

Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de
Minas Gerais – Universidade Federal de Itajubá

LIPOSSOMAS TERMOSENSÍVEIS CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO COMO UM
POTENCIAL SISTEMA ANTICÂNCER

Aluna: Marina Guedes Fonseca de Souza

Orientador: Prof. Dr. Daniel Crístian Ferreira Soares

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Área de concentração: Química

Linha de pesquisa: Química Medicinal

Itabira
Novembro/2019

Marina Guedes Fonseca de Souza

LIPOSSOMAS TERMOSENSÍVEIS CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO COMO UM
POTENCIAL SISTEMA ANTICÂNCER

Dissertação apresentada como requisito parcial,
para obter o grau de mestre em Química
submetido ao Programa de Pós - Graduação
Multicêntrico em Química de Minas Gerais pela
Universidade Federal de Itajubá.

Orientador: Daniel Crístian Ferreira Soares

Co-orientador: André Luís Branco de Barros

Itabira
Novembro/2019

COLABORADORES

Ana Luiza Chaves Maia

Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG.

Prof.^a Cristiane dos Santos Giuberti

Centro de Ciências da Saúde, UFES.

Janaína de Alcântara Lemos

Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG.

Nádia Leão

Laboratório de Bioengenharia, UNIFEI - Itabira.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora.

À minha família, meu pai Geraldo e meu irmão Leandro pelo amor, apoio e incentivos constantes. Minha irmã Taiane e meu cunhado Breno pela inspiração, incentivo e disposição a sempre ajudar em qualquer momento. E em especial ao meu sobrinho João, que ainda não tem dimensão disso, mas renovava minhas forças e enchia de luz meus dias.

Aos meus familiares de Itabira, tia Lucinda, tio Salvador, Luís Paulo e principalmente a Duda. Obrigada por sempre me acolher, pelo carinho, incentivo e amizade.

Ao meu orientador Prof. Daniel Cristian pela paciência, atenção e dedicação. Sempre disponível para sanar qualquer dúvida a qualquer hora. Obrigada pela amizade e conselhos sobre a vida.

Ao meu coorientador Prof. André Branco pela colaboração no trabalho, por abrir as portas do laboratório de tecnologia farmacêutica, e todo apoio no decorrer da pesquisa.

Aos colegas do laboratório de Bioengenharia e agregados pelo conhecimento compartilhado, apoio nos experimentos e os tão necessários momentos de descontração.

À Ana Luiza por todo conhecimento compartilhado e apoio.

À Prof.^a Cristiane Giuberti, pela colaboração nos experimentos de microcalorimetria.

Aos funcionários da UNIFEI sempre a disposição para ajudar.

Um agradecimento especial as melhores companheiras de apartamento, Geórgia, Letícia e Maria Tereza. Gratidão por todo apoio, incentivo, compreensão quando eu não estava nos meus melhores dias e pela incrível amizade de vocês.

À CAPES e a UNIFEI pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Atualmente o câncer é uma das principais causas de morbimortalidade mundial, entretanto a farmacoterapia disponível hoje em dia apresenta diversas limitações. Os tratamentos atuais do câncer acarretam diversos efeitos adversos para o paciente, devido à falta de seletividade dos fármacos utilizados. O objetivo desse trabalho foi desenvolver formulações constituídas de nanopartículas de óxido de ferro encapsuladas em lipossomas termossensíveis, como uma alternativa para o tratamento seletivo do câncer. As nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas por coprecipitação, funcionalizadas com ácido cítrico e caracterizadas por Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG/DTA), Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram em seguida encapsuladas em lipossomas termossensíveis, obtidos pelo método de evaporação em fase reversa. A formulação obtida foi caracterizada físico-quimicamente por espectrofotometria UV-Vis (determinação de encapsulação), DLS, MET e microcalorimetria. As formulações lipossomais obtidas apresentaram características adequadas para os testes *in vitro*. Foram testadas frente às células da linhagem 4T1, A549 e HEK-293 e foi observado caráter seletivo da mesma, onde houve a redução na viabilidade celular nas duas linhagens tumorais estudadas, com mais de 70% de morte celular. Diferentemente do observado na linhagem HEK-293, onde se obteve viabilidade celular superior a 80%. Esses achados abrem perspectiva para utilização desses lipossomas em estudos posteriores para o tratamento de tumores em modelos experimentais.

ABSTRACT

The cancer is nowadays one of the main causes of morbidity and mortality in the world. Despite the undeniable advances, the pharmacotherapy available today still presents many limitations. The current cancer treatments bring with them many collateral effects to the patient due to its unselectively nature. The main objective of this work was to develop formulations made of encapsulated iron oxide nanoparticles inside thermosensitive liposomes as an alternative for the selective treatment of cancer. The iron oxide nanoparticles were synthesized by coprecipitation, functionalized by citric acid and characterized by X-ray diffraction, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetry (TG/DTA), dynamic light scattering (DLS), and transmission electronic microscopy (TEM). The nanoparticles were then encapsulated in the thermosensitive liposomes obtained by the reverse phase evaporation method. The particles obtained were characterized by UV-Vis spectrophotometry (to check encapsulation), DLS, TEM and microcalorimetry. The liposomal samples obtained showed adequate characteristics for the in vitro tests. They were tested against 4T1, A549 and HEK-293 cells and it was observed selective character, where there was a reduction in cell viability in both tumor cells studied, with more than 70% cell death. Unlike the observed in the HEK-293 cells, where was obtained cell viability greater than 80%. These findings open perspective for the use of these liposomes in studies for the treatment of tumors in experimental models.

LISTA DE ABREVIATURAS

4T1	Adenocarcinoma mamário murino
A549	Adenocarcinoma de pulmão humano
ANOVA	Análise de variância
CMC	Concentração micelar crítica
C_p	Capacidade calorífica
DLS	Espalhamento dinâmico da luz (do inglês, <i>Dynamic light scattering</i>)
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês, <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DSPC	diestearoilfosfatidilcolina
DSPE-PEG200	Distearoilfosfatidiletanolamina-(polietilenoglicol)2000
DSPE-PEG-2000	Distearoilfosfatidiletanolamina-(polietilenoglicol)2000
DTA	Análise térmica diferencial
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentado (Enhanced Permeation and Retention)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FSC	<i>Foward scattering</i>
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier
HEK-293	Rim embrionário humano
ICSD	<i>Inorganic Crystal Structure Data base</i>
$L\alpha$	Fase lamelar fluída
$L\beta$	fase lamelar gel ordenado
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MRI	Ressonância magnética nuclear (do inglês <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
MSPC	Monostearoilfosfatidilcolina
PDI	Índice de polidispersividade
REV	Evaporação em fase reversa (do inglês, <i>Reverse-phase Evaporation</i>)
SAR	<i>Specific Absorption Rate</i>
SSC	<i>Side Scattering</i>
T_c	Temperatura de transição de fase $L\beta \rightarrow L\alpha$ (do inglês, <i>Chain melting Temperature</i>)
TG	Termogravimetria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura cristalina da magnetita com sua composição de cátions (Fe^{+2} e Fe^{+3}).....	19
Figura 2: Representação esquemática mostrando a configuração do momento magnético de spin para os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na magnetita.	20
Figura 3: Formação de domínios magnéticos.	23
Figura 4: Representação das etapas de nucleação e crescimento que ocorre no processo de co-precipitação.	26
Figura 5: Ilustração de mecanismos de precipitações coloidais que levam a partículas monodispersas: (a) modelo de La Mer, (b) modelo de Ocaña e (c) modelo de Sugimoto.....	27
Figura 6: Histograma da amostra NPM-Ac.....	34
Figura 7: Difratoograma de raios-X obtido para a nanopartícula magnética sintetizada (NPM), juntamente com os padrões da magnetita (PDF 19-629) e maghemita (PDF 39-1346). Os picos presente são atribuídos aos planos cristalinos nas direções (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) e (4 4 0).	35
Figura 8: Difratoograma de raios-X obtido para a nanopartícula magnética sintetizada (NPM), juntamente com os padrões tabelados da hematita e goethita. A não concordância dos picos elimina a possível presença dessas fases na amostra.....	36
Figura 9: Espectros FTIR. A) amostra de ácido cítrico e B) amostra de NPM-Aco...	37
Figura 10: Representação da ligação da nanopartícula magnética com ácido cítrico do tipo monodentada mononuclear.	38
Figura 11: Curvas de TG e DTA da amostra de nanopartícula magnética funcionalizada com ácido cítrico, mostrando três etapas de perda de massa.	39
Figura 12: Imagens de TEM.	40
Figura 13: Representação esquemática de um lipossoma.....	46
Figura 14: Possíveis conformações de moléculas anfifílicas em meio aquoso..	49
Figura 15: Esquema de preparação dos lipossomas termossensíveis pelo método de evaporação em fase reversa.	52
Figura 16: Soluções para análise de espectrofotometria UV-Vis.	53
Figura 17: Ilustração da formação do complexo 1:3 de Fe^{2+} com a o-fenantrolina....	54
Figura 18: Frascos constituídos de: (1) NPM-Ac; (2) TTSL e (3) TTSL-NPM-Ac. ...	56
Figura 19: Histograma da amostra TTSL-NPM-Ac.....	56

Figura 20: Estudo da eficiência de encapsulação em lipossomas.....	58
Figura 21: Estudo de estabilidade TTSL-NPM-Ac.....	59
Figura 22: Imagem da formulação TTSL-NPM-Ac 21 dias após sua obtenção e sendo armazenada a 4°C.	60
Figura 23: Termograma da amostra TTSL-NPM-Ac.....	61
Figura 24: Fotomicrografias TEM obtidas para o lipossoma TTSL-NPM-Ac.....	62
Figura 25: Diferentes mecanismos de endocitose.....	67
Figura 26: Os lipossomos podem interagir especificamente com a célula.....	68
Figura 27: Ilustração do equipamento citômetro de fluxo.....	72
Figura 28: Micrografias e gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células 4T1 e A549 tratadas com NPM-Ac na concentração de 150 µg/mL.	77
Figura 29: Gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células HEK tratadas com NPM-Ac na concentração de 150 µg/mL.	79
Figura 30: Resultados sobre a viabilidade das células 4T1, determinada por citometria de fluxo, quando tratadas com TTSL-NPM-Ac em diferentes concentrações..	81
Figura 31: Micrografias e gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células 4T1 tratadas com TTSL-NPM-Ac na concentração de 3,8 µg/mL	82
Figura 32: Resultados sobre a viabilidade das células A549, determinada por citometria de fluxo, quando tratadas com TTSL-NPM-Ac em diferentes concentrações.	83
Figura 33: Micrografias e gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células A549 tratadas com TTSL-NPM-Ac na concentração de 3,8 µg/mL.	85
Figura 34: Gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células HEK-293 tratadas por 48 horas com TTSL-NPM-Ac com concentração de ferro igual a 3,8 µg/mL	87

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	12
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo geral.....	16
1.2.2 Objetivos específicos	17
1.3 REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2: SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	19
2.1 INTRODUÇÃO	19
2.1.1 Propriedades magnéticas de nanopartículas.....	21
2.1.2 Síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro	24
2.2 OBJETIVOS.....	31
2.3.1 Materiais.....	31
2.3.2 Síntese e funcionalização das nanopartículas magnéticas	31
2.3.3 Caracterização das nanopartículas magnéticas.....	32
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
2.4.1 Determinação do tamanho médio	33
2.4.2 Caracterização Química	34
2.4.3 Caracterização morfológica	39
2.5 CONCLUSÃO	41
2.6 REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 3: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL.....	46
3.1 INTRODUÇÃO	46
3.1.1 Formação de agregados por moléculas anfifílicas.....	48
3.2 OBJETIVO	50
3.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	50
3.3.1 Materiais.....	50
3.3.2 Preparação de lipossomas termossensíveis	50
3.3.3 Caracterização físico-química dos lipossomas.....	52
3.3.4 Estudo da taxa de incorporação de NPM.....	53
3.3.5 Estudo de estabilidade da formulação (TTSL-NPM-Ac)	54

3.3.6 Caracterização térmica por análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC).....	55
3.3.7 Caracterização morfológica	55
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.5 CONCLUSÃO	63
3.6 REFERÊNCIAS.....	63
CAPÍTULO 4: ESTUDO <i>IN VITRO</i>	66
4.1 INTRODUÇÃO	66
4.1.1 Citotoxicidade induzida por nanopartículas de óxido de ferro	69
4.1.2 Citometria de Fluxo	71
4.2 OBJETIVO	74
4.3 PARTE EXPERIMENTAL	74
4.3.1. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	74
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.4.1 Estudos da citotoxicidade de amostras NPM-Ac	76
4.4.2 Estudos de citotoxicidade de amostras TTSL-NPM-Ac	79
4.5 CONCLUSÃO	88
4.6 REFERÊNCIAS.....	89

1.1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma denominação genérica que envolve um grande número de doenças cuja característica principal é um crescimento celular descontrolado. É caracterizado pelo desequilíbrio entre a proliferação e a diferenciação das células que envolvem os tecidos e órgãos, podendo irradiar para outras regiões do corpo (metástase). É uma doença de causa multifatorial, responsável por uma das maiores taxas de mortalidade no mundo (INCA, 2018). Excluindo-se os cânceres de pele não melanoma, o câncer mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, é o de mama. Estimam-se a ocorrência de 59.700 casos novos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres no país. Esse tipo de câncer também acomete homens, porém é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença. Embora tenha a maior taxa de mortalidade quando comparado aos outros tipos da doença (12,9/100 mil), sua letalidade é relativamente baixa, dada a taxa de incidência que é menor que um terço (INCA, 2018).

O desenvolvimento do câncer pode estar associado a diferentes fatores, podendo estar relacionados com a idade, fatores genéticos, fatores endócrinos/história reprodutiva (primeira menstruação precoce, menopausa tardia e uso de contraceptivos e de terapia de reposição hormonal por tempo prolongado) e fatores ambientais/comportamentais (tabagismo, alcoolismo, obesidade e exposição à radiação ionizante). A idade é o principal fator de risco, pois se tem um acúmulo de exposições aos outros fatores ao longo da vida e as próprias alterações biológicas que ocorrem com o envelhecimento (INCA, 2015).

Atualmente as abordagens utilizadas no tratamento do câncer são: cirurgia para remoção do tumor; radioterapia, onde se usa de radiação para destruir o tumor ou impedir o aumento de suas células; e quimioterapia, o mais utilizado atualmente por ser sistêmico. Em geral é necessária a combinação de mais de um tipo de tratamento, aumentando as chances de cura e assim, muitas vezes, pode aumentar também os efeitos adversos que esses tratamentos acarretam devido sua baixa seletividade (INCA, 2015).

Os tratamentos atualmente disponíveis, em geral, são combinados para maior eficiência, porém trazem diversos efeitos indesejáveis. Na tentativa de contornar esses efeitos, e também tornar o tratamento mais eficiente, existem atualmente diversas pesquisas em muitas áreas do conhecimento. Um dos grandes limitantes na administração de grande parte dos agentes antitumorais empregados na

quimioterapia do câncer são seus severos efeitos adversos, advindos da necessidade de uma alta dosagem para alcançar o sucesso. Assim, dentre os principais efeitos destacam-se a alopecia, náuseas e vômitos, problemas neurológicos e musculares, alterações da pele e unhas, problemas renais, além de poder provocar efeitos de longo prazo, como problemas cardíacos, neurológicos ou infertilidade (GOGOI; KUMAR; PATRA, 2016).

Em sua maioria, o efeito terapêutico de um fármaco resulta de sua interação com componentes macromoleculares funcionais do organismo, levando a uma sequência de eventos bioquímicos que resultam no efeito desejado. Porém, à medida que se eleva a dose do fármaco ele se pode se tornar menos seletivo e pode atuar em outros sistemas, causando os efeitos indesejáveis (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010). Frente a esse cenário, diversas pesquisas focadas no desenvolvimento de formas de administração de agentes terapêuticos que possam minimizar os efeitos adversos, como o emprego de carreadores nanoestruturados de fármacos, vêm demonstrando efetividade na redução da toxicidade como as formulações farmacêuticas aprovadas para uso clínico: Doxil, Myocet, DaunoXome, Depocyt, Mepact, Onivyde, dentre outros (BULBAKE, 2017).

Os lipossomas são as nanoestruturas com o maior número de formulações aprovadas para uso clínico atualmente no mundo. Elas apresentam várias vantagens que contribuem para o aumento da eficácia do fármaco, como: promover a melhor solubilização do fármaco no meio biológico, agir como um sistema de liberação prolongada, fornecer liberação direcionada, reduzir o efeito tóxico dos medicamentos, fornecer para o fármaco proteção contra a degradação no meio biológico, e ainda a encapsulação de agentes quimioterápicos dentro de estruturas lipossômicas pode limitar a captação tecidual normal e, assim, melhorar seu índice terapêutico (BULBAKE, 2017).

O processo de desenvolvimento de fármacos terapêuticos demanda muitos anos de pesquisa e passa por diversas etapas até aprovação para uso clínico. Diversos agentes anticancerígenos com formulações lipossomais já foram aprovados em alguns países, pelos seus respectivos órgãos reguladores, para estudos clínicos. Alguns desses são mostrados na tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Agentes anticancerígenos lipossomais em diferentes fases de ensaio clínico.

NOME	PRINCÍPIO ATIVO	TIPO DE CÂNCER ALVO	MECANISMO DE AÇÃO	STATUS
Doxil (Caelyx)	Doxorrubicina	Câncer de mama e ovário	Inibição da síntese de ácidos nucleicos	Fase II/III
DaunoXome	Daunorrubicina	Sarcoma de Kaposi	Inibição da topoisomerase II	Fase III
DepoCyt	Citarabina	Meningite linfomatosa	Atua na fase S do ciclo celular e bloqueia o DNA síntese	Fase IV
Onivyde	Irinotecano	Câncer de pâncreas	Inibição da topoisomerase I	Fase II/III
Vyxeos	Daunorrubicina e citarabina	Leucemia mielóide aguda	-	Fase III
ThermoDox	Doxorrubicina	Carcinoma hepatocelular	-	Fase III

Fonte: Jabir et al. 2018.

Como apresentado na Tabela 1, novos tratamentos promissores do câncer com lipossomas estão em diferentes estágios de ensaios clínicos. Entre eles pode-se destacar o ThermoDox, que usa tecnologia de lipossomas termossensíveis. Os fosfolípides, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), monostearoilfosfatidilcolina (MSPC), fosfatidilcolina de soja hidrogenada e distearoilfosfatidiletanolamina-(polietilenoglicol)2000 (DSPE-PEG-2000) constituem o ThermoDox em uma proporção de 90:10:4. O aquecimento dessa formulação na faixa de temperatura de 40°C-45°C, promove o processo de desorganização de sua estrutura e consequente liberação da doxorubicina. Nos ensaios clínicos, foi observado que todo o efeito adverso associado ao ThermoDox é apenas associado a doxorubicina livre (JABIR, et. al., 2018).

Na tentativa de melhorar a eficiência de tratamento e diminuir os efeitos indesejáveis, diversos tratamentos alternativos vêm sendo estudados, dentre eles a hipertermia magnética fluida. Nesse tipo de tratamento a morte celular é provocada por meio do aumento da temperatura do tumor. As células tumorais são menos resistentes ao aumento de temperatura em comparação as células saudáveis. O aumento da temperatura em torno de 41°C a 45°C acarreta em mudanças bioquímicas e fisiológicas que resultam na morte celular, principalmente por apoptose. Esse calor pode ser gerado utilizando-se as nanopartículas superparamagnéticas, que apresentam boas propriedades que nanopartículas para este fim deve possuir, como: biocompatibilidade, alto nível de acumulação no tumor alvo e absorção de energia do campo magnético alternado. O calor é gerado quando se aplica o campo magnético alternado causando o aquecimento da região até a temperatura de hipertermia. SAR (*Specific Absorption Rate*) é a taxa de absorção de energia por tecidos do corpo, específica para uma determinada fonte de energia eletromagnética, como no caso das nanopartículas de óxido de ferro, e essa taxa depende de alguns parâmetros, tais como: estrutura das nanopartículas (tamanho, forma e estrutura do cristal), propriedades magnéticas (magnetocristalina, magnetoelástica) assim como, amplitude (H) e frequência (f) do campo alternado aplicado. O aquecimento gerado pode estar relacionado a dois distintos mecanismos: modo Browniano, no qual a fricção mecânica das nanoestruturas leva ao aumento da temperatura e modo Néel, em que o aquecimento é devido à rotação do momento magnético acompanhando a oscilação do campo externo aplicado (HERGT, et al., 2006). Pelo fato do aquecimento ser mais localizado na região acometido pela neoplasia torna esse método de tratamento mais seletivo, logo ocasiona menos efeitos adversos (LAURENT et. al., 2011).

Nas últimas décadas, vários estudos pré-clínicos envolvendo a técnica de hipertermia magnética vêm sendo realizados na tentativa de se obter melhorias significativas no tratamento do câncer, visando a redução de toxicidade. Majeed et al., (2014) estudaram o uso de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com sílica biocompatível ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$). Foi observado alta atividade antitumoral *in vitro* após a aplicação de um campo magnético externo alternado. Rana et al., (2014) utilizaram nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 revestidas com polianilina reticuladas para hipertermia. O sistema exibiu alta taxa de absorção específica, de 120 W/g, em baixa concentração devido à alta sensibilidade magnética e estabilidade coloidal. Makridis et al., (2014) investigaram as propriedades de aquecimento de nanopartículas de MnFe_2O_4 , em soluções aquosas. O perfil de aquecimento do material demonstrou que os valores de taxa de absorção específica de

perda diminuíram significativamente quando disperso em meio aquoso. Os autores atribuíram esse comportamento à restrição do relaxamento browniano em meios altamente viscosos. Além disso, eles demonstraram a aplicação da terapia de hipertermia magnética em células de osteossarcoma sem afetar as células saudáveis.

Xie et al., (2015) desenvolveram nanocristais de ferrita de Mn-Zn magnética, revestidos com fosfolipídios com PEG (fosfatidilcolina de soja hidrogenada e DSPE-PEG2000), biocompatíveis e biodegradáveis. A eficiência de hipertermia induzida magneticamente em camundongos com modelo de carcinoma de mama foi avaliada e os resultados revelaram excelente efeito de aquecimento e alta acumulação no tumor devido ao efeito de permeabilidade e retenção aumentados (EPR). Com um campo magnético de corrente alternada de 12 A a 390 kHz, os locais da superfície do tumor foram aquecidos a aproximadamente 43 °C em 30 min. A hipertermia de longa duração pôde efetivamente induzir a apoptose das células tumorais, inibir a angiogênese dos vasos tumorais e, suprimir o crescimento do tumor em um determinado período de tempo. Guisasola e colaboradores (2018) estudaram a eficácia de nanopartículas de sílica mesoporosas magnéticas para o tratamento tumoral *in vivo*. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, juntamente com um fármaco, doxorrubicina, foram incorporadas a uma matriz de sílica mesoporosa e revestidas com um polímero termorresistente. As nanopartículas magnéticas atuaram como fontes internas de aquecimento sob um campo magnético alternado que aumentaram a temperatura do ambiente, provocando a transição do polímero e consequentemente a liberação do fármaco aprisionado no interior dos poros da sílica. Por um efeito sinérgico entre a hipertermia intracelular e a quimioterapia, foi alcançada uma inibição significativa do crescimento do tumor em 48 h após o tratamento.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Sintetizar nanopartículas de óxido de ferro com potencial caráter superparamagnético, encapsular essas nanopartículas em lipossomas termossensíveis e estudar *in vitro* a potencial aplicação desse sistema na terapia anticâncer.

1.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e funcionalizar com ácido cítrico nanopartículas de óxido de ferro;
- Caracterizar físico-quimicamente e morfologicamente o material obtido;
- Preparar e caracterizar físico-quimicamente e morfologicamente lipossomas termosensíveis contendo as nanopartículas;
- Verificar a taxa de encapsulação das nanopartículas nos lipossomas;
- Conduzir estudos de estabilidade dos lipossomas contendo as nanopartículas;
- Estudar a atividade citotóxica de lipossomas contendo nanopartículas de óxido de ferro em modelos de células de linhagem normal e de tumor.

1.3 REFERÊNCIAS

BULBAKE, U.; DOPPALAPUDI, S.; KOMMINENI N.; KHAN, W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics, Hyderabad*, v. 9, n. 4, 27 mar. 2017.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release*. 2010;148:135–146.

GOGOI, M.; KUMAR, N.; PATRA, S. Multifunctional magnetic liposomes for cancer imaging and therapeutic applications. *Elsevier*. p. 743–782, dez. 2016.

GUISASOLA, E.; ASÍN, L.; BEOLA, L.; DE LA FUENTE, J.M.; BAEZA, A.; VALLET-REGÍ, M. Beyond traditional hyperthermia: In vivo cancer treatment with magnetic-responsive mesoporous silica nanocarriers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018) 12518–12525.

HERGT, R.; DUTZ, S.; MÜLLER, R.; ZEISBERGER, M. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v.18, p.2919, set. 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa incidência de câncer no Brasil 2018. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp>>. Acesso em: 10 out. 2019.

LAURENT, S.; DUTZ, S.; HÄFELI, U.O.; MAHMOUDI, M. Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 166 (2011) 8–23.

MAJEED, J.; PRADHAN, L.; NINGTHOUJAM, R.S.; VATSA, R.K.; BAHADUR, D.; TYAGI, A.K. Enhanced specific absorption rate in silanol functionalized Fe₃O₄ core-shell nanoparticles: Study of Fe leaching in Fe₃O₄ and hyperthermia in L929 and HeLa cells. *Colloids Surf.*(2014) 396–403.

MAKRIDIS , A.; TOPOURIDOU, K.; TZIOMAKI, M.; SAKELLARI, D.; SIMEONIDIS, K.; ANGELAKERIS, M.; YAVROPOULOU, M.P.; YOVOS, J.G.; KALOGIROU, O. In vitro application of Mn ferrite nanoparticles as novel magnetic hyperthermia agents. *J. Mater. Chem.* v. 47, p. 8390–8398, 2014.

JABIR, N.; ANWAR, K.; FIROZ, C.; OVES, M.; KAMAL, M.; TABREZ, S. An overview on the current status of cancer nanomedicines. *Current Medical Research and Opinion*, v. 34, n. 5, p. 911–921, mai. 2018.

RANA, S.; JADHAV, N. V.; BARICK, K.C.; PANDEY, B.N.; HASSAN, P.A. Polyaniline shell cross-linked Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for heat activated killing of cancer cells. *Dalt. Trans.* 43 (2014) 12263–12271.

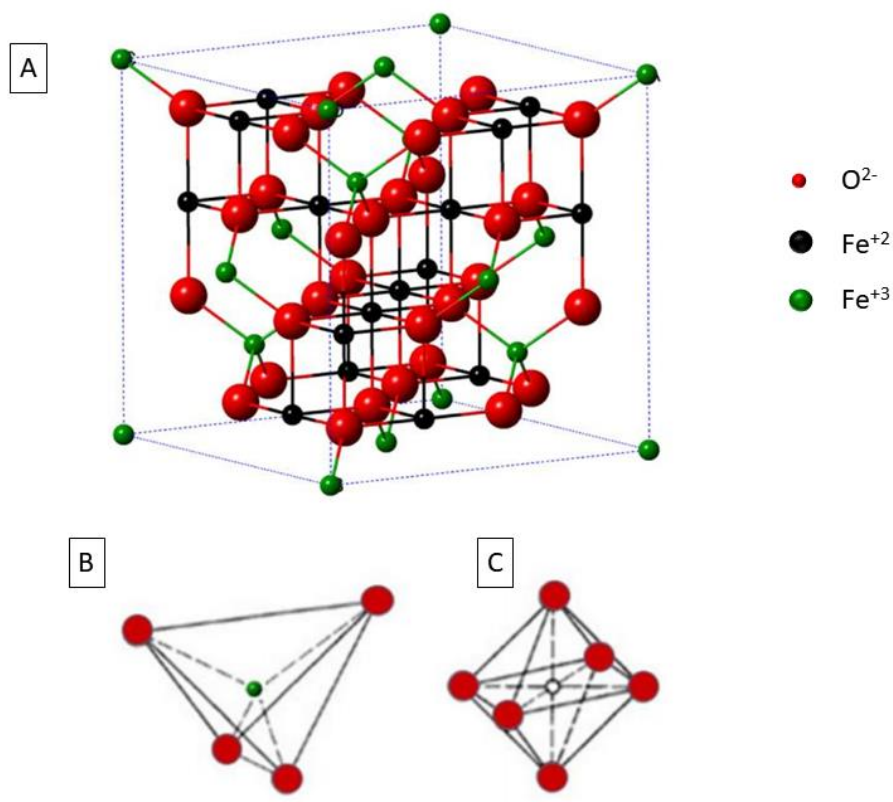
XIE, J.; ZHANG, Y.; YAN, C.; SONG, L.; WEN, S.; ZANG, F.; CHEN, G.; DING, Q.; YAN, C.; GU, N. High-performance PEGylated Mn-Zn ferrite nanocrystals as a passive-targeted agent for magnetically induced cancer theranostics. *Biomaterials* 35 (2014) 9126–9136.

CAPÍTULO 2: SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

2.1 INTRODUÇÃO

Os óxidos de ferro podem apresentar várias composições químicas e assim diferentes propriedades. As formas cristalinas mais intensamente estudadas são a magnetita e sua forma oxidada, maghemita. A magnetita é constituída por óxidos de ferro (II) e (III), sendo sua fórmula química melhor representada por $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$. Essa forma cristalina exibe estrutura do tipo espinélio invertido, pertencente ao sistema cúbico (Figura 1) (KORNIG et al., 2014).

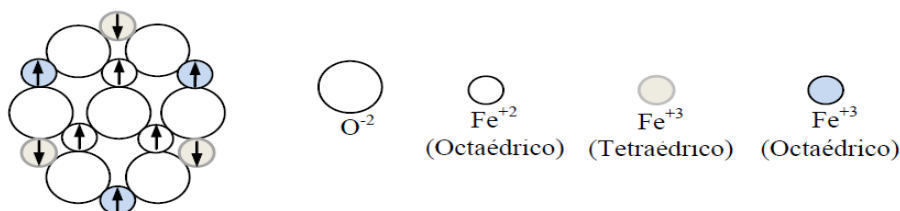
Figura 1: Estrutura cristalina da magnetita com sua composição de cátions (Fe^{+2} e Fe^{+3}) e ânions (O^{2-}), e seus sítios. A) estrutura cristalina do tipo espinélio; B) Representação do sítio tetraédrico; C) Representação do sítio octaédrico.



Fonte: Adaptado de Wu et al., 2015.

Nessa estrutura, os íons oxigênio estão distribuídos de modo a formar a rede cúbica, e os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} estão localizados nos espaços entre os oxigênios, os quais são de dois tipos, sítios tetraédricos e octaédricos, assim metade dos íons Fe^{3+} estão coordenados tetraedricamente, e a outra metade ocupa os sítios octaédricos juntamente com os íons Fe^{2+} . Os momentos magnéticos do Fe^{3+} na posição octaédrica estão alinhados paralelamente, mas em sentido oposto aos íons Fe^{3+} que ocupam a posição tetraédrica, e como estão divididos igualmente entre essas posições, não existe momento magnético resultante da presença desses íons. Porém, os íons Fe^{2+} situam-se todos nos interstícios octaédricos, possuindo os momentos magnéticos alinhados entre si, e sendo portanto, responsáveis por um comportamento magnético observado na magnetita, como mostrado na Figura 2. As nanopartículas desse óxido de ferro que apresentam propriedades superparamagnéticas, são também chamadas SPIONs, do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles* (CORNELL; SCHWERTMANN, 1996; CULLITY, 1972; KORNIG et al., 2014).

Figura 2: Representação esquemática mostrando a configuração do momento magnético de spin para os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na magnetita.



Fonte: Bini, 2016.

Distintos materiais, ou até materiais iguais, porém de diferentes tamanhos de partícula, apresentam diferentes reações quando submetidos a um campo magnético, ou seja, apresentam diferentes propriedades magnéticas, e uma dessas propriedades é classificada como superparamagnetismo. Quando um material tem características superparamagnéticas, o mesmo apresenta magnetização apenas quando em presença de um campo magnético (apresentam um campo coercivo e magnetização remanescente nulo). Essa característica, além da baixa toxicidade, torna o material extremamente interessante para aplicações *in vivo*, pois retirado o campo, as nanopartículas deixarão de ser atraídas umas pelas outras, diminuindo assim o efeito de agregação, algo indesejável

para este tipo de aplicação, diferentemente, por exemplo, de partículas ferromagnéticas, que tendem a se aglomerar por apresentarem dipolo magnético permanente, que interagem fortemente (LAURENT et al., 2014; PANKHURST et al., 2003)

As nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas têm se mostrado cada vez mais interessante para a nanociência e nanotecnologia, encontrando diversas aplicações em diferentes áreas. Na área biomédica, devido sua biocompatibilidade, têm-se explorado sua aplicação principalmente em: sistemas nanocarreadores, destruição *in situ* de células tumorais pelo fenômeno de hipertermia e como agentes de contraste em diagnóstico por imagem de ressonância magnética nuclear (IRM). Suas limitações estão na baixa estabilidade em condições fisiológicas (pH e força iônica), onde as mesmas tendem a aglomerar-se ou a sofrer oxidação na superfície, reduzindo sua eficiência. Tais condições podem ser contornadas através do revestimento dessas nanopartículas, e diversas são as opções que têm sido empregadas, como exemplo pode-se citar os lipossomas (THIESEN; JORDAN, 2008; LAURENT et al., 2014).

2.1.1 Propriedades magnéticas de nanopartículas

As propriedades magnéticas dos materiais têm sua origem na estrutura eletrônica dos átomos. Prótons, nêutrons e elétrons possuem um momento angular intrínseco, conhecido como spin. O spin nuclear cria um momento magnético muito menor que o do elétron, dada a grande massa do núcleo, e dessa forma sua contribuição é tipicamente desprezível. O momento magnético do elétron é usualmente três ordens de grandeza maior do que o spin de um próton. A aplicação de campo magnético externo produz um efeito muito mais pronunciado sobre os elétrons não pareados, e portanto, os elétrons são a principal fonte do momento magnético em sólidos. Os momentos de dipolo magnéticos do elétron tem sua origem associada a duas fontes distintas, onde o primeiro momento decorre do movimento orbital do elétron em torno do núcleo do átomo e o segundo da rotação do elétron em torno do seu eixo (spin) (COEY, 2010; CULLITY; GRAHAM, 2008; DIEGUEZ et. al., 2017).

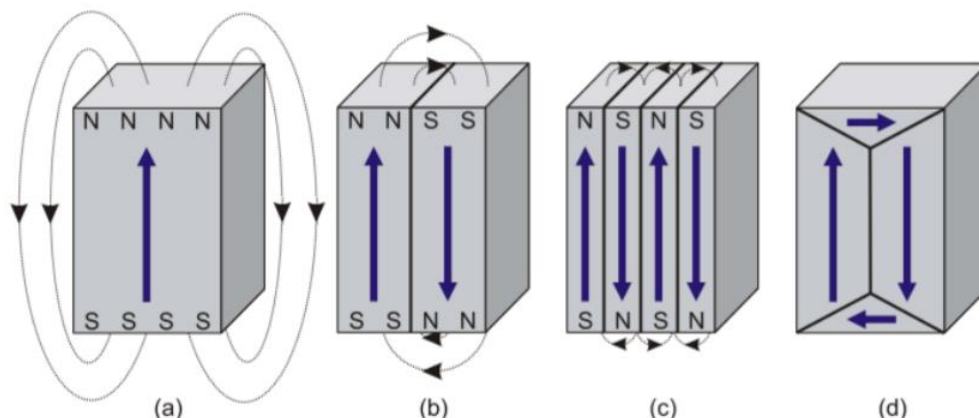
O momento magnético total de um átomo é, então, uma grandeza vetorial dos momentos eletrônicos. Materiais magnéticos, incluindo as nanopartículas magnéticas, são caracterizados pela sua resposta a um campo magnético aplicado. Quando isso ocorre, os momentos magnéticos de todos os elétrons podem se orientar de forma a cancelarem uns aos outros, resultando em um momento

magnético igual a zero (diamagnetismo) ou pode acontecer o cancelamento parcial dos momentos magnéticos deixando o átomo com um momento magnético resultante, e tal comportamento pode ser classificado como paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo e ferrimagnetismo. Todos os materiais exibem pelo menos um dos estados magnéticos apontados acima, e o seu comportamento depende da resposta dos dipolos magnéticos atômicos quando lhe é aplicado um campo magnético externo (CALLISTER, 2005).

Os materiais paramagnéticos quando em ausência de um campo, se encontram orientados de maneira aleatória, apresentando uma magnetização resultante nula. Ao se aplicar um campo magnético, os dipolos tendem a se alinhar na mesma direção, tendo assim uma magnetização resultante diferente de zero. As propriedades magnéticas desses materiais dependem de sua geometria e dimensão. Nos materiais, existem regiões, em que seus momentos magnéticos estão alinhados paralelamente, denominados domínios magnéticos, e dentro de cada domínio, a magnetização assume valores de saturação, mas as direções da magnetização total de cada domínio não são necessariamente paralelas entre si. Os materiais podem ser monodomínios ou multidomínios, e isso está relacionado ao seu tamanho (FRANCISQUINI; SCHOENMAKER; SOUZA, 2016).

Quando as partículas possuem monodomínio, elas apresentam energia magnetostática (energia de um campo magnético externo) muito grande, pois, em sua superfície existem polos magnéticos livres. Dessa forma vai ocorrendo uma quebra em domínios da magnetização, a fim de diminuir a energia magnetostática, que diminui devido ao fechamento do fluxo nas extremidades do material, como pode ser observado na Figura 3. Os polos magnéticos vão ficando cada vez mais próximos uns dos outros, até que se tenha um domínio fechado, onde a energia magnetostática é zero (Figura 3-d). Os domínios serão formados enquanto a energia necessária para criar uma camada de transição, chamada de paredes de domínio ou paredes de Bloch, for menor do que a diminuição da energia magnetostática através da formação de domínios. Dessa forma, quando o tamanho de uma partícula é reduzido, a variação da energia magnetostática responsável pela formação e manutenção das paredes de domínio, também diminui até um determinado diâmetro crítico (D_{crit}), e a partir desse ponto a formação de paredes de domínio, tem um custo energético maior do que sustentar a energia magnetostática de um estado de monodomínio. Assim, partículas que apresentem diâmetro menor que D_{crit} , possuem monodomínios magnéticos. Para partículas de óxido de ferro esse diâmetro varia de 5 a 20 nm (BEAN; LIVINGSTON, 1959; FRANCISQUINI; SCHOENMAKER; SOUZA, 2016; LEFEBURE, 1998).

Figura 3: Formação de domínios magnéticos. (a) Representação partícula monodomínio e sua elevada energia magnetostática devido polos magnéticos livres na superfície; (b) e (c) formação de domínios, e consequente diminuição da energia magnetostática devido ao fechamento do fluxo nas extremidades; (d) devido os polos magnéticos cada vez mais próximos, até que se tenha um domínio fechado, Figura4-d, onde a energia magnetostática é zero.



Fonte: Salvador, 2014.

Partículas com tamanho reduzido, que são constituídas por um único domínio podem apresentar um comportamento magnético conhecido como superparamagnetismo. Nesse tipo de sistema, o momento magnético efetivo é determinado pela contribuição dos momentos magnéticos individuais dos monodomínios. De forma geral, o superparamagnetismo é explicado com base na equação de relaxação magnética (Equação de Néel-Arrhenius), como representado na Equação 1 (BRANDL, 2005).

$$\tau = \tau_0 e^{KV/k_B T} \quad (1)$$

Onde:

τ_0 = tempo de relaxação,

k_B = constante de Boltzmann ($1,346 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$),

T = temperatura absoluta,

V = volume da partícula (m^3),

K = constante de anisotropia (J.m^{-3})

Segundo a equação, cada partícula possui um tempo de relaxação, que é o tempo médio para reverter o momento magnético de um estado de equilíbrio até outro. O tempo de relaxação é determinado por uma frequência de tentativas de saltos, um tempo associado aos pulos entre um estado de equilíbrio e outro. As propriedades magnéticas das nanopartículas são então governadas pelo tempo de relaxação do momento magnético da partícula. Neste caso, o tempo de relaxação τ_0 , o qual depende exponencialmente do volume V , é baixo (CULLITY; GRAHAM, 2008; LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

Existem determinados eixos preferenciais de magnetização, originando assim, uma anisotropia magnetocristalina. Esta preferência na orientação dos momentos magnéticos está associada a uma energia de anisotropia magnetocristalina, a qual é mínima quando os momentos magnéticos estão orientados ao longo destes eixos. Partículas magnéticas de pequeno tamanho possuem dois mínimos de energia anisotrópica. Esses mínimos são separados por uma barreira de energia anisotrópica que é proporcional ao produto das variáveis K e V , e é responsável por manter os momentos magnéticos em certa direção. Com a diminuição do tamanho de partícula, a energia térmica $k_B T$ excede a barreira energética e a magnetização é facilmente invertida. Dessa forma quando $k_B T > KV$, o sistema se torna superparamagnético, a partícula apresenta energia suficiente para oscilar livremente de uma direção a outra (CULLITY; GRAHAM, 2008).

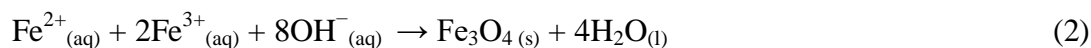
2.1.2 Síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro

Diversas são as metodologias que podem ser utilizadas para a obtenção de partículas nanométricas, apresentando cada uma dessas metodologias vantagens e desvantagens. Os métodos mais utilizados são: decomposição térmica, reações hidrotermais, microemulsão, sol-gel e coprecipitação. A principal vantagem desses métodos é o maior controle da forma e tamanho do nanomaterial a ser obtido, uma vez que é possível o controle cinético e termodinâmico do crescimento da nanopartícula (ALVES, 2012).

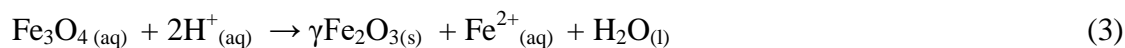
Na última década, as sínteses de nanopartículas com propriedades magnéticas foram intensamente estudadas, se tornando bem consolidado as vantagens que cada método apresenta. Em relação ao controle de tamanho e morfologia das nanopartículas, a decomposição térmica se mostra o melhor método desenvolvido até então. A microemulsão também é muito usada para sintetizar

nanopartículas monodispersas com morfologias diferentes, porém é um método que faz uso de grande quantidade de solvente. As nanopartículas magnéticas sintetizadas pelo método hidrotermal apresentam excelente cristalinidade e por isso, podem possuir melhores propriedades magnéticas. A síntese de nanopartículas por coprecipitação é o caminho químico mais usado, a técnica é simples, econômica, não tem o envolvimento de produtos químicos tóxicos e rendimentos mais elevados na obtenção nanopartículas magnéticas, quando comparado aos outros métodos químicos (LAURENT et al. 2008; MAHMED, et al. 2014; WU; HE; JIANG, 2008).

Os óxidos de ferro (Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sintetizados por co-precipitação, geralmente são obtidos por meio de uma mistura estequiométrica de sais ferrosos e férricos, em um meio aquoso com a adição de uma base e preferencialmente em atmosfera inerte. O tamanho, a forma e a composição das nanopartículas magnéticas dependem de vários fatores, como: tipo de sais utilizados (cloretos, sulfatos, nitratos), da razão entre os sais, da temperatura de síntese, do valor do pH, força iônica do meio, velocidade de agitação, velocidade de adição da base e a ordem de adição dos reagentes. Com as condições de síntese definidas, a qualidade das nanopartículas é totalmente reprodutível (LAURENT et al. 2008). A reação química de formação da magnetita é dada pela Equação 2.



A magnetita (Fe_3O_4) não é muito estável, podendo sofrer oxidação tanto pelo oxigênio do ar como também pelas reações de transferência de elétrons ou íons, dependendo do pH da solução. A oxidação de íons ferrosos está sempre associada ao fluxo de cátions ao longo da estrutura cristalina, que criando lacunas catiônicas distinguem a maghemita da magnetita. A principal desvantagem do método de co-precipitação está relacionada à necessidade de controlar cuidadosamente os valores de pH, tanto durante a síntese como durante a purificação. A magnetita pode ser transformada em maghemita conforme a Equação 3 (LAURENT, 2008).

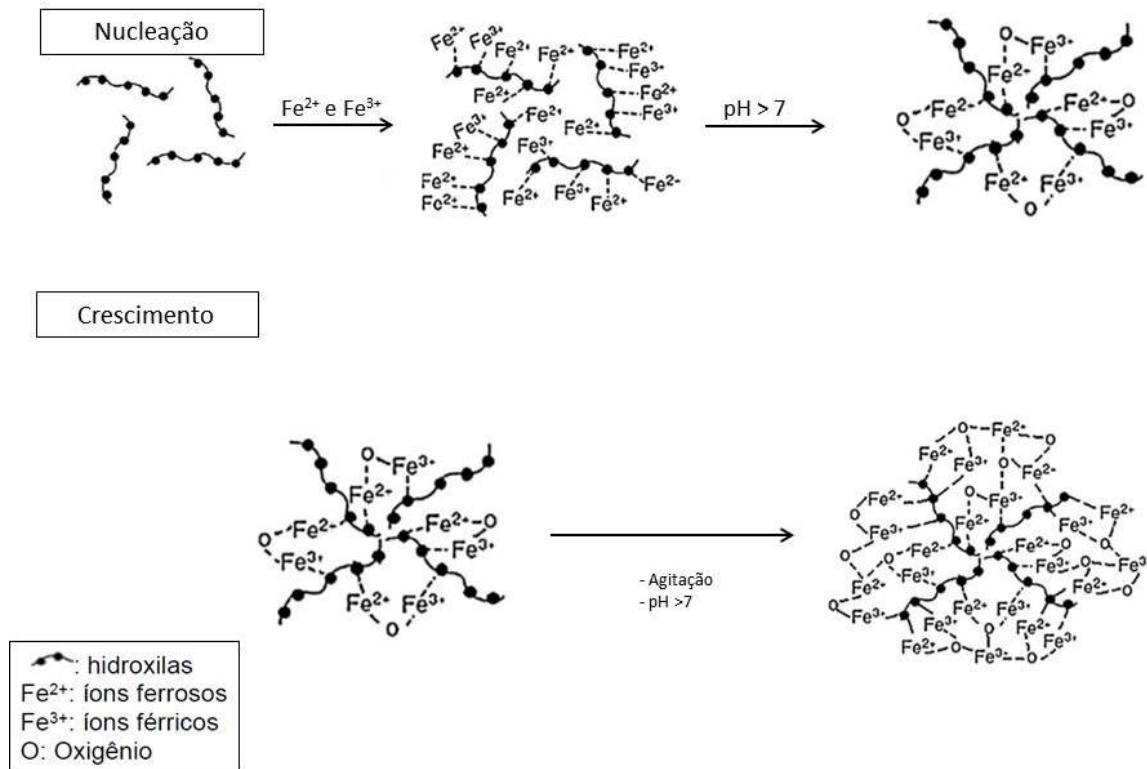


O mecanismo proposto para a reação de co-precipitação do óxido de ferro considera que inicialmente ocorre a formação de aquocomplexos de ferro. Para Fe (II), a temperatura ambiente, a

hidroxilação ocorre entre pH 7 - 9, e para o Fe (III) a hidroxilação ocorre entre pH a 4-5. Então, primeiro ocorre a coordenação das moléculas do solvente pelos cátions metálicos (M), formando espécies do tipo $[M(H_2O)_x]^{n+}$, essas espécies sofrem a hidrólise e formam compostos do tipo $[M(H_2O)_{x-1}]^{(n-1)+}$ (JOLIVET, et. al., 1992; JOLIVET et. al, 2006). Esses compostos formados não são estáveis em solução na forma de monômeros, eles então se condensam, o que pode ocorrer por processo de olação ou oxolação, que é dependente da natureza da esfera de coordenação dos cátions. Para complexos aquohidroxo, a condensação ocorre via olação: o átomo de oxigênio do nucleófilo (M-OH) atua como uma base de Lewis, doando elétrons ao centro metálico da outra molécula, havendo uma formação de ligações hidroxos entre os dois centros metálicos, e a eliminação de uma molécula de água. A oxolação pode ocorrer através de uma reação de substituição nucleofílica do tipo SN2, seguida de eliminação de água na condensação (SOUZA, 2011).

Em função de parâmetros estéricos e da energia de estabilização do campo cristalino, os cátions metálicos formados se organizam nos sítios de uma estrutura tipo espinélio (JOLIVET et. al, 2006). Em geral, nesse processo de coprecipitação, a formação da suspensão coloidal pode ser dividida em duas fases, as quais ocorrem de maneira praticamente simultânea: a nucleação e o crescimento das partículas (Figura 4).

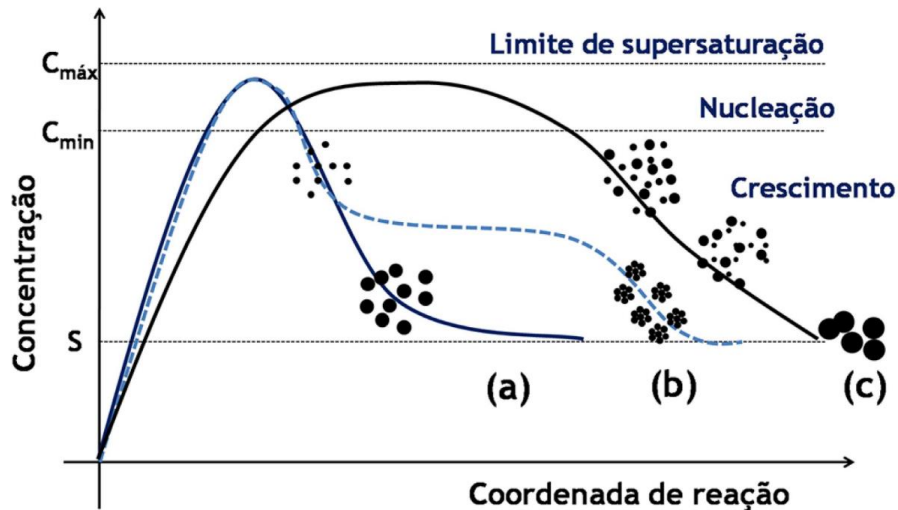
Figura 4: Representação das etapas de nucleação e crescimento que ocorre no processo de coprecipitação. Na nucleação ocorre a hidroxilação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em pH básico entre 8 a 14. Após a nucleação, ocorre o crescimento dos núcleos, lentamente por difusão, onde os solutos se incorporam lentamente na superfície dos cristais.



Fonte: Adaptado Gordon et al., 2011.

O primeiro modelo a tratar da influência das etapas de nucleação e crescimento na formação de suspensões coloidais, foi o modelo proposto por La Mer (LA MER, 1950; VISWANATHA; SARMA, 2007). Atualmente, sabe-se que tal modelo é particular de determinados sistemas, e não se aplica a maioria dos coloides. Entretanto, a ideia central do modelo (separação temporal entre nucleação e crescimento), serviu de base para a elaboração de outros, por exemplo, o modelo de Ocaña e o de Sugimoto, usados para explicar o crescimento da partícula. O modelo de La Mer, também se mostrou útil para o desenvolvimento de diversas metodologias que visam a síntese de sistemas monodispersos. Segundo o modelo de La Mer, a precipitação ocorre em três distintos estágios: pré-nucleação, nucleação e crescimento, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5: Ilustração de mecanismos de precipitações coloidais que levam a partículas monodispersas: (a) modelo de La Mer, (b) modelo de Ocaña e (c) modelo de Sugimoto.



Fonte: Sousa Filho, 2015.

Idealmente, as etapas de nucleação e crescimento possuem períodos bem distintos, o que levaria a uma distribuição controlada de tamanho e forma das nanopartículas. Nessas etapas estão presentes os estágios de adsorção, difusão superficial, ligação química e outros processos atômicos que ocorrem na superfície das nanopartículas em formação. Quando se tem uma solução insaturada com as espécies precursoras do sólido, ou seja, a concentração dessas espécies é inferior a concentração de supersaturação crítica, não se tem a formação do precipitado. Desse modo, é necessária uma etapa de geração ou ativação dos agentes precipitantes, etapa de pré-nucleação, que resulta em um aumento na concentração das espécies precursoras em valores acima da solubilidade de equilíbrio termodinâmico (S), atingindo a concentração de supersaturação mínima (C_{\min}), e assim dar início a fase de nucleação e formação dos primeiros núcleos do retículo cristalinos. Quando os núcleos formados possuem tamanho abaixo do chamado raio crítico de equilíbrio (R_c), eles tendem a ser instáveis e tendem a solubilizar. Os núcleos com raio maior que R_c tendem seguir para a etapa de crescimento dos núcleos, a qual proporciona a formação das morfologias isotrópicas ou anisotrópicas das nanopartículas. O valor de R_c em cada sistema é diretamente proporcional à tensão interfacial existente entre o núcleo formado e a solução, e também ao volume iônico do soluto. Dessa forma, o raio pode ser associado à energia livre de ativação (ΔG_a), envolvida na formação dos núcleos, como demonstrado através da Equação 4 (FÜREDIMILHOFER, 1981; CUSHING et al., 2004).

$$\Delta G_a = \frac{4\pi\sigma_{SL}R_c^2}{3} = \frac{16\pi\sigma_{SL}^3v^2}{3K^2T^2\ln^2S} \quad (4)$$

Onde:

σ_{SL} = energia da interface sólido/líquido,

v = volume atômico do soluto,

K = constante de Boltzmann,

T = temperatura.

Quando a velocidade de nucleação é maior que a formação das espécies precursoras, há uma queda rápida na concentração dos precursores abaixo da C_{min} , interrompendo, assim, a nucleação, e ocorrendo o crescimento das partículas. Essa etapa de crescimento prossegue até a concentração dos agentes precipitantes atingirem o limite de S . Dessa forma, tal etapa é controlada pela difusão do soluto precursor em direção às partículas e pela velocidade de geração dos precursores. É dessa forma, que parâmetros como taxas de adição e de agitação do meio, afetam a nucleação ou crescimento de partículas, e conseqüentemente o tamanho. Uma melhor distribuição de tamanho pode ser obtida aumentando as velocidades de agitação dos produtos químicos para acelerar o transporte das espécies de crescimento até a superfície das nanopartículas. Logo, para se ter sistemas mais monodispersos é necessário um controle rigoroso na etapa de nucleação e proporcionar condições para um crescimento lento (SOUSA FILHO, 2015; MARTINS, 2011).

Para a maioria dos sistemas a etapa de crescimento ocorre concomitantemente à nucleação, e assim, outros modelos foram propostos para explicar o crescimento das partículas, como o de Ocaña (Figura 1.3b) e de Sugimoto (Figura 1.3c). No modelo de Ocaña, o processo de nucleação, assim como o proposto por La Mer, também é rápido, diferenciando na etapa de crescimento, que o modelo de Ocaña propõem ocorrer por meio da agregação dos germes de menores dimensões e das partículas menores. O modelo de Sugimoto diz que a etapa de nucleação é muito lenta, formando assim germes polidispersos. A etapa de crescimento nesse modelo é explicada através da maturação de Ostwald, que é tido como a principal via para o crescimento de cristais, e consiste em partículas menores em suspensão tenderem a se ressolubilizar e se depositar em partículas maiores (SOUSA FILHO, 2015; OCAÑA et. al., 1995; SUGIMOTO, 1987; VISWANATHA e SARMA, 2007).

O método de obtenção de nanopartículas por co-precipitação apresenta, como já mencionado, diversas vantagens em relação a outros métodos, porém a principal desvantagem deste método muitas vezes é a falta de cristalinidade e uma ampla distribuição de tamanho das partículas obtidas, o que acaba resultando em um baixo valor de magnetização de saturação. Uma grande variedade de fatores pode ser ajustada na síntese de óxido de ferro nanopartículas para controlar algumas dessas propriedades. Vikram e cols. (2014) mostraram que a relação estequiométrica de Fe^{2+} / Fe^{3+} e a taxa de adição da base, por exemplo, têm controle sobre a regulação das propriedades magnéticas. Eles relataram também que a mudança na concentração da base podia alterar a propriedade magnética das nanopartículas sintetizadas.

Jolivet e cols. (1994) estudaram a influência da relação Fe^{2+}/Fe^{3+} na composição e propriedades magnéticas das nanopartículas co-precipitadas, e foi observado que valores pequenos da razão (<0,3) levam à formação de goethita (α -FeOOH), enquanto uma razão entre 0,3 e 0,5 mostrou duas fases coexistindo, uma como oxihidróxido férrico (FeO.OH) e outra constituída de magnetita não estequiométrica, com coloração marrom. A razão de 0,5 resultou em magnetita estequiométrica e homogênea em tamanho e composição. Babes e cols. (1999) estudou diversos outros parâmetros assim como a influência da razão molar entre Fe^{2+} / Fe^{3+} . Observou que o parâmetro mais importante era a razão molar, e que uma razão elevada produzia partículas maiores, estando assim entre 0,4 e 0,6 a razão molar mais adequada para síntese de nanopartículas com qualidade mais elevada.

O tamanho médio das partículas da magnetita é também fortemente dependente do pH e a força iônica do meio. Saxena e Singh (2017), estudou os efeitos do excesso do pH e da concentração da solução de base adicionada para a precipitação, os estudos foram feitos utilizando uma base forte, NaOH. Foi observado que concentrações mais baixas (0,5 M e 1,0 M) de base apresentam bons resultados em termos de porcentagem em peso de magnetita formada em comparação com as outras concentrações (2,0 M e 4,0 M).

2.2 OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo foi desenvolver um protocolo de síntese de nanopartículas de óxido de ferro estáveis, funcionalizadas com ácido cítrico e diâmetro inferior a 20 nm. Além disso, constituiu objetivo nesta etapa a caracterização físico-química e morfológica do material obtido.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Materiais

O sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e o hidróxido de amônio (NH_4OH , 27%) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). O cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e o ácido cítrico foram fornecidos pela Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Indaiatuba, SP, Brasil). A água ultra-pura foi produzida a partir de um Smart2Pure 3 UV/UF (Thermo), e usada em todos os experimentos.

2.3.2 Síntese e funcionalização das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas foram sintetizadas por meio da técnica de co-precipitação. Foram empregados dois sais como fonte de ferro, o cloreto de ferro hexa-hidratado e o sulfato ferroso hepta-hidratado que foram solubilizados em água degaseificada, sob agitação vigorosa e aquecimento. Na sequência foi adicionada rapidamente a esse sistema 40 mL de NH_4OH formando assim o precipitado (RACUCIU; CREANG; AIRINEI, 2006). O precipitado de óxido de ferro obtido foi lavado com água ultrapura até a obtenção de uma suspensão com pH neutro, com auxílio de uma centrífuga. O agente funcionalizante foi o ácido cítrico onde o mesmo foi solubilizado em água degaseificada. O pH da suspensão de nanopartículas com ácido cítrico foi ajustado para 4-5 e o sistema foi mantido sob agitação vigorosa por 90 minutos em uma temperatura de 90 °C. As variáveis da funcionalização também foram baseadas no proposto por Racuciu e colaboradores (2006).

2.3.3 Caracterização das nanopartículas magnéticas

2.3.3.1 Caracterização Química

A difração de raio-X foi feita com o objetivo de avaliar as fases de óxido de ferro formado durante a síntese. O difratograma foi obtido em um difratômetro Rigaku modelo Geigerflex, do Departamento de Química da UFMG, no intervalo de 10 a 70° (2 θ) a uma velocidade de varredura de 4° por minutos. A Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi empregada a fim de se avaliar a funcionalização da amostra. Foi analisada por essa técnica a amostra funcionalizada com ácido cítrico que foi homogeneizada em KBr e prensada na forma de pastilha. O espectro foi obtido utilizando o equipamento Frontier da PerkinElmer, com resolução de 4 cm⁻¹ em um intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹.

A análise termogravimétrica foi feita utilizando o equipamento Shimadzu DTG-60. Foi submetida à análise a amostra funcionalizada com ácido cítrico a fim de avaliar a estabilidade térmica da mesma. O gradiente de temperatura utilizado foi de 30°C a 750°C a uma taxa de 10 °C/min.

2.3.3.2 Determinação do tamanho médio

As nanopartículas foram caracterizadas quanto a seu tamanho médio por meio da técnica de espectroscopia de correlação de fótons por espalhamento dinâmico da luz. O ensaio foi conduzido no equipamento Zetasizer Zs (Malvern Instruments, Inglaterra). Para a realização das medidas, amostras de nanopartículas funcionalizadas com ácido cítrico foram dispersas em água deionizada, com auxílio do agitador vortex para melhor homogeneização. As medidas foram efetuadas em pH neutro a temperatura de 25°C com laser incidente apresentando ângulo de incidência de 90° (retroespalhamento).

2.3.3.3 Caracterização morfológica

As amostras de nanopartículas de ferro funcionalizadas (NMP-Ac) e não funcionalizadas (NPM) foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A mesma foi analisada

através do microscópio eletrônico Tecnai - G2-20 - FEI 2006 com tensão de 200 kV. As imagens foram analisadas usando o software ImageJ.

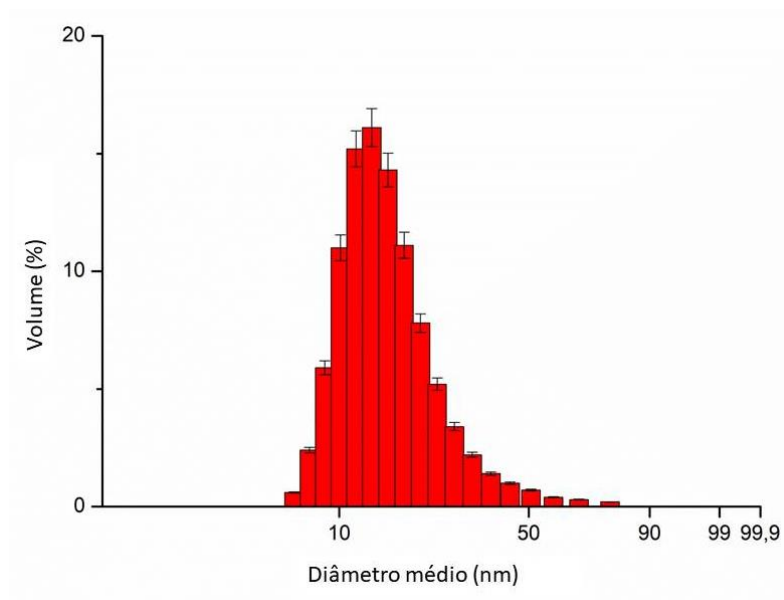
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Determinação do tamanho médio

A técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) fornece a distribuição do tamanho de partículas e a partir destes dados é possível calcular o diâmetro hidrodinâmico médio das mesmas. A análise da distribuição do tamanho de partículas envolve três tipos de distribuição: intensidade, volume e número. Cada tipo de distribuição tem uma aplicação. A distribuição por volume, por exemplo, tem grande utilidade prática em formulações contendo nanopartículas, uma vez que o volume pode ser relacionado à massa, por meio da densidade, e esta é uma grandeza facilmente mensurável (FERREIRA, 2013). A amostra que apresentou coloração mais escura e maior estabilidade, indicando uma funcionalização mais bem sucedida, foi analisada através da técnica de DLS. Apenas a amostra funcionalizada foi analisada, uma vez que a não funcionalizada se mostrava muito instável, rapidamente se depositando ao fundo, de modo que essa técnica se torna não adequada para medir seu tamanho.

Na Figura 6 é apresentado o histograma da amostra de NPM-Ac e revela tamanho de partículas de $16,9 \pm 1,3$ nm. A amostra apresentou um índice de polidispersividade (PDI) igual a 0,43.

Figura 6: Histograma da amostra NPM-Ac. O histograma mostra que a maior contribuição para o cálculo da distribuição média de tamanhos, está na da faixa de 16 nm. A presença de picos em tamanho maior que 50 nm evidenciam a polidispersividade da amostra.



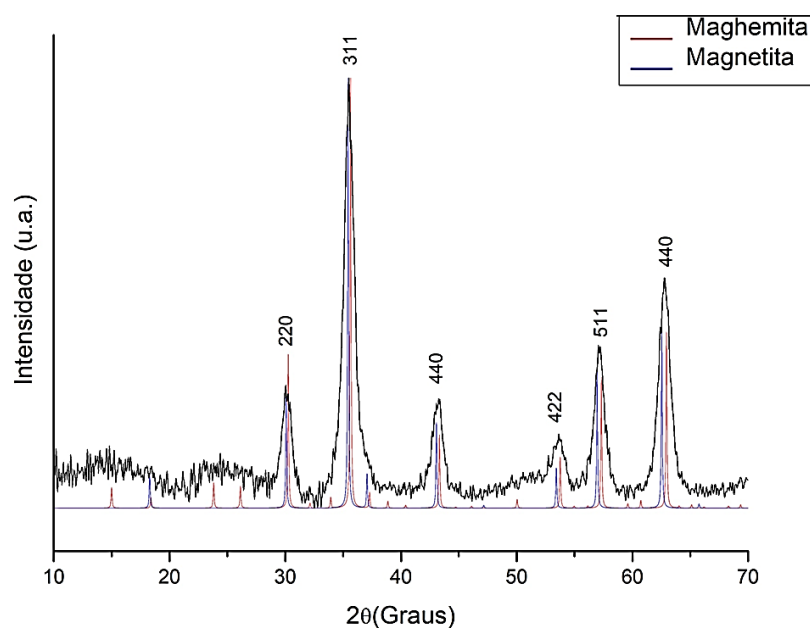
Para sistemas nanoparticulados dispersos em meio aquoso, o DLS é uma técnica adequada que se permite saber não apenas o tamanho das nanopartículas, mas também seu comportamento no meio dispersante, indicando a presença de aglomerados e agregados. A amostra apresentou um elevado valor de PDI, mostrando que apesar de as moléculas de ácido cítrico ligadas a superfície das nanopartículas conferirem efeito estabilizador, ainda é observado certa heterogeneidade do diâmetro das partículas em suspensão. Quando os valores de PDI variam de 0,1 até 0,4 há uma distribuição moderadamente polidispersa e quando os valores ultrapassam 0,4 há uma distribuição amplamente polidispersa (SOLTANI et. al., 2016).

2.4.2 Caracterização Química

A amostra de NPM foi caracterizada por difração de raios-X e a partir dos dados obtidos foi possível identificar as fases presentes e o tamanho médio das partículas. Na Figura 7 é apresentado o

difratograma obtido para amostra não funcionalizada. Os resultados revelaram seis principais picos de difração presentes, os quais foram atribuídos aos planos cristalinos nas direções (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) e (4 4 0). O tamanho médio de cristalito foi calculado pela equação de Scherrer (valor da largura a meia altura (FWHM) dos picos encontrados com auxílio do software Origin), sendo encontrado um valor médio de 7,99 nm. Os resultados foram comparados com padrões tabelados para a magnetita (PDF 19-629) e maghemita (PDF 39-1346), obtidos no banco de dados *Inorganic Crystal Structure Data base* (ICSD).

Figura 7: Difratograma de raios-X obtido para a nanopartícula magnética sintetizada (NPM), juntamente com os padrões da magnetita (PDF 19-629) e maghemita (PDF 39-1346). Os picos presente são atribuídos aos planos cristalinos nas direções (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) e (4 4 0).

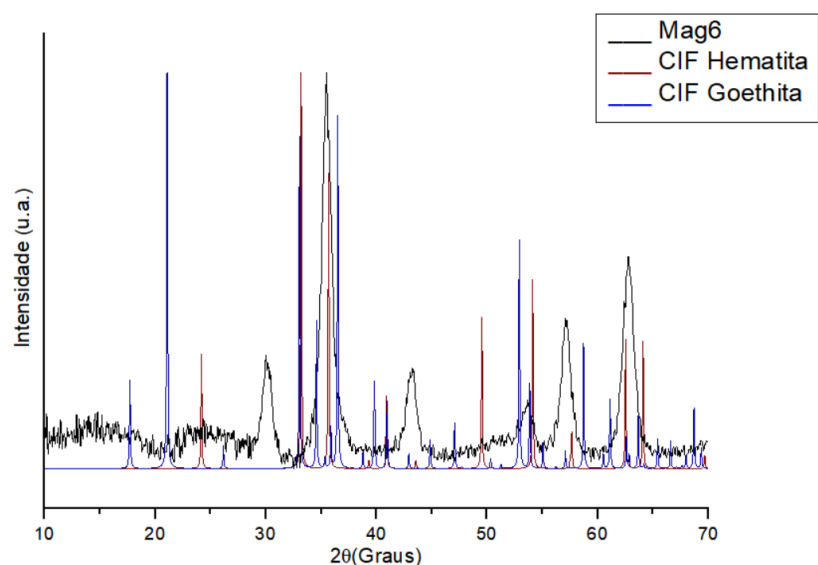


Por meio de comparação, pode-se afirmar que a amostra obtida (NPM) apresenta a estrutura do típica do espinélio, e que houve formação de uma fase correspondente à da magnetita/maghemita.

Dados da literatura revelam que a elevação da temperatura pode levar a transformação de fase formando a hematita, e uma variação de pH entre 8 a 10,6 pode favorecer a formação da goethita. Além de se ter relatos que valores pequenos da razão $x = \text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ são conhecidos por levar à formação de goethita, como a síntese não foi feita em atmosfera inerte, não se tem garantia de ter

seja mantida a proporção 2:1 de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, proporção essa considerada a ideal para formação de magnetita (GNANAPRAKASH et al., 2007). Nesse sentido, a Figura 8 compara os picos obtidos na amostra NPM-Ac com os padrões de hematita e goethita e os resultados revelam baixa similaridade entre os padrões dessas fases.

Figura 8: Difratoograma de raios-X obtido para a nanopartícula magnética sintetizada (NPM), juntamente com os padrões tabelados da hematita e goethita. A não concordância dos picos elimina a possível presença dessas fases na amostra.

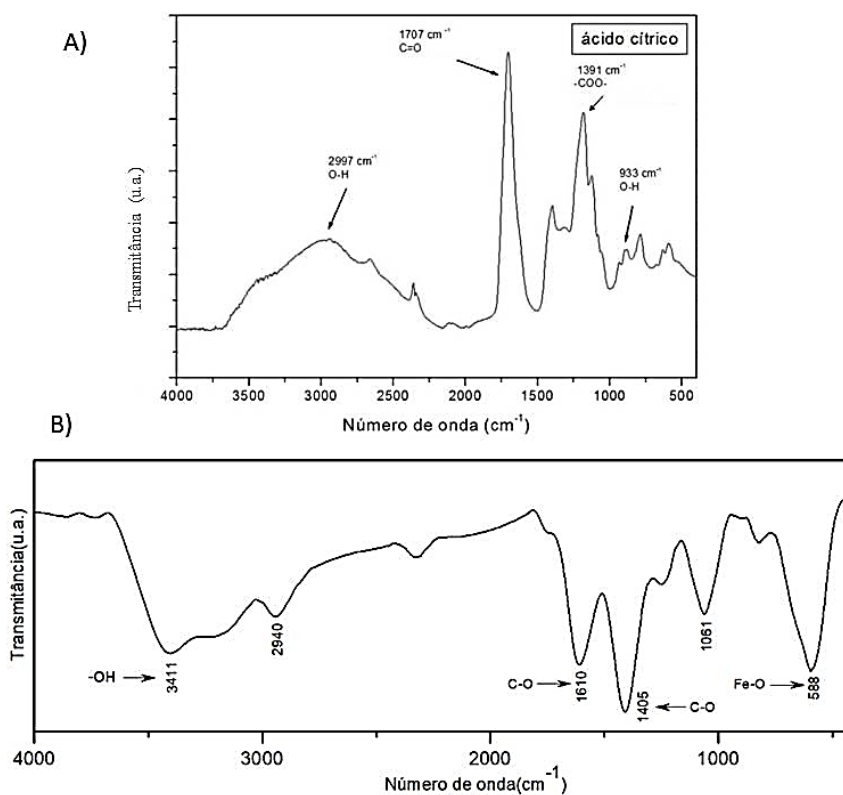


As Figuras 7 e 8 revelaram picos consideravelmente alargados. Este comportamento foi atribuído à dimensão nanométrica dos cristalitos, e com isso se tem um número reduzido de planos cristalinos, dificultando assim a distinção entre magnetita e maghemita (FERREIRA, 2013). Apesar disso, a coloração de cor preta da amostra obtida revela o forte caráter da fase de magnetita, que pode ser adicionalmente caracterizada através da técnica de espectroscopia Mossbauer (equipamento não disponível).

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e também a técnica de análise termogravimétrica foram empregadas para estudar a funcionalização da superfície de nanopartículas com o ácido cítrico (NPM-Ac). O espectro FTIR da amostra funcionalizada está representado na Figura 9B e revela a presença dos picos em 1610 cm^{-1} e 1405 cm^{-1} que foram

atribuídos ao estiramento simétrico e assimétrico, respectivamente, do grupo C-O das moléculas de ácido cítrico. Em espectros do ácido cítrico apenas (Figura 9A), se tem a presença de uma banda em 1707 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo carboxilato livre. Quando o ácido cítrico está ligado à superfície do óxido de ferro, se tem um deslocamento dessa banda para frequências mais baixas, sendo isso uma forte evidência da funcionalização. Esse deslocamento pôde ser observado com a presença da banda em 1610 cm^{-1} na Figura 9B, em que ocorre o enfraquecimento da ligação dupla e dessa forma é alterada a frequência de vibração da molécula. Nessa mesma figura, o pico intenso e alargado em 3411 cm^{-1} foi atribuído ao estiramento dos grupos hidroxila. Podem ter contribuído para o pico, o grupo -OH das moléculas de água adsorvida na superfície das partículas ou correspondente a umidade do KBr utilizado para o preparo da amostra, e também do grupo carboxila do ácido cítrico. A banda observada em torno de 588 cm^{-1} foi atribuída ao modo de vibração do alongamento Fe-O do Fe_3O_4 . E o pico em 2940 cm^{-1} , pode ser atribuído ao estiramento simétrico do grupo $-\text{CH}_2$ (CHERAGHIPOUR; JAVADPOUR; MEHDIZADEH, 2012).

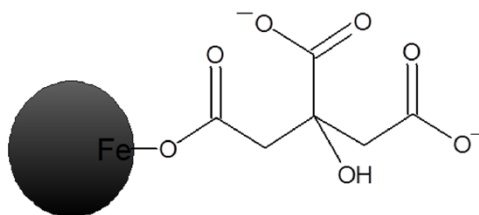
Figura 9: Espectros FTIR. A) amostra de ácido cítrico e B) amostra de NPM-Ac, onde as setas indicam os grupos identificados presentes na amostra funcionalizada com ácido cítrico.



Em geral, as partículas de tamanho nanométrico se agregam em suspensão devido às forças atrativas de Van der Waals para minimizar a energia de superfície. O ácido cítrico é um exemplo de funcionalizante que evita a aglomeração das partículas e estabiliza o colóide magnético, por meio de repulsões eletrostáticas. A adsorção das moléculas de citrato é realizada por meio de ligação covalente com os íons de ferro da superfície da partícula através do seu grupo carboxilato ($-\text{COO}$), que pode ocorrer por coordenação de um ou dois dos grupos carboxilatos, dependendo da curvatura da superfície da nanopartícula (MACHADO, 2014).

Por meio da análise de FTIR, foi possível ainda avaliar o tipo de interação que ocorre entre o grupo carboxilato do ácido cítrico e a superfície da nanopartícula de óxido de ferro. Essas interações podem ser de quatro tipos: monodentada, bidentada em ponte, quelato bidentada e interação iônica. É feito a diferença entre o número de onda do estiramento assimétrico e o estiramento simétrico do grupo carboxilato, caso seja monodentada o valor desta diferença está entre $200\text{-}320\text{ cm}^{-1}$, se o valor for entre 140 cm^{-1} e 190 cm^{-1} , a interação é do tipo quelato bidentada e para valores menores que 100 cm^{-1} a interação deve ser bidentada em ponte. A diferença em número de onda para a amostra da Figura 10 ($1610\text{ cm}^{-1} - 1405\text{ cm}^{-1}$) é igual a 205 cm^{-1} indicando que a interação é do tipo monodentada, como representado na Figura 10 (SCHWERTMANN; CORNELL, 2003; ZHANG; HE; GU, 2006; FERREIRA, 2013).

Figura 10: Representação da ligação da nanopartícula magnética com ácido cítrico do tipo monodentada mononuclear.

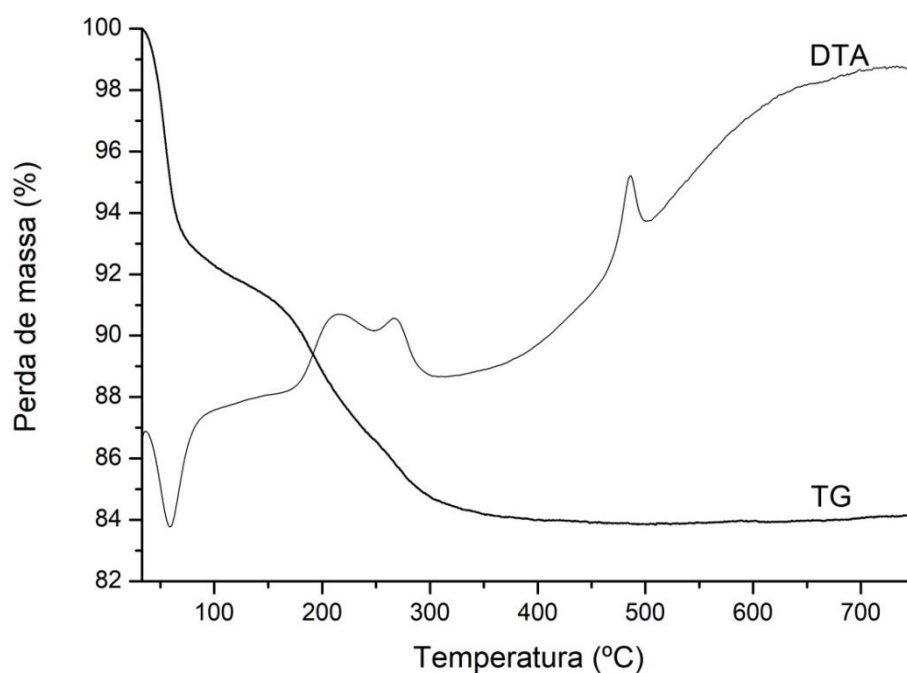


Fonte: Ferreira, 2013.

Os resultados das análises termogravimétricas estão apresentados na Figura 11. A curva de TG mostra três diferentes etapas de perda e massa. A primeira e segunda perda de massa de aproximadamente 6,4 %, com um pico endotérmico acentuado próximo a $60\text{ }^\circ\text{C}$, e a segunda de aproximadamente 3,2 % podem ser atribuídas à remoção de água e moléculas de ácido cítrico adsorvidos na superfície da nanopartícula. A perda de massa em cerca de 8,5 % com um pico

exotérmico amplo próximo a 250 °C pode ser associada a decomposição de moléculas de ácido cítrico ligadas quimicamente na superfície das nanopartículas de óxido de ferro. A curva de DTA revela ainda um evento exotérmico próximo a 480°C, que pode ser associado a transformação de fase da magnetita/maghemita em hematita, já que não ocorreu variação de massa (FERREIRA, 2013; NIGAM; BARICK; BAHADUR, 2011).

Figura 11: Curvas de TG e DTA da amostra de nanopartícula magnética funcionalizada com ácido cítrico, mostrando três etapas de perda de massa. A curva de DTA mostra ainda a transformação estrutural em hematita.

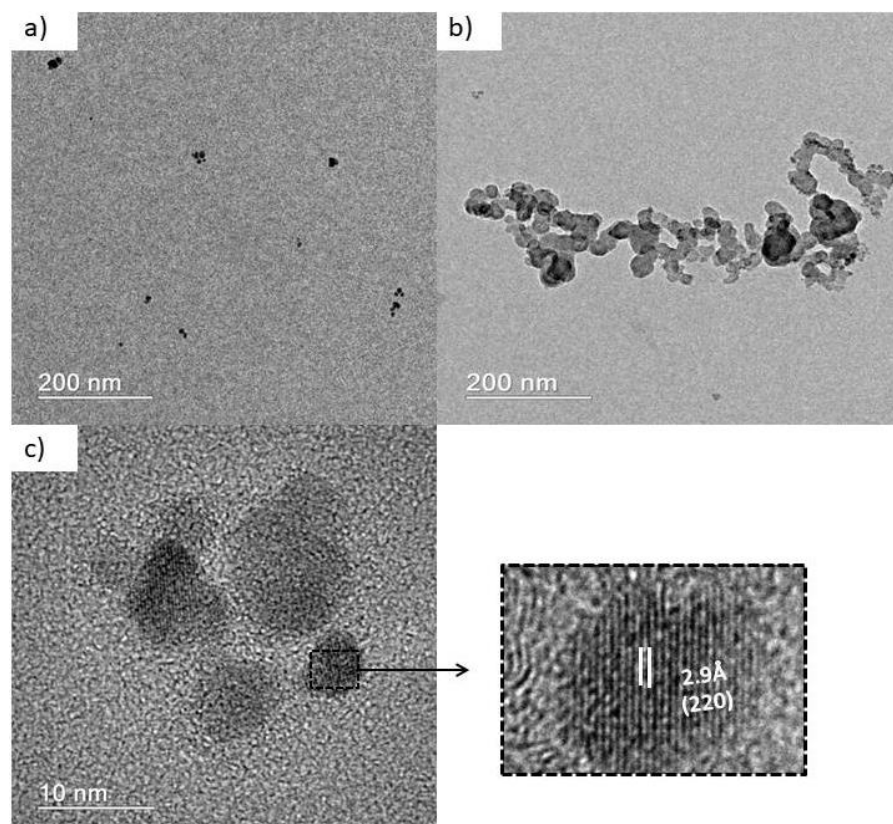


2.4.3 Caracterização morfológica

As amostras funcionalizadas (NPM-Ac) e não funcionalizadas (NPM) foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). O tamanho foi avaliado por medição manual, utilizando o software ImageJ (versão 1.52h). As partículas foram consideradas esféricas e circunscritas em um círculo do qual tomou-se o diâmetro. Foram analisadas ao menos 30 partículas de cada uma das amostras. Comparando as imagens da amostra funcionalizada e sem funcionalizar

(Figuras 12a e 12b) pode se inferir que a funcionalização acarreta no aumento do tamanho e polidispersividade das partículas. O tamanho médio encontrado foi de (7 ± 3) nm para amostra sem funcionalizar e (13 ± 9) nm para amostra funcionalizada. Este último corrobora o valor encontrado para a mesma amostra pela análise de DLS na distribuição de tamanhos por número. A distribuição de tamanho de partícula por DLS pode ser apresentada em volume, intensidade e número. Esta última é a mais adequada para comparação com MET uma vez que a média é associada à quantidade de partículas. Nas imagens de alta resolução (Figura 12c) é possível observar raias denominadas “lattice fringes” (franjas de rede), que são formadas pelos planos de átomos da rede cristalina do material (Baroni, 2006), evidenciando assim a característica cristalina das nanopartículas sintetizadas. O referido espaçamento pode ser atribuído à família de planos (220) da magnetita ou da maghemita.

Figura 12: Imagens de TEM: a) amostra funcionalizada; b) amostra sem funcionalizar mostrando aglomerados e c) amostra sem funcionalizar em alta resolução mostrando os planos cristalinos característicos de magnetita/maghemita.



2.5 CONCLUSÃO

A metodologia de síntese e funcionalização utilizadas no presente trabalho mostrou-se adequada para a obtenção de nanomateriais com composição e tamanho para a utilização pretendida. Apesar da co-precipitação ser um método muito referenciado na literatura, há ainda algumas dificuldades de combinar as melhores condições no processo para a obtenção de partículas com morfologia e tamanho controlado. Os resultados da caracterização por difração de raios-X mostraram que a amostra se trata de nanopartícula que apresenta fase espinélio, porém não sendo possível diferenciar magnetita e maghemita. A análise de FTIR, TG, DTA mostrou que ocorreu o revestimento com moléculas de ácido cítrico na superfície da nanopartícula. A análise de DLS, apesar de um elevado PDI, mostrou que a amostra apresentava tamanho de partícula adequado para a aplicação pretendida. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou o caráter cristalino das nanopartículas e como a presença de um agente funcionalizante diminuiu a formação de aglomerados. Essa técnica também não foi suficiente para diferenciar a presença de magnetita e maghemita.

2.6 REFERÊNCIAS

BABES, L.; DENIZOT, B.; TANGUY, G. et al. *Colloid Interface Sci.* v. 212, n. 2, p. 474-482, 1999.

BARONI, M. P. M. A.; TEIXEIRA, S. R.; DIXON, J. B. et al. Aplicação de programa de análise de imagens na interpretação de fotomicrografias de alta resolução de argilominerais. *Cerâmica*, v. 52, n. 322, p.179-184, jun. 2006.

BEAN, C.P.; LIVINGSTON, J.D.; RODBELL, D.S. The anisotropy of very small cobalt particles. *Journal de Physique et le Radium.* v. 20, 1959.

BINI, R. D. Desenvolvimento de nanopartículas de magnetita para aplicações biológicas: propriedades estruturais, microestruturais e magnéticas. 2016 (Mestrado em Física) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

BRANDL, A. L.; SOCOLOVSKY, L. M.; DENARDIN, J. C. et al. Effects of dipolar interactions on magnetic properties of granular solids. *Journal Of Magnetism And Magnetic Materials*, v. 294, n. 2, p.127-132, jul. 2005.

CALLISTER, W. D., *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.* John Wiley & Sons, Inc., 2005.

CHERAGHIPOUR, E.; JAVADPOUR, S.; MEHDIZADEH, A. R. Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. *Journal Of Biomedical Science And Engineering*. v. 5, n. 12, p.715-719, 2012.

COEY, J. M. Magnetism and Magnetic Materials. Cambridge University Press, 2010.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. The iron oxides : structure, properties, reactions, occurrence, and uses. 1. ed. Weinheim: Wiley VCH, 1996.

CULLITY, B.; GRAHAM, C. Introduction to Magnetic Materials. *Addison-Wesley Publishing Company*, 2008.

CULLITY, B.D. Introduction to magnetic materials. *Addison Wesley Publishing Company*, 1972.

CUSHING , B.L.; KOLESNICHENKO, V.L.; O'CONNOR, C. J. Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles, *Chem. Rev.* v. 104 p. 3893-3946, 2004.

DIEGUEZ, C. M. T.; MONTANHEIRO, L. V.; CLETO, L. B. et al. Quantum mechanical principles of Nuclear Magnetic Resonance. *Rev. Bras. Ensino Fís.* v.40, n.1, ago. 2017.

FERREIRA, R. V. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com núcleo magnético de magnetita. 2009. 104 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Belo Horizonte, 2009.

FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, A. Nanopartículas magnéticas e suas aplicações - Capítulo 14. *Química Supramolecular e Nanotecnologia*, p. 269–289, 2016.

FÜREDIMILHOFER, H. Spontaneous precipitation from electrolytic solutions. *Pure & Appl.Chem.* v.53, p. 2041—2055, 1981.

GNANAPRAKASH, G.; MAHADEVAN, S.; JAYAKUMAR, T. et al. Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*. v.103, n. 1, p.168-17515 , mai. 2007.

GORDON, T.; PERLSTEIN, B.; HOUBARA, O. et al. Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Journal Elsevier*, v. 374, p. 1-8, 2011

JOLIVET, J. P.; BELLEVILLE, P.; TRONC, E.; LIVAG, J. Influence of Fe(II) on the formation of the spinel iron oxide in alkaline medium. *Clays and Clay Minerals*, v. 40, n. 5, p. 531-539, 1992.

KORNIG, A.; WINKLHOFER, M.; BAUMGARTNE, J. et al. Magnetite crystal orientation in magnetosome chains. *Advanced Functional Materials*, v. 24, p. 3926–3932, mar. 2014.

LAMER, V.; DINEGAR, K.; ROBERT, H. THEORY, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal Of The American Chemical Society*. v. 72, n. 11, p.4847-4854, nov. 1950.

LAURENT, S.; SAEI, A. A.; BEHZADI, S. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. *Expert Opin Drug Deliv*, v. 11, n. 9, p. 1449-70, set. 2014.

LEFEBURE, S.; DUBOIS, E.; CABUIL, V. et al. Monodisperse magnetic nanoparticles: preparation and dispersion in water and oils. *Reson*. v. 13, p. 2975-2981, 1998.

LEVY, L.; SAHOO, Y.; KIM, K. et al. Nanochemistry: Synthesis and characterization of multifunctional nanoclusters for biological applications. *Chemistry of Materials*, 14, 2002, 3715-3720.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*. v. 46, p. 1222-1244, 2007.

MACHADO, J. G. FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO COM GLUCOSAMINA. Dissertação (Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2014.

MAHMED, N.; HECZKO, O.; LANCOK, A.; HANNULA, S. P. The magnetic and oxidation behavior of bare and silica-coated iron oxide nanoparticles synthesized by reverse coprecipitation of ferrous ion in ambient atmosphere, *J. Magn. Magn. Mater.* 353 (2014) 15–22.

MARTINS, P. M. A. Produção e caracterização de nanopartículas magnéticas para aplicação biotecnológica. Dissertação (Mestrado em Micro e Nano tecnologia). Escola de Engenharia, Universidade do Minho. Braga, 2011.

NIGAM, S.; BARICK, K. C.; BAHADUR, D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. *Journal Of Magnetism And Magnetic Materials*, v. 323, n. 2, p.237-243, jan. 2011.

OCANA, M.; CLEMENTE, R.; SERNA, C. J. Uniform colloidal particles in solution – formation mechanisms. *Adv. Mater.*, v. 7, p. 212-216, 1995.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 36, 167-181, 2003.

RACUCIU, M.; CREANG, D.E.; AIRINEI, A. Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications. *The European Physical Journal E*, v. 21, p. 117-121, 2006.

SALVADOR, M. Distribuição de barreiras de energia de nanopartículas magnéticas em campo externo. 2014. 83 p. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Física, Florianópolis, 2014.

SAXENA, N.; SINGH, M. Efficient synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles under air for biomedical applications. *Journal Of Magnetism And Magnetic Materials*. v. 429, p.166-176, mai. 2017.

SCHARTL, W. Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions. ed. Springer. 2007.

SCHWERTMANN, U.; CORNELL, R.M. The Iron Oxides: Structure, Properties, Occurrences and Uses, Weinheim, WILEY-VCH, 2003, 664p.

SOUSA FILHO, P. C.; SERRA, O. A. Metodologias de síntese em fase líquida para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base de terras raras. *Quim. Nova*, vol. 38, pp. S1-S7, 2015.

SOUSA, M. Elisa et al. Stability and Relaxation Mechanisms of Citric Acid Coated Magnetite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia. *The Journal Of Physical Chemistry*. v. 117, n. 10, p.5436-5445, 5 mar. 2013.

SOUZA, K. C. Mecanismo de oxidação para a reação de condensação onde a água é eliminada para formar ligações hidroxilo. Tese (Doutorado em Ciências - Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SUGIMOTO, T. Preparation of monodispersed colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Scienc*. v. 28, p. 65-108, 1987.

SUN, S.N.; WEI, C.; ZHU, Z.Z. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chin. Phys*. v. 23, 2014.

THIESEN, B; JORDAN, A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*. v. 24, n. 6, p. 467-474, set. 2008.

VIKRAM, S.; DHAKSHNAMOORTHY, M.; VASANTHAKUMARI, R. et al. Tuning the Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles by a Room-Temperature Air-Atmosphere (RTAA) Co-Precipitation Method. *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology*, v. 15, n. 5, p.3870-3878, mai. 2015.

VISWANATHA, R.; SARMA, D. D. Growth of Nanocrystals in Solution. *Nanomaterials Chemistry*, p.139-170, mai. 2007.

WU, W.; QUANGUO, H.; CHANGZHONG, J. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters*. v. 3, n. 11, p.397-415, out. 2008.

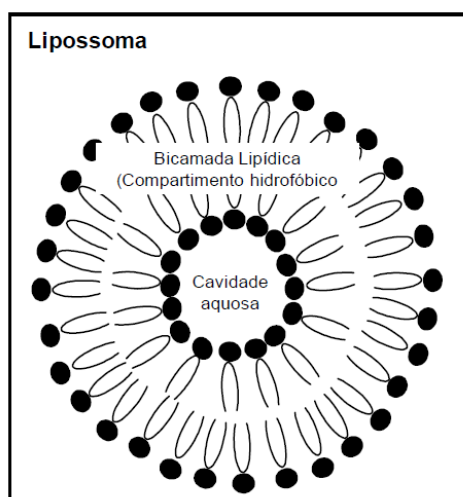
WU, W.; Wu, Z.; Yu, T. et al. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science And Technology Of Advanced Materials*, v. 16, n. 2, abr. 2015

ZHANG, L.; HE, R.; GU, H. C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science*, v.253, p.2611-2617, 2006.

3.1 INTRODUÇÃO

Os lipossomas são pequenas vesículas de forma esférica, que podem variar de 20 nm a 1 µm de diâmetro. São constituídos de uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, alternadas por regiões aquosas e um compartimento aquoso central, dessa forma podem encapsular tanto substâncias hidrofílicas (no compartimento aquoso), quanto lipofílicas (inseridas ou adsorvidas na membrana). Foram preparadas pela primeira vez por Alec Bahgham e colaboradores, por volta de 1965, quando observaram que em soluções aquosas, fosfolipídes podem formar essas estruturas em bicamadas, como representado na Figura 13 (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965).

Figura 13: Representação esquemática de um lipossoma.



Fonte: Ferreira, 2013

Os lipossomas são estruturas versáteis em termos de tamanho, composição, carga superficial e fluidez da bicamada, e com isso se tornam de grande interesse em diversas pesquisas como sistema carreador, tanto para diagnóstico quanto na terapia de doenças. Uma de suas grandes vantagens, em relação a outros sistemas transportadores, é sua elevada biocompatibilidade, em especial quando

formados por lipídeos naturais. Eles podem ser obtidos através de qualquer substância anfifílica formadora de fase lamelar, em geral são fosfolípidios, e podem conter colesterol. O colesterol é encontrado na membrana celular de diversos sistemas biológicos, e tem como função controlar a fluidez, elasticidade e permeabilidade dessas membranas. Dessa forma, quando presente na bicamada dos lipossomas, desempenha importantes funções também, como: aumentar a rigidez das membranas no estado "cristal-líquido" (moléculas possuem movimentos mais livres e os radicais hidrofílicos tornam-se hidratados) e reduzir a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado "gel" (cadeia do lipídeo está em estado ordenado) (BATISTA; BARROS; MAGALHÃES, 2007; LIPOWSKY, 1995). Essas alterações na organização supramolecular dos fosfolípidos ocorrem em temperaturas de transições características. A temperatura de transição de fase (T_c , do inglês chain melting temperature) corresponde à transição do estado em fase lamelar gel ordenado ($L\beta$), para fase lamelar fluída ($L\alpha$). Quando um lipossoma é composto por vários fosfolípidos miscíveis, que apresentam diferentes valores de T_c , a transição $L\beta \rightarrow L\alpha$, ocorre em uma temperatura intermediária entre a temperatura de todos os componentes (FRÉZARD et al., 1999).

Em busca de melhorar o desempenho dos lipossomas em aplicação terapêutica, alterações em sua estrutura básica veem sendo estudadas. Essas alterações acarretam em mudanças nas características de interação dos lipossomas com os sistemas biológicos. Assim, os mesmos podem ser classificados quanto a essas interações, em: lipossomas convencionais (rapidamente removidos da circulação sanguínea), de longa circulação (superfície do lipossoma é revestida de modo a aumentar seu tempo de circulação), sítio-específicos (ligantes são acoplados na superfície conferindo seletividade para distribuir o fármaco encapsulado no sítio de ação desejado) e lipossomas polimórficos (alteração de pH, temperatura ou carga eletrostática do meio os tornam reativos) (VEMURI; RHODES, 1995). Desse último grupo, pode-se destacar os lipossomas termossensíveis, o qual se objetiva obter no presente trabalho. Os lipossomas termossensíveis têm em sua composição fosfolípidios sintéticos, como por exemplo, a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e a diestearoilfosfatidilcolina (DSPC). Em geral, o fosfolípido DPPC é empregado em maior proporção nas formulações, pois apresenta uma temperatura de transição de fase pouco acima da temperatura corporal ($T_c = 41,4 \text{ }^\circ\text{C}$) (DEMEL; DE KRUYFF, 1976). Essa propriedade o torna interessante para aplicação como carreador, uma vez que o fármaco ou as nanopartículas encapsuladas, ficam protegidas no interior dos lipossomas quando o mesmo é injetado no organismo e a liberação ocorre somente quando a temperatura do meio for alterada. A liberação de um fármaco encapsulado no lipossoma termossensível ocorre por

transferência passiva, mediada por gradiente de concentração, e é máxima quando a temperatura é próxima à T_c (SANDIP et al., 2000).

3.1.1 Formação de agregados por moléculas anfifílicas

A partir da década de 70, os lipossomas passaram a ocupar um papel de destaque nos estudos de sistemas carreadores de agentes terapêuticos. Sua estrutura, como já mencionado, é composta por fosfolípidos, grupo esse que apresenta uma molécula com uma região hidrofílica e outra hidrofóbica, e por isso, de maneira rápida e espontânea, forma agregados quando em meio aquoso. Para essa agregação das moléculas anfifílicas, é necessário se ter no meio uma concentração mínima, denominada concentração micelar crítica (CMC). Em baixas concentrações, as moléculas anfifílicas existem como monômeros na solução, e quanto maior a região hidrofóbica do monômero, menor a CMC. Quando a molécula anfifílica é inserida em um meio aquoso, as moléculas de água podem se comportar de duas maneiras, elas podem se ligar a esta molécula por meio de ligação de Van der Waals, uma interação fraca, ou a outras moléculas de água por meio de ligação de hidrogênio. Esse comportamento está relacionado ao tamanho da região apolar da molécula. Se a região apolar da molécula anfifílica possui dimensões grandes, há uma tendência das moléculas associarem-se preferencialmente entre si, e formar uma nova fase com outras moléculas de hidrocarboneto (efeito hidrofóbico). Quando a cadeia de hidrocarbonetos for pequena, há uma tendência de a molécula ser envolvida pelas moléculas de água, e essas formarem uma estrutura tipo gaiola (CHANDLER, 2005; ASHBAUGH, 1999).

Atualmente, entende-se que o efeito hidrofóbico está diretamente relacionado a mudanças na rede das ligações de hidrogênio da água, quando é adicionado ao meio um soluto ou superfície hidrofóbica. Quanto mais volumoso esse soluto ou superfície hidrofóbica, se torna inevitável à quebra de ligações de hidrogênio, e assim há uma penalidade entálpica. E já quando se trata de um soluto pequeno, as moléculas de água se reorientam com a finalidade de conservar o número de ligações de hidrogênio e disso resulta uma penalidade entrópica (BERNARDINO, 2018; CHANDLER, 2005).

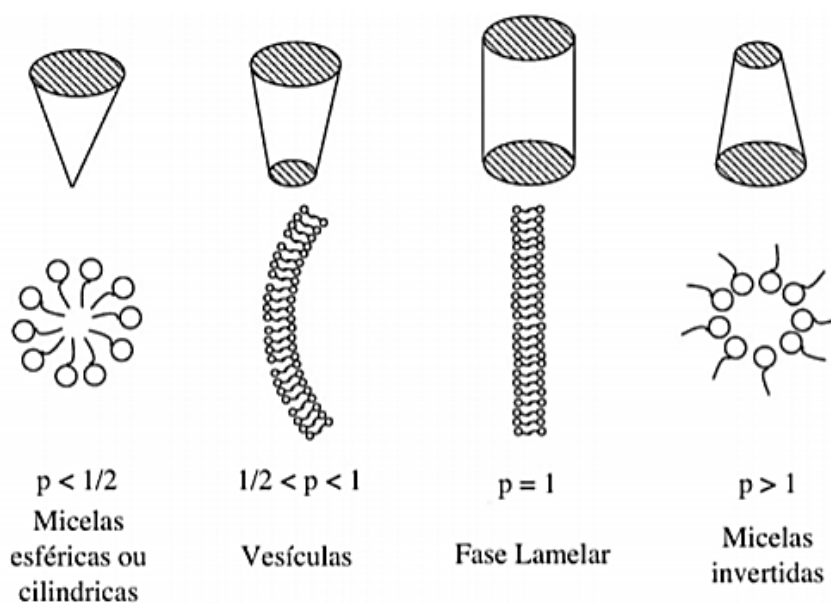
A estrutura do agregado depende da estrutura das moléculas lipídicas constituintes, e assim diferentes tipos de agregados podem ser formados, como as micelas (formação favorecida quando a área de secção transversal do grupo polar é maior do que da cadeia lateral apolar) e as bicamadas

(favorecida quando as áreas de secção transversal dos grupos polares e as cadeias laterais são similares). As bicamadas, por serem relativamente instáveis se dobras espontaneamente para formar uma esfera oca, as vesículas. E assim, como uma maneira de poder prever a forma do agregado, foi definido o parâmetro de empacotamento P , que relaciona características da molécula anfifílica, como representado na Equação 5 (ISRAELACHVILI, 1998).

$$P = \frac{v}{a_0 l} \quad (5)$$

Onde v e l representam o volume e o comprimento da cadeia de hidrocarbonetos, respectivamente, e a_0 a área transversal do grupo da cabeça polar. As configurações que as moléculas anfifílicas podem apresentar segundo o valor do parâmetro de empacotamento, são apresentadas na Figura 14.

Figura 14: Possíveis conformações de moléculas anfifílicas em meio aquoso. Diferentes parâmetros críticos de empacotamento originam a formação de diferentes agregados.



Fonte: Palmeira, 2012.

3.2 OBJETIVO

Neste capítulo o objetivo foi obter formulações estáveis de lipossomas de cerca de 200 nm, termossensíveis e contendo nanopartículas de óxido de ferro previamente sintetizadas. Caracterizar físicoquímica e morfologicamente o sistema. Por fim, determinar a eficiência de encapsulação das nanopartículas, bem como avaliar a sua estabilidade.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Materiais

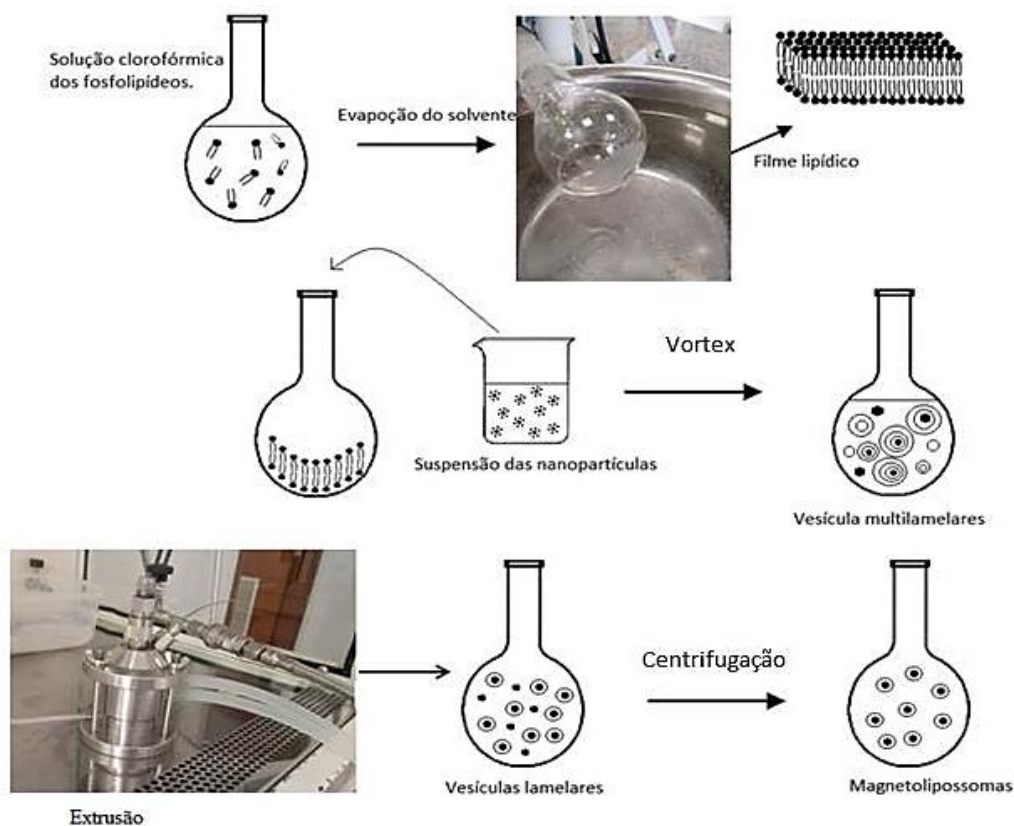
Os fosfolípides usados na formulação do lipossoma termossensível foram o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e distearoilfosfatidiletanolamina-(polietilenoglicol)2000 (DSPE-PEG2000) da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O clorofórmio foi adquirido no LabSynth (São Paulo, Brasil). O HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-etanossulfônico) foi fornecido pela Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). Para o ensaio de determinação da eficiência de encapsulação foram utilizados os seguintes reagentes: permanganato de potássio (KMnO_4) da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); sulfato de ferro (III) amoniacal dodecahidratado ($\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) fornecido pela Merck (São Paulo, Brasil); ácido sulfúrico (H_2SO_4) da L.S. Chemicals (Ribeirão Preto, Brasil); ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) da Isofar (Rio de Janeiro, Brasil); 1,10-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$) da Vetec; ácido clorídrico (HCl) da Alpha (Porto Alegre, Brasil) e álcool isopropílico ($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$). Todos os reagentes usados eram de grau analítico e utilizados sem purificação adicional.

3.3.2 Preparação de lipossomas termossensíveis

As formulações termossensíveis contendo nanopartículas de óxido de ferro foram preparadas pelo método de evaporação em fase reversa (REV) (SZOKA; PAPAHAJPOULOS, 1978) empregando o procedimento descrito por Maia et al., 2016, que somado ao uso da extrusão permite a obtenção de lipossomas unilamelares. A concentração lipídica total definida para todos os lipossomas foi de 40 mmol/L. A composição de cada formulação foi escolhida com base nos estudos de Li e colaboradores (2013). Para o preparo dos lipossomas termossensíveis (TTSL-NPM-Ac)

alíquotas de soluções clorofórmicas de DPPC, DSPC e DSPE-PEG2000, em razão molar lipídica de 80:15:5, respectivamente, foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas a evaporação do solvente sob pressão reduzida em evaporador rotativo R-210 Büchi Labortechnik (Flawil, Suíça) empregando as seguintes condições: 103 mbar, 120 rpm, durante 1 hora. Depois de formado o filme e completa evaporação do clorofórmio, foi adicionado ao balão a dispersão aquosa das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com o ácido cítrico (NPM-Ac), sendo utilizado o material Mag8. A mistura obtida foi submetida à agitação vigorosa em vórtex durante 5 minutos, até todo o filme se desprender da parede do balão formando as vesículas. A calibração destes lipossomas foi realizada, mediante o emprego de cinco ciclos de extrusão (Extrusor T 001, Lipex Biomembranes, Canadá), em cada uma das membranas de policarbonato contendo tamanho de poro de 0,4, e 0,2 μm , sob fluxo de nitrogênio e à temperatura de 55 °C. A separação das nanopartículas de óxido de ferro não encapsuladas foi feita por centrifugação. A amostra foi diluída quatro vezes e centrifugada a 3.000 RPM, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi eliminado e o pellet formado foi ressuspenso em tampão HEPES (composição: HEPES 10 mmol/L, NaCl 145 mmol/L e EDTA 5 mmol/L, pH 7,4). Foi preparada também uma formulação branca, encapsulando somente solução tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹ para controles. Na Figura 15 está apresentado um esquema do preparo dos lipossomas.

Figura 15: Esquema de preparação dos lipossomas termossensíveis pelo método de evaporação em fase reversa.



Fonte: Adaptado de Ferreira, 2013.

3.3.3 Caracterização físico-química dos lipossomas

As análises de diâmetro médio e do índice de polidispersão serão realizadas pela técnica de espalhamento dinâmico da luz, à temperatura de 25 °C e empregando um ângulo de 90°. As medidas serão realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras serão diluídas em tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹, a uma razão de 1:20 para medidas de diâmetro médio e índice de polidispersão.

3.3.4 Estudo da taxa de incorporação de NPM

A determinação de eficiência de encapsulação das nanopartículas magnéticas nos lipossomas foi realizada por espectrofotometria UV-Vis (Espectrofotômetro Frontier da Perkin Elmer). O método empregado foi desenvolvido localmente, baseado nos estudos prévios de Breitzkreitz e colaboradores (2014). Inicialmente, para a curva de calibração, foram preparadas soluções estoque como mostrado no esquema apresentado na Figura 16. Como o analito não era um padrão primário foi necessária sua padronização. O método foi realizado como descrito na farmacopéia brasileira (ANVISA, 2010).

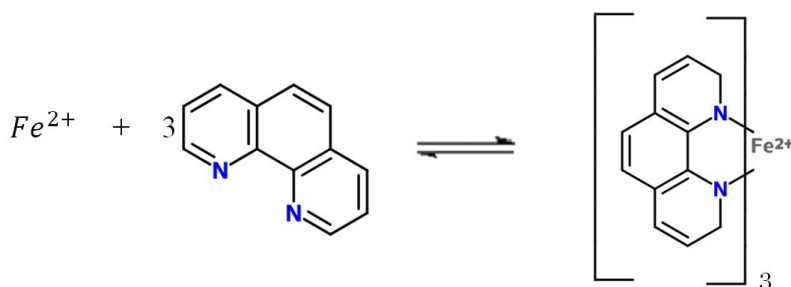
Figura 16: Soluções para análise de espectrofotometria UV-Vis.

Solução estoque do analito (50 mg/mL Fe (III) em H ₂ SO ₄ 0,01mol/L)	<ul style="list-style-type: none">• Balão volumétrico de 250 mL• 130 µL de H₂SO₄ concentrado• 107,5 mg do sal de ferro (III) sulfato de ferro amoniacal dodecahidratado (NH₄Fe (SO₄)₂.12H₂O)
Solução estoque ácido ascórbico 0,5% m/v	<ul style="list-style-type: none">• Balão volumétrico de 25 mL• 0,125g de ácido ascórbico (C₆H₈O₆)
Solução de <i>o</i> -fenantrolina 0,25% m/v	<ul style="list-style-type: none">• Balão volumétrico de 25 mL• 0,0625 g de <i>o</i>-fenantrolina (C₁₂ H₈N₂)• 2,5 mL de acetona
Solução tampão acetato/ácido acético (pH 4,7)	Balão de 25 mL 1,0125 g de acetato de sódio (CH ₃ COONa) 700 µL de ácido acético CH ₃ COOH

A curva-padrão foi preparada a partir de seis diferentes concentrações: 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L; 3,0 mg/L; 4,0 mg/L e 5,0 mg/L. Inicialmente, a absorvância máxima do complexo de ferro e fenantrolina foi determinada por varredura espectrofotométrica, de 185-900 nm. Para a abertura da amostra, os lipossomas foram previamente solubilizados em álcool isopropílico na proporção de 1:5 para completa liberação do conteúdo das vesículas, e em seguida, foi adicionado ácido ascórbico e a *o*-fenantrolina. Nesse sistema, o ácido ascórbico foi adicionado para reduzir o Fe (III) a Fe (II). Na sequência, foi determinado então o teor total de Fe (II) do meio através da sua complexação com a *o*-

fenantrolina, onde um complexo de cor vermelho-alaranjado é formado e apresenta razão estequiométrica de três ligantes para um centro metálico, conforme mostrado na Figura 17. Breitkreitz e colaboradores (2014) estudaram a influência da concentração de ácido ascórbico, o pH e o tempo de reação, e o melhor resultado encontrado foi utilizado nesta metodologia. O pH da reação é um fator importante pois, em valores de pH muito baixos, a espécie desprotonada da *o*-fenantrolina pode não estar presente na concentração necessária para a formação quantitativa do complexo com o Fe (II).

Figura 17: Ilustração da formação do complexo 1:3 de Fe^{2+} com a *o*-fenantrolina. Para cada três moléculas de *o*-fenantrolina ocorre a quelação com um íon ferroso resultando em um complexo vermelho alaranjado.



3.3.5 Estudo de estabilidade da formulação (TTSL-NPM-Ac)

A estabilidade dos lipossomas, mantidos a $4^{\circ}C$, foi acompanhada durante até 31 dias. Os parâmetros avaliados incluíram diâmetro médio e índice de polidispersão, os quais foram analisados pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons por espalhamento dinâmico da luz. Foram realizadas um total de seis medidas, com intervalo de tempo pré-estabelecido (1, 2, 7, 14, 21 e 31 dias após a preparação da formulação). As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Inglaterra). Os valores dos parâmetros avaliados foram comparados com aqueles obtidos no tempo zero. As amostras foram diluídas em tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} , a uma razão de 1:20.

3.3.6 Caracterização térmica por análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Os valores da temperatura de transição de fase dos lipossomos (T_c) foram avaliados pela técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) usando um microcalorímetro Microcal VP-DSC Malvern Instruments (Laboratório de Análises Biomoleculares, pertencente à Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil). Os lipossomas foram diluídos em tampão HEPES, para uma concentração de 1 mg/mL. A capacidade de calor (C_p), a pressão constante em unidades de cal / $^{\circ}\text{C}$ foi então medida de 15 a 65 $^{\circ}\text{C}$, onde uma taxa de aquecimento de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ foi utilizada.

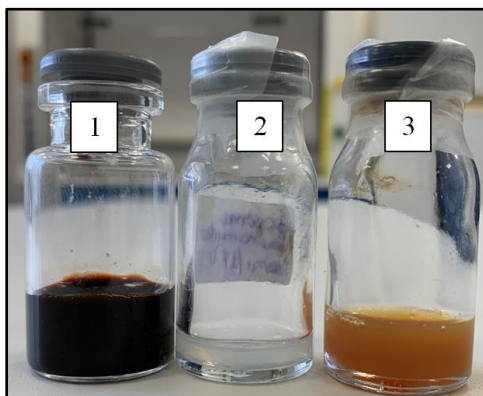
3.3.7 Caracterização morfológica

Amostras de TTSL-NPM-Ac foram caracterizada morfológicamente por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras foram analisadas através do microscópio eletrônico Tecnai - G2-20 - FEI 2006 com tensão de 200 kV. A amostra foi preparada por contrastação negativa com deposição do metal pesado acetato de uranila. Nesse processo as partículas são envolvidas com metal pesado, de forma que, ao microscópio, as mesmas aparecem em contraste negativo contra um fundo escuro.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

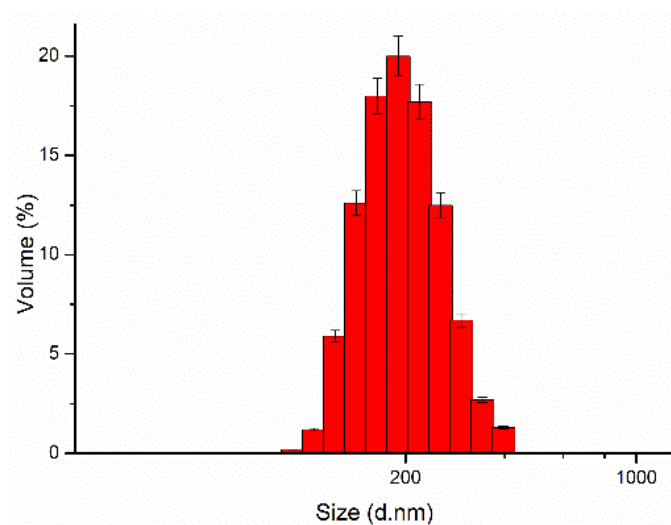
A partir do método descrito, a formulação TTSL-NPM-Ac foi obtida. Na Figura 18 é apresentado os produtos de cada etapa até a obtenção da formulação lipossomal contendo nanopartículas de óxido de ferro. No frasco 1, está disponível uma amostra constituída por NPM-Ac o qual se apresentou como fluido uniforme com cor escura e estável mesmo após 60 dias. No frasco 2, é apresentada a formulação de lipossomas em branco usado como controle, e no frasco 3, segue representado a amostra constituída por lipossomas carregados com nanopartículas de óxido de ferro (TTSL-NPM-Ac). A formulação apresentou-se uma solução uniforme sem presença de corpo de fundo.

Figura 18: Frascos constituídos de: (1) NPM-Ac; (2) TTSL e (3) TTSL-NPM-Ac.



A formulação lipossomal termossensível contendo óxido de ferro (TTSL-NPM-Ac) foi caracterizada quanto ao seu tamanho médio por DLS. A análise foi feita após o processo de extrusão. Os resultados obtidos seguem representados na Figura 19 e revelaram vesículas com tamanho médio de $201,55 \pm 1,29$ nm, como esperado após o processo de extrusão. A ausência de quantidade significativa de nanopartículas por volta de 16 nm (tamanho médio das NPM-Ac, Figura 6) mostra que o processo de centrifugação foi eficiente para separar as nanopartículas de óxido de ferro não encapsuladas da formulação lipossomal.

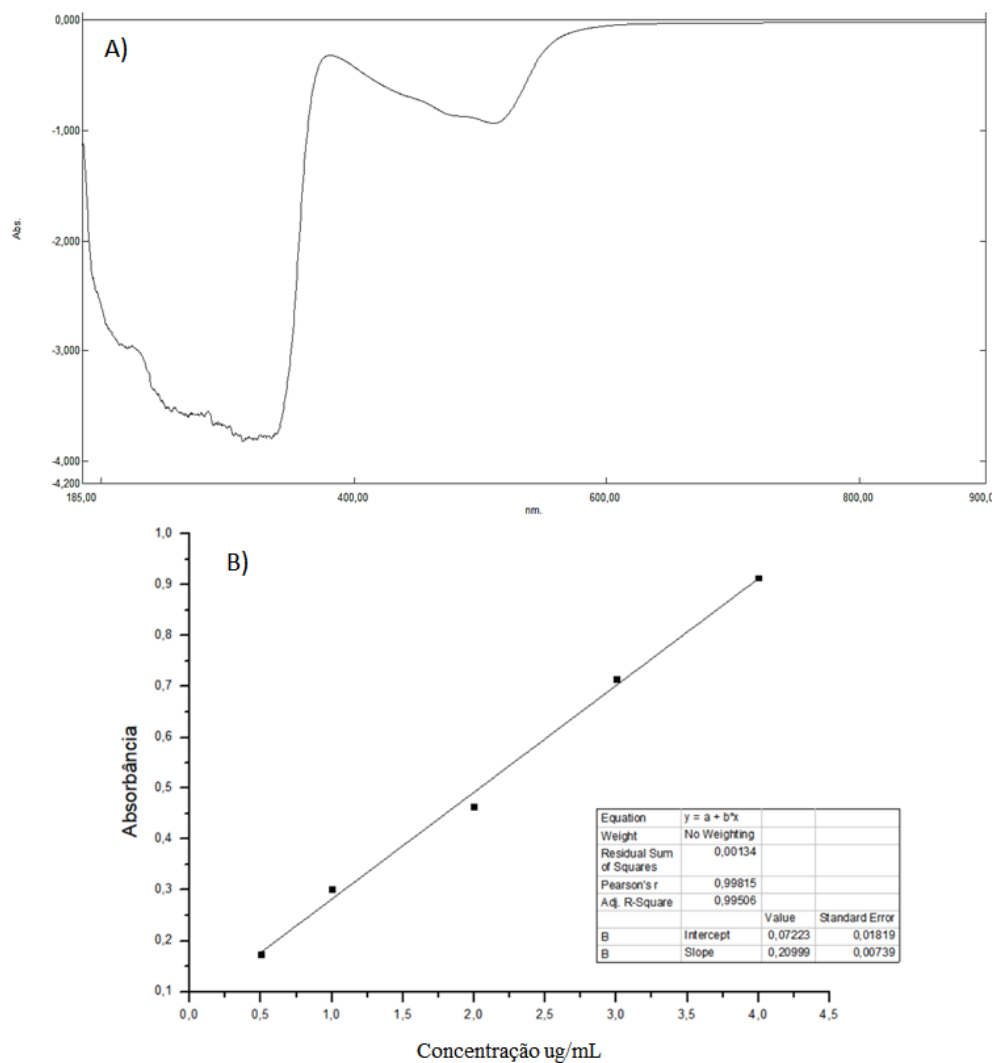
Figura 19: Histograma da amostra TTSL-NPM-Ac. O histograma mostra que a maior contribuição para o cálculo da distribuição média de tamanhos, está na da faixa de 200 nm.



Os resultados obtidos revelaram ainda um baixo índice de polidispersividade igual 0,165. Estes resultados em conjunto revelam que o processo de preparação empregado permitiu obter uma formulação lipossomal com características adequadas para a aplicação pretendida. Lipossomas podem se acumular em tumores sólidos através de mecanismos de vetorização passiva, onde a acumulação é devida, principalmente, pelo efeito de permeação e retenção aumentado (EPR - Enhanced Permeation and Retention) que se baseia na fisiologia anormal dos neovasos presentes nesses tumores. Em tecido sadio, o endotélio vascular apresenta fenestrações que tem tamanho que varia entre 5 e 10 nm, já nos tumores sólidos, estas aberturas, possuem tamanhos aumentados que variam entre 100 e 780 nm. Assim, nanopartículas com tamanho médio de 200 nm, como o caso dos lipossomas obtidos, podem se acumular com mais facilidade em neovasos dos tumores sólidos quando comparado ao tecido sadio (LIECHTY; PEPPAS, 2011).

A amostra TTSL-NPM-Ac foi analisada por espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) para se determinar a quantidade de ferro encapsulado nos lipossomas termossensíveis. Na Figura 20 é mostrada a curva de calibração inicialmente feita e o resultado de varredura espectrofotométrica.

Figura 20: Estudo da eficiência de encapsulação em lipossomas. (A) resultados de varredura espectrofotométrica. Uma absorbância máxima foi obtida a 387 nm. (B) Curva de calibração obtida a partir de 6 padrões diferentes. Um r^2 de 0,978 foi obtido a partir de concentrações variando de 0,5 a 5 $\mu\text{g/mL}$.

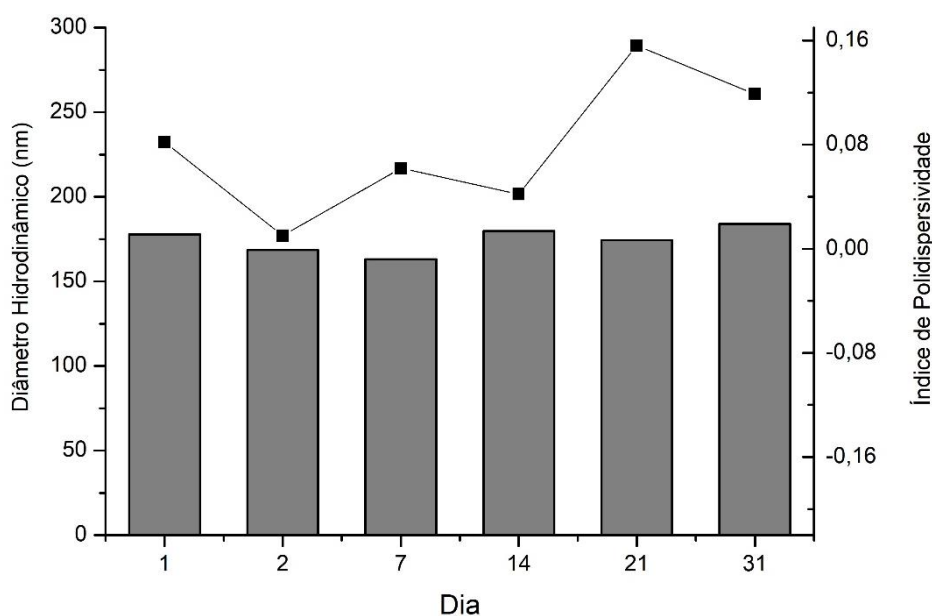


A medida feita por espectrofotometria UV-Vis mostrou que a amostra apresenta um total de $228,53 \pm 9 \mu\text{g/mL}$ de ferro. O valor encontrado foi inferior ao observado em alguns estudos anteriores, como no de Ferreira (2013), em que conseguiu uma encapsulação de até $900 \mu\text{g/mL}$ de ferro. Uma comparação direta do resultado encontrado com estudos anteriores é dificultada devido às diferenças envolvidas no processo de obtenção dos lipossomas com óxido de ferro, além das diferentes composições desses lipossomas, o que pode influenciar na capacidade de encapsular as nanopartículas. Apesar do valor inferior encontrado no presente estudo, acreditasse que a

concentração de ferro encapsulada na formulação lipossomal desenvolvida, seja suficiente para causar toxicidade às células cancerígenas, uma vez que o lipossoma deve aumentar a captação celular dessas nanopartículas, e assim aumentar a concentração de óxido de ferro em seu interior, não sendo necessária uma alta dosagem.

Os resultados do estudo de estabilidade realizado em amostras TTSL-NPM-Ac, onde foi acompanhado seu diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersividade ao longo do tempo, seguem representados no gráfico da Figura 21 e revelam que não houve uma diferença significativa no tamanho médio das partículas lipossomais no decorrer de até 31 dias. Entretanto, uma variação no índice de polidispersividade foi observada entre os 14^o e 21^o dias.

Figura 21: Estudo de estabilidade TTSL-NPM-Ac. Gráfico de barras representando os dias da medida de DLS pelo diâmetro hidrodinâmico médio e o PDI da amostra.



A significativa alteração no índice de polidispersividade pode estar relacionado ao processo de liberação das nanopartículas encapsuladas, aumentando assim o número de nanopartículas com tamanhos diferentes no meio. Tal fato foi visualmente identificado, como pode ser observado na Figura 22, onde é perceptível o aparecimento de um sólido decantado no fundo do frasco.

Quando administrado por via intravenosa, a tendência dos nanocarreadores lipídicos a se acumularem no tecido alvo depende de suas características físico-químicas, incluindo a distribuição

de tamanho de partícula. Medidas de tamanho e PDI estão diretamente relacionadas à segurança de uso da formulação, uma vez que a presença de partículas maiores aumentaria o risco de embolia. Uma formulação segura para uso clínico, requer nanocarreadores estáveis e monodispersos. Em geral, nanopartículas com os menores diâmetros, de até aproximadamente 500 nm, tendem a ser mais seguras para o uso intravenoso (DATE; NAGARSENKER, 2008; BRUXEL, et al., 2012).

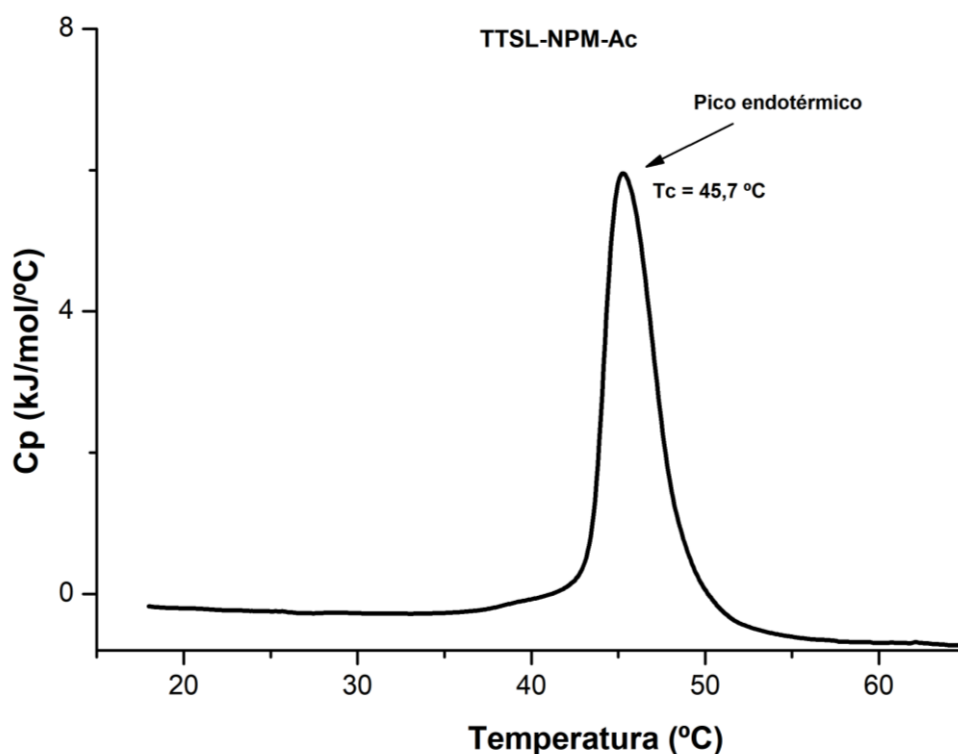
Figura 22: Imagem da formulação TTSL-NPM-Ac 21 dias após sua obtenção e sendo armazenada a 4°C. Presença de corpo de fundo evidenciando a liberação das NPM-Ac anteriormente encapsuladas.



A análise de DSC foi realizada para estudar o comportamento térmico das vesículas durante o aquecimento e assim estudar a temperatura que ocorre mudanças de fases na estrutura lipossomal. Nesta técnica, a transição de fase $L\beta \rightarrow L\alpha$ é visualizada por meio de um pico endotérmico, ou seja, é avaliada a temperatura em que ocorre a transição de fase gel para a fase cristal líquido. A liberação de um fármaco encapsulado em um lipossoma termossensível ocorre por transferência passiva, mediada por gradiente de concentração, e é máxima quando a temperatura é próxima à T_c (KNEIDL et al., 2014). Nos termogramas, a temperatura de C_p máxima corresponde a T_c . O valor de T_c obtido para TTSL-NPM-Ac é representado na figura 23. O resultado de T_c igual a 45,7°C confirma a obtenção de uma formulação com composição lipídica adequada para uma possível aplicação com hipertermia. O valor está de acordo com os valores de T_c dos lipossomas termossensíveis utilizados

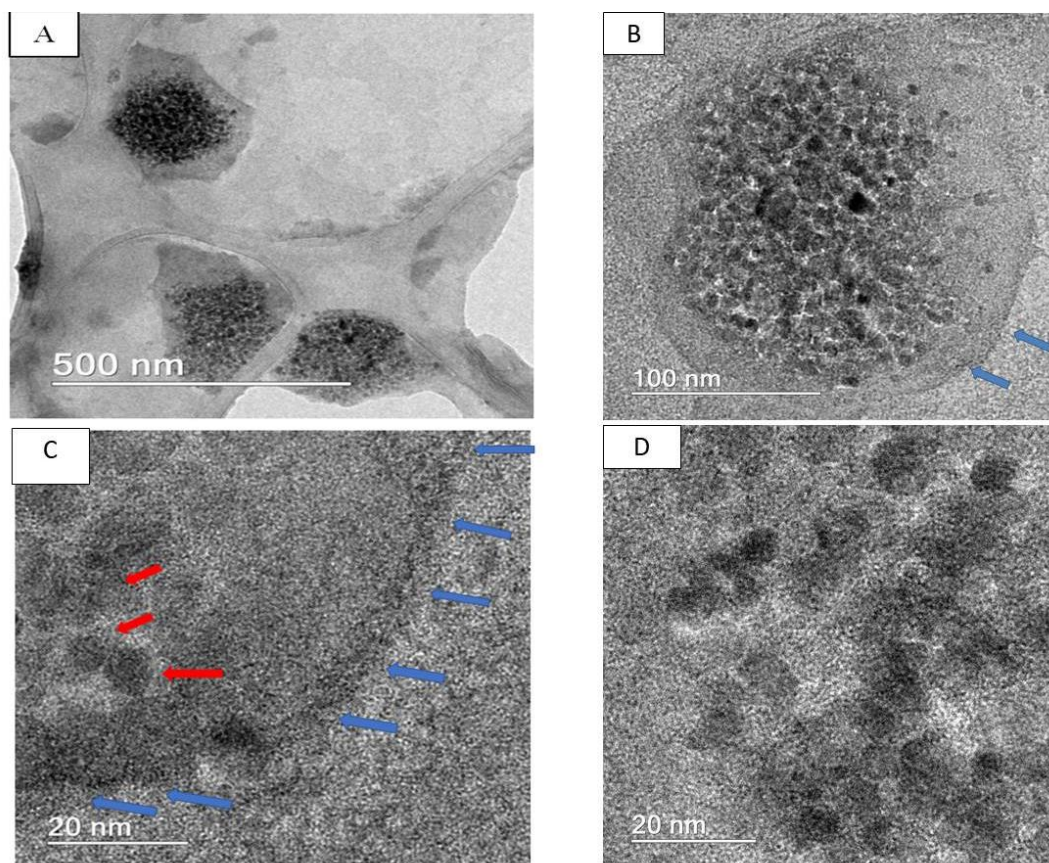
no tratamento do câncer, bem como dentro da faixa especificada de hipertermia moderada (BASTOS, 2016; KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

Figura 23: Termograma da amostra TTSL-NPM-Ac. Identificação da temperatura em que ocorre mudança de fase da formulação termossensível.



A análise da morfologia de amostras de TTSL-NPM-Ac foi conduzida por MET, e as imagens obtidas seguem representadas na Figura 24. Na Figura 24B e 24C, é observado um formato arredondado que pode ser atribuído ao contorno da membrana lipossomal (detalhado pela sequência de setas azuis). É observado também um conjunto denso de formato circular dentro das vesículas, que pode ser atribuído aos agregados de NPM-Ac, melhor definido na Figura 24C, como apontado pelas setas vermelhas e na figura 24D.

Figura 24: Fotomicrografias TEM obtidas para o lipossoma TTSL-NPM-Ac: A) presença de um aglomerado de nanopartículas no interior da vesícula; B) e C) formato arredondado característico de formulações lipossomais apontado por setas azuis; D) medida de alta resolução das NPM-Ac encapsuladas nas vesículas.



Os resultados de morfologia apresentados na Figura 24, não permite ver claramente o formato arredondado como o obtido por Maia (2019), apesar de se tratar de formulação semelhante. A diferença pode ser atribuída à metodologia empregada no preparo da amostra para o estudo. Apesar disso, com o observado em relação à morfologia somado as demais caracterizações, a formulação obtida se mostra adequada para a aplicação pretendida, uma vez que é possível notar as nanopartículas no interior da vesícula e ainda esses resultados corroboram com o encontrado pela análise de DLS quanto ao tamanho médio das mesmas.

3.5 CONCLUSÃO

Nesta etapa do trabalho, formulações lipossomais foram obtidas utilizando-se uma metodologia baseada na hidratação do filme lipídico seguido por extrusão. O método foi escolhido devido sua simplicidade e possibilidade de encapsulamento de substâncias com diferentes graus de hidrofiliicidade. Algo útil para uma possível proposta de trabalho futuro de encapsular fármacos juntamente com as nanopartículas. Foi possível obter lipossomas termosensíveis, confirmado pela análise de DSC, contendo nanopartículas magnéticas em seu interior (observado pela análise de TEM). A estabilidade da formulação foi investigada, e não se mostrou estável por mais que 30 dias, liberando o conteúdo encapsulado. O meio em que estava armazenado a formulação (tampão HEPES) pode influenciar nessa estabilidade, sendo algo que poderia ser melhor investigado em trabalhos futuros. A análise de DLS mostrou que a formulação apresentou tamanho hidrodinâmico médio e PDI adequados para a utilização *in vivo*. A eficiência do encapsulamento foi estudada por UV-Vis, que mostrou baixa porcentagem de material encapsulado. Mais estudos sobre a etapa de hidratação do filme lipídico durante a formulação podem ser futuramente aplicados na tentativa de uma melhoria na encapsulação. Apesar disso, como o lipossoma é uma nanoestrutura que devido sua facilidade de entrar no meio intracelular aumenta a biodisponibilidade do material encapsulado, a formulação obtida ainda se torna adequada para a aplicação pretendida.

3.6 REFERÊNCIAS

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o++Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>>. Acesso em: 05/09/2018.

ASHBAUGH, H. S.; KALER, E. W.; PAULAITIS, M. E. A “Universal” surface area correlation for molecular hydrophobic phenomena. *J. Am. Chem. Soc.* v. 121, p. 9243–9244, 1999.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Jornal of molecular biology*, v. 13, p. 238-252, ago. 1965.

BASTOS, M. Using DSC to characterize thermotropic phase transitions in lipid bilayer membranes. Application Note. *Malvern Instruments Limited*, 2016.

BATISTA, C. M.; BARROS, C. B. M.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BERNARDINO, K. Estudo do potencial eletrostático e da termodinâmica de agregação de surfactantes por simulações de dinâmica molecular. Tese (Doutorado em Ciências – Físico - Química), Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro ii com *o*-fenantrolina. um tutorial, parte III. *Química Nova*. v. 37, n. 3, p.564-573, 2014.

CHANDLER, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature*, v. 437, n. 29, p.640-647, sep. 2005.

DEMEL, R. A.; DE KRUYFF, B. The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* v. 457, p. 109-132, 1976.

FERREIRA, R. V. Síntese e caracterização de magnetolipossomas termossensíveis contendo fármacos antitumorais encapsulados. 2013. 186 p. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Belo Horizonte, 2013.

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 32, p. 181-189, 1999.

ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and Surfaces Forces. 2nd ed. London, Academic Press Limited, 1998.

KNEIDL, B.; PELLER, M.; WINTER, G.; LINDNER, L. H., HOSSAN, M. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *Int. J. Nanomed.*, v. 9, p. 4387-4398, 2014.

KUMAR, C. S. S. R.; MOHAMMAD, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v. 63, p. 789-808, 2011.

LIECHTY, W.B.; PEPPAS, N. A. Expert opinion: responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* v. 80, p. 241-246, ago, 2011;

LIPOWSKY, R. Generic interactions of flexible membranes. Structure and dynamics of membranes - generic and specific interactions. R. Lipowsky and E. Sackmann. Elsevier. p. 524-526, 1995.

MAIA, A. L. C. Lipossomas contendo gadodiamida: aspectos analíticos, farmacotécnicos e avaliação da atividade citotóxica in vitro. 2015. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

MAIA, A. L. C. Lipossomas termossensíveis contendo complexos de gadolínio como potencial estratégia para o tratamento seletivo do câncer de mama. 2019. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SANDIP, B. T. et al. Thermosensitive liposomes and localised hyperthermia – an effective bimodality approach for tumour management. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 32, p. 214-220, 2000.

SZOKA JR. F.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 75, p. 4194-41-98, 1978.

TIAGO F. S. P. Interação de uma série homóloga de anfífilas fluorescentes com bicamadas lipídicas na fase líquido ordenado. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de Coimbra, 2012.

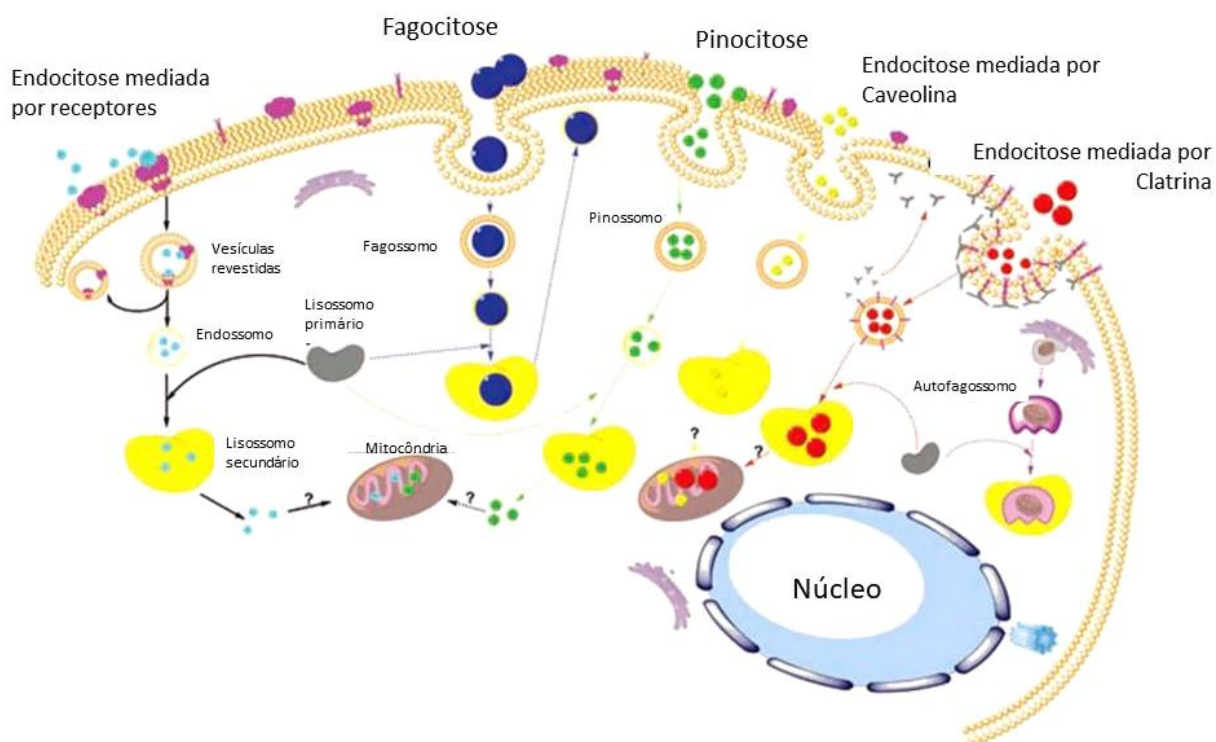
VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 70, p.95-111, jul 1995.

4.1 INTRODUÇÃO

As nanopartículas de óxido de ferro são elegíveis para várias aplicações biomédicas, como hipertermia magnética, ressonância magnética, entrega de drogas alvo, detecção de bactérias, rotulagem de células e enriquecimento de DNA. Quando é desenvolvido nanomateriais para tais aplicações, é imprescindível ter conhecimento da interação do mesmo quando em meio biológico. Além disso, é necessário conhecer o comportamento dessas nanopartículas quando em contato com as células, e assim, compreender de forma mais ampla, possíveis perfis terapêuticos ou toxicológicos. A interação de células com nanopartículas é tão dependente de propriedades físico-químicas da última, como sua forma, tamanho e carga superficial, quanto também do tipo de célula estudado. Diversas investigações teóricas e experimentais indicam que essas propriedades físico-químicas definem além da internalização celular, perfis de biodistribuição e a toxicidade induzida por estes nanomateriais (GHASEMPOUR, et. al., 2015; HARRIS, et. al., 2010; LAURENT, et. al., 2008).

A membrana plasmática é a estrutura através da qual o interior da célula se comunica com o meio externo. Ela mantém a homeostase celular, fornece suporte estrutural, mantém os gradientes de concentração de íons e controla a entrada e a saída de pequenas moléculas e nutrientes carregados. Essa comunicação entre o meio extracelular e intracelular, pode ocorrer seguindo diferentes mecanismos, por exemplo, quando se tem nanossistemas hidrofílicos, os quais são comumente transportados para a célula por endocitose ou graças a danos causados à membrana (Alberts, et. al., 2007). Diferentes mecanismos celulares de captação de nanopartículas de óxido de ferro foram propostos: difusão passiva, endocitose mediada por receptores, endocitose mediada por clatrina ou caveolina (proteínas) e outros tipos de endocitose independente de clatrina e caveolina. De maneira resumida, os mecanismos endocitóticos podem ser descritos como uma sequência de quatro etapas essenciais: (1) ligação à membrana da superfície celular, (2) formação de vesículas pela deformação da membrana plasmática, (3) descolamento da vesícula da membrana e (4) tráfico das vesículas para organelas subcelulares específicas (HILLAIREAU; COUVREUR, 2009). Na Figura 25 estão disponíveis os diferentes mecanismos de captação celular.

Figura 25: Diferentes mecanismos de endocitose.



Prijic e colaboradores (2010) estudaram a via de captação de nanopartículas de óxido de ferro revestidos com sílica. Três linhagens celulares fizeram parte do estudo, e mostraram invaginações da membrana plasmática mediadas por caveolina. A pesquisa mostrou também que o teor de nanopartículas internalizadas foi dependente do tempo e do tipo de célula, sendo o maior teor medido nas células malignas SK-MEL-28. Chaves e colaboradores (2017), estudaram a internalização dessas nanopartículas associadas a citrato de ródio em células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e encontraram que a internalização ocorre de maneira dependente de clatrina. Dessa forma é observável as diversas variáveis que regem os processos endocíticos, mostrando a especificidade de cada caso estudado.

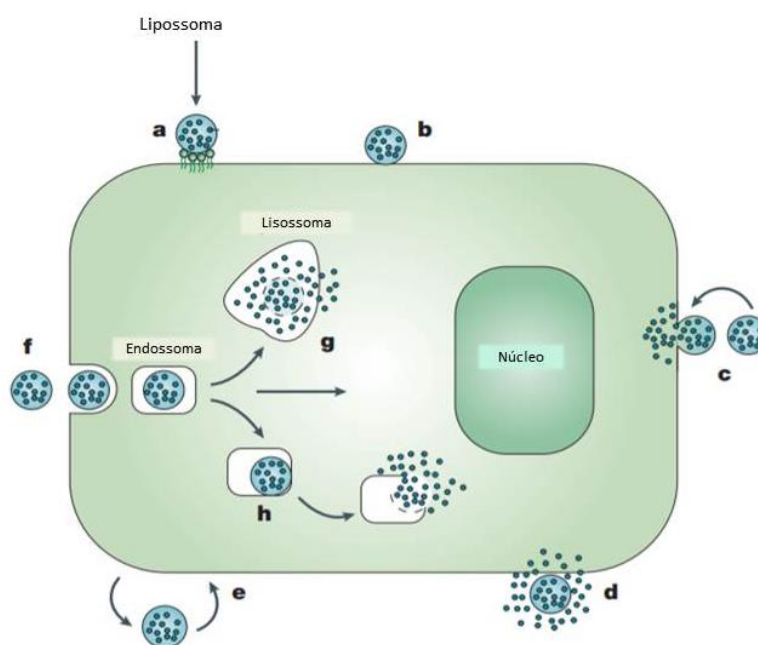
Alguns outros mecanismos de captação celular foram propostos para sistemas lipossomais, como:

(i) adsorção do lipossoma à membrana celular, onde ocorre a liberação dos componentes da vesícula no fluido extracelular, dos quais podem passar através da membrana, entrando na célula por difusão passiva;

(ii) o lipossoma pode também se fixar e se fundir à membrana celular, possibilitando a entrega de moléculas que segue um processo que é independente de processos biológicos, como endocitose, pinocitose ou ligação específica a receptores;

(iii) interação com a membrana por meio de troca lipídica em uma interação de longo alcance que consiste na troca de lípidos lipossomais (incluindo o conteúdo encapsulado) com variados lípidos da membrana celular (Vemuri et al., 1995; Torchilin, 2005). Na Figura 26, são representados os mecanismos de interação entre os lipossomas e as células.

Figura 26: Os lipossomos podem interagir especificamente com a célula (a) ou fundir-se na superfície da célula (b). Pode ocorrer a adsorção dos lipossomos à superfície da célula (c), onde os lipossomas podem ser submetidos a troca direta ou transferência mediada por proteínas dos componentes lipídicos com a membrana celular. Via pinocitose, o fármaco pode entrar e ser liberado na célula (d). Os lipossomas podem realizar intercâmbio molecular entre a parede dos lipossomos e a parede da célula (e). Por endocitose (f), o lipossoma pode ser entregue pelo endossomo ao lisossomo e o fármaco ser liberados no citoplasma (g). Ou ainda o lipossomo pode provocar desestabilização no endossomo, que resulta na liberação do fármaco no citoplasma da célula (h).

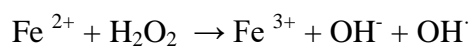
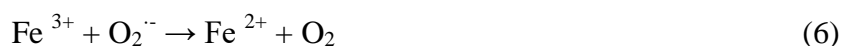


Fonte: Adaptado de Torchilin, 2005.

4.1.1 Citotoxicidade induzida por nanopartículas de óxido de ferro

Como nutriente inorgânico fundamental ao corpo humano, o ferro desempenha um papel importante em numerosos processos biológicos, incluindo síntese de DNA e RNA, transporte de oxigênio, respiração celular, atividade de numerosas enzimas, síntese de heme, dentre outros processos. A homeostase do ferro é rigidamente regulada em células saudáveis, onde o processo metabólico comumente produz espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxido e peróxido de hidrogênio, que são controladas por enzimas antioxidantes e outras moléculas redox. No entanto, ao entrarem nas células, as nanopartículas de óxido de ferro podem catalisar a geração de espécies reativas que, em excesso, leva a estresse oxidativo, que pode desencadear processos de morte celular. Estudos recentes mostram que um excesso de ferro no meio intracelular está associado a um aumento de apoptose, necrose e autofagia. Embora por diferentes mecanismos, esse aumento está relacionado a ação dessas espécies reativas de oxigênio, que podem resultar em processos inflamatórios nas células e consequente ruptura na membrana das mitocôndrias, danos no DNA que invariavelmente em uma grande extensão, induz os processos de morte celular (Abdesselem, et. al., 2017; Dixon; Stockwell, 2014 Latunde-Dada, 2017; Kerins, 2018; Valdiglesias, et. al., 2015).

O ferro livre na forma de íons ferrosos (Fe^{2+}) pode reagir com peróxido de hidrogênio e oxigênio, produzido pelas mitocôndrias, e criar radicais hidroxila altamente reativos. Os íons de ferro catalisam as conhecidas reações de Haber-Weiss e Fenton, responsáveis pela geração de EROs, onde na última há geração de radical OH^\bullet , por meio da reação do H_2O_2 com os íons ferro, e na primeira, os íons ferro catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical O_2^\bullet , a fim de gerar, da mesma forma, o radical OH^\bullet . As reações de Fenton e Haber-Weiss estão apresentadas na Equação 6 e 7, respectivamente (Anastasia, et. al., 2016).



Recentemente, o termo ferroptose foi usado para descrever um tipo de morte celular que se manifesta independente de indutores de necrose ou apoptose, e que é bioquimicamente e

geneticamente diferente desses mecanismos de morte. A ferroptose é um tipo de morte celular não programada, que envolve a participação de íons de ferro, onde estes desencadeiam peroxidação lipídica (oxidação dos lipídeos presentes na membrana plasmática das células), e por consequência leva há um acúmulo dentro da célula dos produtos desse processo de peroxidação, que são derivados lipídicos altamente reativos e tóxicos para a célula. Estudos mostraram que a susceptibilidade das células à ferroptose é dependente da composição lipídica das membranas celulares, e que esse processo em geral pode ser controlado por mecanismos de defesa celular dependentes de glutathione, um antioxidante, sendo a enzima Glutathione peroxidase 4 (GPx4) o principal mecanismo, que tem como função converter os produtos reativos da peroxidação em compostos menos tóxicos (Dixon, et. al., 2012, Yang, et. al., 2014).

Há na literatura diversos estudos sobre a citotoxicidade de nanopartículas de óxido de ferro. Porém, a variação nos revestimentos dessas nanopartículas, seu tamanho, as linhagens celulares estudadas, dentre outros fatores, dificultam a comparação dos resultados e muitas vezes a entender os mecanismos envolvidos. Kalid e colaboradores (2018) estudaram *in vitro* a citotoxicidade de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro e as mesmas revestidas com dextrano, em células tumorais (linhagem C6 de glioma de rato) e em células hipocámpais primárias dissociadas de camundongos embrionários. Os pesquisadores encontraram comportamento citotóxico semelhante nas duas linhagens e dependentes da concentração de óxido de ferro. Tanto na amostra com revestimento de dextrano quanto na não revestida, encontraram uma taxa de viabilidade próxima nos dois casos, de 47,58% após 24 h de incubação com uma concentração igual a 1000 µg/mL de óxido de ferro na linhagem C6, e de 38,82% nas células neurais primárias. Atribuíram essa diminuição da viabilidade celular, pela produção de EROs desencadeadas pela elevada concentração de nanopartículas de óxido de ferro.

Já Murray et. al., (2013) estudaram os efeitos das nanopartículas também revestidas com dextrano em diferentes tamanhos (15-50 nm) e de diferentes fabricantes. O estudo foi realizado em duas linhas celulares saudáveis HEK, e revelou que partículas de 20 nm diminuiu sua viabilidade, porém as de 15 e 50 nm não foram citotóxicas. Ocorreu também variação no comportamento quando comparado os diferentes fabricantes. As células HEK foram capazes de internalizar as partículas de 15 e 20 nm de um fabricante, porém partículas de 20 e 50 nm de um segundo fabricante não foram internalizadas.

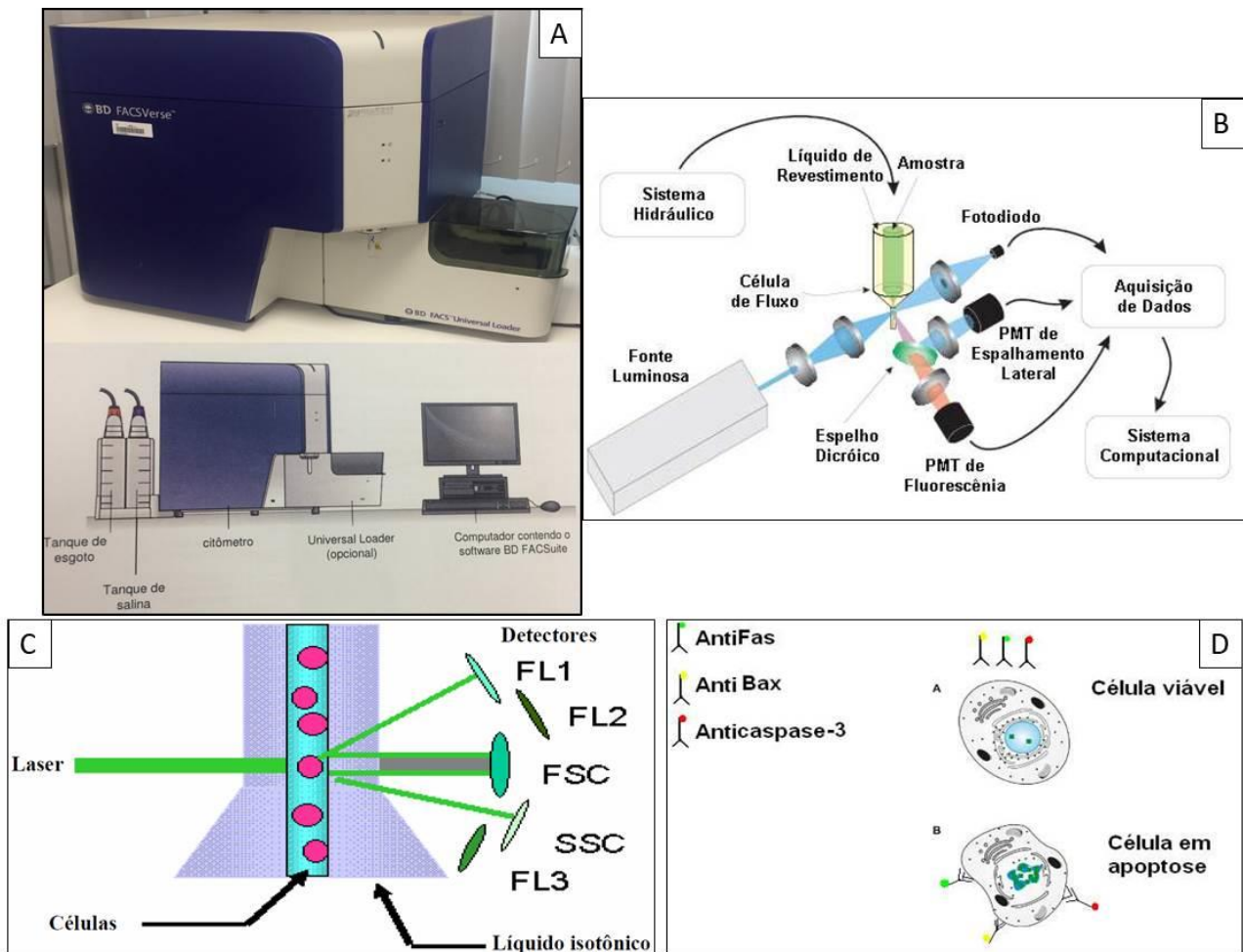
Outro estudo, feito por Cai e colaboradores (2013), evidencia como alterações, nesse caso do revestimento, pode mudar o comportamento citotóxico das nanopartículas. Foi observada toxicidade aumentada em nanopartículas de óxido de ferro revestidas com polietilimina (50 µg / mL de óxido de ferro), enquanto a inclusão de PEG e acetilação eliminou a citotoxicidade. O estudo foi feito em células de carcinoma epidermóide oral humano (KB).

4.1.2 Citometria de Fluxo

Para estudar a toxicidade de sistemas com potencial aplicação biológica, quando em meio celular, distintos ensaios podem ser utilizados, e cada ensaio é baseado em algum princípio diferente. As culturas celulares são sensíveis a diferentes mudanças ambientais, como pH, flutuações de temperatura, nutrientes, concentração de resíduos e também a concentração de agentes potencialmente tóxicos. Dessa forma, o controle sobre as condições experimentais e o uso do ensaio de citotoxicidade apropriado, é muito importante. Um exemplo de metodologia para se estudar a toxicidade de um sistema quando em um meio intracelular, é a citometria de fluxo.

O equipamento de citometria de fluxo é um dispositivo que pode ser utilizado para identificação, avaliação, e diferenciação de diversas características de partículas e células individualmente, como o tamanho celular, a complexidade citoplasmática, estudo do ciclo celular, conteúdo de DNA e RNA, receptores de superfície, atividade enzimática, e diversos parâmetros celulares como a concentração do Ca^{2+} intracelular, pH intracelular e a apoptose. É uma ferramenta que possui várias aplicações desde análises clínicas até o desenvolvimento de novas drogas (Brown; Wittwer, 2000; SHAPIRO, 2003). Na Figura 27 é apresentado o equipamento citômetro de fluxo.

Figura 27: Ilustração do equipamento citômetro de fluxo: A) imagem externa do equipamento junto a os componentes necessários a seu funcionamento, como tanques de salina, tanque de descarte e computador com o *software* BD FACSuite para tratamento dos dados; B) diferentes sistemas físicos complementares (fluxo, óptico e eletrônico) que compõem o citômetro; C) câmara de fluxo e como é feito o alinhamento das células a serem interditadas pelo laser, e D) exemplo de ação de um fluorocromo específico para diferenciar células apoptóticas das saudáveis.



O princípio básico da citometria resume-se no emprego de uma radiação direcionada, que excita componentes fluorescentes, os fluorocromos, os quais durante um ensaio encontram-se ligado às células por meio do uso de anticorpos. Os fluorocromos acoplados a anticorpos possuem elevada afinidade e seletividade por determinada estrutura química presente nas células, e dessa forma se

pode relacionar as informações biológicas, moleculares e/ou químicas das células, a intensidade da fluorescência emitida pelas mesmas (O'DONNELL et. al., 2013). Há fluorocromos que se ligam covalentemente e seletivamente a componentes celulares específicos (marcadores de proteínas, de lipídios, de DNA, de RNA, entre outros), e o equipamento faz a leitura da intensidade da fluorescência refletida por essas células previamente marcadas. Além disso, existem fluorocromos que variam suas características de excitação e emissão em função do microambiente em que se encontram (BERTHO, 2015). Um exemplo do uso de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromo, que se liga seletivamente, é representado na Figura 30D. É mostrado na figura, moléculas específicas que permitem identificar células em processo de morte, onde é empregada a afinidade do anticorpo por proteínas, receptores de superfície, ou qualquer molécula que não estaria presente em uma célula viável para o anticorpo se ligar, permitindo assim identificar as células em processo de morte (HERDERSCHÉE, et. al., 2015).

Em um citômetro de fluxo, a metodologia empregada é composta basicamente por três diferentes sistemas físicos complementares: de fluxo, óptico e eletrônico (Figura 30B). A suspensão celular é introduzida no citômetro aos poucos por meio de um sistema de pressão, que a leva a um compartimento denominado câmara de fluxo, juntamente a um fluxo hidrodinâmico contínuo de solução salina. Esse fluxo contínuo tem velocidade de injeção diferente da suspensão celular, e essa diferença faz com que o fluxo se processe em regime laminar. Esse fato, somado ao formato cônico da câmara, favorece um alinhamento das células presentes na suspensão de modo a alinhá-las, e torna possível que as mesmas sejam individualmente interceptadas por um feixe de radiação perpendicular ao fluxo (Figura 30C) (AMBRIZ-AVIÑA, et. al., 2014; BERTHO, 2015).

Já o sistema óptico consiste na parte que abriga a fonte emissora de luz do laser, que após passar pela célula é captada por um conjunto de filtros (espelhos dicróicos) para posterior detecção. Além de excitar os fluorocromos, a luz do laser, ao interceptar a célula, é refratada e dispersada tornando possível avaliar propriedades físicas da mesma. A combinação das informações obtidas pelo espalhamento frontal (FSC) e espalhamento lateral (SSC), permite se ter conhecimento da dimensão celular, a granulosidade e complexidade da célula. A luz espalhada lateralmente e os sinais fluorescentes são direcionados aos tubos fotomultiplicadores, enquanto um fotodiodo recolhe os sinais espalhados frontalmente. Os sinais de luz então gerados são convertidos em sinais elétricos (tensão) por fotodetectores. (TEVA, et. al., 2009).

4.2 OBJETIVO

Neste capítulo o objetivo foi estudar *in vitro*, por meio da técnica de citometria de fluxo, a viabilidade de três diferentes linhagens células expostas a diferentes concentrações de amostras de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com ácido cítrico (NPM-Ac), e dos lipossomas termosensíveis encapsulando essas nanopartículas (TTSL-NPM-Ac).

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1. Citotoxicidade *in vitro*

Todas as experiências de cultura de células e dos ensaios de citometria de fluxo foram realizadas obedecendo aos padrões de biossegurança descritos na norma ISO 10993-5 (2009). Todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados e todos os processos de manipulação celular foram realizados dentro de uma cabine de segurança biológica BIOSEG 12, Classe II tipo A1 (Grupo Veco, São Paulo, Brasil). Para o estudo da citotoxicidade das amostras NPM-Ac e TTSL-NPM-Ac, uma cultura de rim embrionário humano, HEK-293 (ATCC[®] CRL-1573[™]), adenocarcinoma de pulmão humano, A549 (ATCC[®] CCL-185[™]), e uma cultura de adenocarcinoma mamário murino, 4T1 (ATCC[®] CRL-1555[™]), foram testadas. Linhagens de baixa passagem e com boas propriedades de adesão, foram cultivadas em frascos de cultura celular apropriados de 150 mL. O meio de cultura usado foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) [4500 mg/L de glicose; 1-glutamina 4M; 11 mg/L de piruvato de sódio; 3,7 g/L de bicarbonato de sódio] adquirido da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil), suplementado com soro fetal bovino (Life Technologies - São Paulo, Brasil) a 10% e estreptomicina 1% (Sigma Aldrich - São Paulo, Brasil). As células foram incubadas na incubadora de CO₂ modelo 311 (Thermo Fisher Scientific Asheville, EUA) com atmosfera controlada (95% de O₂ / 5% de CO₂) e umidade, a 37 °C. Após confluência adequada, aproximadamente 1,0 x 10⁸ células foram transferidas para placas de cultura de células com 12 poços, nas quais permaneceram por 24 horas para completa adesão ao fundo da placa. As amostras foram dispersas em tampão fosfato salino, (pH 7,4) e inoculadas nos poços da placa de cultura. Este procedimento foi seguido para cada linha celular. Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos (n = 2 / grupo):

- (i) solução salina (NaCl 0,9% p/v) (controle negativo)
- (ii) Lipossomas branco (controle);
- (iii) DMSO (controle positivo);
- (iv) TTSL-NPM-Ac (2,8 µg/mL, 3,8 µg/mL, 4,8 µg/mL e 5,8 µg/mL);
- (v) NPM-Ac em 9,8 µg/mL, 28 µg/mL e 150 µg/mL);

Após 48 horas dos tratamentos, a citotoxicidade celular foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo, utilizando o kit de reagentes *Fixable Viability Stain*[®] 450 [FVS450, (BD Biosciences - São Paulo, Brasil)], que foi capaz de discriminar células saudáveis das inviáveis. Para cada amostra, 50.000 eventos foram adquiridos para realizar o tratamento estatístico apropriado.

O estudo morfológico das células foi realizado com o objetivo de avaliar possíveis alterações significativas nas células tratadas ou nas células utilizadas como controle. O procedimento foi realizado sob a microscopia de luz invertidas empregando o equipamento Olympus BX43 equipado com uma câmera DP-73 (Olympus China, Shanghai, China).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de estudos envolvendo a citotoxicidade de nanopartículas de óxido de ferro é crescente nos últimos anos. Porém, devido à grande variabilidade nas características que essas nanopartículas podem apresentar (tamanho, morfologia, composição da superfície, dentre outras), além das células utilizadas e às diferenças nas condições do ensaio, a necessidade de mais informações é de primordial importância para os avanços do uso dessas nanopartículas em sistemas biomédicos. Dessa forma, primeiramente, as nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com ácido cítrico (NPM-Ac) foram testadas em uma linhagem normal (HEK-293) e também em duas linhagens de tumor (A-549 e 4T1). Na sequência, amostras de lipossomas contendo as nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas (TTSL-NPM-Ac) também foram avaliadas e todos os resultados estão apresentados a seguir.

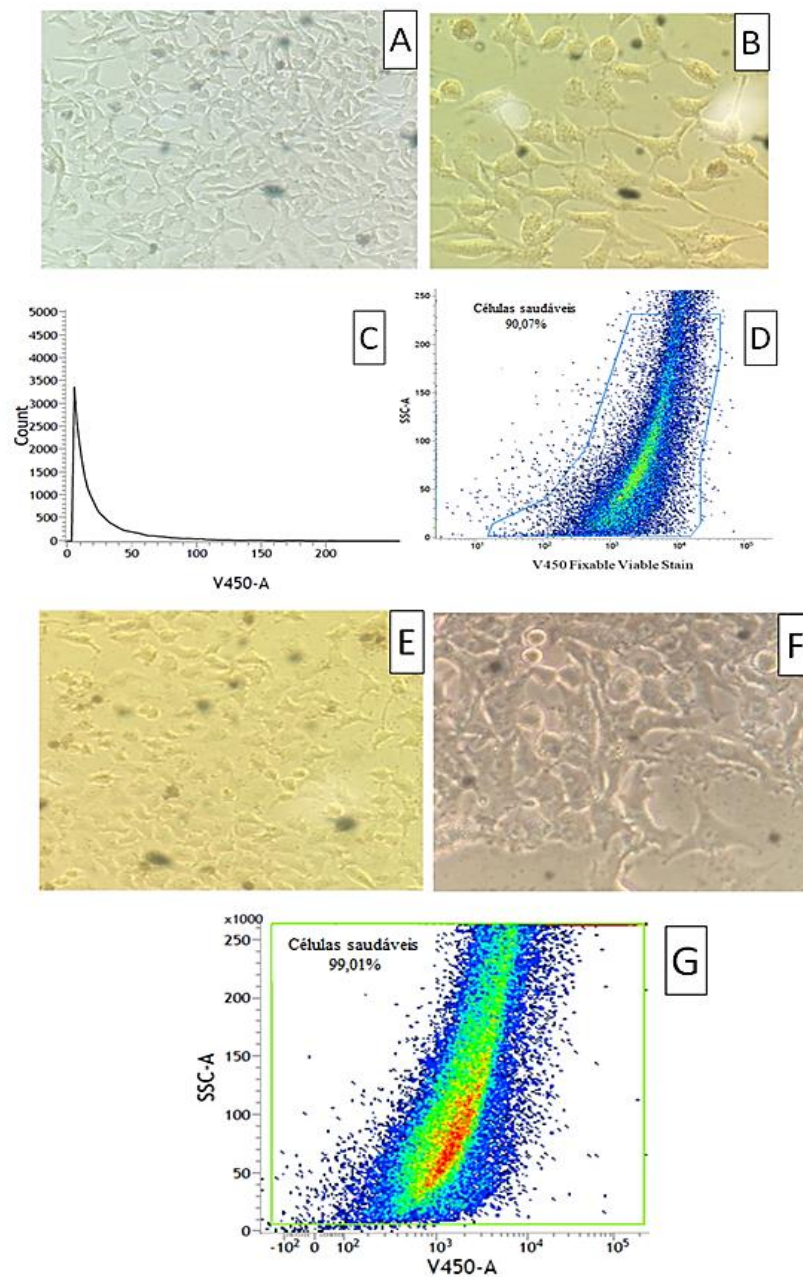
4.4.1 Estudos da citotoxicidade de amostras NPM-Ac

A viabilidade celular das linhagens A549, 4T1 e HEK-293 foi avaliada quando tratadas com três diferentes concentrações de amostras de NPM-Ac (9,8 µg/mL, 28 µg/mL e 150 µg/mL). Nas três linhagens celulares testadas, nas três concentrações de NPM-Ac, não foi observado efeito significativo na viabilidade das células (viabilidade acima de 80%), mostrando não haver relação dose dependente, pelo menos nas condições testadas. De acordo com a literatura e com base no padrão internacional (ISO 10933-5 - Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Ensaio de citotoxicidade *in vitro*), nano materiais que levarem a uma resposta de viabilidade celular mais alta que 70% são considerados não citotóxicos (*in vitro*) (LEONEL, et al., 2019).

Na Figura 28 estão disponíveis os resultados de citotoxicidade para as células A549 e 4T1 tratadas com NPM-Ac na concentração de 150 µg/mL (maior concentração testada). Os dados obtidos revelaram que somente uma população pequena de células não viáveis foi formada após o tratamento de 48h, demonstrando o baixo perfil citotóxico das mesmas. Na Figura 28A e 28B estão disponíveis a micrografia de células A549 não tratadas usada como controle negativo e tratadas por 48h com NPM-Ac na concentração de 150 µg/mL, respectivamente. A similaridade morfológica apresentada pelas células em ambas as micrografias apontam o baixo efeito citotóxico dessa amostra frente a linhagem A549. Tal fato é corroborado pela Figura 28C, onde é observada a presença de um único pico no histograma de emissão V450.

Comportamento similar foi observado nas células 4T1 tratadas com NPM-Ac, Figura 28E e 28F, onde a morfologia em ambas micrografias são semelhantes, não apresentando grande número de células em formato arredondados ou com maior granulosidade, o que evidenciaria a ocorrência de processo de morte. Na Figura 28G, SSC versus V450, também é observado comportamento semelhante ao da linhagem A549, onde se tem uma população de células bem definidas em baixa intensidade de emissão do fluorocromo, evidenciando células viáveis, que nesse caso da linhagem 4T1 foi ainda maior, 92,01%.

Figura 28: Micrografias e gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células 4T1 e A549 tratadas com NPM-Ac na concentração de 150 µg/mL: (A) micrografia células A549 sem tratamento (controle negativo); (B) micrografia células A549 tratadas em uma amplificação de 2000 X; (C) histograma da intensidade de fluorescência V450-FVS para células A549; (D) intensidade de SSC vs V450, obtida a partir da contagem de 50.000 eventos para A549; (E) micrografia células 4T1 sem tratamento (controle negativo); (F) micrografia células 4T1 tratadas em uma amplificação de 2000 X; (G) intensidades SSC vs V450 obtidas a partir da contagem de 50.000 eventos em células 4T1.

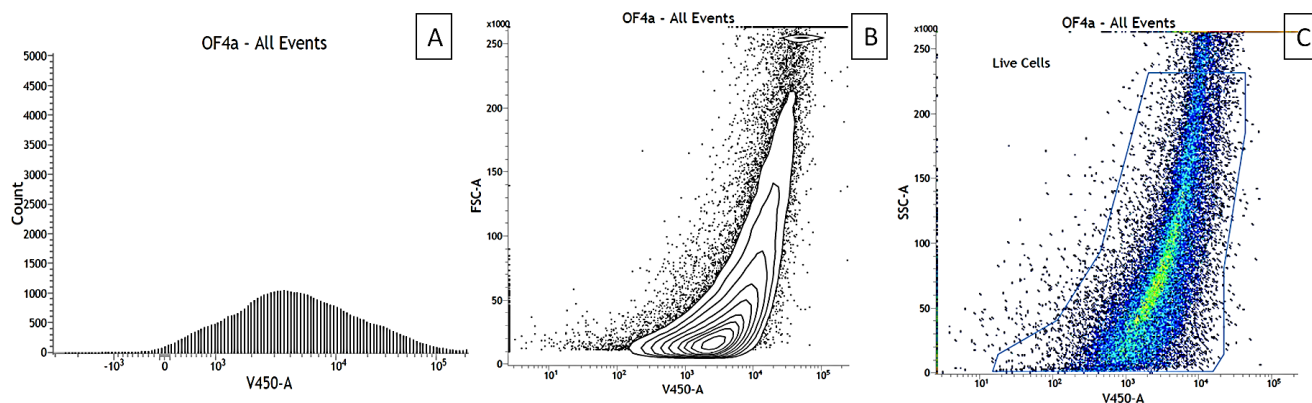


O uso do fluorocromo V450, permite diferenciar células viáveis de não viáveis, esse kit possui um fluorocromo com emissão máxima em 450 nm, o qual reage ligando-se covalentemente às aminas da superfície celular e do meio intracelular. Células em processo de morte apresentam permeabilidade celular alterada, favorecendo assim a difusão do corante para o seu meio intracelular, tendo dessa forma maior taxa de ligação dos corantes às aminas intracelulares nessas células quando comparado a células viáveis impermeáveis. Conseqüentemente, essas células em processo de morte celular apresentam intensidade de fluorescência de 10 a 30 vezes maior em relação às células viáveis, ou seja, quando as células são tratadas com substâncias que podem desencadear processos que resultem em morte celular, a população de células mortas aparece nos histogramas em regiões de intensidade de fluorescência maior. Porém, o que se observa na Figura 28D é apenas uma população bem definida de células, que pela baixa intensidade de emissão pelo fluorocromo, juntamente ao discutido acima, pode ser determinada como células viáveis.

Comportamento semelhante foi observado por Kumar e colaboradores (2016), onde estudaram a citotoxicidade de NPM, de diâmetro hidrodinâmico igual a 25 nm, funcionalizadas com ácido cítrico, em células A549. Eles obtiveram viabilidade celular superior a 95%, mesmo para elevadas concentrações, 400 µg/mL.

Na Figura 29 estão apresentados os resultados de citotoxicidade para as células HEK tratadas com NPM-Ac na concentração de 150 µg/mL (maior concentração testada). Os dados obtidos foram similares ao observado nas células A549 e 4T1, revelando somente uma população pequena de células não viáveis após o tratamento de 48h. Fato demonstrado na Figura 29A, com a presença de um único pico no histograma de emissão V450 e uma população bem definida de células nas Figuras 29B e 29C, que podem ser determinadas como células viáveis, e correspondem a uma porcentagem de 77,10%.

Figura 29: Gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células HEK tratadas com NPM-Ac na concentração de 150 µg/mL: (A) histograma da intensidade de fluorescência V450-FVS para células HEK; (B) e (C) intensidade de FSC vs V450 e intensidade de SSC vs V450, obtida a partir da contagem de 50.000 eventos para HEK, respectivamente.



4.4.2 Estudos de citotoxicidade de amostras TTSL-NPM-Ac

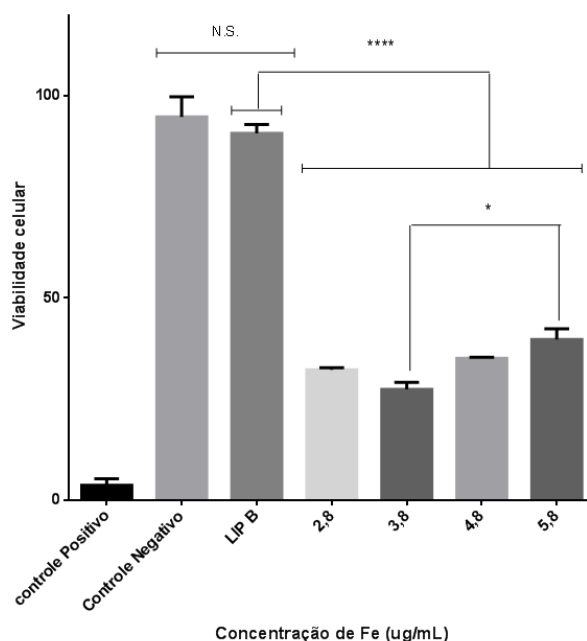
As características físico-químicas dos lipossomas como tamanho, forma, flexibilidade e carga superficial influenciam na internalização desse sistema nas células, de modo a melhorar a biodisponibilidade e reduzir a dose terapêutica e toxicidade do nanomaterial encapsulado (TORCHILIN ET AL., 2005; SCHWENDENER, 2007). Dessa forma, pelo lipossoma ser um sistema carreador que facilita o processo de internalização das NPMs no meio intracelular, a concentração das doses testadas em relação ao óxido de ferro foram baixas, quando comparado a outros estudos que utilizam sistemas com nanopartículas de óxido de ferro (FERREIRA, 2013; LEONEL, et al., 2019).

A viabilidade da linhagem celular 4T1 e A549 foi avaliada quando tratadas por 48 horas com quatro diferentes concentrações da amostra TTSL-NPM-Ac (2,8 µg/mL, 3,8 µg/mL, 4,8 µg/mL e 5,8 µg/mL de ferro total), concentrações essas determinadas em testes preliminares. A comparação estatística entre as porcentagens de viabilidade das concentrações testadas foi realizada por meio de ANOVA e pós-teste de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando o valor de p foi

menor que 0,05. As análises foram realizadas empregando o programa Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Os resultados para a 4T1 seguem representados na Figura 30. Em todas as concentrações examinadas foi encontrada uma redução da viabilidade celular de forma significativa. Pelo gráfico é possível observar também que não há uma relação dose dependente entre a porcentagem de células viáveis e a concentração de ferro. Os resultados revelam que há diferença estatisticamente significativa na porcentagem de morte celular apenas entre as concentrações 3,8 µg/mL e 5,8 µg/mL, apresentando cada uma a viabilidade celular de $27,4 \pm 1,7\%$ e $39,8 \pm 2,6\%$, respectivamente. Ou seja, há aumento de viabilidade quando as células foram tratadas com amostra de 5,8 µg/mL de NPM-Ac. Tal comportamento pode ser associado a ocorrência de aglomerações quando se aumenta a concentração do sistema analisado, diminuindo assim a internalização do mesmo nas células, e consequentemente diminuindo sua atividade citotóxica (FERREIRA, 2013; MEKSERIWATTANA, et al., 2019).

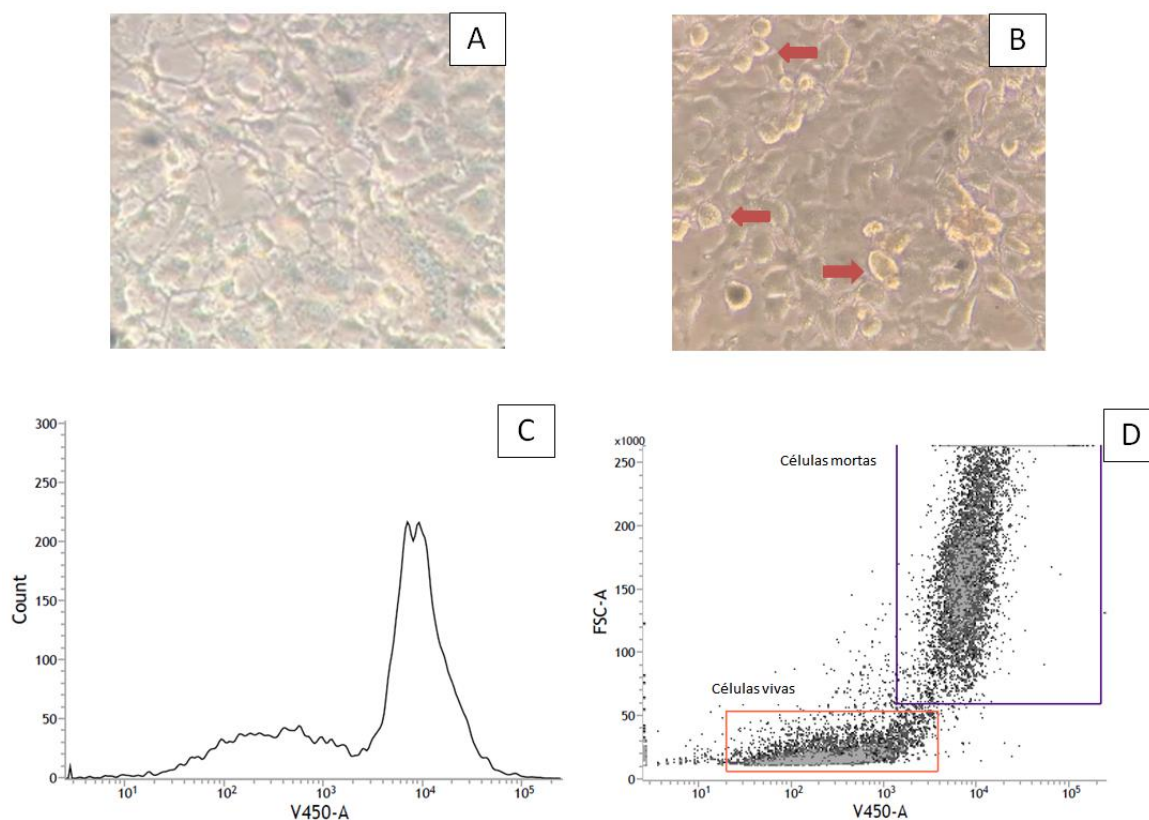
Figura 30: Resultados sobre a viabilidade das células 4T1, determinada por citometria de fluxo, quando tratadas com TTSL-NPM-Ac em diferentes concentrações. NS: não há diferença significativa entre controle negativo e LIP B. LIP B: lipossoma branco. As colunas representam a média \pm DP. Análise estatística revelou que a incubação de 48h com TTSL-NPM-Ac, reduziu significativamente a viabilidade celular em comparação ao controle negativo e/ou lipossomas branco (**** $p < 0,001$). Entre as concentrações testadas, se teve diferença estatística apenas entre as concentrações 3,8 $\mu\text{g/mL}$ e 5,8 $\mu\text{g/mL}$ (* $p < 0,05$).



As micrografias das células 4T1 tratadas com TTSL-NPM-Ac na concentração de 3,8 $\mu\text{g/mL}$, juntamente aos gráficos originados pelo *software* do citômetro de fluxo, seguem apresentados na Figura 31. Na Figura 31A e 31B estão disponíveis as micrografias das células não tratadas e tratadas com TTSL-NPM-Ac, respectivamente. Quando comparado, é possível observar a diferença na morfologia das células, evidenciando que a presença da amostra lipossomal testada por 48 horas, foi citotóxica para a linhagem 4T1. As setas vermelhas na Figura 31B apontam a diferença na morfologia das células, podendo-se observar o caráter arredondado e a diferença na granulometria das mesmas, o que ocorrer em culturas que estão em processo de morte. Os resultados obtidos pela citometria de fluxo estão representados na Figura 31C e 31D. Na primeira se tem um histograma que apresenta dois picos com intensidades diferentes, evidenciando assim duas populações distintas, uma

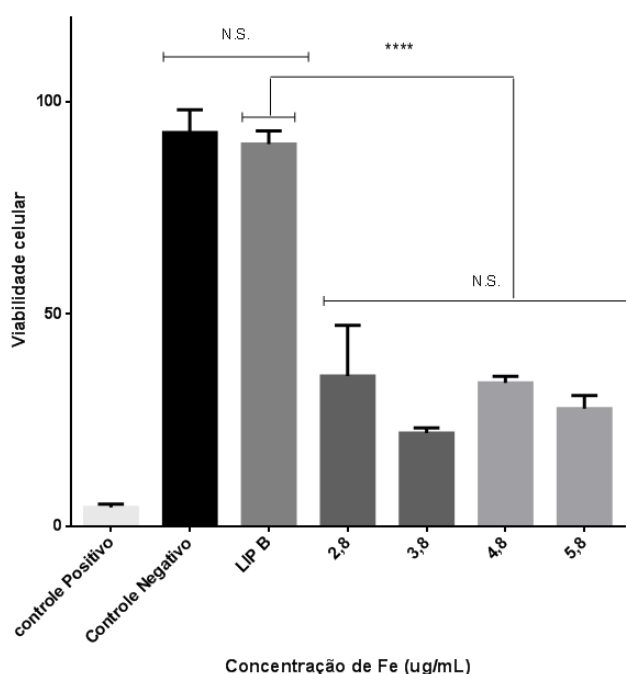
de células saudáveis com pico característico em torno da intensidade de 10^3 , e um na intensidade de 10^4 , uma intensidade de fluorescência 10 vezes maior, que como já mencionado pode ser atribuída a células mortas ou em apoptose/necrose. Essas mesmas duas populações distintas das células 4T1 são confirmadas pela Figura 31D, onde os parâmetros FSC versus V450-FVS revelaram uma porcentagem importante de células mortas. A análise estatística dessas duas populações revelou $72,6\% \pm 1,2$ de células mortas ou em apoptose/necrose.

Figura 31: Micrografias e gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células 4T1 tratadas com TTSL-NPM-Ac na concentração de $3,8 \mu\text{g/mL}$. (A) micrografia células sem tratamento (controle negativo); (B) micrografia células tratadas em uma amplificação de 2000 X; (C) histograma da intensidade de fluorescência V450-FVS e (D) intensidade de FSC vs V450, obtida a partir da contagem de 50.000 eventos.



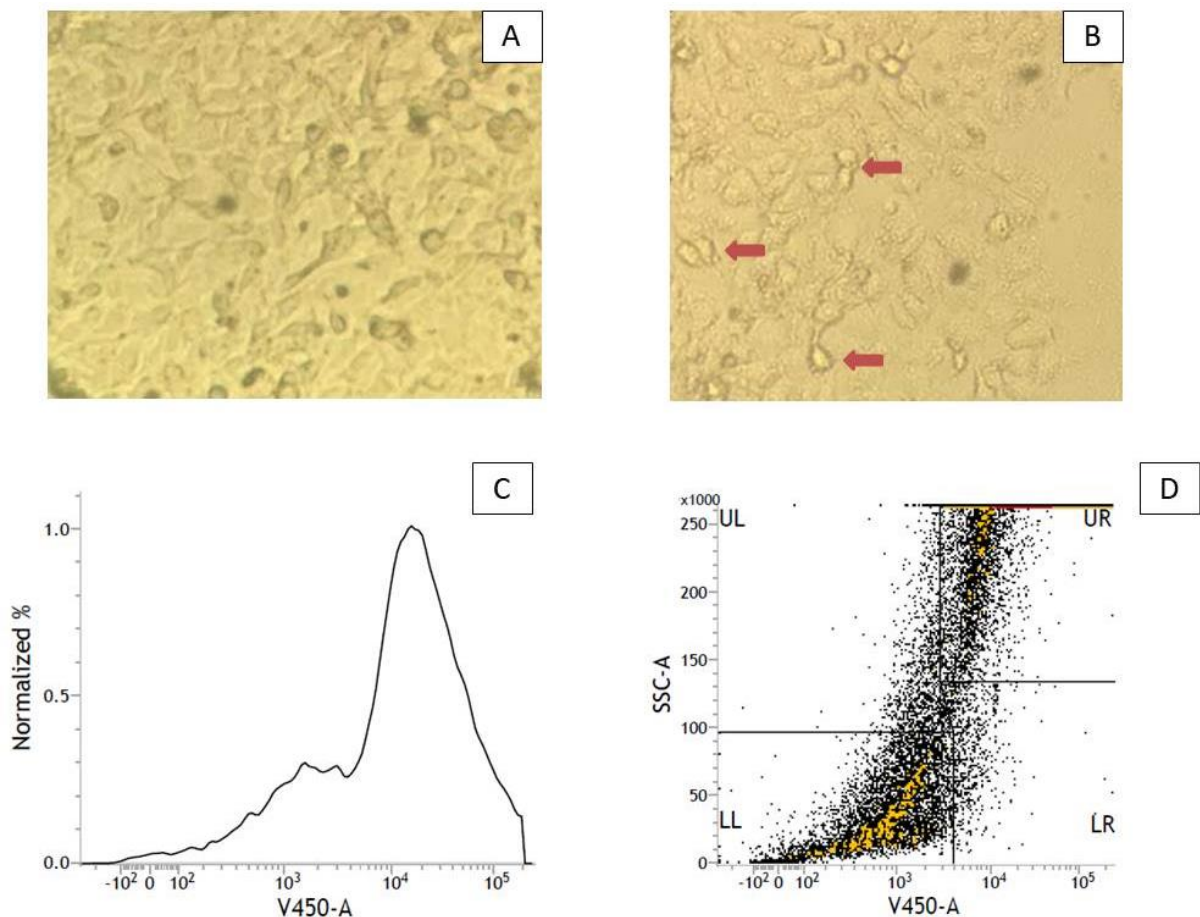
A viabilidade da linhagem A549 foi avaliada nas mesmas condições que a linhagem 4T1: incubada com quatro diferentes concentrações de amostras de TTSL-NPM-Ac (2,8 µg/mL, 3,8 µg/mL, 4,8 µg/mL e 5,8 µg/mL de ferro total), por 48 horas. Os resultados seguem representados na Figura 32. É possível observar pelo gráfico que em todas as concentrações examinadas foi encontrada uma redução da viabilidade celular de forma expressiva. A análise estatística nesse caso mostrou não haver diferença significativa entre as quatro concentrações testadas e a diminuição da viabilidade celular, ou seja, independente da concentração testada, grupo de menor concentração (2,8 µg/mL) e no de maior concentração (5,8 µg/mL), o comportamento da amostra na viabilidade celular foi semelhante. Um resultado diferente do encontrado para a linhagem 4T1. Porém, como já mencionado, o estudo de citotoxicidade envolve muitas variáveis, sendo comum comportamentos diferentes em linhagens celulares distintas.

Figura 32: Resultados sobre a viabilidade das células A549, determinada por citometria de fluxo, quando tratadas com TTSL-NPM-Ac em diferentes concentrações. NS: não há diferença significativa entre controle negativo e LIP B. LIP B: lipossoma branco. As colunas representam a média ± DP. Análise estatística revelou que a incubação de 48h com TTSL-NPM-Ac, reduziu significativamente a viabilidade celular em comparação ao controle negativo e/ou lipossomas branco (**** p <0,001).



Na Figura 33 estão apresentados os resultados obtidos pela citometria e micrografia, de células A549 tratadas com TTSL-NPM-Ac na concentração de 3,8 µg / mL. Na Figura 33A e 33B se tem a comparação das micrografias sem tratamento e tratadas com TTSL-NPM-Ac respectivamente, onde na última as setas vermelhas evidenciam as diferenças na morfologia das células. É possível observar também por toda micrografia da Figura 33B, presença de fragmentos celulares e diferença na granulosidade, indicando assim células mortas ou apoptóticas/necróticas. O histograma disponível na Figura 33C revela a presença de dois picos em intensidades distintas. Como o fluorocromo se liga às amins presentes na membrana plasmática de células viáveis, as células viáveis apresentam baixa intensidade de fluorescência, e as células tratadas com substâncias que podem desencadear processos que resultem em morte celular, aparecem nos histogramas em regiões de intensidade de fluorescência maior. Na Figura 33D, SSC versus V450-FVS, é possível observar também a presença de duas populações distintas, onde a análise estatística dessas populações foram feitas e mostrou uma porcentagem de $76,3\% \pm 1,7$ de células mortas ou apoptóticas / necróticas.

Figura 33: Micrografias e gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células A549 tratadas com TTSL-NPM-Ac na concentração de 3,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (A) micrografia células sem tratamento (controle negativo); (B) micrografia células tratadas em uma amplificação de 2000 X; (C) histograma da intensidade de fluorescência V450-FVS e (D) intensidade de SSC vs V450, obtida a partir da contagem de 50.000 eventos.



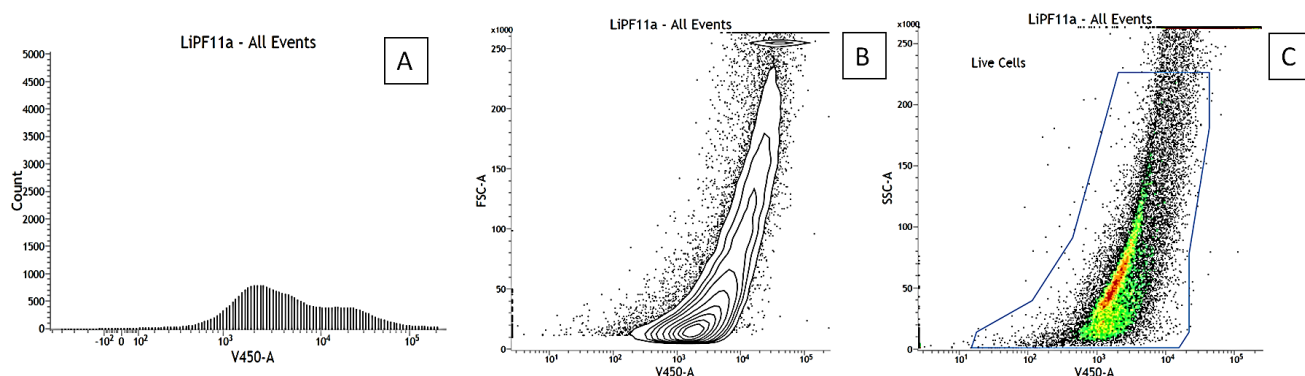
Com os resultados apresentados acima, onde foi observado citotoxicidade significativa apenas nas células tratadas com TTSL-NPM-Ac, e não nos experimentos com NPM-Ac, pode-se dizer que essa citotoxicidade está relacionada as nanopartículas de óxido de ferro, porém apenas se as mesmas estiverem encapsuladas nos lipossomas. Essa maior atividade das NPM-Ac encapsuladas em lipossomas em comparação com a forma livre pode estar relacionado as vesículas ter facilitado o acesso intracelular, e assim desencadear processos que leva as células a morte. Mekseriwattana e colaboradores (2019) estudaram a estabilidade de NPM revestidas com ácido cítrico em diferentes

meios, onde um desses foi DMEM com soro bovino fetal, como no presente trabalho, e relacionaram essa estabilidade com a captação e a viabilidade celular da linhagem MCF-7. Eles observaram que proteínas no meio de cultura podem se ligar as NPM e alterar sua estabilidade, resultando potencialmente em diferentes comportamentos celulares e citotoxicidade, onde a adição de soro bovino fetal ao meio aumentou a viabilidade celular para valores maiores que 80%. Esses resultados demonstram que as proteínas podem reduzir a toxicidade das NPM, e os autores relacionaram ao fato das mesmas alterarem as propriedades da superfície das nanopartículas e assim influenciar no processo de endocitose. Ao reduzir a captação celular se tem menor toxicidade. Além disso, as NPM serem internalizadas pelas células através da endocitose resulta na encapsulação das mesmas nos endossomos/lisossomos. E devido à natureza ácida desses compartimentos subcelulares, as nanopartículas podem ser degradadas não conseguindo assim ter contato com o citoplasma e desencadear reações tóxicas a célula (Anastasia, et. al., 2016).

Já quando as NPM então encapsuladas nos lipossomas termosensíveis, o que irá interferir na captação celular são as propriedades superficiais do lipossoma. Esses, devido à semelhança com a membrana celular, podem sofrer fusão com a mesma liberando o conteúdo encapsulado no citoplasma, comportamento observado em lipossomos unilamelares (Kube, et. al., 2017). Como já mencionado, o método de formulação lipossomal usado nesse trabalho, somado ao processo de extrusão, permite obter lipossomas unilamelares. Dessa forma, a citotoxicidade observada em ambas as linhagens quando tratadas com TTSL-NPM-Ac, e não observada quando tratadas com NPM-Ac, pode também estar relacionada a diferença na captação celular desses nanomateriais.

Para investigar a seletividade do tratamento proposto neste estudo, a citotoxicidade também foi avaliada em uma linhagem celular saudável (HEK-293). Os resultados obtidos seguem representados na Figura 34. É observado que uma porcentagem importante de células permaneceu viáveis, após ser submetida ao mesmo protocolo de tratamento onde um número significativo de células 4T1 e A549 foram conduzidas a morte. Na Figura 34B, é possível observar uma segunda população na região superior do gráfico, que pode ser atribuída as células não viáveis, porém essa população representa uma porcentagem menor que 11%.

Figura 34: Gráficos de citometria de fluxo obtidos a partir de células HEK-293 tratadas por 48 horas com TTSL-NPM-Ac com concentração de ferro igual a 3,8 $\mu\text{g/mL}$: (A) histograma da intensidade de fluorescência de V450 para as células tratada; (B) FSC versus V450-FVS e (C) SSC versus V450-FVS, obtido a partir da contagem de 50.000 eventos.



Frente aos resultados de citotoxicidade apresentados, pode-se dizer que o sistema proposto nesse trabalho apresenta seletividade em relação às culturas celulares estudadas, uma vez que o sistema lipossomal contendo óxido de ferro nanoparticulado mostrou citotoxicidade apenas nas linhagens 4T1 e A549. Mais estudos são necessários para identificar os mecanismos envolvidos na diminuição da viabilidade celular e consequente seletividade.

Carneiro e colaboradores (2011) estudaram complexos de citrato de ródio (II) com NPM, e verificaram que esse sistema são mais específicos e citotóxicos para as células cancerígenas (células mamárias do carcinoma MCF-7 e 4T1) do que as células normais (MCF-10A) e em doses inferiores ao citrato de ródio livre (II). Os autores atribuíram esse comportamento de seletividade a um metabolismo mais rápido e, portanto, a uma maior absorção de micronutrientes, como o ferro, nas células cancerígenas.

O processo de morte celular por ferroptose requer ferro celular abundante e acessível, o que se acredita alcançar usando lipossomas para carrear as NPM-Ac para o meio intracelular (Yang; Stockwell, 2016). Sob condições normais, o lipídio oxidado resultante de interações com espécies reativas de oxigênio geradas pelo ferro normalmente presente no meio intracelular, pode ser convertida em álcoois lipídicos não tóxicos pela glutatona peroxidase 4 (GPX4). Já quando se tem excesso de íons de ferro ou GPX4 disfuncional, os peróxidos lipídicos podem atingir um nível

citotóxico que eventualmente inicia a ferroptose. Como as células cancerígenas já estão fortemente sobrecarregadas com estresse oxidativo devido a elevados processos metabólicos ativos, que se manifestam como peróxido de hidrogênio elevado (H_2O_2) no microambiente tumoral, prevê-se que essas células sejam hipersensíveis à captação desregulada de íons de ferro, causando superprodução de EROs, e à inativação de GPX4, prejudicando a tolerância celular a danos oxidativos (BI, et al., 2019; WHANG, et al., 2019; YANG, et al., 2014).

Vários genes ou proteínas responsáveis pela regulação do metabolismo do ferro e EROs têm sido implicados na ferroptose, mas os mecanismos para induzir e regular a ferroptose nas células cancerígenas ainda estão sendo explorados (Ma, et al., 2016). Esse processo de morte celular provou ser eficaz em células cancerígenas com alto nível de atividade da via RAS-RAF-MEK ou expressão de p53 (CAO; DIXON, 2016). A proteína p53 demonstra inibir a eliminação intracelular de EROs e sensibilizar as células à ferroptose (JIANG, et al., 2015). Em 1997, Mukhopadhyay e Roth conduziram um estudo em que detectaram um alto nível de p53 nas células A549, podendo ser esse o motivo da toxicidade apresentada por essa linhagem celular. Porém, são necessários outros experimentos para se compreender melhor os mecanismos envolvidos.

4.5 CONCLUSÃO

As nanopartículas de óxido de ferro têm várias aplicações no campo biomédico, sendo dessa forma necessário entender e avaliar sua toxicidade. Nesse capítulo do trabalho foi avaliado a citotoxicidade da formulação lipossomal termossensível contendo as nanopartículas de óxido de ferro. Os resultados obtidos por citometria de fluxo revelou que as amostras NPM-Ac, mesmo em elevada concentração, não apresentam toxicidade para as linhagens celulares testadas (4T1, A549 e HEK-293). Já quando encapsuladas em lipossomas essas nanopartículas passam a ser tóxicas para as células tumorais. Os lipossomas aumentam a biodisponibilidade dessas nanopartículas no meio intracelular de modo a desencadear mecanismos que diminuem a viabilidade das células. Já quando testadas em linhagem celular sadia, a formulação lipossomal não apresentou toxicidade as células, revelando um caráter seletivo do sistema desenvolvido.

Apesar de já apresentarem elevada citotoxicidade frente a linhagens tumorais, o sistema lipossomal desenvolvido nesse trabalho possui propriedades que não foram exploradas, como o

possível superparamagnetismo das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas. Diversos trabalhos na literatura estudam a capacidade dessas nanopartículas levar às células a morte por hipertermia. Somado aos resultados já encontrados nesse trabalho, pesquisas futuras podem ser desenvolvidas avaliando o efeito sinérgico que esse sistema pode desencadear aumentando sua citotoxicidade a células tumorais.

4.6 REFERÊNCIAS

ABDESSELEM, M.; RAMODIHARILAFY, R.; DEVYS, L. et al. Fast quantitative ROS detection based on dual-color single rare-earth nanoparticle imaging reveals signaling pathway kinetics in living cells. *Nanoscale*, v. 9, p. 656-665, 2017.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. ET AL. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed., Garland Science: New York, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244961/>>. Acesso em: 10 de setembro de 2019.

ANASTASIA K. H.; MIHAIL I. M.; EMILY F. D. et al. Targeted iron oxide nanoparticles for the enhancement of radiation therapy. *Biomaterials*, v. 105, p.127-135, out. 2016.

BI, J.; YANG, S., LI, L. et al. Metadherin enhances vulnerability of cancer cells to ferroptosis. *Cell Death & Disease*, v. 10, n. 10, p.651-682, 17 set. 2019.

BRUXEL, F., LAUX, M., WILD, L. B. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Química Nova*, v. 35, n. 9, p. 1827 – 1840, 2012.

CAI, H.; AN, X.; CUI, J. et al. Facile hydrothermal synthesis and surface functionalization of polyethyleneimine-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *ACS Appl. Mater. v. 5*, p. 1722–1731, 2013.

CAO, J. Y.; DIXON, S. J. Mechanisms of ferroptosis. *Cellular And Molecular Life Sciences*, v. 73, n. 11-12, p.2195-2209, abr. 2016.

CARNEIRO, M.L.; NUNES, E.S.; PEIXOTO, R.C. et al. Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. *Journal Of Nanobiotechnology*, v. 9, n. 1, dec. 2011.

CHAVES, N. L.; LOPIS, I.; BÖTTNER, J. ET AL. Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells. *International Journal Of Nanomedicine*, v. 12, p.5511-5523, ago. 2017.

- DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 355, n. 1 – 2, p, 19 – 30, 2008.
- DIXON, S. J.; LEMBERG, K. M.; LAMPRECHT, M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, v. 149, n. 5, p. 1060-1072, 2012.
- FERREIRA, R. V. Síntese e caracterização de magnetolipossomas termossensíveis contendo fármacos antitumorais encapsulados. 2013. 186 p. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Belo Horizonte, 2013.
- GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN P.; VITALE, L et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation*, v. 22, n. 1, p.58-73, set. 2014.
- GHASEMPOUR, S.; AliShokrgozar, M.; Ghasempour, R. et al. Investigating the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro studies. *Experimental And Toxicologic Pathology*, v. 67, n. 10, p.509-515, out. 2015.
- HARRIS, T. J.; GREEN, J. J.; FUNG, P. W. et al. Tissue-specific gene delivery via nanoparticle coating. *Biomaterials*, v. 31, n. 5, p. 998 – 1006, 2010.
- HILLAIREAU, H.; COUVREUR, P. Nanocarriers entry into the cell: Relevance to drug delivery. *Cell Mol. Life Sci*, v. 66, p. 2873–2896, 2009.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009. 24p. Disponível em: <<http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>>. Acesso em: 15 de setembro de 2019.
- JIANG, L.; KON, N.; LI, T. ET AL. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature*, v. 520, p. 57– 62, apr. 2015.
- KERINS, M. J.; OOI, A. The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis. *Antioxid Redox Signal*, v. 29, p. 1756-1773, 2018.
- KHALID, K. M.; ASAD, M.; HENRICH-NOACK, P. et al. Evaluation of Toxicity and Neural Uptake In Vitro and In Vivo of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 19, n. 9, p.2613-2627, set. 2018.
- KUBE, S.; HERSCH, N.; NAUMOVSKA, E. ET AL. Fusogenic Liposomes as Nanocarriers for the Delivery of Intracellular Proteins. *Langmuir*, v. 33, p. 1051–1059, 2017.
- KUMAR, P.; AGNIHOTRI, S. Synthesis of Dox Drug Conjugation and Citric Acid Stabilized Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles for Drug Delivery. *Biochemistry & Physiology: Open Access*, v. 01, n. 05, 2016.

LATUNDE-DADA, G. O. Ferroptosis: role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.*, v. 1861, p. 1893–1900, 2017.

LEONEL, A. G; MANSUR, H. S.; MANSUR, A. ET AL. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles/carboxymethyl cellulose core-shell nanohybrids for killing cancer cells in vitro. *International Journal Of Biological Macromolecules*, v. 132, p.677-691, jul. 2019.

MEKSERIWATTANA, W.; SRISUK, S.; KRIANGSAKSRI, S. ET AL. The Impact of Serum Proteins and Surface Chemistry on Magnetic Nanoparticle Colloidal Stability and Cellular Uptake in Breast Cancer Cells. *Aaps Pharmscitech*, v. 20, n. 2, p.55-64, jan. 2019.

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; INMAN, A. ET al. Oxidative Stress and Dermal Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles In Vitro. *Cell Biochemistry And Biophysics*, v. 67, n. 2, p.461-476, jun. 2013.

PRIJIC, S.; SCANCAR, J.; ROMIH, R. ET al. Increased Cellular Uptake of Biocompatible Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles into Malignant Cells by an External Magnetic Field. *The Journal Of Membrane Biology*, v. 236, n. 1, p.167-179, jul. 2010.

SCHWENDENER, R. A. Liposomes in biology and medicine. In: *Bio-Applications of Nanoparticles*. Warren C. W. Chan, v. 620, p. 117-128, 2007.

SHAPIRO, H.M., 2003, *Practical flow cytometry*. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons. Disponível em: https://ia601608.us.archive.org/23/items/PracticalFlowCytometryShapiro/Practical%20Flow%20Cytometry_Shapiro.pdf. Acesso em: 13 de setembro de 2019.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 145-160, 2005.

VALDIGLESIAS, V.; KILIÇ, G.; COSTA, C. et al. Effects of iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, v. 56, n. 2, p.125-148, 11 set. 2014.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparatation and characterization of lipossomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm Acta Helv.* v. 70, p.95-111, 1995.

WANG, S.; LIAO, H.; LI, F.; LING, D. A mini-review and perspective on ferroptosis-inducing strategies in cancer therapy. *Chinese Chemical Letters*, v. 30, n. 4, p. 847-852, 2019.

YANG, W. S.; SriRamaratnam, R.; Welsch, M. E. et al. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell*, v. 156, n. 1-2, p.317-331, jan. 2014.

YANG, W.S.; SRIRAMARATNAM, R.; WELSCH, M.E. Regulation of ferroptotic cancer cell death by gpx4. *Cell*, v. 156, p. 317-331, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho buscou desenvolver um sistema seletivo com potencial para tratamento de tumores. Esse sistema composto por lipossomas e nanopartículas de óxido de ferro, apresentou importantes e satisfatórias propriedades físicas, químicas e citotóxicas, demonstrando ser um promissor sistema para a aplicação pretendida. Dessa forma se pode dizer que a metodologia utilizada em cada etapa foi eficaz. Muitas propriedades desse sistema carreador podem ainda ser exploradas, como encapsulamento conjunto das nanopartículas de óxido de ferro e algum fármaco quimioterápico, além das propriedades magnéticas das nanopartículas. Ainda, algumas características do mesmo deve ser melhor estudadas, como sua estabilidade e teor de nanopartículas encapsulada. Apesar disso, os resultados alcançados mostraram ser satisfatórios e relevantes, cumprindo o objetivo do estudo, de se obter um nanomaterial de citotoxicidade seletiva frente a células tumorais.

PERSPECTIVAS

- Realizar estudos de citotoxicidade aplicando campo magnético alternado, avaliando o efeito sinérgico da hipertermia;
- Avaliar as vias de internalização e mecanismos de morte dos TTSL-NPM-Ac nas células;
- Aumentar a quantidade de nanopartículas de óxido de ferro encapsulado nos lipossomas variando parâmetros da metodologia na etapa de hidratação do filme lipídico;
- Melhorar o tempo de estabilidade da formulação, estudando outros meios de armazenagem;
- Avaliar o efeito citotóxico encapsulando juntamente as nanopartículas de óxido de ferro e um fármaco quimioterápico.