



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

CAROLINA DE LIMA E MOURA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONAIS À
BASE DE CERA DE CARNAÚBA COM POTENCIAL APLICAÇÃO
TERAGNÓSTICA**

FORTALEZA

2017

CAROLINA DE LIMA E MOURA

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONAIS À
BASE DE CERA DE CARNAÚBA COM POTENCIAL APLICAÇÃO TERAGNÓSTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo
Coorientador: Dr. Manuel Bañobre-Lopez

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M885n Moura, Carolina de Lima e.
Nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas multifuncionais à base de cera de carnaúba com potencial aplicação terapêutica / Carolina de Lima e Moura. – 2017.
112 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.
Coorientação: Prof. Dr. Manuel Banobre-Lopez.
1. Cera de carnaúba. 2. Nanopartícula lipídica sólida magnética (NLSM). 3. Hipertermia magnética (HM). 4. Imagem por ressonância magnética (IRM). 5. Magnetita. I. Título.

CDD 540

CAROLINA DE LIMA E MOURA

NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MAGNÉTICAS MULTIFUNCIONAIS À
BASE DE CERA DE CARNAÚBA COM POTENCIAL APLICAÇÃO TERAGNÓSTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: 24/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. César Liberato Petzhold
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS)

Dr. Mateus Borba Cardoso
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

Profa. Dra. Tamara Gonçalves Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha mãe Solange.

Aos meus avós Liberty e Gastão (*in
memoriam*).

Ao meu companheiro Helber.

Aos meus irmãos Karla e Gastão Neto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades que me foram concedidas e por estar sempre presente em minha vida. Só tenho a agradecer. Muitíssimo obrigada!

Aos meus avós Liberty e Gastão (in memoriam), à minha mãe Solange, ao Eduardo e aos meus irmãos Karla e Gastão Neto, que ajudaram a realizar as minhas conquistas.

Ao meu companheiro Helber (*grande amor da minha vida*) que é uma pessoa excepcional a quem tive o privilégio de conhecer e de fazer parte da sua vida. Sempre me apoiou e incentivou desde quando nos conhecemos no colégio e, desde então, tem sido indispensável em todas as áreas de minha vida.

Aos meus amigos desde o colégio: Edvaldo, Ana Aline, Renata e Junior.

A todos da minha família que sempre me apoiaram e que estiveram presente em todas as minhas dificuldades e conquistas.

À professora Nágila pela orientação, paciência e incentivo. Pelo apoio e contribuição na minha formação e principalmente, por acreditar em meu potencial.

A minha amiga, Elenir, pela coorientação, convivência, alegrias e dificuldades compartilhadas. Por todos os conhecimentos transmitidos, amizade e paciência.

Ao José Roberto pela imensa cumplicidade e amizade que teve comigo. Sempre ao meu lado me ajudando em tudo, muito obrigada “Robertito”!

A Francisca, Anida e Paloma, pelo afeto, apoio e amizade que recebi dessas três grandes mulheres inteligentes.

Ao Célio Renovato (*Celinho*), pela amizade, afeto, ternura e respeito que sempre teve comigo.

Ao Rafael Almeida pela amizade, atenção e imensa colaboração para que esse trabalho fosse desenvolvido.

Aos professores Pierre, Sandra, Nadja, Otília e aos amigos do LabPIM, Ethaniêda Lima, Lillian Dutra, Deyse Maya, Débora Brito, Camila Peixoto, Aiêrta da Silva, Arcelina Pacheco, Flávia Uchôa, Carolina Barbosa, Luana, Kelly e a quem mais tenha esquecido de mencionar.

Agradecer ao Dr. Manuel Bañobre que gentilmente me recebeu em seu grupo de pesquisa no International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL) me ajudando e auxiliando no que fosse preciso para o desenvolvimento desse trabalho. Agradecer em especial ao Juan Gallo pela amizade e atenção desde o primeiro dia

que estive no INL e também por ter feito o papel de “coorientador estrangeiro” acreditando e fazendo com que esse trabalho fosse realizado.

Aos colegas e toda a equipe técnica do INL. Em especial aos parceiros de laboratório Noelia Guldris, José Manuel e Renato Grillo pela amizade.

A Sheila Contant pela amizade e carinho que sempre teve comigo.

Ao professor Dr. Danilo Queiroz pela amizade, atenção e principalmente pelo companherismo em Portugal.

Ao Sr. Paulo pelo carinho, amizade, respeito e sorrisos que me proporcionou no INL.

Aos meus amigos Milton, Natália Dantas, Nayara Syndel, Kaline, Gilmara, André Luis, pela grande amizade que se iniciou na graduação.

Célia e ao Orlando por sempre demonstrarem-se disponíveis em ajudar quando eu precisasse.

À UFC por oferecer toda a infraestrutura disponível e a CAPES pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de doutorado.

A quem mais não me recorde agora, mas que tenha ajudado a me manter seguindo sempre em frente: MEU SINCERO AGRADECIMENTO!!

“Árvore da vida - Feliz é a pessoa que encontrou a sabedoria e alcançou o entendimento”

Provérbios: 3

“É somente através da ajuda mútua e das concessões recíprocas que um organismo agrupando indivíduos em número grande ou pequeno pode encontrar sua harmonia plena e realizar verdadeiros progressos.”

Jigoro Kano

RESUMO

Os materiais magnéticos nanoestruturados, constituídos por óxidos de ferro, já estão sendo utilizados em procedimentos de diagnósticos e tratamento de pacientes. Dentre as utilizações estão o diagnóstico por ressonância magnética nuclear, tratamento por hipertermia magnética e carregamento de bioativos. Os nanossistemas magnéticos podem ser utilizados em tratamento de hipertermia magnética mesmo sem a incorporação do fármaco, pois o combate ao tumor é feito pelo acréscimo de temperatura no local, um aumento de 5 °C acima da temperatura corpórea é suficiente para matar um tumor sem afetar as células vizinhas. Realizou-se um procedimento de fusão-emulsificação para formular nanopartícula lipídica sólida (NLS) e nanopartícula lipídica sólida magnética (NLSM) à base de cera de carnaúba e Fe₃O₄@AO em diferentes concentrações. Através do espalhamento de luz dinâmico (DLS) foi possível obter o tamanho médio de partícula que variou de 150,77 a 182,17 nm e o potencial zeta que atingiu valores bastante negativos -53,35 a -59,75 mV, evidenciando uma alta estabilidade física do sistema. A incorporação do óxido de ferro pela matriz lipídica sólida, preferencialmente no núcleo das nanopartículas, foi observada através das micrografias da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As imagens de MET e de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitiram analisar morfologicamente o material, revelando uma forma esférica adquirida pelas NLS e NLSMs. No ensaio de Hipertermia Magnética (HM) as NLSMs 3%, 5% e 7% geraram um aumento de temperatura satisfatório, uma vez que, em 10 minutos os sistemas atingiram um acréscimo de 7,59, 9,18 e 13,4 °C, respectivamente. Observou-se que a liberação do fármaco por HM exibiu melhores resultados que o método sem aplicação do campo magnético. A taxa de relaxação transversal das NLSMs para um campo de 3T foram de 864,18 a 930,35 mM(Fe)⁻¹s⁻¹, o que claramente traduz em um agente de contraste escuro para serem usados em imagem por ressonância magnética (IRM). Observa-se que a NLSM 7% traduz uma imagem mais escura que as demais NLSMs, devido sua maior concentração de óxido de ferro. As NLSMs mostraram potencial aplicação em hipertermia magnética e IRM. Os resultados são bastante promissores para o desenvolvimento para fins terapêuticos.

Palavras-chaves: Cera de carnaúba. Nanopartícula Lipídica Sólida Magnética (NLSM). Hipertermia magnética (HM). Imagem por ressonância magnética (IRM). Magnetita.

ABSTRACT

The nanostructured magnetic materials, made up of iron oxides, are already used in procedures for the diagnosis and treatment of patients. Among the uses are the diagnosis by nuclear magnetic resonance, treatment by magnetic hyperthermia and bioactive loading. Magnetic nanosystems can be used in the treatment of magnetic hyperthermia even without the incorporation of the drug, since the fight against the tumor is done by increasing the temperature in the place, an increase of 5 °C above the body temperature is sufficient to kill a tumor without affecting the Neighboring cells. A melt-emulsification procedure was performed to formulate solid lipid nanoparticle (SLN) and magnetic solid lipid nanoparticle (MSLN) based on carnauba wax and Fe₃O₄@AO in different concentrations. Through the Dynamic Light Scattering (DLS) it was possible to obtain the average particle size ranging from 150.77 to 182.17 nm and the zeta potential that reached very negative values -53.35 to -59.75 mV, high physical stability of the system. The incorporation of iron oxide by the solid lipid matrix, Preferably in the nucleus of the nanoparticles, was observed through the micrographies of the Transmission Electron Microscopy (TEM). The images of TEM and Scanning Electron Microscopy (SEM) allowed analyzing the material morphologically, revealing a spherical shape acquired by the SLN and MSLNs. In the Magnetic Hyperthermia (HM) test as NLSMs 3%, 5% and 7% generated a satisfactory temperature increase, since, in 10 minutes in the systems driven by an increase of 7.59, 9.18 and 13.4 °C, respectively. It was observed that the release of the drug by HM showed better results than the method without application of the magnetic field. The transverse relaxation rate of SLNMs for a 3T field was 864.18 to 930.35 mM (Fe)⁻¹s⁻¹, which clearly translates into a dark contrast agent for use in Magnetic Resonance Imaging (MRI). It should be noted that the MSLN 7% translates a darker image than the other MSLNs, due to its higher concentration of iron oxide. The MSLNs showed potential application in magnetic hyperthermia and MRI. The results are quite promising for development for therapeutic purposes.

Keywords: Carnauba wax. Magnetic Solid Lipid Nanoparticle (MSLN). Magnetic Hyperthermia (MH). Magnetic Resonance Imaging (MRI). Magnetite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Áreas de aplicação da nanotecnologia.....	15
Figura 2 -	Imagem ilustrativa das NPMs em diagnóstico e tratamento.....	16
Figura 3 -	Escala manométrica.....	17
Figura 4 -	Nanopartícula Lipídica Sólida (NLS).....	20
Figura 5 -	Imagem ilustrativa do comportamento dos materiais magnéticos.....	22
Figura 6 -	Estrutura cristalina da magnetita (cúbica de espinélio invertido).....	24
Figura 7 -	Ilustração de uma curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para materiais superparamagnético.....	24
Figura 8 -	Ilustração de uma curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para materiais: diamagnético, paramagnético, antiferromagnético e ferromagnético.....	25
Figura 9 -	Ilustração de uma curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para materiais ferromagnéticos.....	26
Figura 10 -	Ilustração da relaxação de Néel e Brown.....	29
Figura 11 -	Figura: Imagem ilustrativa do procedimento em hipertermia magnética. As nanopartículas são injetadas via intravenosa e então é aplicado um campo magnético alternado na região de tumor, para gerar o aquecimento.....	31
Figura 12 -	Imagem do equipamento de hipertermia magnética.....	32
Figura 13 -	Eixos de coordenadas usadas em IRM e o vetor momento magnético (μ) associado.....	34
Figura 14 -	a) imagem ponderada em T_2 e b) imagem ponderada em T_1	36
Figura 15 -	Auxemma onocalyx Taub (pau branco). a) Árvore, b) Flor e c) Fruto.....	37
Figura 16 -	Estrutura química da onocalyxona A.....	38
Figura 17 -	As diversas aplicações das partes constituintes da carnaubeira. a) Caule; b) Fruto; c) Raiz e d) Folha.....	39
Figura 18 -	Produtos que contém cera de carnaúba. a) Eletrônicos, b) Maquiagens, c) Ceras para carros, d) Polidores de frutas, e) Embalagens de alimentos e f) Entrega de fármaco.....	39

Figura 19 - Composição química majoritária da cera de carnaúba.....	40
Figura 20 - Imagens da Copernicia Cerifera (carnaubeira).....	41
Figura 21 - Gráfico da concentração do fármaco na corrente sanguínea versus tempo de administração: curva A, uma formulação convencional, e curva B, uma formulação ideal de liberação controlada.....	44
Figura 22 - Esquema do processo de obtenção de Fe ₃ O ₄ @AO.....	49
Figura 23 - Esquema do processo de remoção do excesso de ácido oleico das Fe ₃ O ₄ @AO.....	50
Figura 24 - Imagem do ultrassom utilizado para fazer as NLSMs.....	51
Figura 25 - Esquema do processo de obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSMs) pelo método de fusão-emulsificação.....	52
Figura 26 - Imagem do equipamento utilizado nos ensaios de hipertermia.....	54
Figura 27 - Equipamento usado em Relaxometria magnética.....	55
Figura 28 - Equipamento de imagem por ressonância magnética.....	55
Figura 29 - Imagem do sistema de liberação sem aplicação do campo magnético.....	57
Figura 30 - Característica macroscópica do ferrofluido Fe ₃ O ₄ @AO.....	58
Figura 31 - Curvas de TGA/DTG para amostra Fe ₃ O ₄ @AO em pó.....	59
Figura 32 - Difratoograma da amostra Fe ₃ O ₄ @AO (Inserção: Sociedade Americana de Testes e Materiais, ASTM, padrão para Fe ₃ O ₄).....	60
Figura 33 - Curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para a Fe ₃ O ₄ @AO.....	62
Figura 34 - (a) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra Fe ₃ O ₄ @AO, (b) Histograma de distribuição de tamanho e (c) EDX.....	63
Figura 35 - Característica macroscópica das formulações com (II) e sem (I) a presença do campo magnético: (a) NLS, (b) NLSM 1%, (c) NLSM 3%, (d) NLSM 5%, (e) NLSM 7%.....	64
Figura 36 - Curvas de distribuição de tamanho de partícula unimodal das NLS e NLSMs.....	66

Figura 37 - Curvas de TGA/DTG para as amostras; (a) NLS, (b) NLSM 1%, 3%, 5% e 7%.....	69
Figura 38 - Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão e sua distribuição de tamanho das amostras: (a) NLS, (b) NLSM 1%, (c) NLSM 3%, (d) NLSM 5%, (e) NLSM 7%.....	71
Figura 39 - (a) EDX da NLSM 7% e (b) micrografia onde o EDX foi realizado.....	74
Figura 40 - Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras: (a) NLS, (b) NLSM 1%, (c) NLSM 3%, (d) NLSM 5%, (e) NLSM 7%.....	75
Figura 41 - Difratoograma das NPs e suas respectivas ampliações: a) NLS, b) NLSM 1%, c) NLSM 3%, d) NLSM 5%, e) NLSM 7% e f) padrão da Fe_3O_4	77
Figura 42 - Curvas de aquecimento obtidas dos ensaios de magnetohipertermia das formulações de NLSM e NLS.....	78
Figura 43 - Cinética de liberação in vitro da oncocalyxona A incorporada nas NLS e NLSM 3%, 5% e 7%, sob diálise a 37 °C.....	80
Figura 44 - Curvas de calibração para o bioativo oncocalyxona A: a) em clorofórmio, obtida por fluorescência (663 nm) e b) em água, obtida por UV/Vis (490 nm).....	80
Figura 45 - Liberação da oncocalyxona A através da NLSM 7% com (a) e sem (b) a presença de um campo magnético oscilante.....	82
Figura 46 - Curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para a NLS e NLSM 1%, 3%, 5% e 7%.....	83
Figura 47 - Gráfico de Relaxometria magnética das amostras: (a) NLS, (b) NLSM 1%, (c) NLSM 3%, (d) NLSM 5%, (e) NLSM 7%.....	86
Figura 48 - Imagem por ressonância magnética ponderada em T_2 das NLS e NLSMs.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Informações botânicas da carnaubeira.....	38
Tabela 2 -	Descrição dos tipos de cera de carnaúba.....	41
Tabela 3 -	Composição lipídica das formulações de NLSM obtidas pelo método de fusão-emulsificação.....	51
Tabela 4 -	Valores de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de NLS e NLSMs.....	66
Tabela 5 -	Valores de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de NLSM e NLS após 120 dias de preparo.....	67
Tabela 6 -	Valores das concentrações de Fe ₃ O ₄ nas formulações de NLSM e NLS.....	67
Tabela 7 -	Valores de perda de massa das NLS e NLSMs.....	70
Tabela 8 -	Valores de diâmetro médio de partícula das formulações de NLSMs e NLS por MET e DLS.....	74
Tabela 9 -	Relaxatividade dos agentes de contraste T ₂ compostos por óxidos de ferro.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO	Ácido Oléico
ASTM	Sociedade Americana de Testes e Materiais
CA	Corrente Alternada
CFC	Cúbica de face centrada
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DR-X	Difração de Raio-X
DTG	Termogravimetria Derivada
FA	Fase aquosa
FO	Fase Orgânica
FPS	Fator de Proteção Solar
HM	Hipertermia Magnética
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma
IRM	Imagem por Ressonância Magnética
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NLS	Nanopartícula Lípidica Sólida
NLSM	Nanopartícula Lípidica Sólida Magnética
NP	Nanopartícula
Pdl	Índice de polidispersividade
PF	Ponto de Fusão
PSA	Antígeno prostático específico
RES	Sistema retículo endotelial
RF	Radiofrequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
SAR	Taxa de Absorção Específica
SPIOs	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro
SPM	Superparamagnético
SQUID	Dispositivo supercondutor de interferência quântica
TGA	Análise termogravimétrica
USPIO	Nanopartícula superparamagnética de óxido de ferro ultrapequena

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Nanotecnologia	15
1.2	Nanopartícula Lipídica Sólida (NLS)	18
1.3	Nanopartícula Magnética	21
1.4	Nanopartícula Lipídica Sólida Magnética (NLSM)	26
1.5	Aplicações das NLSMs	28
1.5.1	<i>Hipertermia Magnética (HM)</i>	28
1.5.2	<i>Imagem por Ressonância Magnética (IRM)</i>	32
1.6	Oncocalyxone A	36
1.7	Cera de Carnaúba	38
1.8	Liberação controlada de fármaco	43
2	OBJETIVO	47
2.1	Geral	47
2.2	Específico	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	Lipídeos e Ativo	48
3.2	Síntese de nanopartículas magnéticas	48
3.3	Síntese de Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSMs)	50
3.3.1	<i>Método fusão-emulsificação</i>	50
3.4	Tamanho de Partícula	52
3.5	Potencial Zeta	53
3.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	53
3.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53
3.8	Hipertermia Magnética (HM)	53
3.9	Análise Térmica	54
3.10	Relaxometria Magnética	54
3.11	Imagem por Ressonância Magnética	55
3.12	Espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES)	56
3.13	Difração de Raios-X	56
3.14	Magnetometria SQUID	56
3.15	Liberação <i>in vitro</i>	56

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	Síntese do ferrofluido Fe ₃ O ₄ @AO.....	58
4.2	Síntese das Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSMs) e Nanopartícula Lipídica Sólida (NLS).....	64
4.3	Caracterizações das NLS e NLSMs.....	65
4.3.1	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)</i>	65
4.3.2	<i>Análise termogravimétrica (TGA)</i>	68
4.3.3	<i>Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura (MET e MEV)</i>	70
4.3.4	<i>Difração de Raios-X</i>	76
4.4	Ensaio de hipertermia magnética.....	77
4.4.1	<i>Liberção in vitro</i>	79
4.4.2	<i>Liberção in vitro por hipertermia magnética</i>	81
4.5	Caracterizações magnéticas.....	83
4.5.1	<i>Magnetometria SQUID</i>	83
4.5.2	<i>Relaxometria Magnética e Imagem por Ressonância Magnética (IRM)</i>	85
5	CONCLUSÃO.....	90
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICE A - PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO INTERNACIONAL – SUÍÇA.....	105
	APÊNDICE B - PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO INTERNACIONAL – ÁUSTRIA.....	107
	APÊNDICE C - DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO EM PATENTE...	109

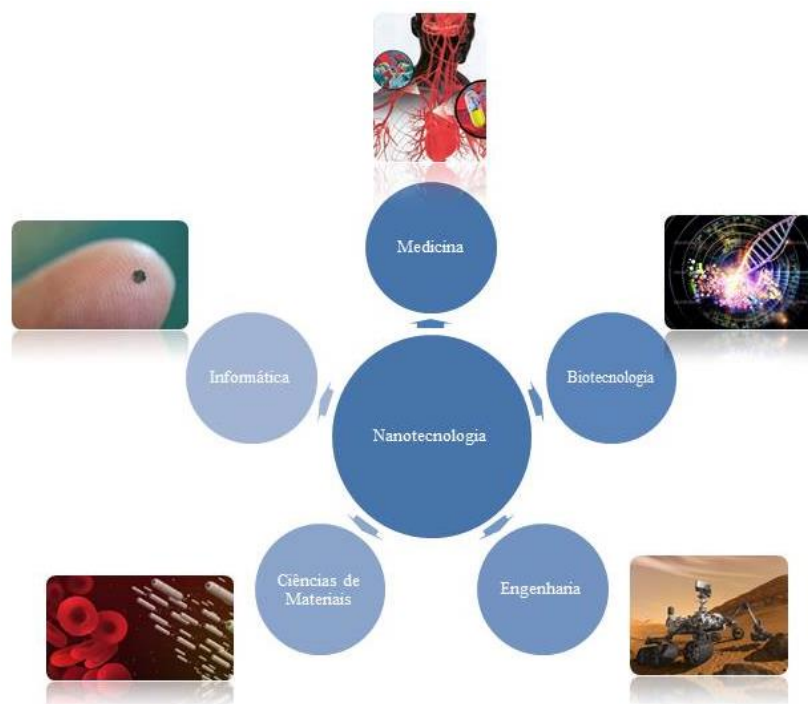
1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a ciência que se refere à engenharia da matéria em escala molecular. Especificamente ela lida com dimensões menores que 100 nanômetros, com isso é capaz de manipular moléculas ou átomos individualmente (GARIMELLA e ELTORAI, 2017).

O desenvolvimento da nanotecnologia contribui significativamente para diversas áreas (Figura1), em especial medicina e biotecnologia (GARIMELLA e ELTORAI, 2017). Aplicações de sistemas nanotecnológicos na área de ciências da saúde estão em constante desenvolvimento e se tornando cada vez mais crescente. Medicamentos nanoestruturados, sistemas de entrega e direcionamento de fármaco até o local específico para o tratamento, nanomateriais biocompatíveis para substituir partes lesionadas do corpo como ossos e tecidos, biossensores para diagnóstico do câncer, esses são alguns exemplos importantes onde a nanotecnologia é aplicada na medicina (GLORIA et al., 2012; BAÑOBRE-LÓPEZ et al., 2011; TAMPIERI et al., 2012).

Figura 1- Áreas de aplicação da nanotecnologia.

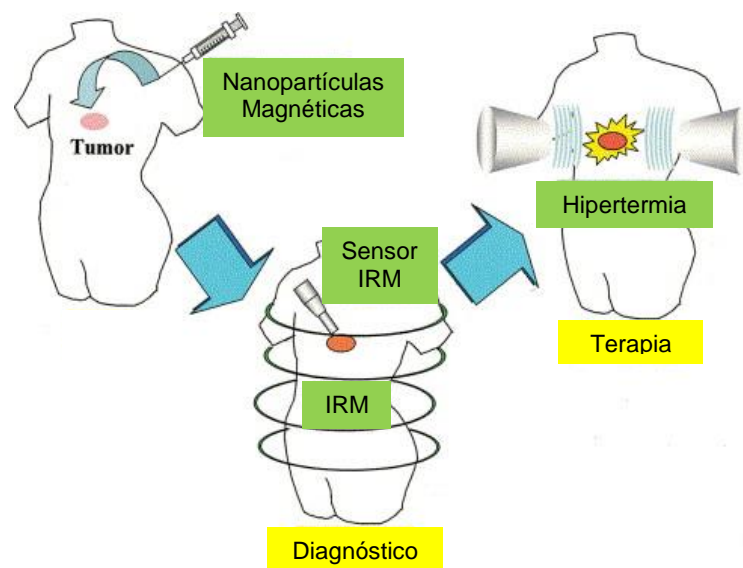


Fonte: Autor.

As nanopartículas (NPs) são definidas como partículas que tem sua dimensão física abaixo de 1000 nm. Devido ao seu tamanho nanométrico as suas propriedades (óptica, catalítica, eletrônica e magnética) diferirão dos materiais com maiores dimensões (HERVAULT e THANH, 2014; FONTANIVE et al., 2014), ou seja, as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas são influenciadas pelo seu tamanho. As NPs de maiores dimensões são utilizadas como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética do trato gastrointestinal, por outro lado NPs menores (~20 nm) são usadas como carreadores de drogas para tratamento de tumores (FONTANIVE et al., 2014; VO-DINH, 2007).

O uso de materiais em tamanho nanométrico, em especial nanopartículas magnéticas (NPMs), é atualmente um assunto que desperta grande interesse em ciências da saúde. Devido às suas propriedades físico-químicas e seu tamanho, as NPMs demonstram um grande número de aplicações que vão desde o diagnóstico médico à tratamento de pacientes (Figura 2).

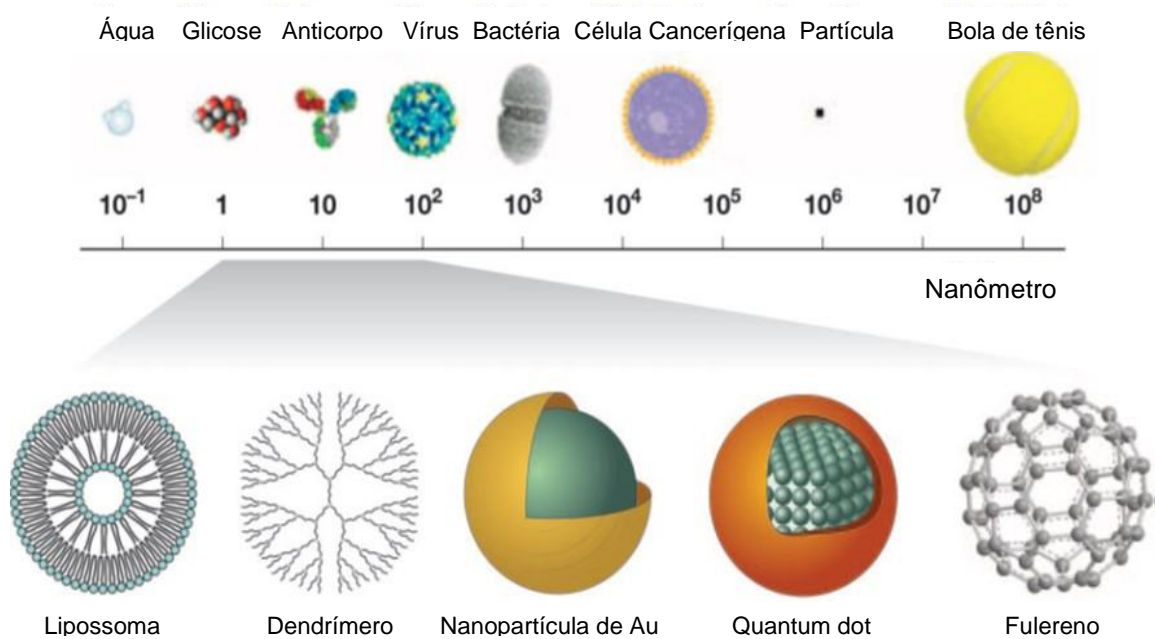
Figura 2- Imagem ilustrativa das NPMs em diagnóstico e tratamento.



Fonte: <http://trialx.com>, 2017.

As NPs de óxidos magnéticos possuem vantagens para o uso na biomedicina por conseguirem controlar o seu tamanho na escala nanométrica, e assim ficarem em dimensões semelhantes a vírus, proteínas e genes (Figura 3) (FONTANIVE et al., 2014; VO-DINH, 2007).

Figura 3- Escala nanométrica



Fonte: <http://justoginer.com>, 2017.

As nanopartículas de óxido de ferro, em particular, estão sendo investigadas para ajudar no tratamento do câncer, localizando e destruindo as células doentes, através de um tratamento eficiente que é a hipertermia magnética. A hipertermia tem sido utilizada em paralelo com a radioterapia, durante as últimas décadas, entretanto foram relatados efeitos altamente prejudiciais aos tecidos saudáveis associados a esses tratamentos. Com isso a nanotecnologia proporciona uma nova solução com a magnetohipertermia (ou hipertermia magnética) que se baseia na utilização de nanopartículas magnéticas para induzir calor no local do tratamento, quando um campo magnético por radiofrequência é aplicado provocando um aumento de temperatura nos tecidos e órgãos, onde as células tumorais estão presentes. Portanto, um fator importante que determina a eficácia dessa técnica é a capacidade das nanopartículas magnéticas de serem direcionadas e acumuladas na área desejada. Dessa forma, NPMs devem ter sua superfície funcionalizada estrategicamente para que sejam seletivas às células e tecidos lesionados (BAÑOBRE-LÓPEZ, TEIJEIRO E RIVAS, 2013).

Estudos recentes mostraram que as NPs de óxido de ferro quando revestidas adequadamente podem proporcionar maiores benefícios quando usadas em hipertermia magnética contra neoplasia maligna (ESCALONA et al., 2016; DUTZ

e HERGT, 2014; FANTECHI et al., 2014; KHANDHAR et al., 2012; KRUSE et al., 2014; QUINTO et al., 2015; SADHASIVAM et al., 2015), prevenção de aglomeração / sedimentação *in vitro* e *in vivo*, biocompatibilidade e a possibilidade de introduzir novas funcionalidades terapêuticas (carrear moléculas terapêuticas / drogas e genes) (ESCALONA et al., 2016).

O recobrimento biocompatível e biodegradável nestes sistemas de nanopartículas de núcleo / casca é geralmente feito por um material polimérico ou lipídico (REDDY et al., 2012). Neste último caso, a associação de lipídeos sólidos a NPMs pode possibilitar resultados biomédicos promissores (ROSTAMI et al., 2014; PURI et al., 2009;). Tais matrizes (nanopartículas lipídicas sólidas, NLSs) têm sido relatadas como biocompatíveis, biodegradáveis e materiais bem tolerados (DOKTOROVOVA et al., 2014), encontrando aplicações promissoras como carregamento de drogas e ácidos nucleicos até o local de ação (ESCALONA et al., 2016; DE JESUS e ZUHORN, 2015; GASTALDI et al., 2014; ROSTAMI et al., 2014; UNER e YENER, 2007).

1.2 Nanopartícula Lipídica Sólida (NLS)

Os lipídeos são compostos de origem biológica que se dissolvem em solventes apolares, tais como: clorofórmio e éter dietílico. O nome lipídeo vem da palavra grega, *lipos*, que significa gordura. Eles são definidos pela operação física que se usa para isolá-los e não por suas estruturas, como é o caso dos carboidratos e das proteínas, portanto é comum que os lipídeos incluam uma variedade de tipos estruturais (SOLOMONS e FRYHLE, 2002), dentre eles óleos, gorduras, ceras e ácidos graxos.

A maioria dos excipientes farmacêuticos são originários de outras indústrias: os polímeros de grau farmacêutico evoluíram da indústria química doméstica e da indústria alimentar. Os excipientes lipídicos são derivados predominantemente da indústria alimentícia onde foram utilizados como aditivos para emulsificação, solubilização, estabilização e lubrificação. Os excipientes lipídicos foram refinados e aperfeiçoados para que a indústria farmacêutica pudesse solucionar os desafios da administração de fármacos, incluindo a solubilidade, propriedades de dissolução e também na produção (ROSIAUX et al., 2014).

As NLSs apresentam uma alternativa muito interessante frente a algumas nanopartículas poliméricas, que foram frequentemente citadas como citotóxicas e relativamente difíceis de fabricar em larga escala (ROSIAUX et al., 2014; SINGH e RAMARAO, 2013; JONG e BORM, 2008).

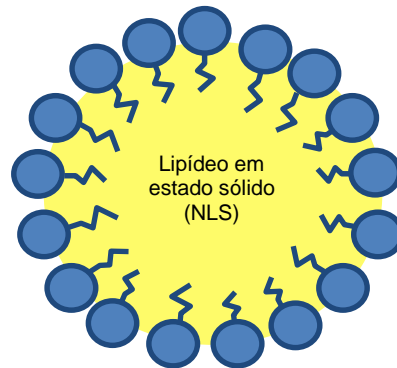
As matrizes lipídicas são usadas em nanossistemas e vêm sendo amplamente pesquisadas por possuírem excelentes características, tais como; biocompatibilidade e versatilidade na utilização desse sistema para entrega de fármaco por via oral, pulmonar, tópica e parenteral (AMARAL et al., 2014; SEVERINO et al., 2012; ÜNER e YENER, 2007; WISSING et al., 2004).

Para aplicação na área da saúde um nanossistema ideal deve ser menor que 1000 nm e apresentar vantagens superiores do material quando não está particulado. Com o avanço na área de nanotecnologia é possível desenvolver sistemas carreadores de fármaco com uma grande diversidade de constituintes e técnicas de obtenção (AMARAL et al., 2014; FANTHI, MOZAFARI e MOHEBBI, 2012; GUPTA e KOMPELLA, 2006).

A nanopartícula lipídica sólida (NLS) (Figura 4) foi introduzida em 1991 e tem atraído cada vez mais atenção por ser um sistema alternativo para entrega controlada de fármaco (KHERADMANDNIA et al., 2010; MULLER et al., 2000; WESTESEN, 2000; VRINGER, 1999), devido à sua boa tolerabilidade, biodegradabilidade, estabilidade física, possibilidade de produção em larga escala e a incorporação eficaz das drogas hidrofóbicas em seu núcleo lipídico (KHERADMANDNIA et al., 2010; MULLER e KECK, 2004; MÜHLEN et al., 1997).

NLSs são sistemas de liberação de ativos que agrupam as melhores características encontradas nos sistemas convencionais como: Lipossomais (inocuidade dos constituintes), micro e nanopartículas poliméricas (matriz sólida) (TAVEIRA, NOMIZO e LOPEZ, 2009; LACERDA, 2006; OLBRICH et al., 2001). Elas são compostas de lipídeos que são compatíveis fisiologicamente, possuem alto ponto de fusão (PF) e núcleo sólido o qual é revestido por surfactantes anfifílicos atóxicos (MEHNERT e MÄDER, 2001). As nanopartículas estão no estado sólido, tanto na temperatura corpórea quanto na ambiente e possuem tamanho nanométrico que varia entre 50 a 1000 nm (MÜHLEN et al., 1997).

Figura 4- Nanopartícula Lipídica Sólida (NLS)



Fonte: Autor

Estruturalmente as NLSs são bastante parecidas com as nanoemulsões, à diferença entre elas é a composição nuclear, pois as NLSs são compostas por lipídeos sólidos à temperatura ambiente, enquanto as nanoemulsões são óleos líquidos (MULLER et al., 2000a). O estado físico desses lipídeos é responsável por tornar a mobilidade dos bioativos menor nas NLS, podendo sustentar ou controlar a taxa de liberação desses ativos (TAVEIRA, NOMIZO e LOPEZ, 2009; MEHNERT e MADER, 2001).

Estudos têm demonstrado que as características físico-químicas e estabilidade das NLSs com fármaco dependerá das propriedades da droga e dos outros componentes (LIM e KIM, 2002). A escolha adequada dos lipídeos e surfactantes, sua composição, afetam o tamanho das partículas, a estabilidade a longo prazo (durante o armazenamento), o transporte e a liberação da droga (KIM et al., 2005). Logo, observa-se que existe uma formulação ideal da NLS para cada ativo e que pode ser obtido através da investigação dos efeitos das variáveis no processo e nas características desejáveis dos transportadores (sistemas) (KHERADMANDNIA et al., 2010).


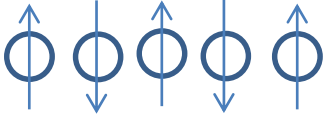
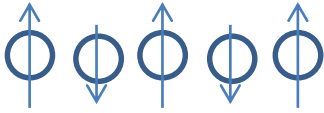
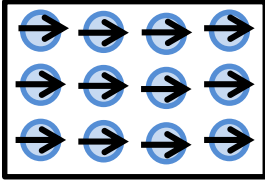
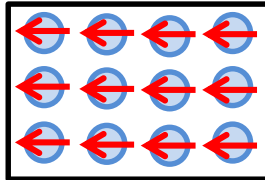
Os lipídeos mais utilizados na síntese das NLS são os triglicerídeos (triestearina), glicídeos parciais (monoestearato de gliceril), ácidos graxos (ácido esteárico), esteróis (colesterol) e ceras (cetilpalmitato). São usados vários emulsificantes e polímeros para evitar a agregação das partículas e estabilizá-las. Os mais usados são sais biliares (taurodeoxicolato), lecitinas e copolímeros de polióxidoetileno e polióxidoetileno (Poloxamer) (TAVEIRA, NOMIZO e LOPEZ, 2009; MEHNERT e MADER, 2001).

1.3 Nanopartícula Magnética

As nanopartículas magnéticas podem ser definidas como a classe de nanopartículas que podem ser manipuladas usando um campo magnético, e que normalmente são constituídas de elementos magnéticos, como ferro, níquel, cobalto e seus compostos (BEDÊ, 2010).

Os materiais podem ser organizados em diferentes tipos, como ferromagnético, diamagnético, paramagnético, ferrimagnético, antiferromagnético, entre outros, dependendo da sua resposta a um campo magnético externo aplicado. Os materiais diamagnéticos (quando submetidos a um campo magnético externo, a magnitude do momento magnético induzido é baixa e oposta ao sentido do campo), paramagnético (o campo magnético induzido é de maior magnitude e no mesmo sentido do campo externo aplicado), ferromagnético (o momento magnético é intenso e permanente, mesmo com ausência de campo externo) (SOUZA, BECK e VARANDA, 2013), antiferromagnético (com a presença do campo externo o momento magnético é quase nulo devido ao alinhamento dos spins ocorrerem antiparalelamente) e o ferrimagnetismo (o momento magnético é menor que o do ferromagnético, por esse material ser composto por dois ou mais íons diferentes e ainda possuem spins antiparalelos acabam possuindo momentos magnéticos que se cancelam mas não completamente) (Figura 5) (JUNIOR et al., 2011).

Figura 5- Imagem ilustrativa do comportamento dos materiais magnéticos:

Formação de domínios espontâneos	Ferromagnetismo	 <p>Momento de átomos individuais alinhados</p>
	Antiferromagnetismo	 <p>Momentos alternados de átomo a átomo</p>
	Ferrimagnetismo	 <p>Momentos alternados desiguais</p>
Sem domínios	Paramagnetismo	 <p>Alinhamento com campo aplicado</p>
	Diamagnetismo	 <p>Alinhamento oposto ao campo</p>

Fonte: Autor

Existem também materiais magnéticos classificados como superparamagnéticos que comportam-se de maneira semelhante aos materiais paramagnéticos (mas em vez de cada átomo ser afetado individualmente pelo campo magnético externo, o momento magnético de todo o material tende a alinhar-se com o campo magnético) e ao mesmo tempo mostra uma alta susceptibilidade magnética como em um ferromagnético (OLIVEIRA, 2012). Assim os momentos magnéticos de vários íons não se cancelam mutuamente, alinhando-se em conjunto, fazendo com que estes materiais tenham um momento magnético permanente, muito superior na

presença de um campo magnético externo (CARVALHO, 2011). O superparamagnetismo permite o alinhamento magnético instantâneo da NP em relação a um campo magnético externo aplicado, mesmo em valores muito baixo de campo, mas na sua ausência nenhuma magnetização é encontrada (SOUZA, BECK e VARANDA, 2013). Por causa dessa propriedade esses materiais despertam interesse nas ciências da saúde.

Os nanossistemas magnéticos estão sendo usados em diversas aplicações biológicas. A utilização de distintas formas de óxido de ferro para procedimentos de diagnósticos como agente de contraste em imagem por ressonância magnética (IRM), carreador magnético de ativos e magnetohipertermia tem conquistado grande aceitação em diversas práticas, embora as aplicações terapêuticas ainda estejam sob investigação. Tais aplicações exploram, dos óxidos de ferro, suas duas maiores vantagens: sua baixa toxicidade em seres humanos e a possibilidade de controlar sua magnetização (SOUZA e MOHALLEM, 2011; CHASTELLAIN et al., 2004; RĂCUCIU, 2006).

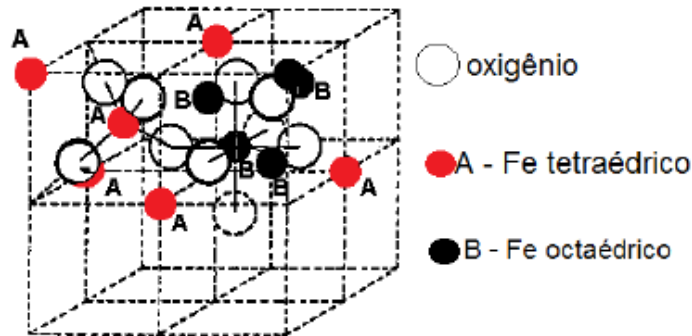
Provavelmente a via química mais simples e eficiente para a obtenção de partículas magnéticas é a coprecipitação. Óxidos de ferro (Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são geralmente preparados por uma mistura estequiométrica de sais ferrosos e férricos em meio aquoso com a adição de uma base em atmosfera inerte à temperatura ambiente ou temperatura elevada. O tamanho, a forma e a composição das nanopartículas magnéticas dependem do tipo de sais utilizados (por exemplo, cloretos, sulfatos e nitratos), da razão entre os sais, da temperatura, do valor do pH e da força iônica dos meios. A reação química de formação da Fe_3O_4 pode ser escrita como na equação (1) (FRANCISQUINI, SCHOENMAKER E SOUZA, 2015):



A magnetita é um óxido de ferro que possui estrutura de espinélio invertido (Figura 6), podendo ser representada pela fórmula $\text{FeOFe}_2\text{O}_3(\text{Fe}_3\text{O}_4)$. A célula unitária ($[\text{Fe}^{3+}]_8[\text{Fe}^{3+}_8\text{Fe}^{2+}_8]\text{O}_{32}$) possui 56 íons, dentre eles 32 O^{2-} , 8 Fe^{2+} e 16 Fe^{3+} . Os íons do oxigênio formam uma estrutura cúbica de face centrada (cfc). Os íons do Fe^{2+} ocupam os buracos octaédricos juntamente com 8 íons do Fe^{3+} , ficando assim com 6 átomos de O^{2-} como 1º vizinhos. O restante dos íons de Fe^{3+} ocupam os buracos

tetraédricos e ficam circundados por quatro íons de oxigênio (KORELEVE, AREFYEV, e RAMAZANOVA, 2008).

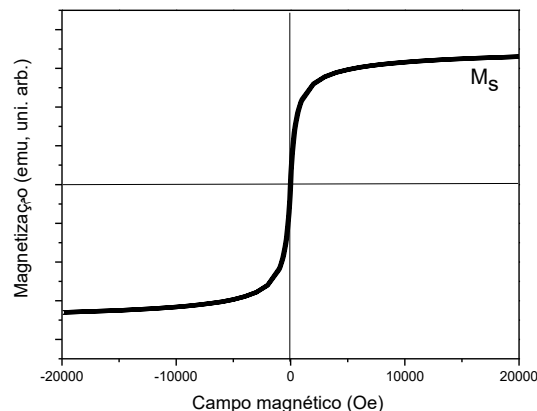
Figura 6- Estrutura cristalina da magnetita (cúbica de espinélio invertido).



Fonte: Silva, 2013.

As nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) apresentam caráter superparamagnético. A principal característica dessa propriedade magnética consiste na magnetização das nanopartículas apenas na presença de um campo magnético externo. Assim, quando se retira o campo magnético externo, nenhum comportamento magnético, magnetização remanescente e coercividade (campo magnético aplicado para que a magnetização do material seja igual à zero) são verificados (Figura 7) (FREY et al., 2009), podendo ser utilizadas como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética para diagnosticar tumores e doenças cardiovasculares, hipertermia na terapia do câncer e separação magnética de células e biomoléculas (BINI, et al., 2011).

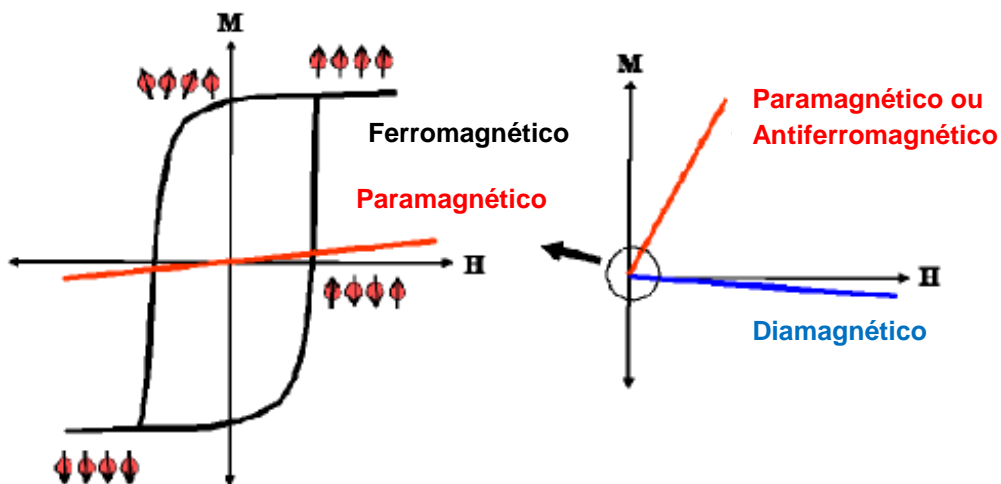
Figura 7- Ilustração de uma curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para materiais superparamagnéticos.



Fonte: Autor.

As curvas de magnetização variam de acordo com o material magnético. Para materiais diamagnético e paramagnético, a magnetização observada, a baixo campo, é linear e retorna a zero quando o campo é removido. Comparando-se estes dois comportamentos, observa-se que a inclinação da curva para um material diamagnético é pequena e negativa, enquanto que para um material paramagnético é maior e positiva. Materiais ferromagnéticos são facilmente identificados pela histerese presente no gráfico de magnetização *versus* campo magnético (Figura 8). Quando a área da curva de histerese é grande o material é dito duro, enquanto materiais moles produzem curvas de histerese com pequenas áreas (FERRI, 2010).

Figura 8- Ilustração de uma curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para materiais: diamagnético, paramagnético, antiferromagnético e ferromagnético.

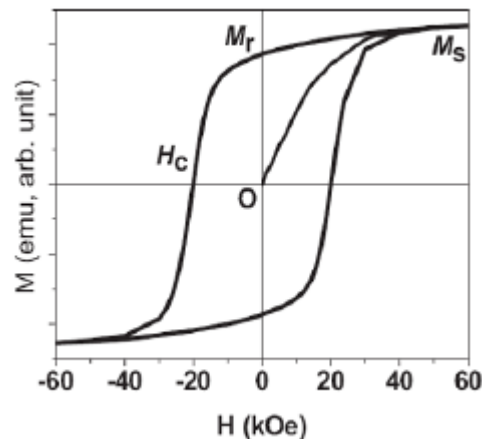


Fonte: Ferri, 2010.

Aplicando-se um campo magnético no material inicialmente desmagnetizado (ver Figura 9), este seguirá a curva até atingir um patamar estável chamado de magnetização de saturação (M_s). Através da redução do campo magnético a partir deste valor, M decresce mais lentamente até um valor residual da magnetização para um campo nulo chamado de magnetização remanescente (M_r), onde o material fica magnetizado sem aplicação de campo. Trocando o sentido do campo a magnetização segue no mesmo sentido da curva para valores de M menores que M_r até que a magnetização se anule para um determinado valor de campo chamado de campo coercivo (H_c). Com o prosseguimento da variação do módulo do campo magnético, adquire-se novamente uma região de saturação e repetindo o ciclo

no sentido inverso ocorre uma curva fechada que é o chamado ciclo de histerese (CUNHA, 2014).

Figura 9- Ilustração de uma curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para materiais ferromagnéticos.



Fonte: Junior, 2011

Essas partículas magnéticas são capazes de responder a um gradiente de campo magnético externo. Os tecidos humanos apresentam penetrabilidade ao campo magnético, desta forma as NPMs podem ser conduzidas para tecidos de interesse, como células tumorais, por exemplo, e apresentar ação específica (FONTANIVE et al., 2014).

1.4 Nanopartícula Lipídica Sólida Magnética (NLSM)

Para agregar ainda mais valores aos sistemas de NLSs foram adicionadas nanopartículas magnéticas, logo surgiram as NLSMs. Elas apresentam as mesmas características das NLSs tais como compatibilidade fisiológica, alto ponto de fusão (PF) da matriz lipídica e núcleo sólido o qual é revestido por surfactantes anfifílicos atóxicos (MEHNERT e MÄDER, 2001).

A incorporação das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro a esse sistema foi devido principalmente a sua baixa toxicidade em seres humanos e a possibilidade de se controlar sua magnetização (SOUZA e MOHALLEM, 2011; RĂCUCIU, 2006; CHASTELLAIN et al., 2004). Partículas de magnetita [são compostas de ferro (II e III) e oxigênio, possui fórmula química Fe₃O₄ (FeO.Fe₂O₃)]

que vão desde micrometros a nanometros de diâmetros estão atualmente em estudo para diversas aplicações médicas, tais como a separação magnética de células (SON et al., 2005; BRUCE et al., 2004; SAFARIKOVA et al., 2003; WEETALL e LEE, 1989), entrega de fármaco (SON et al., 2005; GUPTA e GUPTA, 2005; FINOTELLY et al., 2004; ATTWOOD, 1994), agente de contraste de IRM (SON et al., 2005; GUPTA e GUPTA, 2005; PARDOE et al., 2003) e hipertermia (SON et al., 2005; GUPTA e GUPTA, 2005; JORDAN et al., 1999; KAWASHITA et al., 2005; HERGT et al., 1998). Suas propriedades únicas em termos de estabilidade química, biocompatibilidade, baixo preço e boa resposta magnética fazem desse material ideal para tais aplicações (VERGÉS et al., 2008).

As NLSMs têm sido descritas, em alguns artigos, como um sistema em potencial para carreamento e liberação controlada de drogas. Pang et al., (2007) obtiveram NLSM utilizando o ácido esteárico, 1-octadecanol e lecitina para constituir a matriz lipídica e Fe_3O_4 como nanopartículas magnéticas. A droga incorporada nas NLSMs foi o ibuprofeno. Os resultados de Raios-X e MET mostraram uma incorporação bem sucedida do óxido de ferro pela matriz lipídica e a eficiência de encapsulação do ibuprofeno foi medida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Segundo Pang et al., (2007) as NLSMs mostraram potencial para serem utilizadas na liberação controlada de fármacos. Trabalho semelhante foi desenvolvido por Hsu e Su (2008) onde também desenvolveram NLSMs para serem utilizadas na liberação de fármaco por hipertermia magnética.

Escalona et al., (2016) realizaram um procedimento de dupla emulsão e evaporação do solvente para obter NLSMs com o gliceril trimiristato como matriz lipídica e no seu núcleo nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. As propriedades da superfície (eletrocínética e dados termodinâmicos) foram quase indistinguíveis daqueles da nanomatriz lipídica sólida, enquanto que as caracterizações de microscopia eletrônica e os padrões de difração de raios-X confirmaram o recobrimento satisfatório da magnetita. Determinações do ciclo de histerese foram importantes para definir a capacidade de resposta magnética adequada dos nanocompósitos, e sua característica de aquecimento foi investigada em um campo magnético alternado de alta frequência, uma temperatura máxima e constante de 46 °C foi obtida no período de 40 min. Testes *in vitro* foram realizados em células humanas de adenocarcinoma do cólon HT29 e demonstraram uma diminuição promissora da viabilidade celular depois do tratamento com os nanocompósitos, após

a exposição ao campo eletromagnético alternado. Esta foi a primeira vez que esse tipo de nanoformulações, com características muito promissoras para aplicação em hipertermia, foi desenvolvida para fins terapêuticos.

1.5 Aplicações das NLSMs

1.5.1 *Hipertermia Magnética (HM)*

O significado etimológico da palavra "Hipertermia" é a geração de calor. E em relação à terapia do câncer, esse termo é usado para implicar no tratamento com base na geração de calor no local específico (NAGARAJAN e YONG, 2008). A abordagem envolve elevar a temperatura no ambiente, onde o tumor encontra-se, resultando em mudança na fisiologia das células doentes finalmente levando-as a apoptose (LOO et al., 2002). As células tumorais são mais sensíveis à temperatura elevada do que as células normais, portanto, a hipertermia não afeta as células normais. É uma terapia de câncer adjuvante usada para aumentar a eficácia de terapias tradicionais, como radioterapia e quimioterapia, cirurgia, terapia genética e imunoterapia para o cancro (KUMAR e MOHAMMAD, 2011).

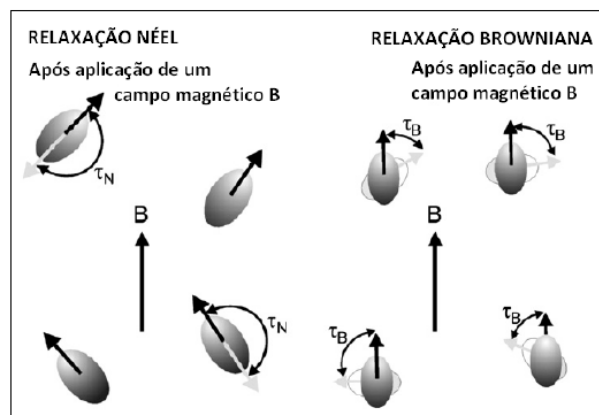
Dependendo do aumento da temperatura, o tratamento de hipertermia magnética pode ser classificado em três diferentes tipos. Na ablação térmica, um tumor é submetido a altas temperaturas de aquecimento, ($46\text{ }^{\circ}\text{C} < T < 56\text{ }^{\circ}\text{C}$), fazendo com que as células sofram necrose direta do tecido, coagulação ou carbonização. A hipertermia moderada ($41\text{ }^{\circ}\text{C} < T < 46\text{ }^{\circ}\text{C}$) tem vários efeitos tanto ao nível celular como tecidual. A diatermia utiliza temperaturas mais baixas ($T < 41\text{ }^{\circ}\text{C}$) para o tratamento de doenças reumáticas em fisioterapia (KUMAR e MOHAMMAD, 2011).

A hipertermia magnética moderada tem atraído significativamente à atenção como um método seguro para terapia do câncer. Essa técnica pode permitir um acréscimo de temperatura no local específico, matando assim as células tumorais causando o mínimo de danos ao tecido normal. Este método envolve a introdução de partículas ferromagnéticas ou superparamagnéticas no tecido tumoral, seguido por irradiação do campo magnético de corrente alternada (CA). Em geral, partículas magnéticas geram calor em um campo magnético externo de CA, devido a rotação dos momentos magnéticos causada pela aplicação do campo, a partir de vários mecanismos físicos. Esses incluem perda por relaxação (mecanismo dominante em

materiais magnéticos superparamagnéticos de monodomínio) ou perda por histerese (materiais de multidomínio), que depende fortemente da frequência do campo externo, bem como da natureza das partículas, tais como o tamanho da partícula e modificações na superfície (SOUZA e MOHALLEN, 2011; LI et al., 2010; JOZEFCAK e SKUMIEL, 2007; SHINKAI et al., 1994).

A perda de energia por relaxação (processo através do qual os spins retornam ao equilíbrio) em nanopartículas magnéticas de monodomínio acontece principalmente de dois modos: O relaxamento magnético (Relaxação de Néel) e de movimento (Relaxação de Brown), e são responsáveis pelo aquecimento em sistemas superparamagnéticos (SOUZA e MOHALLEN, 2011). Na relaxação de Néel, o momento magnético da partícula gira internamente para se alinhar com o campo (rotação dos momentos magnéticos atômicos de cada partícula), enquanto na relaxação Browniana, a partícula gira fisicamente para alinhar o momento magnético com o campo (rotação física das partículas no fluido) (Figura 10) (SILVA, 2012).

Figura 10- Ilustração da relaxação de Néel e Brown.



Fonte: Silva, 2012

No que diz respeito a aplicações na hipertermia, as propriedades importantes de partículas magnéticas são biocompatibilidade, atoxicidade, injetabilidade, possibilidade de conduzi-las e mantê-las em local desejado dentro do corpo, alta capacidade de se acumular no tumor alvo e taxa de absorção específica de energia eficaz (SAR), que indica a taxa de evolução do calor em hipertermia (VÉRGES et al., 2008).

Outro motivo pelo qual os materiais superparamagnéticos são preferíveis é o fato de possuírem uma alta taxa de absorção específica (SAR – *Specific Absorption*

Rate). Ou seja, tendo fundamento na relaxação Browniana e de Néel, demonstrou-se que as nanopartículas superparamagnéticas, ou partículas monodomínio, absorvem muito mais energia quando expostas a um campo magnético de corrente alternada em comparação com o obtido por histerese aquecendo micropartículas, ou partículas multidomínio (OLIVEIRA, 2012).

A taxa de absorção específica é uma medida da quantidade de energia convertida em calor, por unidade de tempo e massa, a partir de um campo magnético aplicado em partículas magnéticas (SILVA, 2012; WIJAY et al., 2007).

O SAR em $W.g^{-1}$ pode ser calculado através da equação 2 (THOMAS et al., 2015):

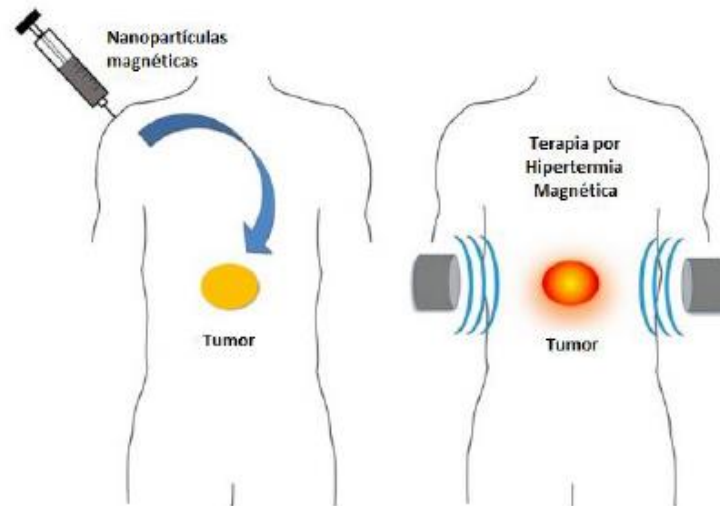
$$SAR = C \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \frac{1}{m} \quad \text{Equação (2)}$$

onde: C é a capacidade calorífica ($J/g.k$) do material, m é a massa total (g) das nanopartículas magnéticas e ΔT (k) é a variação da temperatura em um intervalo de tempo Δt (s).

Alguns estudos sobre hipertermia no tratamento do câncer focaram no desenvolvimento de sistemas intracelulares para hipertermia. Nestes estudos, nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (com tamanho aproximadamente de 10 nm) são normalmente modificados utilizando dextrano ou ácido oleico, são funcionalizadas com um polímero ou lipossomas, e / ou são associadas a um fármaco terapêutico anticâncerígeno para tentar melhorar a estabilidade coloidal do fluido magnético, afinidade com célula de carcinoma ou conferir capacidade de direcionamento específico até o tumor (LI et al., 2010; ITO et al., 2003; MITSUMORI et al., 2001; YANASE et al., 1998; MITSUMORI et al., 1996).

No caso particular de nanopartículas magnéticas, uma das vias de administração mais desejável é através da injeção intravenosa (Figura 11) de modo que a criação adicional de forças magnéticas suficientemente fortes por meio de ímãs permanentes poderia orientá-las para o tecido alvo, superando as forças de fluxo sanguíneo geradas naturalmente no sistema de circulação sanguínea (BAÑOBRE, TEIJEIRO E RIVAS, 2013).

Figura 11- Imagem ilustrativa do procedimento em hipertermia magnética. As nanopartículas são injetadas via intravenosa e então é aplicado um campo magnético alternado na região de tumor, para gerar o aquecimento.



Fonte: Andrade et al., 2011.

As células carcinomatosas, como qualquer outra célula existente, quando submetidas a um determinado tratamento, não são completamente suprimidas, parte delas são eliminadas e a outra parte fica mais resistente a esse tratamento. Por isso a importância no desenvolvimento de novas terapias para o combate da neoplasia maligna. Observa-se também a necessidade de especificidade do local onde será aplicado o tratamento para que se possa reduzir os efeitos colaterais e, desse modo, proporcionar ao paciente sintomas menos incômodos e prejudiciais (OLIVEIRA, 2012).

Um dos trabalhos mais importantes voltados para tratamento da neoplasia maligna em humanos por Hipertermia magnética foi desenvolvido a partir da década de 90, por pesquisadores no hospital Charité na Alemanha, durante um tratamento de câncer de próstata (JOHANNSEN et al., 2005). Neste estudo, a viabilidade da terapia foi avaliada utilizando um aparelho de hipertermia com campo magnético (MFH[®]-300F, operando em 100 kHz, com uma intensidade de campo variando de 0-226 Oe) e as nanopartículas Fe₃O₄ eram revestidas por aminosilana. As nanopartículas foram administradas através de uma injeção transperineal e o material ficou retido na próstata pelo intervalo de 6 semanas do tratamento, fazendo com que apenas uma aplicação fosse necessária, porém sem apresentar toxicidade sistêmica pelo

acompanhamento até 1 ano, 5 meses e 15 dias. Foi observada a diminuição dos níveis do antígeno prostático específico (PSA) em oito, dos dez pacientes que se submeteram ao tratamento (LI et al., 2010; JOHANNSEN et al., 2005).

Figura 12- Imagem do equipamento de hipertermia magnética.



Fonte: <http://www.agenciasinc.es>, 2016.

1.5.2 Imagem por Ressonância Magnética (IRM)

A Imagem por Ressonância Magnética (IRM) é uma técnica de imagiologia fundamentada nos princípios da Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

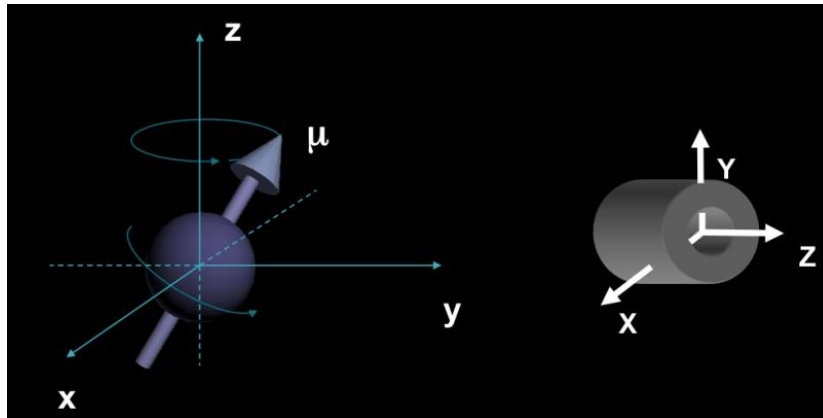
A IRM é um método de diagnóstico por imagem, muito utilizado e está em crescente desenvolvimento. Devido à alta capacidade de diferenciar tecidos e coletar informações bioquímicas, a diversidade de aplicações se estende a todas as partes do corpo humano e explora aspectos anatômicos e funcionais. Os principais átomos que estão presentes no tecido humano são o oxigênio, carbono, nitrogênio, cálcio, fósforo, hidrogênio, mas nem todos estes núcleos possuem propriedades que possibilitem seu uso em IRM. Utiliza-se o hidrogênio por ter o maior momento magnético nuclear, possuir diferenciação em IRM quando está presente no tecido normal e no tecido patológico e ser um elemento químico abundante no corpo humano (MAZZOLA, 2009).

A IRM é, resumidamente, o resultado da interação do forte campo magnético produzido pelo equipamento com os hidrogênios do tecido humano,

criando uma condição para que se possa enviar um pulso de radiofrequência (RF) e, depois coletar a RF modificada, através de uma bobina ou antena receptora. Este sinal codificado espacialmente por gradientes de campo magnético é coletado, processado e convertido numa imagem ou informação (MAZZOLA, 2009). Ao aplicar um pulso de radiofrequência (RF) ressonante com a transição de spin, os hidrogênios mudam seu nível de spin. A partir do instante em que o pulso de RF é desligado, o sistema excitado dos spins relaxa e volta ao seu estado de equilíbrio reemitindo a RF que é captada através de correntes induzidas em bobinas receptoras no equipamento. O processo através do qual os spins dos prótons voltam para o seu estado original, é referido como relaxação (OLIVEIRA, 2014).

O efeito de relaxação dos spins é devido a trocas de energia entre spins e entre os spins e suas vizinhanças (rede), estas interações são denominadas de relaxação spin-spin e spin-rede, respectivamente. Os tempos de relaxação foram denominados de T_1 e T_2 . A constante T_1 representa o tempo de retorno da magnetização para o eixo longitudinal e é influenciada pela interação dos spins com a rede. A constante T_2 faz referência a redução da magnetização no plano transversal e é influenciada pela interação spin-spin (MAZZOLA, 2009). As imagens ponderadas em T_1 e T_2 são sequências de contraste que medem as diferenças dos parâmetros T_1 e T_2 de cada tecido (intrínsecos ao tecido em estudo). O tempo de relaxação T_1 corresponde às trocas de energia do núcleo de hidrogênio com seu meio ambiente e o tempo de relaxação T_2 representa as trocas de energia entre núcleos vizinhos (FERNANDES, DIAS E MARQUES, 2011). A Figura 13 exibe os eixos de coordenadas (x, y e z) e o vetor que representa o momento magnético (μ) de um hidrogênio realizando o movimento de precessão em torno do eixo z, assim como as mesmas coordenadas num típico magneto supercondutor. O eixo z, ou longitudinal, representa a direção de aplicação do campo magnético principal (B_0). O plano xy é chamado de plano transversal (MAZZOLA, 2009).

Figura 13- Eixos de coordenadas usadas em IRM e o vetor momento magnético (μ) associado



Fonte: Mazzola, 2009.

O contraste por IRM em diferentes tecidos pode ser modificado por agentes de contraste que encurtam o tempo de relaxação longitudinal e transversal. Esta capacidade de alterar os tempos T_1 e T_2 é frequentemente usada para aumentar a sensibilidade e especificidade de detecção de certas patologias (OLIVEIRA, 2014; AGRAWAL, STRIJKERS e NICOLAY, 2010).

A IRM é uma excelente modalidade de imagem. No entanto, a baixa sensibilidade da técnica representa um desafio para conseguir uma imagem precisa a nível molecular. Para superar isso, os agentes de contraste são utilizados (KEASBERRY et al., 2015). Um dos principais objetivos na elaboração de agentes de contraste em IRM envolve a síntese e caracterização de novos materiais poliméricos que auxiliam na imagem nítida de tecidos e células específicas (HUFFSTETLER, 2009).

Os agentes de contraste, atualmente em uso clínico ou laboratorial, podem ser relativamente divididos em dois tipos: os que incorporam íons paramagnéticos, tais como gadolínio ou manganês para imagem ponderada em T_1 , e as que contêm nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs-*Superparamagnetic Iron Oxides*) para imagem ponderada em T_2 (PRASAD, 2006).

Nanopartículas de óxido de ferro têm sido utilizadas como agentes de contraste em IRM devido às suas propriedades de encurtamento de T_2 e T_2^* , que são o tempo de relaxação transversal (spin-spin), referente à componente do vetor magnetização, perpendicular ao campo magnético aplicado, e curto tempo de relaxação transversal, respectivamente. Em uma análise de IRM, quando o núcleo do átomo absorve energia pelas ondas de radiofrequência, aplicadas externamente,

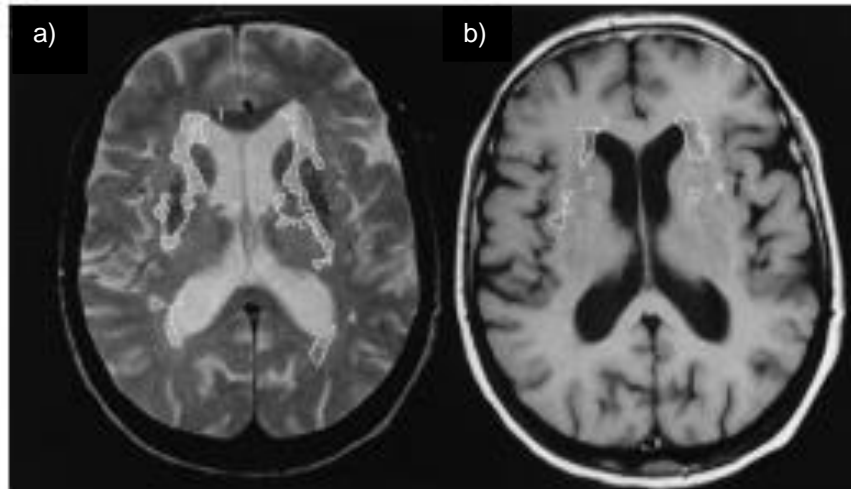
libera a energia em forma de sinal ao retornar ao seu estado de menor energia. A velocidade com que a amostra volta ao seu estado de mais baixa energia é chamada de relaxação. As nanopartículas distorcem o campo magnético local e modificam T_2 e T_2^* dos prótons da água nas moléculas de água circunvizinhas. Por isso os óxidos de ferro servem como um agente de contraste negativo em IRM para aplicações biológicas.

NPs superparamagnética de óxido de ferro desempenham um papel importante como agentes de contraste para ressonância magnética, para melhor diferenciar os tecidos saudáveis dos patológicos. A inclusão de partículas magnéticas no interior do tecido permite um sinal muito grande para ser obtido a partir de um scanner de ressonância magnética (FONTANIVE et al., 2014).

Agentes de contraste do tipo T_1 , contendo gadolínio, são os usados convencionalmente em clínicas, por produzir um aumento no sinal e dessa forma é mais favorável e mais fácil de distinguir as imagens, embora haja inconveniências no seu uso devido a interferência no tecido adiposo, seu potencial de toxicidade e um curto tempo de permanência no corpo, pois são rapidamente excretados (KEASBERRY et al., 2015). Por isso as nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro têm sido propostas para ser usadas como agentes de contraste (do tipo T_2) mais seguros devido a sua biocompatibilidade e capacidade de aumentar o contraste escuro nas imagens.

Dizem-se agentes de contraste positivos, os que possibilitam tornar a imagem mais clara afetando predominantemente o valor de tempo de relaxação longitudinal (T_1). Contrariamente, agentes de contraste negativos têm um efeito predominante no valor do tempo de relaxação transversal (T_2) e, portanto levam ao escurecimento da imagem. Imagens por ressonância magnética em que é evidenciado o efeito no T_1 dizem-se imagens ponderadas em T_1 , no caso do efeito evidenciado em T_2 estas se dizem ponderadas em T_2 (Figura 14) (CARVALHO, 2011).

Figura 14-a) imagem ponderada em T₂ e b) imagem ponderada em T₁.



Fonte: Carvalho, 2011.

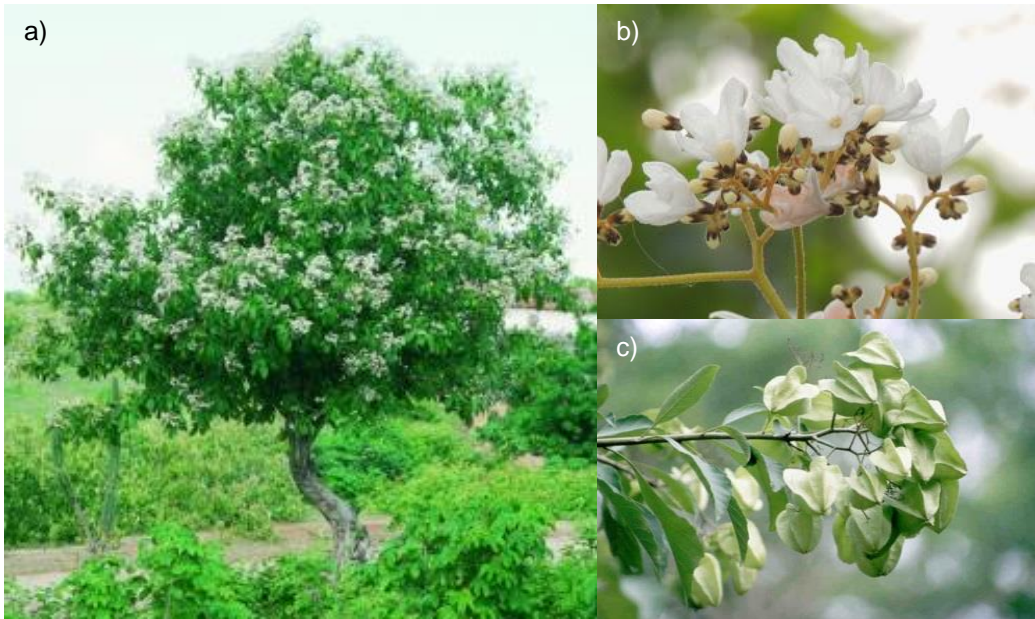
A técnica de IRM se apresenta vantajosa por ser não invasiva e não depositar energia ionizante, sendo ideal para estudos da marcação celular mediante análise dos tempos de relaxação característicos: tempo de relaxação longitudinal (T₁) e tempo de relaxação transversal (T₂) (MAMANI, 2012).

1.6 Oncocalyxone A

Muitas plantas são repositórios de compostos orgânicos, que podem conter substâncias farmacologicamente ativas que serveriam como drogas ou moléculas para o desenvolvimento de fármacos (JOSHI et al., 2013). A *Auxemma oncocalyx* Taub (*A. oncocalyx*) seria uma delas. Ela pertence à família Boraginaceae e é uma planta endêmica da região do nordeste brasileiro, comumente encontrada no Rio Grande do Norte e Ceará, particularmente da caatinga, um bioma exclusivo dessa região (BARRETO et al., 2013).

A. oncocalyx é uma árvore que tem entre 6 a 8 metros de altura e seu tronco possui diâmetro de 30 a 40 cm. Possui flores pequenas, densas e brancas e esta é uma particularidade que atribui ao seu nome popular “pau branco”. As folhas são simples, alternadas, elípticas, serrilhadas do meio ao ápice e com consistência membranosa. Seus frutos são drupas glabras de 2,5 cm (Figura 15) (REVILLA, 2016).

Figura15-*Auxemma oncocalyx* Taub (pau branco). a) Árvore, b) Flor e c) Fruto.

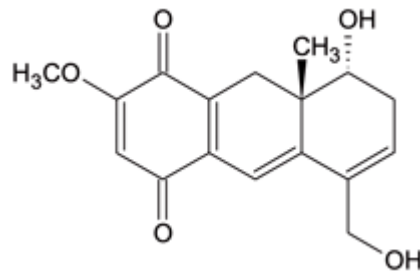


Fonte:<http://www.cnip.org.br>, 2017.

Pessoa et al., (1995) e Marques et al., (2000) afirmam que o extrato extraído do cerne da *A. oncocalyx* teve como resultado da sua análise fitoquímica várias quinonas, terpenoides e hidroquinonas com esqueleto C16. Dois destes metabólitos secundários, denominados oncocalyxona A (oncoA) e C foram obtidos em quantidades significativas. Ambos os compostos demonstraram atividade antitumoral (PESSOA et al., 2000), possivelmente relacionado com seus efeitos antimetabólicos e posteriormente foi demonstrado que em culturas primárias de linfócitos humanos a onco A é desprovida de genotoxicidade (FERREIRA et al, 2008; PESSOA et al., 2003).

A oncocalyxona A (C₁₇H₁₈O₅) é o principal metabolito secundário isolado a partir do extrato etanólico extraído do cerne de *Auxemma oncocalyx* Taub. A onco A (Figura 16) tem muitos usos farmacêuticos tais como: antitumoral, analgésico, antioxidante e inibidor de agregação plaquetária (JOSHI et al., 2013; COSTA et al., 2012).

Figura 16- Estrutura química da oncocalyxona A.



Fonte: Autor.

1.7 Cera de Carnaúba

A *Copernicia Cerifera*, conhecida popularmente como carnaubeira, pertence à família Palmae. É uma palmeira nativa do Brasil, mas também se desenvolve com facilidade em qualquer país com clima tropical. A carnaubeira existe em países como; África Equatorial, Ceilão, Equador, Tailândia e na Colômbia, mas apenas no ambiente seco das caatingas do Nordeste Brasileiro, especialmente nos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte, que ela se encontra em condições de exploração econômica e apenas no Brasil essa palmeira é capaz de produzir cera (CARVALHO e GOMES, 2004) (Tabela 1).

Tabela 1- Informações botânicas da carnaubeira.

Dados Botânicos	
Nome popular:	carnaúba, carnaubeira, carandá;
Família Botânica:	Palmae;
Nome Científico:	<i>Copernicia cerifera</i> Mart.;
Sinonímias:	<i>C. prunifera</i> Miller, <i>Corypha cerifera</i> Arruda.
Origem:	Nordeste do Brasil e Pantanal

Fonte: Rodrigues, 2004

A carnaubeira é conhecida como árvore da vida, devido sua quantidade de aplicações. Os frutos servem para alimentação, os caules no mercado de construção civil, as folhas servem para cobrir casas e fazer artesanato, as raízes são fontes de fitoterápicos (Figura17).

Figura 17- As diversas aplicações das partes constituintes da carnaubeira. a) Caule; b) Fruto; c) Raiz e d) Folha.



Fonte: Autor

A cera produzida a partir do pó de suas folhas tem inúmeras aplicações nas áreas de cosmético, eletrônica, alimentícia e nanomedicina (Figura18). A exploração dessa palmeira representa uma atividade economicamente viável, pois não é nociva ao meio ambiente, visto que, as folhas retiradas são espontaneamente repostas depois de algum tempo (GÓES e BEZERRA, 2016; CARVALHO e GOMES, 2004).

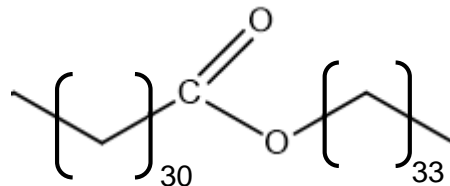
Figura 18- Produtos que contém cera de carnaúba. a) Eletrônicos, b) Maquiagens, c) Ceras para carros, d) Polidores de frutas, e) Embalagens de alimentos e f) Entrega de fármaco.



Fonte: Autor

As ceras são sólidos que repelem água e fazem parte do revestimento de proteção de vários seres vivos, incluindo as folhas de plantas, a pele dos animais e as penas de pássaros. Em geral, elas são misturas de ésteres formadas por ácidos carboxílicos e álcoois de cadeia longa (ANZENBERGER, 2016). A cera de carnaúba é uma cera natural e é um exsudato vegetal brasileiro da *Copernicia cerifera*, composta majoritariamente de ésteres de ácidos carboxílicos C24 e C28 e álcoois primários de cadeia linear C32 e C34 (Figura 19) (LOZHECHNIKOVA et al., 2017; MILANOVIC et al., 2010).

Figura 19-Composição química majoritária da cera de carnaúba.






Fonte: Autor

Devido seu alto ponto de fusão (83-86 °C) é amplamente utilizada como um aditivo em polimentos para carros, couro, pisos, vidros, papéis, alimentos (LOZHECHNIKOVA et al., 2017) e também em uma variedade de produtos, tais como; materiais eletrônicos, maquiagens, polidores de frutas, embalagens de alimentos e na entrega de fármaco. Alguns países desenvolvidos, como os Estados Unidos, não tem nenhuma fonte doméstica de cera de carnaúba e importa 100% dessa matéria-prima (HARRON et al., 2017).

O que define em qual área comercial a cera de carnaúba vai ser utilizada são suas características, para isso existem qualificações de acordo com as suas propriedades físicas. A cera tem diversas classificações, contudo a mais conhecida e validada internacionalmente desde 1980 relaciona os tipos 1, 3 e 4 (Tabela 2). O tipo 2 não é mais comumente comercializado devido se tratar de uma mistura das matérias-primas originárias (OLIVEIRA e GOMES, 2006).

Tabela 2- Descrição dos tipos de cera de carnaúba.

Cera de Carnaúba			
	Tipo 1 (Prime Yellow)	Tipo 3 (Light Fatty Grey)	Tipo 4 (Fatty Grey)
Nome popular	“Flor”	“Cauípe” ou “Gorda clara”	“Gorda escura” ou “gorda batida”
Parte da canaubeira onde é extraída a cera	Pó do “Olho” Folha	Pó de “Palha”	Pó de “Palha”
Aspectos físicos (cor e formato)	Amarelo-clara Escama	Castanha ou amarelo escuro Escama ou pedaços	Marrom-escuro ou marrom- esverdeado Escama ou pedaços
Área comercial	Indústriascosmética, farmacêutica, alimentícia e em emulsões	Indústrias químicas e de informática	Polidor para piso e fabricação de papel carbono
Imagens			

Fonte: Alves e Coelho, 2006; Oliveira e Gomes, 2006.

A carnaubeira não desperta apenas interesses econômicos, mas científicos também. Rodrigues, (2004) desenvolveu uma análise fotoquímica das folhas da carnaúba e encontrou ácidos graxos e hidrocarbonetos de cadeia longa. Ele também detectou a presença de substâncias com efeito antibacteriano, atividade antioxidante, analgésica e anti-inflamatória.

Figura 20- Imagens da *Copernicia Cerifera* (carnaubeira).



Fonte: <http://veravidalpaisagismo.blogspot.com.br>, 2016.

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas no campo da química fina com cera de carnaúba. Dentre elas a utilização da cera para sintetizar nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) com diversas aplicações.

Uma revisão recente destacou a importância da cera de carnaúba como excipiente lipídico em sistemas de administração de fármacos (NART et al., 2017; ROSIAUX et al., 2014).

NLSs têm sido propostas como veículos coloidais adequados para administração de drogas com baixa solubilidade. O cetoprofeno é uma droga modelo e foi incorporado as NLSs, preparadas a partir de uma mistura de cera de abelha e cera de carnaúba, usando Tween 80 e lecitina de ovo como emulsificantes. Uma alta eficácia de encapsulação da droga (97%) revelou a capacidade de NLS para incorporar um fármaco com baixa solubilidade em água, tais como o cetoprofeno. As análises realizadas indicaram estabilidade das nanopartículas em relação à quantidade do bioativo, pois a “liberação” do ativo foi insignificante após 45 dias de armazenamento (KHERADMANDNIA et al., 2010). Madureira et al., (2015) desenvolveram um trabalho semelhante, onde o objetivo foi produzir nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) estáveis usando cera de carnaúba como matriz lipídica sólida, para entrega do ácido rosmarínico, e posteriormente ser incorporado em matrizes alimentares. Obteve-se também uma alta eficiência de associação (aproximadamente 99%). As propriedades físico-químicas foram mantidas durante 28 dias de armazenamento sob-refrigeração e nenhum ácido rosmarínico migrou das nanopartículas para o meio aquoso durante esse período, indicando uma boa compatibilidade entre o ácido rosmarínico e o núcleo das NLSs de cera de carnaúba.

Em um trabalho desenvolvido por Arias et al., (2011) desenvolveu-se nanopartículas de cera de carnaúba para serem usadas para transportar o antígeno proteico HIV-gp 140. Os resultados mostraram que são capazes de induzir fortes respostas celulares imunitárias humorais / sem inflamação nas mucosas e possuem potencial para serem usados como vacinas anti-HIV.

As NLSs de cera de carnaúba também estão sendo usadas para desenvolver filtros solares mais eficazes. Um estudo desenvolvido por Hernández e Goymann (2005), caracterizou os sistemas transportadores de filtros solares inorgânicos com base em uma matriz composta de cera de carnaúba e oleato de decila. Houve um aumento significativo no Fator de Proteção Solar (FPS), aproximadamente 50, relatado após a encapsulação do dióxido de titânio.

1.8 Liberação controlada de Fármaco

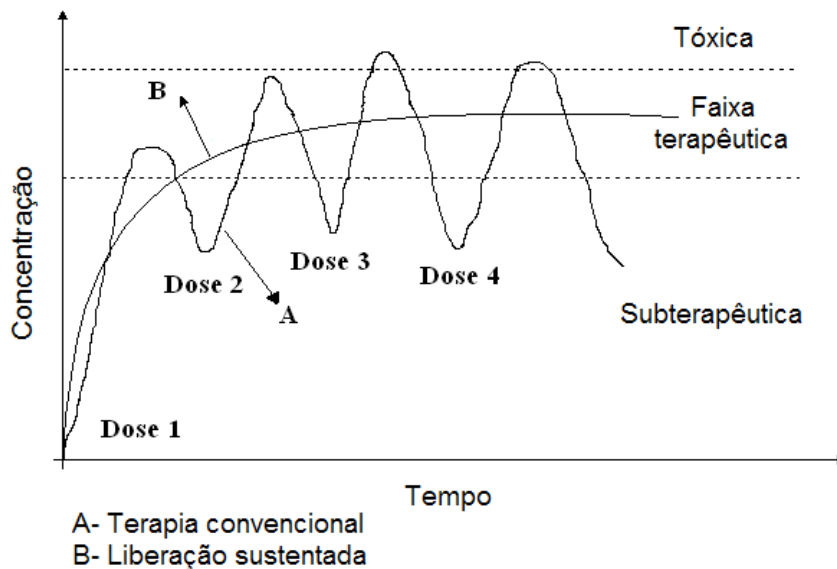
A ideia da liberação controlada de compostos biologicamente ativos começou a ser empregada nos anos 50 com a chegada dos materiais poliméricos (SOUZA e MOHALLEM, 2011).

Um dos grandes problemas encontrados pelas ciências da saúde e pelas indústrias farmacêuticas são a baixa solubilidade da maioria dos fármacos em água e os efeitos colaterais causados pela liberação desordenada desses fármacos no organismo. E aperfeiçoar esses parâmetros, como reduzir as doses de administração, o nível de toxicidade e os efeitos colaterais, está sendo objeto de estudo contínuo de grandes pesquisas. Os aspectos mais estudados nos fármacos são a solubilidade em água, a liberação e a distribuição biológica no organismo (MOURA, 2013).

Estima-se que quase metade dos fármacos falha em suas formulações farmacêuticas devido a sua baixa solubilidade em água (PATRAVALE, 2004). Um fator limitante para o desempenho *in vivo* de fármacos pouco solúveis em água é a sua resistência em ser umedecido e dissolvido nos fluidos do trato gastrointestinal. O aumento da solubilidade de fármacos pouco solúveis em água é, portanto, muito importante para incrementar sua taxa de absorção no organismo (biodisponibilidade).

Na liberação existe um conceito farmacológico chamado de faixa terapêutica, que é a faixa de concentração do fármaco no organismo na qual ele exerce sua atividade com eficiência e sem causar danos ao paciente. Muitas vezes, ao se administrar um medicamento a um paciente, a sua concentração inicial é alta, podendo até ultrapassar a concentração máxima da dose terapêutica, e após um curto tempo fica abaixo da concentração mínima, seguindo um ciclo como mostra a Figura 21. Visando estabilizar a concentração do fármaco dentro dessa faixa terapêutica após sua administração e, assim, diminuir as doses do medicamento e seus efeitos colaterais, tem-se desenvolvido sistemas de encapsulação de fármacos para liberação controlada. Tais sistemas também possuem a vantagem de conferir uma maior estabilidade química ao fármaco, ao protegê-lo de fatores externos tais como o pH gástrico e o calor no ambiente de armazenagem do fármaco (MOURA, 2013).

Figura 21- Gráfico da concentração do fármaco na corrente sanguínea *versus* tempo de administração: curva A, uma formulação convencional, e curva B, uma formulação ideal de liberação controlada.



Fonte: Adaptado de Peppas(1997).

Outro aspecto muito estudado é a distribuição do fármaco até o alvo do tratamento. Quando um fármaco entra no organismo, ele é distribuído pela corrente sanguínea e atingem tecidos e órgãos que não são o alvo do tratamento, podendo causar vários efeitos colaterais e assim comprometer a segurança ou agregar desvantagem terapêutica. Com isso, nos últimos anos, investiga-se sistemas “inteligentes” que direcionem o fármaco até o alvo específico (por exemplo, tecidos tumorais), onde serão liberados.

Os sistemas magnéticos mostram uma vantagem por unir as características de polímeros termossensíveis com o campo magnético externo para permitir uma forma adicional de controle da liberação de fármacos (SOUZA e MOHALLEM, 2011).

Um exemplo é a entrega de fármaco induzida magneticamente. O *design* de sistemas inteligentes para a administração de fármacos é um desafio na biomedicina, devido à sua capacidade de proporcionar um tratamento terapêutico adicional na área desejada através da liberação controlada de drogas. Uma estratégia para conseguir isto é incorporar NPs magnéticas em polímeros termoativos ou hidrogéis, os quais possam contrair e expandir de forma reversível como consequência do aumento da temperatura induzida magneticamente pelo efeito da

hipertermia, de tal modo que possam entregar a quantidade de agentes terapêuticos necessários de forma controlada (BAÑOBRE et al., 2013).

Quando NPs estão dispersas homoganeamente em uma matriz polimérica e entram em contato com o sistema biológico, acontece a difusão normal do fármaco, por causa do gradiente de concentração. No entanto, a aplicação de um campo magnético externo alternado, poderá liberar mais rapidamente uma maior quantidade de fármaco. Os parâmetros críticos para a regulação da liberação compreendem a posição, orientação e força magnética das partículas incorporadas no polímero e ainda a frequência e a amplitude do campo magnético aplicado. Além dos parâmetros existentes das partículas magnéticas e do campo magnético, a natureza do polímero precisa ser levada em consideração. Caso a matriz polimérica não seja biodegradável, ela terá que ser removida do corpo humano através de cirurgia, o que ocasionaria um elevado custo e risco para o paciente. Por isso a imprescindibilidade do uso de polímeros biodegradáveis, que se fragmentam em pedaços menores, não tóxicos e que possam ser excretados facilmente pelo corpo (CUNHA, 2014).

Após a administração das NPs, as que possuem um diâmetro acima de 200 nm, são simplesmente isoladas pelo baço e fagocitadas, ocasionando uma diminuição do tempo de circulação no sangue. Em contrapartida, as partículas com diâmetros menores que 10 nm são rapidamente removidas pelos rins. Partículas com diâmetro que variam entre 10 a 100 nm são eficazes para a injeção intravenosa e possuem um maior tempo de circulação na corrente sanguínea. Essas NPs são consideravelmente pequenas para evitar a eliminação pelo sistema reticuloendotelial (RES) do corpo (OLIVEIRA, 2014; LAURENT et al., 2008; LU, SALABAS e SCHÜTH, 2007).

JUSTIFICATIVA

As nanopartículas magnéticas (NPMs) têm sido amplamente investigadas pelo seu grande potencial como mediadores de calor em Hipertermia magnética (HM). A apoptose de células tumorais, em HM, ocorre através do calor gerado pelas NPMs, uma consequência direta das suas propriedades de aquecimento sob um campo magnético alternado aplicado. No entanto, a HM poderia permitir outras ações sinérgicas além da morte de células cancerígenas.

Estes nanocarreadores também têm atraído muita atenção devido à possibilidade de direcionamento do fármaco em locais específicos, limitando assim os efeitos sistêmicos. O aumento do efeito anticancerígeno da quimioterapia concomitante com Hipertermia foi observado há mais de trinta anos. Contudo, combinar NPMs com moléculas de drogas na mesma nanoformulação, surgiu a poucos anos, como uma ferramenta promissora para a aplicação de HM com quimioterapia ou radioterapia para o tratamento da neoplasia maligna.

Outra grande contribuição das nanopartículas magnéticas tem sido em imagem por ressonância magnética (IRM). As NPs de óxido de ferro (Fe_3O_4) têm sido utilizadas como agentes de contraste em IRM, para diagnosticar tumores e doenças cardiovasculares, isso se deve principalmente a sua baixa toxicidade em seres humanos e a possibilidade de se controlar sua magnetização.

No presente trabalho foi desenvolvido pela primeira vez nanossistemas magnéticos com matriz lipídica de cera de carnaúba com potencial aplicação terapêutica. Os resultados são bastante promissores para o desenvolvimento para fins terapêuticos.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Sintetizar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas (NLSMs) a base de cera de carnaúba e $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ para aplicação em Hipertermia Magnética (HM) e Imagem por Ressonância Magnética (IRM).

2.2 Específico

- Sintetizar nanopartículas hidrofóbicas de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$);
- Preparar formulações de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) e Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSM);
- Determinar a concentração de ferro nas emulsões e no ferrofluido, através da análise de Espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES).
- Determinar o tamanho, a polidispersão e o potencial zeta das NLSMs e NLS;
- Avaliar a morfologia e estrutura das NLSMs e NLS por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Caracterizar as NLSM, NLS e $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ por Análise térmica (Termogravimétrica) e por Difração de Raio-X (DRX);
- Avaliar por relaxometria magnética o potencial das NLSM para o uso em Imagem por Ressonância Magnética (IRM);
- Investigar a característica de aquecimento das NLSMs em hipertermia magnética;
- Determinar a capacidade das NLSMs como agente de contraste nos ensaios de IRM.
- Analisar a liberação *in vitro* do fármaco oncolítico A nas NLS e NLSM com e sem Hipertermia Magnética.
- Determinar através do SQUID o comportamento magnético das NLSMs, NLS e $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ em função do campo magnético e da temperatura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Lipídeos e Ativo

Para fazer as NLSMse NLS utilizou-se os lipídeos ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$) da Sigma-Aldrich ($\geq 85\%$ Pureza) e cera de carnaúba [$H_3C(CH_2)_{30}COO(CH_2)_{33}CH_3$] do tipo 1 fornecido gentilmente pela Empresa Pontes, Ltda.

O ativo oncocalyxona A foi cedido pelo Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II (LAFIPLAM II) da Universidade Federal do Ceará.

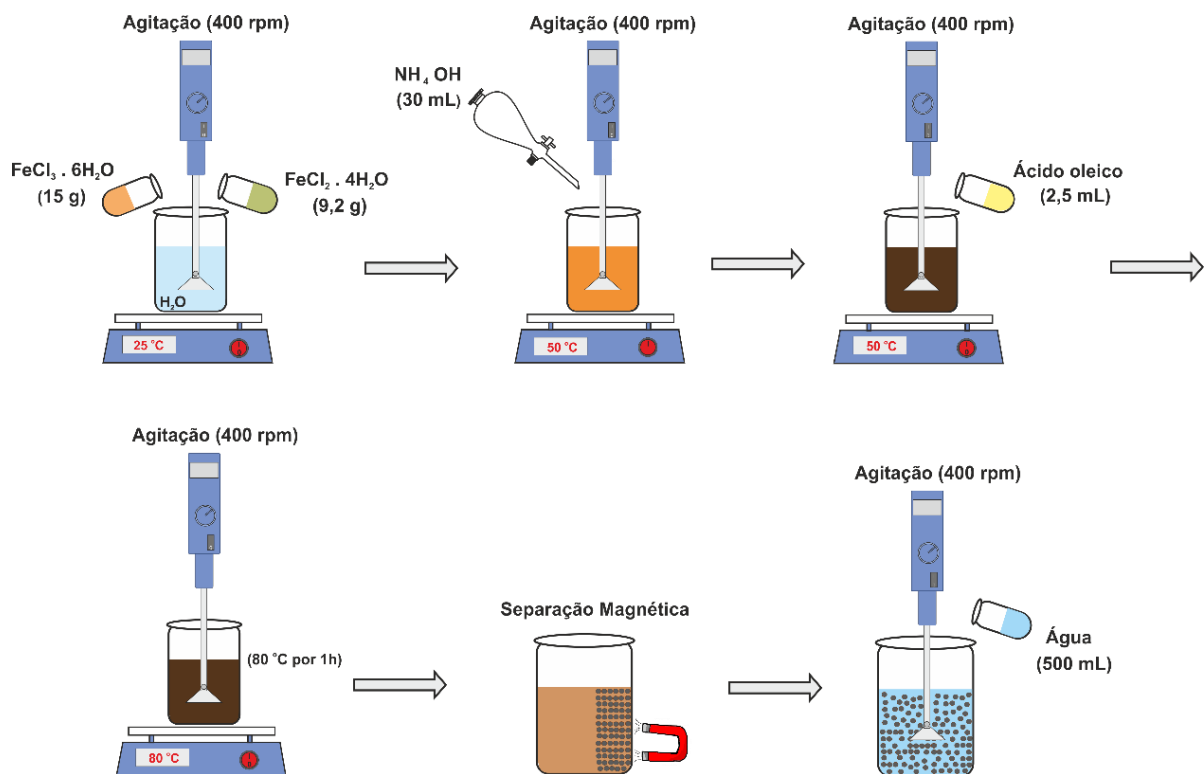
3.2 Síntese de nanopartículas magnéticas

Nanopartículas hidrofóbicas de magnetita ($Fe_3O_4@AO$) foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, segundo Kolen'ko et al., 2014.

Resumidamente, 9,2 g de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (99%, Sigma-Aldrich[®]) e 15 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (99%, Sigma-Aldrich[®]) foram dissolvidos em um béquer de 500 mL contendo 250 mL de água deionizada (produzido por Milli-Q Advantage A10 system, Millipore[®]), obtendo-se uma solução límpida de cor laranja. Quando o sistema atingiu 50 °C, adicionou-se 30 mL de solução aquosa de amoníaco (28-30%, Sigma-Aldrich[®]). Na sequência, obteve-se uma suspensão de cor preta, na qual foram adicionados 2,5 mL de ácido oleico.

O sistema foi mantido a 50 °C por 30 min e, posteriormente, aquecido a 80 °C por mais 1 h. Em seguida, as $Fe_3O_4@AO$ foram coletadas com o auxílio de um ímã e dispersas em 500 mL de água com o auxílio de um agitador mecânico. Este processo foi repetido 5 vezes. Todos os procedimentos supracitados foram realizados sob agitação constante a 400 rpm e estão ilustrados na Figura 22.

Figura 22- Esquema do processo de obtenção de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$.

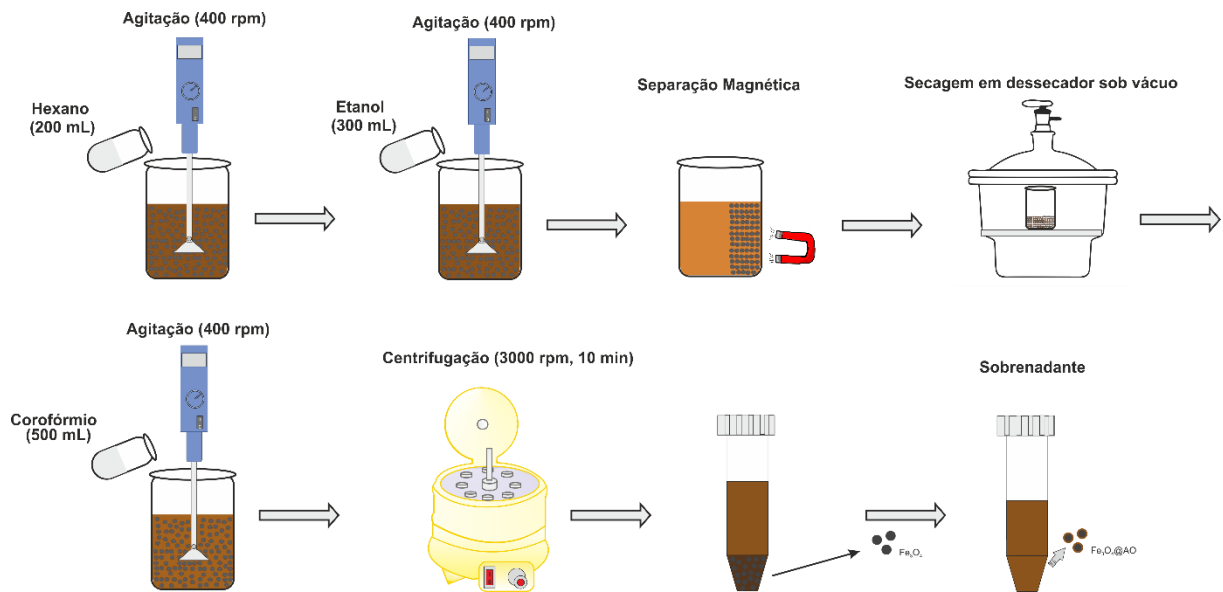


Fonte: Almeida, 2016.

Para remover o excesso de ácido oleico, as $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ foram dispersas em 200 mL de hexano. Posteriormente, estas foram precipitadas pela adição de 300 mL de etanol e coletadas com o auxílio de um ímã. Após repetir este processo por 4 vezes, as $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ foram secas a vácuo por 6 h à temperatura ambiente, para total remoção do etanol.

O produto resultante foi, então, redisperso em clorofórmio (Sigma-Aldrich®) e centrifugado a 3000 rpm durante 10 min (centrifuga universal 320, Hettich®) para a remoção de quaisquer sólidos insolúveis. Na sequência, obteve-se as $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ na forma de ferrofluido (Figura 23).

Figura 23- Esquema do processo de remoção do excesso de ácido oleico das Fe₃O₄@AO.



Fonte: Almeida, 2016.

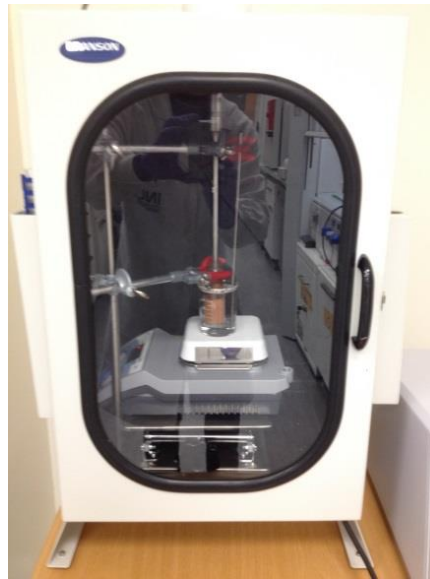
3.3 Síntese de Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSMs)

3.3.1 Método fusão-emulsificação

A fase orgânica (FO) foi preparada a partir de 400 mg da cera de carnaúba e diferentes proporções de Fe₃O₄@AO (Tabela 3), onde a porcentagem no nome das NLSM é a massa de Fe em relação a massa da cera de carnaúba. No preparo da FO, o lipídeo foi previamente fundido a uma temperatura de 85 - 90 °C, para posterior adição das partículas de Fe₃O₄@AO. Na sequência, a fase aquosa (FA) foi preparada dissolvendo-se 50 mg de Tween[®] 80 em 10 mL de água deionizada e, em seguida, aquecida a mesma temperatura da FO.

Mantendo-se a temperatura, a FA foi vertida sobre a FO. Em seguida, a emulsão foi sonicada em um ultrassom (modelo W-450D Branson Sonifier[®]) com amplitude de 50% por 2 min (Figura 24).

Figura 24- Imagem do ultrassom utilizado para fazer as NLSMs.



Fonte: Autor

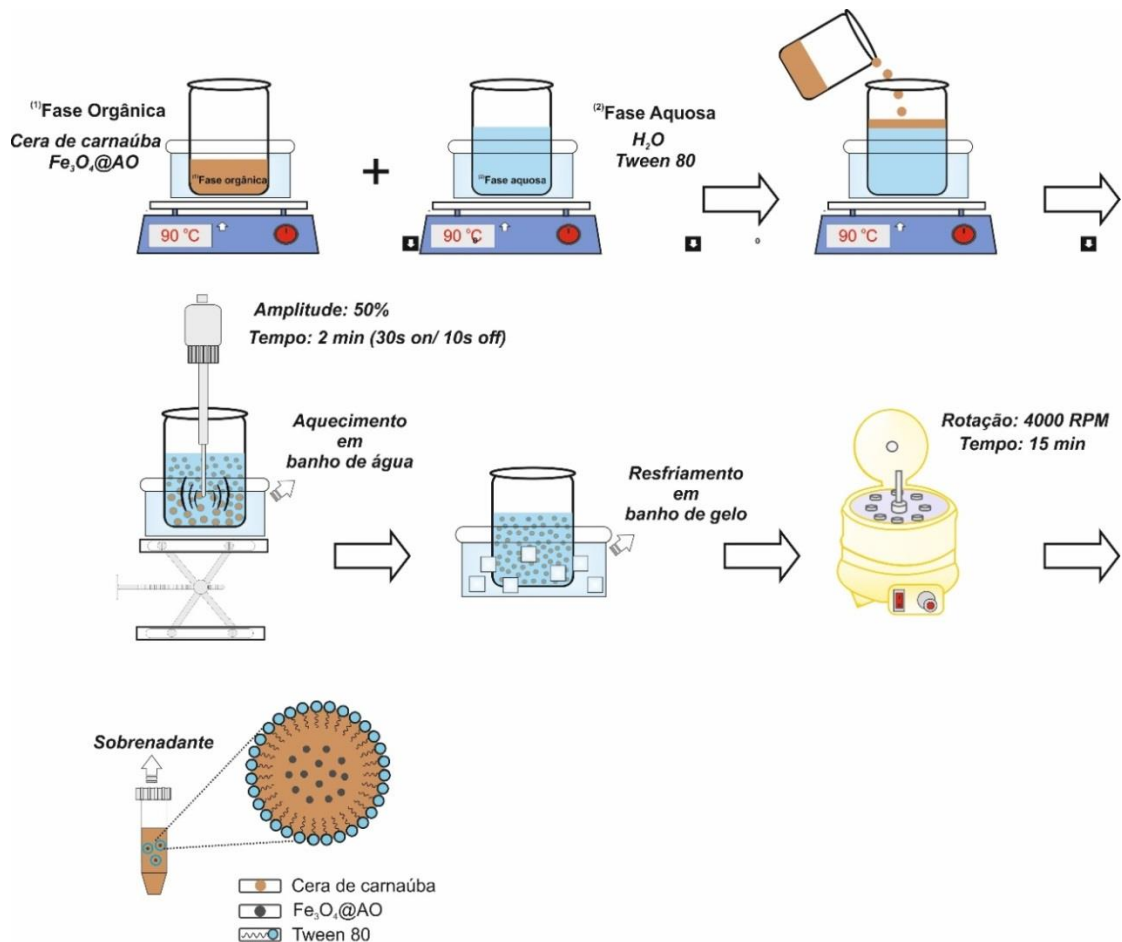
Em seguida, a dispersão foi resfriada, seguindo-se a solidificação do lipídeo e obtenção das dispersões de NLSM. Na sequência, o material foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 min (centrífuga universal 320, Hettich®), para remover quaisquer sólidos insolúveis (Figura25).

Tabela 3- Composição lipídica das formulações de NLSM obtidas pelo método de fusão-emulsificação.

Formulação	Composição lipídica		Composição aquosa	
	Cera de carnaúba (mg)	Fe ₃ O ₄ @AO [Fe]=39,2 g/L (mg)	Tween® 80 (mg)	Água deionizada (g)
NLS	400	0	50	10
NLSM 1%	400	4	50	10
NLSM 3%	400	12	50	10
NLSM 5%	400	20	50	10
NLSM 7%	400	28	50	10

Fonte: Autor

Figura 25- Esquema do processo de obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSMs) pelo método de fusão-emulsificação.



Fonte:Autor.

A NLS foi obtido através do mesmo experimento citado anteriormente para as NLSMs, a única diferença é a ausência de $Fe_3O_4@AO$ na fase orgânica.

3.4 Tamanho de Partícula

A análise foi realizada utilizando-se um ZS-100 nanopartica (Horiba®). As dispersões de NLSM e NLS foram diluídas em água deionizada na proporção 1:1000 (v/v) (NLSM: H_2O) e analisadas a um ângulo fixo de 90 °C a 25 °C. O tamanho médio e a distribuição de tamanho (polidispersão) das NLSM foram expressos como média de três determinações.

3.5 Potencial Zeta

A carga de superfície das NLSM e NLS foi avaliada através da determinação do potencial zeta utilizando-se um ZS-100 nanopartica (Horiba®). As análises foram realizadas diluindo-se as dispersões de NLSM em água deionizada na proporção 1:1000 (v/v) (NLSM:H₂O) e os resultados foram expressos como média de treze determinações.

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens microscópicas, bem como dados sobre a composição química das NLSM e NLS, foram analisadas por meio Titan ChemSTEM 80-200 kV, probe corrected, equipado com espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDX). As NLSM foram diluídas em água deionizada na proporção 1:1000 (v/v) (NLSM: H₂O) e depois depositadas diretamente numa grade de cobre revestida com carbono e secas a vácuo.

3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens foram obtidas por MEV através de um Quanta 650 FEG ESEM (FEI Company). As dispersões aquosas de NLSM e NLS foram diluídas em água deionizada na proporção 1:1000 (v/v) (NLSM: H₂O), depositada sobre um substrato de silício e secas a vácuo.

3.8 Hipertermia Magnética (HM)

As medidas de HM foram realizadas em um instrumento DM100 (nanoScale Biomagnetics®), ilustrado na Figura 26. As amostras foram colocadas em frascos de 1,5 mL e medidas sob a forma de dispersão aquosa em um campo magnético de 200 G e uma frequência de 869 kHz.

Figura 26- Imagem do equipamento utilizado nos ensaios de hipertermia.



Fonte: Autor

3.9 Análise Térmica

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada em um Mettler-Toledo® TGA / DSC em atmosfera de ar sintético. Para a análise, as amostras foram aquecidas de 25 a 120 °C (5 °C min⁻¹), permaneceram 120 °C por 10 min e 120 a 700 °C (10 °C min⁻¹).

3.10 Relaxometria Magnética

As amostras foram medidas em um relaxômetro Bruker Minispec (Figura 27) de 1,41T a 37 °C para obter os valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) e transversal T_2 . As NLSMs e NLS foram diluídas, em água deionizada, em 3 diferentes concentrações: 1°) 5 μ L da NLSM \rightarrow 500 μ L de solução, 2°) 10 μ L da NLSM \rightarrow 500 μ L de solução e 3°) 15 μ L da NLSM \rightarrow 500 μ L de solução. Os resultados foram expressos como média de três determinações. Os valores obtidos qualificaram a amostra para a análise de IRM.

Figura 27- Equipamento usado em Relaxometria magnética.



Fonte: Autor

3.11 Imagem por Ressonância Magnética (IRM)

Foi utilizado um espectrômetro de RMN Bruker DRX400 de 9,4T (Figura 28). As imagens foram obtidas em um MR Solutions (Guildford, UK) de bancada horizontal em um campo de 3T para uma imagem ponderada em T_2 , spin eco rápida (FSE) com um tempo de repetição $TR = 12000$ ms e o tempo de eco $TE = 11$ ms. Utilizou-se uma gaiola com diâmetro de 56 mm e uma bobina para transmitir e receber o sinal. As NLSMs e NLS foram medidas em diferentes concentrações (1,34 a 205,48 μM de Fe) e colocadas em tubos de eppendorf com capacidade de 300 μL .

Figura 28- Equipamento de imagem por ressonância magnética.



Fonte: Autor

3.12 Espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES)

A concentração de ferro nas emulsões e na magnetita foi determinada pela análise de ICP-OES, em um equipamento ICPE-9000 Shimadzu. Foi utilizado ácido clorídrico ou ácido nítrico para degradar as amostras. As soluções foram filtradas em membrana Millipore 0,45 μm .

3.13 Difração de Raios-X

Os dados de difração de raios-X (DRX) foram obtidos em um difratômetro X'Pert PRO (PANalytical®) regulado a 45 kV e 40 mA e equipado com radiação Cu K ($\lambda = 1,541\ 874\ \text{\AA}$), usando geometria Bragg- Brentano em intervalo 2θ de 10 a 80 ° com uma velocidade de digitalização de 0,006 ° s⁻¹.

3.14 Magnetometria SQUID

As medidas foram realizadas em equipamento Quantum Design SQUID/VSM. Para determinar a magnetização de saturação e o perfil magnético das nanopartículas em função de um campo magnético externo de corrente direta, foram realizadas medidas às temperaturas fixas de 300 K e 2 K, variando o campo de -20 KOe até +20 KOe (Oersted, unidade eletromagnética em sistemas CGS, usadas para campos magnéticos auxiliares).

3.15 Liberação *in vitro*

O estudo de liberação *in vitro* da oncoalyxona A (onco A) nos sistemas NLS e NLSM foi realizado através da técnica de diálise com e sem Hipertermia Magnética. Utilizou-se uma membrana de diálise de celulose com massa molecular de corte (MWCO) de 3500 g/mol, da Sigma-Aldrich.

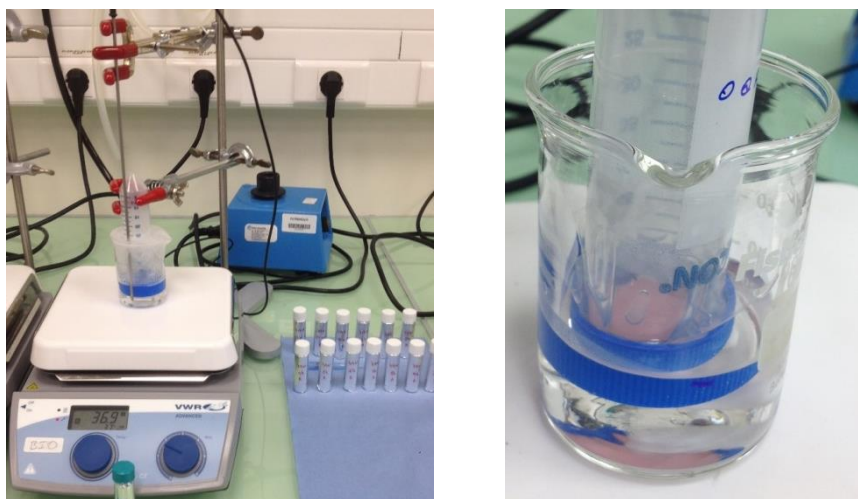
O material utilizado na liberação foi preparado da seguinte forma: a onco A foi dispersa nas nanofurmulações a 0,05% do volume total da emulsão. Pegou-se 1,5 mL da emulsão e centrifugou-se a 2000 rpm por 40 min dentro de um eppendorf com um filtro (30 kDa), mediu-se o volume do centrifugado (fármaco livre). O que ficou no filtro (fármaco encapsulado) foi invertido em outro eppendorf e novamente

centrifugado a 2000 rpm por 5 min, para que toda a emulsão saísse do filtro. Reconstituiu-se o volume do recuperado com água deionizada. Em seguida, foi inserido na membrana de diálise (MWCO= 3500 g/mol) e imerso em 25 mL de água deionizada a 37 °C ($\pm 0,2$ °C) (Figura 29). Em intervalos de tempo determinados, alíquotas de 1 mL do meio de liberação foram retiradas e o volume foi reconstituído com 1 mL de água deionizada a mesma temperatura.

Para fazer a quantificação das amostras foi preciso diluí-las em clorofórmio para a quantificação do bioativo encapsulado e em água para a quantificação do bioativo liberado. Em seguida as amostras foram quantificadas por espectroscopia de Fluorescência (encapsulado) no comprimento de onda de 663 nm e de UV/Vis (Livre) no comprimento de onda do bioativo (490 nm).

O mesmo procedimento citado acima foi realizado para a liberação com Hipertermia magnética. Utilizou-se uma frequência de 560 kHz e um campo de 190 Oe.

Figura 29- Imagem do sistema de liberação sem aplicação do campo magnético.



Fonte: Autor

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do ferrofluido Fe₃O₄@AO

A reação química que descreve o processo de obtenção da magnetita (Fe₃O₄) está representada na Equação 1. A Figura 30 ilustra a resposta do ferrofluido ao campo magnético externo, evidenciando-se a presença de propriedades magnéticas.

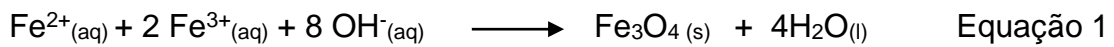


Figura 30- Característica macroscópica do ferrofluido Fe₃O₄@AO.



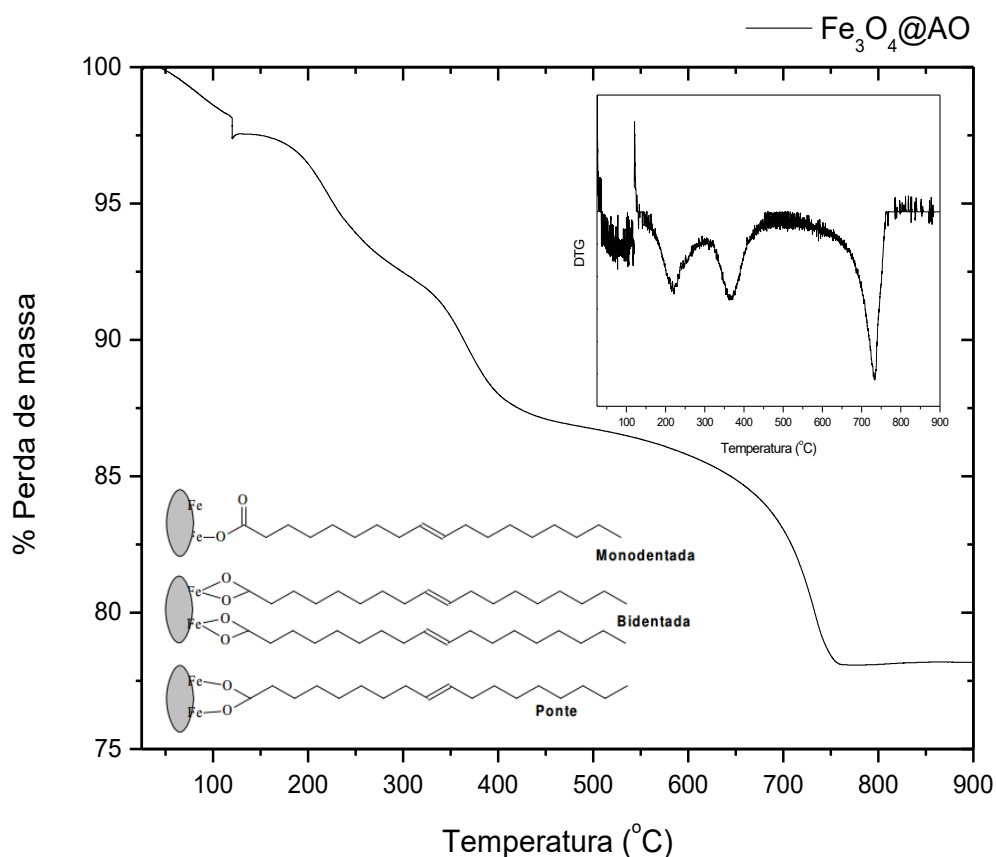
Para determinar a concentração de Fe no ferrofluido, realizou-se uma Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma (ICP OES), na qual se obteve um valor de concentração média de 39,2 g/L de Fe ou 54,18 g/L Fe₃O₄.

Devido a atração dipolar anisotrópica as nanopartículas de óxidos de ferro tendem a se agregar em grandes grupos e, assim, perder as propriedades específicas associadas a nanoestruturas magnéticas de monodomínio (SUN et al., 2006). Portanto, a modificação superficial das nanopartículas magnéticas (NPMs) com ácido oleico é essencial para sua estabilidade.

Como intuito de avaliar o teor de ácido oleico nas partículas de Fe₃O₄@AO, realizou-se uma análise termogravimétrica (TGA). Para isso, utilizou-se partículas de Fe₃O₄@AO na forma de pó (secas em estufa a 60 °C por 1h, até total evaporação do solvente). Nas curvas de TGA/DTG (Figura 31), observou-se 4 eventos de perda de

massa no intervalo de 25 a 900 °C. Uma ligeira perda de massa observada entre 35-120 °C é referente a moléculas de H₂O adsorvidas na superfície da amostra Fe₃O₄@AO. Os 3 eventos no intervalo de 160-760 °C são atribuídos a degradação das moléculas de ácido oleico. No entanto, a degradação em 3 etapas indica a presença de interações distintas entre as moléculas de oleico e os átomos metálicos superficiais. Segundo Viali et al., (2010) as ligações do ácido oleico e os íons de ferro da superfície das nanopartículas de óxido de ferro podem ser do tipo: monodentada, bidentada ou ponte, explicando assim a ocorrência de degradação em três etapas. Desta forma, o percentual de perda de massa oriundo das moléculas de oleico abrange um total de 19,5%.

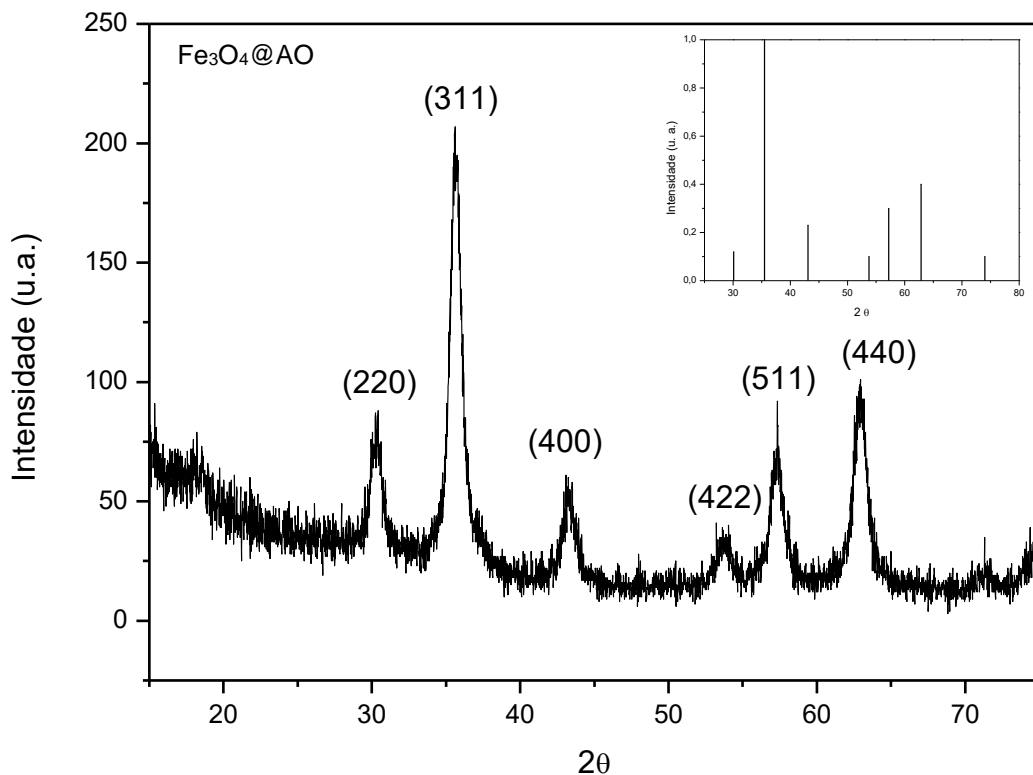
Figura 31- Curvas de TGA/DTG para amostra Fe₃O₄@AO em pó.



Por difração de raios-X, avaliou-se a estrutura do pó de Fe₃O₄@AO. Não detectou-se nenhum pico DRX relacionado a outras fases cristalinas, incluindo as misturas mais prováveis, como maghemita (γ -Fe₂O₃), hematita (α -Fe₂O₃) ou goethita (α -FeOOH) (KOLEN'KO et al., 2014). A Figura 32 mostra os padrões de difração de

raios-X das NPs de magnetita sintetizada e o padrão ASTM (Sociedade Americana de Testes e Materiais) para Fe_3O_4 . Comparando o DRX da mesma com o espectro de difração padrão dos núcleos puros de óxido de ferro confirmou-se a pureza mineralógica dos núcleos Fe_3O_4 e sua alta cristalinidade (responsável pelo comportamento superparamagnético e excelente capacidade de resposta ao campo magnético) (ESCALONA et al., 2016; REDDY et al., 2012). Os picos de difração em 2θ (30,1; 35,5; 43,1; 53,75; 57,2 e 62,85) correspondem, respectivamente, aos planos cristalinos (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) e (4 4 0) característicos da estrutura de Fe_3O_4 (BEIRAGHI, POURGHAZI e AMOLI-DIVA, 2014; TAN e BAKAR, 2013; LÉON et al., 2011). Na estrutura de espinélio inverso os íons Fe^{3+} ocupam 8 sítios tetraédricos e 8 sítios octaédricos, totalizando 16 sítios, e os íons Fe^{2+} ocupam 8 sítios octaédricos, resultando na célula unitária de fórmula $[\text{Fe}^{3+}]_8[\text{Fe}^{3+}_8 \text{Fe}^{2+}_8] \text{O}_{32}$ (LÉON et al., 2011).

Figura 32-Difratograma da amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ (Inserção: Sociedade Americana de Testes e Materiais, ASTM, padrão para Fe_3O_4).



A partir da curva de magnetização obtida através do Dispositivo Supercondutor de Interferência Quântica (SQUID-Superconducting Quantum

Interference Device), foi possível determinar as propriedades magnéticas da $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$.

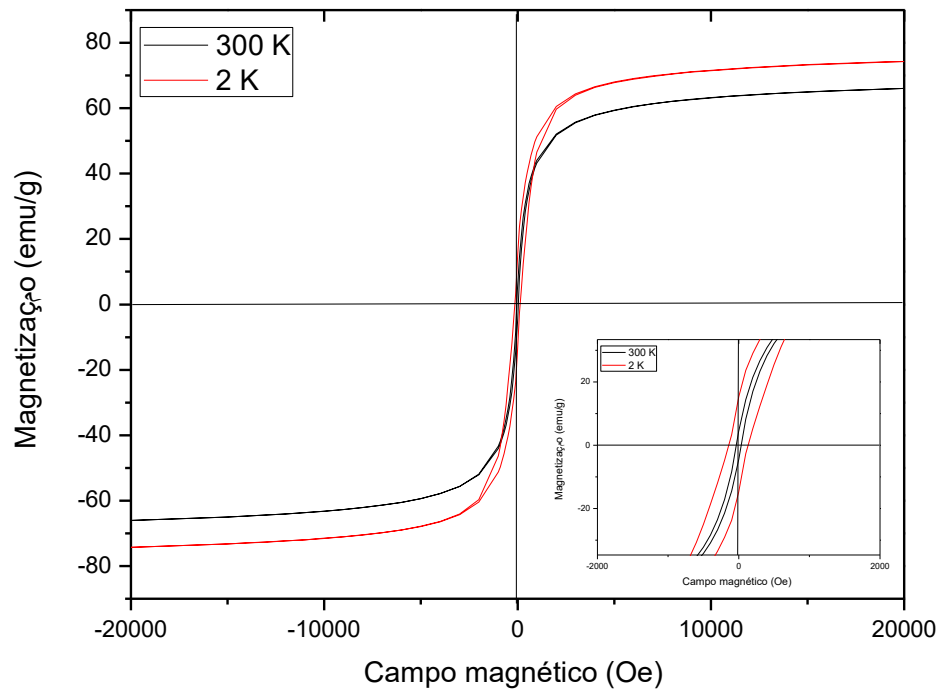
A magnetização de saturação (M_s), magnetização remanescente (H_r), histerese e coercividade (H_c) podem ser vistas na Figura 33. O gráfico exibe curvas de magnetização *versus* o campo magnético, com dependência da temperatura (300 K e 2 K). A Figura 33 mostra um perfil de curva de NPs muito semelhante ao comportamento superparamagnético (SPM), o mesmo foi observado por Kolen'ko et al., (2014), em partículas semelhantes ao desse trabalho. A magnetita, tanto a 300 K quanto a 2 K, praticamente não apresentou histerese e sua coercividade e magnetização remanescente exibiram baixos valores. A $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ exibiu elevados valores de magnetização de saturação, bem próximos aos encontrados por Kolen'ko et al., (2014) (70-85 emu/g), sendo de 74,24 emu/g e 66,06 emu/g para 2 K e 300 K, respectivamente. Essas características podem confirmar um caráter muito próximo ao superparamagnetismo das NPMs.

Esse comportamento SPM permite que a magnetização das nanopartículas aconteça apenas na presença de um campo magnético externo, ou seja, não retém magnetização na ausência de campo. Assim, quando se retira o campo magnético externo, nenhum comportamento magnético, magnetização remanescente e coercividade são encontrados.

Esta característica de NPs superparamagnéticas torna-se muito vantajosa para utilizações biomédicas visto que, na ausência do campo magnético, as partículas deixarão de ser atraídas umas pelas outras, diminuindo consideravelmente o efeito de agregação, indesejável para este tipo de aplicação (KOLHATKAR et al., 2013).

As nanopartículas magnéticas sintetizadas não só mostraram comportamento semelhante ao superparamagnetismo, mas também exibiram uma alta magnetização de saturação.

Figura 33- Curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para a Fe₃O₄@AO.



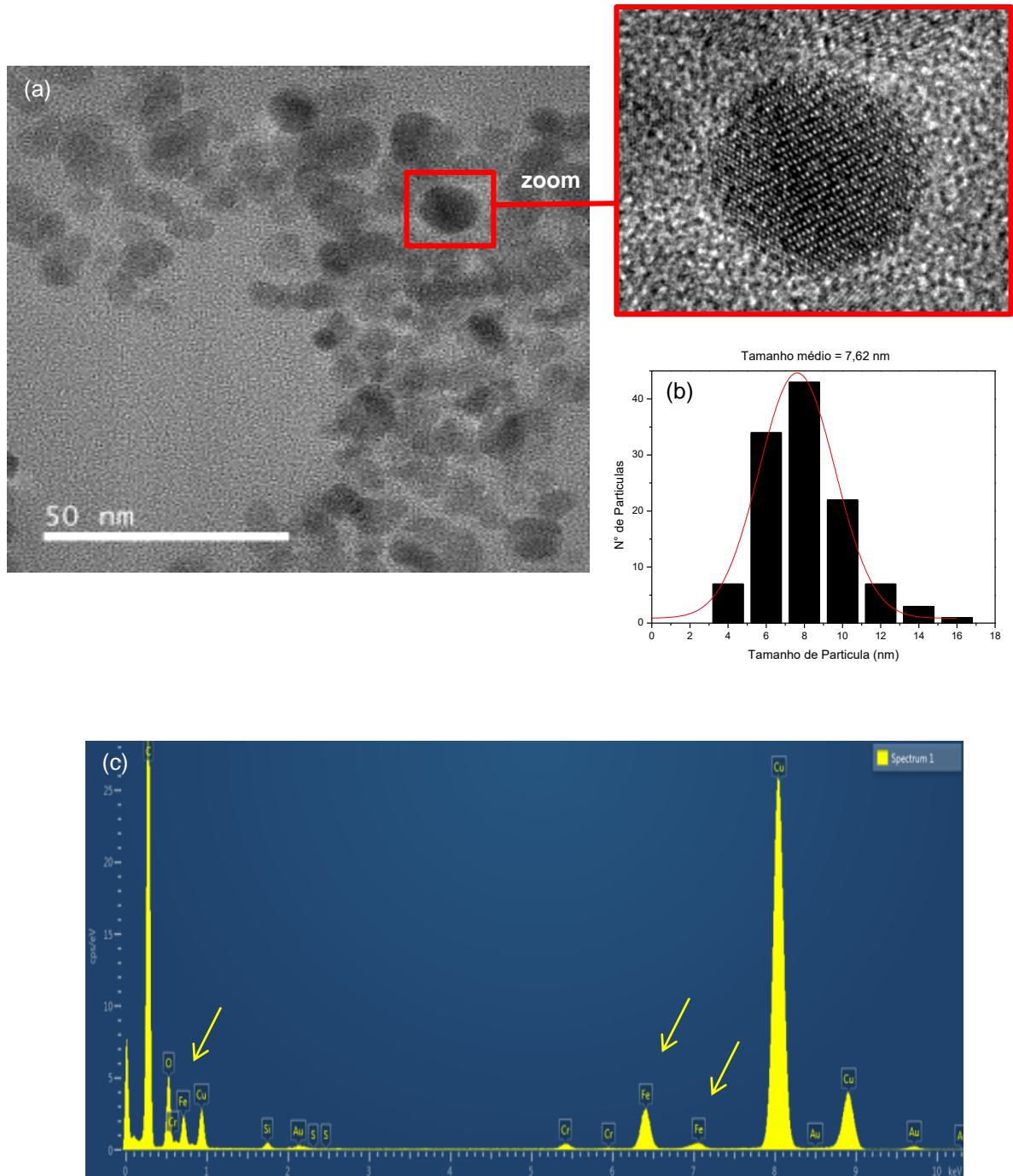
A partir da imagem de MET (Figura 34b), foi possível inferir o tamanho de partícula para a amostra Fe₃O₄@AO variando de 4 a 12 nm obtendo-se um diâmetro médio de 7,62 nm. Foi calculado através do programa Fiji (Image J), a partir da medição de aproximadamente 120 partículas, para isso utilizou-se várias micrografias obtidas por MET incluindo a apresentada na Figura 34. Esse tamanho permite a essas nanopartículas apresentarem comportamento superparamagnético (≤ 20 nm) (LU et al., 2007).

Foi possível avaliar a morfologia, relativamente, esférica adquirida pelas partículas de Fe₃O₄@AO. Esse fato decorre da presença de uma camada de ácido oleico revestindo as Fe₃O₄ (PANG et al., 2007). Além disso foi possível observar a cristalinidade da amostra. A Figura 34a (ampliada) fornece evidências de que as nanopartículas são cristalinas, corroborando com os dados obtidos por DRX. Esta imagem apresenta regiões seguindo um ordenamento atômico de planos cristalinos nas nanopartículas (KOLEN'KO et al., 2014; OLIVEIRA, 2014, SILVA, 2012).

Através do resultado de energia dispersiva de Raios-X (EDX) foi possível fazer uma análise semi-quantitativa dos elementos químicos na superfície dos materiais. Através da Figura 34c observou-se a presença de um pico intenso de Cu,

C e picos mais discretos de Fe. A presença do Cu é devido ao suporte (*grid*) onde a amostra é deposita, pois a mesma tem na sua composição Cu, C e polímero, já a existência do Fe é justificada pela composição química das NPMs. Com isso foi possível confirmar a presença desse metal nas partículas.

Figura 34- (a) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão da amostra Fe₃O₄@AO, (b) Histograma de distribuição de tamanho e (c) EDX.

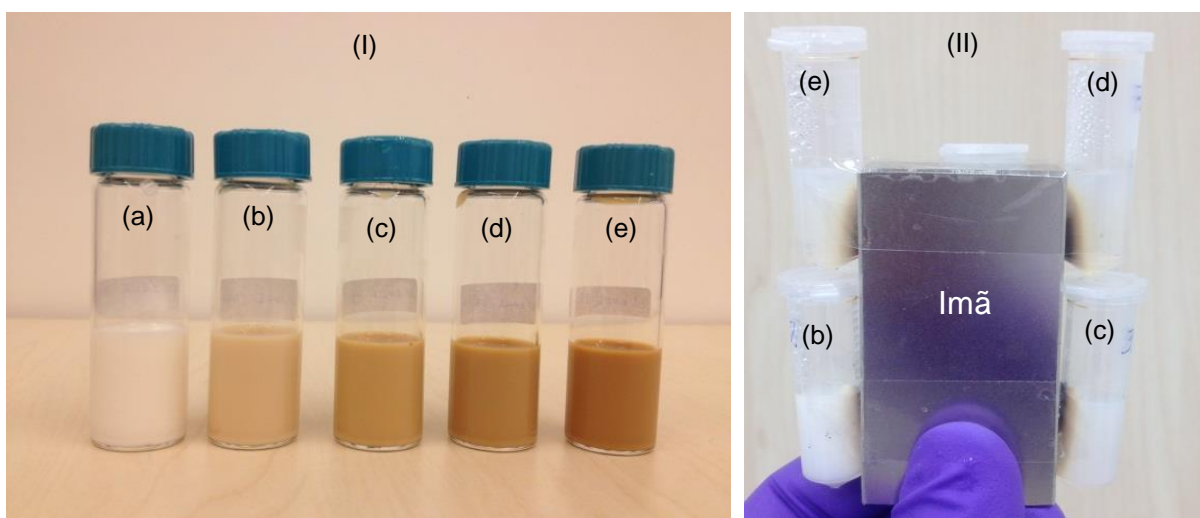


4.2 Síntese das Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSMs) e Nanopartícula Lipídica Sólida (NLS).

Na NLS o tamanho médio varia conforme a concentração lipídica da emulsão e isso é diretamente proporcional à viscosidade da fase interna. Logo um aumento da concentração lipídica, aumenta a viscosidade e assim o tamanho das NLSs. Normalmente essa concentração varia de 5-10% (m/v), mas pode chegar a valores entre 30-50% (SEVERINO et al., 2012). Objetivando a obtenção de partículas de tamanho nanométrico, utilizou-se 4% do lipídeo (m/v), 0,5% de Tween 80, 1%, 3%, 5% e 7% (m/m) de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ (massa de Fe em relação a massa do lipídeo) e 10 mL de água deionizada para compor as emulsões.

A obtenção das NLSMs por fusão-emulsificação consistiu, inicialmente, na fusão de 400 mg de cera de carnaúba, para posterior adição das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$. Esta ordem de adição favoreceu a estabilidade das $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ na fase orgânica. Após a dispersão da fase aquosa (FA) na fase orgânica (FO), a amostra foi sonicada. Durante a sonicação, a amostra foi mantida em banho de água a 90 °C, afim de evitar a solidificação da cera. Na síntese da NLS apenas a etapa da adição das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ não ocorreu. O aspecto macroscópico das dispersões coloidais obtidas pode ser visualizado na Figura 35.

Figura 35- Característica macroscópica das formulações com (II) e sem (I) a presença do campo magnético: (a) NLS, (b) NLSM 1%, (c) NLSM 3%, (d) NLSM 5%, (e) NLSM 7%.



4.3 Caracterizações das NLS e NLSMs.

4.3.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Para a determinação do diâmetro médio, índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta das partículas de NLSM e NLS, fez-se uso da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

As formulações de NLS e NLSMs apresentaram valores de índice de polidispersão compreendidos entre 0,298 e 0,427 (Tabela 4). O Pdl para todas as amostras não ultrapassou o valor de 0,4, denotando assim uma distribuição de tamanho de partícula moderadamente polidispersa (ZHAO et al., 2015) e unimodal (Figura 36). Enquanto que o diâmetro médio das NPs variou entre $150,77 \pm 8,27$ e $182,17 \pm 8,11$ nm (Tabela 4). Observou-se que as NLSMs tiveram tamanhos de partículas semelhantes à NLS. Com esses resultados, foi possível observar que não houve uma diferença significativa entre o tamanho médio de partícula das formulações, revelando a baixa influência exercida pelas nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ no diâmetro médio das NLSMs. Tamanho de partícula semelhante foi obtido por Escalona et al., (2016) (tamanho médio de 180 nm). Eles obtiveram NLSM por dupla emulsão e evaporação do solvente, com o gliceril trimiristato como matriz lipídica sólida e óxido de ferro como partícula magnética.

A magnitude do potencial zeta é muito importante para estimar a estabilidade desses sistemas. Caso as partículas em suspensão, em sua totalidade, possuam valores relativamente elevados de potencial zeta, positivo ou negativo, terão a tendência de se repelirem mutuamente, não causando agregação. Entretanto, se as partículas possuam baixos valores de potencial zeta, não haverá força repulsiva forte o suficiente para evitar a agregação das partículas, nesse caso as forças atrativas serão superiores, favorecendo a aproximação das mesmas. Zhao et al., (2015) admitiram que eram necessários potenciais zeta ≥ 30 mV ou ≤ -30 mV para estabilização eletrostática do sistema, devido à repulsão elétrica entre partículas. Eles também afirmaram que um potencial zeta negativo revela que o agente tensoativo, com a porção polar carregada negativamente, estabiliza o lipídeo através da adsorção na superfície, proporcionando uma força eletrostática.

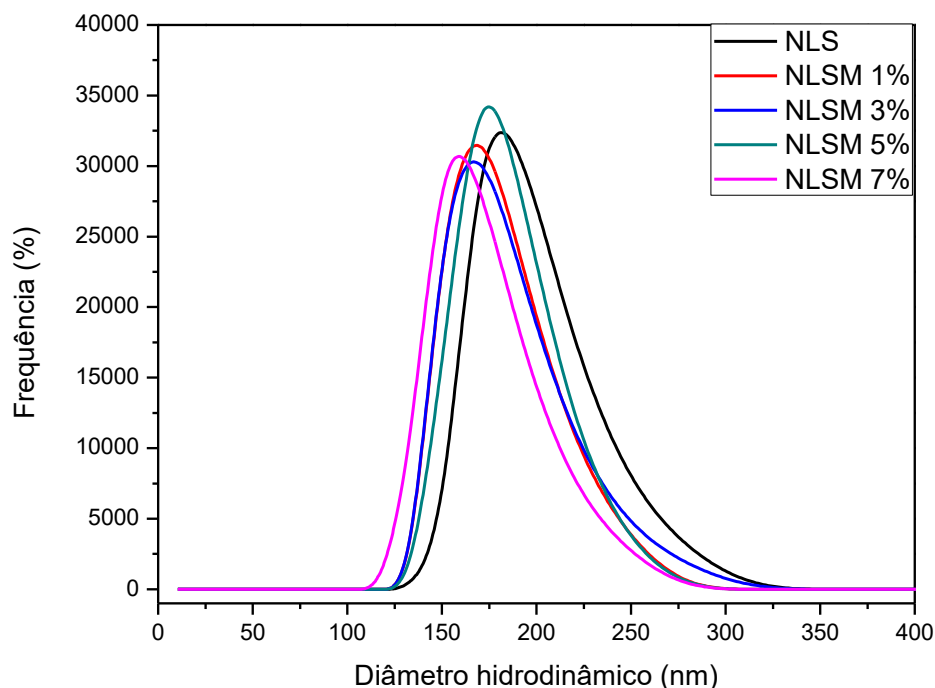
As medidas foram realizadas para analisar se as NLS e NLSMs apresentam boa estabilidade eletrostática quando em suspensão. Sendo assim, as NLS e NLSMs

apresentaram uma alta estabilidade física, haja vista, que assumiram valores elevados de potenciais zeta, compreendidos no intervalo de $-53,35 \pm 1,01$ a $-59,75 \pm 1,30$ (mV) (Tabela 4).

Tabela 4- Valores de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de NLS e NLSMs.

Amostra	Diâmetro médio (nm)	Pdl médio	Potencial Zeta (mV)
NLS	182,2 \pm 8,11	0,427 \pm 0,040	-53,35 \pm 1,01
NLSM 1%	173,5 \pm 3,91	0,424 \pm 0,041	-58,36 \pm 1,63
NLSM 3%	181,5 \pm 9,30	0,382 \pm 0,026	-57,83 \pm 1,30
NLSM 5%	150,8 \pm 8,27	0,298 \pm 0,060	-59,75 \pm 1,30
NLSM 7%	160,2 \pm 7,41	0,322 \pm 0,058	-59,20 \pm 1,95

Figura 36: Curvas de distribuição de tamanho de partícula unimodal das NLS e NLSMs.



Após 120 dias as NLSMs e NLS foram analisadas novamente por DLS e mostraram-se estáveis à temperatura ambiente após esse período. As formulações apresentaram valores de índice de polidispersão compreendidos entre 0,295 e 0,506, enquanto que o diâmetro médio variou entre $169,97 \pm 5,00$ e $202,47 \pm 5,32$ nm (Tabela

5). Foi possível observar que não houve uma grande diferença entre o tamanho médio das partículas medidas com as formulações novas e após 4 meses de preparo.

As nanopartículas permaneceram com uma grande estabilidade física, pois exibiram elevados potenciais zeta, assumindo valores no intervalo de $-55,14 \pm 2,52$ a $-65,73 \pm 1,80$ (mV) (Tabela 5). Observou-se que as formulações continuaram estáveis.

Tabela 5- Valores de diâmetro médio de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das formulações de NLSM e NLS após 120 dias de preparo.

Amostra	Diâmetro médio (nm)	Pdl médio	Potencial Zeta (mV)
NLS	181,7±7,17	0,506	-57,16±1,48
NLSM 1%	189,9±6,66	0,450	-55,14±2,52
NLSM 3%	202,5±5,32	0,362	-64,85±1,33
NLSM 5%	170,0±5,00	0,295	-63,45±1,32
NLSM 7%	175,3±3,93	0,343	-65,73±1,80

Para a remoção de possíveis nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ não associadas aos sistemas de NLSM, recorreu-se ao procedimento de centrifugação. Posteriormente, as amostras foram analisadas por ICP OES para a determinação da concentração real de Fe_3O_4 nas formulações (Tabela 6). A redução da concentração de Fe_3O_4 nas formulações corrobora com a hipótese da presença de aglomerados de magnetita não associados às nanopartículas lipídicas, as quais precipitaram durante a centrifugação.

Tabela 6- Valores das concentrações de Fe_3O_4 nas formulações de NLSM e NLS.

Amostra	$[\text{Fe}_3\text{O}_4]_{\text{Teórica}}$ (mg/L)	$[\text{Fe}]_{\text{Real}}$ (mg/L)	$[\text{Fe}_3\text{O}_4]_{\text{Real}}$ (mg/L)
NLS	0	7,5*	0
NLSM 1%	400	55*	76
NLSM 3%	1200	188*	260
NLSM 5%	2000	215,5*	298
NLSM 7%	2800	382,5*	528

*Valores determinados por ICP OES

4.3.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria é uma análise térmica que determina a alteração da massa da amostra em função da temperatura, quando a mesma é submetida a uma programação controlada de temperatura (CANEVAROLO, 2004).

Utilizou-se a análise termogravimétrica (TGA) para observar a estabilidade térmica das nanopartículas. As NLS e NLSMs apresentaram termogramas de decomposição térmica que ocorre em uma única etapa.

A partir do evento de perda de massa e do resíduo obtido no final do experimento, pôde-se observar na curva de TGA/DTG para a NLS (Figura 37a) uma perda de massa de 97,48 % no intervalo de 262,17 - 498,67 °C, referente a perda de massa da matéria orgânica (lipídeo e tensoativo). Ao final da análise, o resíduo de 2,52% foi atribuído ao teor de Fe presente (Tabela 7). Esse ferro encontrado é proveniente da composição da cera de carnaúba, pois a essa amostra não foi adicionada a $Fe_3O_4@AO$, portanto os dados apresentados estão de acordo com os resultados da análise de ICP OES.

O perfil termogravimétrico e a faixa de temperatura de degradação (262,33 – 500,67 °C) das NLSMs foram semelhantes. No único evento de degradação verificou-se a perda de massa de 91,2 a 92,9% referente à matéria orgânica (lipídeo e tensoativo). A porcentagem residual encontrada em todos os termogramas das amostras é relativa a presença de Fe nas NLSMs (Tabela 7).

Observou-se também que as NLS e NLSMs possuem perfis termogravimétricos semelhantes, haja vista que todas as nanopartículas possuem o mesmo teor de matéria orgânica. Contudo, diferenciam-se no teor residual encontrado nas amostras, visto que nas NLSMs foram adicionadas $Fe_3O_4@AO$.

Observou-se através dos termogramas que a degradação térmica ocorreu acima de 260 °C. Pôde-se inferir, portanto, que as NLSMs são estáveis à aplicação em tratamentos com Hipertermia magnética moderada, haja vista que serão submetidas à temperatura de no máximo 44 °C.

Figura 37- Curvas de TGA/DTG para as amostras; (a) NLS, (b) NLSM 1%, 3%, 5% e 7%.

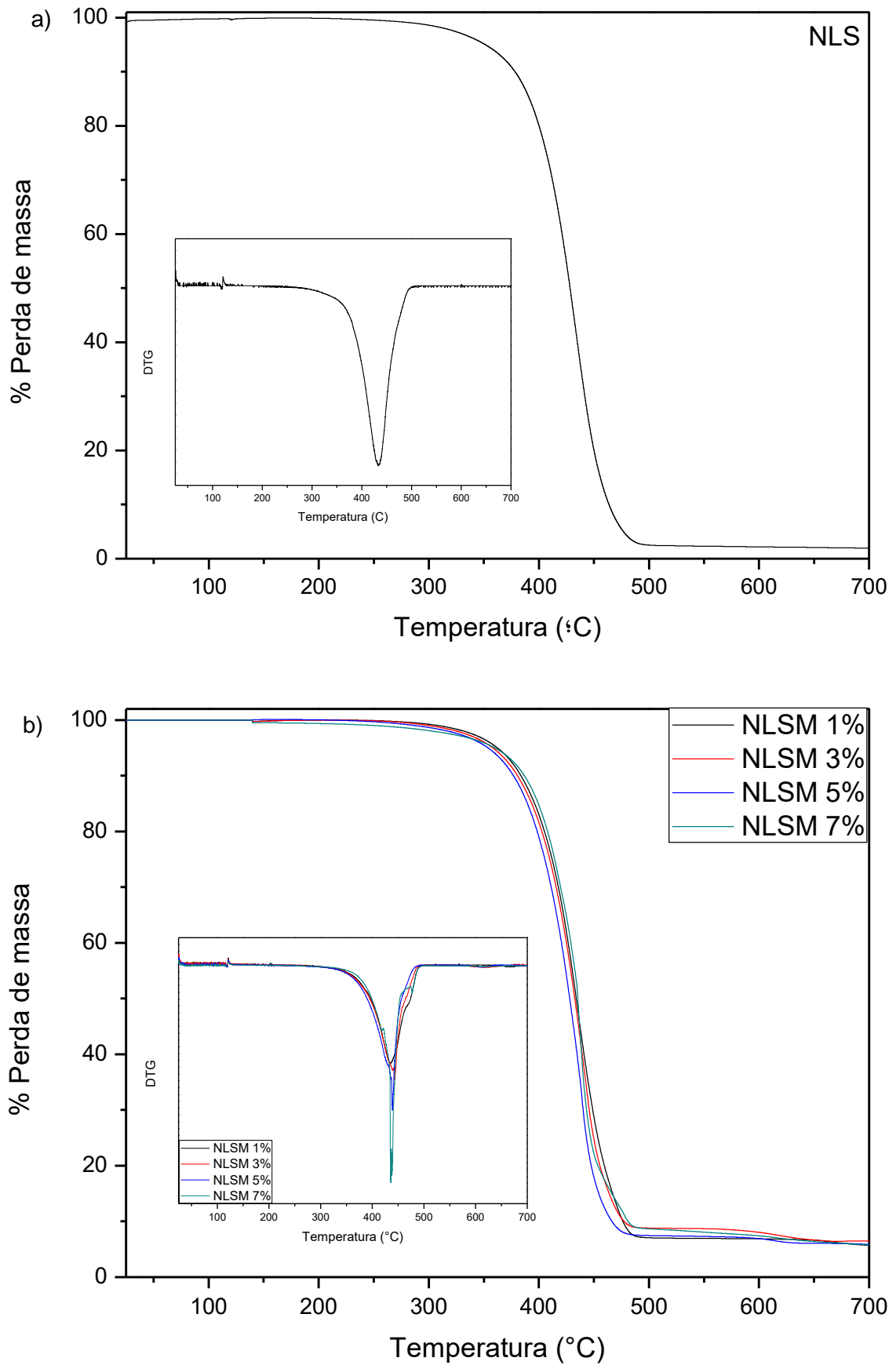


Tabela 7- Valores de perda de massa das NLS e NLSMs.

Amostra	Massa inicial (mg)	Intervalo de temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%)
NLS	6,11	262,17-498,67	97,48	2,52
NLSM 1%	4,77	268,17-495,67	92,88	7,12
NLSM 3%	5,55	268,17-494,17	91,16	8,84
NLSM 5%	6,37	262,33-489,50	92,46	7,54
NLSM 7%	9,33	262,50-500,67	91,15	8,85

4.3.3 Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura (MET e MEV)

A microscopia eletrônica de transmissão e de varredura (MET e MEV) são importantes técnicas que permitem a observação e análise das propriedades morfológicas de materiais em escala muito pequena. Outra característica importante é a aparência tridimensional que o microscópio oferece da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Essas técnicas possuem poder de alta resolução, onde valores na ordem de dois a cinco nanômetros podem ser alcançados (FRANCISQUINI, SCHOENMAKER E SOUZA, 2015).

A MET fornece dados tais como: morfologia, estrutura cristalina, composição química e natureza das interfaces e superfícies.

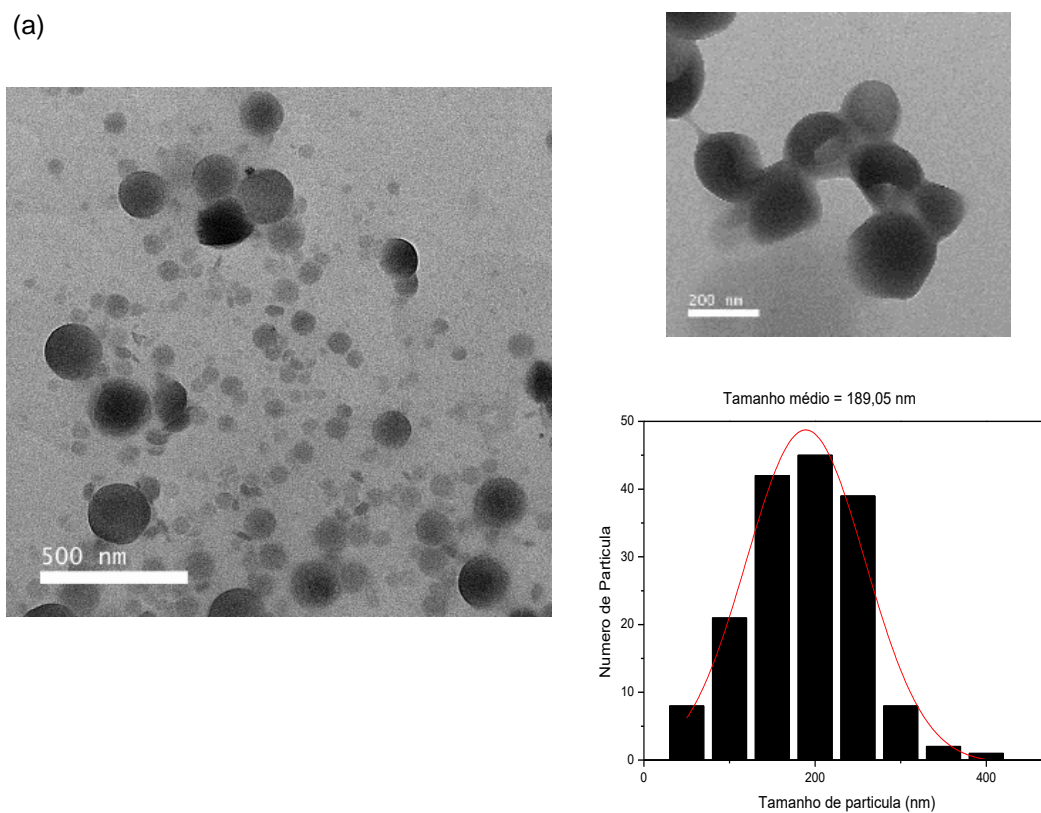
Através das imagens por MET, observou-se a estrutura morfológica adquirida pelas NLS e NLSMs. Através da Figura 38a é possível observar morfologia predominantemente esférica da NLS possuindo diâmetro médio de $189,05 \pm 5,07$ nm. A mesma estrutura morfológica foi observada para todas as NLSMs (1%, 3%, 5% e 7%). Zhao et al., (2015) também sintetizaram NLSMs e a mesma estrutura foi observada.

Para as NLSMs obteve-se um tamanho médio de partícula de $162,84 \pm 7,00$ a $195,79 \pm 10,68$ nm. Foi calculado utilizando-se o programa Fiji (Image J), a partir da contagem de 50-100 NPs, para isso utilizou-se várias micrografias obtidas por MET. A Figura 38 mostra as imagens e a distribuição do tamanho das NPs determinadas a partir das micrografias adquiridas pelo microscópio. Os valores do tamanho médio dessas partículas encontram-se expressos na Tabela 8.

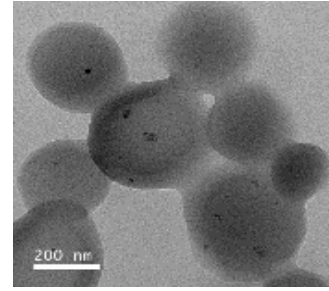
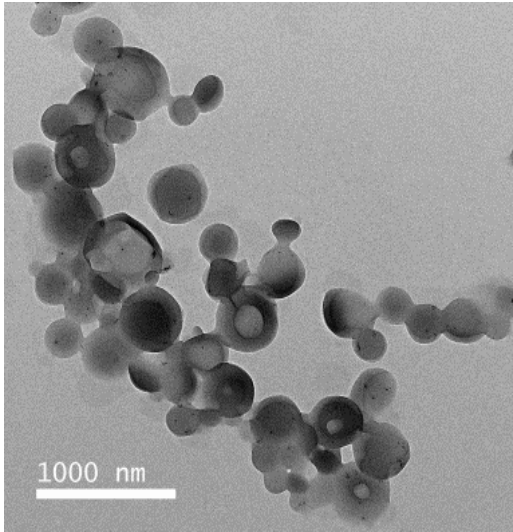
As Figuras 38b, c, d, e revelam que as nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) tiveram uma incorporação bem sucedida, os resultados mostraram que elas se acumulam preferencialmente no interior do núcleo lipídico. Nas imagens não são visualizadas nanopartículas com tamanhos inferiores a 8 nm, com aspecto de contraste escuro da imagem fora das esferas, o que evidenciaria nanopartículas magnéticas não encapsuladas (PERCIN, 2016). Escalona et al., (2016), observou que não houve mudança na forma e superfície das NLSMs quando comparadas as NLS. O mesmo comportamento foi observado com as NLSMs (1%, 3%, 5% e 7%) e NLS nesse trabalho.

Através da energia dispersiva de Raios-X (EDX) da amostra NLSM 7% (Figura 39) foi possível observar a presença do ferro dentro das nanopartículas de cera.

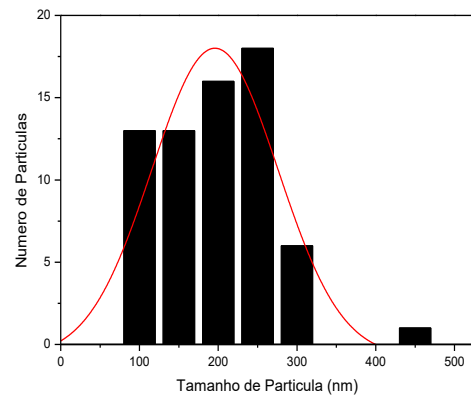
Figura 38- Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão e sua distribuição de tamanho das amostras: (a) NLS, (b) NLSM 1%, (c) NLSM 3%, (d) NLSM 5%, (e) NLSM 7%.



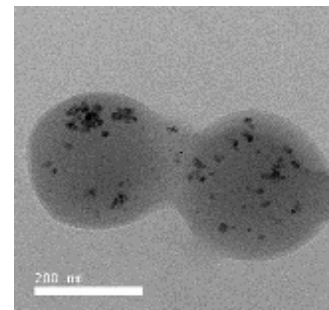
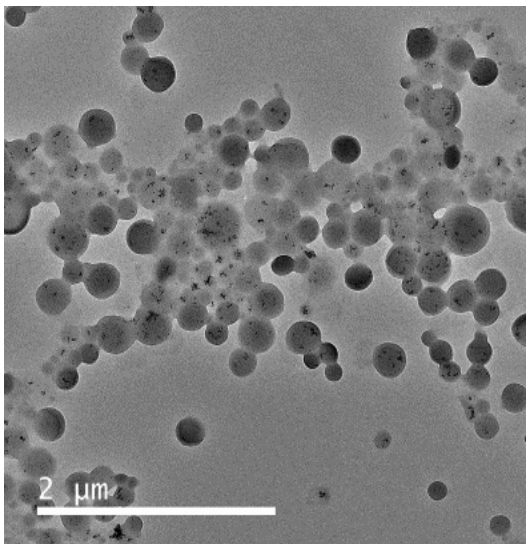
(b)



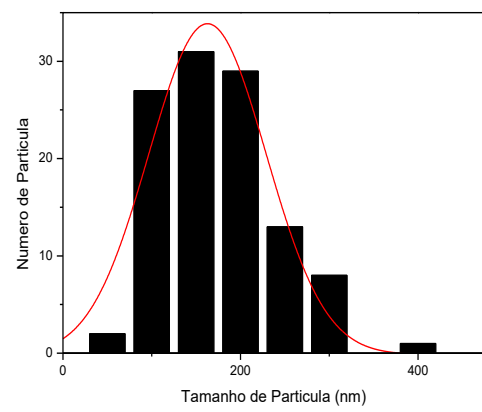
Tamanho médio = 195,79 nm



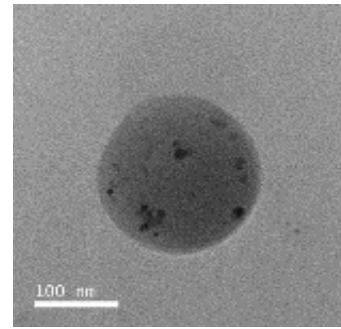
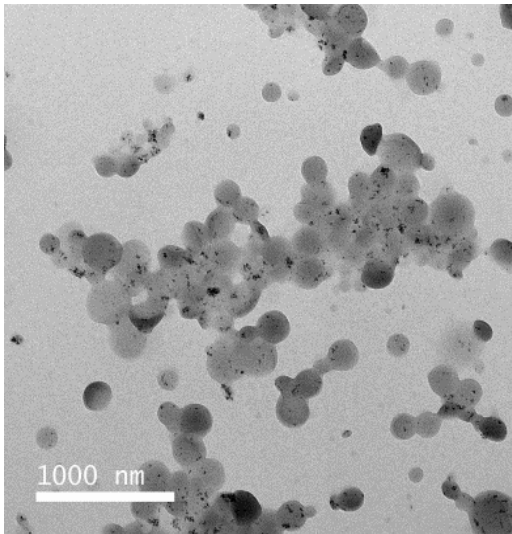
(c)



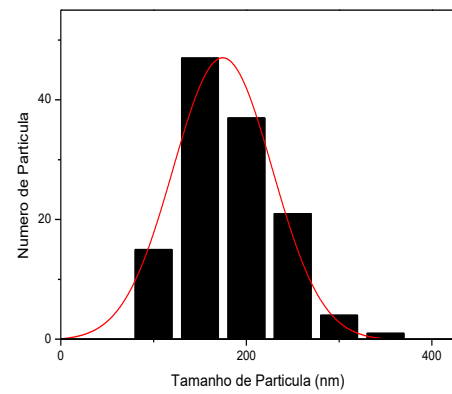
Tamanho médio = 162,84 nm



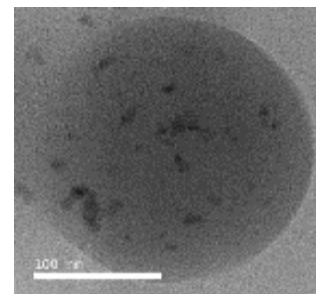
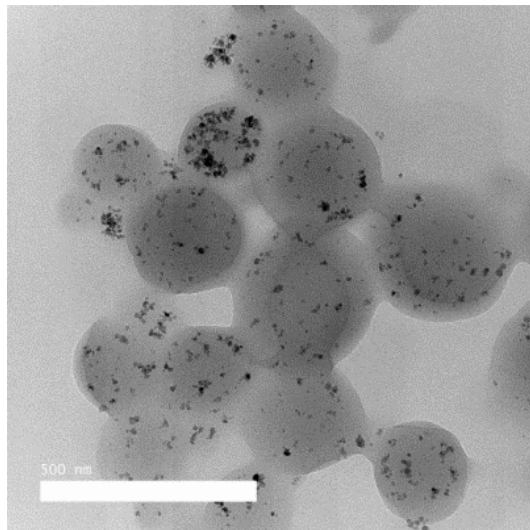
(d)



Tamanho Médio = 174,50 nm



(e)



Tamanho Médio = 188,98 nm

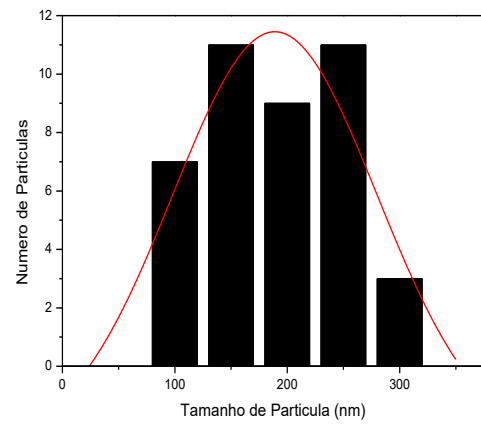
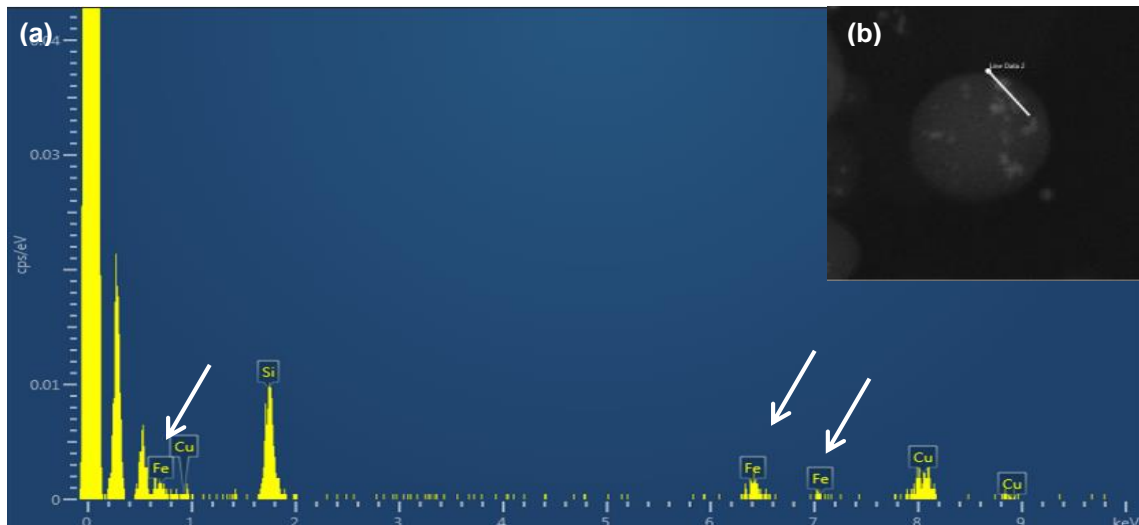


Figura 39-(a) EDX da NLSM 7% e (b) micrografia onde o EDX foi realizado.



Observou-se também que os valores obtidos do diâmetro médio das partículas por MET são semelhantes aos relatados no DLS (Tabela 8).

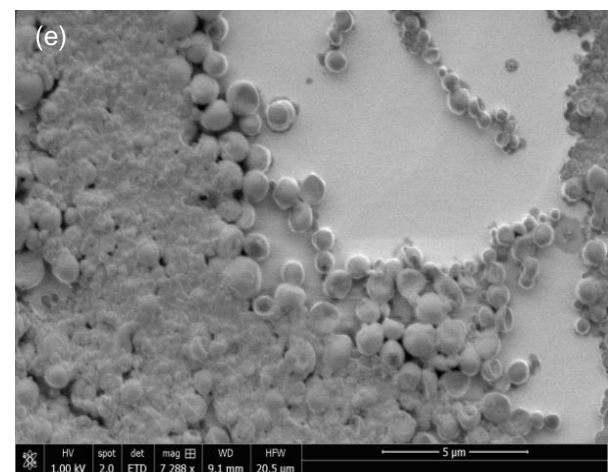
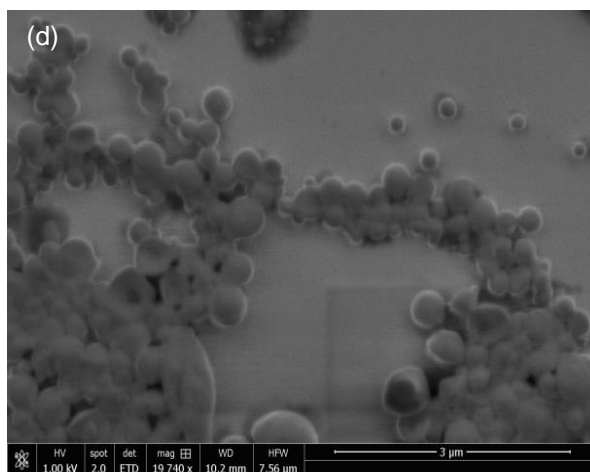
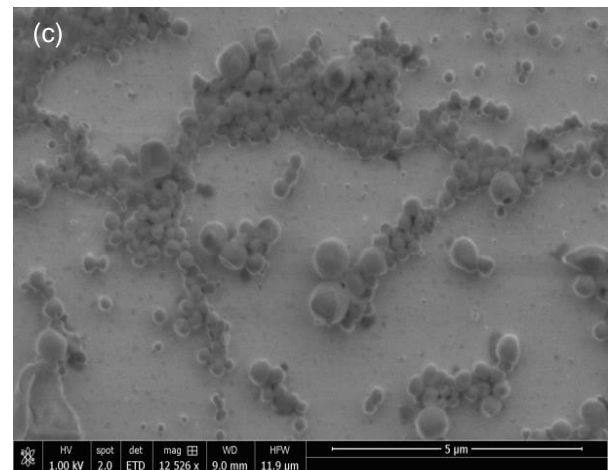
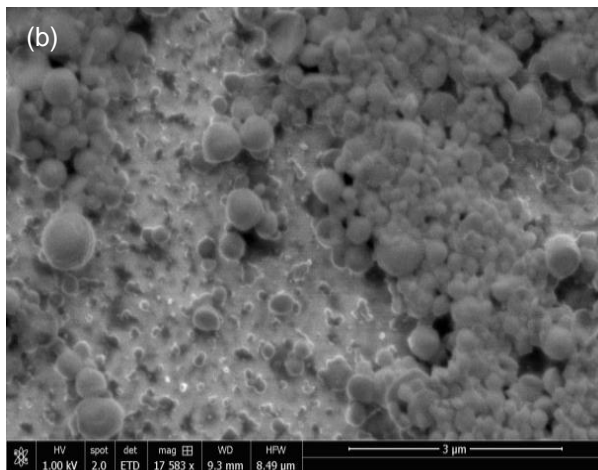
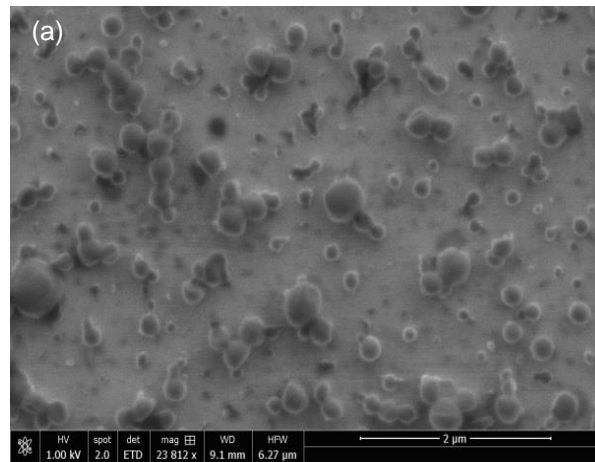
Tabela 8- Valores de diâmetro médio de partícula das formulações de NLSMs e NLS por MET e DLS.

Amostra	Diâmetro médio(nm) MET	Diâmetro médio (nm) DLS
NLS	189,1±5,07	181,7±7,17
NLSM 1%	195,8±10,68	189,9±6,66
NLSM 3%	162,8 ±7,00	202,5±5,32
NLSM 5%	174,5 ±4,62	170,0±5,00
NLSM 7%	189,0±10,85	175,3±3,93

As amostras foram submetidas a microscopia eletrônica de varredura para verificação da morfologia das nanopartículas. Foram analisadas as NPs lipídicas com e sem a presença das partículas magnéticas.

Através das imagens da NLS e NLSMs, apresentadas na Figura 40, observou-se uma morfologia predominantemente esférica, o que corrobora com os resultados obtidos pelas micrografias da MET. O mesmo foi observado por Escalona et al., (2016) em um sistema semelhante aos obtidos nesse trabalho, tanto para a NLS, quanto para as NLSMs.

Figura 40- Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras: (a) NLS, (b) NLSM 1%, (c) NLSM 3%, (d) NLSM 5%, (e) NLSM 7%.



4.3.4 Difração de Raios-X

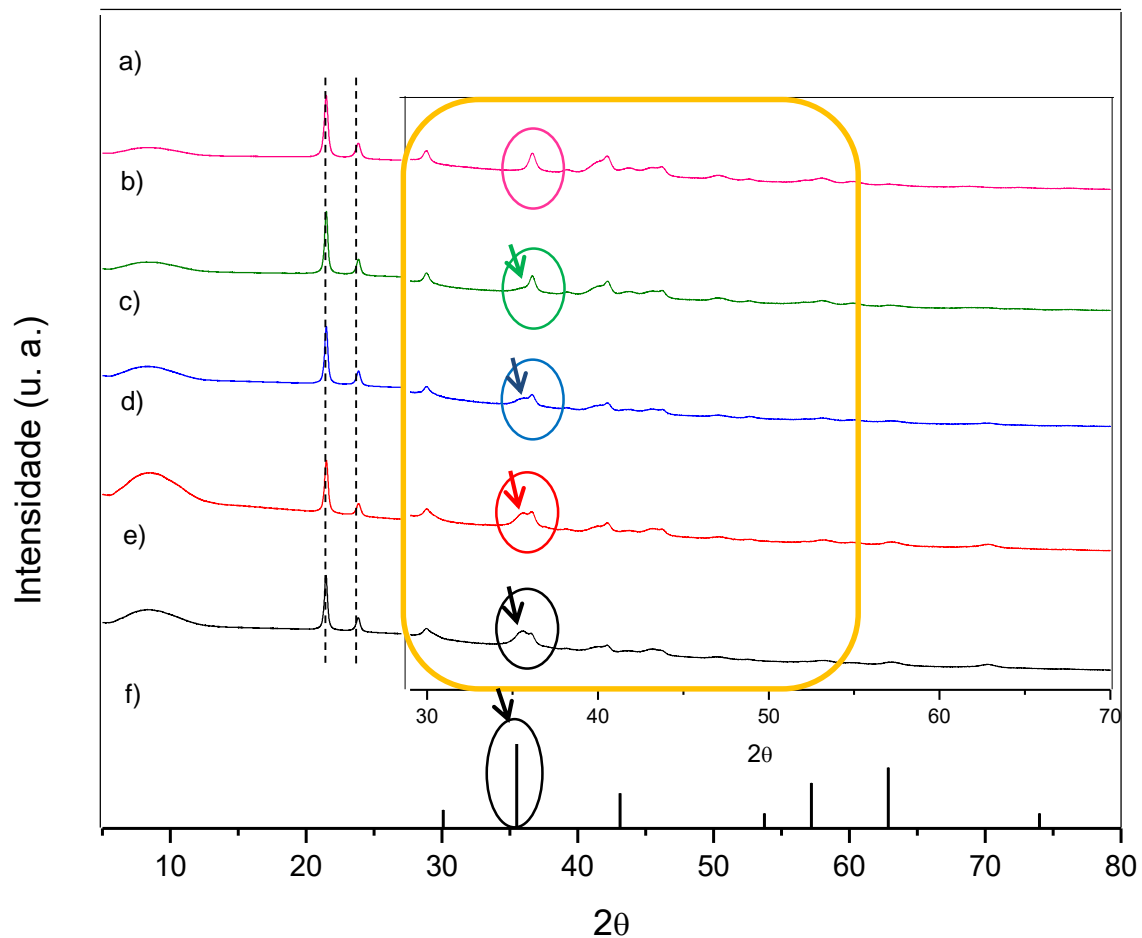
A análise por difração de raios-X das NPs com e sem a presença do ferro foi realizada em um difratômetro X'Pert PRO (PANalytical®), com ângulo 2θ de 10-80°. A Figura 41 mostra os padrões de difração de raios-X das NPs Fe_3O_4 , NLS e NLSMs (na mesma escala).

Considerou-se a hipótese que a concentração de magnetita presente nas nanoemulsões seja suficientemente baixa, não sendo possível o aparecimento nítido dos picos cristalinos característicos da Fe_3O_4 nos difratogramas das NLSMs.

Na Figura 41, observou-se apenas o surgimento de um único pico de difração em 2θ em 35,5 nas NLSMs, correspondente a Fe_3O_4 . Nessa região encontra-se o pico mais intenso no difratograma padrão da mesma. Logo, através da ampliação dos difratogramas nessa região, foi possível analisar a discreta presença de Fe_3O_4 em todas as NLSMs. A NLSM 7% exibe o pico em 35,5° mais evidente, devido ser a NP com maior teor de ferro. A comparação do difratograma das NLSMs (Figura 41b, c, d, e) com a dos núcleos puros de óxido de ferro (Figura 41f) confirmou a cristalinidade dos núcleos Fe_3O_4 (responsável pelo comportamento superparamagnético e capacidade de resposta ao campo magnético) (ESCALONA et al., 2016; REDDY et al., 2012), mesmo quando incorporado pela matriz lipídica sólida.

O difratograma da nanopartícula lipídica sólida apresenta alguns picos de difração em 2θ , mas dois são bastante intensos em 21,46 e 23,84, característicos desta nanomatriz de cera de carnaúba (Figura 41a). Os mesmos picos também foram exibidos pelas NLSMs 1%, 3%, 5% e 7% (Figura 41b,c,d,e).

Figura 41- Difratoograma das NPs e suas respectivas ampliações: a) NLS, b) NLSM 1%, c) NLSM 3%, d) NLSM 5%, e) NLSM 7% e f) padrão da Fe_3O_4 .



4.4 Ensaios de hipertermia magnética

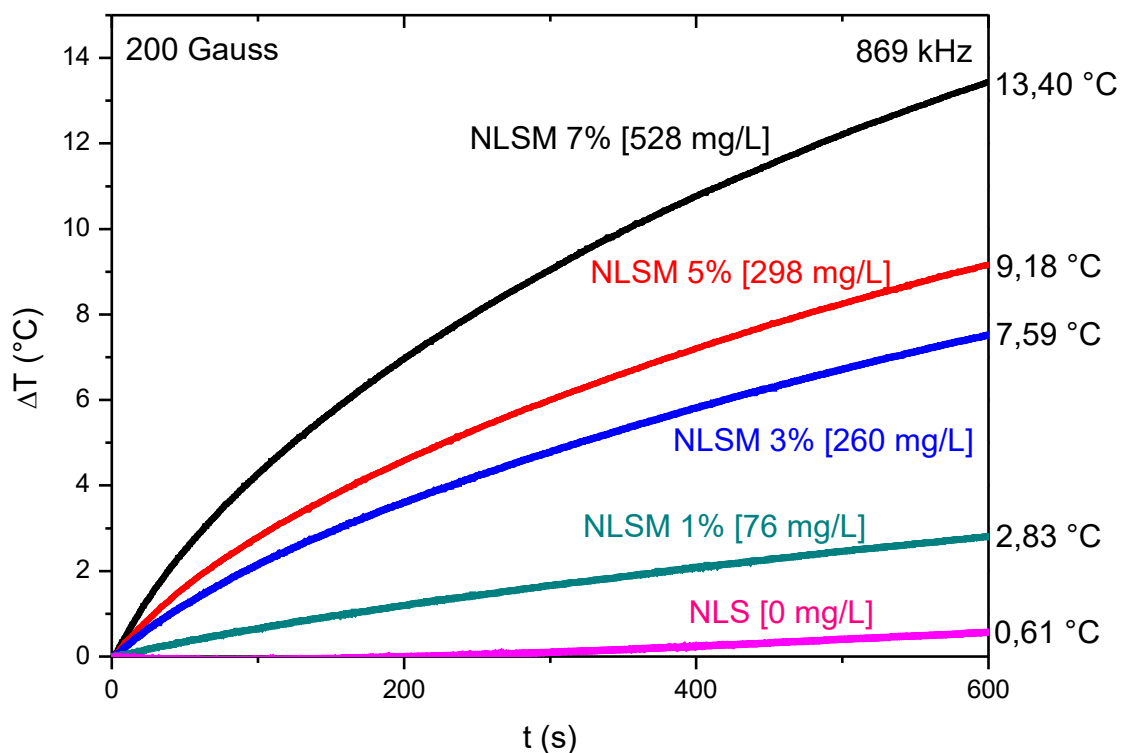
Foram realizados testes preliminares de magnetohipertermia, necessários para ajustes de parâmetros, tais como: frequência, campo magnético e concentração das nanopartículas magnéticas, que serão utilizados em futuros ensaios de liberação controlada de fármaco. Tais parâmetros devem ser ajustados para conduzir a geração de calor em uma faixa de 41,8 a 44 °C (Hipertermia clínica) (LI et al., 2010).

Sendo assim, o aumento de temperatura nos centros de calor (Fe_3O_4), que compõem o nanossistema, provocado pela ação do campo magnético alternado externo, poderá matar as células tumorais ou danificá-las, tornando-as mais sensíveis aos efeitos de outras terapias, tais como: radioterapia ou utilização de fármacos antitumorais, também poderá influenciar a modulação da liberação do fármaco pelo

provável aumento de mobilidade e difusibilidade do fármaco para meio receptor (PERECIN, 2016; SALUNKHE et al., 2014).

Os testes de magnetohipertermia foram realizados com as seguintes concentrações de Fe_3O_4 : [0 g/L], [76 mg/L], [260mg/L], [298mg/L] e [528mg/L]. Nos ensaios foram utilizados uma frequência de 869,00 KHz e campo magnético de 200 G (Figura 42). A radiação eletromagnética utilizada na hipertermia magnética está no intervalo de radiofrequência (kHz a 1 MHz). Esta radiação é completamente saudável e mostra a profundidade de penetração suficiente para acender a órgãos ou tecidos internos do corpo (BANOBRE-LOPEZ, TEIJEIRO e RIVAS, 2013).

Figura 42- Curvas de aquecimento obtidas dos ensaios de magnetohipertermia das formulações de NLSM e NLS.



Com a frequência de 869 KHz e amplitude de 200 G, pôde-se afirmar que a concentração de 260 mg/L de Fe_3O_4 , já é suficiente para gerar um aumento satisfatório de temperatura, uma vez que em 10 min, atingiu-se um acréscimo de 7,59 °C. Essa, somada a temperatura corpórea interna de 37 °C chegará a 44,59 °C, faixa ideal para a aplicação de uma hipertermia moderada condizente à aplicada em tratamentos clínicos.

A partir dos resultados, estima-se que o aquecimento produzido pelos nanocarreadores magnéticos pode representar um mecanismo desencadeador do processo de liberação do fármaco, possibilitando a obtenção de sistemas de liberação controlada por magnetohipertermia. Porém, mostraram também potencial para serem utilizados em tratamento de câncer por HM sem a incorporação de drogas, pois o combate ao tumor pode ser feito apenas pelo aumento de temperatura.

4.4.1 Liberação *in vitro*

Uma recente revisão destacou a importância da cera de carnaúba como um excipiente lipídico em sistemas de administração de fármacos (NART et al., 2017; ROSIAUX et al., 2014). A cera de carnaúba foi estudada como excipiente para modificar a liberação de fármaco em comprimidos preparados pela compressão direta (EL-BAGORY et al., 2012), bem como para produzir comprimidos com retenção gástrica (PAWAR e DHAVALÉ, 2014). Também foi alvo de estudo para revestir produtos, formando uma película protetora (RODRIGUES et al., 2014) e seu uso em nanopartículas lipídicas (ARIAS et al., 2011; HERNÁNDEZ e GOYMANN, 2005).

A Figura 43 mostra o estudo preliminar da liberação *in vitro*. Nela encontram-se os perfis de liberação das NLS e NLSM 3%, 5% e 7%, sem aplicação do campo magnético alternado, nos quais se estuda a variação de liberação do fármaco com o tempo de liberação gasto pelo sistema em meio aquoso.

As curvas de calibração para o bioativo onco A, em clorofórmio e em água, são mostradas na Figura 44. A partir das curvas de calibração foram obtidas as equações que relacionam a absorção e concentração ($\mu\text{g/mL}$) (Figura 44b), e intensidade e concentração ($\mu\text{g/mL}$) (Figura 44a). A Equação 3 foi adquirida, para a onco A, através da espectroscopia de fluorescência no comprimento de onda 663 nm e a Equação 4 foi obtida através da espectroscopia de UV/Vis no comprimento de onda de 490 nm.

Figura 43- Cinética de liberação *in vitro* da oncocalyxona A incorporada nas NLS e NLSM 3%, 5% e 7%, sob diálise a 37 °C.

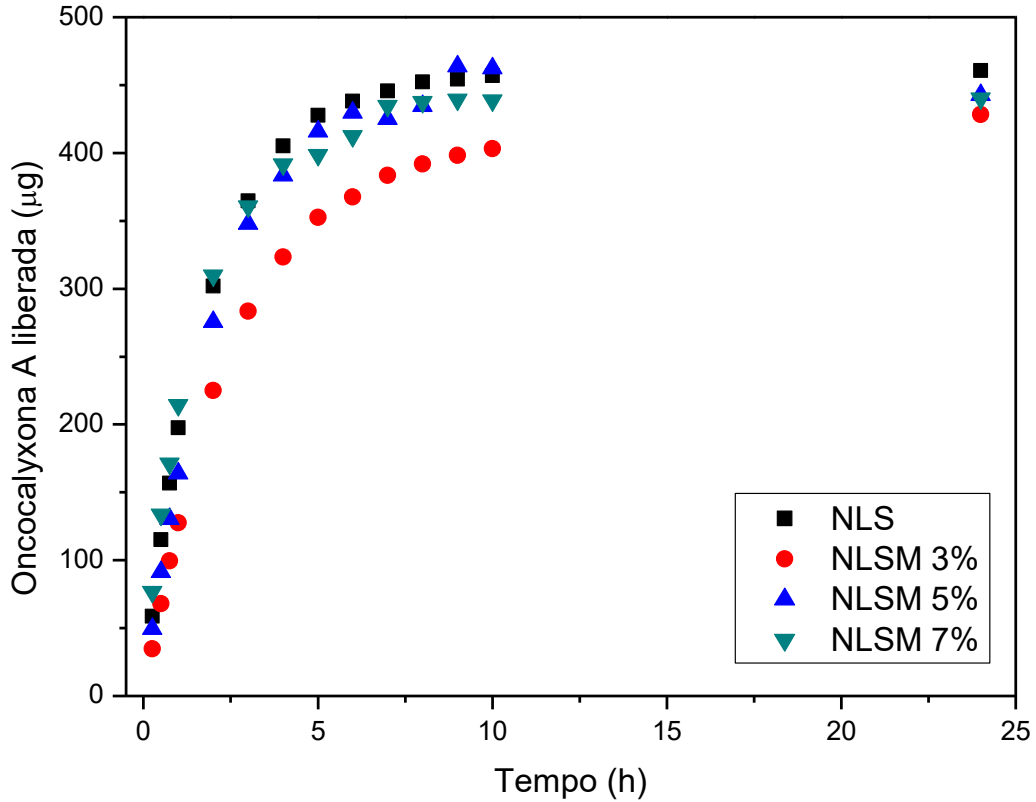
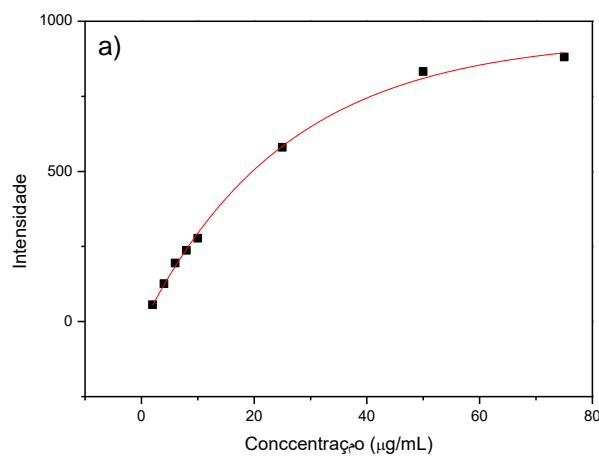


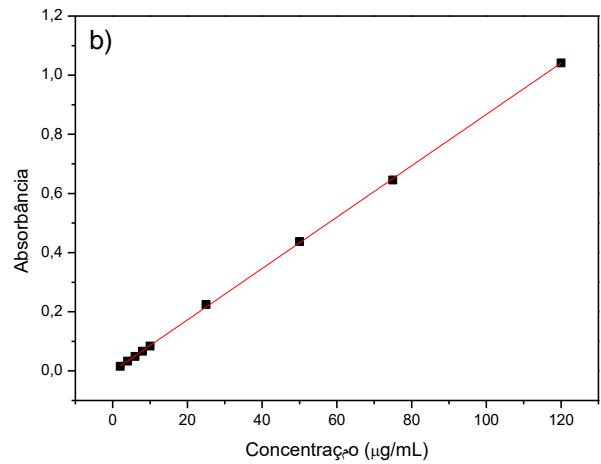
Figura 44-Curvas de calibração para o bioativo oncocalyxona A: a) em clorofórmio, obtida por fluorescência (663 nm) e b) em água, obtida por UV/Vis (490 nm).



Equação 3

$$\text{Conc } (\mu\text{g/mL}) = - 25,56 \ln [(\text{Fluorescência} - 946,19) / -963,88]$$

$$R = 0,99775$$



Equação 4

$$\text{Conc } (\mu\text{g/mL}) = (\text{Absorbância} + 0,00105) / 0,00868$$

$$R = 0,99987$$

Observou-se que as NLS e NLSMs possuem o mesmo perfil de liberação, com isso foi possível verificar que não houve uma diferença significativa na liberação entre as formulações, revelando a baixa ou nenhuma influência exercida pelas nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ na liberação *in vitro* sem a presença do campo magnético alternado.

A liberação ocorreu através do mecanismo de difusão durante as 24 h, o que é condizente com o tipo de interação não-covalente entre a onco A e as nanopartículas (MISSIRLIS et al., 2006).

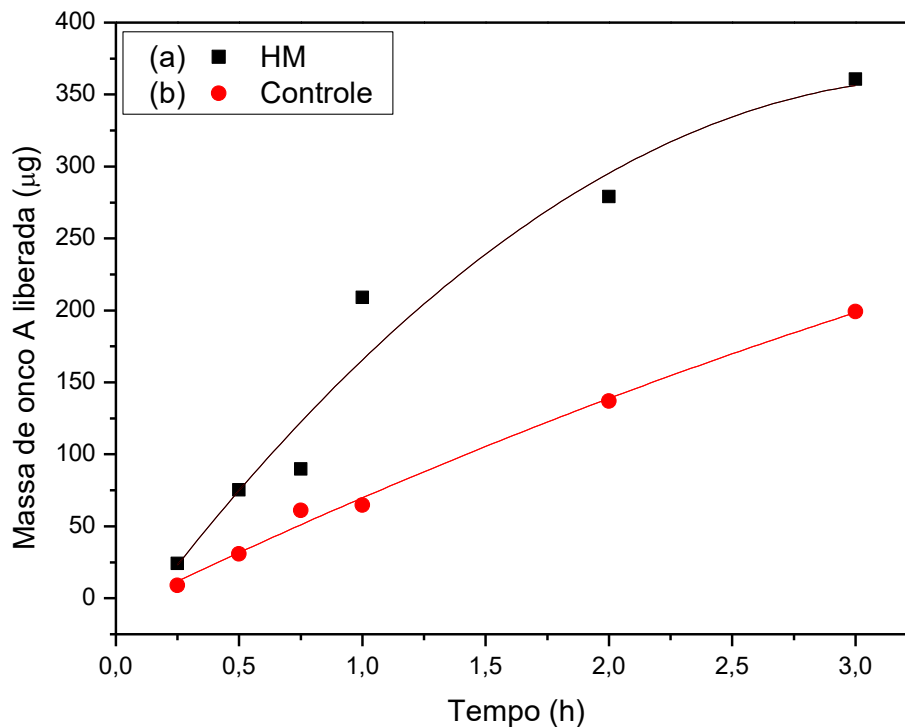
4.4.2 Liberação *in vitro* por hipertermia magnética

Recentemente, as nanopartículas lipídicas sólidas orgânicas-inorgânicas híbridas foram exploradas como uma abordagem sinérgica que combina a liberação modificada do bioativo induzida pelo encapsulamento lipídico e as propriedades físico-químicas intrínsecas da contraparte inorgânica (OUMZIL et al., 2016).

Neste contexto, foram obtidas nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas (NLSMs) carregadas com o bioativo oncoalyxona A e nanopartículas de óxido de ferro como fontes geradoras de calor em Hipertermia magnética (HM).

Com base nos resultados preliminares de HM e liberação *in vitro*, determinou-se a NLSM 7% com o bioativo oncoalyxona A para fazer a liberação por Hipertermia magnética a uma frequência de 560 kHz e um campo de 190 Oe (Figura 45). A escolha desse sistema foi determinada por possuir a maior concentração de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ e não apresentar um perfil diferenciado das outras NPs na liberação *in vitro*.

Figura 45- Liberação da oncoalyxona A através da NLSM 7% com (a) e sem (b) a presença de um campo magnético oscilante.



O mecanismo de entrega de fármaco do tipo “*open loop*” exige mudanças ambientais ocasionadas externamente para dar início a entrega de medicamentos. Estas mudanças compreendem campos magnéticos, campos elétricos, ultrassom, temperatura, luz e forças mecânicas (SERSHEN e WEST et al., 2002).

Observou-se que a liberação *in vitro* induzida pelo campo magnético alternado (Figura 45a) permitiu uma maior liberação do bioativo. Após 3h do início do experimento foi possível analisar que a curva (b) liberou 199,24 µg de onco A, enquanto que a curva (a) liberou 360,73 µg. Observou-se que através da HM foi possível induzir quase o dobro da liberação do ativo que o sistema sem a presença do campo magnético. Quando nanopartículas magnéticas estão uniformemente dispersas em uma matriz polimérica e entra em contato com o sistema biológico, ocorre a difusão normal do fármaco devido ao gradiente de concentração. Porém, aplicando-se um campo magnético externo oscilante, uma maior quantidade de fármaco poderá ser liberada mais rapidamente (CUNHA, 2014; DASH e CUDWORTH, 1998).

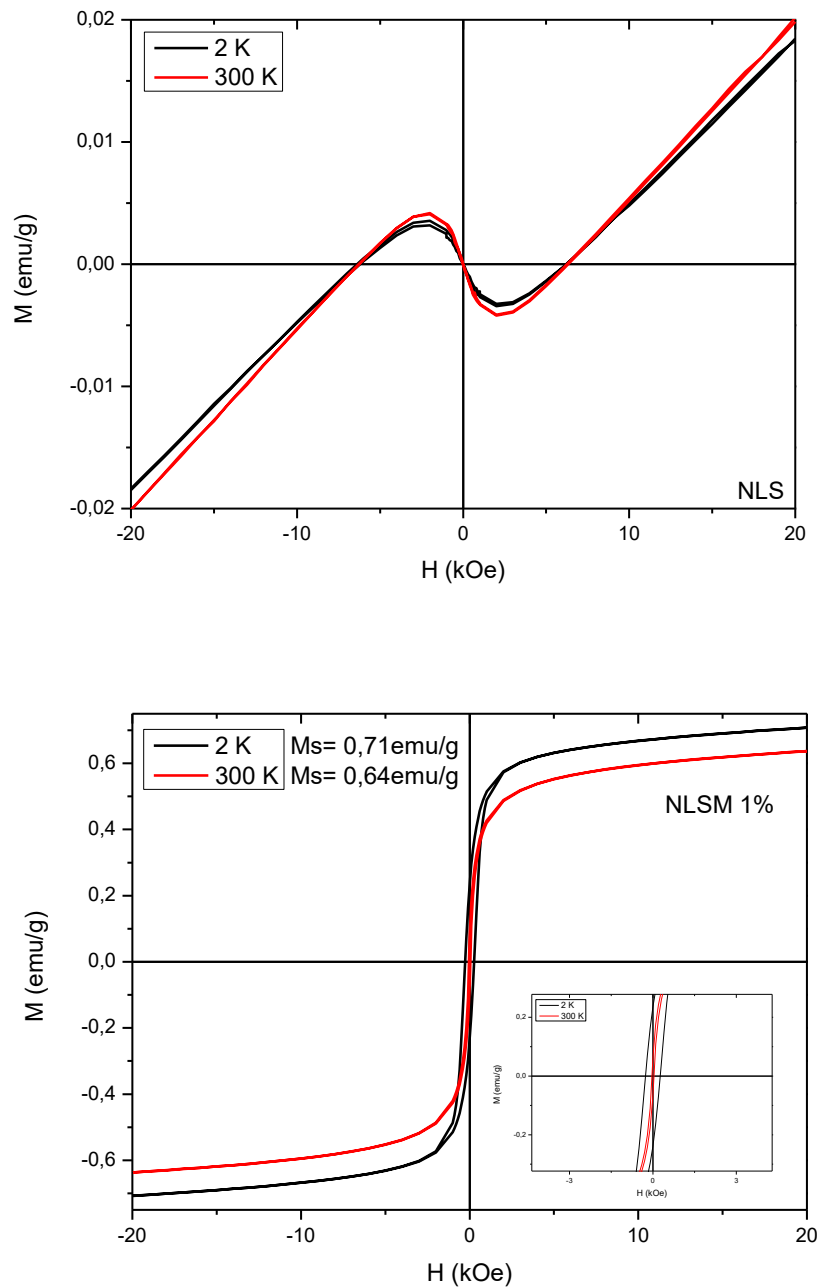
Observou-se que a NLSM 7%, através da HM, resultou ser eficiente para induzir externamente um aumento de liberação do bioativo.

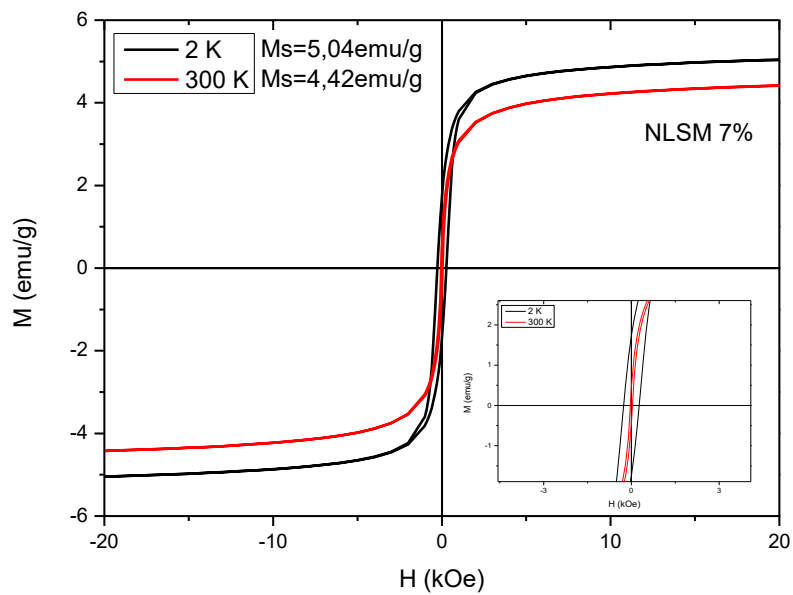
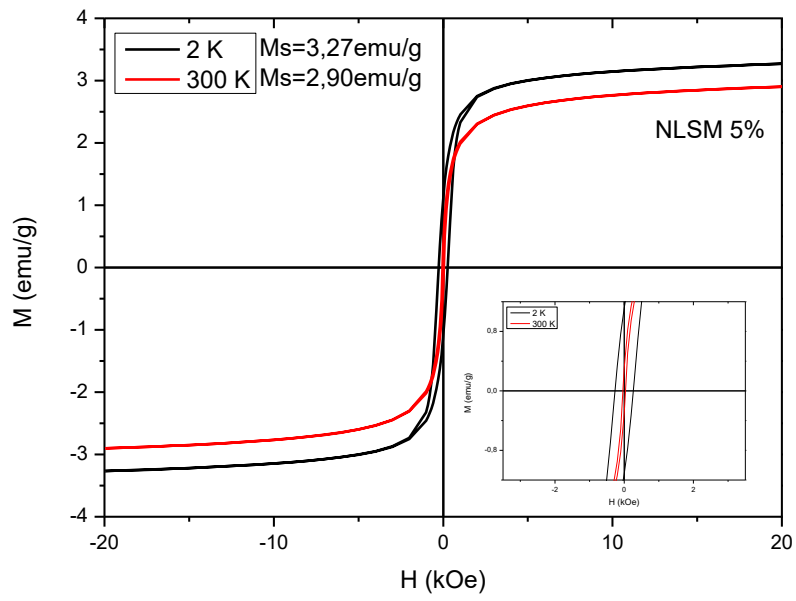
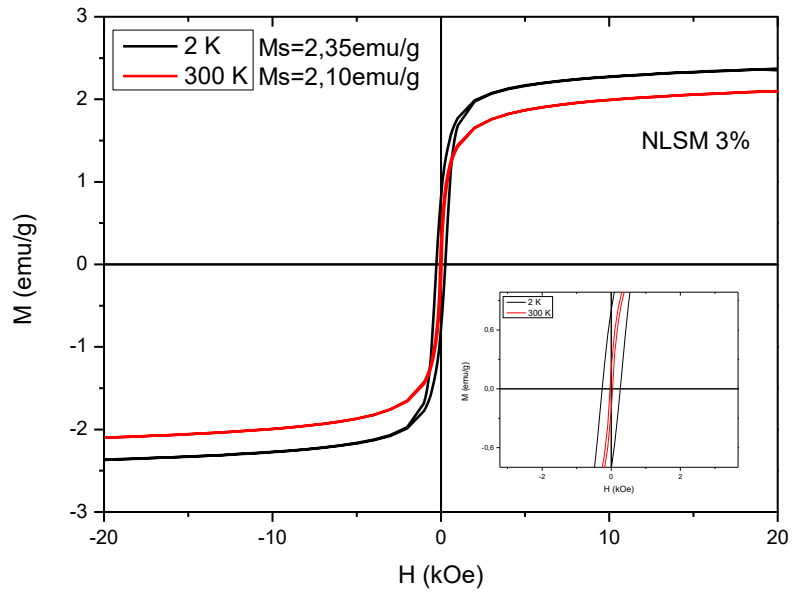
4.5 Caracterizações magnéticas

4.5.1 Magnetometria SQUID

A magnetização *versus* o campo magnético, com dependência da temperatura (300 K e 2 K), está mostrada na Figura 46. Foram realizadas medidas de magnetização em um equipamento Quantum Design SQUID/VSM para constatar se as NPs possuem um comportamento magnético em função do campo aplicado.

Figura 46- Curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para a NLS e NLSM 1%, 3%, 5% e 7%.





Observou-se que todas as curvas de magnetização das NLSMs demonstram que as NPs possuem um comportamento muito semelhante ao superparamagnetismo (KOLEN'KO et al., 2014), mas já para a NLS esse comportamento magnético não é observado, o que já era esperado, pois as NPMs estão ausentes nessas nanoemulsões.

Observou-se que as NLSMs, diferentemente das NLS, apresentam discretamente um laço de histerese, que é semelhante para as amostras NLSM 1%, 3%, 5% e 7%. Verificando a ampliação da região central das curvas apresentadas na Figura 46, é possível notar uma área de histerese muito pequena para todas as NLSMs, o que indica um comportamento bastante próximo ao superparamagnetismo, visto que não é observada uma expressiva magnetização remanente (M_r) e nem campo coercitivo (H_c) nas NLSMs.

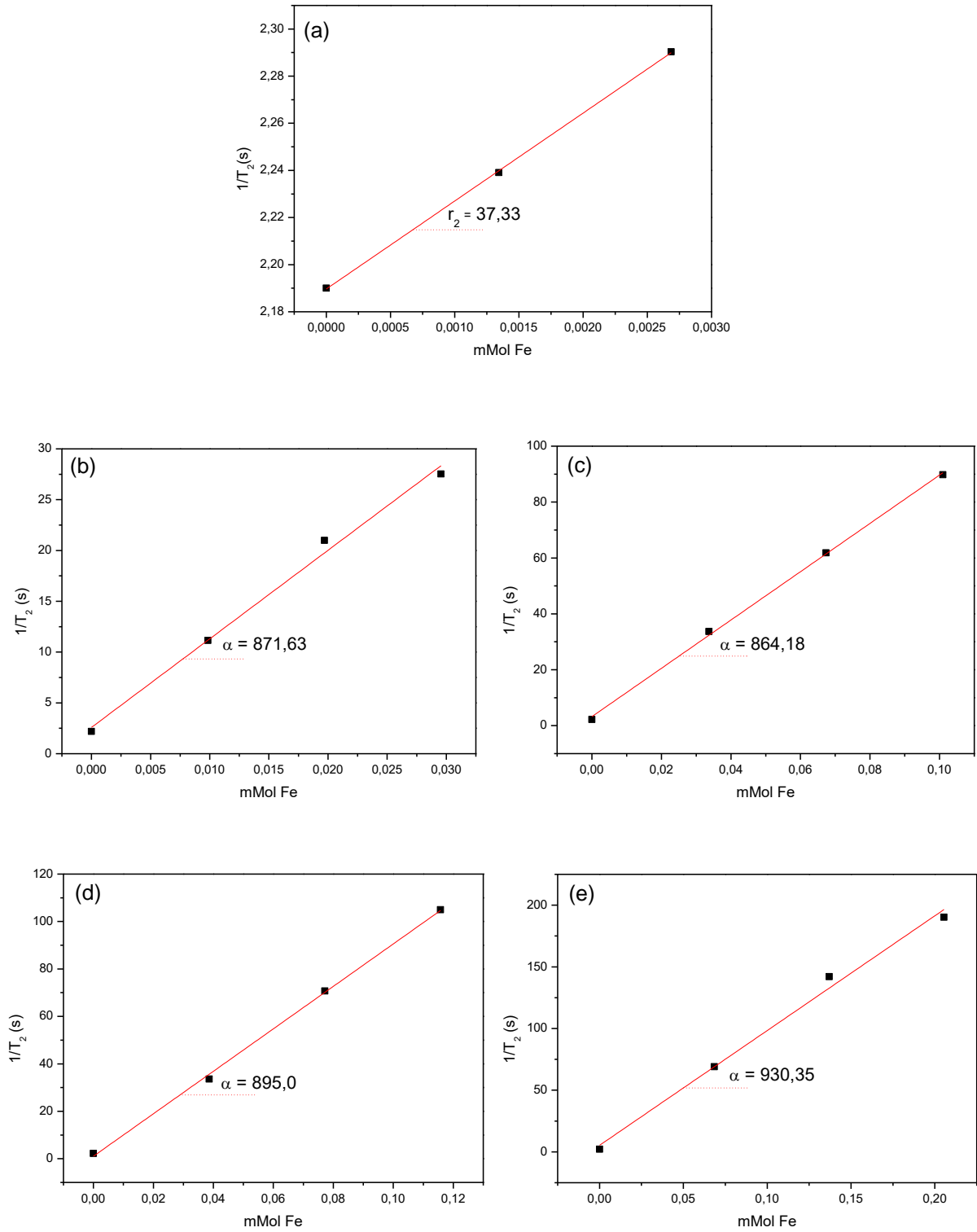
De acordo com os valores de M_s , pode-se concluir que a NLSM 7% obteve a maior resposta ao campo magnético aplicado, exibindo os maiores valores de magnetização de saturação nas duas temperaturas, o que já era previsto devido possuir maior concentração de Fe_3O_4 em sua composição.

4.5.2 Relaxometria Magnética e Imagem por Ressonância Magnética (IRM)

Nanopartículas superparamagnéticas são de grande interesse para imagem em ressonância magnética (IRM). Observou-se que estas partículas têm grande potencial como agente de contraste para IRM.

As nanopartículas magnéticas, recobertas com ácido oleico e encapsuladas pela cera de carnaúba com o diâmetro hidrodinâmico das NLSMs aproximadamente 170 nm, exibiram uma relaxativadede 864,18 a 930,35 mM (Fe)⁻¹s⁻¹ para um campo de 3T (Figura 47).

Figura 47- Gráfico de Relaxometria magnética das amostras: (a) NLS, (b) NLSM 1%, (c) NLSM 3%, (d) NLSM 5%, (e) NLSM 7%.



Observou-se que os tempos de relaxações transversais destas NLSMs possuem valores muito mais elevados do que outros agentes de contraste existentes na literatura (Tabela 9) (CARVALHO, 2011; HUFFSTETLER, 2009).

Tabela 9- Relaxatividade dos agentes de contraste T₂ compostos por óxidos de ferro.

	Agentes de contraste	Relaxatividade (r ₂) [mM(Fe) ⁻¹ s ⁻¹]
Comerciais	Ferumoxides (Feridex [®]) ^a	107,00
	Ferumoxtran (Combidex [®]) ^a	53,10
	Ferumoxsil (Lumirem [®]) ^a	72,00
	Ferucarbotran (Resovist [®]) ^a	186,00
Sintetizadas nesse trabalho	NLSM 1%	871,63
	NLSM 3%	864,18
	NLSM 5%	895,00
	NLSM 7%	930,35

^aFonte: CARVALHO, 2011; HUFFSTETLER, 2009.

Souza e Mohallem (2011) relataram que o Feridex[®] é usado em imagiologia do fígado em IRM e possui um tamanho hidrodinâmico de 120 a 180 nm. Na Tabela 9 observa-se o valor da relaxatividade desse agente de contraste comercial [107 mM(Fe)⁻¹s⁻¹]. As NLSMs presentes nesse trabalho exibiram um tamanho médio de partícula (170 nm) semelhante ao Feridex[®], mas com relaxatividades transversais de até 8,7 vezes maiores.

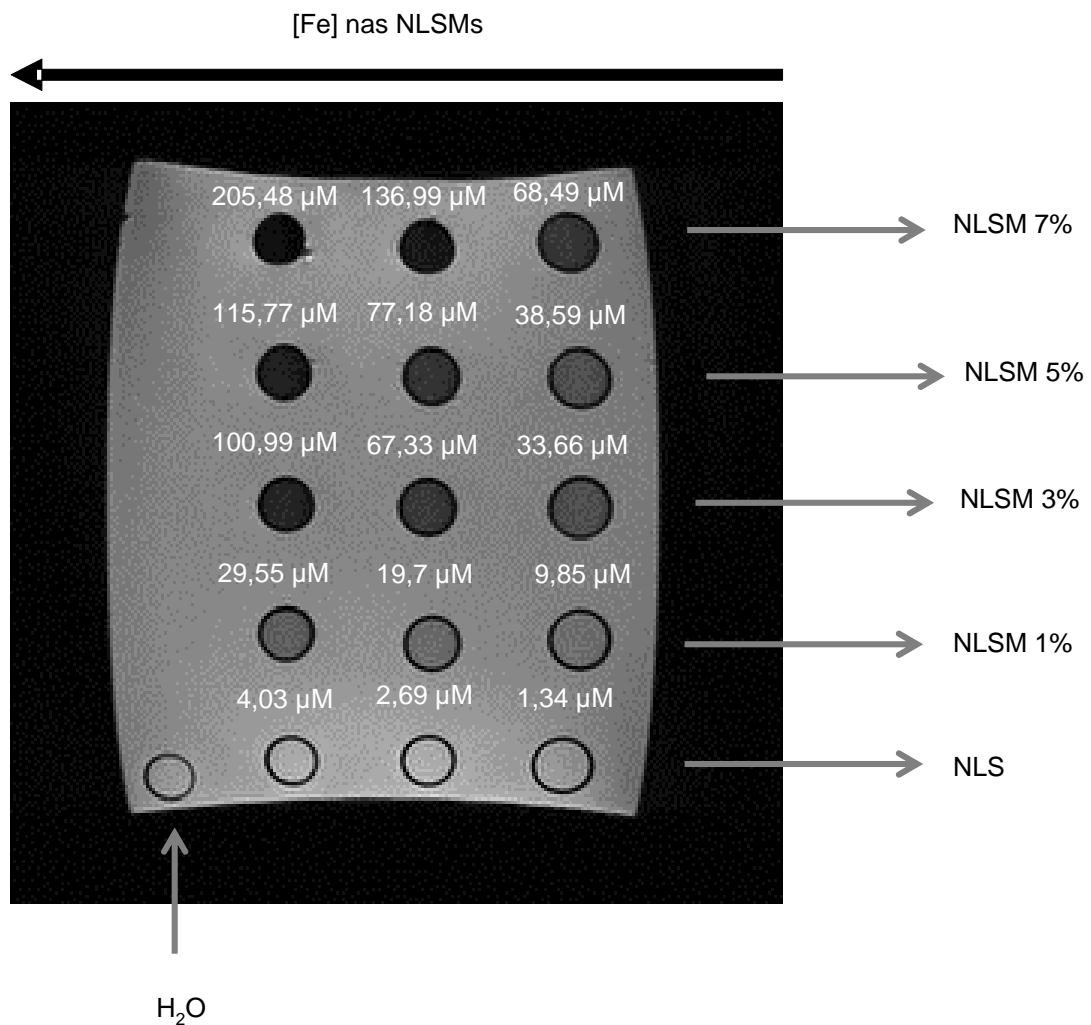
Os agentes de contraste comerciais, mostrados na Tabela 9, obtiveram destaque devido ao fato de encurtarem significativamente os tempos de relaxação transversal (T₂) no baço, fígado e medula óssea devido à sua incorporação e acumulação seletivo pelas células do sistema reticuloendotelial (RE). Um exemplo disso, é o uso clínico de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIOs) para visualizar o fígado, as partículas são internalizadas pelas células de Kupffer (NA, SONG e HYEON, 2009).

Enquanto as SPIO (> 30 nm) e nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro ultra pequenas (USPIO) (< 30 nm) permitem uma administração intravenosa, as partículas volumosas, com tamanhos maiores, somente conseguem ser administradas oralmente de forma a analisar o trato gastrointestinal, pois de outro

modo podem ficar retidas nos alvéolos pulmonares (SOUZA e MOHALLEM, 2011; GERALDES e LAURENT, 2009).

Observou-se que as NLSMs mostraram valores de relaxatividade (r_2) superiores a $850 \text{ mM(Fe)}^{-1}\text{s}^{-1}$, o que claramente traduz para efeitos de contraste escuros quando as amostras foram fotografadas em 3T em IRM (Figura 48).

Figura 48- Imagem por ressonância magnética ponderada em T_2 das NLS e NLSMs.



Apenas a NLS não atingiu valores altos de relaxatividade (r_2), o que já era esperado, pois esse sistema não possui as nanopartículas magnéticas. Entretanto, todas as outras amostras mostraram valores semelhantes, crescentes de acordo com a quantidade de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@AO}$ dentro das NLSMs. Observou-se que a NLSM 7% traduz uma imagem mais escura que as demais NLSMs, devido sua maior concentração de óxido de ferro (Figura 48).

As nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas mostraram potencial para serem usadas como agentes de contraste para auxiliar no diagnóstico por imagem por ressonância magnética com técnica de imagem ponderadas em T_2 (MAMANI et al., 2012; KEASBERRY et al., 2015).

5 CONCLUSÃO

O procedimento de fusão-emulsificação para formular nanopartícula lipídica sólida (NLS) e nanopartícula lipídica sólida magnética (NLSM) à base de cera de carnaúba foi realizado com êxito e a obtenção das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ pelo método de coprecipitação, obteve-se um ferrofluido com boas propriedades magnéticas, pois mostraram comportamento semelhante ao superparamagnetismo com alta magnetização de saturação. Através da análise de ICP OES foi possível determinar a concentração de ferro nas emulsões e no ferrofluido.

As NLS e NLSMs apresentaram-se estáveis, devido seu elevado potencial zeta, e dimensões nanométricas de 150,77 a 182,17 nm. A partir das micrografias de MET e de MEV foi possível avaliar a morfologia esférica das nanopartículas e a incorporação bem sucedida do óxido de ferro pela matriz lipídica sólida, que ocorreu preferencialmente no núcleo da nanopartícula lipídica.

As NLSM 3%, NLSM 5% e NLSM 7% apresentaram um perfil de aquecimento por hipertermia magnética capaz de chegar a uma faixa ideal para a aplicação de uma hipertermia moderada condizente à aplicada em tratamentos clínicos. As NLSMs e NLS mostraram um mesmo perfil de liberação *in vitro*. Observou-se que a NLSM 7% na liberação do bioativo por Hipertermia Magnética exibiu melhores resultados que o método sem aplicação do campo magnético. Através dos resultados obtidos por relaxometria magnética as NLSMs foram qualificadas como excelentes agentes de contraste escuro para serem usados em imagem por ressonância magnética (IRM). As nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro são usadas como agentes de contraste (tipo T_2) mais seguros devido a sua baixa toxicidade em seres humanos e a possibilidade de ser controlada sua magnetização. Nesse trabalho a NLSM 7% apresentou um maior contraste escuro que as demais NLSMs, devido sua maior concentração de nanopartículas de óxido de ferro.

No presente trabalho foi desenvolvido pela primeira vez nanossistemas magnéticos com cera de carnaúba e $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ sendo possíveis candidatos em potencial para aplicações terapêuticas.

REFERÊNCIAS

AGENCIASINC.ES: **Hipertermia-magnetica-una-herramienta-auxiliar-en-los-tratamientos-contr-el-câncer**. Disponível em:

<<http://www.agenciasinc.es/Noticias/Hipertermia-magnetica-una-herramienta-auxiliar-en-los-tratamientos-contr-el-câncer>>. Acesso em: 21 jun.2016.

AGRAWAL, P., STRIJKERS, G., NICOLAY, K. **Chitosan-based systems for molecular imaging**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, v. 62, p. 42-58.

ALVES, M. O.; COELHO, J. D. **Tecnologia e relações sociais de produção no extrativismo da carnaúba no nordeste brasileiro**. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL (SOBER), 44, Fortaleza, 2006.

AMARAL, L. H.; BARROS, R. DE C. A.; BARBOSA, S. S.; ABREU, L. C. L.; CARMO, F. A.; CASTRO, H. C.; NASCIUTTI, L. E.; RODRIGUES, C. R.; SOUSA, V. P.; CABRAL, L. M.; **Development of New Babassu Oil Lipidic Nanostructured Systems; Potential Alternative for Benign Prostatic Hyperplasia Therapy**. *Current Nanoscience* 2014, v. 10, p. 786-795.

ANDRADE, A., FERREIRA, R., FABRIS, J., DOMINGUES, R. **Coating Nanomagnetic Particles for Biomedical Applications**. In: Fazel-Rezaei, R. *Biomedical Engineering-Frontiers and Challenges*. Rijeka: InTech, 2011. p. 157-176.

ANZENBERGER, C.; LI, S.; BOUZIDI, L.; NARINE, S. S. **Synthesis of waxes from vegetable oil derived self-metathesized aliphatic esters**. *Industrial Crops and Products*, St Martin d'Herès, 2016, v. 89, p. 368-375.

ATTWOOD, D. **Microemulsions**. In: KREUTER, J. **Colloidal drug delivery systems, Drugs and the pharmaceutical sciences**. New York: Marcel Dekker, 1994. v. 66, p. 31-71.

BANOBRE-LOPEZ, M.; PINEIRO-REDONDO, Y.; DE SANTIS, R.; GLORIA, A.; AMBROSIO, L.; TAMPIERI, A.; DEDIU, V.; RIVAS, J. **Poly(caprolactone) based magnetic scaffolds for bone tissue engineering**. *Journal of Applied Physics*, Berkeley, 2011, v. 109, p. 07B313-1- 07B313-3.

BANOBRE-LOPEZ, M.; TEIJEIRO, A.; RIVAS, J. **Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment**. *Reports of practical oncology and radiotherapy*, Poznań, 2013, v. 8, p. 397-400.

BARRETO, A. C. H.; SANTIAGO, V. R.; FREIRE, R. M.; MAZZETTO, S. E.; DENARDIN, J. C.; MELE, G.; CAVALCANTE, I. M.; RIBEIRO, M. E. N. P.; RICARDO, N. M. P. S.; GONÇALVES, T.; CARBONE, L.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; FECHINE, P. B. A. **Magnetic Nanosystem for Cancer Therapy Using Oncocalyxone A, an Antitumour Secondary Metabolite Isolated from a Brazilian Plant**. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, v. 14, p. 18269-18283.

BEDÊ, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico - magnéticas para utilização biomédica**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.

BEIRAGHI, A.; POURGHAZI, K.; AMOLI-DIVA, M. **Mixed supramolecular hemimicelles aggregates and magnetic carrier technology for solid phase extraction of ibuprofen in environmental samples prior to its HPLC–UV determination**. Chemical Engineering Science, 2014, v. 108, p. 103–110.

BINI, R. A.; MARQUES, R. F. C.; SANTOS, F. J.; CHAKER, J. A.; JAFELICCI, M. **Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2011, v. 324, p. 534-539.

BRUCE, I. J.; TAYLOR, J.; TODD, M.; DAVIES, M. J.; BORIONI, E.; SANGREGORIO, C.; SEN, T. **Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, Illinois, 2004, v. 284, p. 145-160.

CANEVAROLO, Jr, S. V. **Técnicas de caracterização de Polímeros**. Artliber Editora, São Paulo, 2004, v. 430, p. 209.

CARVALHO, F. P. A.; GOMES, J. M. A. **Eco-eficiência na Produção de Cera de Carnaúba no Município de Campo Maior, Piauí, 2004**. Revista de Economia e Sociologia Rural, Toledo, 2008, v.46, p. 421-453.

CARVALHO, R. F. S. **Nanopartículas como potenciais agentes de contraste para Imagem de Ressonância Magnética: caracterização físico – química de polioxometalatos (POMs) contendo íons lantanídeos (III) e suas nanopartículas revestidas de sílica**. Dissertação (Mestre em Bioquímica). Faculdade de Ciências eTecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

CHAN, D.; KIRPOTIN, D.B.; BUNN, P.A. **Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency- induced hyperthermia of câncer**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, Illinois, 1993, v.122, p. 374-378.

CHASTELLAIN, M.; PETRI, A.; GUPTA, A.; RAO, K.V.; HOFMANN, H. **Scalable synthesis of new class of polymer microrods by a liquid-liquid dispersion technique**. Advanced Engineering Materials, Saarbrücken, 2004, v. 6, p. 235.

CNIP.ORG.BR. Pau branco. Disponível em:
http://www.cnip.org.br/banco_img/Pau%20Branco/auxemmaoncocalyxtaub4.html>. Acesso em: 03 abr. 2017.

COSTA, C.O.; COSTA, E.O.; FERREIRA, F.R.; VIANA, L.S.; DA SILVA, L.V.; SILVA, F.A.S.; ABREU, F.C.; FIGUEIREDO, I.M.; PINHO Jr. W.; BENTO, E.S.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; AGUILERA-VENEGAS, B.; NORAMBUENA, E.; OLEA-AZAR, C.; GOULART, M.O.F. **Oncocalyxone A: Electrochemical, Spectroscopic Investigation and Studies of Its Interaction with DNA, Nucleobases and N-**

acetylcysteine. Journal of the Brazilian Chemical Society, Campinas, 2012, v. 23, p. 1174-1185.

CUNHA, S. S. **Aplicação de Nanopartículas Magnéticas em Hipertermia.** 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Biomédica), Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2014.

DASH, A. K.; CUDWORTH, G. C. **Therapeutic applications of implantable drug delivery system.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 1998, v. 40, p. 1-12.

DE JESUS, M.B.; ZUHORN, I.S. **Solid lipid nanoparticles as nucleic acid delivery system: properties and molecular mechanisms.** Journal of Controlled Release, 2015, v. 201, p. 1–13.

DE VRINGER, T. **Topical preparation containing a suspension of solid lipid particles.** US Patent No. 5904932, 1999.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E.B.; SILVA, A.M. **Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers—a systematic review of in vitro data.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2014, v. 87, p. 1–18.

DUTZ, S.; HERGT, R. **Magnetic particle hyperthermia—a promising tumour therapy?** Nanotechnology, 2014, v. 25, p. 452001.

EL-BAGORY, I.; BARAKAT, N.; IBRAHIM, M.A.; EL-ENAZI, F. **Formulation and in-vitro evaluation of theophylline matrix tablets prepared by direct compression: effect of polymer blends.** Saudi Pharmaceutical Journal, 2012, v. 20, p. 229–238.

ESCALONA, M. M.; FERNÁNDEZ, E, S.; PRADOS, J, C.; **Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer.** International Journal of Pharmaceutics, Lille, 2016, v. 504, p. 11–19.

FANTECHI, E.; INNOCENTI, C.; ZANARDELLI, M.; FITTIPALDI, M.; FALVO, E.; CARBO, M.; SHULLANI, V.; DI CESARE MANNELLI, L.; GHELARDINI, C.; FERRETTI, A.M.; PONTI, A.; SANGREGORIO, C.; CECI, P. **A smart platform for hyperthermia application in cancer treatment: cobalt-doped ferrite nanoparticles mineralized in human ferritin cages.** ACS Nano, 2014, v. 8, p. 4705–4719.

FANTHI, M.; MOZAFARI, M. R.; MOHEBBI, M. **Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems.** Trends in Food Science & Technology, Norwich, 2012, v. 23, p. 13-27.

FERNANDES, L.; DIAS, J. L.; MARQUES, R. M.; **A Ressonância Magnética (RM).** Revista Medicina Desportiva Informa, 2011, v. 2, p. 4-5.

FERREIRA, M.A.D.; NASCIMENTO, N.R.F.; SOUSA, C.M.; PESSOA, O.D.L.; LEMOS, T.L.G.; VENTURA, J.S.; SCHATTNER, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, AM.

Oncocalyxone A inhibits human platelet aggregation by increasing cGMP and by binding to GP Iba glycoprotein. British Journal of Pharmacology, London, 2008, v. 154, p. 1216-1224.

FINOTELLY, P. V.; MORALES, M. A., ROCHA-LEÃO, E. M.; BAGGIO-SAITOVITCH.; ROSSY, A. M. **Magnetic studies of iron(III) nanoparticles in alginate polymer for drug delivery applications.** Materials Science and Engineering: C, Fusionopolis, 2004, v. 24, p. 625-629.

FONTANIVE, V.C.P.; KHALIL, N.M.; COTICA, L.F.; MAINARDES, R.M. **Aspectos Físicos e Biológicos de Nanopartículas de Ferritas Magnéticas.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara, 2014, v. 4, p.549-558.

FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, J. A. **Nanopartícula Magnética e suas Aplicações.** In: ALVES, W. A. Química Supramolecular e Nanotecnologia. Rio de Janeiro: Atheneu, 2015. p. 269-289.

GARIMELLA, R.; ELTORAI, A. E. M. **Nanotechnology in orthopedics.** Journal of Orthopaedics, Jagdishpur, 2017, v. 14, p 30-33.

GASCO, M. R. **Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution.** US Patent No. 5250236, 2003.

GASTALDI, L.; BATTAGLIA, L.; PEIRA, E.; CHIRIO, D.; MUNTONI, E.; SOLAZZI, I.; GALLARATE, M.; DOSIO, F. **Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: current state of the art.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2014, v. 87, p. 433–444.

GERALDES, C. F.; LAURENT, S. **Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging.** Contrast Media & Molecular Imaging, 2009, v. 4, p. 1–23.

GHADIRI, M.; VATANARA, A.; DOROUD, D.; ROHOLAMINI NAJAFABADI, A. **Loading hydrophilic drug in solid lipid media as particles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size.** International Journal of Pharmaceutics, Lille, 2012, v. 424, p. 128-137.

GLORIA, A.; RUSSO, T.; D'AMOR, U.; ZEPPESELLI, S.; D'ALESSANDRO, T.; SANDRI, M.; BAÑOBRE-LÓPEZ, M.; PIÑEIRO-REDONDO, Y.; UHLARZ, M.; TAMPIERI, A.; RIVAS, J.; HERRMANNSDÖRFER, T.; DEDIU, V.A.; AMBROSIO, L.; DE SANTIS, R. **Magnetic poly(ϵ -caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposite substrates for advanced bone tissue engineering.** Journal of the Royal Society Interface, Philadelphia, 2013, v. 10, Article Number: 20120833.

GÓES, M. C. C., BEZERRA, C. W. B. **Palha da Carnaúba - Copernicia Cerifera.** 1º edição. Editora: Novas edições acadêmicas, 2016, p. 1-108.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. **Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications**. Journal Biomaterials, New York, 2005, v. 26, p. 3995-4021.

GUPTA, R. R.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticle Technology for Drug Delivery. Drug and the Pharmaceutical Science**. Nova York: Taylor & Francis Group, 2006.
HAFELI, U.; SCHUTT, W.; TELLER, J.; ZBROROWSKI, M. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. 1° Ed. New York: Plenum Press, 1997.

HAHN, P. **Advances in contrast-enhanced MR imaging. Gastrointestinal contrast agents**. American Journal Roentgenology. Jacksonville, 1991, v. 156, p. 252-254.

HAO, R.; XING, R.; XU, Z.; HOU, Y.; GAO, S.; SUN, S. **Synthesis, Functionalization, and Biomedical Applications of Multifunctional Magnetic Nanoparticles**. Advanced Materials, Cambridge, 2010, v. 22, p. 2729-2742.

HARRON, A. F.; POWELL, M. J.; NUNEZ, A.; MOREAU, R. A. **Analysis of sorghum wax and carnauba wax by reversed phase liquid chromatography mass spectrometry**. Industrial Crops and Products, 2017, v. 98, p. 116-129.

HERGT, R.; ANDRÄ, W.; AMBLY, C.G.; HILGER, I.; KAISER, W.A.; RICHTER, U.; SCHMIDT, H.G. **Physical Limits of Hyperthermia Using Magnetite Fine Particles**. IEEE Transactions on Magnetics, Boulder, 1998, v. 34, p. 3745-3754.

HERNÁNDEZ, J.R. V.; GOYMANN, C.C. M. **Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005, v. 60, p. 113–122.

HERVAULT. A.; THANH, N. T. K. **Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer**. The Royal Society of Chemistry Nanoscale, Haidian, 2014, v. 6, p. 11553-11573.

HSU, M. H.; SU, Y. C. **Iron-oxide embedded solid lipid nanoparticles for magnetically controlled heating and drug delivery**. Biomedical Microdevices, Houston, 2008, v. 10, p. 785–793.

HUFFSTETLER. P., P. **Synthesis and Characterization of Well-Defined Heterobifunctional Polyethers for Coating of Magnetite and their Applications in Biomedicine and Magnetic Resonance Imaging**. These (Doctor of Philosophy In Macromolecular Science and Engineering). Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, 2009.

INVENNTA.EU: **Desenho-de-agentes-de-contraste**. Disponível em: <<http://www.invennta.eu/pt-pt/desenho-de-agentes-de-contraste-baseados-em-nanoparticulas-magneticas-para-aplicacoes-em-imagem-por-resonancia-magnetica/>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

ITO, A.; NAKAHARA, Y.; TANAKA, K.; KUGA, Y.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. **Time course of biodistribution and heat generation of magnetite cationic liposomes in mouse model.** Japanese Journal of Hyperthermic Oncology, Tokyo, 2003, v. 19, p. 151-159.

JOHANNSEN, M.; GNEVECKOW, U.; ECKELT, L.; FEUSSNER, A.; WALDÖFNER, N.; SCHOLZ, R.; DEGER, S.; WUST, P.; LOENING, S.A.; JORDAN, A. **Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique.** International Journal of Hyperthermia, 2005, v. 21, p. 637-647.

JONG, W.H.; BORM, P.J. **Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards.** International Journal Nanomedicine, 2008, v. 3, p. 133–149.

JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; WUST, P.; FÄHLING, H.; FELIX, R. **Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 1999, v. 201 p. 413-419.

JOSEPHSON, L.; LEWIS, J.; JACOBS, P.; HAHN, P.; STARK, D. **The effects of iron oxide on proton relaxivity.** Magnetic Resonance Imaging, 1988, v. 6, p. 647-653.

JOSHI, B.D.; SRIVASTAVA, A.; HONORATO, S. B.; TANDON, P.; PESSOA, O. D. L.; FECHINE, P. B. A.; AYALA, A. P. **Study of molecular structure, vibrational, electronic and NMR spectra of oncocalyxone A using DFT and quantum chemical calculations.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2013, v. 113, p. 367–377.

JOZEFCAZAK, A.; SKUMIEL, A. **Study of heating effect and acoustic properties of dextran stabilized magnetic fluid.** Journal of Magnetismo and Magnetic Materials, 2007, v. 311, p. 193-196.

JUNG, C. W.; JACOBS, P. **Physical and Chemical-Properties of Superparamagnetic Iron-Oxide MR Contrast Agents - Ferumoxides, Ferumoxtran, Ferumoxsil.** Magnetic Resonance Imaging, 1995, v. 13, p. 661-674.

JUNIOR, W. B.; SOUZA, C. G. S. ; SILVA, T. L. ; JAFELICCI JR, M. ; VARANDA, L. C. **Formation Mechanism via a Heterocoagulation Approach of FePt Nanoparticles Using the Modified Polyol Process.** Journal of physical chemistry. C, 2011, v. 115, p. 10475-10482.

JUSTOGINER.COM. **Nanotecnologia.** Disponível em: <<http://justoginer.com/2014/02/09/quimica-y-nanotecnologia-premio-san-alberto-magno-a-la-mejor-tesis-doctoral/>>. Acesso em: 24 fev. 2017.

KAWASHITA, M.; TANAKA, M.; KOKUBO, T.; INOUE, Y.; YAO, T.; HAMADA, S.; SHINJO, T. **Preparation of ferrimagnetic magnetite microspheres for in situ hyperthermic treatment of cancer**. *Journal Biomaterials*, 2005, v. 26, p. 2231-2238.

KEASBERRY, N. A.; BAÑOBRE-LÓPEZ, M.; WOOD, C.; STASIUK, G. J.; GALLO, J.; LONG, N. J. **Tuning the relaxation rates of dual-mode T_1/T_2 nanoparticle contrast agents: a study into the ideal system**. This journal is © The Royal Society of Chemistry Nanoscale, 2015, v. 7, p. 16119-16128.

KHANDHAR, A.P.; FERGUSON, R.M.; SIMON, J.A.; KRISHNAN, K.M. **Tailored magnetic nanoparticles for optimizing magnetic fluid hyperthermia**. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, v. 100, p. 728–737.

KHERADMANDNIA, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; NOSRATI, M.; ATYABI, F. **Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax**. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicinal*, 2010, v. 6, p. 753-759.

KIM BD, N. A. K.; CHOI, H. K. **Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, v. 24, p. 199-205.

KIM, C. K.; LEE, E. J. **The controlled release of blue dextran from alginate beads**. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, 1992, v. 79, p. 11-19.

KOLEN'KO, YU.V.; BAÑOBRE-LÓPEZ, M.; RODRÍGUEZ-ABREU, C.; CARBÓ-ARGIBAY, E.; SAILSMAN, A.; PIÑEIRO-REDONDO, Y.; CERQUEIRA, M.F.; PETROVYKH, D.Y.; KOVNIR, K.; LEBEDEV, O.I.; RIVAS, J. **Large-Scale Synthesis of Colloidal Fe_3O_4 Nanoparticles Exhibiting High Heating Efficiency in Magnetic Hyperthermia**. *Journal of Physical Chemistry C*, 2014, v. 118, p. 8691–8701.

KOLHATKAR, A. G.; JAMISON, A. C.; LITVINOV, D.; WILLSON, R. C.; LEE, T. R. **Tuning the magnetic properties of nanoparticles**, *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, v. 14, p. 15977–6009.

KORELEV, V. V.; AREFYEV, I.; RAMAZANOVA, A. G. **The magnetocaloric effect of superfine magnets**. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2008, v. 92, p. 691-695.

KRUSE, A.M.; MEENACH, S.A.; ANDERSON, K.W.; HILT, J.Z. **Synthesis and characterization of CREKA-conjugated iron oxide nanoparticles for hyperthermia applications**. *Journal Acta Biomaterialia*, 2014, v. 10, p. 2622–2629.

LAURENT, S.; DUTZ, S.; HAFELI, U. O.; MAHMOUD, M. **Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles**. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011, v. 166, p. 8-23.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. **Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization,**

Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. American Chemical Society, 2008, v. 108, p. 2064-2110.

LEÓN, L.; BUSTAMANTE, A.; OSORIO, A.; OLARTE, G.S.; VALLADARES, L. S.; BARNES, C.H.W.; MAJIMA, Y. **Synthesis and characterization of hollow α -Fe₂O₃ sub-micron spheres prepared by sol-gel.** *Hyperfine Interactions*, 2011, v. 202, p.131-137.

LI, Z.; KAWASHITA, M.; ARAKI, N.; MITSUMORI, M.; HIRAOKA, M.; DOI, M. **Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of câncer.** *Materials Science and Engineering: C*, 2010, v. 30, p. 990-996.

LIM, S.J.; KIM, C.K. **Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid.** *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, v. 243, p. 135-146.

LOO, G. V.; SAELENS, X.; GURP, M. V.; MACFARLANE, M.; MARTIN, S. J.; VANDENABEELE, P. **The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.** *Cell Death & Differentiation*, 2002, v. 9, p.1031–1042.

LOO, G.V.; SAELENS, X.; GURP, M.V.; MACFARLANE, M.; MARTIN, S.J.; VANDENABEELE, P. **The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet.** *Cell Death & Differentiation*, 2002, v. 9, p.1031–1042.

LOPEZ, M. B.; TEIJEIRO, A.; RIVAS, J. **Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for câncer treatment.** *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*, 2013, v. 18, p. 397- 400.

LOZHECHNIKOVA, A.; BELLANGER, H.; MICHEN, B.; BURGERT, I.; ÖSTERBERG, M. **Surfactant-free carnauba wax dispersion and its use for layer-by-layer assembled protective surface coatings on wood.** *Applied Surface Science*, 2017, v. 396, p. 1273-1281.

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

MARQUES, W.B.; DOS SANTOS, H.S.; PESSOA, O.D.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T.L. **Anthracene derivatives from *Auxemma oncocalyx*.** *Phytochemistry*, 2000, v. 55, p. 793–797.

MARTINS, S.; THOI, I.; REIMOLD, I.; FRICKER, G.; SOUTO, E.; FERREIRA, D.; BRANDL, M. **Brain delivery of camptothecin by means of solid lipids nanoparticles: formulation design, *in vitro* and *vivo* studies.** *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, v. 439, p. 49-62.

MAZZOLA, A. A. **Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional.** Revista Brasileira de Física Médica, 2009, v. 3, p. 117-129.

MEENACH, S. A.; HILT, J. Z.; ANDERSON, K. W. **Poly(ethylene glycol)-based magnetic hydrogel nanocomposites for hyperthermia cancer therapy.** Acta Biomaterialia, 2010, v. 6, p. 1039-1046.

MEHNERT, W.; MADER, K. **Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications.** Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, v. 47, p. 165–196.

MILANOVIC, J.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; RAJIC, N.; NEDOVIC, V.; BUGARSKI, B. **Microencapsulation of Flavors in Carnauba Wax.** Journal Sensors, 2010, v. 10, p. 901-912.

MISSIRLIS, D.; KAWAMURA, R.; TIRELLI, N.; HUBBELL, J. A. **Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, v. 29, p. 120-129.

MITSUMORI, M.; HIRAOKA, M.; SHIBATA, T.; OKUNO, Y.; NAGATA, Y.; NISHIMURA, Y.; ABE, M.; HASEGAWA, M.; NAGAE, H.; EBISAWA, Y. **Target hyperthermia using dextran magnetite complex: a new treatment modality for liver tumors.** Hepato-Gastroenterology, 1996, v. 43, p. 1431-1437.

MITSUMORI, M.; SHIBATA, T.; NAGATA, Y.; HIRAOKA, M.; HASEGAWA, M.; NAGAE, H.; KITO, K. **Time course change of the heat-generating capability of dextran magnetite complex (DM) in vivo.** Japanese Journal of Hyperthermic Oncology, 2001, v. 17, p. 85-91.

MOURA, C. L. **Estudo da solubilização da griseofulvina em micelas dos Brijs® 78, 98, 700.** 2013. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

MÜHLEN, A. Z.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—drug release and release mechanism.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1997, v. 45, p. 149-155.

MULLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000a, v. 50, n. 1, p. 161-177.

MÜLLER, R. H.; SHEGOKAR, R.; KECK, C. M. **20 years of solid lipid nanoparticles (SLN or CLN): present state of development and industrial applications.** Current drug discovery technologies, 2011, v. 8, p. 207-227.

MÜLLER, R.H.; KECK, C.M. **Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles.** Journal of Biotechnology, 2004, v.113, p. 151-170.

NA, H. B.; SONG, I. C.; HYEON, T. **Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents**. *Advanced Materials*, 2009, v. 21, p. 2133–2148.

NAGARAJAN, S.; YONG, Z. **Use of core/shell structured nanoparticles for biomedical applications**. *Recent Patents on Biomedical Engineering*, 2008, v.1, p.34–42.

NART, V.; BERINGHS, A. O.; FRANÇA, M. T.; ESPÍNDOLA, B.; PEZZINI, B. R.; STULZER, H. K. **Carnauba wax as a promising excipient in melt granulation targeting the preparation of mini-tablets for sustained release of highly soluble drugs**. *Materials Science and Engineering C*, 2017, v. 70, p. 250-257.

OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C. M.; MULLER, R. H.; KNEUER, C. **Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA**. *Journal Control Release*, 2001, v. 77, p. 345-355.

OLIVEIRA, A. M. S.; GOMES, J. M. A. **'Exigências e Vantagens Mercadológicas da Cera de Carnaúba'**. In: GOMES, J. M. A.; SANTOS, K. B.; SILVA, M. S. (Org.). *Cadeia Produtiva da Cera de Carnaúba: Diagnóstico e Cenários*. 1ª edição. Teresina, EDUFPI, 2006, v. 1, p. 85-98.

OLIVEIRA, S. S. **Ciências Moleculares**, Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, 2015, v 3, p. 22-25.

OLIVEIRA, S. S. *Ciências moleculares*. Capítulo: Hipertermia Magnética: O Uso de Nanopartículas no Combate ao Câncer. Editora: Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, 2012, v. III, p. 16-47.

OUMZIL, K.; RAMIN, M. A.; LORENZATO, C.; HEMADOU, A.; LAROCHE, J.; JACOBIN-VALAT, M. J.; MORNET, S.; ROY, C.-E.; KAUSS, T.; GAUDIN, K.; CLOFENT-SANCHEZ, G.; BARTHELEMY, P. **Solid Lipid Nanoparticles for Image-Guided Therapy of Atherosclerosis**. *Bioconjugate Chemistry*, 2016, v. 27, p. 569-575.

PANG, X. J.; ZHOU, J.; CHEN, J. J.; YU, M.H.; CUI, F. D.; ZHOU, W. L. **Synthesis of Ibuprofen Loaded Magnetic Solid Lipid Nanoparticles**. *IEEE Transactions on Magnetics*, 2007, v. 43, p. 2415-2417.

PARDOE, H.; CHUA-ANUSOM, W.; ST PIERRE, T. G.; DOBSON. **Detection limits for ferrimagnetic particle concentrations using magnetic resonance imaging based proton transverse relaxation rate measurements**. *Journal Physics in Medicine and Biology*, 2003, v. 48, p. N89-N95.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A.; KULLAMI, R. M. **Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Belfast, 2004, v. 56, p. 827-840.

PATRAVALE, V. B.; DATE, A. A.; KULLAMI, R. M. **Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Belfast, 2004, v.

56, p. 827-840.

PAWAR, H.A.; DHAVAL, R. **Development and evaluation of gastroretentive floating tablets of an antidepressant drug by thermoplastic granulation technique**, Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2014, v. 3, p. 122–132.

PEPPAS, L. B. **Polymers in Controlled Drug Delivery**. Medical Plastics and Biomaterials, 1997, p. 1-10.

PERECIN, C. J. **Nanopartículas Superparamagnéticas Encapsuladas com Polímeros para Aplicação no Tratamento de Câncer por Hipertermia**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de química de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos, 2016.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R.; LEMOS, T.L.; WETMORE, L.A.; MORAES, M.O.; LEYVA, A. **Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil**. Phytotherapy Research, 2000, v. 14, p. 187–191.

PESSOA, C.; VIEIRA, F.M.; LEMOS, T.G.; MORAES, M.O.; LIMA, P.D.; RABENHORST, S.H. **Oncocalixona A from Auxemma oncocalyx lacks genotoxic activity in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes**. Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis, Herndon, 2003, v. 1, p. 215–220.

PESSOA, O.D.L.; DE LEMOS, T.L.G.; DE CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. **Cordichromes from Auxemma oncocalyx**. Phytochemistry, 1995, v. 40, p. 1777–1786.

PRASAD, P. V. **Magnetic Resonance Imaging: Methods and Biologic Applications**. Humana Press: Totowa, Nova Jersey, 2006, v. U, p. 41.

PURI, A.; LOOMIS, K.; SMITH, B.; LEE, J.H.; YAVLOVICH, A.; HELDMAN, E.; BLUMENTHAL, R. **Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic**. Journal Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, 2009, v. 26, p. 523–528.

QUINTO, C.A.; MOHINDRA, P.; TONG, S.; BAO, G. **Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment**. Nanoscale, 2015, v. 7, p. 12728–12736.

RĂCUCIU, M.; **Recent Advances In Biological And Medical Applications Of Magnetic Fluids**. Analele Stiintifice ale Universitatii “Al. I. Cuza” Iasi Tomul II, s. Biofizică, Fizică medicală și Fizica mediului, 2006, p. 67-78.

REDDY, L.H.; ARIAS, J.L.; NICOLAS, J.; COUVREUR, P. **Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications**. Chemical Reviews, 2012, v. 112, p. 5818–5878.

REVILLA, J. L. **Teste de toxicidade da fração da Auxemma oncocalyx e onconcalixona A sobre o desenvolvimento folicular e embrionário in vitro**.

Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.

RODRIGUES, D.C.; CACERES, C.A.; RIBEIRO, H.L.; ABREU, R.F.A.; CUNHA, A.P.; AZEREDO, H.M.C. **Influence of cassava starch and carnauba wax on physical properties of cashew tree gum-based films**, Food Hydrocoll, 2014, v. 38, p. 147–151.

RODRIGUES, V. P. **Copernicia cerifera mart.: aspectos químicos e farmacológicos de uma palmeira brasileira**. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

ROSIAUX, Y.; JANNIN, V.; HUGHES, S.; MARCHAUD, D. **Solid lipid excipients — Matrix agents for sustained drug delivery**. Journal of Controlled Release, 2014, v. 188, p. 18-30.

SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S.; WU, C.J.; LIN, F.H.; STOBINSKI, L. **Carbon encapsulated iron oxide nanoparticles surface engineered with polyethylene glycol-folic acid to induce selective hyperthermia in folate over expressed cancer cells**. International Journal of Pharmaceutics, 2015, v. 480, p. 8–14.

SAFARIKOVA, M.; ROY, I.; GUPTA, M. N.; SAFARIK, I. **Magnetic alginate microparticles for purification of α -amylases**. Journal of Biotechnology, 2003, v. 105, p. 255-260.

SERSHEN, S.; WEST, J. **Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery**. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, v. 54, p. 1225–1235.

SEVERINO, P.; ANDREANI, T.; MACEDO, A. S.; FANGUEIRO, J. F.; SANTANA, M. H.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. **Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery**. Journal of Drug Delivery, 2012, v. 2012, p. 1-10.

SHINKAI, M.; MATSUI, M.; KOBAYASHI, T. **Heat properties of magnetoliposomes for local hyperthermia**. Japanese Journal of Hyperthermic Oncology, 1994, v. 10, p. 168-177.

SILVA, M. F. **Engenharia de superfície de nanopartículas magnéticas para biomedicina: recobrimento de macromoléculas visando estabilidade e compatibilidade em meio fisiológico**. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos, 2013.

SINGH, R.P.; RAMARAO, P. **Accumulated polymer degradation products as effector molecules in cytotoxicity of polymeric nanoparticles**, Toxicology. Science, 2013, v, 136, p. 131–143.

SOLOMONS, T. W. G., FRUHLE, C. B. Química Orgânica, 7ª edição, LTC –Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. Rio de Janeiro, 2002, v. 2, p. 367.

SON, S. J.; REICHEL, J.; HE, B.; SCHUCHMAN, M.; LEE, S. B. **Magnetic nanotubes for magnetic-field-assisted bioseparation, biointeraction, and drug delivery**. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, v. 127, p. 7316-7317.

SOUTO, E. B.; MULLER, R. H. **Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers- Lipid nanoparticles for medicals and pharmaceutical**. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 2011, v. 23, p. 313-328.

SOUZA, C. G. S.; BECK, W.; VARANDA, L. C. **Multifunctional luminomagnetic FePt@Fe₃O₄/SiO₂/Rhodamine B/SiO₂ nanoparticles with high magnetic emanation for biomedical applications**. *Journal of Nanoparticle Research (Online)*, 2013, v. 15, p. 1545-1553.

SOUZA, K, C.; MOHALLEM, N, D, S.; **Nanocompósitos Magnéticos: Potencialidades de Aplicações em Biomedicina** . *Química Nova*, 2011, v. 34, p. 1692-1703.

SUN, S. H.; ZENG, H. **Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles**. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, v. 124, p. 8204-8205.

TAMPIERI, A.; D'ALESSANDRO, T.; SANDRI, M.; SPRIO, S.; LANDI, E.; BERTINETTI, L.; PANSERI, S.; PEPPONI, G.; GOETTLICHER, J.; BAÑOBRE-LOPEZ, M.; RIVAS, J. **Intrinsic Magnetism and Hyperthermia in Bioactive Fe-doped Hydroxyapatite**. *Acta Biomaterialia*, 2012, v. 8, p. 843–851.

TAN, W. L.; BAKAR, M. A. **Synthesis, characterization and impedance spectroscopy study of magnetite/epoxidized natural rubber nanocomposites**. *Journal of Alloys and Compounds*, 2013, v. 561, p. 40–47.

TAVEIRA, S. F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R. F. **Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity**. *Journal of Controlled Release*, 2009, v. 134, p. 35-40.

THOMAS, R. J.; MOON, M. J.; LEE, H.; SASIKALA, A. R. K.; KIM, C. S.; PARK, I-K.; JEONG, Y. Y. **Hyaluronic acid conjugated superparamagnetic iron oxidenanoparticle for cancer diagnosis and hyperthermia therapy**. *Carbohydrate Polymers*, 2015, v. 131, p. 439-446.

TRIALX.COM: Cancer-treatment-multifunctional-magnetic-nanoparticles-for-molecular-imaging-and-hyperthermia. Disponível em: <<http://trialx.com/curetalk/2012/11/19/cancer-treatment-multifunctional-magnetic-nanoparticles-for-molecular-imaging-and-hyperthermia/>>. Acesso em: 01 mar. 2017.

UNER, M.; YENER, G. **Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives**. *International Journal of Nanomedicine*, 2007, v. 2, p. 289–300.

ÜNER, M.; YENER, G. **Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives.** International Journal of Nanomedicine, 2007, v. 2, n. 3, p. 289-300.

VERAVIDALPAISAGISMO.BLOGSPOT.COM.BR: Carnaubeira. Disponível em: <<http://veravidalpaisagismo.blogspot.com.br>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

VIALI, W. R.; ALCANTARA, G. B.; SARTORATTO, P. P. C.; SOLER, M. A. G.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; ANDRZEJEWSKI, B.; MORAIS, P. C. **Investigation of the Molecular Surface Coating on the Stability of Insulating Magnetic Oils.** Journal of physical chemistry. C, 2010, v. 114, p. 179-188.

VITHANI, K.; MANIRUZZAMANA, M.; SLIPPER, I.J.; MOSTAFA, S.; MIOLANEC, C.; CUPPOK, Y.; MARCHAUD, D.; DOUROUMIS, D. **Sustained release solid lipid matrices processed by hotmelt extrusion (HME).** Colloids and Surfaces B, 2013, v. 110, p. 403–410.

VO-DINH T. **Nanotechnology in biology and medicine: methods, devices and applications.** Taylor & Francis, Boca Raton, 2007, p. 762.

WEETALL, H. H.; LEE, M. J. Appl. **Antibodies immobilized on inorganic supports.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 1989, v. 22, p. 311-330.

WESTESEN, K. **Particles with modified physico-chemical properties, their preparation and uses.** US Patent No. 6197349, 2000.

WIJAYA, A.; BROWN, K. A.; ALPER, J. D.; HAMED-SCHIFFERLI, K. **Magnetic field heating study of Fe-doped Au nanoparticles.** Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007, v. 309, p. 15-19.

WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. **Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery.** Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, v. 56, p. 1257-1272.

YANASE, M.; SHINKAI, N.; HONDA, H.; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, J.; KOBAYASHI, T. **Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: an in vivo study.** Japanese Journal of Cancer Research, 1998, v. 89, p. 463-469.

ZHAO, S.; ZHANG, Y.; HAN, Y.; WANG, J.; YANG, J. **Preparation and Characterization of Cisplatin Magnetic Solid Lipid Nanoparticles (MSLNs): Effects of Loading Procedures of Fe₃O₄ Nanoparticles.** Pharmaceutical Research, 2015, v. 32, p. 482-491.

APÊNDICE A - Participação em congresso internacional - SUÍÇA



Trends in Nanotechnology International Conference (TNT2016)

Ultra-high transversal relaxivity and hyperthermia-induced drug delivery in superparamagnetic solid lipid nanoparticles

Carolina L. Moura^{1,2}, Juan Gallo², Nágila M. P. S. Ricardo¹ and Manuel Bañobre-López²

¹Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, CX 12200 Fortaleza, Brazil.

²Advanced (magnetic) theranostic nanostructures Group, International Iberian Nanotechnology Laboratory, INL, Braga, Portugal.

Abstract

Magnetic hybrid self-assemblies have been found to open new perspectives for biomedical and environmental applications [1]. In particular, solid lipid nanoparticles (SLNs) have received great interest as suitable bioactive encapsulating agents and carriers due to their biocompatibility, low toxicity and ability to influence the bioactive delivery profile [2,3]. Recently, hybrid organic-inorganic solid lipid nanocomposites have been explored as a synergistic approach that combines the modified bioactive release induced by the lipidic encapsulation and the intrinsic physico-chemical properties from the inorganic counterpart [4]. In this context, magnetic solid lipid nanocomposites (MSLNs) dual loaded with a bioactive compound and superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were obtained showing good multifunctional performance as improved T₂-contrast agents and heat generating sources in magnetic resonance imaging (MRI) and magnetic hyperthermia (MH), respectively.

A method based on oil-in-water emulsions was employed to prepare SLNs from carnauba wax containing different concentration of ~10 nm superparamagnetic oleic acid coated magnetite (Fe₃O₄@OA) nanoparticles. Successful incorporation of the magnetic nanoparticles was confirmed by transmission electron microscopy (TEM), and the results showed that they accumulate preferentially inside the organic lipidic core. Dynamic light scattering (DLS) and ζ-potential measurements showed a relatively narrow size distribution of spherical-shaped magnetic nanocomposites with an average particle size of ~180 nm and a surface charge around -60 mV. In terms of

magnetic characterization, hysteresis loops showed MSLNs to behave as superparamagnetic particles. Interestingly, MSLNs showed an anomalous ultra-high transversal relaxivity (r_2) with values higher than $900 \text{ mM(Fe)}^{-1}\text{s}^{-1}$, what clearly translated into dark contrast effects when sample phantoms were imaged at 3 T. On the other hand, an anticâncer drug was encapsulated and its delivery profile assessed without and with the application of an oscillating magnetic field (MH). MH resulted to be efficient to externally induce a drug release increase. *In vitro* results will be also shown and discussed.

References

- [1] C. Sanson , O. Diou, J. Thévenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Brûlet, S. Miraux, E. Thiaudière, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre and S. Lecommandoux. *ACS Nano* , **5** (2011), 1122.
- [2] W. Mehnert and K. Mader., *Adv. Drug Delivery Rev.* **47** (2001), 165.
- [3] E. Andreozzi, P. Wang, A. Valenzuela, C. Tu, F. Gorin, M. Dhenain and A. Louie, *Bioconjugate Chem.*, **24** (2013), 1455.
- [4] K. Oumzil, M. A. Ramin, C. Lorenzato, A. Hemadou, J. Laroche, M. J. Jacobin-Valat, S. Mornet, C.-E. Roy, T. Kauss, K. Gaudin, G. Clofent-Sanchez and P. Barthelemy, *Bioconjugate Chem.*, **27** (2016), 569.

Acknowledgment: Edital CAPES/INL.

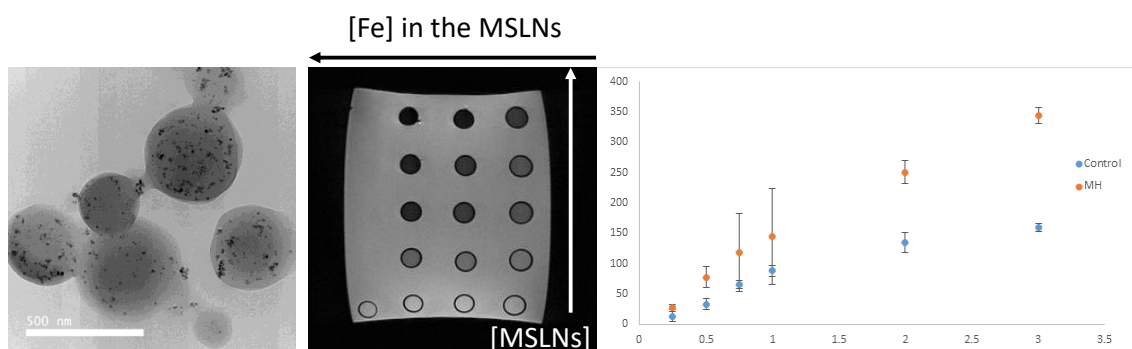


Figure 1: (left) TEM image of MSLNs; (middle) T₂-weighted MRI image of MSLNs; (right) Drug delivery profiles without and with applying MH.

APÊNDICE B - Participação em congresso internacional – ÁUSTRIA



(16AJ) Nanotechnology in Medicine: From Molecules to Humans
3 a 7 de julho de 2016, Hernstein, Áustria

Organic-inorganic magnetic hybrids as multifunctional imaging and therapeutic agents

J. Gallo¹, C. L. Moura^{1,2}, N. M. P. S. Ricardo², N. J. Long³, and M. Bañobre-López¹

¹Advanced (magnetic) theranostic nanostructures Group, International Iberian Nanotechnology Laboratory, INL, Braga, ²Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, CX 12200 Fortaleza, Brazil.

³Department of Chemistry, Imperial College London, South Kensington, London, SW7 2AZ, UK.

Abstract

Magnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) have become key elements in the design of functional nanostructures able to play an active role in different biomedical applications, e. g. as heat generating nanosources in magnetic hyperthermia, as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI), in drug delivery and cell separation, and in biosensing. On the other hand, polymeric nanostructures have received great interest as suitable bioactive encapsulating agents and carriers due to their biocompatibility, low toxicity and ability to influence the bioactive delivery profile [1]. In a further step, hybrid organic-inorganic nanocomposites have been explored as a synergistic approach that combines the modified bioactive release induced by the polymer/lipid encapsulation and the intrinsic physico-chemical properties from the inorganic counterpart [2]. In particular, magnetic hybrid self-assemblies have been found to open new perspectives for biomedical and environmental applications [3, 4].

Here, I will discuss about the synthesis and properties of unconventional organic-inorganic magnetic hybrids as an approach towards an earlier and more accurate diagnosis and therapy of disease. On one hand, relevant results will be presented on the rational design of the ideal dual-mode T_1/T_2 MRI system, involving the covalent organic attachment of a T_2 (magnetic nanoparticle) and a T_1 (paramagnetic ion) moieties [5]. On the other, the multifunctional performance of magnetic hybrid solid lipid nanocomposites (MSLNs) dual loaded with a bioactive compound and SPIONs,

as ultra-high T_2 -MRI contrast agents and heat generating sources through magnetic hyperthermia, will be also discussed. Interestingly, the incorporation of SPIONs into these hybrid nanocomposites results in a very significant enhancement of their T_2 -MRI imaging capabilities, with transversal relaxivity (r_2) values above $900 \text{ mM(Fe)}^{-1}\text{s}^{-1}$, and enables the generation of modified drug release profiles through the application of oscillating magnetic fields.

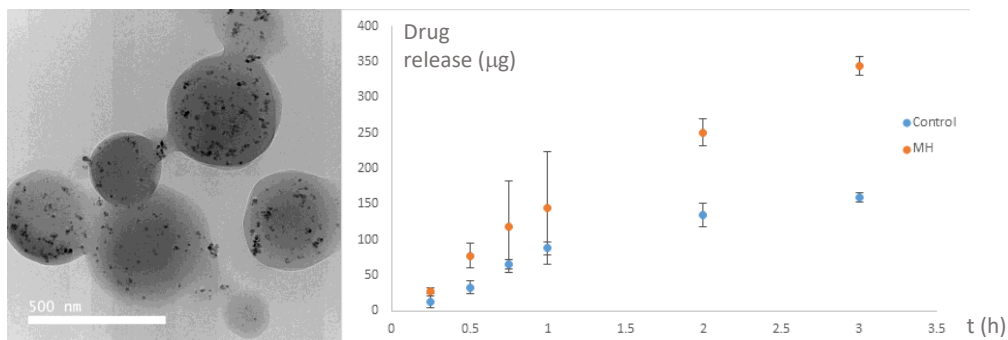


Figure 1. (Left) Organic-inorganic magnetic solid lipid nanoparticles. (Right) Drug delivery profiles without and with applying magnetic hyperthermia.

- [1] M. Elsabahy and K. L. Wooley. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 2545.
- [2] A. P. R. Johnston, G. K. Such, and F. Caruso. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 2664.
- [3] C. Sanson, O. Diou, J. Thévenot, E. Ibarboure, A. Soum, A. Brûlet, S. Miraux, E. Thiaudière, S. Tan, A. Brisson, V. Dupuis, O. Sandre and S. Lecommandoux. *ACS Nano* 2011, 5 (2), 1122.
- [4] A. Pavia-Sanders, S. Zhang, J. A. Flores, J. E. Sanders, J. E. Raymond and K. L. Wooley. *ACS Nano*, 2013, 7 (9), 7552.
- [5] N. A. Keasberry, M. Bañobre-López, C. Wood, G. J. Stasiuk, J. Gallo and N. J. Long. *Nanoscale*, 2015, 7, 16119.

APÊNDICE C – Declaração de participação em patente



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que Carolina de Lima e Moura, é um dos inventores da patente intitulada **“Nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas a base de cera de carnaúba com potencial aplicação em hipertermia magnética e imagem por ressonância magnética”**, em depósito no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), sob número de processo de patente definitivo BR 10 2016 016795 7.

Fortaleza, 18 de agosto de 2016.

Prof. Javam de Castro Machado
Coordenador de Inovação Tecnológica

Prof. Javam de Castro Machado
Coordenador de Inovação Tecnológica
Sic - Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação