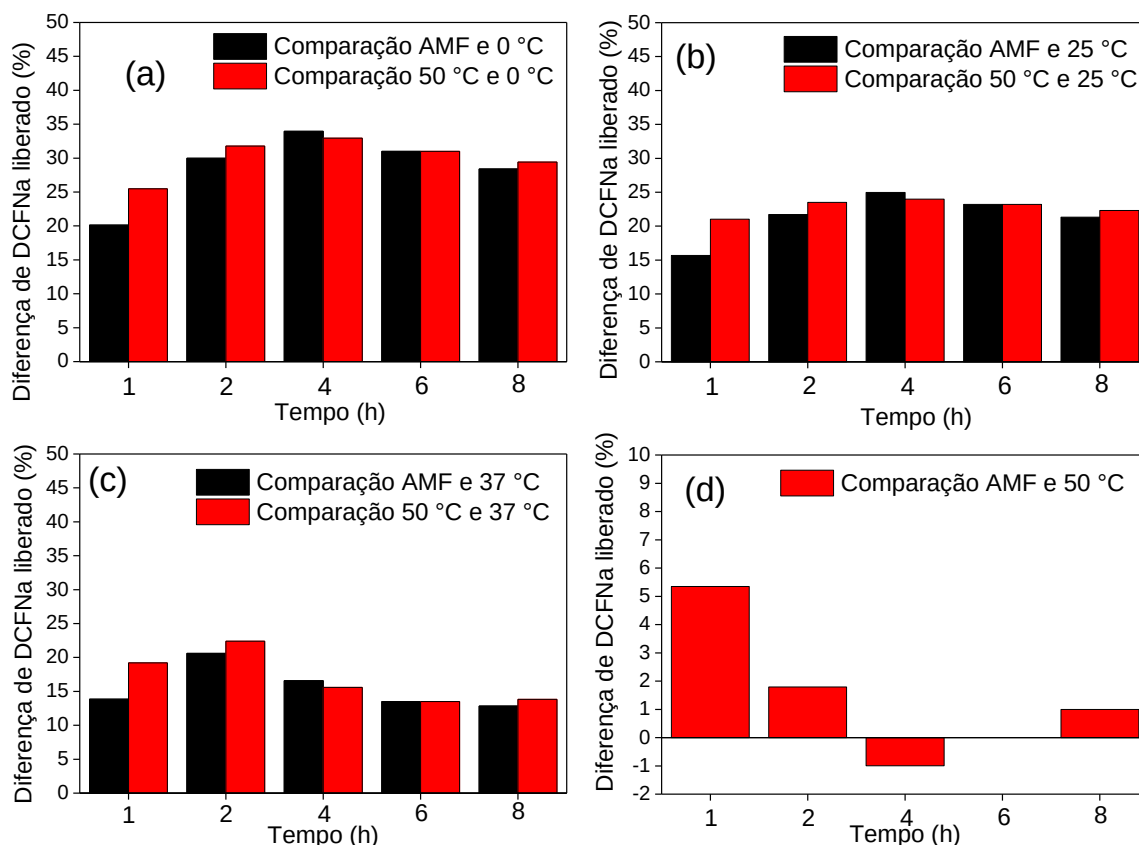


Figura 28. Comparação entre a diferença de DCFNa liberado nos ensaios de liberação realizados a 50 °C e sob AMF com o ensaio realizado à (a) 0 °C, (b) 25 °C, (c) 37 °C, e comparação entre os ensaios realizados a (d) 50 °C e sob AMF

Fonte: autor

Vários sistemas magnéticos utilizados para aplicações biomédicas dependem das propriedades de superfície das nanopartículas, que exercem o papel principal de interagir com os sistemas biológicos de forma biocompatível, conseguindo localização específica em proteínas células e tecidos.⁷³ Esses sistemas geralmente usam sínteses complexas para modificar a superfície das nanopartículas.⁷⁴ Em nosso caso usamos MNP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sem revestimentos as quais foram facilmente incorporadas a um material híbrido orgânico-inorgânico, gerando a formação de nanocompósitos em uma única etapa através do processo sol-gel. A dispersão

adequada destas nanopartículas nos híbridos foi conseguida simplesmente pelo controle do pH durante a síntese. Além disso, as propriedades superparamagnéticas dos nanocompósitos são bastante estáveis porque as nanopartículas magnéticas não são lixiviadas quando o nanocompósito é colocado em meio biológico e não se agregam sob aplicação de campo magnético. Outra vantagem da matrix U-POE é a capacidade de incorporação de quantidades elevadas de fármaco^{11,60} podendo ser utilizados fármacos quimioterápicos. Outro aspecto importante para a aplicação *in vivo* é que este material não apresenta citotoxicidade.⁷⁵

3 Conclusões

Relatamos a síntese de nanocompósitos em uma etapa através do processo sol-gel formados pela conjugação da matriz semicristalina ureasil-POE carregada com um fármaco modelo o DCFNa e nanopartículas superparamagnéticas de γ -Fe₂O₃ bem dispersas. O sistema mostrou controle ativo sobre a taxa de liberação de medicamento conforme evidenciado pelos efeitos locais de hipertermia causados pela exposição a um AMF. A exposição ao AMF permitiu a fusão dos domínios cristalinos do U-POE em ~ 38°C, favorecendo a difusão do líquido para o interior da matriz, aumentando a taxa liberada de medicamento. Estes nanocompósitos são promissores para liberação desencadeada pela aplicação de AMF. Outro resultado muito importante foi que nanocompósitos podem atuar como um mediador de hipertermia (42 e 45 °C), evitando o dano causado por superaquecimento de células normais, além do controle da taxa de liberação de fármacos.

CAPÍTULO 5

ESTUDO DE SISTEMAS NANOCOMPÓSITOS

U-PEO:CoFe₂O₄

1 Caracterização da estrutura molecular e comportamento térmico

Os espectros FTIR para a ferrita de cobalto e para os nanocompósitos estão apresentadas na Figura 29.

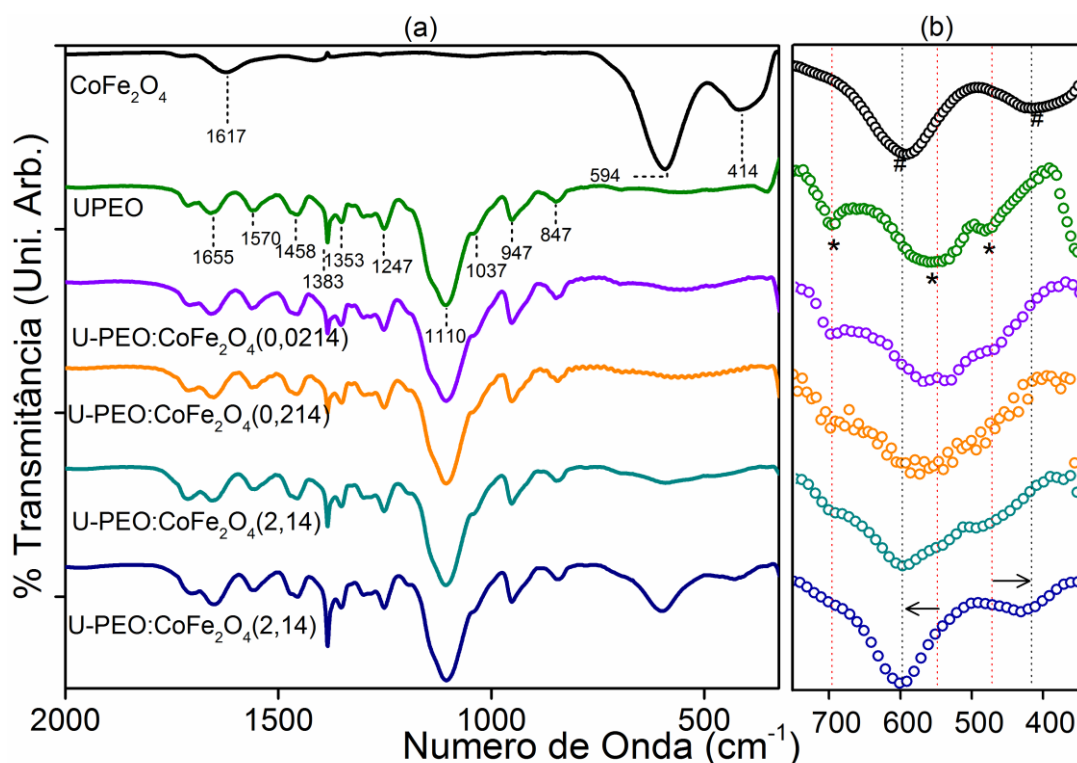


Figura 29. (a) Espectros FTIR dos híbridos contendo diferentes quantidades de ferrita de cobalto, (b) ampliação dos espectros na região de baixos valores de número de onda.

Fonte: autor.

O espectro do CoFe₂O₄ mostra duas bandas principais, em 594 cm⁻¹ e em 414 cm⁻¹, referentes a vibrações Fe-O em sítios tetraédricos e em sítios octaédricos, respectivamente.⁷⁶ Quanto aos nanocompósitos pode-se observar bandas características referentes ao estiramento da carbonila, presente no grupo ureia, e da ligação C-N em 1655 cm⁻¹ e em 1458 cm⁻¹, e bandas de deformação do grupo metil entre 1380-1460 cm⁻¹. Na faixa de 1000-1150 cm⁻¹ pode haver sobreposições referentes a vibrações dos grupos Si-O-Si, C-O-C e C-Si-O, que aparecem na mesma região do espectro. As bandas harmônicas referentes a vibrações Si-CH₂-CH₂-, devido a presença do alcóxido modificado de silício, aparecem em 1247, 1037, 947 cm⁻¹. A banda em 847 cm⁻¹ é atribuída a vibrações Si-O da rede de siloxano. Na mesma região em que aparece a banda dos grupos metil, também aparece a banda

dupla com máximos em 1353 e 1383 cm^{-1} , que é característica da cristalinidade do PEO. ⁷⁷Como a intensidade destas bandas é maior para o material contendo 21,4% em massa de ferrita de cobalto, U-PEO:CoFe₂O₄(21,4), pode-se indicar que as MNP podem estar servindo como uma carga mineral que aumenta a cristalinidade do PEO.

Como podemos ver na Figura 29(a) a adição crescente de CoFe₂O₄ não causou modificação das principais bandas presentes no UPEO na faixa de 2000 - 750 cm^{-1} . Entretanto, a ampliação da região referente a pequenos números de onda (Figura 29(b)) mostra que as bandas da ferrita de cobalto, assinaladas com o símbolo “#”, começam a aparecer gradativamente, desdobrando as bandas características do UPEO, assinaladas com o símbolo “*”, com o aumento da quantidade de CoFe₂O₄, até aparecerem bem definidas na amostra U-PEO:CoFe₂O₄(21,4).

A Figura 30 mostra esquematicamente a estrutura molecular do híbrido orgânico-inorgânico evidenciando os sítios mais prováveis para os íons de ferro e cobalto. Os grupos éter, metila e ureia são apresentados em (1), (2) e (3), respectivamente. Em (4) mostra-se a fase inorgânica de silício que conecta as cadeias de poliéter através de octômeros cúbicos, de fórmula Si₈O₁₂, sendo que de cada vértice deste cubo parte uma cadeia de PEO. Em (5) e (6), são apresentados, respectivamente, um sítio tetraédrico e um sítio octaédrico, onde os metais estão inseridos.

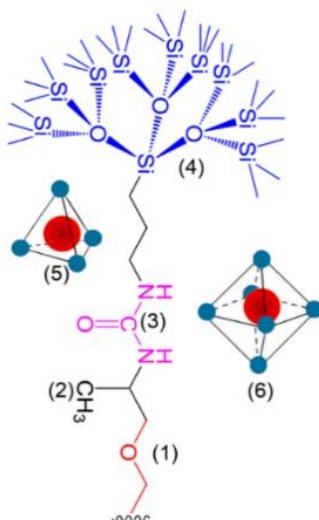


Figura 30. Esquema estrutural da molécula representativa do material híbrido.
Fonte: autor.

As curvas de DSC são apresentadas na Figura 31(a) enquanto na Figura 31(b) estão apresentadas as curvas de capacidade calorífica, C_m , em função da temperatura.

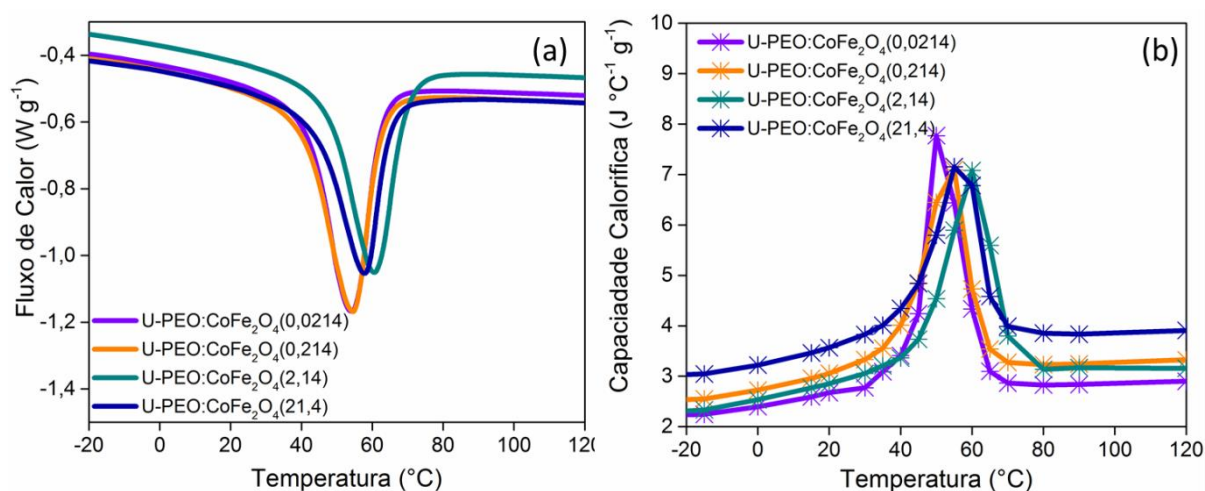


Figura 31. (a) Curvas de DSC, e (b) capacidade calorífica específica à 25 °C para os híbridos contendo ou não diferentes concentrações de ferrita. A curva do padrão, safira, foi incluída para fins de comparação.

Fonte: autor.

Os valores encontrados para temperatura de fusão (T_f), grau de cristalinidade (D_c), e capacidade calorífica específica a 25 °C para os nanocompósitos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores obtidos para a temperatura de fusão (T_f), porcentagem de cristalinidade (D_c), e capacidade calorífica específica a 25 °C para os nanocompósitos.

Amostra	T_f (°C)	D_c (%)	Capacidade calorífica (J·g ⁻¹ ·°C ⁻¹)*
U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (0,0214)	53,9	31,5	2,7
U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (0,214)	54,6	31,2	3,2
U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (2,14)	60,4	28,5	2,9
U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (21,4)	57,8	24,7	3,6

* Capacidade calorífica específica à 25 °C

Fonte: autor.

Verifica-se que tanto a variação de T_f , $56,2 \pm 2,8$ °C quanto a variação do D_c , $29,1 \pm 2,7$ %, não segue uma tendência que seja diretamente proporcional a quantidade de CoFe_2O_4 adicionado e se mantém aproximadamente constante. O mesmo pode ser visto com os valores de C_m medidos a 25 °C, já que a média dos valores é $3,2 \pm 0,4$ J·°C⁻¹·g⁻¹.

2 Caracterização estrutural e nanoestrutural

Os difratogramas das amostras CoFe_2O_4 , U-PEO, U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(2,14)$ estão apresentados na Figura 32, enquanto na Figura 33 está representada a cela unitária de uma estrutura cristalina tipo espinélio.

Os espinélios são uma classe de materiais de fórmula geral MFe_2O_4 (onde M pode ser Mn, Co, Ni, Zn, Mg, etc) de grande interesse devido a suas propriedades magnéticas, catalíticas, elétricas e óticas. A estrutura tipo espinélio pertence ao grupo espacial $\text{Fd}3\text{m}$, onde a cela unitária cúbica possui 56 átomos, sendo 32 ânions de O^{2-} e 24 cátions (16 Fe^{+3} e 8 M^{+2}). Dos 24 cátions, 8 ocupam sítios tetraédricos (representado por A na formula geral apresentada na Equação 10) e 16 ocupam sítios octaédricos (representados por B).



Numa estrutura tipo espinélio normal os íons bivalentes ocupam os sítios tetraédricos, enquanto os íons trivalentes ocupam os sítios octaédricos. Porém é possível haver inversão entre os cátions bi e trivalentes, tornando necessário introduzir um parâmetro de inversão (i) na equação geral para o espinélio. Se $0 < i < 1$ trata-se um espinélio parcialmente invertido, e se $i=1$ trata-se de um espinélio invertido. Conhecer a distribuição dos cátions nesta estrutura é de grande interesse uma vez que esta distribuição, além do tamanho da nanopartícula, pode afetar a propriedade magnética do material. ⁷⁸

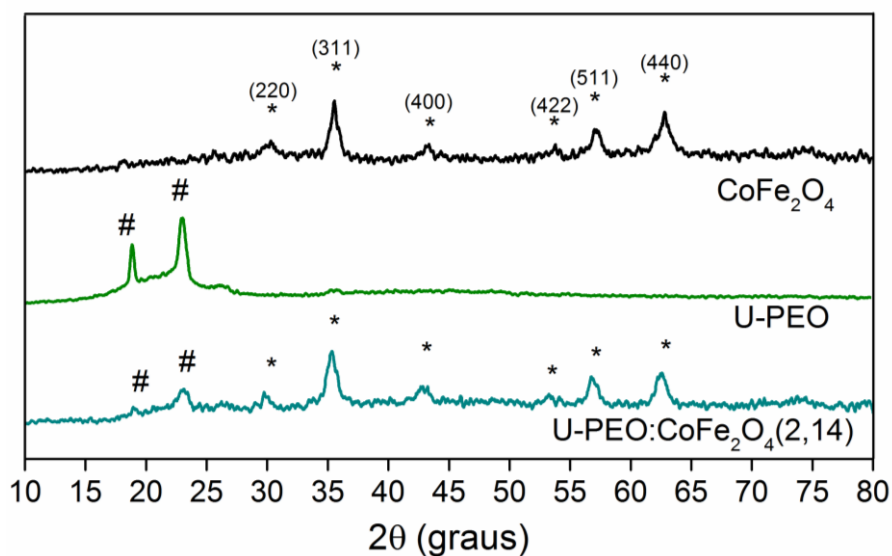


Figura 32. Perfil de difração das amostras UPEO, U-PEO:CoFe₂O₄(2,14), e CoFe₂O₄.

Fonte: autor.

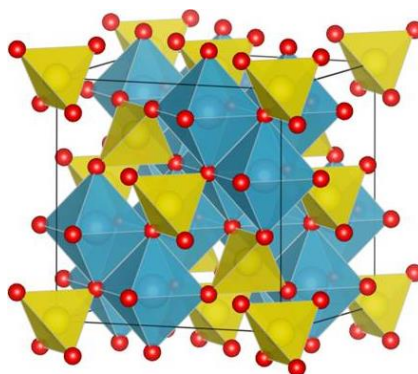


Figura 33. Cella unitária de uma estrutura tipo espinélio.

Fonte: imagem da internet.

Na Figura 32 é apresentado o perfil de difração de uma ferrita de cobalto (CoFe₂O₄), que possui uma estrutura tipo espinélio e cujos picos estão marcados com um asterístico (*). A amostra U-PEO apresenta os dois picos de difração alargados característicos da presença de regiões cristalinas na fase polimérica, que estão marcados com o símbolo (#). Os dois padrões de difração podem ser observados no nanocompósito U-PEO:CoFe₂O₄(2,14), evidenciando a fase cristalina do U-PEO e também a fase espinélio da ferrita de cobalto.

Embora a estrutura espinélio esteja evidenciada nos difratogramas das amostras U-PEO:CoFe₂O₄(2,14) e CoFe₂O₄, não é possível saber se esta fase espinélio é normal, parcialmente, ou totalmente invertida. Para tanto, foi utilizada a

espectroscopia de absorção de raios X próxima à borda de absorção (região de XANES) do Co e do Fe, cujos resultados serão apresentados a seguir.

Os espectros de XANES, na borda do Fe (a) e do Co (b), da suspensão coloidal de CoFe_2O_4 e do híbrido contendo a máxima concentração de MNP são apresentados na Figura 34.

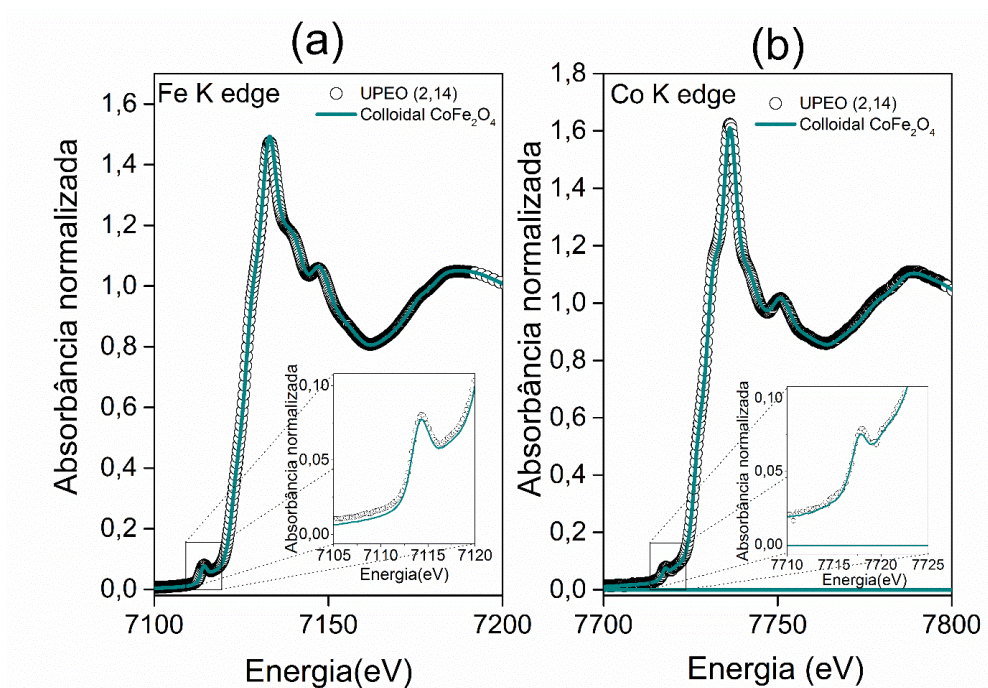


Figura 34. Espectros de XANES para a amostra U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(2,14)$ e para a suspensão coloidal de CoFe_2O_4 , na borda K de absorção do (a) ferro e do (b) cobalto . O insert mostra a ampliação da pré borda de absorção

Fonte: autor.

Como dito anteriormente, a partir do difratograma de raios X é impossível obter informações sobre uma possível inversão da fase espinélio, porém, a presença do pico na pré-borda de absorção do Fe ($\sim 7114\text{eV}$) é característica de íons de Fe^{+3} (Figura 34(a)) em centros de simetria tetraédrica (sítios A), o que consequentemente indica a presença de Co^{+2} em centro de simetria octaédrica (sítios B), conforme confirmado na Figura 34(b). Com estas informações podemos assegurar que $0 < x < 1$, pois para que x fosse igual a 1 o pico na pré borda de absorção do cobalto deveria ser nulo. Entretanto, não podemos afirmar qual o valor exato de x no momento.

As curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) das suspensões coloidais de ferrita de cobalto e do sistema UPEO- CoFe_2O_4 são

apresentadas na Figura 35. Após a incorporação da CoFe_2O_4 na matriz do híbrido UPEO, a distância de correlação em $q_{\text{max}} = 1,86 \text{ nm}^{-1}$ ($\xi_0 = 2\pi/q_{\text{max}} = 3,37 \text{ nm}$), ⁷⁹ é característica de grupos ureasil regularmente espaçados (Figura 36), e vai desaparecendo gradativamente com o aumento da quantidade de CoFe_2O_4 . Isto deve-se ao aumento do contraste de densidade eletrônica entre a fase CoFe_2O_4 e a matriz UPEO.

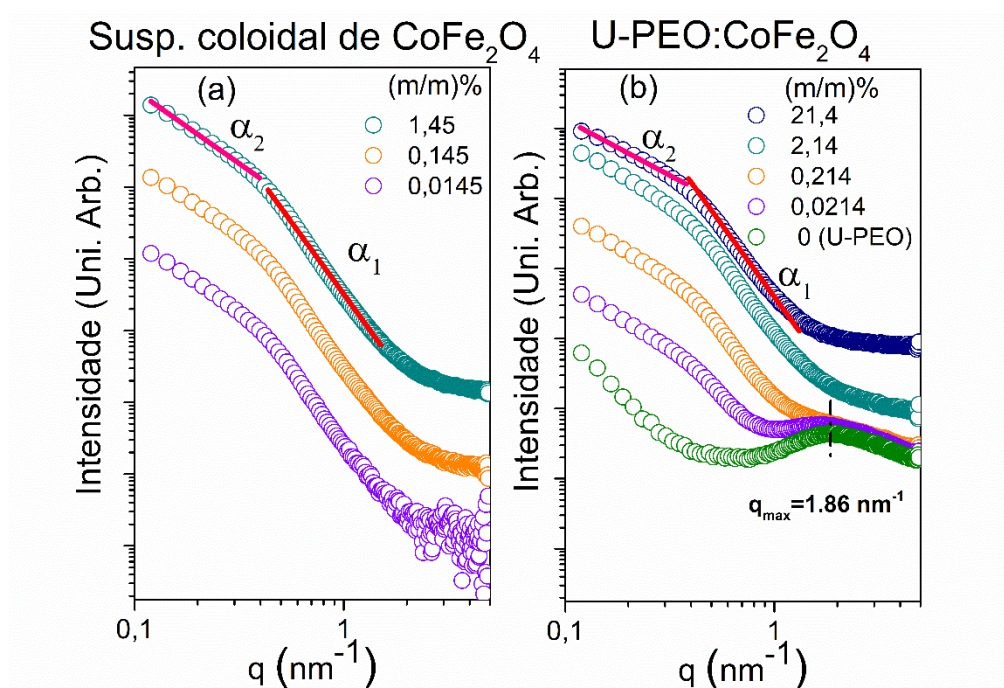


Figura 35. Curvas de SAXS para as suspensões coloidais de CoFe_2O_4 e para os híbridos contendo ou não CoFe_2O_4 .

Fonte: autor.

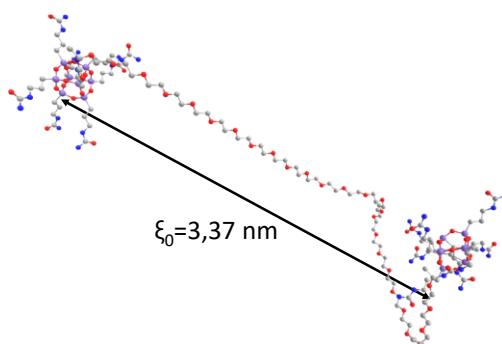


Figura 36. Esquema da distância de correlação (ξ_0) entre os grupos ureasil.

Fonte: autor.

A Tabela 5 apresenta os valores das duas regiões lineares indicadas na Figura 35. Para altos valores de q , as curvas exibem uma tendência linear assintótica com uma inclinação de $\alpha_1 \sim -4$ para as suspensões e para os nanocompósitos com altas concentrações de ferrita de cobalto, indicando que a interface entre as MNP e a matriz é lisa e bem definida, com ausência de heterogeneidades no interior da MNP, isto é, cada nanopartícula age como um único objeto espalhador. Para o nanocompósito mais diluído este valor cai para $\alpha_1 = -2,59$, pois neste caso há uma grande contribuição do espalhamento dos grupos siloxano regularmente espaçados, já que a diferença de contraste eletrônico é relativamente pequena.

Uma observação importante é que não foi possível obter informação sobre o tamanho das nanopartículas pela técnica de SAXS pois não há a formação do patamar de Guinier e sim uma nova região com dependência linear (α_2) onde $-2 < \alpha_2 < -1,65$ para as amostras contendo MNP. Este comportamento que indica a formação de agregados, enquanto o valor de $\alpha_2 = -2,86$ para a amostra U-PEO ocorre devido espalhamento da fase semicristalina do PEO1900. Contudo, podemos afirmar que tanto o sistema UPEO- CoFe_2O_4 quanto as suspensões coloidais de MNP apresentam perfis de espalhamento semelhante, o que significa que os dois sistemas são comparáveis.

Tabela 5. Apresentação das inclinações nas duas regiões lineares das curvas de SAXS

Amostra	Coeficiente linear	
	α_1	α_2
$\text{CoFe}_2\text{O}_4(1,45)$	-4,05	-2,05
$\text{CoFe}_2\text{O}_4(0,145)$	-4,02	-2,12
$\text{CoFe}_2\text{O}_4(0,0145)$	-3,97	-2,16
U-PEO:$\text{CoFe}_2\text{O}_4(21,4)$	-3,7	-1,65
U-PEO:$\text{CoFe}_2\text{O}_4(2,14)$	-3,91	-2,05
U-PEO:$\text{CoFe}_2\text{O}_4(0,214)$	-3,59	-1,86
U-PEO:$\text{CoFe}_2\text{O}_4(0,0214)$	-2,87	-1,85
U-PEO	-	-2,86

Fonte: autor

As imagens de TEM, juntamente com seu histograma é apresentada na Figura 37(a) e Figura 37(b), respectivamente. Observa-se que o diâmetro, d_0 , destas

nanopartículas, é de $\sim 8,27$ nm, e a polidispersão, σ , igual 0,485. Estes valores foram obtidos a partir do ajuste do histograma com uma função de densidade de probabilidade Log-normal. Uma imagem de microscopia com maior amplificação, com escala de 10 nm, é apresentada na Figura 37(c) que evidencia claramente os planos cristalográficos da ferrita de cobalto. Também foram feitas análises de EDS destas imagens, e como esperado, a presença de átomos de ferro, cobalto e oxigênio foram observadas no espectro, apresentado na Figura 37(d)

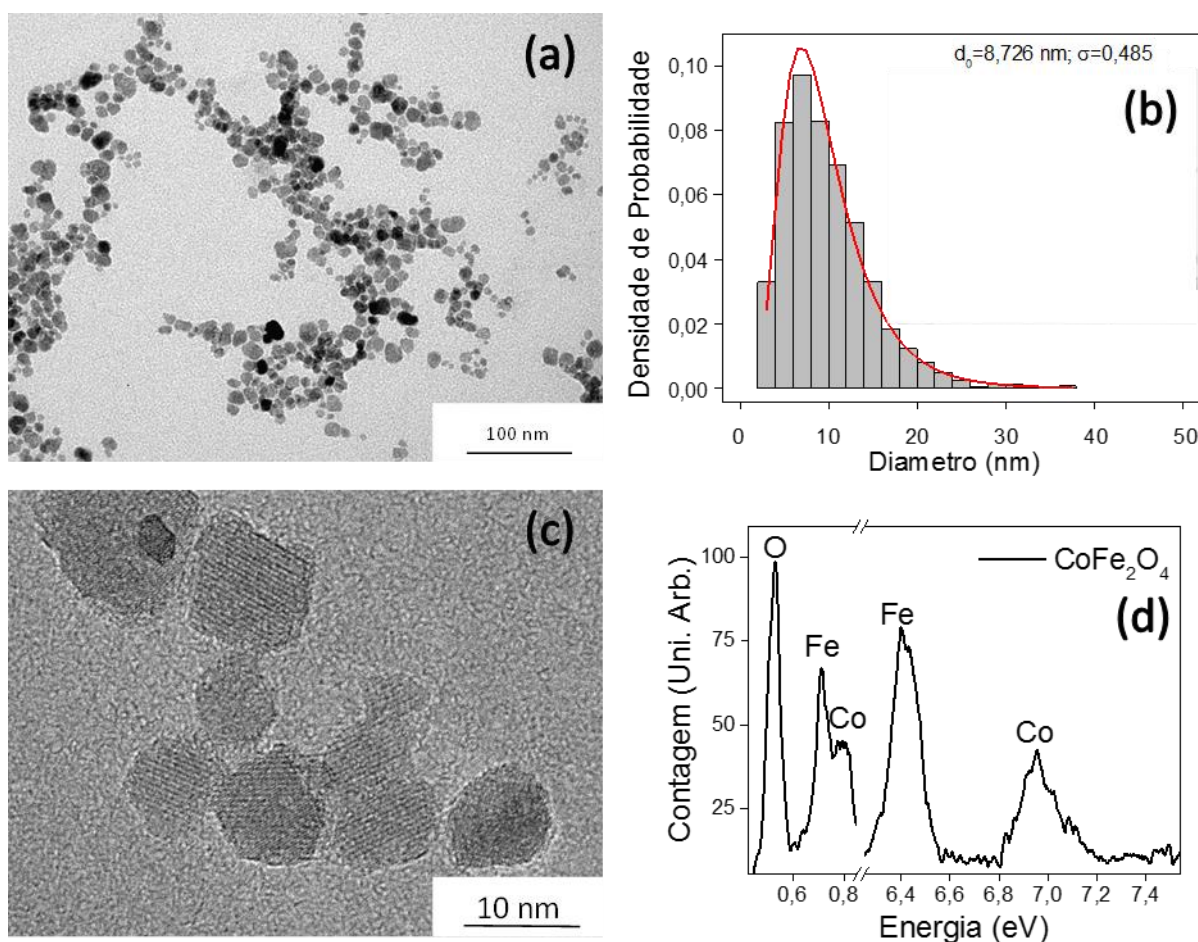


Figura 37. Apresentação dos resultados de microscopia eletrônica de transmissão para a ferrita de cobalto: (a) imagem com escala de 100 nm, em (b) a distribuição log-normal a partir da imagem (a). Em (c) ferrita de cobalto com escala de 10 nm, e em (d) é apresentado o espectro de EDS destas partículas.

Fonte: autor.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão também foram realizadas para a amostra $\text{U-PEO:CoFe}_2\text{O}_4(1,45)$, apresentada na Figura 38, com diferentes

níveis de ampliação. Nota-se a presença de grandes agregados nestas matrizes, corroborando com os resultados de SAXS que evidenciam a presença da segunda região linear em baixos valores de q .

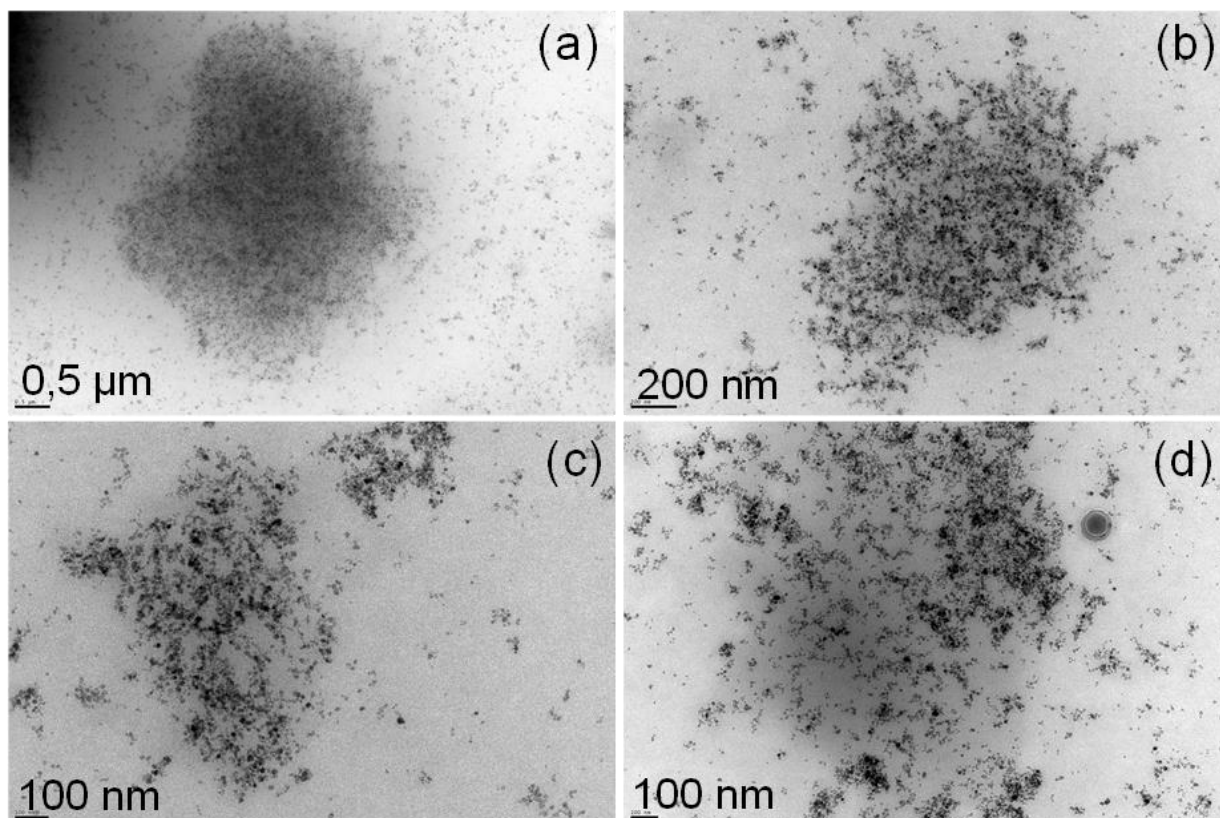


Figura 38. Apresentação dos resultados de microscopia eletrônica de transmissão para a amostra U-PEO:CoFe₂O₄(1,45). Imagem com escala de (a) 0,5 μm, (b) 200 nm, e ambas imagens (c) e (d) com a escala de 100 nm

Fonte: autor.

3 Caracterização magnética

As curvas de magnetização medidas em 5 e 298 K são apresentadas na Figura 39. Em $T = 5\text{K}$, abaixo da temperatura de bloqueio, o tempo necessário para o alinhamento, dos momentos magnéticos das MNP na direção do campo magnético aplicado é muito longo, maior que 10^{-9} s , o que implicaria ausência de relaxação de Néel. Esta tendência, conjugada com a ausência de movimento Browniano de MNP na matriz híbrida sólida, pode proibir o efeito da hipertermia sob AMF. Em $T = 298\text{K}$, acima da temperatura de bloqueio, o tempo necessário para o alinhamento pela

rotação de Néel dos momentos magnéticos das nanopartículas na direção do campo magnético aplicado é rápido (ordem de 10^{-12} a 10^{-9} s), o que pode favorecer o efeito da hipertermia sob AMF. Assim, apesar da anisotropia magnética muito maior, a utilização dos MNP CoFe_2O_4 em substituição às MNP de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (mais comuns nestes sistemas) não deve ser prejudicial para a existência do efeito da hipertermia próximo da temperatura ambiente.⁸⁰

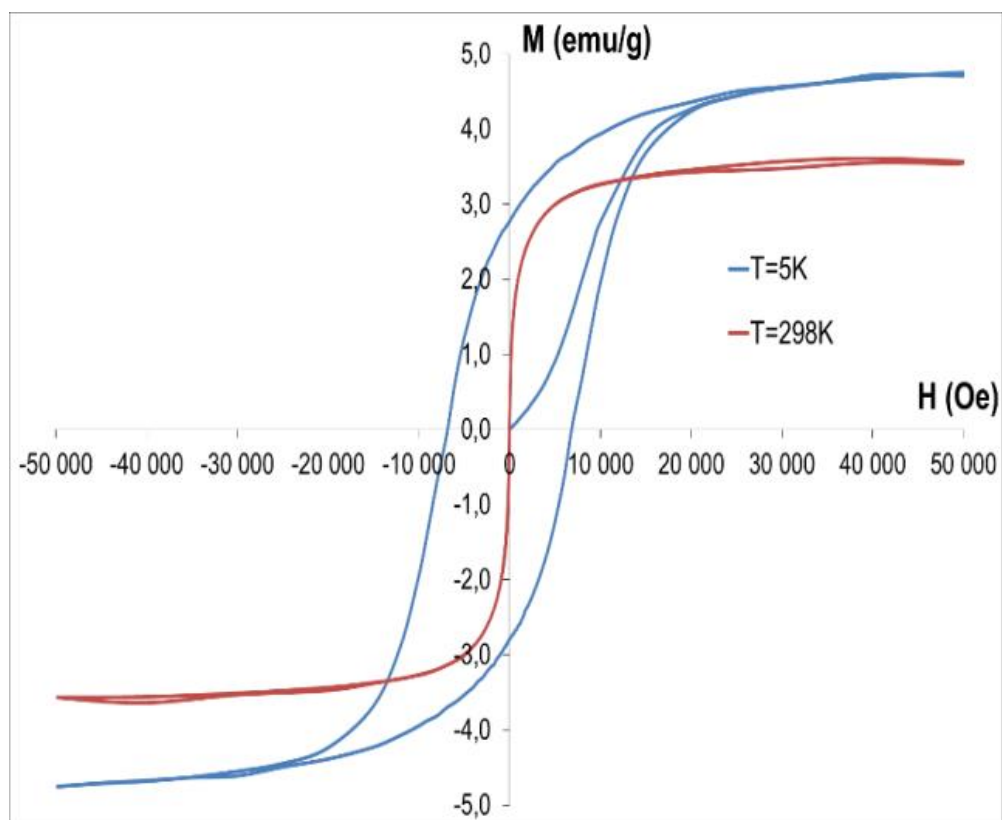


Figura 39. Curva de magnetização típica à $T = 298\text{K}$ e $T = 5\text{K}$ de um material nanocomposto magnético (U-PEO: CoFe_2O_4) obtida por magnetometria SQUID.

Fonte. autor.

A Tabela 6 apresenta resumidamente os parâmetros magnéticos obtidos nas curvas de magnetização. Como podemos notar os valores de H_c e M_r são iguais a zero quando o experimento é realizado a 298 K ($25\text{ }^\circ\text{C}$), o que implica no comportamento superparamagnético destas nanopartículas.

Tabela 6. Parâmetros magnéticos para os nanocompósitos

Temperature	<i>T</i> =5K	<i>T</i> =298K
Magnetização de saturação, <i>M_s</i> (emu/g)	4.8	3.6
Susceptibilidade magnética inicial, <i>χ₀</i> *	0.003**	0.075
Coercividade magnética, <i>H_c</i> (Oe)	6930	0
Magnetização remanente, <i>M_r</i> (emu/g)	2.79	0

* *χ₀* foi calculada a partir da razão *M/H* em campo muito baixo (*H* → 0), com *H* e *M* expressos em A·m⁻¹; ** Nesse caso, o cálculo foi feito na primeira parte da curva magnetização-desmagnetização, antes de atingir o ciclo de histerese. O valor relativamente baixo obtido para *χ₀* é explicado pelo momento magnético bloqueado dos MNP em *T* = 5K e a ausência de magnetização preliminar da amostra.

Fonte: autor.

Quando voltamos nossa atenção para o uso terapêutico das nanopartículas magnéticas é de grande interesse conhecer o SLP das MNP. Os valores de SLP dependem de fatores intrínsecos, como os já citados, além de fatores relacionados ao experimento, como frequência e intensidade de campo magnético aplicado.²⁸ Para a normalização dos resultados em relação aos parâmetros experimentais a perda de energia intrínseca - *intrinsic loss power* - (ILP), apresentado na Equação 11, foi calculada:

$$ILP = \frac{SLP}{f \times H_0^2} \quad (11)$$

As curvas de hipertermia magnética são apresentadas na Figura 40. Observa-se que a taxa de aquecimento é maior para as suspensões coloidais de ferrita de cobalto do que para os nanocompósitos, independentemente da concentração ou frequência aplicada. Esta maior taxa de aquecimento reflete na taxa de aquecimento máxima ((*dT/dt*)_{max}), que por sua vez irá resultar num maior valor de SLP para as suspensões coloidais.

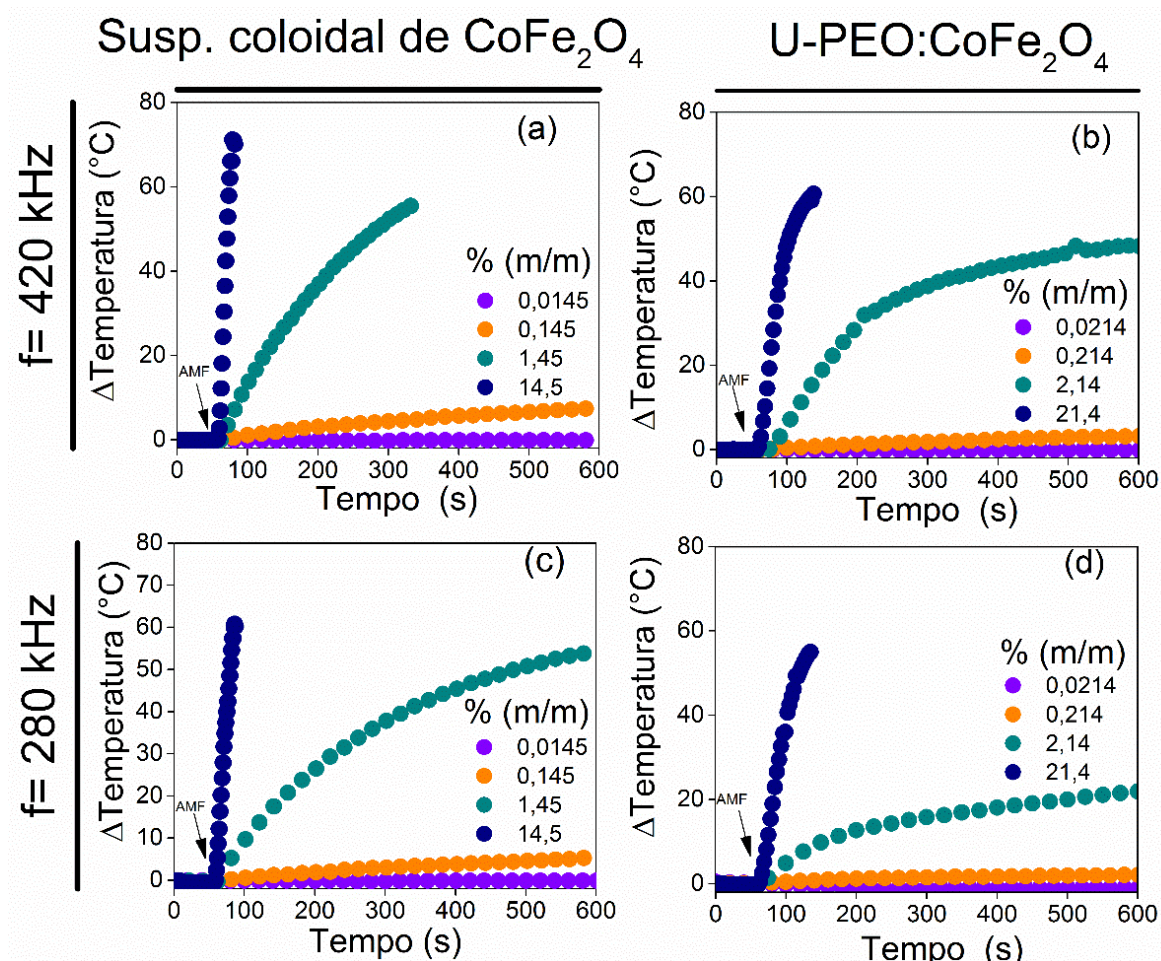


Figura 40. Apresentação da curvas de hipertermia em diferentes concentrações e frequências.

Fonte: autor.

Este comportamento não pode ser explicado pelo bloqueio das partículas no interior da matriz de UPEO, pois MNP de CoFe_2O_4 na faixa de tamanho apresentada nas imagens de TEM apenas apresentam relaxação de Néel, ou seja, apenas o momento magnético das partículas se orienta com o campo. Outra explicação para o decaimento dos valores de ILP e SLP seria o estado de agregação das partículas, ⁸¹porém, apesar das curvas de SAXS não fornecerem informações concretas definitivas sobre o estado de agregação das partículas podemos notar que tanto no híbrido quanto em suspensão as partículas apresentam o mesmo perfil de espalhamento. Na Tabela 7 são apresentados os parâmetros necessários para o cálculo dos valores de (SLP) e (ILP), bem como seus valores. Como pode ser observado, os valores de SLP e ILP são cerca de 4 vezes maiores para as suspensões coloidais de CoFe_2O_4 .

Tabela 7. Apresentação dos valores de SLP e ILP calculados em diferentes frequências

Amostra	$(dT/dT)_{\max}$ ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$)	f (kHz)	SLP ($\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$)	ILP ($\text{W}/(\text{g}\cdot\text{Hz} (\text{A}\cdot\text{m}^{-1})^2)$)
CoFe ₂ O ₄ (14,5)	3,8	420	109,5	$1,2\cdot 10^{-12}$
CoFe ₂ O ₄ (1,45)	0,39	420	112,7	$1,2\cdot 10^{-12}$
CoFe ₂ O ₄ (0,145)	0,038	420	109,2	$1,2\cdot 10^{-12}$
CoFe ₂ O ₄ (14,5)	2,34	280	67,4	$1,1\cdot 10^{-12}$
CoFe ₂ O ₄ (1,45)	0,28	280	80,4	$1,3\cdot 10^{-12}$
CoFe ₂ O ₄ (0,145)	0,027	280	77,8	$1,3\cdot 10^{-12}$
U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (21,4)	1,6	420	27,4	$2,9\cdot 10^{-13}$
U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (2,14)	0,27	420	36	$3\cdot 10^{-13}$
U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (0,214)	0,015	420	22,4	$2,4\cdot 10^{-13}$
U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (21,4)	1,25	280	21,4	$3,4\cdot 10^{-13}$
U-PEO:CoFe ₂ O ₄ (2,14)	0,12	280	16,7	$2,7\cdot 10^{-13}$
U-PEO: CoFe ₂ O ₄ (0,214)	0,01	280	14,9	$2,4\cdot 10^{-13}$

* Valores de capacidade calorífica calculada em 25 °C

Fonte: autor.

4 Ensaios de liberação controlada de curcumina e viabilidade celular

A avaliação da promoção de toxicidade celular pelos nanocompósitos e também pela suspensão coloidal foi realizada *in vitro* para a linhagem celular HepG2. Estas células são do hepatoma humano, metabolicamente ativas, amplamente empregadas em diferentes estudos, por serem capazes de simular a função hepática de um organismo. A média da viabilidade celular, juntamente com seu desvio padrão, é apresentada na Figura 41. Note que para todas as amostras a viabilidade celular é maior que 70%, indicando que para esta linhagem celular o material sob estudo mostrou baixa toxicidade.

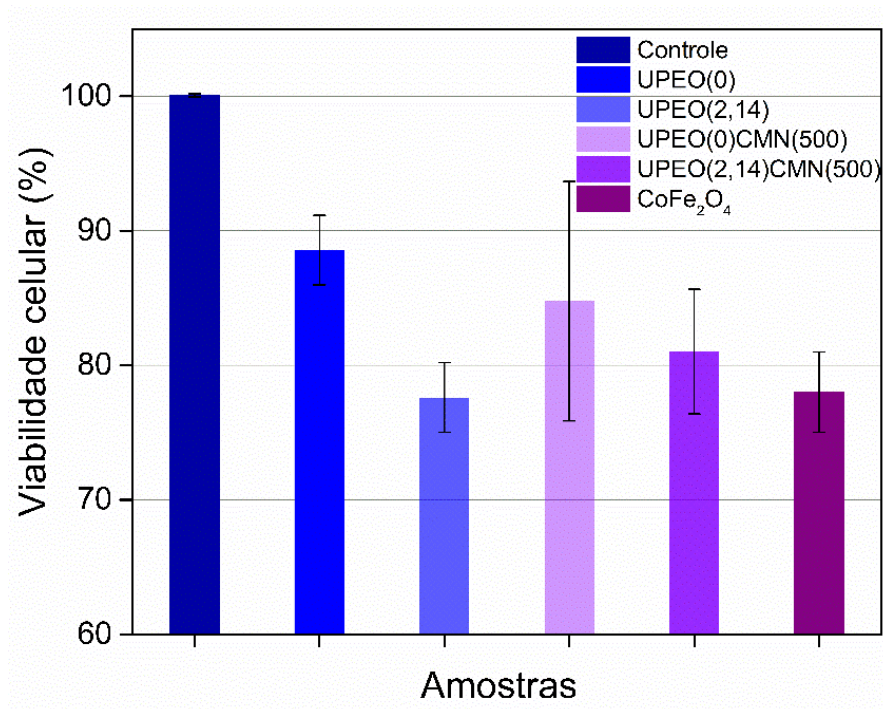


Figura 41. Viabilidade celular da linhagem HepG2 após incubação. Dados referem-se a média de três experimentos independentes (Média $\pm$ desvio padrão)

Fonte: autor.

A curcumina foi o fármaco escolhido para acompanhar os testes de liberação, sob a aplicação ou não de um campo magnético alternado, devido a suas propriedades anticancerígenas.

Num primeiro momento fez-se necessária a construção de uma curva de calibração deste fármaco no meio de liberação, que constitui-se de uma solução de etanol, polisorbato 80, propilenoglicol, e tampão fosfato pH7,2 na razão volumétrica 5:1:15:79(v/v). Os espectros da curva de calibração foram coletados na faixa espectral de 600-300 nm e evidenciam que a absorbância máxima ocorre em 426 nm (Figura 42(a)). Foram preparadas 5 amostras de concentração variada entre 2,01 e 9,96 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, sendo que cada amostra foi preparada três vezes para garantia da reprodutibilidade da curva. Com os dados obtidos da curvas de espectroscopia na região do UV-Vis, apresentado na Figura 42(a), foi possível montar a Tabela 8, que apresenta a média de absorbância medida em cada amostra da triplicata, e o desvio padrão encontrado. A curva de calibração foi montada a partir da absorbância média, Figura 42(b), e a partir do ajuste linear foi possível extrair o coeficiente de absortividade da curcumina, ϵ_{CMN} , igual a 0,1107 $\text{mL} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$.

Tabela 8. Valores de absorbância das três medidas, das médias e do desvio padrão

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Absorbância*			Absorbância média	Desvio Padrão
0	$-7,0\cdot 10^{-5}$	$-7,5\cdot 10^{-5}$	$-7,3\cdot 10^{-5}$	$-7,3\cdot 10^{-5}$	$2,6\cdot 10^{-5}$
2,01	0,22	0,22	0,22	0,22	0,00
4,03	0,44	0,42	0,47	0,44	0,02
6,04	0,65	0,68	0,70	0,68	0,03
8,06	0,89	0,89	0,91	0,90	0,01
9,96	1,12	1,06	1,11	1,10	0,03

*Absorbância em 426 nm

Fonte: autor.

Após este procedimento e considerando os resultados de citotoxicidade deste material, foram propostas medidas de liberação da curcumina. A amostra U-PEO:CoFe₂O₄(2,14)CMN também foi submetida a aplicação de um campo magnético alternado de frequência de 420 kHz amplitude máxima de 14,9 kA.m⁻¹. Os perfis de liberação são apresentados na Figura 43(b), enquanto o perfil de aquecimento e os momentos em que o campo magnético alternado foram aplicados são apresentados na Figura 43(a).

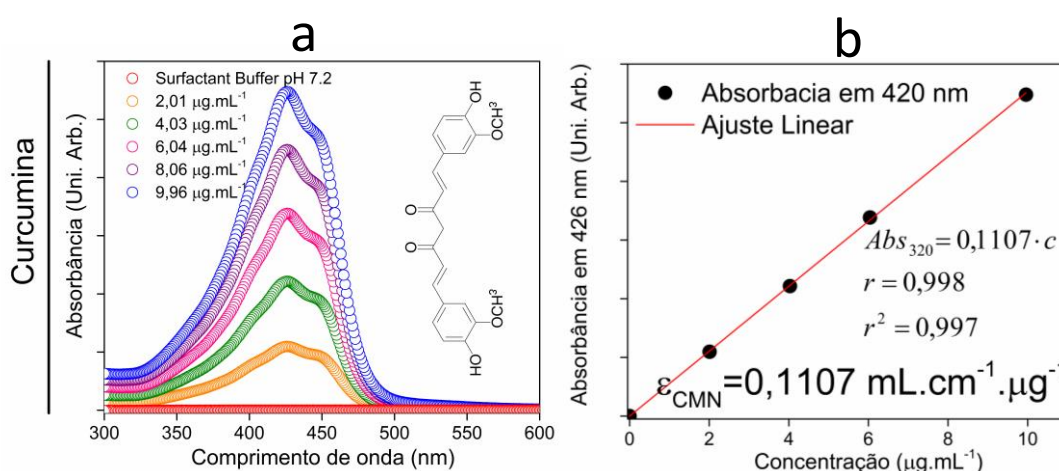


Figura 42. (a) Espectro de absorção na região do UV-Vis (entre 600 e 300 nm) da curcumina em diferentes concentrações. (b) curva de calibração da curcumina utilizando sua absorção máxima em 426 nm.

Fonte: autor.

Observa-se que a liberação da amostra U-PEO:CMN é cerca de 6 vezes maior que nos nanocompósitos que continham nanopartículas de CoFe_2O_4 . Também podemos notar que não há diferença significativa entre os perfis de liberação das amostras U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(2,14)$:CMN que foram coletados com e sem aplicação de AMF. Deste resultado pode-se inferir que a aplicação do campo e o consequente aumento de temperatura (37°C para $\sim 41^\circ\text{C}$) não resultou em um perfil diferente de liberação da curcumina.

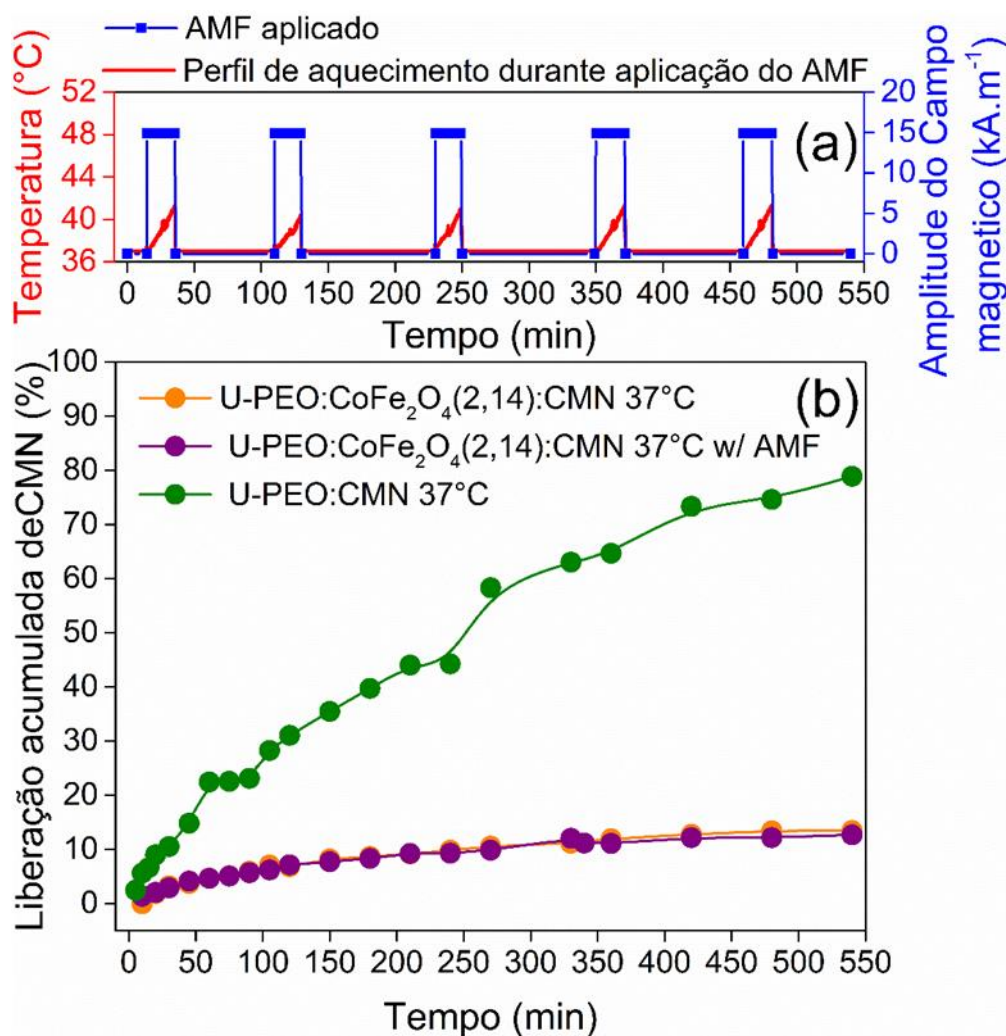


Figura 43. (a) Perfil de aquecimento durante a aplicação do campo, juntamente com AMF aplicado. (b) Perfil de liberação da curcumina .

Fonte: autor.

A grande diferença nos perfis de liberação das amostras contendo ou não nanopartículas magnéticas indica que está havendo algum tipo de interação química

e/ou física entre estas nanopartículas e a curcumina. Entretanto para comprovar estas suposições estudos adicionais precisam ser realizados, tais como espectroscopia na região do infravermelho e medidas das isotermas de adsorção da curcumina nestes materiais. Os resultados obtidos permitem propor ensaios de liberação com diferentes concentrações de nanopartículas no híbrido, de forma a tentar controlar a liberação.

5 Conclusões

Nesta etapa a síntese de um material nanocompósito pelo método sol-gel foi relatada. O material é composto por uma matriz ureasil-polióxietileno, contendo MNP de ferrita de cobalto com tamanho de 8,7nm. Este material foi caracterizado por diversas técnicas, como o FTIR, que evidenciou o aparecimento das bandas características de ferrita de cobalto, em 594 e 414 cm^{-1} . As curvas de DSC apresentaram picos endotérmicos referentes a fusão da fase cristalina do material para todas as amostras, além de terem sido fundamentais para o cálculo da capacidade calorífica específica destes materiais, necessária para o cálculo dos parâmetros magnéticos: valores de SLP e, conseqüentemente, ILP. O valor de SLP foi cerca de 4 vezes menor para os nanocompósitos quando comparados com as suspensões coloidais. Como evidenciado pelas curvas de SAXS e pela microscopia foi possível perceber a formação de agregados, que tendem a diminuir a capacidade de aquecimento das nanopartículas, além da falta de movimento browniano das MNP nas matrizes. Experimentos de citotoxicidade com a linhagem celular HepG2 mostraram viabilidade celular superior a 70 % para todas as amostras analisadas. Este resultado nos incentivou a realizar ensaios de liberação controlada de fármaco, que mostraram que as amostras contendo CoFe_2O_4 liberam cerca de 6 vezes menos que as amostras sem as nanopartículas. Como futuras atividades, sugere-se realizar:

- Ensaios de liberação controlada com os híbridos contendo diferentes quantidades de nanopartículas magnéticas;
- Medidas de hipertermia magnética nos nanocompósitos contendo curcumina;
- Medidas de isotermas de adsorção de curcumina nos híbridos para averiguação de possíveis interações físicas ou químicas entre a curcumina e as nanopartículas;

- Medidas de espectroscopia na região do infravermelho para verificação de uma possível alteração de posições de bandas de absorção que possa comprovar interações entre a curcumina e as nanopartículas de ferrita de cobalto.

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os nossos estudos mostraram progresso no desenvolvimento de novos materiais com aplicações biomédicas. Através de uma rota sintética simples, dois sistemas foram sintetizados e estudados. A rota sol-gel possibilitou a preparação do sistema nanocompósito composto por uma matriz de ureasil-poliéter, com características hidrofílicas, carregada com dois tipos de MNP superparamagnéticas, sendo elas a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e ferrita de cobalto (CoFe_2O_4). Ambos os sistemas apresentaram potencial em aplicações como agente de hipertermia magnética, sendo que o nanocompósito carregado com a ferrita de cobalto apresenta maior potencial para tal aplicação, já que seu valor de SLP é aproximadamente 2 vezes maior que o dos nanocompósitos contendo $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

A temperatura de fusão dos nanocompósitos contendo ferrita de cobalto apresenta uma diferença de aproximadamente 18 °C quando comparada àquela contendo maguemita. Ainda, a capacidade calorífica dos nanocompósitos de ferrita de cobalto é igual a $3,2 \text{ J}\cdot\text{C}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ e a média para os com maguemita é igual a $2,12 \text{ J}\cdot\text{C}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Este comportamento pode estar relacionado com a diferença de acidez das partículas, que podem estar modificando a acidez do meio reacional e alterando a estrutura final do material assim como o grau de mobilidade das cadeias poliméricas.

A comparação das microscopias das duas suspensões de MNP mostram que, as MNP de ferrita de cobalto apresentam formação de agregados, enquanto as partículas de maguemita estão dispersas, tanto no híbrido quanto em suspensão. As nanopartículas de maguemita são maiores que as nanopartículas de ferrita de cobalto, enquanto o valor de SLP das amostras contendo ferrita de cobalto são maiores. Este comportamento pode estar associado ao maior valor de M_s da ferrita de cobalto e também a sua anisotropia, K .

O perfil de liberação de DCFNa pelas amostras U-PEO: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3(5)$:DCFNa nas diferentes temperaturas estudadas e também sob aplicação do campo magnético é dependente da temperatura, pois os domínios cristalinos se mostraram fundidos em temperaturas superiores a 38 °C. A liberação de curcumina pelos nanocompósitos contendo ou não ferrita de cobalto mostrou que a amostra sem MNP liberou cerca de 90 % de toda curcumina incorporada na matriz, enquanto a amostra U-PEO: $\text{CoFe}_2\text{O}_4(2,14)$:CMN liberou cerca de 6 vezes menos curcumina, tanto a 37 °C quanto no experimento realizado a 37 °C sob aplicação de AMF. Este

comportamento pode estar relacionados com interações fortes entre a nanopartícula de ferrita de cobalto e a molécula de curcumina.

REFERÊNCIAS

- 1 SANCHEZ, C. et al. Applications of advanced hybrid organic-inorganic nanomaterials: from laboratory to market. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 2, p. 696-753, 2011.
- 2 JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. D. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.
- 3 KICKELBICK, G. Introduction to hybrid materials. In: _____. **Hybrid materials: synthesis, characterization, and application**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. Chap. 1, p. 1-48.
- 4 JUDEINSTEIN, P.; SANCHEZ, C. Hybrid organic-inorganic materials: a land of multidisciplinary. **Journal of Materials Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 511-525, 1996.
- 5 WANG, K. et al. Inorganic-organic p-n heterojunction nanotree arrays for a high-sensitivity diode humidity sensor. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 12, p. 5825-5831, 2013.
- 6 GU, Y.; DORIN, R. M.; WIESNER, U. Asymmetric organic-inorganic hybrid membrane formation via block copolymer-nanoparticle co-assembly. **Nano Letters**, v. 13, n. 11, p. 5323-5328, 2013.
- 7 HARB, S. V. et al. A comparative study on graphene oxide and carbon nanotube reinforcement of PMMA-siloxane-silica anticorrosive coatings. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 25, p. 16339-16350, 2016.
- 8 CABRERO-ANTONINO, J. R. et al. Synthesis of organic-inorganic hybrid solids with copper complex framework and their catalytic activity for the s-arylation and the azide-alkyne cycloaddition reactions. **ACS Catalysis**, v. 1, n. 2, p. 147-158, 2011.
- 9 ALLO, B. A.; RIZKALLA, A. S.; MEQUANINT, K. Hydroxyapatite formation on sol - gel derived poly(ϵ -caprolactone)/bioactive glass hybrid biomaterials. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 6, p. 3148-3156, 2012.
- 10 MOLINA, E. et al. Ureasil-polyether hybrid blend with tuneable hydrophilic/hydrophobic features based on U-PEO1900 and U-PPO400 mixtures. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 70, n. 2, p. 317-328, 2014.
- 11 SANTILLI, C. V. et al. Controlled drug release from ureasil-polyether hybrid materials. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 3, p. 463-467, 2009.
- 12 MOLINA, E. F. et al. Fine-tuning of a nanostructure, swelling, and drug delivery profile by blending ureasil-PEO and ureasil-PPO hybrids. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 1897-1904, 2014.

- 13 CARAVIERI, B. et al. Solubility enhancement of ibuprofen using tri-ureasil-PPO hybrid: structural, cytotoxic, and drug release investigation. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 72, n. 3, p. 627-636, 2014.
- 14 BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. Introduction. In: _____. **Sol-gel science**. San Diego: Academic Press, 1990. Chap. 1, p.1-18.
- 15 ESTEVES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 798-806, 2004.
- 16 BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. Hydrolysis and condensation I: nonsilicates. In: _____. **Sol-Gel Science**. San Diego: Academic Press, 1990. Chap. 2, p. 21-95.
- 17 SANCHEZ, C. et al. Applications of hybrid organic-inorganic nanocomposites. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, n. 35/36, p. 3559-3592, 2005
- 18 HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, v. 18, n. 2, p. 171-180, 1995.
- 19 MOLINA, E. F. et al. Ureasil-poly(ethylene oxide) hybrid matrix for selective adsorption and separation of dyes from water. **Langmuir**, v. 30, n. 13, p. 3857-3868, 2014.
- 20 BOYER, C. et al. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. **NPG Asia Materials**, v. 2, n. 1, p. 23-30, 2010.
- 21 LACONTE, L.; NITIN, N.; BAO, G. Magnetic nanoparticle probes. **Materials Today**, v. 8, n. 5, p. 32-38, 2005.
- 22 LEWIN, M. et al. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 410-414, 2000.
- 23 PITTET, M. J. et al. Labeling of immune cells for in vivo imaging using magnetofluorescent nanoparticles. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 73-79, 2006.
- 24 WANG, D. et al. Superparamagnetic Fe₂O₃ beads-CdSe/ZnS quantum dots core-shell nanocomposite particles for cell separation. **Nano Letters**, v. 4, n. 3, p. 409-413, 2004.
- 25 HALBREICH, A. et al. Biomedical applications of maghemite ferrofluid. **Biochimie**, v. 80, n. 5/6, p. 379-390, 1998.
- 26 YOO, D. et al. Theranostic magnetic nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 863-874, 2011.

- 27 AMSTAD, E.; TEXTOR, M.; REIMHULT, E. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, v. 3, n. 7, p. 2819-2843, 2011.
- 28 LEE, N. et al. Iron oxide based nanoparticles for multimodal imaging and magnetoresponsive therapy. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10637-10689, 2015.
- 29 CULLITY, B. D. **Introduction to magnetic materials**. Boston: Reading, Mass.: Addison-Wesley, 1972.
- 30 SPALDIN, N. A. **Magnetic materials**: fundamentals and application. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2010.
- 31 HERGT, R. et al. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 38, p. 2019-2034, 2006.
- 32 HO, D.; SUN, X.; SUN, S. Monodisperse magnetic nanoparticles for theranostic applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 875-882, 2011.
- 33 TRAN, N.; WEBSTER, T. J. Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 40, p. 8760-8767, 2010.
- 34 GILCHRIST, R. K. et al. Effects of electromagnetic heating on internal viscera a preliminary to the treatment of human tumors. **Annals of Surgery**, v. 161, n. 6, p. 890-895, 1965.
- 35 GNECKOW, U. et al. Magnetic force nanotherapy: with nanoparticles against cancer: experiences from three clinical trials. **Biomedical Engineering**, v. 50, n. 1, p. 92-93, 2005.
- 36 SCHMIDT, A. M. Induction heating of novel thermoresponsive ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, n. 1, p. 5-8, 2005.
- 37 HILGER, I.; HERGT, R.; KAISER, W. A. Use of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer. **IEE Proceedings - Nanobiotechnology**, v. 152, n. 1, p. 33-39, 2005.
- 38 MOHR, R. et al. Initiation of shape-memory effect by inductive heating of magnetic nanoparticles in thermoplastic polymers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10, p. 3540-3545, 2006.
- 39 COLE, A. J.; YANG, V. C.; DAVID, A. E. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. **Trends Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 323-332, 2011.
- 40 SILVIO, D.; RUDOLF, H. Magnetic particle hyperthermia-a promising tumour therapy? **Nanotechnology**, v. 25, n. 45, p. 452001-452029, 2014.

- 41 DRUMMOND, A. L. **Desenvolvimento de sistemas magnéticos nanoestruturados para aplicações biomédicas**. 2012. 139 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.
- 42 MOROZ, P.; JONES, S. K.; GRAY, B. N. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. **International Journal of Hyperthermia**, v. 18, n. 4, p. 267-284, 2002.
- 43 JORDAN, A. et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, n. 1/3, p. 413-419, 1999.
- 44 FORTIN, J.-P. et al. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 9, p. 2628-2635, 2007.
- 45 BRULÉ, S. et al. Doxorubicin release triggered by alginate embedded magnetic nanoheaters: a combined therapy. **Advanced Materials**, v. 23, n. 6, p. 787-790, 2011.
- 46 DERFUS, A. M. et al. Remotely triggered release from magnetic nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 19, n. 22, p. 3932-3936, 2007.
- 47 ZHANG, J.; MISRA, R. D. K. Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: core-shell nanoparticle carrier and drug release response. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 6, p. 838-850, 2007.
- 48 THOMAS, C. R. et al. Noninvasive remote-controlled release of drug molecules in vitro using magnetic actuation of mechanized nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 31, p. 10623-10625, 2010.
- 49 AMSTAD, E. et al. Triggered release from liposomes through magnetic actuation of iron oxide nanoparticle containing membranes. **Nano Letters**, v. 11, n. 4, p. 1664-1670, 2011.
- 50 ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 104-120, 2013.
- 51 EKENSEAIR, A. K.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G. Perspectives on the interface of drug delivery and tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 89-92, 2013.
- 52 SALEM, M.; ROHANI, S.; GILLIES, E. R. Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery. **RSC Advances**, v. 4, n. 21, p. 10815-10829, 2014.

- 53 PAYTON, F.; SANDUSKY, P.; ALWORTH, W. L. NMR Study of the solution structure of curcumin. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 143-146, 2007.
- 54 VAREED, S. K. et al. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 6, p. 1411-1417, 2008.
- 55 SHOBA, G. et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta Medica**, v. 64, n. 4, p. 353-356, 2007.
- 56 TUNÇAY, M. et al. Diclofenac sodium incorporated PLGA (50:50) microspheres: formulation considerations and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 195, n. 1/2, p. 179-188, 2000.
- 57 SILVA, N. J. O. et al. Structure of magnetic poly(oxyethylene)-siloxane nanohybrids doped with FeII and FeIII. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 4, p. 961-966, 2003.
- 58 LOPES, L. et al. Drug-matrix interaction of sodium diclofenac incorporated into ureasil - poly(ethylene oxide) hybrid materials. **RSC Advances**, v. 2, n. 13, p. 5629-5636, 2012.
- 59 MOLINA, C. et al. Structure and luminescence of Eu³⁺-doped class I siloxane-poly(ethylene glycol) hybrids. **Chemistry of Materials**, v. 13, n. 9, p. 2818-2823, 2001.
- 60 MOLINA, E. F. et al. Controlled cisplatin delivery from ureasil-PEO1900 hybrid matrix. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 10, p. 3461-3466, 2010.
- 61 MOLINA, E. F. **Matrizes híbridas siloxano-poliéter para liberação controlada de fármacos**. 2010. 169 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 62 MOLINA, E. F. et al. Ligand exchange inducing efficient incorporation of CisPt derivatives into ureasil - PPO hybrid and their interactions with the multifunctional hybrid network. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 27, p. 7931-7939, 2012.
- 63 FIGUEROLA, A. et al. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 126-143, 2010.
- 64 CAETANO, B. L. et al. Magnetic hyperthermia-induced drug release from ureasil-PEO-[gamma]-Fe₂O₃ nanocomposites. **RSC Advances**, v. 6, n. 68, p. 63291-63295, 2016.
- 65 MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 17, n. 2, p. 1247-1248, 1981.

- 66 ABRAMSON, S. et al. Preparation of highly anisotropic cobalt ferrite/silica microellipsoids using an external magnetic field. **Langmuir**, v. 30, n. 30, p. 9190-9200, 2014.
- 67 RAVEL, B.; NEWVILLE, M. ATHENA and ARTEMIS: interactive graphical data analysis using IFEFFIT. **Physica Scripta**, v. 2005, p. 1007-1010, 2005.
- 68 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.
- 69 OSHIRO JUNIOR, J. A. et al. Development of cutaneous bioadhesive ureasil-polyether hybrid films. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015. doi:10.1155/2015/727324.
- 70 BRUGGISSER, R. et al. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445-448, 2002.
- 71 CRAIEVICH, A. F. Small-angle x-ray scattering by nanostructure materials. In: _____. **Handbook of sol-gel science and technology**. Norwell: Springer US, 2005. Chap. 8, p. 161-189.
- 72 PASSOS, A. R. et al. High surface area hierarchical porous Al₂O₃ prepared by the integration of sol-gel transition and phase separation. **RSC Advances**, v. 6, n. 62, p. 57217-57226, 2016.
- 73 BERRY, C. C. et al. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalisation. **Biomaterials**, v. 25, n. 23, p. 5405-5413, 2004.
- 74 LEE, J.-H. et al. On-demand drug release system for in vivo cancer treatment via self assembled magnetic nanoparticles. **Angewandte Chemie**, v. 52, n. 16, p. 4384-4388, 2013.
- 75 SOUZA, L. K. et al. Ureasil–polyether hybrid film-forming materials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 156-161, 2013.
- 76 MOHAMED, R. M. et al. Structure and magnetic properties of nanocrystalline cobalt ferrite powders synthesized using organic acid precursor method. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, n. 14, p. 2058-2064, 2010.
- 77 LI, X.; HSU, S. L. An analysis of the crystallization behavior of poly(ethylene oxide)/poly(methyl methacrylate) blends by spectroscopic and calorimetric techniques. **Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition**, v. 22, n. 7, p. 1331-1342, 1984.
- 78 CARTA, D. et al. A structural and magnetic investigation of the inversion degree in ferrite nanocrystals MFe₂O₄ (M = Mn, Co, Ni). **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 20, p. 8606-8615, 2009.

79 DAHMOUCHE, K. et al. Small-angle x-ray scattering study of sol-gel-derived siloxane-peg and siloxane-ppg hybrid materials. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 24, p. 4937-4942, 1999.

80 CLAEISSON, E. M. et al. Measurement of the zero-field magnetic dipole moment of magnetizable colloidal silica spheres. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 19, n. 3, p. 036105/1-036105/16, 2007.

81 GUIBERT, C. et al. Hyperthermia of magnetic nanoparticles: experimental study of the role of aggregation. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 50, p. 28148-28154, 2015.