

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Sheila Caroline Vendrame

Guarapuava

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Sheila Caroline Vendrame

Dissertação a ser apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas à Universidade Estadual do Centro-Oeste.

ORIENTADOR: PROFº DR. LUIZ FERNANDO CÓTICA
CO-ORIENTADOR: PROFº. DR. NAJEH MAISSAR KHALIL

Guarapuava

2011

SHEILA CAROLINE VENDRAME

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE
CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Dissertação a ser apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas à Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Aprovada em 25 de julho de 2011

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica
Universidade Estadual de Maringá
Orientador

Prof. Dr. Emerson Marcelo Giroto
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Emerson Carraro
Universidade Estadual do Centro-Oeste

Guarapuava
2011

*“... Fundamental é mesmo o amor
É impossível ser feliz sozinho...”*

Tom Jobim

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à meus maravilhosos pais Anorita e Calisto João Vendrame, meu irmão Maycon Geórgio Vendrame e à meu companheiro Richard Maikot.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que não me deixou desanimar e me deu força em todos os momentos.

Agradeço à minha mãe, Anorita Vendrame, que me apoiou e sempre torceu e acreditou em mim e no sucesso deste mestrado e ao meu pai, Calisto, que mesmo ausente, sentia-o do meu lado me dando força e me iluminando. *À vocês todo meu amor e gratidão.*

Agradeço à meu irmão, Maycon, que é mais que um irmão e um amigo, é meu segundo pai.

Agradeço a meu namorado Richard, que me aguentou reclamar e chorar tantas vezes, mas sempre me deu força, ficou do meu lado em todas as horas, especialmente nas piores e fazia tudo parecer mais simples do que era. O melhor companheiro que poderia ter. *Te amo!*

Agradeço às minhas amigas que, mesmo longe, estão sempre presentes e me apoiando, minhas verdadeiras e sempre amigas: Ana, Cássia, Gisiele e Larissa, essenciais em minha vida.

Agradeço às minhas “amigas conquistas” do mestrado Lígia e Luciana. O mestrado não seria o mesmo sem vocês.

Agradeço às minhas amigas ICs que tanto me ajudaram, Lori e Thaísa.

Agradeço ao meu orientador Prof^o Dr. Luiz Fernando Cótica pela oportunidade de trabalho e desta conquista.

Agradeço ao meu co-orientador Najeh Maissar Khalil, que foi de imensa ajuda para que este trabalho se realizasse.

Agradeço a Fundação Araucária pelo auxílio com a bolsa de estudos.

LISTA DE ABREVIATURAS

nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
SPIO	Nanopartícula Superparamagnética
SSPIO	Nanopartícula Superparamagnética Padrão
USPIO	Nanopartícula Superparamagnética Ultra Pequena
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
PVA	Álcool Polivinílico
DM	Materiais Diamagnéticos
PM	Materiais Paramagnéticos
FM	Ferromagnético
SPM	Superparamagnético
Fe_3O_4	Magnetita
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Maghemita
Fe_2O_3	Hematita
CoFe_2O_4	Ferrite de Cobalto
MnFe_2O_4	Ferrite de Manganês
Fe_xPt_y	Platina-Ferro
Co	Cobalto
FePd	Paládio-Ferro
CoPt	Platina-Cobalto

Fe₆₅Co₃₅ Cobalto-Ferro

A/O	Microemulsão Água em Óleo
MET	Microscopia Eletrônica De Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica De Varredura
keV	Quilo Elétron-Volt
mmHg	Milímetros de Mercúrio
EDX	Espectroscopia Por Energia Dispersiva De Raios-X
PMN	Polimorfonuclear

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ilustração dos arranjos dos dipolos para o ferromagnetismo, antiferromagnetismo e ferrimagnetismo.

Figura 2 Resposta magnética associada às diferentes classes de materiais magnéticos. As curvas *M-H* são representadas para materiais diamagnéticos (DM), paramagnéticos (PM), ferromagnéticos com uma resposta de multi-domínio (---- no diagrama FM), ferromagnéticos com uma resposta mono-domínio (— no diagrama FM) ou superparamagnético (SPM).

Figura 3 Representação esquemática da (a) Estrutura cristalina da magnetita; (b) Comparação de uma nanopartícula SPIO, mono-domínio magnético (todos os momentos individuais dos átomos estão alinhados), com uma partícula maior de óxido de ferro multi-domínio magnético; (c) Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas SPIO; (d) Esquema ilustrando o comportamento das SPIO na presença e na ausência de um campo magnético externo (na presença de um campo magnético, os momentos magnéticos das SPIO estão alinhados na direção do campo magnético, enquanto na ausência de um campo magnético as SPIO estão orientadas aleatoriamente devido às flutuações brownianas).

Figura 4 Estrutura da magnetita (a) cristal natural, (b) estrutura cristalina da magnetita com O - oxigênio, A – o cátion tetraédrico do Fe³⁺ e B – o cátion octaédrico do Fe³⁺.

Figura 5 Nanopartículas magnéticas, em uma solução, na ausência e na presença de um ímã.

Figura 6 Principais rotas de síntese de nanopartículas magnéticas.

Figura 7 Esquema ilustrando o mecanismo de reação da síntese de nanopartícula de magnetita de uma solução aquosa de cloreto férrico e ferroso pela adição de uma base.

Figura 8 Representação da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico.

Figura 9 Representação de uma microemulsão A/O.

Figura 10 Imagem de ressonância magnética do baço antes e após a injeção de nanopartículas magnéticas.

Figura 11 Representação esquemática do direcionamento da droga magnética.

Figura 12 Perfil de concentração plasmática do fármaco x tempo, de um fármaco administrado convencionalmente (B), comparado com um sistema de liberação controlada (A).

Figura 13 Representação do sistema de liberação em resposta termomagnética. As nanopartículas magnéticas são representadas pelos retângulos e o fármaco disperso, pelos círculos.

Figura 14 Representação da difração de raios-X por um cristal.

Figura 15 Representação esquemática do MEV.

Figura 16 Ilustração da estrutura do MET.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tamanho aproximado dos componentes celulares humanos
Tabela 2	Diferentes polímeros/moléculas utilizados para revestimento de nanopartículas para aplicações biológicas
Tabela 3	Tipos de nanopartículas magnéticas utilizadas

RESUMO

Nos últimos anos, a nanotecnologia desenvolveu e continua a desenvolver nanopartículas com propriedades multifuncionais, por exemplo, em aplicações biomédicas, nanopartículas magnéticas permitem novas oportunidades como agentes de contraste para imagem em ressonância magnética, liberação específica de fármacos através de campo magnético, tratamento de tumores via hipertermia e separação biomolecular. Em meio a tantas nanopartículas a mais utilizada é a magnetita (Fe_3O_4), devido a suas possibilidades atrativas na biomedicina e sua baixa citotoxicidade e alta biocompatibilidade com o organismo, porém sua síntese envolve métodos elaborados e a utilização de vários reagentes, o que torna seu produto final de alto custo e em pequena quantidade. Desta forma, o presente estudo objetivou a síntese de nanopartículas de magnetita por uma nova rota, simples e econômica, que permita futuras aplicações, como por exemplo, carreador de fármacos. As nanopartículas de magnetita obtidas demonstraram, por meio de estudos de caracterização realizados, características superparamagnéticas, uniformidade, tamanho controlável e formato

esférico das mesmas, e nos estudos de citotoxicidade não demonstraram toxicidade frente a hemácias e leucócitos polimorfonucleares (PMN).

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas, magnetita, síntese, toxicidade.

ABSTRACT

In recent years, nanotechnology has developed and continues to develop nanoparticles with multifunctional properties, for example, in biomedical applications, magnetic nanoparticles allow new opportunities as contrast agents for magnetic resonance imaging, specific release of drugs through the magnetic field, treatment of tumors via hyperthermia and separation biomolecular. Amongst all the most commonly used nanoparticles are magnetite (Fe_3O_4), due to its attractive possibilities in biomedicine and its low cytotoxicity and high biocompatibility with the body, but its synthesis involves elaborate methods and the use of various reagents, which makes the end product more expensive and in small quantities. Thus, this study aimed at the synthesis of magnetite nanoparticles by a new route, simple and economical, enabling future applications, such as a carrier of drugs. The magnetite nanoparticles obtained demonstrated through characterization studies performed, superparamagnetic characteristics, uniform,

manageable size and spherical shape of them, and cytotoxicity studies showed no toxicity against erythrocytes and polymorphonuclear leukocytes (PMN).

Key-words: Magnetite nanoparticles, magnetite, synthesis, toxicity.

SUMÁRIO

Mensagem.....	4
Fe ₆₅ Co ₃₅ Cobalto-Ferro.....	8
A/O Microemulsão Água em Óleo.....	8
MET Microscopia Eletrônica De Transmissão.....	8
MEV Microscopia Eletrônica De Varredura.....	8
keV Quilo Elétron-Volt.....	8
mmHg Milímetros de Mercúrio.....	8
EDX Espectroscopia Por Energia Dispersiva De Raios-X.....	8
PMN Polimorfonuclear.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	40

3. ANEXAÇÃO DO ARTIGO.....	41
.....	52
Figure 2.....	53
.....	53
Figure 3.....	54
.....	54
Figure 4.....	55
.....	55
Figure 5.....	56
.....	56
Figure 6.....	57
.....	57
4. TRABALHOS APRESENTADOS.....	58
.....	59
.....	66
.....	66
III Congresso Brasileiro de Toxicologia Clínica, Florianópolis – SC, 2010.	70
Através da difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura e transmissão pode-se comprovar a obtenção de magnetitas com diâmetro inferior a 30nm para todas as temperaturas testadas. As análises de citotoxicidade revelaram que as magnetitas não apresentam efeito citotóxico sobre as hemácias, pois os tubos testes (com magnetita) apresentaram valores semelhantes de hemoglobina livre e K ⁺ comparadas ao controle.....	71
Fig. 1. Microscopia eletrônica de varredura da magnetita a 300°C e de transmissão a 500°C.....	72
.....	72
Fig.2. Difração de raio-X da magnetita a 300°C, representativo para as demais magnetitas e teste de citotoxicidade sobre eritrócitos.....	72
À Fundação Araucária pelo financiamento com a bolsa de estudos.....	72
5. OUTROS RESULTADOS.....	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas são estruturas com tamanho inferior ou igual a 100nm, tamanho semelhante aos componentes das células humanas, como mostra a tabela 1, o que as tornam de grande interesse como sistema de liberação de drogas (GUPTA e KOMPELLA, 2006).

Os sistemas nanoparticulados usados em fármacos visam à modificação das propriedades físico-químicas destes, tendo como objetivo a redução dos efeitos tóxicos, a proteção do fármaco, o controle da velocidade de liberação e a liberação sítio-específica (SCHAFFAZICK *et al*, 2003; TAVEIRA, 2009).

Tabela 1. Tamanho aproximado dos componentes celulares humanos

Componente	Tamanho do componente (nm)
Ribossomo	25
Vesícula de Golgi	30–80
Vesículas secretoras	100–1000
Grânulos de glicogênio	10–40
Gotículas lipídicas	200–5000
Lisossomos	500–1000
Proteossomos	11
Peroxisomos	500–1000
Mitocôndria	500–1000
Filamentos superfinos	2–4
Microfilamentos	5–7
Filamentos grossos	15
Microtúbulos	25
Centríolos	150
Poros Nucleares	70–90
Nucleossomos	10
Cromatina	1,9

Fonte: GUPTA e KOMPELLA, 2006.

1.2 NANOPATÍCULAS MAGNÉTICAS

Dentre os diversos tipos de sistemas nanoparticulados, um dos mais utilizados atualmente são as nanopartículas de óxido de ferro, que possuem características magnéticas, ou seja, que podem ser manipuladas pela aplicação de campos magnéticos (CORRÊA, 2007).

As nanopartículas magnéticas podem ser compostas de diferentes átomos ou íons com diferentes momentos magnéticos e são comumente obtidas a partir de óxidos de ferro (YANG *et al*, 2006).

A utilização de nanopartículas de óxido de ferro em estudos *in vitro* ocorre há décadas, com um grande aumento dos estudos na última década, em especial com nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), devido à baixa citotoxicidade e biocompatibilidade já comprovada (GUPTA e GUPTA, 2005; YANG *et al*, 2006; HAFELI e CHASTELLAIN, 2006).

Nanopartículas superparamagnéticas (SPIO) exibem uma alta susceptibilidade magnética por causa do tamanho em escala nanométrica (ELIAS e TSOURKAS, 2009). Uma nanopartícula é superparamagnética quando: (i) as curvas de magnetização medidas a diferentes temperaturas se sobrepõem quando traçadas num gráfico de M versus H/T , sendo H o campo magnético e T a temperatura e, (ii) não há um ciclo de histerese, ou seja, a remanência e a coercividade devem ser nulos (MENEZES, 2010). Em outras palavras, as nanopartículas são superparamagnéticas quando apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo, quando retirado o campo a partícula não permanece magnetizada (FABIAN, 2009), como será visto mais a frente.

O diâmetro médio das nanopartículas influenciam, não só as propriedades magnéticas, como também o tempo de permanência no organismo, a velocidade que atravessam a barreira endotelial e o seu reconhecimento pelo sistema imune fagocitário (CORRÊA, 2007).

Em geral, as nanopartículas magnéticas utilizadas em aplicações biomédicas têm sua superfície modificada por agentes complexantes. Esta modificação na superfície é necessária para evitar a aglomeração das nanopartículas, devido à sua superfície hidrofóbica (TRAN, *et al*, 2010; SCHWEIGER *et al*, 2010; FAN *et al*, 2011), reduzir a toxicidade, promover o controle de biodistribuição (ELIAS e TSOURKAS, 2009; SCHWEIGER *et al*, 2010) e aumentar sua estabilidade impedindo que seja rapidamente

depurada da circulação pelo sistema retículo-endotelial (SRE) (FAN *et al*, 2011). Revestimentos poliméricos representam a classe mais comum de revestimentos de superfície utilizados para melhorar a biocompatibilidade e estabilidade das nanopartículas de óxido de ferro, como mostra a tabela 2 (SCHWEIGER *et al*, 2010; ELIAS e TSOURKAS, 2009).

Tabela 2. Diferentes polímeros/moléculas utilizados para revestimento de nanopartículas para aplicações biológicas

Polímeros/Moléculas	Vantagens
Polietilenoglicol (PEG)	Imobilização não covalente do PEG na superfície melhora a biocompatibilidade, tempo de circulação no sangue e a eficiência de internalização das nanopartículas
Dextran	Aumenta o tempo de circulação e estabiliza a solução
Polivinilpirrolidona (PVP)	Aumenta o tempo de circulação e estabiliza a solução
Ácidos Graxos	Estabilidade
Álcool Polivinílico (PVA)	Previne a coagulação das partículas, originando partículas monodispersas
Ácido Poliacrílico	Melhora a estabilidade e biocompatibilidade das partículas e ajuda na bioadesão
Polipeptídeos	Direcionamento celular
Poli (D,L-láctico)	Biocompatível e baixa toxicidade
Poli (N-isopropilacrilamida)	Liberação termossensível do fármaco e separação celular
Quitosana	Sistema de liberação de gene não viral, biocompatível e hidrofílico
Gelatina	Agente geleificante, emulsificante hidrofílico, biocompatível e polímero natural

Fonte: GUPTA e GUPTA, 2005.

1.3 MAGNETIZAÇÃO

O magnetismo de um sólido é originado a partir das contribuições dos elétrons que constituem este sólido. As propriedades quânticas dos elétrons que determinam o

comportamento magnético de um sólido são: o momento angular de spin, s , e o seu momento angular orbital, l , uma vez que os elétrons também carregam carga elétrica e devido ao seu movimento nas órbitas quânticas também contribuem para o momento magnético (GOYA *et al*, 2008).

Se um material magnético é colocado em um campo magnético de intensidade H , os momentos atômicos individuais no material contribuem para a resposta global, a indução magnética:

$$\mathbf{B} = \mu_0(\mathbf{H} + \mathbf{M}),$$

onde μ_0 é a permeabilidade do espaço livre, e a magnetização $\mathbf{M} = \mathbf{m} / V$ é o momento magnético por unidade de volume, onde m é o momento magnético em um volume V do material. Todos os materiais são magnéticos, até certo ponto, com a sua resposta dependendo da sua estrutura atômica e temperatura. Eles podem ser convenientemente classificados em termos de susceptibilidade magnética volumétrica χ onde

$$\mathbf{M} = \chi \mathbf{H},$$

descreve a magnetização induzida em uma material por H . Os materiais que não apresentam uma magnetização espontânea são classificados como paramagnéticos, para o qual χ está na faixa 10^{-6} - 10^{-1} ou diamagnéticos, com χ na faixa de 10^{-6} - 10^{-3} . No entanto, alguns materiais exibem estados magnéticos ordenados e apresentam magnetização espontânea mesmo sem um campo aplicado (figura 1). Estes materiais são classificados como ferromagnéticos, ferrimagnéticos e antiferromagnéticos, onde o prefixo se refere à natureza da interação de acoplamento entre os elétrons no material (PANKHURST *et al*, 2003).

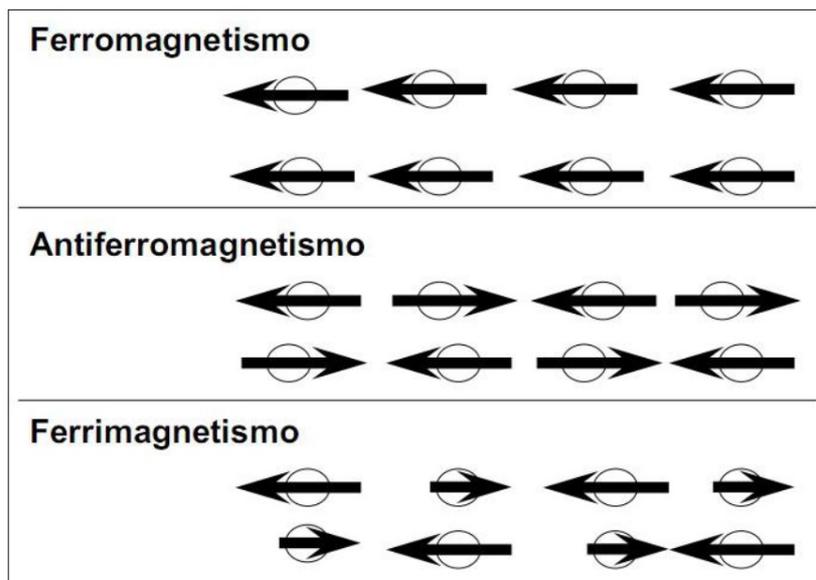


Figura 1: Ilustração dos arranjos dos dipolos para o ferromagnetismo, antiferromagnetismo e ferrimagnetismo.

A susceptibilidade dos materiais ordenados não depende apenas da temperatura, mas também de H , o que dá origem à forma sigmoideal característica da curva $M-H$, com M se aproximando do valor de saturação para grandes valores de H . Além disso, em materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos, com frequência vê-se uma histerese, que é uma irreversibilidade do processo de magnetização que está relacionado com a fixação das paredes de domínio magnético em impurezas ou grãos no interior do material, bem como aos efeitos intrínsecos, como a anisotropia magnética da rede cristalina. Isto dá origem a curvas $M-H$ abertas, chamadas curvas de histerese. As formas destas curvas são determinadas em parte pelo tamanho de partícula: em partículas grandes (da ordem de um micron ou mais), existe um estado multi-domínio que leva a um ciclo de histerese amplo desde que este tenha relativamente pouca energia para fazer as paredes de domínio se mover, enquanto que em partículas menores, há um estado de mono-domínio que leva a um ciclo de histerese estreito. O superparamagnetismo pode ser observado em partículas com diâmetros da ordem de algumas dezenas de nanômetros ou menos. Nestas partículas o momento magnético da partícula como um todo flutua em resposta à energia térmica enquanto os momentos atômicos individuais mantêm seu estado ordenado uns em relação aos outros. Este tipo de arranjo magnético leva a um comportamento não histerético, mas ainda sigmoideal, como mostra a figura 2 (PANKHURST *et al*, 2003).

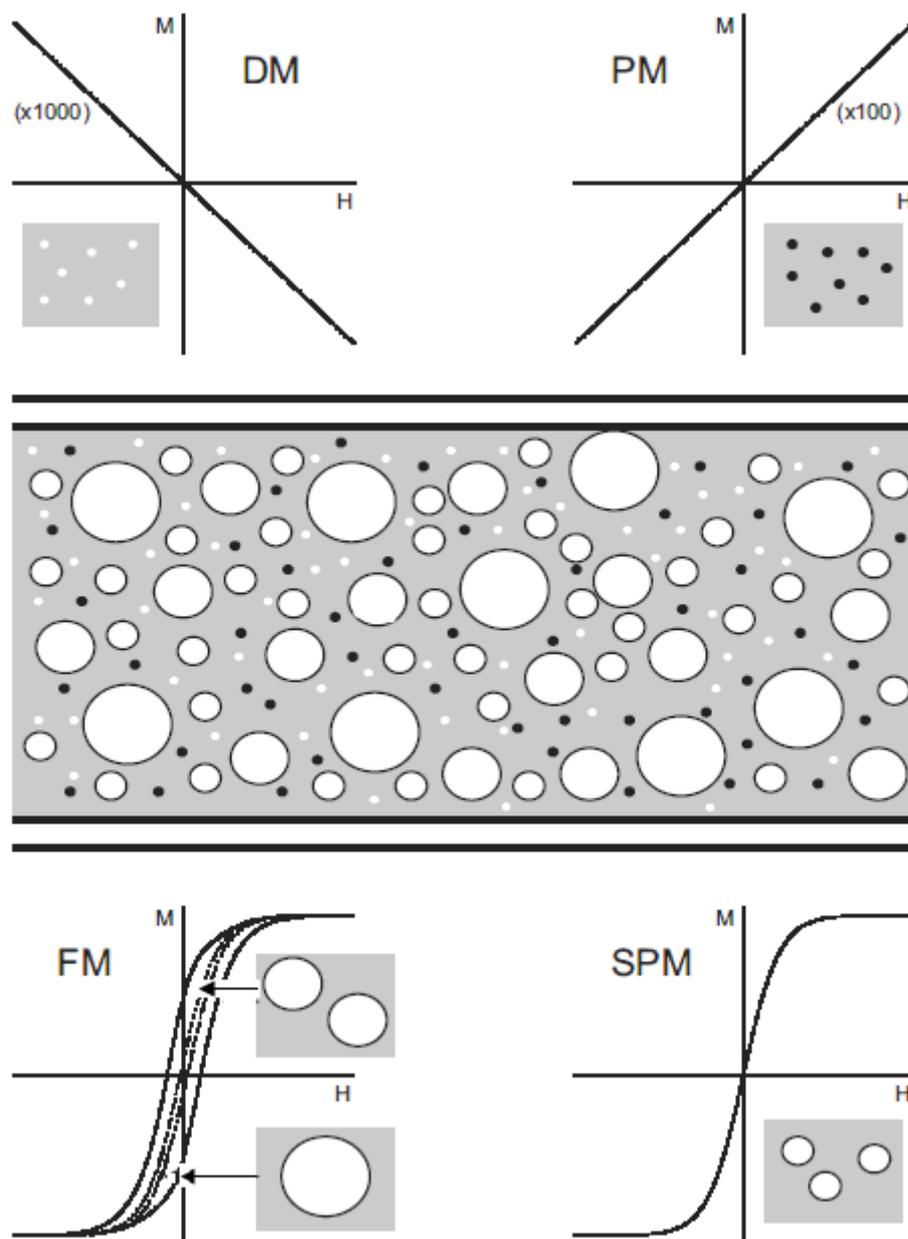


Figura 2: Resposta magnética associada às diferentes classes de materiais magnéticos. As curvas $M-H$ são representadas para materiais diamagnéticos (DM), paramagnéticos (PM), ferromagnéticos com uma resposta de multi-domínio (---- no diagrama FM), ferromagnéticos com uma resposta mono-domínio (— no diagrama FM) ou superparamagnético (SPM).

Fonte: PANKHURST *et al*, 2003.

A maioria das nanopartículas de óxido de ferro utilizadas em aplicações biomédicas possuem diâmetros menores que 20 nm e apresentam propriedades superparamagnéticas. Isso significa que elas têm uma alta susceptibilidade magnética positiva, mas na ausência de um campo magnético não exibem remanência magnética (não apresentam magnetização espontânea). Isto porque, nestas condições, as flutuações brownianas são suficientemente intensas para orientar aleatoriamente os momentos magnéticos individuais de cada partícula, levando a uma magnetização global nula

(ELIAS e TSOURKAS, 2009). Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas apresentam uma elevada susceptibilidade magnética devido aos monocristais em escala nanométrica que são formados com todos os domínios magnéticos alinhados (figura 3). Em contraste, grandes nanopartículas magnéticas consistem, tipicamente, de múltiplos domínios magnéticos que não estão bem alinhados e, assim, interferem uns com os outros.

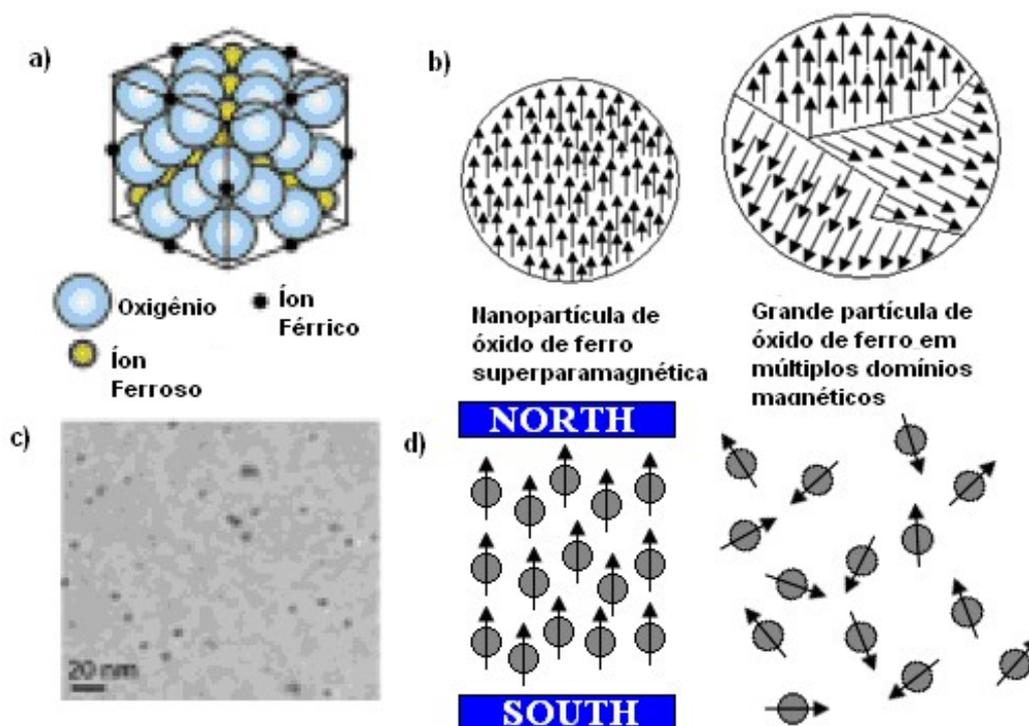


Figura 3: Representação esquemática da (a) Estrutura cristalina da magnetita; (b) Comparação de uma nanopartícula SPIO, mono-domínio magnético (todos os momentos individuais dos átomos estão alinhados), com uma partícula maior de óxido de ferro multi-domínio magnético; (c) Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas SPIO; (d) Esquema ilustrando o comportamento das SPIO na presença e na ausência de um campo magnético externo (na presença de um campo magnético, os momentos magnéticos das SPIO estão alinhados na direção do campo magnético, enquanto na ausência de um campo magnético as SPIO estão orientadas aleatoriamente devido às flutuações brownianas.

Fonte: ELIAS e TSOURKAS, 2009.

1.4 MAGNETITA

A magnetita é um óxido formado por íons de ferro de valências diferentes (Fe^{2+} e Fe^{3+}), (figura 4a), possui fórmula química Fe_3O_4 e apresenta estrutura do tipo espinélio invertido. Os íons O_2^{2-} apresentam empacotamento cúbico e os íons maiores (Fe^{2+}) ocupam os interstícios octaédricos. Os íons Fe^{3+} ocupam sítios octaédricos e sítios tetraédricos (figura 4b) (BEDÊ, 2010). É um composto solúvel em ácido e insolúvel em

água e que pode ser encontrado sob a forma de cubos ou em pó na cor preto metálico com brilho lustroso (LEAL, 2006; HOLLAND e YAMAMURA, 2009).

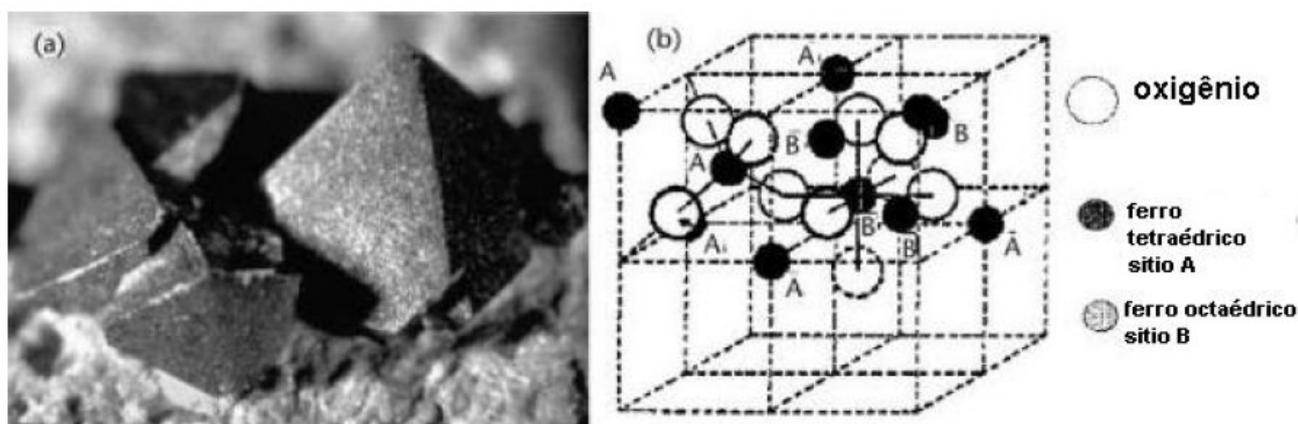


Figura 4: Estrutura da magnetita (a) cristal natural, (b) estrutura cristalina da magnetita com O - oxigênio, A – o cátion tetraédrico do Fe^{3+} e B – o cátion octaédrico do Fe^{3+} .
Fonte: BEDÊ, 2010.

Na presença de um campo magnético externo, o pó constituído de nanopartículas de magnetita tende a se orientar segundo o campo (figura 5), podendo ser facilmente separado de uma solução com a aproximação de um ímã. Com o distanciamento do campo magnético, o pó perde a magnetização adquirida (LEAL, 2006; HOLLAND e YAMAMURA, 2009).

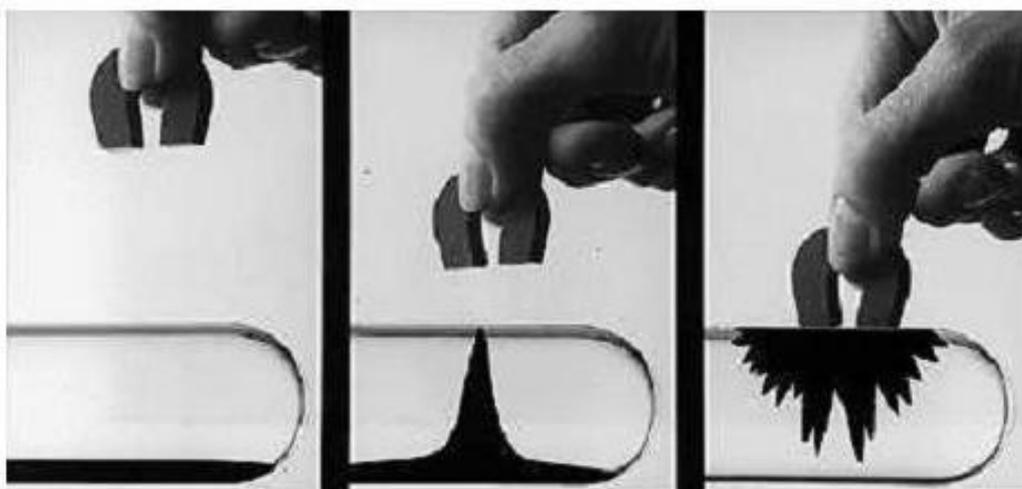


Figura 5: Nanopartículas magnéticas, em uma solução, na ausência e na presença de um ímã.
Fonte: FABIAN, 2009.

O tipo de nanopartícula magnética produzida varia de acordo com a finalidade da sua aplicação. A composição, o tamanho e a síntese das magnetitas são determinados pelo alvo de aplicação, pois este influencia em suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas (HAFELI e CHASTELLAIN, 2006; VO-DINH, 2007; THASSU *et al*, 2007).

As magnetitas oferecem várias possibilidades atrativas na biomedicina. Elas possuem tamanhos controláveis variando desde alguns nanômetros até dezenas de nanômetros, o que as coloca em dimensões menores quando comparadas à algumas células (10–100µm), vírus (20–450nm), proteínas (5–50nm) ou gene (2nm de largura e 10–100nm de comprimento). Isso significa que elas podem aproximar-se em tamanho de uma entidade biológica de interesse. As nanopartículas magnéticas podem também ser revestidas com moléculas biológicas ou materiais orgânicos específicos para fazê-las interagirem ou se ligarem às células alvo, aumentando sua biocompatibilidade, biodisponibilidade, biodegradabilidade e diminuindo sua toxicidade (MULLER *et al*, 1996; PANKHURST *et al*, 2003; YANG *et al*, 2006; ELIAS e TSOURKAS, 2009).

Além da magnetita, vários outros materiais magnéticos também são utilizados (tabela 3). Cada um destes materiais pode ser utilizado em hipertermia magnética, imagem por ressonância magnética e liberação controlada, porém, alguns têm propriedades únicas que melhoram a sua função ou fornecem maior segurança (BRAZEL, 2009).

Tabela 3. Tipos de nanopartículas magnéticas utilizadas.

Magnetita (Fe_3O_4)

Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

Hematita (Fe_2O_3)

Ferrite de Cobalto (CoFe_2O_4)

Ferrite de Manganês (MnFe_2O_4)

Platina-Ferro (Fe_xPt_y)

Cobalto (Co)

Paládio-Ferro (FePd)

Platina-Cobalto (CoPt)

Cobalto-Ferro ($\text{Fe}_{65}\text{Co}_{35}$)

Fonte: BRAZEL, 2009.

1.5 PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Com a grande utilização de nanopartículas magnéticas nos últimos tempos, devido as suas atrativas aplicações biomédicas potenciais, muitos métodos de síntese destas nanopartículas foram e continuam sendo desenvolvidos (ROSHAN *et al*, 2010; NIGAM *et al*, 2011).

A figura 6 apresenta as principais rotas utilizadas para síntese de nanopartículas magnéticas. Os métodos de rota física são procedimentos elaborados, mas com incapacidade de controlar o tamanho de partículas em escala nanométrica. Já os métodos químicos são mais simples e eficientes no controle do tamanho, composição e, muitas vezes, da forma das nanopartículas (GUPTA e GUPTA, 2005).

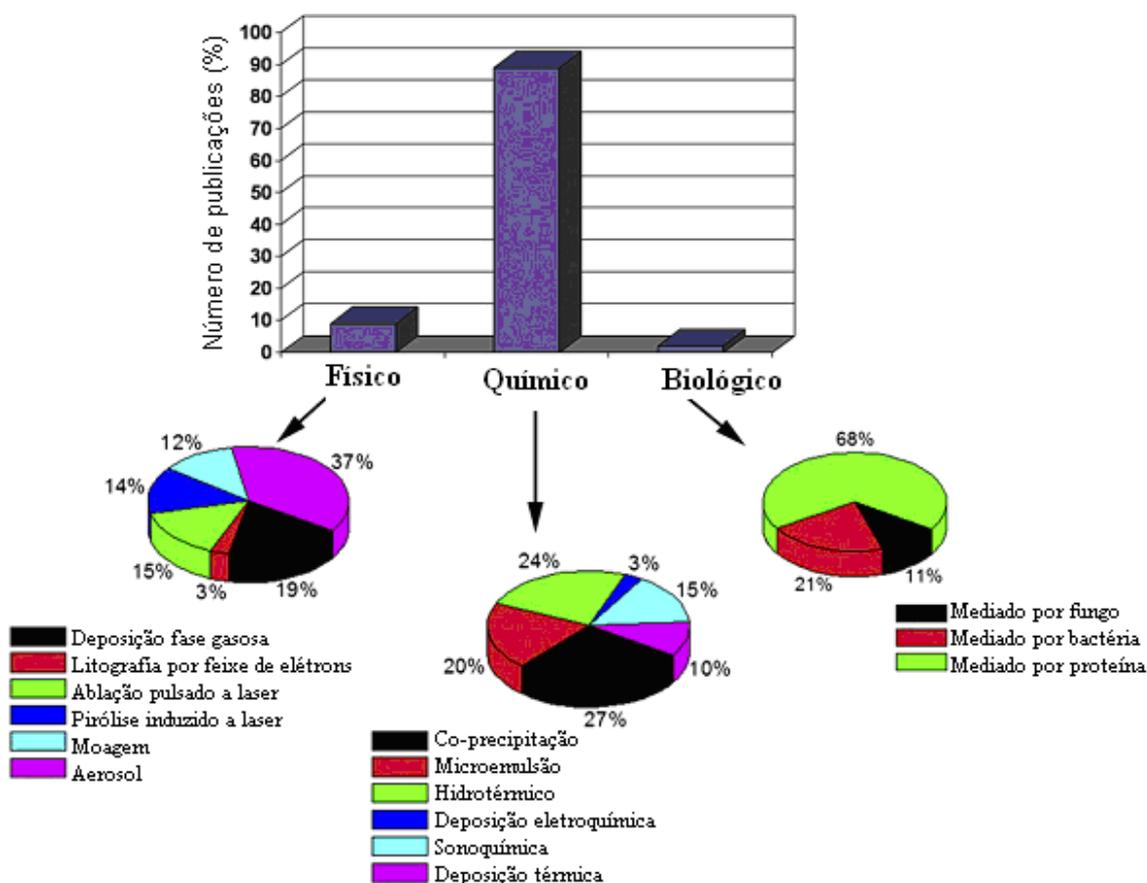


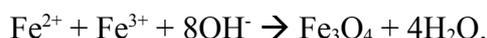
Figura 6: Principais rotas de síntese de nanopartículas magnéticas.

Fonte: MAHMOUDI *et al*, 2011.

Os principais métodos, das diferentes rotas que são utilizados, incluem: o método de Co-precipitação, Sol-gel e Microemulsão.

1.6.1 MÉTODO DE CO-PRECIPITAÇÃO

Nanopartículas de óxido de ferro podem ser sintetizadas através do método de co-precipitação do Fe^{2+} e Fe^{3+} em solução de sal aquosa pela adição de uma base (figura 7). A magnetita precipitada, de coloração preta, é dada pela reação química:



A precipitação completa de Fe_3O_4 acontece ente pH 9 e 14, mantendo a proporção molar de Fe^{3+} : Fe^{2+} de 2:1.

O controle de tamanho, forma e composição da nanopartícula é dependente do tipo de sal utilizado (cloreto, sulfato, nitrato, etc.) e taxa de Fe^{2+} e Fe^{3+} (GUPTA e GUPTA, 2005).

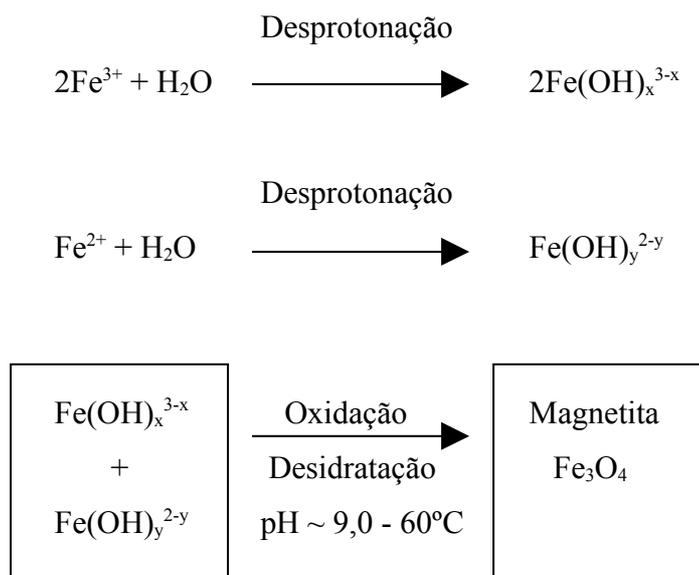


Figura 7: Esquema ilustrando o mecanismo de reação da síntese de nanopartícula de magnetita de uma solução aquosa de cloreto férrico e ferroso pela adição de uma base, onde x e y representam o número de moléculas de OH.

1.6.2 MÉTODO SOL-GEL

O processo sol-gel é uma rota de síntese de materiais onde em um determinado momento ocorre a transição do sistema *sol* (dispersão de partículas coloidais estáveis em um fluido) para um sistema *gel* (formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida

nos seus interstícios. Os géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias (figura 8a), que ocorrem pela alteração das condições físico-químicas da suspensão. Por outro lado, os géis poliméricos (figura 8b) são, geralmente, preparados a partir de soluções onde se promovem reações de polimerização, onde a gelatinização ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

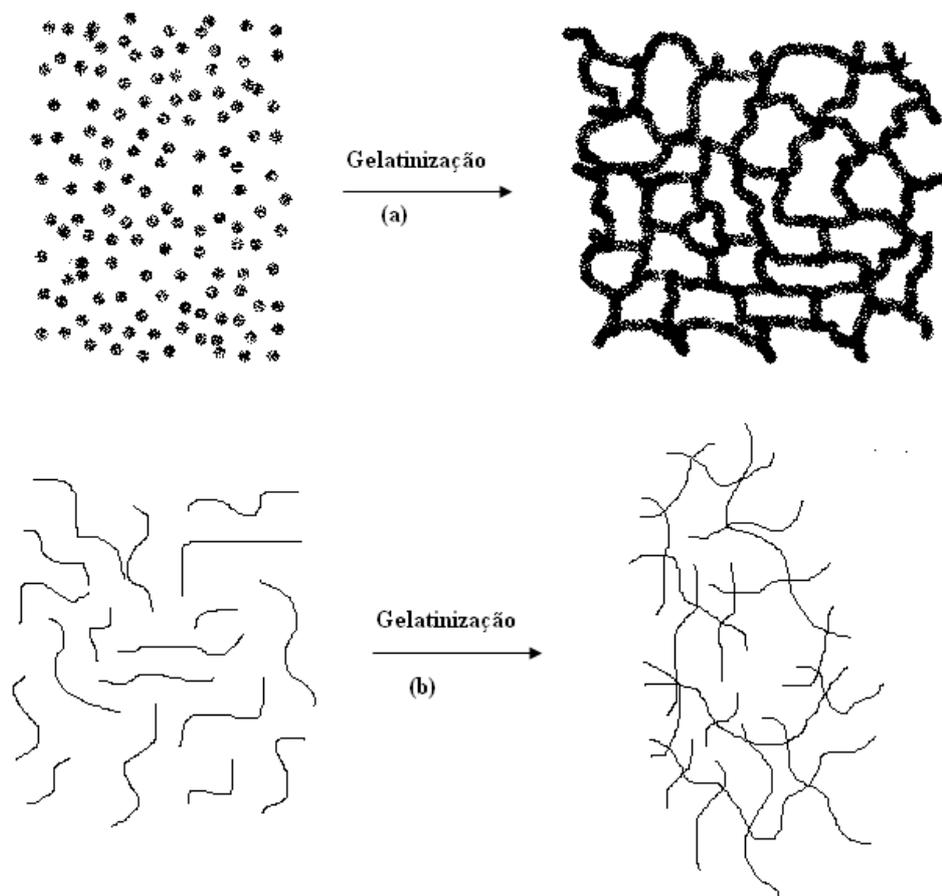


Figura 8: Representação da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico.

1.6.4 MÉTODO DE MICROEMULSÃO

Uma microemulsão consiste em um sistema termodinamicamente estável de dois líquidos imiscíveis, onde um ou ambos os líquidos sejam estabilizados por um agente tensoativo. Em uma microemulsão água em óleo (A/O) (figura 9) a fase aquosa está dispersa como microgotas cercada por uma monocamada de surfactante na fase de hidrocarbonetos. Ao incorporar um sal de metal solúvel à fase aquosa da microemulsão, ele permanecerá nas microgotas aquosas e cercado pela fase oleosa (GUPTA e GUPTA,

2005). O controle do tamanho das nanopartículas faz-se pelo controle das gotas de água (MAHMOUDI *et al*, 2011).

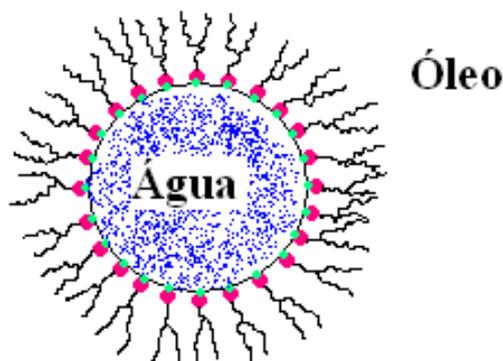


Figura 9: Representação de uma microemulsão A/O.
Fonte: GUPTA e GUPTA, 2005 (adaptado).

1.7 APLICAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS NA MEDICINA

As nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas para várias aplicações biomédicas, como: agentes de contraste para imagem por ressonância magnética (KIM *et al*, 2003; LAWACZECK *et al*, 2004; GAMARRA *et al*, 2005; JUN *et al*, 2005; CHENG *et al*, 2005), carreadoras de fármaco guiadas por campo magnético (ASMATULU *et al*, 2005; TAN *et al*, 2005) tratamento de tumores via hipertermia (ROGER *et al*, 1999; VO-DINH, 2007; THASSU, 2007), separação biomolecular magnética e diagnósticos (LIBERTI *et al*, 2001).

No entanto, para uma alta eficácia em aplicações biológicas função-específica, as magnetitas devem obedecer a alguns critérios como: serem esféricas, biocompatíveis, superparamagnéticas, ter uma estreita diferença de tamanho, alta cristalinidade, grandes áreas superficiais (para uma máxima ligação a proteínas ou enzimas), alta saturação magnética (para fornecer um sinal máximo) e boa dispersão em meio líquido (GUPTA *et al*, 2006; THASSU *et al*; 2007; GUO *et al*, 2009; TRAN *et al*, 2010).

1.7.1 IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

As nanopartículas magnéticas podem ser sintetizadas para responder ressonantemente a um campo magnético com transferência de energia do campo magnético excitante para a magnetita (PANKHURST *et al*, 2003).

Como agentes de contraste em ressonância magnética, a maioria das nanopartículas magnéticas utilizadas possuem diâmetros menores que 20nm e exibem características superparamagnéticas (ELIAS e TSOURKAS, 2009). Estas nanopartículas magnéticas são revestidas e estabilizadas com polímeros hidrofílicos sendo encontradas termodinamicamente estáveis em condições fisiológicas, não exercendo efeitos tóxicos evidentes (HAFELI e CHASTELLAIN, 2006; THASSU *et al*, 2007).

Micrometástases, contendo centenas de células cancerosas, possuem um tamanho de escala micrométrica em que não há capacidade de visualização e de diagnóstico precoce do tumor por imagem em ressonância magnética, porém, a incorporação de nanopartículas magnéticas às células neoplásicas aumenta o contraste (figura 10), permitindo a visualização de estruturas tumorais até mesmo sub-micrométricas. Isso ocorre devido a diminuição do tempo de relaxação dos prótons da água, aumentando a velocidade com estes se alinhem ao campo magnético principal, resultando em um maior sinal de RM e maior contraste (CORRÊA, 2007; BEDÊ, 2010).

A incorporação das nanopartículas magnéticas é feita através de injeção endovenosa de fluídos magnéticos biocompatíveis, que podem ser realizadas por duas formas: (i) utilizando nanopartículas recobertas com moléculas inespecíficas, onde sua circulação prolongada permite a captação destas pelas células neoplásicas, em virtude de seu metabolismo exacerbado, ou então pelo seu direcionamento através da utilização de gradientes de campos magnéticos externos, e (ii) utilizando nanopartículas magnéticas vetorizadas por anticorpos monoclonais em sua superfície (CORRÊA, 2007).

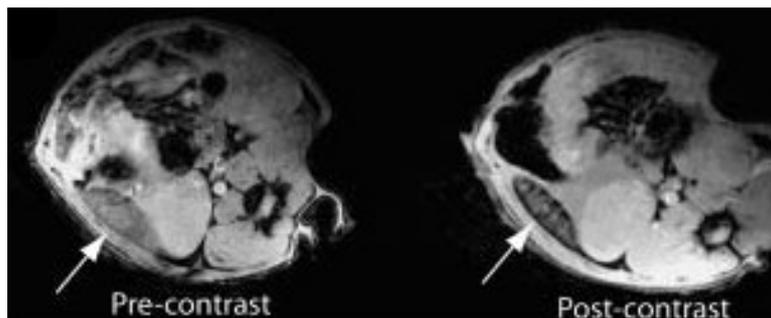


Figura 10: Imagem de ressonância magnética do baço antes e após a injeção de nanopartículas magnéticas.

Fonte: ELIAS e TSOURKAS (2009) (adaptado).

1.7.2 LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Como carreadoras de fármaco, as nanopartículas magnéticas vem sendo amplamente estudadas na tentativa de se obter partículas com alta capacidade de carregamento de fármaco, boa estabilidade em solução aquosa, biocompatibilidade com células e tecidos, liberação de perfil desejado e retenção de propriedades magnéticas após a modificação com estabilizadores poliméricos (SONVICO *et al*, 2005; KOHLER *et al*, 2005; ZHANG *et al*, 2005; GUPTA, 2006; HU *et al*, 2007; ZHANG *et al*, 2007; GUO *et al*, 2009).

As nanopartículas com características magnéticas podem ser manipuladas por um gradiente de campo magnético. Esta "ação à distância", combinada com a penetração intrínseca de campos magnéticos em tecidos humanos, abre muitas aplicações envolvendo o transporte e/ou imobilização de nanopartículas magnéticas ou de entidades biológicas adicionadas magneticamente (PANKHURST *et al*, 2003).

A utilização de sistemas magnéticos carreadores de fármaco possui muitas vantagens na liberação controlada do fármaco, como (i) devido ao tamanho pequeno, as nanopartículas podem penetrar em pequenos capilares onde são capturadas por células, acumulando-se eficientemente em órgãos específicos; (ii) a utilização de polímeros biodegradáveis permite sustentar a liberação do fármaco em alvos específicos por período de dias ou até mesmo semanas; e também vantagens na relação custo-benefício, (i) comparado à descoberta de uma nova molécula, a formulação de um carreador envolve baixo custo e (ii) a diminuição da utilização de um fármaco de alto custo implica na redução do custo do produto final (CORRÊA, 2007).

A liberação de fármacos por carreadores magnéticos é capaz de concentrar o fármaco em um tumor se este for acessível através do sistema arterial e tiver um bom

suprimento de sangue (figura 11). Portanto, a liberação do fármaco antitumoral por um carreador magnético ocorre com menos efeitos colaterais e proporcionando tratamentos mais curtos e menos tóxicos (GUPTA *et al*, 2006; HAFELI e CHASTELLAIN, 2006).

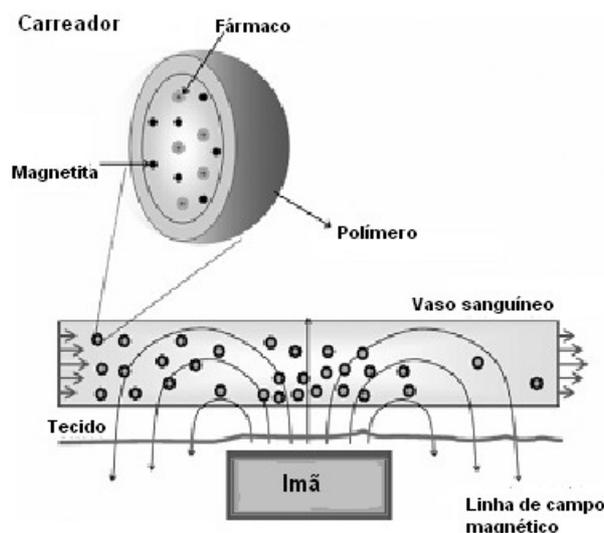


Figura 11. Representação esquemática do direcionamento da droga magnética.
Fonte: YANG *et al* (2006).

Carreadores magnéticos foram utilizados, pela primeira vez, na liberação de drogas citotóxicas (doxorubicina) em tumores sarcoma implantados no rabo de ratos, com sucesso para os resultados iniciais, mostrando remissão total dos sarcomas comparados com a não remissão em outro grupo de ratos onde foram administradas 10 vezes a dose mas sem o direcionamento por carreador magnético. Desde o sucesso deste estudo, são relatados estudos por vários grupos de pesquisa utilizando modelos animais incluindo suínos, coelhos e ratos (PANKHURST *et al*, 2003). Kubo *et al* (2000) implantaram ímãs permanentes nos sítios de osteosarcomas sólidos de hamsters e liberados compostos citotóxicos via lipossomas magnéticos. Em seus resultados relataram um aumento de 4 vezes na liberação da droga citotóxica nos sítios do osteosarcoma quando comparado com a liberação endovenosa normal (não-magnética), bem como no aumento significativo da atividade anti-tumoral (PANKHURST *et al*, 2003).

Outra utilidade desta técnica é no direcionamento de drogas citotóxicas para tumores cerebrais, pois estes são alvos de difícil acesso devido a proteção do cérebro pela barreira hemato-encefálica. Pulfer e Gallo (1999) demonstraram que partículas do

tamanho de 1-2 μ m poderiam ser concentradas no sítio do tumor glioma intracerebral de ratos, porém a concentração das partículas no tumor foi baixa, mas ainda assim significativamente maior que a concentração de partículas não-magnéticas. Em um estudo posterior, com nanopartículas de 10-20nm, o grupo obteve resultados ainda mais eficazes no direcionamento destes tumores em ratos. Resultado que foi comprovado através de análise microscópica de amostras do tecido cerebral que revelaram a presença de carreadores magnéticos no espaço intersticial nos tumores, mas em tecido cerebral normal foram somente encontradas na vasculatura (PANKHURST *et al*, 2003).

Para enfatizar a importância do sistema de liberação controlada a ilustração abaixo (figura 12) mostra duas formas de administração de um medicamento. A situação A, onde um medicamento é liberado de forma controlada, mantendo um nível desejado no plasma por um longo período sem atingir um nível tóxico ou cair abaixo da concentração mínima para efeito e a situação B, em que é liberado de forma convencional e após sua ingestão ou injeção a concentração plasmática da droga ultrapassa o nível desejável e então decai exponencialmente quando o fármaco é excretado ou metabolizado, implicando na administração de várias doses diárias (BEDÊ, 2010).

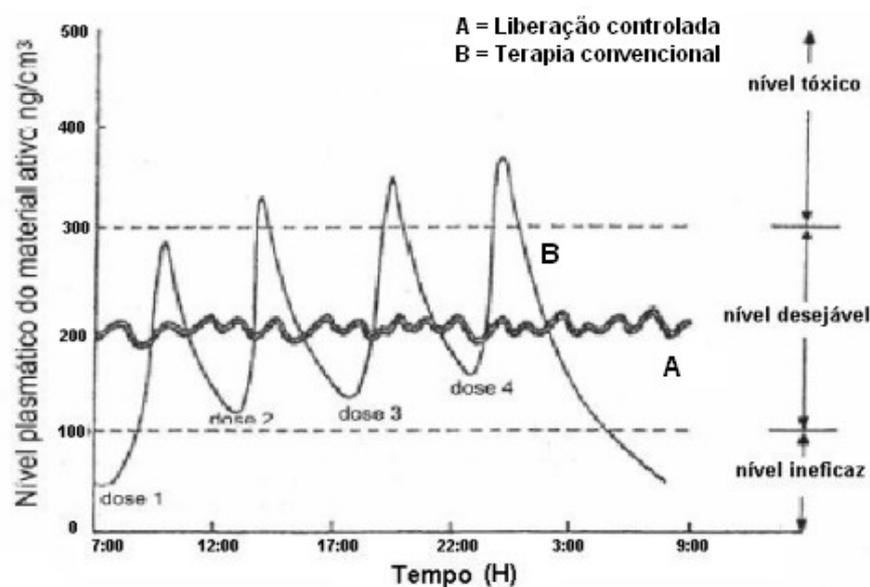


Figura 12: Perfil de concentração plasmática do fármaco x tempo, de um fármaco administrado convencionalmente (B), comparado com um sistema de liberação controlada (A).

Fonte: BEDÊ, 2010.

1.7.3 HIPERTERMIA

Em um campo magnético oscilante as magnetitas, presentes em um fluido magnético, produzem calor e esta produção de calor acima da temperatura normal corporal (hipertermia) pode ser utilizada clinicamente na erradicação de células tumorais através da liberação de quantidades tóxicas de energia térmica, como representado na figura 13 (VO-DINH, 2007; FERRARI, 2008). O aumento de temperatura a uma faixa de 41 a 46°C pode conduzir à termoablação (a destruição térmica de células), pois células tumorais são sensíveis a variações de temperatura (BEDÊ, 2010). Quando as magnetitas alcançam certos órgãos ou tecidos, especialmente tumores, a hipertermia magnética pode ser induzida, porém, o tecido normal nas proximidades (não contendo magnetitas) permanece com a temperatura normal, não causando qualquer dano (HAFELI e CHASTELLAIN, 2006; GUPTA *et al*, 2006).

O aquecimento local de magnetitas, contendo fármaco anti-tumoral, através de radiação eletromagnética, resulta na perfuração de vasos sanguíneos do tumor e perfuração da membrana da célula cancerosa, levando a uma maior liberação do medicamento do sangue para as células cancerosas, com um mínimo aquecimento térmico (GUPTA *et al*, 2006). Outra vantagem do direcionamento das nanopartículas para o aquecimento e erradicação do tumor é a diminuição da dose a ser administrada e, conseqüentemente, dos efeitos colaterais (ESTEVANATO, 2008).

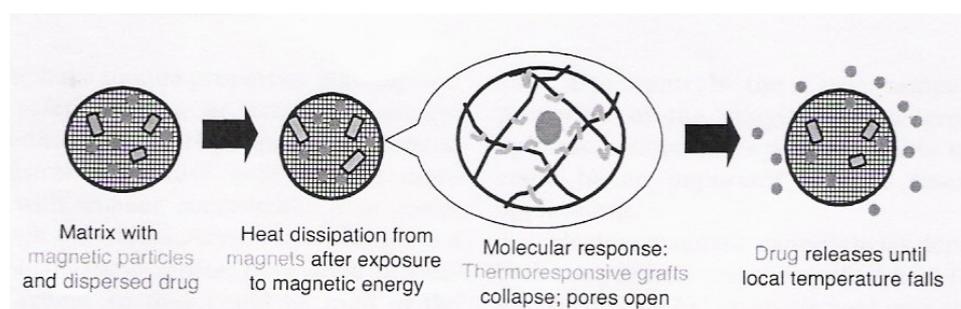


Figura 13: Representação do sistema de liberação em resposta termo-magnética. As nanopartículas magnéticas são representadas pelos retângulos e o fármaco disperso, pelos círculos.

Fonte: BRAZEL, 2009.

Dados pré-clínicos mostram que a combinação da hipertermia com irradiação e/ou quimioterapia aumenta a eficácia do tratamento prescrito sem produzir uma toxicidade adicional (GOYA *et al*, 2008; MEENACH *et al*, 2009). Além de ter um efeito citotóxico no tecido canceroso, a hipertermia tem mostrado diminuir o fluxo de sangue no tumor, induzindo à hipóxia, acidose e privação de energia no local do tumor,

portanto, aumentando a eficácia terapêutica (HILDEBRANDT *et al*, 2002). A termoablação induz a necrose celular mais do que a morte por apoptose, normalmente atribuída à hipertermia (MEENACH *et al*, 2009).

Yanase *et al* (1997), utilizaram lipossomas magnéticos em estudos *in vivo* e relataram a regressão completa de um tumor após 30 dias de tratamento e sem crescimento do mesmo tumor em um período de 3 meses. Desta mesma forma, Ito *et al* (2003) também relataram a regressão completa de um carcinoma mamário de rato com tamanho de 15mm, onde o controle do crescimento do tumor ocorreu em um período de 20 dias após a aplicações repetidas de lipossomas magnéticos direcionados (GOYA *et al*, 2008).

Ainda, as magnetitas podem incorporar radioisótopos em sua matriz ou em sua superfície, e então liberar doses de radiação ionizantes em células tumorais. Campos magnéticos externos ou internos são os responsáveis por acumular as magnetitas radioativas e mantê-las no local específico (HAFELI e CHASTELLAIN, 2006), ou então, podem ser anexadas à anticorpos dirigidos contra antígenos da vasculatura tumoral e liberá-los seletivamente nas paredes sanguíneas do tumor (GUPTA *et al*, 2006).

1.8 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

1.8.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A difração de raios-X é uma técnica analítica versátil e não destrutiva para análise de sólidos cristalinos, o que inclui materiais naturais e sintéticos, revelando informações sobre sua cristalografia (SETTLE, 1997; BEDÊ, 2010).

A estrutura cristalina é uma distribuição regular tridimensional de átomos no espaço. Estes estão organizados de modo a formar uma série de planos paralelos separados entre si por uma distância d , que varia conforme a natureza do material. Para qualquer cristal, os planos existem em uma série de orientações diferentes – cada uma com seus próprios espaçamentos d específicos (SCHETTINO JÚNIOR, 2009; BEDÊ, 2010).

Quando um feixe de raios X monocromático com comprimento de onda λ incide

sobre um material cristalino em um ângulo θ , a difração ocorre somente quando a distância percorrida pelos raios refletidos de planos sucessivos difere por um número n inteiro de comprimento de onda, como mostra a figura 14 (BEDÊ, 2010).

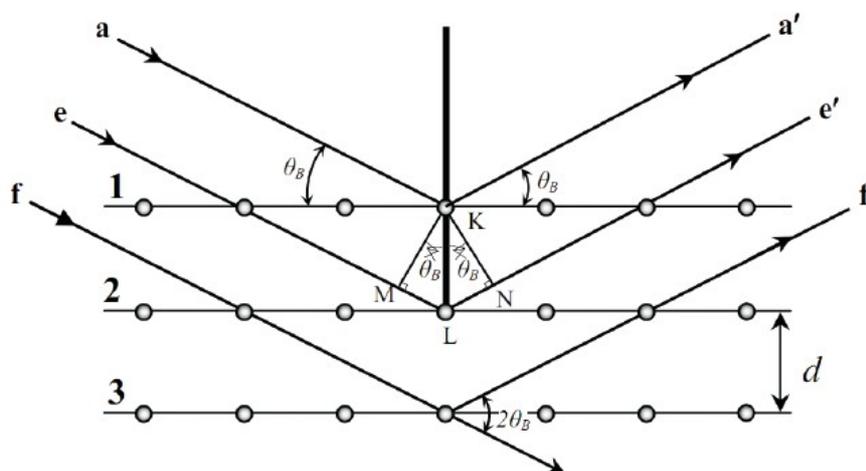


Figura 14: Representação da difração de raios-X por um cristal.
Fonte: SCHETTINO JUNIOR, 2009.

As aplicações mais comuns da difração de raios-X são em:

- Controle de qualidade: análise qualitativa e quantitativa;
- Quantificação de textura e orientação em metais e polímeros;
- Estudos de variação de temperatura para determinar expansão térmica, estabilidade e diagrama de fases (SETTLE, 1997).

1.8.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E DE TRANSMISSÃO

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é utilizada na investigação da microestrutura superficial de materiais como, vidro, cerâmica, polímeros, metais e minerais (SOARES e SARON, 2010). O uso desta técnica vem se tornando mais freqüente por fornecer informações de detalhe, com aumentos de até 300.000 vezes. A imagem eletrônica de varredura é formada pela incidência de um feixe de elétrons no mineral, sob condições de vácuo (figura 15). A incidência do feixe de elétrons no mineral promove a emissão de elétrons secundários, retroespalhados, Auger e absorvidos, assim como de raios X característicos e de catodoluminescência. A imagem eletrônica de varredura representa em tons de cinza o mapeamento e a contagem de

elétrons secundários (SE - secondary electrons) e retroespalhados (BSE - backscattering electrons) emitidos pelo material analisado (DUARTE *et al*, 2003; SOARES e SARON, 2010).

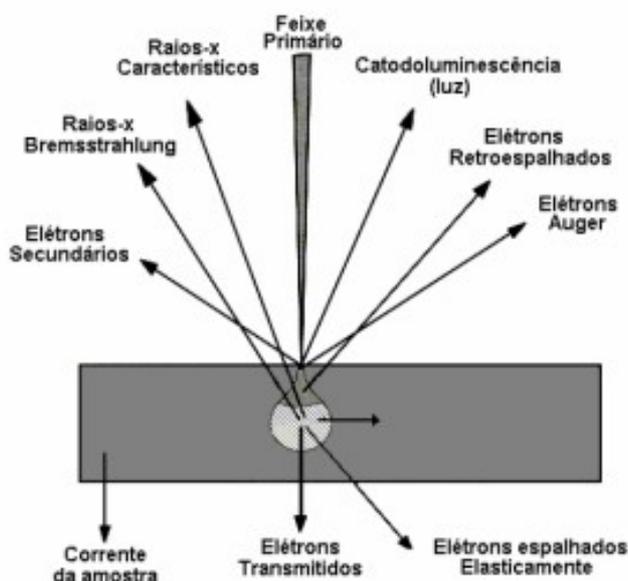


Figura 15: Representação esquemática do MEV.
Fonte:SOARES e SARON, 2010.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é talvez a técnica mais adequada quando se deseja obter imagens diretas de nanopartículas. No MET, uma amostra é irradiada com um feixe de elétrons de densidade de corrente uniforme; a energia dos elétrons está na faixa de 60~150 keV. O feixe de elétrons pode ser gerado por fontes termo-iônicas, na qual há o aquecimento de um filamento de tungstênio ou hexaboreto de lantânio, ou por fontes de emissão de campo, onde há a geração de campos elétricos intensos em formas pontiagudas, como por exemplo, uma ponta de tungstênio, que com raio menor que 0,1 mm, pode gerar sob um potencial de 1 keV, um campo elétrico de 1010 V/m, baixando significativamente a barreira de potencial e permitindo assim o tunelamento dos elétrons para fora do tungstênio (BEDÊ, 2010).

Um microscópio eletrônico de transmissão consiste de uma fonte emissora de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas que controlam o feixe emitido, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10^{-5} mmHg. A figura 16 ilustra a estrutura do MET (BEDÊ, 2010).

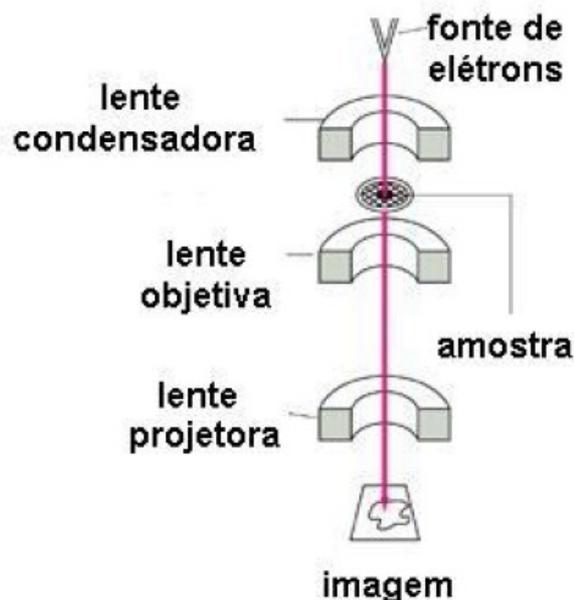


Figura 16: Ilustração da estrutura do MET.
Fonte: BEDÊ, 2010.

1.8.3 ESPECTROSCOPIA POR ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS-X

A espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDX) possibilita a determinação da composição qualitativa e semi-quantitativa de amostras a partir da emissão de raios-X característicos, fornecendo a composição química elementar de um ponto ou região da superfície e possibilitando a identificação de praticamente qualquer elemento presente a partir de seus espectros (VENÂNCIO, 2005). O limite de detecção é da ordem de 1%, mas pode variar de acordo com especificações utilizadas durante a análise, como o tempo de contagem (DUARTE *et al*, 2003).

1.9 TOXICIDADE

A avaliação da toxicidade tem o intuito de determinar o potencial de novas substâncias e produtos com determinadas atividades biológicas de causar danos à saúde humana. Além da letalidade, são estudados também parâmetros de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta (VALADARES, 2006).

O sangue humano constitui uma fonte simples de vários tipos celulares com propriedades estruturais e metabólicas peculiares, que o torna um alvo para estudos

farmacológicos e toxicológicos. As vantagens da utilização de eritrócitos e leucócitos humanos residem no fato dos mesmos serem facilmente obtidos, em grande quantidade e com baixo custo (CHAVES, 2007; SANTOS, 2009).

Os eritrócitos circulam no corpo humano cerca de 120 dias exercendo a função principal de transporte de gases pelo organismo. Para isso o eritrócito depende de características morfológicas, reológicas e de uma relação entre superfície e volume para tornar-se ideal para o transporte de oxigênio aos tecidos (CHAVES, 2007).

A resposta imunológica é desencadeada por diferentes tipos de células, sendo as principais os leucócitos, que são divididos de acordo com características do seu citoplasma em granulócitos (chamados de polimorfonucleares; PMN) e agranulócitos (mononucleares) (AQUINO, 2008).

Os neutrófilos (PMN) são os mais numerosos no sangue periférico, cerca de 40% a 70%, e com vida média de circulação de 6 a 10 horas, contudo, após ativação e migração para o tecido este valor passa a ser de 2 a 6 dias, retardando o processo de apoptose. O mecanismo de ativação dos neutrófilos é fundamental para a resposta inata e ocorre após algum estímulo, possibilitando a migração das células para o local da inflamação para que ocorra a destruição do patógeno (AQUINO, 2008).

1.10 INDICADORES DE TOXICIDADE

1.10.1 HEMÓLISE

Os eritrócitos são células sanguíneas que contêm altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, oxigênio molecular e íons ferrosos. Como consequência, são altamente vulneráveis à ação de agentes citotóxicos, oxidantes e de radicais livres e, portanto muito suscetíveis a alterações na integridade estrutural como: mudanças na fluidez da membrana e hemólise (SANTOS, 2009). Estas células são consideradas bons modelos para estudo de toxicidade, devido a sua estabilidade e facilidade de trabalho, onde uma vez ocorrendo a hemólise há a liberação de hemoglobina, facilmente quantificada por leitura espectrofotométrica de absorvância na região do visível, absorvância que é proporcional à lise dos eritrócitos (liberação de hemoglobina). A quantificação de íons, presentes nos eritrócitos, na solução afirma a lise das células (NETO, 2006).

Com base nestes conhecimentos, os testes realizados com hemácias para avaliar a possível ação de agentes tóxicos requer a utilização de soluções que mimetizem as condições dos fluidos humano, preservando a integridade dos elementos celulares, como a solução salina isotônica pH 7,4 que possui a tonicidade igual ao do líquido intracelular, mesma pressão osmótica e mantendo o equilíbrio de água entre o meio extracelular e intracelular.

1.10.2 VIABILIDADE CELULAR

Existem diversas formas de se obter a viabilidade celular, sendo a mais comum a detecção da integridade da membrana, onde as membranas defeituosas levam a perda de componentes intracelulares tais como proteínas. A integridade da membrana pode ser detectada por exclusão ou retenção de corantes (SILVA, 2007).

A viabilidade celular pode ser determinada pelo teste de exclusão do corante azul de Trypan, onde as células viáveis são impermeáveis a este corante, enquanto que sua penetração na célula indica a perda da integridade de sua membrana (VENANCIO, 2005). Este teste permite estimar indiretamente o grau de integridade da membrana celular, onde o percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (QUINTÃO, 2009).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho consistem na síntese de nanopartículas de magnetita através de uma nova rota, caracterização e ensaios de citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas de magnetita, tendo como requisitos: a obtenção de magnetitas de tamanhos uniformes e com baixa ou nula toxicidade em hemácias e leucócitos PMN humanos.

As etapas para atingir os objetivos delineados incluem:

- Desenvolver protocolos para síntese das nanopartículas de magnetita;
- Síntese de nanopartículas de magnetita de acordo com os protocolos desenvolvidos;
- Caracterização das nanopartículas de magnetita;
- Avaliação da citotoxicidade sobre hemácias e PMN humanos.

3. ANEXAÇÃO DO ARTIGO

Artigo publicado na revista Journal of Magnetism and Magnetic Materials.

Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells

Luiz F. Cótica^{a*}, Valdirlei F. Freitas^a, Gustavo S. Dias^a, Ivair A. Santos^a, Sheila C. Vendrame^b, Najeh M. Khalil^b, Rubiana M. Mainardes^b, Margo Staruch^c, and Menka Jain^c

^a*Department of Physics, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR, 87020900 Brazil.*

^b*Department of Pharmacy, Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava, PR, 85040080 Brazil.*

^c*Department of Physics, University of Connecticut. Storrs, CT, 06269 USA.*

In this paper, a very simple and facile approach for the large scale synthesis of uniform and size-controllable single-domain magnetite nanoparticles is reported. These magnetite nanoparticles were synthesized via thermal decomposition of a ferric nitrate/ethylene glycol solution. The structural and morphological properties of the synthesized nanoparticles were carefully studied. Nearly spherical nanoparticles with inverted spinel structure and average particle and crystallite sizes smaller than 20 nm were obtained. The magnetic measurements revealed that magnetite nanoparticles have a magnetic saturation values near the bulk magnetite. The erythrocyte cytotoxicity assays showed no hemolytic potential of the samples containing magnetite nanoparticles indicating no cytotoxic activity on human erythrocytes that makes these interesting for biotechnological applications.

Keywords: magnetite nanoparticles, structural properties, magnetic properties, biological effects

* Corresponding author. Tel. +55-044-3011-5904; fax: +55-044-3263-4623

E-mail address: lfcotica@pq.cnpq.br (L. F. Cótica)

1. Introduction

In recent years, many researchers have investigated materials designed to accomplish multiple performance objectives using a single system [1,2], i.e., materials with multiple functionalities for their applications in electronics, energy, and medicine [3-6]. With advancement in nanotechnology it has become possible to fabricate, characterize, and specially tailor the multifunctional properties of nanoparticles. For example, in biomedical applications, water or alcohol dispersible magnetic nanoparticles allowed new opportunities as contrast agents for magnetic resonance imaging [7], magnetic field guided drug delivery [8], tumour treatment via hyperthermia [9] and biomolecular separation and diagnostic imaging [10,11]. Especially in drug delivery applications, drug transport through magnetic nanoparticles has been widely studied in an attempt to obtain particles with high drug carrier capacity, good stability in aqueous solutions, and good biocompatibility with cells and tissues [12].

A variety of magnetic nanoparticles composed of different atoms or ions with different magnetic moments have been synthesized to target these applications. Inorganic nanoparticles such as Fe_3O_4 (magnetite), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemite), and spinel-structured magnetic nanoparticles (MFe_2O_4 , $\text{M} = \text{Fe}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Mn}$) have been widely used for their applications in nanomedicine [13]. Among various magnetic nanoparticles, magnetite offers many attractive possibilities in biomedicine and thus is of great importance [12]. Bulk and nanostructured magnetite crystallize with inverted spinel structure (space group $Fd\bar{3}m$) and the large oxygen ions are closely packed in a cubic arrangement, while smaller Fe-ions fill the structural gaps (tetrahedral and octahedral sites). The tetrahedral and octahedral sites form two magnetic sublattices, A and B, respectively. This particular arrangement of cations in A and B sublattices characterizes the inverse spinel structure. With negative AB exchange interactions, the net magnetic moment of the magnetite is due to the B-site Fe^{2+} ions [14].

The magnetite nanoparticles have a controllable size ranging from a few nanometers up to tens of nanometers, which is comparable to the dimensions of some cells (10-100 μm), viruses (20-450 nm), proteins (5-50 nm) or genes (2 nm wide and 10-100 nm long). This means that these nanoparticles are of great interest for their use with the biological entities of interest since they are biocompatible and able to interact

or bind to target cells [13,15,16]. To date, several methods have been proposed to synthesize magnetite nanoparticles [17-24]. In general, these methods are wet chemical routes. The most widely used method is based in the co-precipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} aqueous salt solutions by addition of a base [17]. The size, shape and composition of synthesized nanoparticles depends on the type of salts used (chlorides, sulphates, nitrates, etc.), $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ratio, and the pH and ionic strength of the media [18,19], but the disadvantage of this method is that the synthesis of particles must be done in an oxygen-free environment [20]. Other methods based on the precipitation principle have been developed: sol-gel [21], polymer matrix-mediated synthesis [5], and precipitation using microemulsions [22,23] and vesicles [24]. In all these routes, only small quantities of nanoparticles can be produced.

Herein, we report a very simple and facile approach for the large scale synthesis of uniform and size-controllable single-domain magnetite nanoparticles with diameters smaller than 20 nm. Structural, microstructural, and magnetic properties of these nanoparticles are presented and discussed. Attestation of potential for biological applications was obtained by erythrocyte cytotoxicity assays that showed no hemolytic potential and negligible toxicity for samples containing magnetite nanoparticles processed by the innovative route proposed in this work.

2. Experimental

2.1. Preparation of magnetite nanoparticles

The magnetite nanoparticles were synthesized via thermal decomposition of a ferric nitrate/ethylene glycol solution – see Fig. 1(a). First, a mixture of adequate amounts of ferric nitrate (Alfa Aesar) and ethylene glycol (Vetec) was prepared. The solution was homogenized for one hour, at room temperature followed by heating at 90 °C (Fig. 1(b)). To obtain nanoparticles with different sizes and distributions, the resulting material was heated in a tube furnace at temperatures between 300 °C (sample MAG300) and 500 °C (sample MAG500), under inert atmosphere (argon) – Figs. 1(c), (d).

2.2. Characterization of nanoparticles

X-ray diffraction (XRD) measurements were performed with a Shimadzu XRD 7000 diffractometer, using CuK_α radiation. The mean crystallite sizes were calculated from the linewidth broadening relative to a LaB_6 standard by using Scherrer's formula. Morphological characterizations were conducted in a JEOL JEM-1400 Transmission Electron Microscope (TEM) in order to gain some insights of the microstructure and the particle sizes distribution. Temperature dependent and field dependent magnetic characterizations (at 300 K) were performed in a commercial Vibrating Sample Magnetometer (VSM) from Lakeshore and in a VSM attached with a Physical Property Measurement System from Quantum Design.

3.3. Preparation of erythrocyte suspensions

The in-vitro cytotoxic effects of magnetite nanoparticles were studied using heparinized venous blood samples collected from healthy volunteers. Fresh blood was centrifuged (4000 rpm for 5 min) at 4 °C using a refrigerated centrifuge and the plasma and buffy coat were removed by aspiration. The the red blood cells were washed three times by centrifugation (4000 rpm for 5 min) in cold phosphate buffer saline (PBS) (0.15 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, pH 7.4). The supernatant and buffy coat of white cells was carefully removed with each wash. The red blood cells were finally re-suspended with the same buffer to obtain a hematocrit of 1% [25]. This suspension was used to erythrocyte hemolysis and measurement of K^+ assays. All experiments involving human blood were approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual do Centro-Oeste (protocol 313/2010).

2.4. Erythrocyte hemolysis assay

Different concentrations of MAG300 and MAG500 nanoparticles were incubated with a 1% red blood cell suspension for 90 min at 37°C with constant shaking, in PBS with 30mg/mL penicillin and 50mg/mL streptomycin solution. After incubation, the red blood cell suspension was centrifuged at 4000 rpm for 5 min. Hemolysis was determined by measuring the absorbance at 540 nm in a microplate reader (UV-Vis spectrometer Molecular Devices SpectraMax 190) [26,27].

2.5. K⁺ Release

Red blood cells were incubated with different concentrations of MAG300 and MAG500 nanoparticles for 90 min at 37°C with constant shaking. After the incubation, the red blood cells were centrifuged at 4000 rpm at 4°C for 5 min, and K⁺ release was measured with an ion-selective electrode (Roche/AVL 9180).

3. Results and Discussion

3.1. Physical Properties – Structural, Microstructural and Magnetic Properties

The XRD results (θ - 2θ scans) for MAG300 and MAG500 samples (Figure 2) showed broadened lines, which were assigned to the crystallized magnetite (JCPDS PDF19-0629) with inverted spinel structure (space group $Fd\bar{3}m$) [14]. The mean crystallite sizes (t) obtained by using Scherrer's formula [15] ($t = 0.9\lambda / B \cos\theta$), where B is the half-value breadth of the diffracted x-ray beam, θ is the Bragg angle, and λ is the wavelength of the incident x-rays) were $t_{MAG300} = 15$ nm, and $t_{MAG500} = 20$ nm for 300 °C and 500 °C annealed samples, respectively.

TEM images for MAG300 and MAG500 nanoparticles are shown in Figs. 3(a) and 3(b), respectively. In both samples, the majority of the particles were nearly spherical in shape. Some magnetite nanoparticles are partially superimposed onto the agglomerate core, i.e., the boundary limit of each nanoparticle is partially diffuse, thus a precise average particle size cannot be determined. However, a narrowed particle sizes distribution can be seen and the average particle size for the magnetite nanoparticles was found to be between 15-20 nm. It should be noted that generally, magnetite nanoparticles with no surface treatments tend to agglomerate with the neighboring ones, which could be due to the substantial built-up specific surface area of the nanosized particles [29]. Also, the magnetic nanoparticles aggregate together to reduce their surface energy [30] and/or due to the magnetic dipole–dipole interactions and the van der Waals forces between the nanoparticles [31,32].

Fig. 4 plots the magnetization vs. applied field (M vs. H) curves for MAG300 and MAG500 samples and the value of saturation magnetization (M_s) was found to be 11 emu/g for MAG300 and 67 emu/g for MAG500. M_s was found to increase with an

increase in the annealing temperature and approached that of the bulk magnetite (92 emu/g) [12]. The increase of M_S can be explained by considering that the annealing contributes to facilitate the exchange interaction between the magnetic sublattices of the magnetic core (Fe_3O_4) and to increase the magnetic core reducing the surface spin effects [14]. In order to better define the magnetic state of the magnetite nanoparticles, field cooling (FC) and zero field cooling (ZFC) magnetization values were measured (as shown in Fig. 5). All measurements were performed with an applied DC field of 20 Oe. No thermoremanent behavior was observed in these curves for both samples, as previously reported in similar nanoparticles [14]. In fact, nanosized magnetic particles are expected to be magnetic monodomain particles and the temperature dependence of the thermoremanent magnetization directly correlates with the deblocking process that occurs inside the magnetic nanoparticle system for temperature increases in zero applied magnetic fields and after a previous FC process. As previously reported [14,33], the blocking temperature (T_B), that was obtained from the temperature dependent ZFC and FC curves, was near room temperature. This behavior is expected since the magnetic properties of nanoparticles are strongly influenced by finite size effects and the breaking of the crystal symmetry at the particle surface. In that case, very high anisotropy constant values suppresses the thermoremanent behavior [14].

3.2. Cytotoxicity assays

Magnetite nanoparticles have been of significant use for many biological applications. However, for use in biological systems they should have biocompatibility with cells and tissues among other properties. Several tests have been performed in order to evaluate the toxicological risks of magnetite nanoparticles [34], including the evaluation of cytotoxicity on red blood cells and phagocyte cells [35-38]. Several studies also use erythrocytes as a model to assess cytotoxicity of a series of compounds that have some potential biological activity and that has not yet been evaluated for toxic effects by other methods. Hemolysis testing is a fast, efficient, simple, and low cost analysis method to evaluate the possible cytotoxicity of magnetite nanoparticles on erythrocytes membrane, determined spectrophotometrically by observing the release of hemoglobin. Fig. 6 shows that the rate of hemolysis by 24h incubation with different concentrations of MAG300 and MAG500 (0.062 – 1.87 mg/mL) was similar to control sample (in the absence of magnetite nanoparticles), demonstrating the compatibility

with these blood cells. Corroborating with hemolysis results, the analysis of K-release of red blood cells, which is also an indicator of membrane damage, showed similar results (data not shown). Thus, the cytotoxicity assays results indicate that MAG300 and MAG500 nanoparticles have no effects on blood cells that were potentially in contact with these particles in circulation, demonstrating their potentiality for nanomedicine and biotechnological applications.

4. Conclusion

In this study, we report a very simple approach for the large scale synthesis of uniform and size-controllable single-domain magnetite nanoparticles. Based on the X-ray diffraction and transmission electron microscopy measurements, it was inferred that the magnetite nanoparticles were of spherical shape with diameters small than 20 nm and narrow size distribution. Magnetic saturation close to the bulk magnetite was confirmed with magnetic measurements. Assays using human erythrocytes were performed to evaluate the cytotoxicity of these magnetite nanoparticles. The erythrocyte cytotoxicity assays showed no hemolytic potential of the samples containing magnetites. Thus, we can conclude that the magnetite nanoparticles have no cytotoxic activity on human erythrocytes. These results clearly indicate that the present magnetite nanoparticles can be a model drug-carrier, which makes these interesting for their potential use in biomedical applications, such as DNA separation, drug delivery site-specific, cancer treatment by hyperthermia and diagnostic imaging in MRI. Further, this new route of nanoparticle synthesis would simplify and reduce the cost of production, providing access to drugs and carriers that utilize these nanoparticles to a large numbers of people.

Acknowledgements

The authors would like to thank the CAPES (Proc. 082/2007), CNPq (proc. 307102/2007-2 and 302748/2008-3), and Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (Prot. 15727) Brazilian agencies for their financial support. S.C.V. also thanks the Fundação Araucária for the fellowship. We also gratefully acknowledge the instrumental research facilities provided by COMCAP/UEM. Author MJ is grateful for the support from the national science foundation grant (NSF1105975)

- [1] N. A. Spaldin and M. Fiebig, *Science* 309 (2005) 391.
- [2] J. F. Scott, *Science* 315 (2007) 954.
- [3] M. Fiebig, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 38 (2005) R123.
- [4] A. Balazs, C. Emrick, and T. P. Russell, *Science* 314 (2006) 1107.
- [5] R. F. Ziolo *et al.*, *Science* 257 (1992) 219.
- [6] H. Kawaguchi, *Prog. Polym. Sci.* 25 (2000) 1171.
- [7] D. K. Kim *et al.*, *Chem. Mater.* 15 (2003) 4343.
- [8] R. Asmatulu *et al.*, *J. Magn. Magn. Mater.* 292 (2005) 108.
- [9] J. Roger *et al.*, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* 5 (1999) 321.
- [10] P. A. Liberti, C. G. Rao, and L. W. M. M. Terstappen, *J. Magn. Magn. Mater.* 225 (2001) 301.
- [11] D. Navarathne *et al.*, *Mater. Lett.* 65 (2011) 219.
- [12] R. B. Gupta and U. B. Kompella, *Nanoparticle technology for drug delivery* (Taylor & Francis Group, New York, 2006).
- [13] J. Yang *et al.*, *Int. J. Pharm.* 324 (2006) 185.
- [14] L. F. Cótica *et al.*, *J. Appl. Phys.* 108 (2010) 064325.
- [15] A. L. Patterson, *Phys. Rev.* 56 (1939) 978.
- [16] Q. A. Pankhurst *et al.*, *J. Phys. D.* 36 (2003) 167.
- [17] R. H. Muller *et al.*, *Int. J. Pharm.* 138 (1996) 85.
- [18] G. W. Reimers and S. E. Khalafalla, *US Bureau Mines Tech. Rep.*, 59, (1972).
- [19] G. C. Hadjipanayis and R. W. Siegel, *Nanophase materials: synthesis, properties and applications - NATO ASI Series* (Kluwer, Dordrecht, 1993).
- [20] C. E. Sjogren *et al.*, *Magn. Reson. Med.* 31 (1994) 268.
- [21] A. K. Gupta and A. S. G. Curtis, *Biomaterials* 25 (2004) 3029.
- [22] T. M. Tillotson *et al.*, *J. Non-Cryst. Solids* 285 (2001) 335.
- [23] Y. Deng *et al.*, *J. Magn. Magn. Mater.* 257 (2003) 69.
- [24] S. Santra *et al.*, *Langmuir* 17 (2001) 2900.
- [25] S. Li *et al.*, *Colloids Surf. A* 174 (2000) 275.
- [26] C. D. Hapner, P. Deuster, and Y. Chen, *Chem-Biol. Interact.* 186 (2010) 275.
- [27] A. Banerjee *et al.*, *Chem-Biol. Interact.* 174 (2008) 134.
- [28] J. Wang *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 1591.
- [29] D. H. Chen and X. R. He, *Mater. Res. Bull.* 36 (2001) 1369.
- [30] C. Hu, Z. Gao and X. Yang, *Chem. Phys. Lett.* 429 (2006) 513.
- [31] Y. Lalatonne, J. Richardi and M.P. Pileni, *Nature Mater.* 3 (2004) 121.

- [32] P.A. Hartley, G.D. Parfitt and L.B. Pollack, *Powder Technol.* 42 (1985) 35.
- [33] R. A. Silva *et al.*, *J. Solid State Chem.* 180 (2007) 3545.
- [34] S. M. Griffiths *et al.*, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3778.
- [35] Y. Liu *et al.*, *Toxicol. Lett.* (2011) in press.
- [36] W. Wu *et al.*, *Int. J. Nanomed* 5 (2010) 1079.
- [37] R. D. Oude Engberink *et al.*, *Radiology.* 243(2) (2007) 467.
- [38] J. Kristl *et al.*, *Int. J. Pharm.* 256 (2003) 133.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. A schematic of the flowchart for the synthesis of magnetite nanoparticles.

Fig. 2. X-ray diffraction patterns for the magnetite nanoparticles synthesized at (a) 300 °C (MAG300) and (b) 500 °C (MAG500). M = magnetite (JCPDS PDF19-0629).

Fig. 3. Transmission electron microscopy images of magnetite nanoparticles synthesized at (a) 300 °C (MAG300) and (b) 500 °C (MAG500).

Fig. 4. Room temperature magnetization vs. magnetic field data (M vs. H) of magnetite nanoparticles synthesized at (a) 300 °C (MAG300) and (b) 500 °C (MAG500).

Fig. 5. Temperature dependent magnetization (field cooling and zero field cooling) of magnetite nanoparticles synthesized at (a) 300 °C (MAG300) and (b) 500 °C (MAG500).

Fig. 6. Hemolysis test on human erythrocytes with increasing concentrations of magnetite nanoparticles synthesized at (a) 300 °C (MAG300) and (b) 500 °C (MAG500).

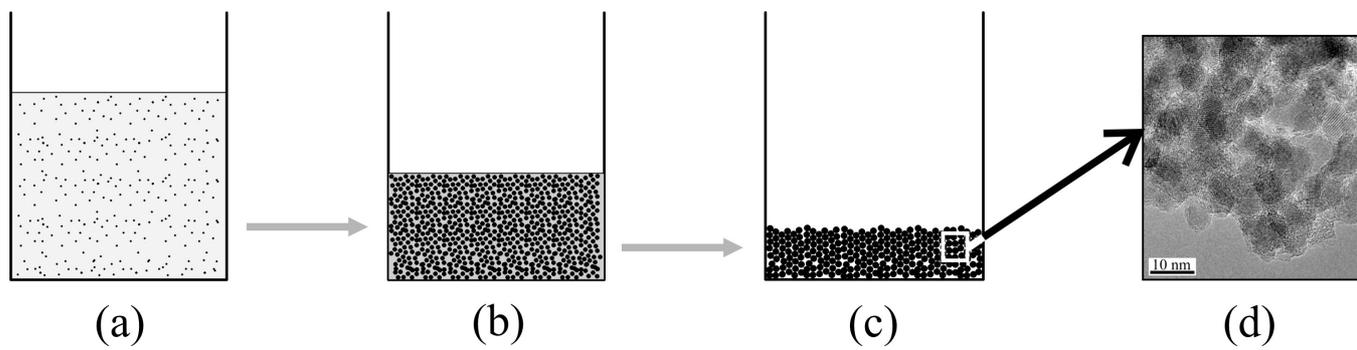
Figure 1

Figure 2

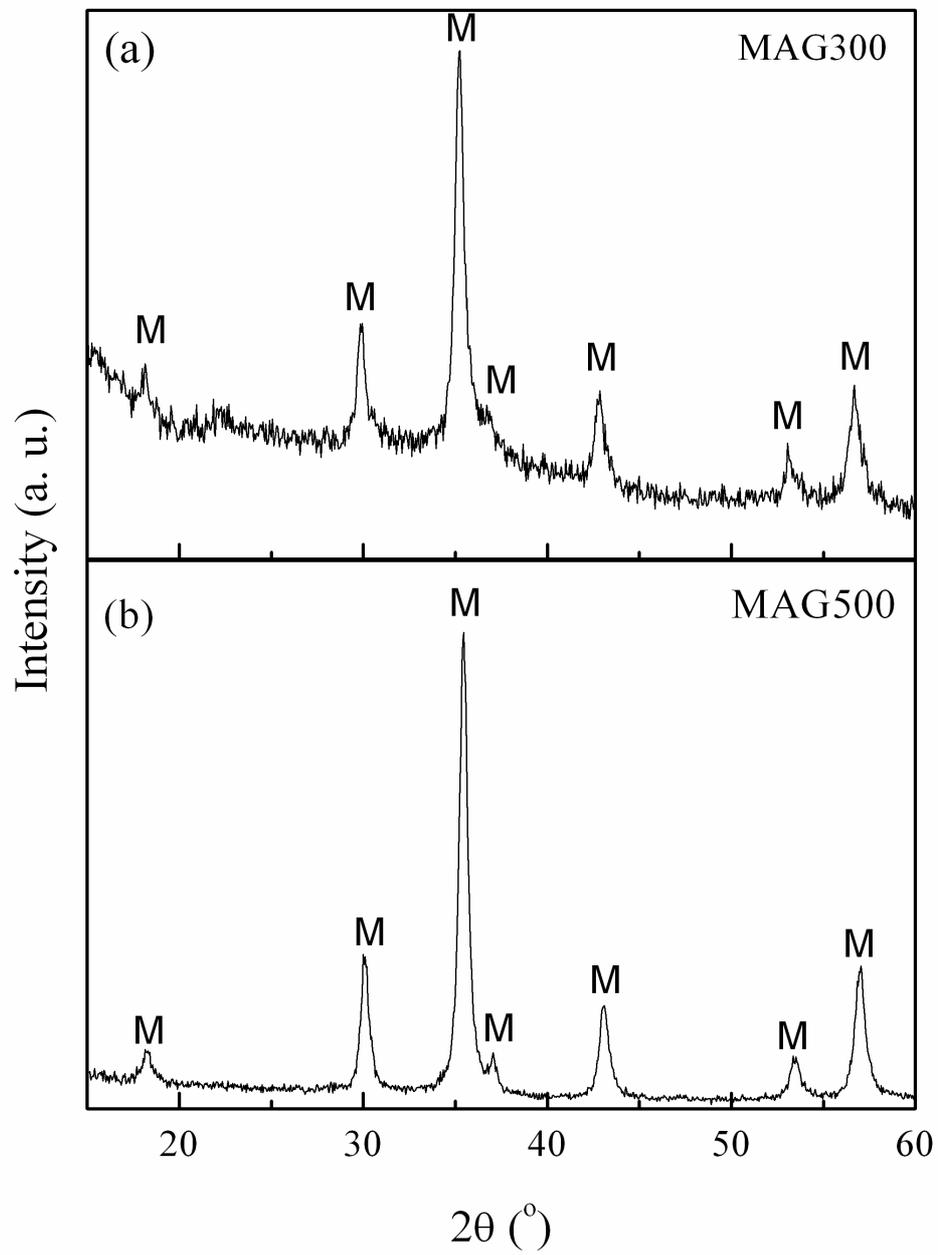


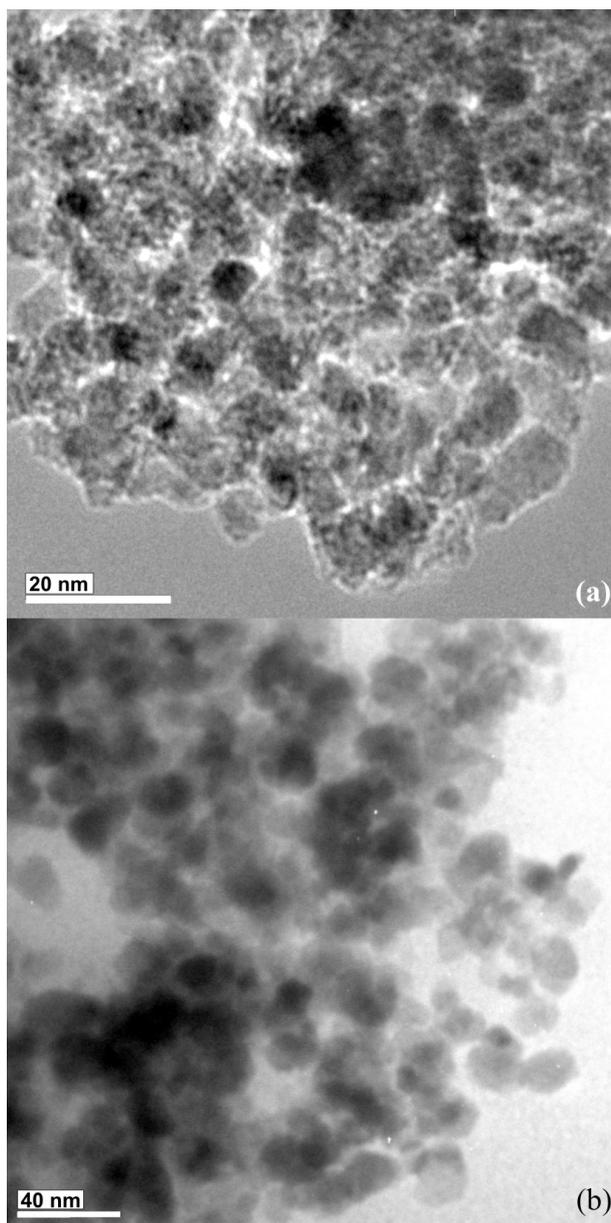
Figure 3

Figure 4

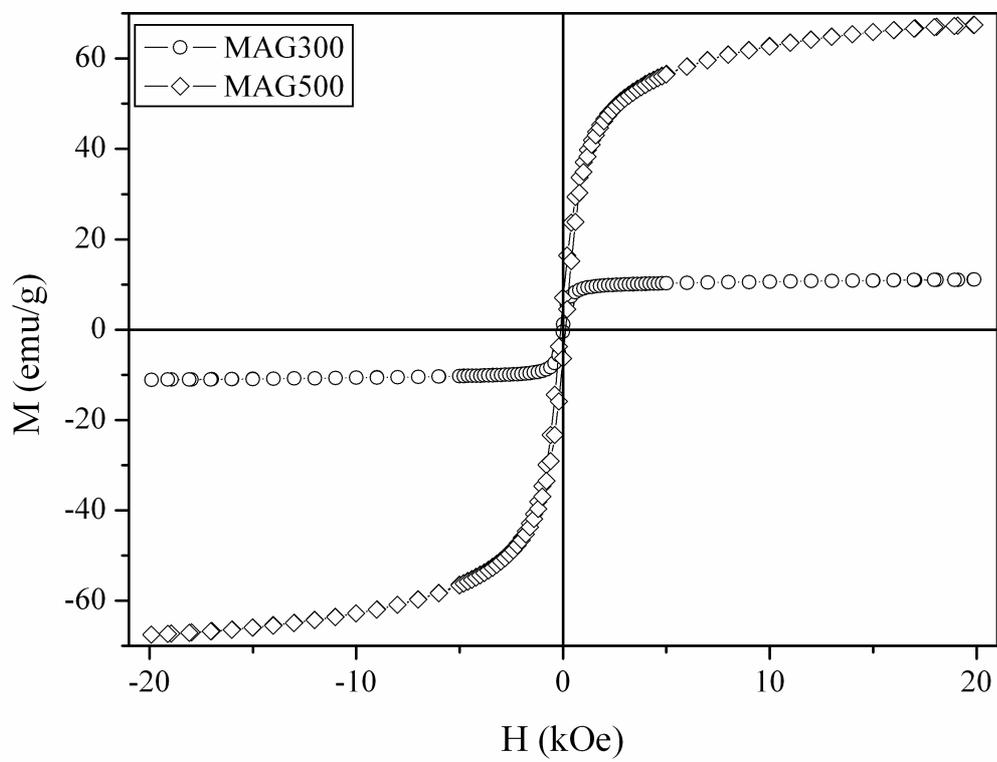


Figure 5

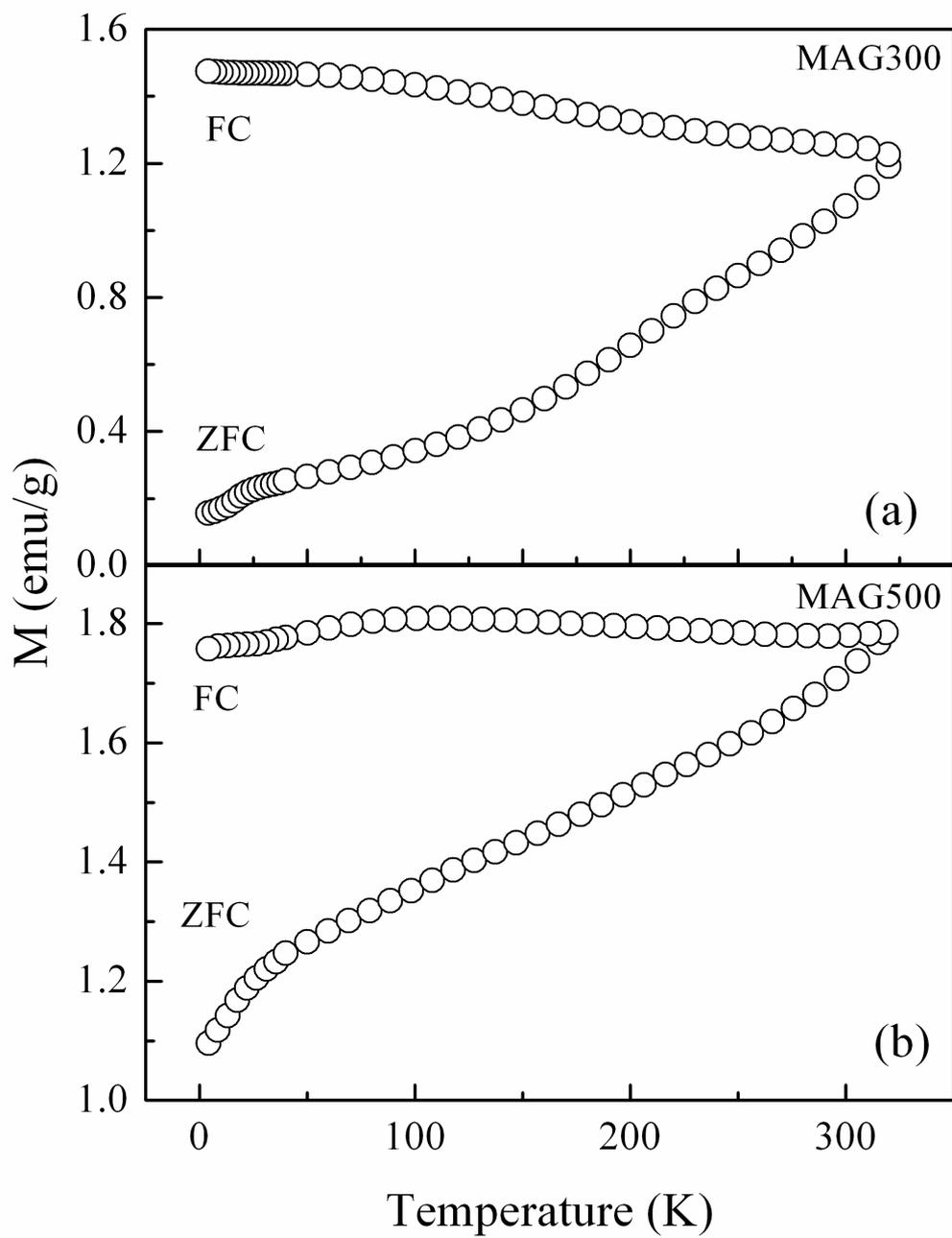
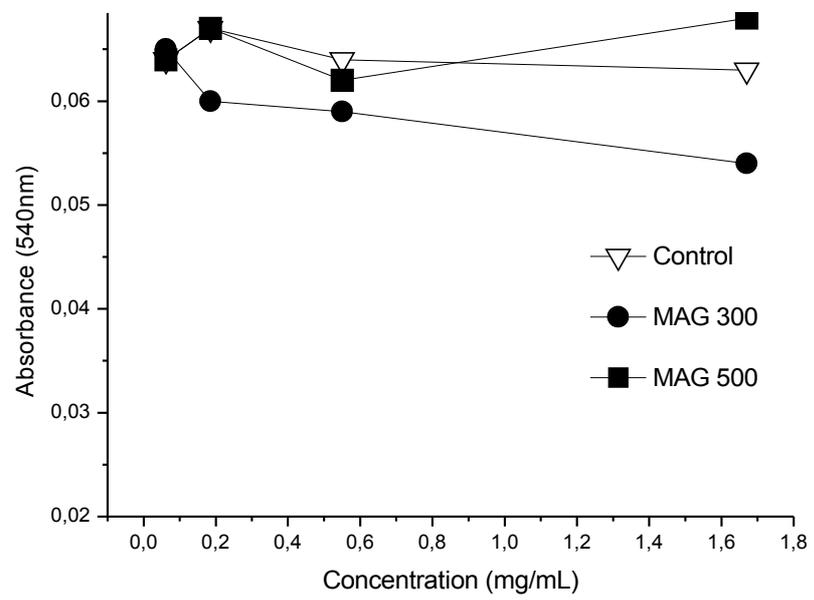


Figure 6



4. TRABALHOS APRESENTADOS

4.1 Controlling the Size of Magnetic Nanoparticles for Drugs' Applications

Symposium: Controlled Processing of Nanoparticle-based Materials and Nanostructured Films

MS&T 2010 Ceramic Transactions

**Controlling the Size of Magnetic Nanoparticles for Drugs'
Applications**

Journal:	<i>MS&T 2010 Ceramic Transactions</i>
Manuscript ID:	Draft
Symposium:	Controlled Processing of Nanoparticle-based Materials and Nanostructured Films
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cótica, Luiz; Universidade Estadual de Maringá

SCHOLARONE™
Manuscripts

CONTROLLING THE SIZE OF MAGNETIC NANOPARTICLES FOR DRUGS' APPLICATIONS

Luiz Fernando Cótica, Valdirlei Fernandes Freitas, Gustavo Sanguino Dias, Ivair Aparecido dos Santos.

Department of Physics, Universidade Estadual de Maringá.

Maringá, PR, Brazil.

Sheila Caroline Vendrame, Najeh Maissar Khalil, Rubiana Mara Mainardes.

Department of Pharmacy, Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Guarapuava, PR, Brazil.

ABSTRACT

Water or alcohol dispersible magnetic nanoparticles allowed new opportunities for various biomedical applications as contrast agents for magnetic resonance imaging, magnetic field guided drug delivery, tumor treatment via hyperthermia and biomolecular separation and diagnostic imaging. Especially in drug delivery applications, drug transport through magnetic nanoparticles has been widely studied in an attempt to obtain particles with high carrier capacity of drugs, good stability in aqueous solutions, good biocompatibility with cells and tissues, among others. In this context, in this work, chemically synthesized magnetite nanoparticles (via the modified sol-gel processing), with different sizes, were obtained through heat treatments. Magnetic, structural (X-ray diffraction), microstructural (scanning electron microscopy) and cells toxicity properties of nanoparticles are carefully investigated.

INTRODUCTION

The synthesis of biocompatible magnetic nanoparticles has long been of interest in biomedical applications. The feasibility of many medical applications may strongly rely upon generating narrow size distribution and well dispersed nanoparticles in an aqueous or alcoholic solution.

With these characteristics, magnetic nanoparticles can be accurately manipulated by a magnetic field gradient. This “action at a distance”, combined with intrinsic magnetic field penetration into human tissue, opens up many applications involving

transport and/or immobilization of magnetic nanoparticles or magnetically added biological entities.¹ The main biomedical applications that use the magnetic characteristic of the nanoparticles include contrast agents for magnetic resonance imaging, magnetic field guided drug delivery, tumor treatment via hyperthermia and biomolecular separation and diagnostic imaging.²⁻⁵

Targeting these applications, a variety of magnetic nanoparticles composed of different atoms or ions with different magnetic moments have been synthesized. Inorganic nanoparticles such as Fe₃O₄ (magnetite), γ -Fe₂O₃ (maghemite) and spinel-structure magnetic particles (MFe₂O₄, M = Fe, Co, Ni, Mn) are increasingly finding applications in nanomedicine.⁶ Most of the magnetic materials used in biomedical applications are 10–20 nm size range, i. e., they are in a single domain magnetic regime. This leads to the phenomenon of superparamagnetism. These materials respond to an applied external magnetic field but do not have any residual magnetization upon removal of the magnetic field.

Among the cited magnetic nanoparticles, the most used are magnetite nanoparticles. These nanoparticles offer many attractive possibilities in biomedicine. They have controllable sizes ranging from few nanometers up to tens of nanometers, which puts them in smaller dimensions when compared to some cells (10-100 μ m), viruses (20-450 nm), protein (5-50 nm) or gene (2 nm wide and 10-100 nm long). This means that they near in size to biological entities of interest.^{1,7,8}

Bulk and nanostructured magnetite crystallize with inverted spinel structure (space group *Fd-3m*) and the large oxygen ions are closely packed in a cubic arrangement, while smaller Fe ions fill the structural gaps (tetrahedral and octahedral sites). The tetrahedral and octahedral sites form two magnetic sublattices, A and B, respectively. The spins of sublattice A are antiparallel to those of B. The two crystal sites are very different and result in complex forms of exchange interactions of iron ions between and within the two types of sites. The structural formula of magnetite is [Fe³⁺]₁[Fe³⁺,Fe²⁺]₂O₄ (AB₂O₄). This particular arrangement of cations in A and B sublattices characterizes the inverse spinel structure. With negative AB exchange interactions, the net magnetic moment of the magnetite is due to the B-site Fe²⁺ ions.⁹

In a biological statement, magnetite nanoparticles present low cytotoxicity and are well tolerated by the human body.^{1,10} As a consequence, the drug release of magnetic drugs is able to concentrate these particles in a tumor if it is accessible through the arterial system and has a good blood supply. Therefore, the magnetic antitumor drug

release occurs with fewer collateral effects and providing treatments shorter and less toxic.^{6,11} However, for high efficiency in applicationspecific biological function, magnetite must comply with certain criteria such as being spherical, biocompatible, superparamagnetic, have a narrow difference in size, high crystallinity, high magnetic saturation to provide a maximum control of the target and good dispersion in liquid.^{5,7,12}

The composition, size and conditions for the synthesis of magnetite are determined by the target application, since this determines the physico-chemical and pharmacokinetic that the nanoparticles must be present.^{6,13,14} Herein, we report a very simple route to synthesize uniform and size-controllable superparamagnetic magnetite nanoparticles with diameters smaller than 30 nm. Such magnetite nanoparticles are fabricated based on the thermal decomposition of a ferric nitrate/ethylene glycol solution. This attractive method is facile and convenient, requires neither harsh conditions nor extra modifiers, and provides an economical route to fabricate other functional inorganic nanomaterial. The structural and morphological properties of the nanoparticles were carefully studied via X-ray diffraction and scanning electron microscopy, respectively. The magnetic properties were obtained via vibrating sample magnetometry and the potential for biological applications was tested by *in vitro* cytotoxic effects of magnetite nanoparticles essays.

EXPERIMENTAL

The magnetite nanoparticles were synthesized from a mixture of adequate amounts of ferric nitrate (Alfa Aesar) and ethylene glycol (Vetec). The solution was homogenized for one hour at room temperature and then subjected to heating until 90°C. After heated, the solution was cooled to room temperature. To obtain nanoparticles with different sizes and distributions, the resulting material was heated in tunnel furnace at temperatures between 300 and 500°C, under inert atmosphere (argon). X-ray diffraction (XRD) measurements were performed with a Shimadzu XRD 2000 diffractometer, using CuK α radiation. The mean crystallite sizes were calculated from linewidth broadening relative to a metallic silicon standard by using Scherrer's formula. Morphological characterizations were made in a Shimadzu Superscan SS550 microscope. Magnetic characterizations were performed in a commercial vibrating sample magnetometer (VSM) Lakeshore at room temperature (300 K). The *in vitro* cytotoxic effects of magnetite nanoparticles were studied using blood samples collected from three healthy volunteers. The blood was centrifuged and then plasma and the

leukocytes layer were removed by aspiration. Erythrocytes were resuspended in a sodium phosphate buffer 50mM, pH 7.4. Different concentrations of magnetite were incubated with an erythrocytes solution for 6 hours at 37°C with constant mixing. Then, the solution was centrifuged and the content of hemoglobin released due to the cytotoxic action of magnetite nanoparticles in the supernatant was determined. This determination was made by measuring the absorbance at 540nm in the absence or presence of magnetite (UV-Vis spectrometer Molecular Devices SpectraMax 190).

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the XRD patterns of the 300, 400 and 500 oC heat treated in argon atmosphere samples. All XRD patterns showed broadened X-ray lines, which were assigned to crystallized magnetite (JCPDS PDF19-0629) with inverted spinel structure (space group $Fd-3m$).⁹ The mean crystallite sizes obtained for the Fe₃O₄ nanoparticles (using Scherrer's formula) were $t_{300} = 15$ nm, $t_{400} = 18$ nm and $t_{500} = 20$ nm for 300°C, 400°C and 500°C heat treated samples, respectively.

Scanning electron microscopy images of magnetite nanoparticles heat treated at 300 and 500°C are shown in Figure 2. The particles are in spherical shape with a 45nm mean diameter and a narrow size distribution. Moreover, some magnetite nanoparticles partially superimposed onto the agglomerate core, i.e., the boundary limit of each nanoparticle is partially diffuse.

To gain information on the magnetic properties of the magnetite nanoparticles, the dependence of the room temperature magnetic field on magnetization ($M \times H$ curves) was investigated. Figure 3 shows $M \times H$ curves for the magnetite nanoparticles heat treated for 2 hours at 300 oC and 500 oC. These curves present typical superparamagnetic shapes. As already stated, nanoparticles usually are magnetic monodomains.¹⁵⁻¹⁷ As can be seen, the saturation of magnetization (MS) increases with the heat treatment temperature increasing. The increase in the MS value leads to the magnetite nanoparticles has a magnetic saturation near the bulk magnetite (92 emu/g). The increase of MS can be explained by considering that the heat treatment contributes to facilitate the exchange interaction between the magnetic sublattices of the magnetic core (Fe₃O₄) and to increase the magnetic core.⁹

In order to further explore the potential biological applications of the magnetite nanoparticles, we evaluated the cytotoxic effects of the 300°C, 400°C and 500°C heat treated samples. Figure 4 shows a representative result obtained by spectroscopic

measurements. The erythrocyte cytotoxicity assays showed no acute adverse effects comparing the obtained values for control samples and the magnetite containing samples. This characterizes the non-erythrocyte hemolysis in a wide concentration range up to 1.67 mg/mL after cell incubations. The negative result for hemolysis was confirmed by potassium ions quantification through ion-selective electrode, where there was no quantification of this ion. Thus, we can conclude that the magnetite nanoparticles have no cytotoxic activity on human erythrocytes.

In summary, the presented synthesis route allows control of the size and the magnetic properties of magnetite nanoparticles. The formation of the magnetite nanoparticles resulted in a multifunctional material with desired sizes, controlled magnetic properties and low toxicity properties. It is worth noting that these characteristics are very important in medical applications, such as DNA separation, magnetic drug targeting, immune detection, tissue engineering, hyperthermia in cancer treatment, detoxification of biological fluids, and magnetic guidance of particle systems for specific drug delivery processes.

CONCLUSIONS

In this paper were presented the results of detailed structural, microstructural, magnetic and biological studies in the magnetite nanoparticles obtained from a low cost thermal decomposition of a mixture of ferric nitrate and ethylene glycol. The samples were investigated by scanning electron microscopy, X-ray diffraction, magnetization measurements and in vitro cytotoxic effects. Analysis of the crystallographic data revealed inverted spinel structure in all cases. Typical superparamagnetic behaviour was observed in magnetization measurements. The saturation of magnetization (MS) increases with the heat treatment temperature increasing. The increase in the MS value leads to the magnetite nanoparticles has a magnetic saturation near the bulk magnetite.

The erythrocyte cytotoxicity assays showed no acute adverse effects comparing the obtained values for control samples and the magnetite containing samples. The synthesis procedure used in this paper made it possible to tune the size and the magnetic properties of the magnetite nanoparticles. This tuning process is remarkably important in the design of materials for biological and biomedical applications, mainly drug delivery.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the CAPES (Proc. 082/2007), CNPq (proc. 307102/2007-2 and 302748/2008-3), and Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (Prot. 15727) Brazilian agencies for their financial support. S.C.V. also thanks the Fundação Araucária for the fellowship. We also gratefully acknowledge the instrumental research facilities provided by COMCAP/UEM.

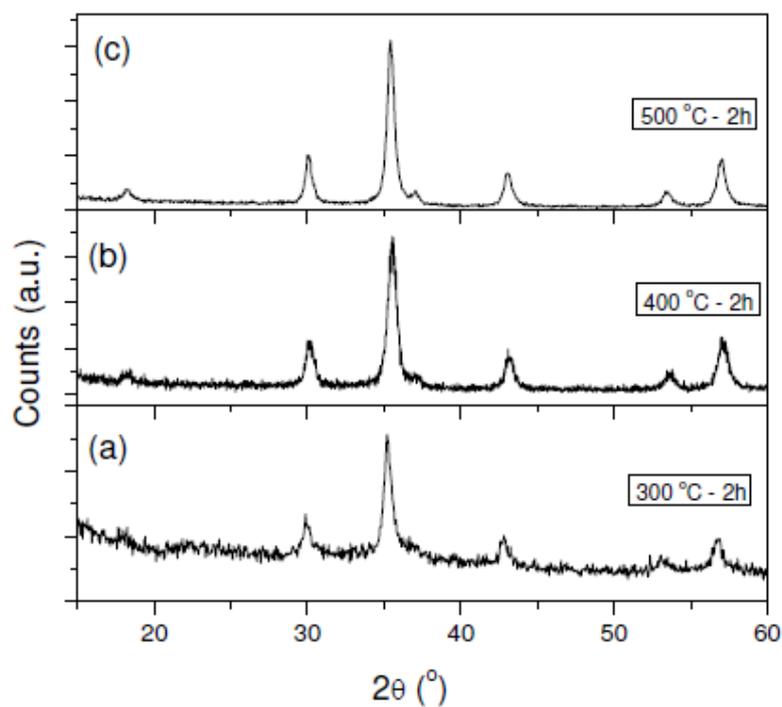


Figure 1 – X-ray diffraction patterns of the magnetite nanoparticles heat treated for 2 hours at (a) 300°C, (b) 400°C and (c) 500°C. The patterns have been assigned to crystallites with spinel structure ($Fd-3m$ space group) for all samples.

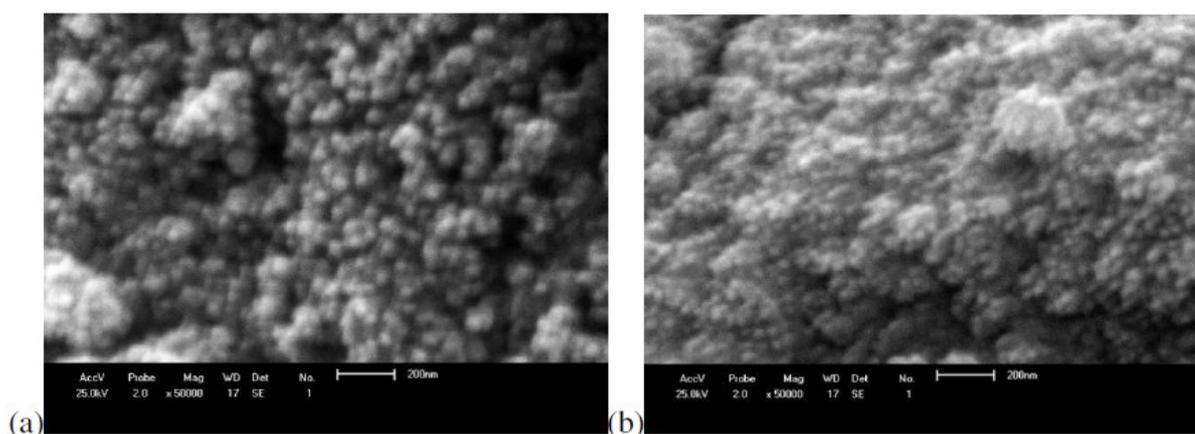


Figure 2 – Scanning electron microscopy images of the magnetite nanoparticles heat treated for 2 hours at (a) 300°C and (b) 500°C.

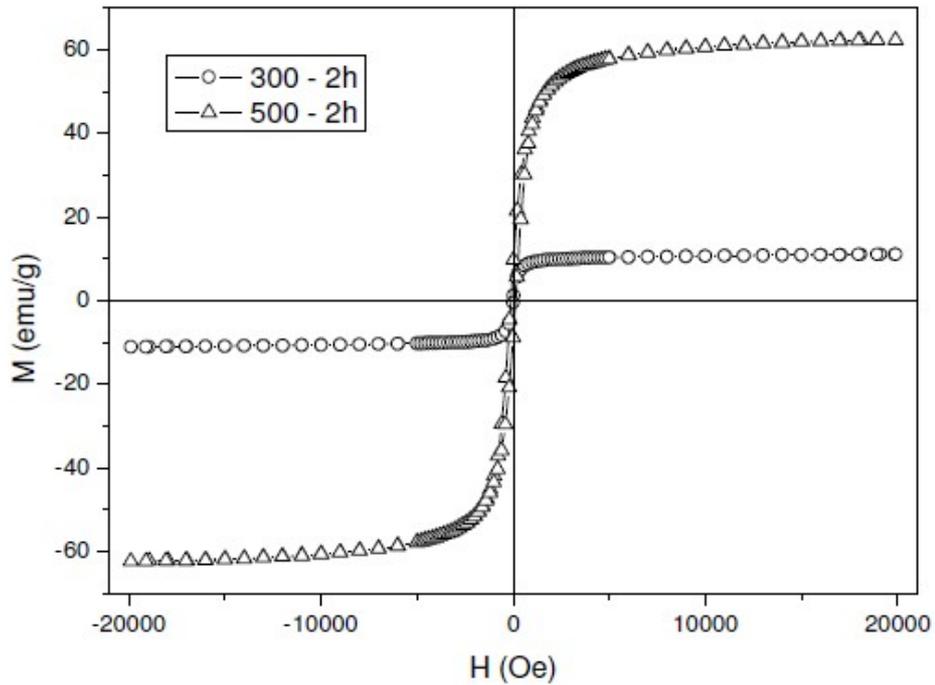


Figure 3 – Magnetization curves ($M \times H$) of the magnetite nanoparticles heat treated for 2 hours at 300°C and 500°C.

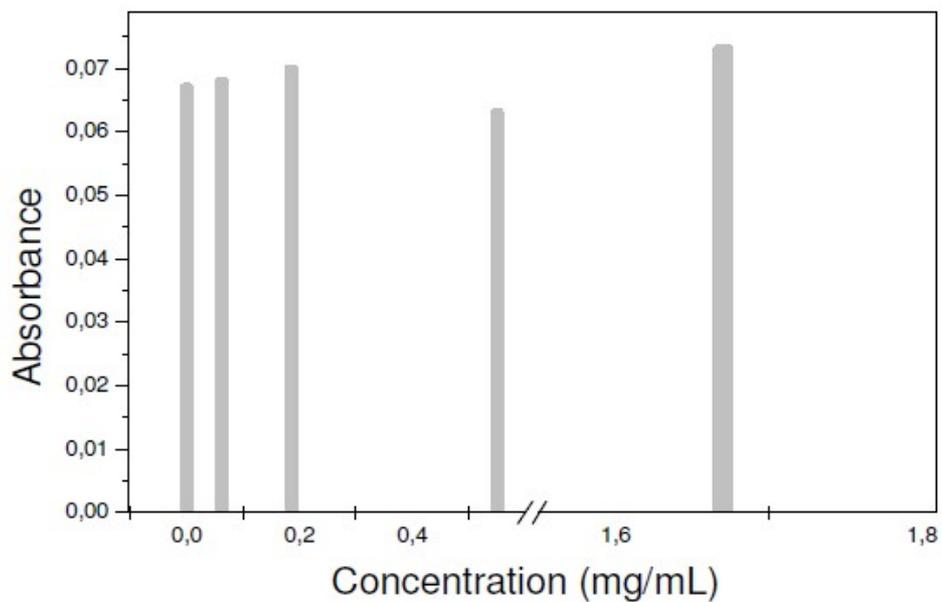


Figure 4 – Erythrocyte cytotoxicity assays for evaluates the cytotoxic effects of the 500°C heat treated samples. These results are representative to all the other samples.

REFERENCES

- 1 Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D.*, **36**, 167-181(2003).
- 2 D.K. Kim, Y. Zhang, J. Kehr, T. Klason, B. Bjelke, M. Muhammed, Characterization and MRI study of surfactant-coated superparamagnetic nanoparticles administered into the rat brain, *J. Magn. Magn. Mater.*, **225**, 256–61 (2001).
- 3 A.S. Lubbe, C. Bergemann, H. Riess, Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 40-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors, *Cancer Res.*, **56**, 4686–93 (1996).
- 4 D.C.F. Chan, D.B. Kirpotin, P. Bunn, Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radio frequency induced hyperthermia of cancer, *J. Magn. Magn. Mater.*, **122**, 374–8 (1993).
- 5 A. Dyal, K. Loos, M. Noto, S.W. Chang, C. Spagnoli, K.V.P.M. Shafi, A. Ulman, M. Cowman, R.A. Gross, Activity of candida rugosalipase immobilized on Fe₂O₃ magnetic nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1684–5 (2003).
- 6 J. Yang, S.B. Park, H.G. Yoon, Y.M. Huh, S. Haam, Preparation of poly-caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier, *Int. J. Pharm.*, **324**, 185-190 (2006).
- 7 R.H. Muller, S. Maaben, H. Weyhers, F. Specht, J.S. Lucks, Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, **138**, 85-94 (1996).
- 8 Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S.K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D.*, **36**, 167-181 (2003).
- 9 L.F. Cótica, I.A. Santos, E.M. Giroto, E.V. Ferri, A.A. Coelho, Surface spin disorder effects in magnetite and poly(thiophene)-coated magnetite nanoparticles, *J. Appl. Phys.*, **108**, 064325 (2010).
- 10 O. Hafeli, M. Chastellain, *Nanoparticulates as drug carriers*, Imperial College Press (London), 397-411 (2006).
- 11 R.B. Gupta, U.B. Kompella, *Nanoparticle technology for drug delivery*, Taylor & Francis Group (New York), **159**, 1-18 (2006).
- 12 S. Guo, D. Li, L. Zhang, J. Li, E. Wang, Monodisperse mesoporous superparamagnetic singlecrystal magnetite particles for drug delivery, *Biomaterials*, **30**, 1881-1889 (2009).

- 13 T.Vo-Dinh, *Nanotechnology in biology and medicine: methods, devices and applications*, Taylor & Francis Group (Boca Raton), 762 (2007).
- 14 D. Thassu, M. Deleers, Y. Pathak, *Nanoparticulate drug delivery systems*, Informa Healthcare (New York), 382 (2007).
- 15 M. Jamet, V. Dupuis, P. Mélinon, G. Guiraud, A. Pérez, W. Wernsdorfer, A. Traverse, B. Baguenard, Structure and magnetism of well defined cobalt nanoparticles embedded in a niobium matrix, *Phys. Rev. B*, **62**, 493-99 (2000).
- 16 L. H. M. Fonseca, A.W. Rinaldi, A.F. Rubira, L.F. Cótica, S.N. de Medeiros, A. Paesano, Jr., I.A. Santos, E.M. Giroto, Structural, magnetic, and electrochemical properties of poly(oanisidine)/maghemite thin films, *Mater. Chem. Phys.*, **97**, 252 (2006).
- 17 R.A. Silva, M.J.L. Santos, A.W. Rinaldi, A.J.G. Zarbin, M.M. Oliveira, I.A. Santos, L.F. Cótica, A.A. Coelho, A.F. Rubira, E.M. Giroto, Low coercive field and conducting nanocomposite formed by Fe₃O₄ and poly(thiophene), *J. Solid State Chem.*, **180**, 3545 (2007).

4.2 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

III Congresso Brasileiro de Toxicologia Clínica, Florianópolis – SC, 2010.

Introdução

As nanopartículas com características magnéticas podem ser manipuladas através de um campo magnético externo, o que lhe garante uma alta eficácia em aplicações sítio-específicas por facilitar a liberação do fármaco no órgão ou tecido afetado e com uma redução dos efeitos colaterais, além de proteger o fármaco de degradação e controlar a velocidade de liberação. Porém, a síntese de nanopartículas magnéticas com alta estabilidade e diâmetro menor ou igual a 30 nm ainda é um obstáculo, bem como a sua segurança para aplicação em sistemas biológicos.

Objetivo

Desenvolvimento de uma técnica para síntese de nanopartículas magnéticas (magnetita) com alta estabilidade e diâmetro inferior a 30nm e análise de citotoxicidade das magnetitas sobre hemácias.

Métodos

As magnetitas foram sintetizadas a partir de nitrato férrico e aquecidas a diferentes temperaturas em forno tubular para obtenção de diferentes tamanhos. Foram realizadas preparações de magnetitas em 04 diferentes temperaturas, 300, 400, 500 e 600°C. Os ensaios de citotoxicidade sobre hemácias humanas (hematócrito 5%) foram realizados pela medida da intensidade de hemólise (leitura da hemoglobina livre em 540nm) ou pela liberação de K⁺ (análise por eletrodo íon seletivo) na ausência ou presença de diferentes concentrações de magnetitas, incubadas por 24 horas a 37°C. Os ensaios foram realizados em tampão fosfato de sódio com NaCl 0,85%, e analisados os sobrenadantes após centrifugação a 1000 g a 4°C por 5 minutos.

Resultados

Através da difração de raios-X e microscopia eletrônica de varredura e transmissão pode-se comprovar a obtenção de magnetitas com diâmetro inferior a 30nm para todas as temperaturas testadas. As análises de citotoxicidade revelaram que as magnetitas não apresentam efeito citotóxico sobre as hemácias, pois os tubos testes (com magnetita) apresentaram valores semelhantes de hemoglobina livre e K⁺ comparadas ao controle.

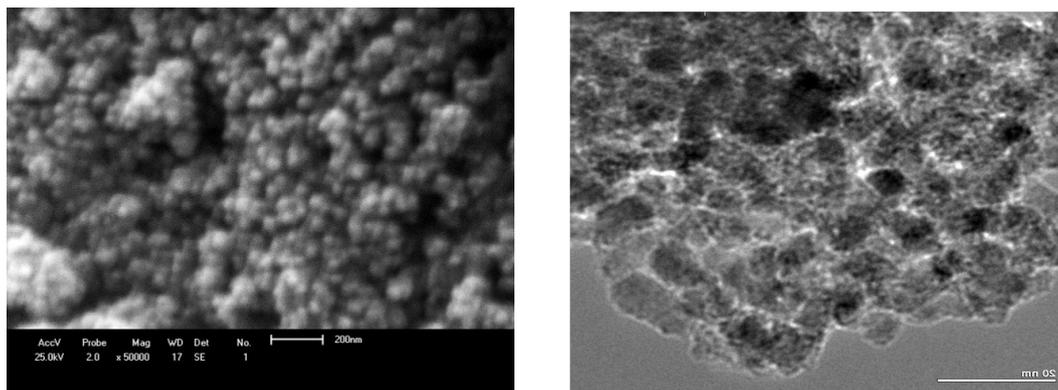


Fig. 1. Microscopia eletrônica de varredura da magnetita a 300°C e de transmissão a 500°C.

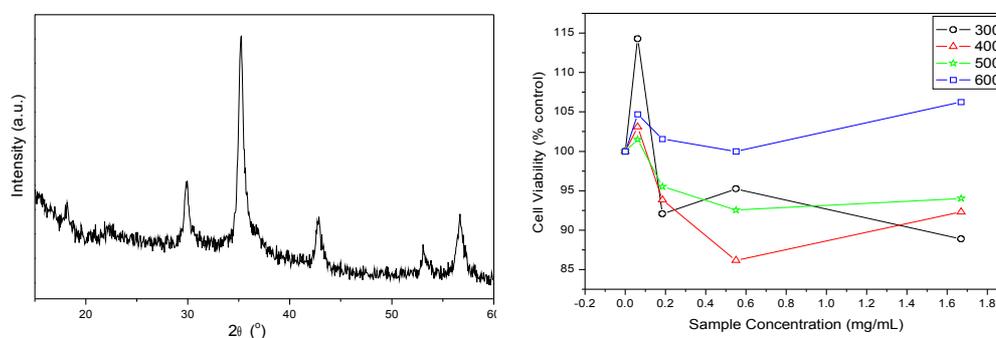


Fig.2. Difração de raio-X da magnetita a 300°C, representativo para as demais magnetitas e teste de citotoxicidade sobre eritrócitos.

Conclusão

Frente aos resultados obtidos pelos experimentos realizados pode-se concluir que foi possível a síntese de nanopartículas magnéticas por um método econômico, que garante a estabilidade e diâmetro pequeno, características compatíveis para a sua aplicação em sistemas biológicos, bem como a sua possível aplicação devido a ausência de citotoxicidade sobre hemácias.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelo financiamento com a bolsa de estudos.

5. OUTROS RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA *IN VITRO* SOBRE LEUCÓCITOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)

Foram coletados 5mL de sangue total, por punção venosa, de três indivíduos voluntários sadios acima de 18 anos. O sangue coletado foi colocado em tubo de ensaio estéril contendo 10 μ L de heparina e misturado a 2 mL de uma solução de dextran 1,5%. Esta mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente por uma hora. Após, retirou-se o plasma rico em LPMN e transferindo-o para tubos plásticos estéreis sendo centrifugado por 5 minutos a 2500 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet de células duas vezes com tampão PBS-Dulbecco e sendo novamente centrifugado por 5 minutos a 2500 rpm. As células foram ressuspensas em aproximadamente 3,5mL de tampão PBS-Dulbecco com Ca²⁺ e contadas em câmara de Neubauer (BACH *et al*, 2006).

O efeito das magnetitas sobre LPMN foi realizado através do teste de exclusão pelo Azul de Trypan, onde as células viáveis não incorporam o corante, apresentando-se brilhantes quando observadas em microscópio óptico, em câmara de Neubauer. Os LPMN (1x10⁶ células/mL) foram incubados em PBS-Dulbecco na ausência ou presença de várias concentrações de magnetitas, por três horas a 37°C. Após incubação, essa suspensão foi misturada e homogeneizada por 5 minutos com uma solução de azul de Trypan 0,5%, na proporção 1:1. As células foram observadas em microscópio e contadas como coradas ou não coradas em câmara de Neubauer e a partir das células mortas foi calculada a porcentagem (PHILLIPS, 1973). O controle foi o mesmo número de células ressuspensas em PBS-Dulbecco.

O efeito das nanopartículas de magnetitas sobre leucócitos PMN foi analisada pela incorporação do Azul de Trypan, onde a incorporação das células por este corante confere a morte celular. No teste com as nanopartículas de magnetita observou-se viabilidade celular acima de 95% para os PMN, ou seja, nesse ensaio, as magnetitas não apresentaram efeitos sobre a integridade celular do PMN.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Neste estudo foram apresentados os resultados dos estudos estruturais, microestrutural, magnético e biológico de nanopartículas de magnetita obtidas a partir de um método fácil, simples e econômico de síntese em larga escala, baseado na decomposição térmica de uma mistura de nitrato férrico e etilenoglicol. Baseado nos resultados de difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão pode-se confirmar a obtenção de nanopartículas de magnetita esféricas com diâmetro menor que 30nm com controle do tamanho de distribuição. A análise dos dados cristalográficos revelou a estrutura de espinélio invertido em todos os casos e as medições de magnetização mostraram comportamento superparamagnético das nanopartículas.

Nos estudos de citotoxicidade sobre hemácias e leucócitos PMN não houve efeito tóxico por parte das magnetitas, comparados com valores de amostra controle. Então, pode-se concluir que nanopartículas de magnetita não possuem efeito citotóxico sobre células humanas.

Os resultados obtidos indicam que as nanopartículas de magnetitas obtidas podem ser um modelo de carreador de fármacos e que despertam o interesse para novas pesquisas em outras aplicações, como, separação de DNA, liberação sítio-específica, tratamento de câncer via hipertermia e diagnóstico por imagem em ressonância magnética. Além disso, esta nova rota de síntese de nanopartículas de magnetitas simplifica e reduz custos de produção, proporcionando o acesso a medicamentos que utilizam estas nanopartículas como carreadoras.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFAYA, A.A.S.; KUBOTA, L.T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Quim. Nova**. 25 (2002) 835-841.

ALI, I.; NASEEM, I. Hemolysis of human red blood cells by combination of riboflavin and aminophylline. **Life Sciences**. 70 (2002) 2013–2022.

AQUINO, E.N. **Análise proteômica comparativa entre neutrófilos quiescentes e estimulados com fator de agregação plaquetária (PAF)**. Dissertação (Pós-Graduação em Patologia Molecular). Universidade de Brasília, 2008.

ASMATULU, R.; ZALICH, M.A.; CLAUS, R.O.; RIFFLE, J.S. Synthesis, characterization and targeting of biodegradable magnetic nanocomposite particles by external magnetic fields. **J. Magn. Magn. Mater.** 292 (2005) 108–119.

BACH, J.P.; BORTA, H.; ACKERMANN, W.; FAUST, F.; BORCHERS, O.; SCHRADER, M. The Secretory Granule Protein Syncollin Localizes to HL-60 Cells and Neutrophils. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 54 (2006) 877-888.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K.I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**. 174 (2008) 134–139.

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

BRAZEL, C.S. Magnetothermally-responsive nanomaterials: combining magnetic nanostructures and thermally-sensitive polymers for triggered drug release. **Pharmaceutical Research**. 26 (2009).

CHAVES, M.A.F. **Ação antioxidante das vitaminas C e E no processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de hemoglobina S.** Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, 2007.

CHENG, F.Y.; SU, C.H.; YANG, Y.S.; YEH, C.S.; TSAI, C.Y.; WU, C.L. Wu; *et al.* Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. **Biomaterials** 26 (2005) 729–738.

CORRÊA, F.A.P. **Avaliação da biocompatibilidade de fluido magnético à base de nanopartículas de maghemita recobertas por polifosfato em camundongos.** Dissertação (Pós-Graduação em Patologia Molecular). Universidade de Brasília, 2007.

DUARTE, L.C.; JUCHEM, P.L.; PULZ, G.M.; BRUM, T.M.M.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A.C.; ACAUAN, R.B. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: exemplos brasileiros. **Pesquisas em Geociências** 30 (2003) 3-15.

ELIAS, A.; TSOURKAS, A. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. **Hematology**, 2009.

ESTEVANATO, L.L.C. **Investigação da biocompatibilidade de polímeros de albumina magnéticos em camundongos.** Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Animal). Universidade de Brasília, 2008.

FABIAN, F.A. **Síntese e caracterização de nanopartículas de maghemita suspensas em NaOH à 10% e HCl.** Monografia (Departamento de Física). Universidade Federal de Rondônia, 2009.

FAN, C.; GAO, W.; CHEN, Z.; FAN, H.; LI, M.; DENG, F.; CHEN, Z. Tumor selectivity of stealth multi-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics** 404 (2011) 180–190.

FERNANDES, M.T.C.; KAWACHI, E.Y. Influência da quantidade de amônio na síntese de nanopartículas de óxido de ferro por microemulsão. **Quim. Nova.** 33 (2010) 1242-1246.

FERRARI, M. **Multifunctional pharmaceutical nanocarriers.** Springer, Boston, 2008.

GAMARRA, L.F.; BRITO, G.E.S.; PONTUSCHKA, W.M.; AMARO, E.; PARMA, A.H.C.; GOYA, G.F. Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for contrast agents: a structural and magnetic study. **J. Magn. Magn. Mater.** 289 (2005), 439–441.

GOYA, G.F.; GRAZU, M.R.; IBARRA. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. **Current Nanoscience.** 4 (2008) 1-16.

GUO, S.; LI, D.; ZHANG, L.; LI, J.; WANG, E. Monodisperse mesoporous superparamagnetic single-crystal magnetite particles for drug delivery. **Biomaterials.** 30 (2009) 1881-1889.

GUPTA, A.K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials** 26 (2005) 3995–4021.

GUPTA; R.B.; KOMPELLA, U.B. **Nanoparticle technology for drug delivery.** Taylor & Francis Group, New York, 2006.

HAFELI, O.; CHASTELLAIN, M. **Nanoparticulates as drug carriers.** Imperial College Press, Londres, 2006.

HAPNER, C.D.; DEUSTER, P.; CHEN, Y. Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. **Chemico-Biological Interactions.** 186 (2010) 275-279.

HILDEBRANDT, B.; WUST, P.; AHLERS, O.; DIEING, A.; SREENIVASA, G.; KERNER, T.; FELIX, R.; RIESS, H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 43 (2002).

HOLLAND, H.; YAMAMURA, M. **Adsorção de íons urânio em nanopartículas de magnetita**. Associação Brasileira De Energia Nuclear: Rio de Janeiro (2009).

HU, F.; LI, Z.; TU, C.; GAO, M. Preparation of magnetite nanocrystals with surface reactive moieties by one-pot reaction. **J. Colloid Interface Sci.** 311 (2007) 469–474.

JUN, Y.W.; HUH, Y.M.; CHOI, J.S.; LEE, J.H.; SONG, H.T.; KIM, S.; *et al.* Nanoscale size effect of magnetic nanocrystals and their utilization for câncer diagnosis via magnetic resonance imaging. **J. Am. Chem. Soc.** 127 (2005) 5732–5733.

KIM, D.K.; MIKHAYLOVA, M.; WANG, F.H.; KEHT, J.; BJELKE, B.; ZHANG, Y.; *et al.* Magnetic core-bilayer shell nanoparticle: A novel vehicle for entrapment of poorly water-soluble drugs. **Chem. Mater.** 15 (2003) 4343–4351.

KOHLER, N.; SUN, C.; WANG, J.; ZHANG, M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. **Langmuir** 21 (2005) 8858–8864.

LAWACZECK, R.; MENZEL, M.; PIETSCH, H. Superparamagnetic iron oxide particles contrast media for magnetic resonance imaging. **Appl. Organomet. Chem.** 18 (2004) 506–513.

LEAL, R. **Estudo da magnetita como material adsorvedor de íons urânio**. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares - "Autarquia associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

LIBERTI, P.A.; RAO, C.G.; TERSTAPPEN, L.W.M.M. Optimization of ferrofluids and protocols for the enrichment of breast tumor cells in blood. **J. Magn. Magn. Mater.** 225 (2001) 301–307.

MAHMOUDI, M.; SANT, S.; WANG, B.; LAURENT, S.; SEN, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. (2011).

MEENACH, S.A.; HILT, J.Z.; ANDERSON, K.W. Poly(ethylene glycol)-based magnetic hydrogel nanocomposites for hyperthermia cancer therapy. **Acta Biomaterialia**. (2009).

MENEZES, J.C.A. **Obtenção de nanopartículas de níquel via processo aquoso e sua aplicação na metalização de fibras naturais**. Tese (Pós Graduação em Física). Universidade Federal de Sergipe, 2010.

MULLER, R.H.; MAABEN, S.; WEYHERS, H.; SPECHT, F.; LUCKS, J.S. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. 138 (1996) 85-94.

NETO, M.B. **Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol**. Dissertação (Pós Graduação em Genética e Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

NIGAM, S.; BARICK, K.C.; BAHADUR, D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 323 (2011) 237–243.

PANKHURST, Q.A.; CONNOLLY, J.; JONES, S.K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J. Phys. D**. 36 (2003) 167-181.

PHILIPS, H. J. **Dye exclusion tests for cell viability**. In: **Tissue culture methods**, (Ed. Kruse, P.F., Patterson, M.K.). New York, 1973.

QUINTÃO, C.C.R. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e citotoxicidade de substâncias naturais frente a microrganismos causadores de mastite bovina**. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal Juiz de Fora, 2009.

ROGER, J.; PONS, J.N.; MASSART, R.; HALBREICH, A.; BACRI, J.C. Some biomedical applications of ferrofluids. **Eur. Phys. J. Appl. Phys.** 5 (1999) 321–325.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research.** Vol. 6 (2003) 317-320.

ROSHAN, A.H.; VAEZI, M.R.; SHOKUHFAR, A.; RAJABALI, Z. Synthesis of iron oxide nanoparticles via sonochemical method and their characterization. **Particuology.** (2010).

SANTANA, G.P.; RAMOS, A.M. Uma estratégia adaptada para síntese de magnetita. **Quim. Nova.** 31 (2008) 430-432.

SANTOS, D.B. **Avaliação dos efeitos de compostos orgânicos de selênio e de telúrio sobre a integridade estrutural e funcional de células sanguíneas humanas.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica). Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova.** 26 (2003).

SCHETTINO JUNIOR, M.A. **Obtenção e caracterização de nanopartículas Magnéticas inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Física). Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

SCHWEIGER, C.; PIETZONKA, C.; HEVERHAGEN, J.; KISSEL, T. Novel magnetic iron oxide nanoparticles coated with poly(ethylene imine)-g-poly(ethylene glycol) for potential biomedical application: synthesis, stability, cytotoxicity and MR imaging. **International Journal of Pharmaceutics.** (2010).

SETTLE, F.A. **Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry**. Prentice Hall PTR, New Jersey, 1997.

SILVA, B. G. **Quantificação de apoptose e necrose mediante corantes fluorescentes e análise de imagens no cultivo de células de inseto: o caso da *Drosophila melanogaster* S2**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, 2007.

SOARES, B.M.C.; SARON, E.S. Microanálise elementar de materiais: aplicações do sistema MEV-EDX. **ITAL**. 22 (2010).

SONVICO, F.; MORNET, S.; VASSEUR, S.; DUBERNET, C.; JAILLARD, D.; DEGROUARD, J. *et al.* Folate-conjugated iron oxide physicochemical characterization and *in vitro* experiments. **Bioconjugate Chem.** 16 (2005) 1181–1188.

TAN, S.T.; WENDORFF, J.H.; PIETZONKA, C.; JIA, Z.H.; WANG, G.Q. Biocompatible and biodegradable polymer nanofibers displaying superparamagnetic properties. **Chem. Phys. Chem.** 6 (2005) 1461–1465.

TAVEIRA, S.F. **Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK.Y **Nanoparticulate drug delivery systems**. Informa Healthcare, New York, 2007.

TRAN, L.D.; HOANG, N.M.T.; MAI, T.T.; TRAN, H.V.; NGUYEN, N.T.; TRAN, T.D.; DO, M.H.; NGUYEN, Q.T.; PHAM, D.G.; HA, T.P.; LE, H.V.; NGUYEN, P.X. Nanosized magnetofluorescent Fe₃O₄-curcumin conjugate for multimodal monitoring and drug targeting. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**. 371 (2010) 104–112.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. 3 (2006) 93-98.

VENANCIO, V.S. **Caracterização de filmes de carbono do tipo diamante para aplicações biomédicas**. Tese (Ciências em Engenharia Metalúrgica e de Materiais). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

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

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y. Protection of wheat bran feruloyl oligosaccharides against free radical-induced oxidative damage in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**. 47 (2009) 1591–1599.

YANG, J.; PARK, S.B.; YOON, H.G.; HUH, Y.M.; HAAM, S. Preparation of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. **International Journal of Pharmaceutics**. 324 (2006) 185-190.

ZHANG, J.L.; SRIVASTAVA, R.S.; MISRA, R.D.K. Core-shell magnetite nanoparticles surface encapsulated with smart stimuli-responsive polymer: synthesis, characterization, and LCST of viable drug-targeting delivery system. **Langmuir**. 23 (2007) 6342–6351.

ZHANG, Y.; ZHANG, J. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells **J.Colloid Interface Sci**. 283 (2005) 352–357.