



POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO
SOBRE A REPOLARIZAÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS

Tayna Ferreira da Cunha Pariz

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Marcel Guimarães Martins

Sara Gemini Piperni

Rio de Janeiro

Agosto de 2024

POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO
SOBRE A REPOLARIZAÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS

Tayna Ferreira da Cunha Pariz

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Marcel Guimarães Martins, D.Sc.

Prof. Tito Livio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. Helvécio Vinícius Antunes Rocha, D.Sc.

Prof^a. Paula Cristina de Souza Souto, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

AGOSTO DE 2024

Pariz, Tayna Ferreira da Cunha

Potencial de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sobre a repolarização pró-inflamatória de macrófagos / Tayna Ferreira da Cunha Pariz – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2024.

XXV, 140 f.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz, Marcel Guimarães Martins e Sara Gemini Piperni.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2024.

Referências Bibliográficas: p. 109-122.

1. Repolarização pró-inflamatória de macrófagos. 2. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. 3. Potencial eletrocinético. I. Ferraz, Helen Conceição *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

A Deus, de quem recebi a inspiração e capacidade essenciais para realização deste
trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu satisfação e pleno sentido de existência. Agradeço a Ele pela renovação da minha mente em Cristo, que me permitiu ressignificar os propósitos de vida, incluindo o presente trabalho, para algo que não está restrito ao tempo e minhas limitações.

Ao meu esposo, Roberto Matheus, por todo cuidado e dedicação diários. Seu carinho e encorajamento foram fundamentais para renovar as energias, alimentar a persistência e relembrar as motivações.

Aos meus pais, Ricardo e Magda, que, apesar da distância, se fizeram presentes em mais esta etapa de vida. Vocês são verdadeiros exemplos de amor incondicional.

Aos meus amados familiares e amigos por todo incentivo e preocupação. Cada um de vocês, à própria forma, me acrescentou força durante a execução deste trabalho.

Aos meus orientadores por todo apoio e atenção dispendidos. A dedicação e prontidão de vocês em cada necessidade ficaram de modelo para minha caminhada profissional. Agradeço a vocês, em especial, pela compreensão em cada fase vivenciada ao longo desses anos de projeto.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), ao Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE) e aos laboratórios que me permitiram a execução de cada etapa deste trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro.

“O sucesso, como a felicidade, não pode ser perseguido; ele deve acontecer, e só tem lugar como efeito colateral de uma dedicação pessoal a uma causa maior que a própria pessoa.”

Vitor Frankl

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

POTENCIAL DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO SOBRE A REPOLARIZAÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS

Tayna Ferreira da Cunha Pariz

Agosto/2024

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Marcel Guimarães Martins

Sara Gemini Piperni

Programa: Engenharia Química

O emprego de nanossistemas magnéticos de óxido de ferro para repolarização pró-inflamatória de macrófagos é uma das estratégias emergentes para o tratamento de câncer de pulmão. Tal abordagem revelou efeito antitumoral e redução de fenômenos adversos comumente relatados para terapias convencionais. Com esta perspectiva, o presente trabalho desenvolveu nanossistemas magnéticos de óxido de ferro com diferentes potenciais eletrocinéticos (positivo ou negativo), visando avaliação do potencial dos nanomateriais na repolarização pró-inflamatória de macrófagos. Os nanomateriais de partida foram nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM), as quais foram preparadas pelo método químico de co-precipitação e apresentaram diâmetro médio de cristalito de 20,8 nm, diâmetro de partícula (D_{MET}) de 22,66 nm, estrutura cristalina compatível com a da magnetita, valor de magnetização de saturação de $70,5 \text{ emug}^{-1}$ e potencial eletrocinético negativo (-17,35 mV) no pH correspondente ao tumoral (6,8). Para o desenvolvimento dos nanossistemas com potencial eletrocinético positivo, as NPM foram modificadas por recobrimento com sílica e/ou funcionalização com aminosilano. Dentre os nanomateriais com carga positiva, as NPM funcionalizadas duas vezes com aminosilano (NPM_NH₂_50%H₂O_R) exibiram diâmetro de partícula (D_{MET}) de 24,05 nm, deslocamento do ponto isoelétrico para maiores valores de pH e potencial eletrocinético de + 14,86 mV (pH 6,8). Portanto, as NPM_NH₂_50%H₂O_R foram selecionadas, juntamente com as NPM, para os ensaios biológicos. Ambos os nanossistemas provocaram a manutenção dos macrófagos M1 e a conversão do fenótipo M2 para M1, comprovando o potencial destes na repolarização pró-inflamatória de macrófagos.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

THE POTENTIAL OF MAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES IN INDUCING PRO-INFLAMMATORY REPOLARIZATION OF MACROPHAGES

Tayna Ferreira da Cunha Pariz

August/2024

Advisors: Helen Conceição Ferraz

Marcel Guimarães Martins

Sara Gemini Piperni

Department: Chemical Engineering

The use of magnetic iron oxide nanosystems for pro-inflammatory repolarization of macrophages is one of the emerging strategies for lung cancer treatment. This approach has demonstrated antitumor effects and a reduction in adverse phenomena commonly reported in conventional therapies. With this perspective, the present work developed magnetic iron oxide nanosystems with different electrokinetic potentials (positive or negative), aiming to evaluate the potential of these nanomaterials in the pro-inflammatory repolarization of macrophages. The starting nanomaterials were magnetic iron oxide nanoparticles (MNPs), which were prepared by the chemical co-precipitation method. These nanoparticles exhibited an average crystallite diameter of 20.8 nm, a particle diameter (DMET) of 22.66 nm, a crystalline structure compatible with magnetite, a saturation magnetization value of 70.5 emug^{-1} , and a negative electrokinetic potential (-17.35 mV) at a pH corresponding to the tumor microenvironment (6.8). To develop nanosystems with a positive electrokinetic potential, the MNPs were modified by coating with silica and/or functionalization with aminosilane. Among the positively charged nanomaterials, the MNPs functionalized twice with aminosilane (NPM_NH₂_50%H₂O_R) exhibited a particle diameter (DMET) of 24.05 nm, an isoelectric point shift to higher pH values, an electrokinetic potential of +14.86 mV (pH 6.8). Therefore, NPM_NH₂_50%H₂O_R was selected, along with the MNPs, for biological assays. Both nanosystems induced the maintenance of M1 macrophages and the shift of the M2 phenotype to M1, confirming their potential in the pro-inflammatory repolarization of macrophages.

SUMÁRIO

I. Introdução	1
1.1. Estrutura da dissertação	1
1.2. Estado da Arte	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo Geral	5
1.3.2. Objetivos Específicos	5
II. Fundamentação Teórica e Revisão da Literatura.....	6
2.1. Câncer de pulmão e abordagens terapêuticas	6
2.1.1. Câncer de pulmão.....	6
2.1.2. Terapias convencionais	10
2.1.3. Terapias emergentes.....	14
2.1.4. Terapia com Macrófagos	22
2.1.5. Repolarização de Macrófagos.....	27
2.2. Nanossistemas para repolarização de macrófagos	29
2.2.1. Revisão de nanossistemas repolarizadores de macrófagos	29
2.2.2. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	34
2.2.3. Potencial eletrocinético.....	39
2.2.3. Modificação de superfície de nanopartículas	44
2.2.4. Estratégias para conferir potencial eletrocinético positivo por adição de silanos	47
III. Materiais e Métodos.....	53
3.1. Obtenção dos nanossistemas.....	53
3.1.1. Síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM)	54

3.1.2.	Recobrimento das NPM com sílica	58
3.1.3.	Funcionalização das NPM com grupo amino.....	59
3.2.	Caracterizações	61
3.2.1.	Difração de raios X (DRX).....	62
3.2.2.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	63
3.2.3.	Espalhamento dinâmico de luz e dispersão de luz eletroforética ..	63
3.2.4.	Magnetometria (MxH)	64
3.2.5.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 64	
3.2.6.	Análise elementar (CHN).....	64
3.3.	Ensaio biológico	65
3.3.1.	Obtenção dos monócitos.....	65
3.3.2.	Diferenciação dos macrófagos em M1 e M2.....	65
3.3.3.	Exposição dos macrófagos aos nanossistemas	66
3.3.4.	Imunofluorescência	66
IV.	Resultados e Discussões	67
4.1.	Nanopartículas magnéticas (NPM)	67
4.1.1.	Caracterização estrutural, morfológica e magnética	67
4.1.2.	Composição química	71
4.1.3.	Propriedades coloidais	72
4.2.	Recobrimento com sílica (NPM@SiO ₂)	76
4.3.	Funcionalização da NPM (NPM-NH ₂)	82
4.4.	Funcionalização da NPM recoberta com sílica (NPM@SiO ₂ -NH ₂)	87
4.5.	Seleção dos nanossistemas.....	94
4.5.	Ensaio biológico	99
4.5.1.	Comparação dos nanossistemas em meio biológico	99

4.5.2. Viabilidade celular	101
4.5.3. Repolarização de macrófagos.....	102
V. Conclusões	105
VI. Propostas Futuras	106
Apêndice	107
Referências Bibliográficas.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1 Classificação do câncer de pulmão.	7
Figura II.2 Evolução das terapias para o câncer de pulmão ao longo do tempo.	14
Figura II.3 Esquema ilustrativo do índice terapêutico obtido pela razão entre a concentração eficaz mínima (CEM50) e a concentração tóxica mínima (CTM50).	15
Figura II.4 (a) Ligação entre as proteínas PD-1 e PD-L1 e consequente supressão da ativação imunológica (b) Bloqueio da via de checkpoint e restauração da resposta imune por meio da ligação das proteínas PD-1 e PD-L1 com seus respectivos ICIs específicos.	20
Figura II.5 Polarização do macrófago nos fenótipos M1 e M2.	23
Figura II.6 Abordagens terapêuticas de controle do estado de polarização dos macrófagos.	25
Figura II.7 Interconversão entre macrófagos M1 e M2. Receptores de membrana, fatores de transcrição e vias de sinalização envolvidos na polarização de macrófagos.	27
Figura II.8 Número de documentos publicados em nível global referentes às nanopartículas repolarizadoras de macrófagos para tratamento de câncer.	30
Figura II.9 Estrutura cristalina da magnetita.	35
Figura II.10 Ilustração da formação de (a) multidomínios magnéticos e histerese no caso dos materiais ferrimagnéticos e (b) região monodomínio e ausência de histerese nos materiais superparamagnético.	36
Figura II.11 Diagrama de LaMer para o modelo de nucleação e crescimento de nanopartículas.	38
Figura II.12 Diagrama representativo das camadas elétricas ao redor da partícula negativamente carregada e os respectivos potenciais elétricos.	39
Figura II.13 Perfil de potencial zeta de um óxido metálico em função do pH do meio.	42
Figura II.14 Diagrama de perfil de potencial zeta em função do pH do meio.	44
Figura II.15 Principais nanossistemas empregados em terapia e diagnóstico de câncer.	45
Figura II.16 Ilustração esquemática das principais modificações feitas na superfície das NPM.	46
Figura II.17 Resumo das etapas de funcionalização das NPM com grupos amino pelo procedimento de silanização em meio aquoso.	48

Figura II.18 Possíveis rotas de sinalização das NPM em meio aquoso contendo (3-Aminopropil)trietoxissilano (APTES).	49
Figura II.19 Representação do mecanismo de reação das NPM com o aminossilano em meio anidro, sendo R = CH ₃ ou CH ₂ CH ₃	50
Figura II.20 Representação das etapas do mecanismo de recobrimento da superfície das nanopartículas de magnetita com sílica.	52
Figura III.1 Esquema dos 13 nanossistemas magnéticos de óxido de ferro a serem desenvolvidos.	53
Figura III. 2 Aparato experimental utilizado na síntese das nanopartículas.	55
Figura III.3 Resumo esquemático da síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM) por co-precipitação química.	56
Figura III. 4 Etapas do procedimento de recobrimento das NPM pelo método de Stober modificado.	58
Figura III.5 Etapas do procedimento de funcionalização das NPM pelo método de silanização.	60
Figura IV.1 Difratoograma obtido para a amostra de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sintetizadas e o padrão de picos de difração da magnetita identificados com os respectivos planos cristalográficos (JCPDS N° 89-4319). 67	67
Figura IV.2 Transição da coloração do meio reacional após o ajuste do pH para 10... 68	68
Figura IV.3 Imagens de MET obtidas com menor (A) e maior (B) magnificação para a amostra de NPM.	69
Figura IV.4 Curva de magnetização em função do campo magnético aplicado na temperatura fixa de 300 K para a amostra de NPM.	70
Figura IV.5 Espectro de FTIR obtido para a amostra de NPM.	71
Figura IV.6 Representação do diâmetro hidrodinâmico de uma partícula dispersa em um meio qualquer.	72
Figura IV.7 Curvas de distribuição de tamanho hidrodinâmico da amostra de NPM dispersa em água deionizada.	73
Figura IV.8 Curva de potencial zeta em função do pH do meio obtida para as NPM dispersas em solução aquosa de KCl 1mM.	74
Figura IV.9 Difratoogramas obtidos para as amostras de NPM@SiO ₂ _100, NPM@SiO ₂ _300 e NPM@SiO ₂ _500.	76
Figura IV.10 Imagens de MET das amostras de NPM@SiO ₂	78
Figura IV.11 Mapas elementares obtidos por EDS para as amostras de NPM@SiO ₂ . 79	79
Figura IV.12 Espectros de FTIR das amostras de NPM@SiO ₂	80

Figura IV.13 Curvas de potencial zeta em função do pH do meio obtidas para as amostras de NPM e NPM@SiO ₂ dispersas em solução aquosa de KCl 1mM.	81
Figura IV.14 Espectros de FTIR das amostras de NPM_NH ₂ _2%H ₂ O e NPM_NH ₂ _50%H ₂ O comparados com o de NPM.	82
Figura IV.15 Curva de potencial zeta das amostras de NPM, NPM_NH ₂ _2%H ₂ O e NPM_NH ₂ _50%H ₂ O dispersas em solução de KCl 1 mM.	84
Figura IV.16 Curva de potencial zeta em função do pH do meio obtida para a amostra de NPM_NH ₂ _50%H ₂ O_R dispersas em solução de KCl 1 mM e comparação com as curvas de potencial zeta das amostras de NPM e NPM_NH ₂ _50%H ₂ O.	85
Figura IV.17 Espectro de FTIR da amostra de NPM_NH ₂ 50% H ₂ O comparado com os de NPM e NPM_NH ₂ 50% H ₂ O.	85
Figura IV.18 Espectros de FTIR (a) e curvas de potencial zeta em função do pH do meio (b) obtidos para as amostras de NPM@SiO ₂ _100, NPM@SiO ₂ _100_NH ₂ e NPM@SiO ₂ _100_NH ₂ _R.	88
Figura IV.19 Espectros de FTIR (a) e curvas de potencial zeta em função do pH do meio (b) obtidos para a amostra de NPM@SiO ₂ _300, NPM@SiO ₂ _300_NH ₂ e NPM@SiO ₂ _300_NH ₂ _R.	90
Figura IV.20 Espectros de FTIR (a) e curvas de potencial zeta em função do pH do meio (b) obtidos para a amostra de NPM@SiO ₂ _500, NPM@SiO ₂ _500_NH ₂ e NPM@SiO ₂ _500_NH ₂ _R.	91
Figura IV.21 Imagens de MET com menor (A) e maior aproximação (B) obtidas para as amostras de NPM (-) e NPM_NH ₂ (+).	95
Figura IV.22 Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das amostras de NPM (-) e NPM_NH ₂ (+) dispersas em água deionizada.	96
Figura IV.23 Gráfico de magnetização em função do campo magnético aplicado na temperatura fixa de 300 K para as amostras de NPM (-) e NPM_NH ₂ (+).	97
Figura IV.24 Curvas de distribuição de tamanho hidrodinâmico das amostras de NPM (-) e NPM_NH ₂ (+) dispersas em meio sem SFB (A) e em meio contendo SFB (B).	99
Figura IV.25 Viabilidade celular dos macrófagos M0 após exposição aos nanossistemas puro e funcionalizado.	101
Figura IV.26 Micrografias dos macrófagos M0 após o ensaio de citotoxicidade dos nanossistemas selecionados (NPM(-) e NPM_NH ₂ (+)).	102
Figura IV.27 Imagens de microscopia de fluorescência obtidas para os macrófagos M1 (em verde) e M2 (em vermelho) expostos aos dois nanossistemas (NPM(-) e NPM_NH ₂ (+)) na concentração de 200 µg/mL.	103
Figura IV.28 Imagens de microscopia de fluorescência obtidas para os macrófagos M1 (em verde) e M2 (em vermelho) expostos aos dois nanossistemas (NPM(-) e NPM_NH ₂ (+)) na concentrações de 20 µg/mL., 90 µg/mL. e 200 µg/mL.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1 Estadiamento clínico do câncer de pulmão com base no sistema internacional TNM.	9
Tabela II.2. Terapias mais empregadas em cada estágio clínico do câncer de pulmão.	10
Tabela II.3. Principais Quimioterápicos aplicados no tratamento de câncer de pulmão.	12
Tabela II.4 Principais sistemas empregados como transportadores em terapia dirigida, exemplos, quimioterápicos comumente associados e efeitos observados com o uso de terapia dirigida.	17
Tabela II.5 Nanossistemas empregados na imunomodulação de macrófagos.	31
Tabela III. 1 Reagentes empregados na síntese das NPM.	55
Tabela III.2 Reagentes empregados no recobrimento das NPM.	58
Tabela III. 3 Reagentes empregados na funcionalização das NPM.	59
Tabela III.4 Técnicas de caracterização físico-química empregadas para os nanossistemas e objetivos da caracterização.	61
Tabela IV.1 Diâmetros médios de cristalito de NPM estimados para as amostras de NPM@SiO ₂	77
Tabela IV.2 Percentual mássico de Fe, O e Si presentes nas amostras de NPM e NPM@SiO ₂ estimados por EDS.	79
Tabela IV.3 Análise elementar de HCN das amostras de NPM antes e após a primeira e segunda etapa de funcionalização.	86
Tabela IV.4 Análise elementar de CHN das amostras de NPM@SiO ₂ antes e após a primeira e segunda etapa de funcionalização	92
Tabela IV.5 Potencial eletrocinético dos nanossistemas obtidos em pH 6,8.	94
Tabela IV.6 Diâmetro hidrodinâmico e PDI obtidos para as amostras de NPM (-) e NPM-NH ₂ (+) dispersas em água e meio de cultura sem e com SFB.	99

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AAT	antígeno associado ao tumor
AET	antígeno específico do tumor
CAA	célula apresentadora de antígeno
CAR-T	célula T com receptor de antígeno quimérico (<i>chimeric antigen receptor T cell</i>)
CCL2	ligante de quimiocina 2 (<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>)
CED	camada elétrica dupla
CEM	concentração eficaz mínima
CPCP	câncer de pulmão de células pequenas
CPCNP	câncer de pulmão de células não pequenas
CTM	concentração tóxica mínima
D_H	diâmetro hidrodinâmico
D_{MET}	diâmetro de partícula estimado por imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET)
DLE	dispersão de luz eletroforética
DRX	difração de raios X
EDL	espalhamento dinâmico de luz
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
FAR	receptor de ácido fólico (<i>folic acid receptor</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
H	campo magnético
HBV	vírus da hepatite B (<i>hepatitis B virus</i>)
Hc	campo coercivo
HPV	papiloma vírus humano

	<i>(human papilomavírus)</i>
ICI	inibidor de <i>checkpoint</i> imunológico
IL	interleucina
IT	índice terapêutico
k	constante de proporcionalidade
L_c	diâmetro médio do cristalito calculado em referência ao pico de maior intensidade
m	massa
M	magnetização
M_r	magnetização remanescente
M_{sat}	magnetização de saturação
MAT	microambiente tumoral
MHC	complexo principal de histocompatibilidade <i>(major histocompatibility complex)</i>
MET	microscopia eletrônica de transmissão
NPM	nanopartículas magnéticas de óxido de ferro
PD-1	proteína de morte celular programada 1 <i>(programmed cell death protein-1)</i>
PDL-1	ligante de morte celular programada 1 <i>(programmed cell death ligand 1)</i>
PI	ponto isoelétrico
PMAM	poli(amidoamina)
p/v	peso por volume
QT	quimioterapia
r _{cf}	força centrífuga relativa (<i>relative centrifugal force</i>)
RT	radioterapia
SFB	soro fetal bovino
TCA	transferência celular adotiva
TfR	receptor de transferrina <i>(transferrin receptor)</i>
Th-1	célula T auxiliar tipo 1 (pró-inflamatória)
Th-2	célula T auxiliar tipo 2 (anti-inflamatória)
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

TRC	receptor de célula T (<i>T- cell receptor</i>)
uPAR	receptor de superfície do ativador do plasminogênio uroquinase (<i>urokinase plasminogen activator surface receptor</i>)

I. Introdução

1.1. Estrutura da dissertação

A estrutura do presente trabalho está organizada em 6 capítulos: (I) introdução; (II) fundamentação teórica e revisão da literatura; (III) materiais e métodos; (IV) resultados e discussões; (V) conclusões e (VI) propostas futuras.

No Capítulo I, o estado da arte do estudo em questão é apresentado, sendo evidenciada a problemática em torno do câncer de pulmão e a transição das formas de tratamento atualmente empregadas. Neste sentido, aborda rapidamente o destaque da imunoterapia via repolarização de macrófagos frente às demais técnicas e a relevância das nanopartículas de magnetita com diferentes potenciais eletrocinéticos como agentes de repolarização. Ao final, traz a proposta do trabalho e elenca os objetivos a serem atingidos.

O Capítulo II tem por finalidade apresentar um panorama atualizado do câncer de pulmão, subclassificações, conceitos pertinentes e as principais estratégias terapêuticas empregadas atualmente. Além disso, pretende revelar os desafios, lacunas e oportunidades para desenvolvimento de novas tecnologias no campo da imunoterapia. Neste sentido, introduz a repolarização de macrófagos no elenco de terapias emergentes, destacando o potencial do fenômeno no combate ao câncer de pulmão. Dentro deste campo, apresenta os principais nanossistemas recentemente desenvolvidos e pontua a associação e relevância do potencial eletrocinético de nanopartículas de magnetita sobre a repolarização destas células.

No Capítulo III, são apresentados os nanossistemas magnéticos de óxido de ferro desenvolvidos e as técnicas de síntese e modificação de superfície adotadas. Além disso são apresentadas as metodologias de caracterização físico-química quanto às propriedades morfológicas, estruturais, de tamanho, magnéticas, elétricas e relativas à composição química dos diferentes nanomateriais obtidos. Ademais, apresenta os ensaios biológicos de obtenção de monócitos e diferenciação destes em macrófagos; exposição dos macrófagos com os nanossistemas pré-selecionados e, por fim, é feita a análise de imunofluorescência para investigar o potencial das nanopartículas magnéticas de óxido

de ferro, com diferentes potenciais eletrocinético, como agentes repolarizadores de macrófagos.

No Capítulo IV, são apresentados os resultados obtidos, bem como as discussões a respeito das análises físico-químicas e biológicas anteriormente descritas para as NPM pura e com superfície modificada.

Ao final do documento, nos Capítulos V e VI, são elucidadas as conclusões do presente estudo e apontadas as propostas para trabalhos futuros com base nos avanços realizados e oportunidades aqui identificadas.

1.2. Estado da Arte

O câncer se configura como uma das principais causas de morte prematura em nível global. Nas últimas décadas, dentre os tipos de câncer, o de pulmão apresentou as maiores taxas de incidência e mortalidade, representando, aproximadamente, 18% do total de mortes causadas por câncer. Além disso, a sobrevida média de pacientes, cinco anos após o diagnóstico, é estimada em apenas 21% (WHO, 2020).

A elevada letalidade da doença e o prognóstico desanimador não implicam investimentos expressivos. O número de óbitos atribuídos ao câncer de pulmão é superior aos decorrentes de câncer de mama, pâncreas e próstata juntos. No entanto, o financiamento em pesquisa por vida perdida e a quantidade de protocolos de diagnóstico e tratamento bem definidos são inferiores aos destinados para os outros três tipos de câncer (WHO, 2020).

A evolução das formas de tratamento ao longo dos anos demonstra uma substituição das terapias convencionais por estratégias terapêuticas mais eficazes baseadas em maior seletividade e minimização dos efeitos adversos (LCRF, 2021). Neste contexto, a imunoterapia via repolarização de macrófagos se destaca pela eficácia antitumoral aliada à minimização dos efeitos sistêmicos nocivos que comumente acompanham abordagens menos específicas (HAGEMANN *et al.*, 2008; BONAPACE *et al.*, 2014; NAM *et al.*, 2013).

A repolarização de macrófagos consiste na conversão do fenótipo de macrófagos M2 (forma anti-inflamatória) para M1 (forma pró-inflamatória). No contexto do câncer de pulmão, estima-se que 70% da população de macrófagos tumorais é atribuída à forma M2, sendo comprovada a forte correlação entre este tipo de macrófago e o pequeno tempo de sobrevida de pacientes diagnosticados (GENARD *et al.*, 2017).

Recentemente, foi evidenciado o potencial de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM) sobre a repolarização pró-inflamatória de macrófagos tumorais, sendo revelada a forte correlação deste fenômeno com a composição e potencial de superfície dos nanomateriais (ZHANG *et al.*, 2020).

Com esta perspectiva, o presente trabalho tem a proposta de desenvolver nanossistemas magnéticos imunoterapêuticos voltados para a repolarização de macrófagos. Para tal, foram desenvolvidos nanomateriais compostos por nanopartículas

magnéticas de óxido de ferro modificados com sílica e/ou funcionalizadas com aminossilano, de forma que apresentassem diferentes potenciais eletrocinéticos (positivo ou negativo) em pH correspondente ao do ambiente biológico tumoral (6,8) (HOSONUMA *et al.*, 2023). Então, foi investigado o efeito dos diferentes nanossistemas sobre a resposta imunológica de macrófagos, visando possível aplicação futura como imunoterapia de câncer de pulmão.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento de nanossistemas magnéticos de óxido de ferro com potenciais eletrocinéticos de polarizações opostas (negativo ou positivo) e validação como repolarizadores pró-inflamatórios de macrófagos, visando imunoterapia oncológica.

1.3.2. Objetivos Específicos

- 1) Obtenção de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com potencial eletrocinético negativo (em pH 6,8 – similar ao de ambiente tumoral), empregando o método de coprecipitação química;
- 2) Obtenção de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com potencial eletrocinético positivo (em pH 6,8 – similar ao de ambiente tumoral), utilizando estratégias de modificação de superfície (funcionalização e/ou recobrimento);
- 3) Avaliação das propriedades estruturais, morfológicas, magnéticas e eletrocinéticas dos nanossistemas obtidos;
- 4) Seleção dos nanossistemas que exibem, em pH correspondente ao tumoral (6,8), maiores potenciais eletrocinéticos em módulo;
- 5) Avaliação do efeito dos nanossistemas selecionados sobre a repolarização de macrófagos em ensaios *in vitro*.

II. Fundamentação Teórica e Revisão da Literatura

2.1. Câncer de pulmão e abordagens terapêuticas

2.1.1. Câncer de pulmão

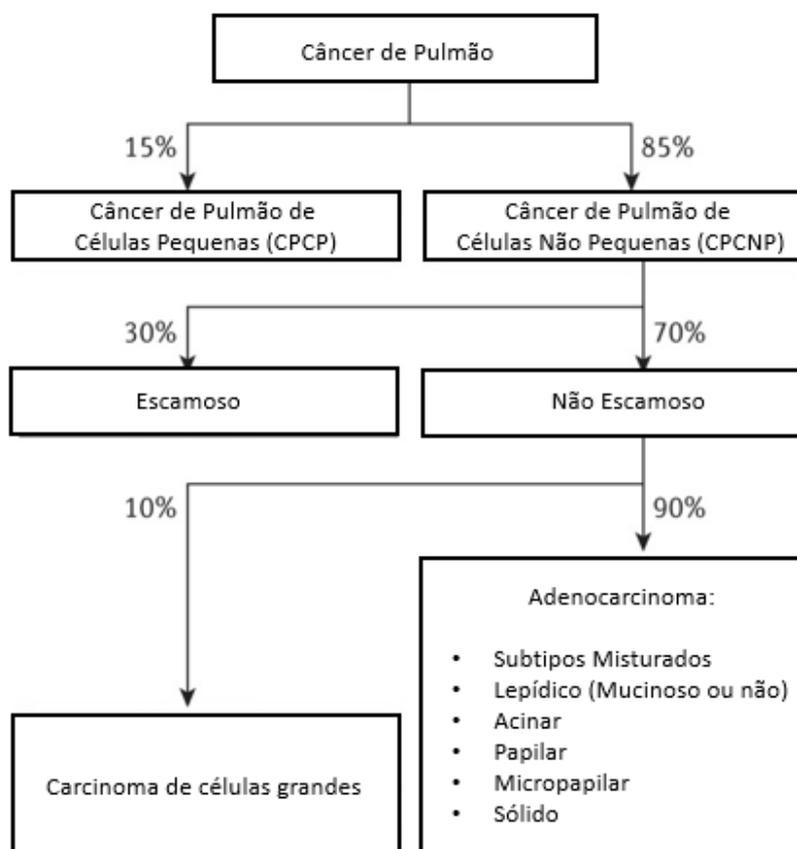
O câncer de pulmão apresenta, atualmente, a maior porcentagem (18%) do total de mortes causadas por câncer no mundo, segundo dados da Organização Mundial da Saúde. Frente aos novos casos diagnosticados, a doença corresponde a 11,4% do total de ocorrências, sendo inferior apenas ao câncer de mama (11,7%). No Brasil, houve 28.620 mortes ocasionadas pela doença em 2020 e estima-se 32.560 novos casos brasileiros para cada ano do triênio 2023-2025 (IARC, 2020; INCA, 2023). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença são o hábito de fumar e a exposição passiva ao fumo, o que aumenta o risco em 11 vezes e apresenta associação com 85% dos casos diagnosticados. O consumo de carnes processadas e bebidas alcoólicas, o sedentarismo, o contato com substâncias cancerígenas e a presença da doença no histórico familiar também constituem elementos que aumentam a probabilidade de um indivíduo desenvolver a doença (WCRF, 2023).

A exposição frequente e prolongada a diferentes tipos de agentes cancerígenos pode provocar alterações ou mutações no material genético das células, conduzindo ao processo de formação do câncer, oncogênese. A origem da doença está ligada à ocorrência de três etapas fundamentais: iniciação, promoção e progressão das células (SIDDIQUI *et al.*, 2015). Na iniciação, as células sofrem modificações genéticas irreversíveis causadas pela exposição a agentes cancerígenos químicos, físicos ou biológicos. Uma vez iniciadas, as células podem permanecer neste estágio pela ausência de estímulos de divisão ou serem convertidas em células pré-neoplásicas mediante o contato com agentes promotores, os quais podem ser exógenos, como infecções virais, ou endógenos, como hormônios sexuais (GALE, 2022). O processo de promoção não se caracteriza pela mudança na estrutura genética das células iniciadas, mas pela proliferação anormal e

seletiva destas, gerando o acúmulo de células pré-cancerígenas no organismo. Diferentemente das células saudáveis, as células iniciadas respondem de forma muito maior aos estímulos de proliferação, o que gera o aumento pronunciado de seus clones (SIDDIQUI *et al.*, 2015). Na última etapa, a de progressão, ocorre a conversão maligna das células pré-cancerosas por ocasião de mudanças genéticas e fenotípicas. Além disso, há a elevação do potencial de disseminação para outros tecidos, o desenvolvimento de tumor maligno e metástase da doença (INCA, 2022).

Com relação à classificação, o câncer de pulmão pode ser dividido em dois principais tipos: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP) e câncer de células não pequenas (CPCNP), sendo este último o tipo predominante, ocorrendo em 85% dos casos (Figura II.1). A distinção é feita com base no tipo de célula de origem, perfil de crescimento e espalhamento e estratégia de tratamento empregada (WANG, W. *et al.*, 2020).

Figura II.1 Classificação do câncer de pulmão.



Fonte: Adaptado de Gridelli *et al.*, 2015.

Para o tipo CPCNP, ainda existem 2 subclassificações histológicas¹ mais comuns, câncer escamoso e não escamoso, sendo este último subdividido em adenocarcinoma e câncer de células grandes. A origem do câncer escamoso se dá nas células achatadas dos pulmões, ao passo que no adenocarcinoma e no câncer de células grandes ocorre nos alvéolos e nas células grandes, respectivamente. Embora sejam originados em células distintas, pertencem ao mesmo subgrupo devido à semelhança de tratamento e tempo de vida após o diagnóstico (LARIONOVA *et al.*, 2020; ACS, 2019 a). O tipo CPCP representa, aproximadamente, 15% do total de casos diagnosticados e possui dois subtipos reconhecidos pela OMS, carcinoma de células tipo grão de areia e de células combinadas. É a forma de câncer de pulmão mais agressiva, apresentando alta taxa de crescimento e espalhamento em outros sítios do corpo (NCI, 2023 a).

O câncer de pulmão pode ser originado não apenas nas próprias células residentes (câncer primário), mas também pode receber metástase de tumores de outros órgãos (câncer secundário), por meio da corrente sanguínea ou sistema linfático. Diversos locais de câncer primário podem desenvolver metástase no pulmão. Estima-se que, do total de tumores malignos investigados, de 20 a 54% apresenta disseminação pulmonar, tornando o órgão o segundo alvo mais comum de metástase à distância (JAMIL *et al.*, 2023).

Além do conhecimento da origem e do tipo de câncer, a determinação da fase da doença, ou seja, do estadiamento, é de suma importância para a definição da estratégia terapêutica a ser empregada. Dependendo do estágio, o câncer pode estar restrito à região pulmonar ou ter se disseminado para outros locais do corpo (A. C. CAMARGO, 2023). No caso do tipo CPCP, o estágio pode ser limitado, quando o câncer acomete apenas um dos pulmões e pode afetar os gânglios linfáticos do mesmo lado do tórax, ou extenso, quando o câncer atinge, além do outro pulmão, os gânglios linfáticos do outro lado do tórax, o fluido ao redor dos pulmões e outros órgãos (A. C. CAMARGO, 2023). Para o tipo CPCNP, o estadiamento clínico é determinado de acordo com o sistema de estadiamento internacional TNM estabelecido pelo AJCC (do inglês, *American Joint Committee on Cancer*). O sistema TNM consiste em determinar a dimensão do tumor principal (T), o grau de disseminação para os linfonodos próximos (N) e da existência, ou não, de metástase (M) da doença (ACS, 2023 a). Para cada categoria determinada é feito o detalhamento da progressão da doença em níveis que variam de T0 a TIV, N0 a

¹ Histológica: relativa aos tecidos biológicos

NIII e M0 a MI nas categorias T, N e M, respectivamente, sendo que quanto maior o nível, maior a disseminação da doença. Com base nas categorias são definidos os diferentes estágios, como demonstra a Tabela II.1 (CRUK, 2023).

Tabela II.1 Estadiamento clínico do câncer de pulmão com base no sistema internacional TNM.

Estágio	Categoria TMN
0	Tis, N0, M0
I	T1-T2, N0, M0
II	T1-T3, N0-N1, M0
III	T1-T4, N0-N3, M0
IV	T1-T4, N0-N3, M1

Fonte: Autoria própria.

No estágio 0, a dimensão do tumor é menor ou igual a 3 cm e o desenvolvimento das células cancerígenas ocorre apenas na superfície do tecido. Neste caso, o câncer é dito como *in situ* (is), ou seja, está limitado ao local inicial de desenvolvimento e, por isso, T é Tis. N0 representa que os linfonodos não foram afetados e M0 indica ausência de metástase. Os demais estágios refletem níveis maiores de T e N, o que é coerente com o aumento do tumor e disseminação para os linfonodos. Contudo, apenas o último estágio, IV, indica a existência de metástase (NCI, 2023 b).

Informações similares de estadiamento definem critérios e perspectivas semelhantes de tratamento, embora a definição da melhor terapia e a indicação de prognóstico sejam dependentes de muitos fatores e relativos a cada organismo. Por isso, a compreensão da origem e do estágio clínico da doença aliadas aos exames complementares adequados para cada paciente são os pilares para a seleção da terapia ideal (ACS, 2019 b).

2.1.2. Terapias convencionais

Como visto no tópico anterior, o tratamento correto para o câncer de pulmão está intimamente relacionado com o estágio da doença. Para pacientes com câncer em fases iniciais, o objetivo do tratamento é alcançar a cura da doença. Por outro lado, se a doença está avançada, a terapia é pensada no sentido de melhora de sobrevida e alívio dos sintomas. A Tabela II.2 resume as principais terapias atualmente empregadas para o tipo CPCNP, forma predominante, de acordo com o estágio da doença (GADGEEL *et al.* 2012; NCI, 2023 b).

Tabela II.2. Terapias mais empregadas em cada estágio clínico do câncer de pulmão.

Estágio de CPCNP	Terapias convencionais
Estágio 0	Cirurgia e Terapias Endobrônquicas
Estágio I	Cirurgia, Radioterapia e Terapias Adjuvantes (pós-cirurgia)
Estágio II	Cirurgia, Radioterapia, Terapias Adjuvantes e Neoadjuvantes (pré-cirurgia)
Estágio III	Cirurgia, Radioterapia, Quimioterapia, Terapias Adjuvantes e Neoadjuvantes
Estágio IV	Quimioterapia e Terapias avançadas

Fonte: Adaptado de NCI, 2023 b

No início da doença, Estágio 0, o câncer ainda está limitado em extensão e, geralmente, a cirurgia de remoção é suficiente e a opção primária de tratamento. Existem 4 tipos de procedimento cirúrgico atualmente aplicados, a depender da região afetada pelo tumor e operabilidade do paciente, ou seja, da capacidade de tolerar a cirurgia: segmentectomia, ressecção em cunha, lobectomia e pneumonectomia (NCI, 2023 b). Na segmentectomia é feita a retirada parcial do lobo pulmonar. Este caso é recomendado para pacientes com tumores pequenos e condições de saúde não viáveis para o procedimento de remoção completa. Se o indivíduo tiver maior tolerância, o lobo inteiro de um pulmão é retirado (lobectomia), o que aumenta a probabilidade de cura. Em algumas situações é necessária a remoção do tecido pulmonar que contém o tumor e uma parte do tecido saudável (ressecção em cunha) ou até mesmo a retirada de um pulmão inteiro (pneumonectomia) (ACS, 2023 a.).

Quando o tratamento cirúrgico não é possível em estágio inicial, comumente são realizadas terapias endobrônquicas com o objetivo de desbloquear as vias aéreas afetadas pela doença e prevenir o surgimento de problemas respiratórios. Dentre as opções utilizadas, destacam-se a cirurgia a laser e a terapia fotodinâmica por apresentarem rápida remoção do bloqueio e redução da possibilidade de danos às células normais, respectivamente (CCS, 2023).

Na cirurgia a laser, ocorre a destruição das células cancerígenas por meio da aplicação de um feixe intenso de luz direcionado ao tumor. Na terapia fotodinâmica é empregado um medicamento que aumenta de forma seletiva a sensibilidade das células cancerígenas à luz. Neste caso, é feita a exposição das células a um laser de baixa intensidade com o auxílio de um broncoscópio, provocando uma reação química que causa a morte das células (SCARLATTA *et al.*, 2017).

As taxas de cura associadas às terapias endobrônquicas variam entre 43% e 97%. No entanto, o alto grau de recorrência do câncer, além dos efeitos colaterais, como infecção, dor, sangramento e colapso pulmonar, constituem empecilhos à implementação efetiva desse tipo de tratamento (CCS, 2023).

Nos estágios I e II, são exploradas as terapias adjuvantes para coibir a permanência de células cancerígenas no corpo e evitar, ao máximo, a reincidência do câncer após a realização de cirurgia. A radioterapia (RT) e quimioterapia (QT) são as principais formas de tratamento pós-cirúrgico atualmente aplicadas, bem como as primeiras opções para pacientes não aptos para as cirurgias de remoção (ZAPPA *et al.*, 2016; NCI, 2023 b).

A radioterapia consiste na aplicação de radiação de alta energia (raios X) na área a ser tratada para danificar ou destruir as células cancerígenas. É utilizada no tratamento de tumores não ressecáveis - que não podem ser removidos por cirurgia – e na prevenção da recidiva² do câncer, principalmente, quando, após a cirurgia, é observada a existência de tumor residual ou de outras partes ainda comprometidas pela doença (CARVALHO *et al.*, 2002). A RT é empregada no intuito de aumentar o controle sobre a região afetada e prevenir a recorrência e metástase do câncer, sendo utilizada, em alguns casos, de forma conjunta com a QT como terapia auxiliar de tratamento. Além disso, também é aplicada para alívio de sintomas que surgem em decorrência do avanço da doença (ACS, 2023 b).

² Recidiva: retorno de atividade detectável da doença.

Dentre as técnicas convencionais de RT, as principais são a radioterapia por feixe externo, na qual uma radiação externa em alta dosagem é incidida sobre o corpo, e a braquiterapia, quando são inseridos pellets de material radioativo no local de interesse ou bem próximo por tempo definido (NCI, 2023 c). Apesar dos benefícios mencionados da RT, são conhecidos os efeitos nocivos desse tipo de tratamento sobre qualidade de vida do paciente. Problemas de precisão de dose, direcionamento e distribuição da radiação são alguns dos ônus relatados para a radioterapia, os quais podem culminar em efeitos colaterais cardíacos e pulmonares a longo prazo, perda de cabelo e peso, dentre outros malefícios que podem ser pronunciados por ação da QT, geralmente, associada (NCI, 2023 c).

A quimioterapia enquadra-se como um tratamento sistêmico geralmente empregado como terapia adjuvante (pós-cirurgia) em pacientes em estágio I; como opção neoadjuvante (antes da cirurgia) para estágio II com tumores de diâmetro maior que 4 cm e associada à radioterapia, imunoterapia e terapia direcionada para os estágios III e IV mais avançados (GADGEEL *et al.* 2012; ACS 2023 a). A QT baseia-se na utilização de fármacos com atividade citotóxica para o câncer, administradas por via oral ou intravenosa. O tratamento ocorre em ciclos com período determinado e pausas para recuperação do paciente. O número de ciclos é relativo às condições de saúde do paciente, ao estágio do câncer, ao fármaco utilizado e ao método de tratamento (QT adjuvante, neoadjuvante ou associada a outras terapias) (MAYO CLINIC, 2024; SOCINSKI, 2004). A **Tabela II.3** apresenta alguns dos agentes quimioterápicos mais empregados no tratamento de CPCNP metastático e não metastático e de CPCP.

Tabela II.3. Principais Quimioterápicos aplicados no tratamento de câncer de pulmão.

Quimioterápico (CPCNP não metastático)	Quimioterápico (CPCNP metastático)	Quimioterápico (CPCP)
Cisplatina	Cisplatina	Cisplatina
Carboplatina	Carboplatina	Carboplatina
Pemetrexede	Paclitaxel	Etoposídeo
Vinorelbina	Docetaxel	Doxorrubicina

Fonte: Autoria própria.

Ao longo dos últimos anos, diversos ensaios clínicos realizados apontaram a efetividade dos agentes à base de platina no tratamento de câncer de pulmão, tornando estes compostos fundamentais nas abordagens quimioterapêuticas de primeira linha (KOSMIDIS, 2002). Em geral, o CPCP apresenta uma boa resposta à combinação de cisplatina ou carboplatina com etoposídeo e o CPCNP não metastático é comumente tratado pela união de cisplatina ou carboplatina com compostos como pemetrexede e vinorelbina. Em estágio metastático, o CPCNP revelou bons resultados ao tratamento com as seguintes duplas de quimioterápicos: cisplatina + vinorelbina e carboplatina + paclitaxel (CRUK, 2023; INOUE, 2001). No entanto, apesar do aumento substancial de sobrevida quando comparada aos outros métodos convencionais, a quimioterapia apresenta elevada resistência aos medicamentos e toxicidade sistêmica e cumulativa para as células saudáveis, principalmente, quando empregada após cirurgia de remoção. Dentre os efeitos mais comuns estão a anemia, neutropenia e fadiga, que comprometem a execução completa do tratamento, estando aptos para tal, em média, de 60% a 70% dos pacientes iniciados pós-cirurgia (SOCINSKI, 2004; GADGEEL, 2012).

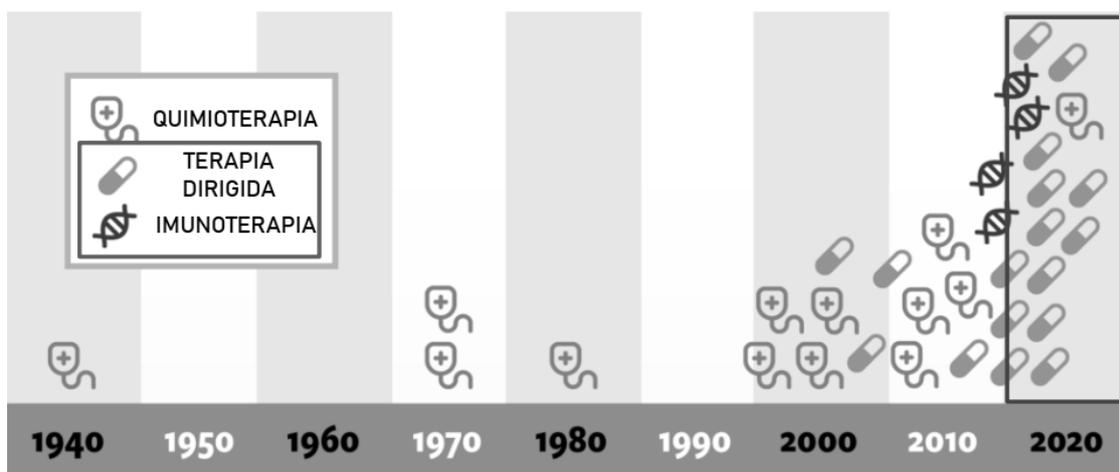
Como visto inicialmente, em estágios mais avançados, quando ocorre elevada disseminação e a doença não é curável pelos métodos convencionais, o principal objetivo do tratamento é aumento da sobrevida e alívio dos sintomas. Neste cenário, é essencial o estudo da terapia mais adequada e o ajuste da duração do tratamento a fim promover o melhor resultado a curto e longo prazo (SOCINSKI, 2004).

Uma vez conhecidos os efeitos adversos das formas de tratamento mais difundidas atualmente, bem como o alto grau de intrusividade associado e baixo prognóstico em estágios mais avançados, tornaram-se fundamentais a pesquisa e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais seletivas e cada vez menos nocivas à saúde do indivíduo acometido da doença (SOCINSKI, 2004).

2.1.3. Terapias emergentes

As duas últimas décadas marcaram a transição dos métodos de tratamento de câncer de pulmão (Figura II.2). Na tentativa de superar os principais entraves associados às terapias convencionais, surgiram novas formas de tratamento baseadas em direcionamento específico, biodistribuição controlada de medicamentos e emprego do sistema imunológico no combate à doença (LCRF, 2023).

Figura II.2 Evolução das terapias para o câncer de pulmão ao longo do tempo.

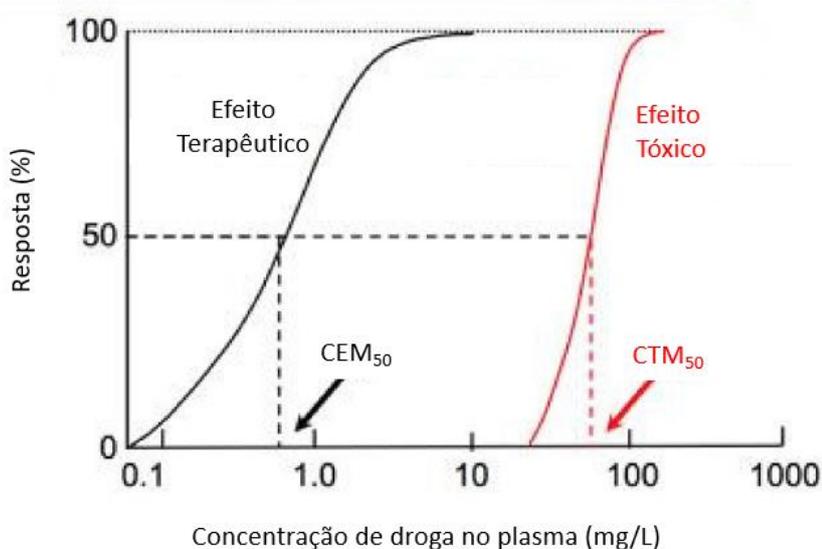


Fonte: Adaptado de Lung Cancer Research Foundation (LCRF), 2023.

A terapia dirigida integra o quadro de terapias emergentes no combate ao câncer e caracteriza-se pela entrega direcionada e controlada de medicamentos no alvo de interesse a partir de um sistema constituído de um suporte transportador ou ligante e o próprio agente terapêutico (LIN *et al.*, 2022). De forma geral, os ligantes mais utilizados são compostos que interagem especificamente com as células tumorais por meio de receptores de membrana, uma vez já conhecida a super expressão de tais receptores nas células cancerígenas em relação às células saudáveis (EZHILARASAN *et al.*, 2022). Em células de câncer de pulmão, é relatada a super expressão de receptores de ácido fólico (FAR, do inglês *folic acid receptor*); de fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *epidermal growth factor receptor*); de transferrina (TfR, do inglês *transferrin receptor*) e de uroquinase (uPAR, do inglês *urokinase plasminogen activator surface receptor*). Dessa forma, tais receptores são os mais visados nas estratégias de funcionalização dos sistemas de entrega para o câncer de pulmão (EZHILARASAN *et al.*, 2022).

Além da especificidade, o controle da dosagem e tempo de liberação do fármaco é fundamental na terapia dirigida a fim de promover a eficácia terapêutica do agente administrado. Tal eficácia pode ser representada pela razão ou índice terapêutico (IT), o qual expressa quantitativamente o nível de segurança do medicamento empregado (ADEPU *et al.*, 2023). Numericamente, o IT corresponde à razão entre a concentração tóxica mínima de medicamento (CTM₅₀) e a concentração eficaz mínima (CEM₅₀), ambas em 50% do grupo de indivíduos analisados em determinado estudo, ou seja, $IT = CTM_{50}/CEM_{50}$ (Figura II.3). Dessa forma, a janela terapêutica refere-se à faixa de concentração situada entre a CTM₅₀ e a CEM₅₀. Quanto mais ampla for a janela, menor a chance de o fármaco provocar toxicidade e, portanto, mais seguro é o uso deste (WEN *et al.*, 2015).

Figura II.3 Esquema ilustrativo do índice terapêutico obtido pela razão entre a concentração eficaz mínima (CEM₅₀) e a concentração tóxica mínima (CTM₅₀).



Fonte: Adaptado de ADEPU *et al.*, 2023.

Neste sentido, o design específico e biocompatível do sistema de entrega contribui para a ampliação da janela terapêutica e redução dos efeitos colaterais à medida que promove o aumento da concentração do fármaco no alvo tumoral ao mesmo tempo que reduz a exposição às células saudáveis. Além disso, favorece o aumento do tempo de circulação do fármaco na corrente sanguínea, uma vez que o transportador pode ser projetado para evitar a degradação e depuração do agente terapêutico pelo sistema imunológico (EZHILARASAN *et al.*, 2022; WANG, X. *et al.*, 2020). Na Tabela II.4 estão

relatados os principais sistemas de administração desenvolvidos em terapia dirigida, os quimioterápicos comumente associados e as implicações no tratamento de câncer de pulmão.

No contexto do câncer de pulmão, o Docetaxel é uma das moléculas mais promissoras no tratamento de primeira e segunda linha de CPCNP metastático, sendo, portanto, um dos principais quimioterápicos visados para entrega direcionada (RAWAL *et al.*, 2021).

Transportadores lipídicos nanoestruturados anexados a folato foram desenvolvidos para a entrega conjunta de docetaxel e curcumina. Os resultados dos ensaios *in vivo* revelaram o aumento da biodisponibilidade em cerca de 24,85 vezes em relação ao docetaxel (Taxotere®) empregado sem o sistema de entrega. Além disso, pode-se observar a regressão tumoral e aumento do potencial apoptótico e antimetastático do fármaco. (RAWAL *et al.*, 2021).

Lipossomas sensíveis ao pH direcionados ao receptor beta de folato foram projetados para o transporte de docetaxel e doxíciclin, uma vez que tal receptor é superexpresso em células tumorais de CPCNP. O pH mais ácido do microambiente tumoral (MAT) promoveu a liberação controlada e direcionada dos fármacos, ocasionando o aumento da seletividade e eficácia do tratamento. Ademais, pode-se confirmar *in vitro* e *in vivo* o efeito combinado dos fármacos sobre o tumor, a inibição do crescimento deste e a redução da toxicidade nos tecidos normais (PARK *et al.*, 2021).

Tabela II.4 Principais sistemas empregados como transportadores em terapia dirigida, exemplos, quimioterápicos comumente associados e efeitos observados com o uso de terapia dirigida.

Sistema de administração	Exemplo	Quimioterápico associado	Efeitos com Terapia Dirigida	Referência
Nanopartículas metálicas, poliméricas e lipídicas	Transportadores lipídicos nanoestruturados	Docetaxel e Curcumina	Aumento da biodisponibilidade do Docetaxel (24,85 vezes maior)	Rawal <i>et al.</i> , 2021.
Lipossomas	Lipossomas sensíveis ao pH	Docetaxel e Doxíciclina	Liberação do fármaco em pH ácido em células de CPCNP e aumento da especificidade	Park <i>et al.</i> , 2021.
Conjugados de fármacos	Conjugado Ramucirumabe - fármaco	Docetaxel	Liberação direcionada e redução da toxicidade sistêmica	Garon <i>et al.</i> , 2014.
Dendrímeros	Complexo Poli(amidoamina) - fármaco	Camptotecina	Liberação controlada e aumento de solubilidade	Cheng <i>et al.</i> , 2008

Fonte: Autoria própria.

O efeito de conjugação do docetaxel com o anticorpo monoclonal ramucirumabe foi investigado em pacientes com CPCNP em estágio IV. O anticorpo em questão destaca-se por provocar a inibição da angiogênese³ tumoral e é comumente aplicado para aumento de sobrevida em CPCNP pré-tratado. Os resultados revelaram que não houve aumento da toxicidade com a conjugação dos fármacos e melhoria estatisticamente significativa da sobrevida global dos pacientes em relação ao emprego de docetaxel junto com placebo (GARON *et al.*, 2014).

A atividade antitumoral da camptotecina é descrita na literatura para diversos tipos de câncer. No entanto, a baixa hidrofiliabilidade e elevada toxicidade comprometem a eficácia e tratamento desse quimioterápico. Para contornar tais problemas, foi analisado o potencial da camptotecina encapsulada em dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM). Após a utilização do sistema, foi relatado o aumento da solubilidade do composto em água, maior estabilidade no meio biológico e redução da degradação do fármaco, além da liberação controlada deste no ambiente tumoral (CHENG *et al.*, 2008)

Apesar da ampla gama de benefícios adquiridos com a terapia dirigida, ainda são enfrentados grandes desafios no tratamento do câncer de pulmão por meio dessa técnica. Alguns dos impactos negativos mais comuns descritos na literatura incluem: a possibilidade de o organismo desenvolver resistência ao tratamento ao longo do tempo, assim como nas terapias convencionais; a baixa previsibilidade das propriedades farmacocinéticas, dentre elas a absorção, distribuição e excreção dos sistemas de entrega no organismo receptor, e a heterogeneidade genética entre as subpopulações de células tumorais, as quais podem possuir diferentes perfis de expressão de receptores alvo, comprometendo a eficácia do tratamento (EZHILARASAN *et al.*, 2022)

Com o intuito de resolver tal problemática, foram desenvolvidas abordagens terapêuticas imunoestimulantes, ou seja, focadas na ativação do sistema imunológico para o combate ao câncer. Em contraste às demais formas de tratamento, a imunoterapia tem revelado: ampla atividade antitumoral, uma vez que pode atingir populações múltiplas e heterogêneas de células cancerígenas; desenvolvimento de memória imunológica, o que implica respostas prolongadas após a conclusão do tratamento; toxicidade reduzida

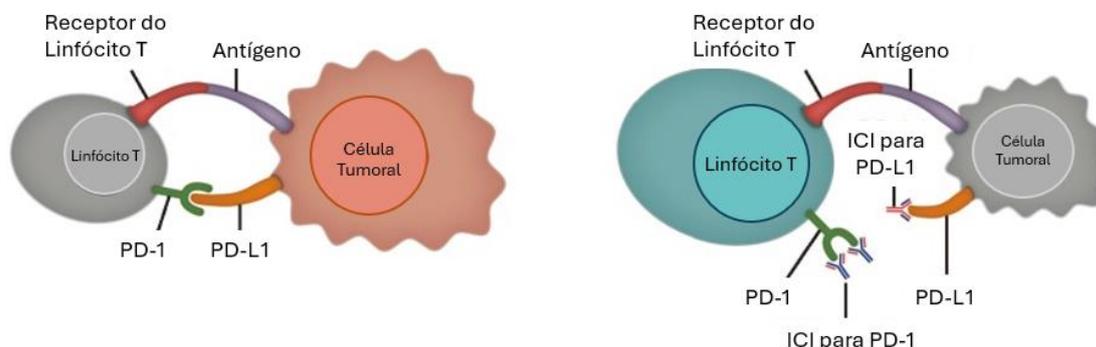
³ Angiogênese: processo de formação de novos vasos sanguíneos responsáveis pela oxigenação e nutrição do tumor.

devido à maior especificidade de atuação; menor resistência e elevado potencial de cura em estágios mais avançados da doença (ZHANG *et al.*, 2022).

As abordagens imunoterapêuticas mais exploradas atualmente incluem inibidores de checkpoint imunológico (ICIs), terapia celular e vacinas anticâncer. Os ICIs se baseiam no mecanismo de verificação ou *checkpoint* do sistema imunológico responsável por regular, por meio de proteínas específicas, a ativação ou desativação de respostas imunológicas (ACS, 2024). A terapia celular, a rigor, terapia de transferência celular adotiva (TCA) consiste na infusão de células imunológicas geneticamente modificadas para expressão de características antitumorais. Já as vacinas contra o câncer destacam-se, principalmente, como ferramentas de ativação de memória imunológica prolongada e como adjuvantes ao sistema imune contra as células cancerígenas, contribuindo para a efetividade da resposta imunológica, regressão tumoral e redução das possibilidades de recorrência do câncer (BUONAGURO *et al.*, 2020)

A fim de evitar o reconhecimento e destruição, em muitos casos, as células cancerígenas desenvolvem estratégias de manipulação e controle do mecanismo de *checkpoint* e, desta forma, conseguem suprimir o ataque do corpo contra elas. Os ICIs atuam, justamente, bloqueando a influência das proteínas das células anormais responsáveis pela desativação da resposta imune, o que permite a restauração do combate ao câncer (ACS, 2024). Uma das vias de *checkpoint* mais visadas para o desenvolvimento de ICIs resulta da interação entre as proteínas PD-1 (do inglês *programmed cell death protein-1*) e PD-L1 (do inglês *programmed cell death ligand-1*). A PD-1 está presente na superfície dos linfócitos T, os quais, em condições normais, identificam e atacam células estranhas ao organismo. A expressão de PDL-1 em células tumorais já foi comprovada para câncer de pulmão (KIM *et al.*, 2019). A ligação entre as proteínas PD-1 e PD-L1 estimula a via de *checkpoint* que suprime a ativação das células T, o que promove a progressão do câncer. Em contrapartida, os ICIs bloqueiam a interação entre tais proteínas e, portanto, impedem a inativação das células T, como ilustrado na Figura II.4 (KIM *et al.*, 2019).

Figura II.4 (a) Ligação entre as proteínas PD-1 e PD-L1 e consequente supressão da ativação imunológica (b) Bloqueio da via de checkpoint e restauração da resposta imune por meio da ligação das proteínas PD-1 e PD-L1 com seus respectivos ICIs específicos.



Fonte: Adaptado de KIM *et al.*, 2019.

As principais formas de aplicação da TCA são a terapia com receptores de células T (TCR, do inglês *T-cell receptor*) e terapia com células T com receptores de antígeno quimérico (CAR-T, do inglês *chimeric antigen receptor T cells*). Na TCR ocorre a modificação genética dos linfócitos T do próprio paciente para que haja a expressão de receptores de linfócitos T com alta capacidade de identificação e afinidade com fragmentos de antígenos tumorais apresentados pelo complexo MHC do corpo⁴, desencadeando a ativação da resposta imunológica contra as células cancerígenas. Na terapia CAR-T é realizada a síntese de células geneticamente modificadas para expressão de receptores que reconhecem especificamente antígenos de superfície de células tumorais. Desta forma, provoca-se a ativação dos linfócitos T e ataque ao tumor independente da apresentação do antígeno pelo próprio organismo (ZHAO *et al.*, 2021; OHTA *et al.*, 2019; RAPOPORT *et al.*, 2015)

As vias de atuação das vacinas contra o câncer são a profilática e terapêutica. No primeiro caso, o objetivo é evitar a ocorrência de infecções por vírus oncogênicos, assim como ocorre na vacinação com antígenos contra os vírus da hepatite B (HBV) e papiloma vírus humano (HPV), ambos agentes de risco para o desenvolvimento de câncer

⁴MHC = complexo principal de histocompatibilidade, o qual é responsável pelo reconhecimento e apresentação de antígenos ao sistema imunológico.

hepatocelular e cervical, respectivamente (GARCÍA-PARDO *et al.*, 2022). A partir da provocação de uma resposta primária imunológica, as vacinas profiláticas possibilitam uma segunda resposta imune mais forte e intensa, caso ocorra outra exposição ao agente viral no futuro. Contudo, uma vez ainda não relatados vírus associados à causa e desenvolvimento do câncer de pulmão, a grande parcela de investimento em pesquisa concentra-se nas vacinas terapêuticas (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2019; GARCÍA-PARDO *et al.*, 2022). Diferentemente da profilática, a abordagem terapêutica é focada na ativação da resposta imunológica contra tumores ou células cancerígenas já existentes no organismo. O foco desse tipo de vacina é aprimorar a capacidade do sistema imune de reconhecer e reagir aos antígenos tumorais presentes nas células anormais a fim de destruí-las (LIU *et al.*, 2022). Neste sentido, uma das principais estratégias das vacinas terapêuticas consiste na seleção e emprego de dois tipos de antígenos: os antígenos associados ao tumor (AATs), os quais são superexpressos em células tumorais, mas também estão presentes nas células saudáveis, e antígenos específicos do tumor (AETs), como, por exemplo, proteínas ou outras biomoléculas encontradas, exclusivamente, nas células cancerígenas. Esta última categoria de antígeno permite a indução de respostas direcionadas, intensificação de respostas existentes e ampliação da diversidade destas, sendo, portanto, a forma de antígeno mais visada (MOTZ *et al.*, 2013). A indução da resposta imune antitumoral por meio das vacinas se dá mediante um complexo ciclo composto de etapas de apresentação e identificação de antígenos tumorais por células apresentadoras de antígeno (CAAs), recrutamento e ativação de células imunológicas, como as células B de memória e as células T efectoras e de memória. Ao final do ciclo imunológico, ocorre a infiltração das células imunológicas ativadas no ambiente tumoral, reconhecimento e morte das células neoplásicas, as quais liberam mais antígenos que são reconhecidos pelas CAAs, dando continuidade ao ciclo imune tumoral (CHEN *et al.*, 2013; CREWS *et al.*, 2021). O principal desafio encontrado, atualmente, na pesquisa e desenvolvimento das vacinas terapêuticas é a dificuldade de identificação de antígenos que sejam específicos para células tumorais, expressos de forma mais homogênea possível e com alta imunogenicidade⁵. Além disso, o ambiente tumoral imunossupressor e a elevada carga de doença na maioria dos casos comprometem ainda mais o emprego das vacinas terapêuticas, sendo necessária a utilização das vacinas de forma adicional no combate ao câncer (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2019).

⁵ Imunogenicidade: capacidade de estimular uma resposta imunológica.

De forma geral, a terapia dirigida e a imunoterapia via inibidores de checkpoint imunológico, terapia celular e vacinas anticâncer configuram o campo disruptivo de abordagens clínicas para o tratamento do câncer de pulmão. Por outro lado, as limitações associadas a cada uma destas formas de tratamento revelam a forte dependência de critérios complexos para a efetividade de aplicação destas, como por exemplo a necessidade de identificação de AETs no caso da terapia anticâncer (SHIELDS *et al.*, 2020). Neste contexto, foi revelado mais recentemente o potencial dos macrófagos para destruição de células tumorais (BINNEMARS-POSTMA *et al.*, 2017). Uma vez conhecida a predominância dos macrófagos no MAT, bem como a capacidade destes de exibirem diversas atividades funcionais, foi desenvolvida a estratégia de repolarização de macrófagos. Diferentemente da terapia dirigida, vertente na qual os macrófagos configuram-se como grandes barreiras devido à fagocitose de nanossistemas, a repolarização de macrófagos faz uso de uma propriedade inerente ao agente terapêutico, aliando biocompatibilidade e eficácia no tratamento. Tal abordagem tem adquirido proeminência dentro da imunoterapia devido aos resultados promissores, principalmente, pela superação das limitações associadas às demais formas de tratamento, mas carece de compreensão em diversos níveis dentro de um campo multidisciplinar, o que justifica a necessidade de investimento em pesquisa e desenvolvimento desta tecnologia (BINNEMARS-POSTMA *et al.*, 2017).

2.1.4. Terapia com Macrófagos

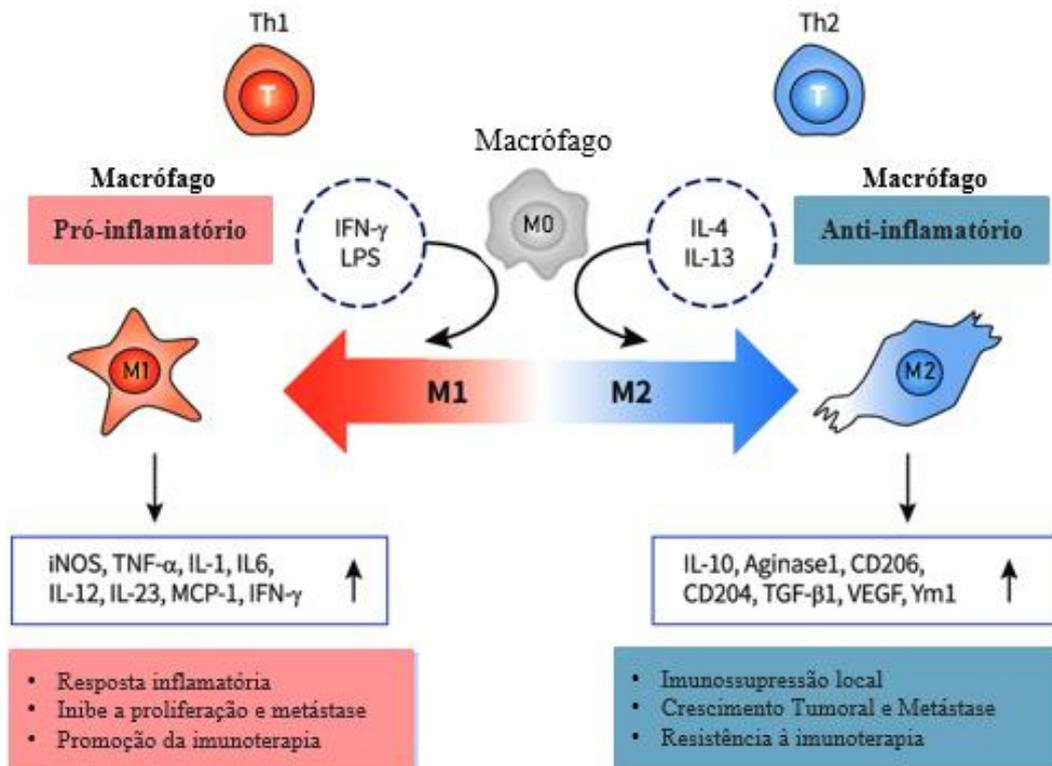
Macrófagos são algumas das principais células que compõem o sistema mononuclear fagocítico⁶ e estão amplamente distribuídos nos tecidos do corpo. Embora ainda não haja consenso estabelecido quanto à origem, a teoria mais aceita é a de que os macrófagos residentes nos tecidos são originados a partir de células do saco vitelino durante o desenvolvimento embrionário e podem ser derivados de monócitos circulantes na corrente sanguínea em resposta a um processo inflamatório (ANDRADE *et al.*, 2021)

A atuação dos macrófagos no sistema imune é diversa e tem estreita relação com seu estado de polarização. Tais estados são provocados mediante estímulos ambientais recebidos e compõem um amplo espectro de polarização, cujos extremos são

⁶ Sistema mononuclear fagocítico: sistema responsável pela defesa e remoção de células mortas e corpos estranhos por meio do processo de fagocitose, dentre outras funções.

denominados fenótipos M1 e M2 (Figura II.5). Os macrófagos M1 são classificados como classicamente ativados e expressam propriedades pró-inflamatórias e antitumorais. Já os macrófagos M2, ou alternativamente ativados, possuem atividades anti-inflamatórias e pró-tumorais (BINNEMARS-POSTMA *et al.*, 2017).

Figura II.5 Polarização do macrófago nos fenótipos M1 e M2.



Fonte: Adaptado de LEE, 2019.

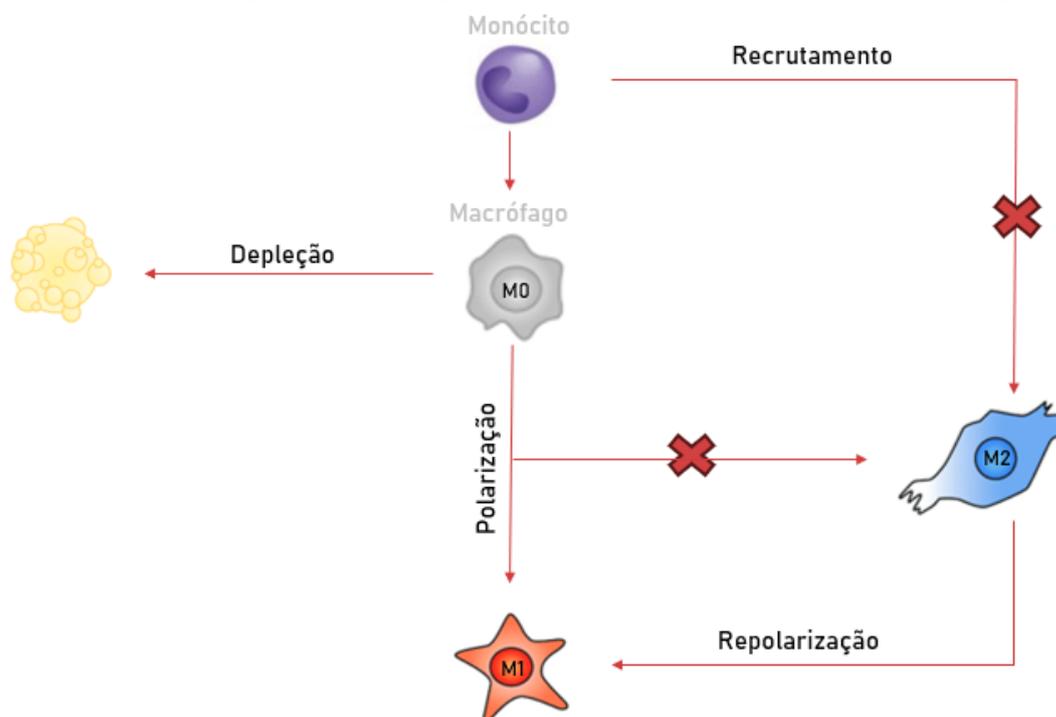
Macrófagos M1 são células cruciais do sistema imune para o combate de infecções e tumores e estão diretamente envolvidos com as células T auxiliares tipos 1 (Th-1), o que justifica sua nomenclatura. Macrófagos não diferenciados (M0) podem ser polarizados em M1 por meio de ligantes e citocinas (LPS e IFN- γ) produzidos pelas células Th-1. O fenótipo M1 efetua expressiva produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL-1 e IL-6, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, dentre outros agentes fundamentais para a resposta inflamatória (GENARD *et al.*, 2017; LEE, 2019).

Por outro lado, macrófagos M2, ou, alternativamente ativados, são o estado polarizado por meio das citocinas IL-4 e IL-13 produzidas pelas células Th-2. Algumas das características deste subtipo são os altos níveis de IL-10 e arginase 1, a qual reduz, principalmente, a produção de células T e óxido nítrico. Macrófagos M2 estão intimamente ligados à supressão imunológica local, reparo e formação de novos tecidos, crescimento tumoral e promoção de metástase (GEERAERTS *et al.*, 2017; LEE, 2019).

No MAT, os macrófagos locais, denominados macrófagos associados ao tumor são derivados dos macrófagos residentes e dos monócitos circulantes da corrente sanguínea derivados da medula óssea. Estes monócitos representam 50% das células infiltrantes em um tumor e penetram localmente em resposta aos sinais inflamatórios emitidos pelo MAT (GEERAERTS *et al.*, 2017; DALTON *et al.*, 2014). A evolução das fases de resposta imunológica com o tempo e o padrão de citocinas presentes no MAT provoca a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2, o que comprova a predominância deste fenótipo no ambiente tumoral e corrobora a associação entre o aumento da quantidade local de M2 e a redução da sobrevida em pacientes com câncer (GENARD *et al.*, 2017).

A plasticidade funcional exibida pelos macrófagos tornou-se um alvo atraente para o desenvolvimento de um novo ramo da imunoterapia. As principais abordagens atualmente propostas considerando essa propriedade são: (i) inibição do recrutamento de monócitos; (ii) depleção de macrófagos; (iii) bloqueio da polarização para fenótipo M2; (iv) polarização para o fenótipo M1 e (v) repolarização do estado M2 para o M1 (Figura II.6) (GENARD *et al.*, 2017).

Figura II.6 Abordagens imunoterapêuticas focadas no controle sobre macrófagos.



Fonte: Autoria própria.

A inibição do recrutamento dos monócitos para o MAT tem como meta inibir a progressão do tumor. Uma das principais vias exploradas neste campo é o bloqueio de CCL2, quimiocina sintetizada em células cancerígenas e responsável por regular o recrutamento de monócitos e retenção de macrófagos M2 na região tumoral. A inibição da CCL2 é comumente realizada por meio de compostos que bloqueiam a própria quimiocina - como por exemplo os anticorpos monoclonais anti-CCL2 - ou impedem a síntese desta, como o caso do inibidor seletivo Bindarit (SORIA *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010). Por meio da inibição do recrutamento de monócitos no ambiente tumoral é relatada a redução da população do fenótipo M2, o que implica em redução da imunossupressão e da angiogênese e consequente minimização dos efeitos pró-tumorais. Por outro lado, é verificado que a interrupção do bloqueio do recrutamento dos macrófagos pode causar resultados reversos, como promoção de metástases em excesso e redução do tempo de vida do paciente (BONAPACE *et al.*, 2014).

A depleção de macrófagos é a destruição destas células com o objetivo de esgotar uma das principais fontes de promoção tumoral. O método consiste no emprego de compostos tóxicos que são fagocitados pelos macrófagos e provocam a morte celular. Os três sistemas mais empregados atualmente com esse propósito são os lipossomas

contendo compostos bifosfonados, anticorpos monoclonais conjugados com toxinas, microorganismos atenuados e linfócitos T ativados (LEHENKARI *et al.*, 2002; BAK *et al.*, 2007; SHEN *et al.*, 2016). As estratégias de esgotamento dos macrófagos revelaram resultados promissores quanto à regressão tumoral, mas, uma vez não específico o tratamento via depleção, são constatados efeitos sistêmicos graves como supressão da imunidade inata e conseqüente diminuição da resistência do organismo a infecções e outras injúrias, além de prejuízo à regeneração de tecidos e processos de cicatrização, sendo de vital importância o aprimoramento do controle e da precisão desta forma de tratamento no local de interesse (GENARD *et al.*, 2017).

O bloqueio da polarização para M2 é outra vertente relevante no combate ao câncer. Um dos fármacos investigados para este fim é o resveratrol (RES), composto com propriedades anticancerígenas presente nas uvas e seus derivados. Estudos recentes sugeriram a atenuação da ativação dos macrófagos M2 pelo uso de RES, uma vez constatado menor nível de citocinas pró-tumorais após o tratamento com o composto, dentre outros benefícios (SUN *et al.*, 2017).

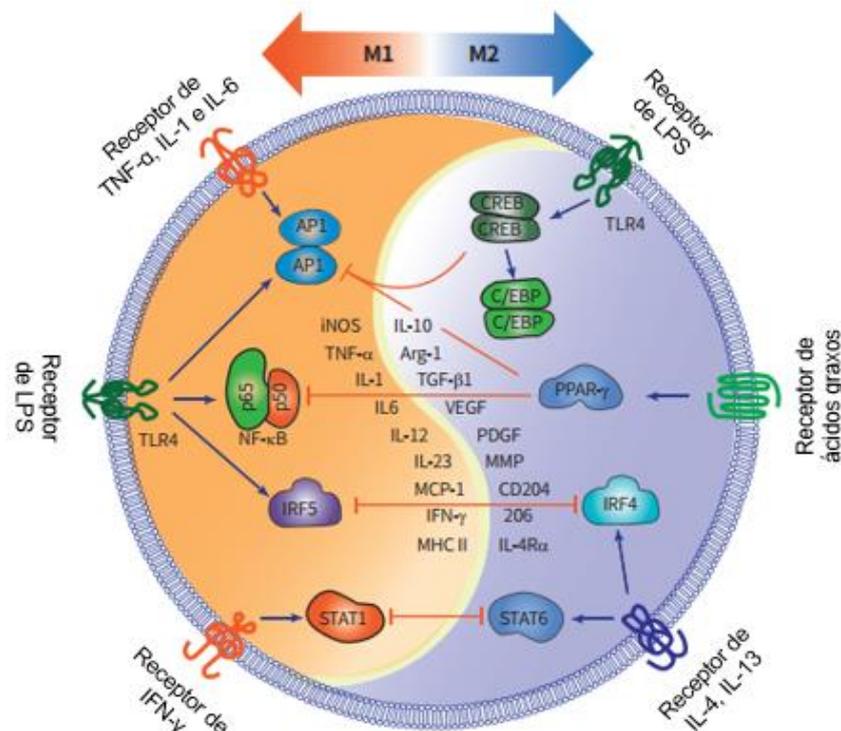
A indução da polarização dos macrófagos não diferenciados (M0) para o fenótipo M1 é uma das abordagens visadas para o tratamento de câncer. Estudos recentes revelaram que nanopartículas à base de ferro promoveram o fenótipo pró-inflamatório de macrófagos M0 *in vitro* e *in vivo* e a inibição do crescimento tumoral, sendo constatada a expressão de genes associados ao M1, como CD-80 e TNF- α após o tratamento com os nanomateriais (ARIAS *et al.*, 2015; JIN *et al.*, 2019)

A repolarização dos macrófagos M2 para M1 destaca-se como uma das imunoterapias mais promissoras no tratamento de câncer. Diferentemente das demais terapias com macrófagos, a repolarização contribui com um efeito sinérgico anticâncer baseado em eficácia antitumoral - a partir do aumento da atividade tumoricida e elevação da resposta inflamatória local - e de prevenção de efeitos sistêmicos nocivos ocasionados por abordagens menos específicas, como a inibição de recrutamento e depleção de macrófagos (HAGEMANN *et al.*, 2008; BONAPACE *et al.*, 2014). Além disso, em comparação ao tratamento por indução da polarização de M0 em M1, promove um ambiente com maior impacto antitumoral, uma vez já constatado o predomínio de macrófagos M2 no MAT (GENARD *et al.*, 2017)

2.1.5. Repolarização de Macrófagos

A repolarização de macrófagos consiste na reversão do fenótipo anti-inflamatório/pró-tumoral, M2, destas células para o estado M1, que promove uma resposta anti-tumoral no MAT. Ao invés de buscar o extermínio da fonte associada à promoção do tumor, a estratégia de repolarização foca no aproveitamento e reeducação dos macrófagos M2, os quais constituem, aproximadamente, 50% da massa tumoral. A Figura II.7 ilustra as principais moléculas e vias de sinalização envolvidas no fenômeno de polarização dos macrófagos e, portanto, visadas como alvo no desenvolvimento de sistemas de repolarização. Ao receberem estímulos do ambiente externo, os receptores de LPS, $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e IL-6 presentes na superfície das células M1 ativam os fatores de transcrição NF- κ B, AP-1, IRF-5 e STAT-1 associados à expressão de proteínas pró-inflamatórias. Os macrófagos M2 possuem receptores de LPS, ácidos graxos, IL-4 e IL-13 responsáveis pela ativação dos fatores STAT-6, IRF-4, PPAR- γ e CREB característicos para imunossupressão. A conversão mútua entre os fenótipos M1 e M2 é possível por meio da interação estabelecida entre os fatores de transcrição que regulam a polarização em um mecanismo de feedback (LEE *et al.*, 2019).

Figura II.7 Interconversão entre macrófagos M1 e M2. Receptores de membrana, fatores de transcrição e vias de sinalização envolvidos na polarização de macrófagos.



Fonte: Adaptado de LEE *et al.*, 2019.

Uma vez elucidado o fundamento molecular por trás da polarização, os métodos desenvolvidos atualmente neste campo focam em duas principais frentes: (i) ativação dos fatores de transcrição responsáveis pela expressão do fenótipo M1 e/ou (ii) desativação das vias de sinalização específicas ao M2. Para exemplificar o primeiro caso existe a estimulação com agonistas dos receptores TLR e administração direta de citocinas pró-inflamatórias e, para o segundo, a utilização de anticorpos antagonistas e microRNAs (DALEN *et al.*, 2019).

Na fronteira do conhecimento dos agentes de repolarização estão os sistemas nanoestruturados. Nanopartículas sintéticas com diferentes materiais, tamanhos, formatos e propriedades de superfície constituem uma grade plataforma para o desenvolvimento de sistemas que potencializam a modulação imunológica no combate ao câncer de pulmão (FENG *et al.*, 2019).

2.2. Nanossistemas para repolarização de macrófagos

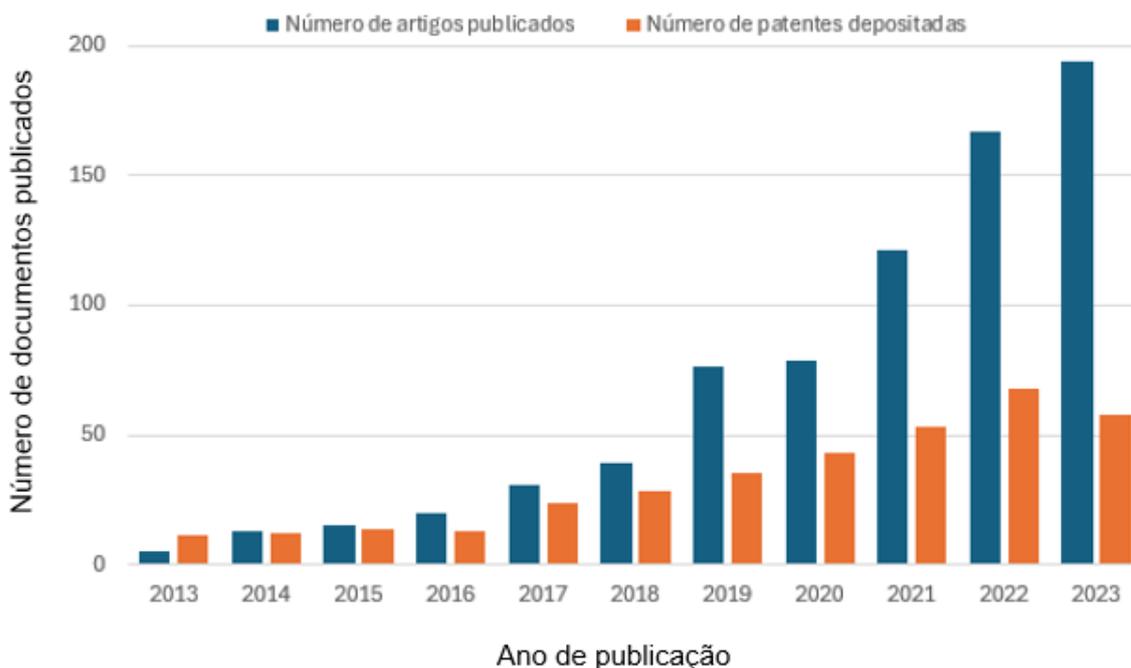
2.2.1. Revisão de nanossistemas repolarizadores de macrófagos

Na última década, cresceu o número de estudos envolvendo a aplicação de nanopartículas na repolarização de macrófagos. A Figura II.8 ilustra o aumento da quantidade de documentos publicados no período de 2013 até 2023. A análise não foi expandida para 2024, para não agregar viés de ano não concluído. As pesquisas foram realizadas com o auxílio das plataformas SCOPUS e ESPACENET.

A busca de artigos no banco de dados da SCOPUS foi realizada empregando os seguintes termos e operadores booleanos: cancer AND macrophag* AND (polari* OR modulat*) AND nanoparticle*. Vale ressaltar que o símbolo * se refere a qualquer palavra que contenha o radical anterior a ele. Além disso, os booleanos AND e OR são empregados, respectivamente, com o sentido de restrição (obrigatoriedade da busca retornar todos os termos separados por AND) e possibilidade (a busca pode retornar apenas um dos termos separados por OR). A busca foi referente ao conteúdo presente no título, resumo ou palavras-chave dos documentos. No período analisado, foram publicados 760 artigos, dos quais a maioria (407) é de origem chinesa, 184 pertencem aos Estados Unidos e 11 são de contribuição brasileira. Restringindo a pesquisa ao câncer de pulmão, o número total de documentos é de 137, sendo apenas 1 publicado no Brasil no ano de 2023.

Com relação às patentes depositadas no mesmo período (2013 a 2023) e em escala global, empregando os mesmos buscadores e termos truncados para pesquisa na plataforma ESPACENET, foram obtidos 123 resultados. Realizando a análise a nível nacional com as mesmas palavras-chave, em português, no banco de dados disponibilizado no site do INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), observa-se a inexistência de documentos de patente depositados no Brasil.

Figura II.8 Número de documentos publicados em nível global referentes às nanopartículas repolarizadoras de macrófagos para tratamento de câncer.



Fonte: Scopus e Espacenet. Acesso em: 02 de julho de 2024 às 09:06 h.

As análises ressaltam a incipiência no desenvolvimento da vertente imunoterapêutica abordada no presente trabalho, bem como a modesta participação do Brasil nesse cenário. No entanto, também reflete o terreno fértil para avanço do conhecimento e criação de soluções inovadoras. O mecanismo de busca da presente seção está detalhado no Apêndice A.

Por meio da revisão de documentos efetuada, foi estruturada a Tabela II.5, que sintetiza alguns dos principais sistemas nanoparticulados desenvolvidos atualmente para repolarização de macrófagos, dentre os quais, destacam-se as nanopartículas poliméricas, metálicas e magnéticas de óxido de ferro.

Tabela II.5 Nanossistemas empregados na imunomodulação de macrófagos.

Nanossistema	Aplicação / Modelo	Efeito observado	Referência
Np de PS revestidas com glicopolímeros	Macrófagos de camundongo / <i>in vitro</i>	M2 → M1	SU <i>et al.</i> , 2015
Np de Ag e Au	Macrófagos de camundongo/ <i>in vitro</i>	M2 → M1	PAL <i>et al.</i> , 2015
Nanopartículas de PS-NH ₂ e PS-COOH	Macrófagos humanos / <i>in vitro</i>	↓ M2	FUCHS <i>et al.</i> , 2016
Np de Fe ₃ O ₄ revestidas com carboximetildextrano	Tumor de camundongo / <i>in vivo</i>	M0 → M1 M2 → M1	ZANGANEH <i>et al.</i> , 2016
Np polimérica com IL-12	Macrófagos de camundongo / <i>in vitro</i>	M2 → M1	WANG <i>et al.</i> , 2017
Np poliméricas com mRNA	Tumores de camundongo / <i>in vivo</i>	M2 → M1	ZHANG <i>et al.</i> , 2019
Np de Fe ₃ O ₄ modificadas com potenciais de superfície positivo e negativo	Macrófagos tumorais de camundongo / <i>in vitro e in vivo</i>	M2 → M1	ZHANG <i>et al.</i> , 2020
Np de Fe ₃ O ₄ modificadas com lactato oxidase	Macrófagos tumorais de camundongo / <i>in vitro</i>	M2 → M1	LIAO <i>et al.</i> , 2021
Np de γ -Fe ₂ O ₃ revestidas com polialinina	Macrófagos humanos (2D) e modelos de esferoides tumorais multicelulares (3D) / <i>in vitro</i>	M2 → M1	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2023
Np de γ -Fe ₂ O ₃ contendo micelas poliméricas	Macrófagos humanos e células de carcinoma de pulmão de Lewis / <i>in vitro</i>	M2 → M1	BAUER <i>et al.</i> , 2021; HORVAT <i>et al.</i> 2024

Fonte: Autoria própria.

Fuchs e colaboradores (2016) investigaram os efeitos de nanopartículas de poliestireno (PS) modificadas com grupos catiônicos NH₂ e aniônicos COOH na polarização de macrófagos humanos *in vitro*. A exposição dos macrófagos aos dois nanossistemas inibiu a liberação de IL-10 e reduziu a expressão de CD163 e CD220R, marcadores associados ao fenótipo M2, mas não comprometeram a expressão de marcadores M1. O trabalho evidenciou o potencial das nanopartículas poliméricas sobre a repolarização dos macrófagos M2 e manutenção do fenótipo M1.

Com o mesmo propósito Su e colaboradores (2015) sintetizaram nanopartículas de PS recobertas com glicopolímeros de monossacarídeos (glicocálix artificial) e avaliaram o comportamento *in vitro* de macrófagos M2 peritoneais primários de camundongo após o contato com os nanomateriais. Como resultado, foram observados a diminuição da expressão dos receptores CD206 e CD23 e aumento da sinalização de CD86, evidenciando a mudança no estado de polarização dos macrófagos de M2 para M1.

Zhang e colaboradores (2019) desenvolveram nanocarreadores poliméricos de poli(β-amino éster) contendo mRNA e testaram a influência dos nanossistemas em três modelos pré-clínicos *in vivo* de tumores sólidos ovarianos, de melanoma e glioblastoma. Após a infusão da formulação de nanopartículas, foi identificada a reversão do fenótipo imunossupressor para o inflamatório e, conseqüentemente, a regressão dos tumores.

Para promover a repolarização dos macrófagos M2, Wang e colaboradores (2017) projetaram nanopartículas poliméricas de poli(β-amino éster) responsivas ao pH do meio carregadas com citocinas IL-12. Os autores utilizaram os nanossistemas para tratar macrófagos M2 de camundongo e constataram, ao final do experimento, a ocorrência da repolarização das células para a forma M1.

Nanopartículas de prata e ouro foram empregadas por Pal e colaboradores (2015) para tratar macrófagos isolados de fibrosarcoma de camundongo. Por meio da exposição aos nanomateriais, pode-se observar a regulação negativa do fator de necrose TNF-α e de IL-10 e a regulação positiva de IL-12, pró-inflamatória, nas células, o que resultou na repolarização destas de M2 para M1.

Zanganeh e colaboradores (2016) investigaram o efeito *in vivo* de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com carboximetildextrano sobre um modelo de

camundongo contendo metástases pulmonares de câncer de pulmão de células pequenas. Após a administração intravenosa do nanocomposto, foi observada a manutenção das células pulmonares pró-inflamatórias, a redução do marcador CD206 referente ao M2 e a regressão das metástases pulmonares 14 dias pós o tratamento, evidenciando o predomínio da polarização M1. Além disso, os autores avaliaram o efeito preventivo de formação de metástases hepáticas no mesmo modelo por meio do pré-tratamento com os nanossistemas. Ao final, constataram que os monócitos infiltrantes sofreram polarização M1, os macrófagos residentes foram repolarizados de M2 para M1 e observaram a queda da carga tumoral para uma quantidade seis vezes menor que a inicial, revelando o diferencial das nanopartículas de óxido de ferro como agentes de imunomodulação.

Nascimento e colaboradores analisaram a resposta de macrófagos humanos ao tratamento *in vitro* com nanopartículas de óxido de ferro (maghemita) recobertas com polianilina. Os resultados revelaram a diminuição dos marcadores CD163+ de macrófagos M2 e aumento dos marcadores CD86+ M1. Nos modelos de esferoides tumorais aplicados, os nanossistemas também provocaram o aumento da expressão de CD86+, evidenciando a eficácia dos nanomateriais na repolarização da resposta imune.

Nanopartículas de óxido de ferro (maghemita) incorporadas em micelas de poli(S-etilsulfonil-L-cisteína) funcionalizadas com ácido diidrolipoico foram desenvolvidas por Bauer e colaboradores (2021) e testadas em macrófagos humanos derivados da medula óssea. O tratamento com as nanopartículas induziu a conversão do fenótipo M2 para M1, que foi evidenciado pelo aumento da expressão dos marcadores de superfície característicos de M1 e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Após tal descoberta, Horvat e colaboradores (2024) avaliaram a capacidade antitumoral dos macrófagos repolarizados pelos nanossistemas obtidos contra células de câncer de pulmão. O trabalho revelou a remodelação do microambiente tumoral pulmonar para um perfil pró-inflamatório e citotóxico marcado pelo recrutamento de células T CD8 e secreção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias por parte dos macrófagos. Também foi comprovada a redução da viabilidade das células tumorais, de acordo com o marcador de proliferação ki67, e a interrupção do crescimento de tumores.

Nanopartículas de óxido de ferro (magnetita) combinadas com lactato oxidase (LOX) foram desenvolvidas por Liao e colaboradores (2021) e testadas em macrófagos tumorais de camundongo (RAW 264.7). Após o contato com os nanossistemas, pode-se

observar a inibição da proliferação das células cancerígenas acompanhada da conversão dos macrófagos de M2 para M1.

Zhang e colaboradores (2020) estudaram o efeito de nanopartículas de óxido de ferro (magnetita) com diferentes potenciais eletrocinéticos em meio biológico sobre a repolarização de células RAW 264.7. Após o tratamento *in vivo*, os pesquisadores observaram que os nanossistemas carregados positivamente ou negativamente possuíram maior captação celular e efeito de repolarização dos macrófagos de M2 para M1 em comparação aos nanossistemas com carga neutra. Ademais, ao injetarem os macrófagos repolarizados em um xenoinxerto tumoral, constataram a regressão significativa do tumor ($p < 0,01$) 14 dias após o contato, enquanto os macrófagos pré-tratados com as nanopartículas de potencial eletrocinético nulo não provocaram retardo tumoral apreciável. Os resultados revelaram o impacto da modificação da carga de superfície da magnetita nanométrica sobre repolarização *in vitro* e *in vivo* de macrófagos associados ao tumor.

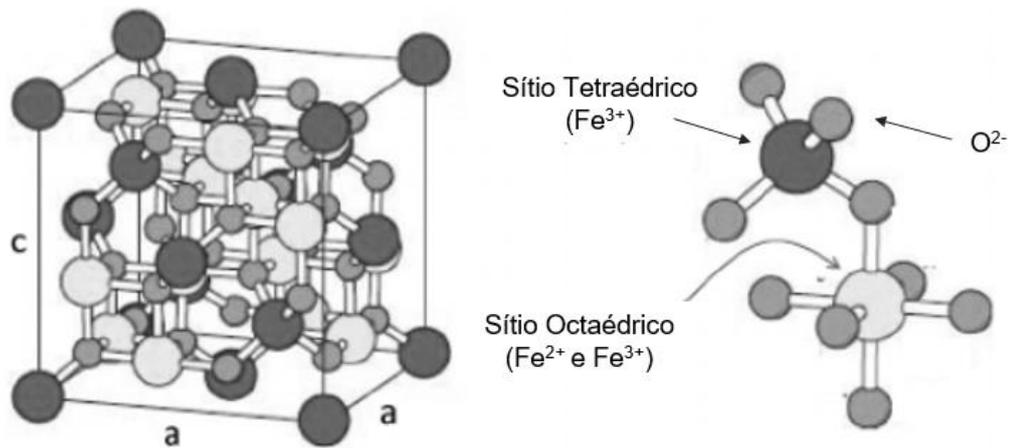
Considerando a revisão apresentada, no presente trabalho, foram desenvolvidos nanossistemas magnéticos de óxido de ferro com potenciais eletrocinéticos positivo e negativo, visando a repolarização de macrófagos. Neste contexto, é essencial a compreensão das propriedades físico-químicas das nanopartículas de magnetita, bem como dos métodos de modificação da superfície destes materiais para o ajuste do potencial de superfície e o papel deste no fenômeno de repolarização de macrófagos, o que será apresentado nas próximas seções.

2.2.2. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM) possuem diferentes propriedades a depender do tamanho, forma e estrutura. Na natureza, são encontrados óxidos de ferro com diferentes estequiometrias e fases cristalinas, como a wustita (FeO), goetita (FeO(OH)), hematita (α -Fe₂O₃), maghemita (γ -Fe₂O₃) e magnetita (Fe₃O₄). Dentre eles, a magnetita é o tipo mais explorado na área biotecnológica devido à versatilidade de aplicações, facilidade de funcionalização, comportamento superparamagnético mediante o ajuste de tamanho e obtenção em baixo custo (SEABRA *et al.*, 2017; GANAPATHE *et al.*, 2020).

A magnetita possui fórmula química Fe_3O_4 e contém íons férricos (Fe^{3+}), ferrosos (Fe^{2+}) e O^{2-} em sua composição. A estrutura cristalina é classificada como cúbica de espinélio invertido e possui sítios octaédricos e tetraédricos. A célula unitária da magnetita pode ser descrita como $(Fe^{3+})_8[Fe_{\frac{1}{2}}^{2+}.Fe_{\frac{1}{2}}^{3+}]_{16}O_{32}^{2-}$, onde os parêntesis representam os 8 sítios tetraédricos ocupados pelos íons Fe^{3+} e os colchetes representam 16 sítios octaédricos ocupados pelos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} (Figura II.9) (VANGIJZEGEM *et al.*, 2023).

Figura II.9 Estrutura cristalina da magnetita.

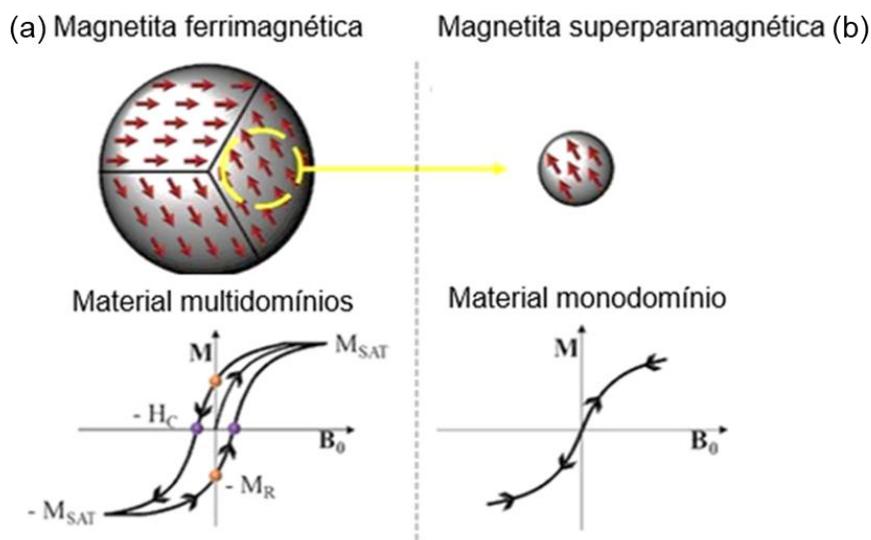


Fonte: Adaptado de FRIÁK *et al.*, 2007

Acima de 100 nm, a magnetita apresenta comportamento ferrimagnético (Figura II.10 (a)), que se caracteriza pela divisão do material em regiões ou domínios de orientações magnéticas distintas e opostas. Quando submetidos a um campo magnético externo, tais domínios sofrem alinhamento progressivo até alcançarem a magnetização de saturação (M_{sat}) (WALLYN *et al.*, 2019; PUCCI *et al.*, 2022). Após a remoção do campo, não ocorre a reversão completa da magnetização ao valor inicial devido à resistência de desalinhamento dos domínios, mas sobra uma quantidade de magnetização conhecida como magnetização remanescente (M_r). O déficit da magnetização com relação ao campo é representado pela histerese na curva de magnetização de materiais ferrimagnéticos. Para o retorno ao valor inicial, faz-se necessária a aplicação de um campo magnético inverso denominado campo coercivo (H_c) (CALLISTER, 2011).

Diferentemente da fase bulk, nanopartículas de magnetita com diâmetro abaixo de 30 nm (diâmetro crítico) possuem propriedades superparamagnéticas (Figura II.10 (b)). Neste caso, na presença de um campo magnético externo, há a formação de um domínio único de orientação magnética e, por isso, a retirada de um campo magnético externo após a aplicação não implica na ocorrência de magnetização residual, mas, ao contrário, na desmagnetização total do material. Portanto, na curva de magnetização de materiais superparamagnéticos não é observado o loop de histerese (PUCCI *et al.*, 2022).

Figura II.10 Ilustração da formação de (a) multidomínios magnéticos e histerese no caso dos materiais ferrimagnéticos e (b) região monodomínio e ausência de histerese nos materiais superparamagnético.



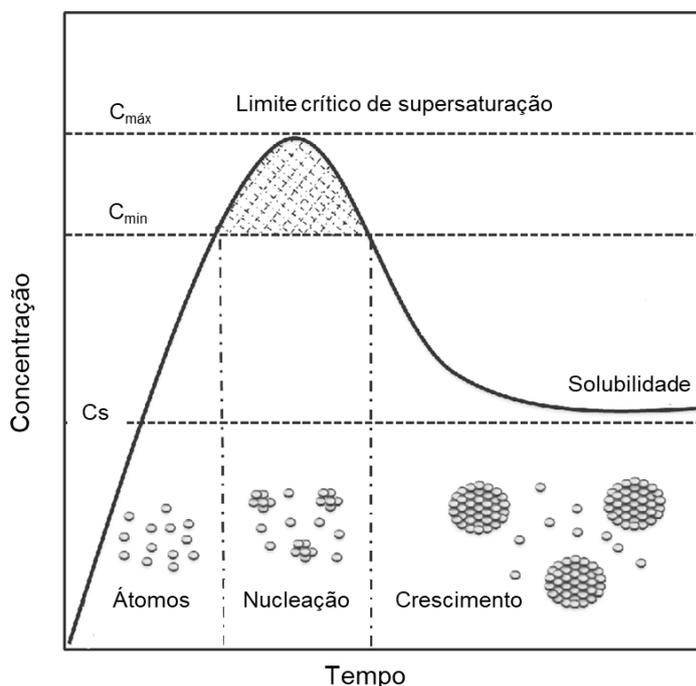
Fonte: Adaptado de VANGIJZEGEM *et al.*, 2023.

As propriedades superparamagnéticas das nanopartículas de magnetita promovem ainda mais a aplicação destes materiais na área biomédica, uma vez que a magnetização residual desprezível minimiza o risco de entupimento de vasos sanguíneos ocasionado pela agregação dos nanomateriais (VANGIJZEGEM *et al.*, 2023). Além disso, a elevada suscetibilidade magnética, que quantifica o grau de magnetização do material em resposta a um campo magnético externo aplicado, promove maior eficiência de liberação de calor quando submetidas a um campo magnético alternado (GANAPATHE *et al.*, 2020).

Dentre os métodos químicos de produção de nanoestruturas de magnetita, a técnica de coprecipitação química é tida como a mais empregada e citada até o presente momento devido à maior simplicidade, baixo custo e elevado rendimento em curto tempo. O procedimento é baseado na reação de sais precursores de Fe^{3+} e Fe^{2+} , geralmente cloretos férrico e ferroso, em meio básico, sendo comumente empregadas soluções aquosas de NH_4OH e NaOH em atmosfera livre de oxigênio (NICULESCU *et al.*, 2021). Por outro lado, também é relatada distribuição de tamanho menos estreita para as partículas obtidas por esta via.

No método de coprecipitação química, o mecanismo de formação das nanopartículas pode ser descrito pelo modelo proposto por LaMer (Figura II.11) que resume o fenômeno em 3 principais etapas: supersaturação, nucleação e crescimento. No início, com a dissolução dos sais precursores, ocorre o aumento da concentração dos íons metálicos Fe^{3+} e Fe^{2+} em solução. Em meio fortemente básico, os íons de ferro reagem com as hidroxilas fornecidas pela base, formando as espécies $\text{Fe}(\text{OH})_2$ e $\text{Fe}(\text{OH})_3$ insolúveis (JANA, 2015). Quando a concentração dos hidróxidos formados é supersaturada o suficiente para superar a barreira energética de nucleação (C_{min}) ocorre a aglomeração espontânea destes íons, provocando a formação de núcleos estáveis e cristalinos de óxido de ferro, os quais atuam como sementes para o crescimento das partículas (JANA, 2015). Na última etapa, a de crescimento, os íons remanescentes na solução (Fe^{3+} , Fe^{2+} e OH^-) se difundem e reagem na superfície dos núcleos formados, sendo incorporados à estrutura cristalina e promovendo o aumento de tamanho destes. O crescimento das partículas é interrompido quando a concentração dos íons de ferro em solução diminui abaixo do nível da supersaturação (C_s) (ANSARI *et al.*, 2022; VANGIJZEGEM *et al.*, 2023).

Figura II.11 Diagrama de LaMer para o modelo de nucleação e crescimento de nanopartículas.



Fonte: Adaptado de KHAN *et al.*, 2019.

A concentração e proporção molar dos sais precursores; o tipo, concentração e velocidade de adição da base empregada; o uso de agentes estabilizantes; o valor de pH do meio, taxa de agitação e a temperatura de reação são as principais variáveis da síntese por coprecipitação que exercem influência sobre o tamanho, formato e propriedades magnéticas das nanopartículas e, portanto, são as principais estratégias na busca por nanopartículas uniformes, estáveis e com maior cristalinidade (SAMRAT *et al.*, 2021).

Em quaisquer métodos empregados, são atestadas a elevada energia e reatividade superficial das partículas de magnetita em escala nanométrica, bem como a tendência dos nanomateriais à oxidação e aglomeração. Neste sentido, torna-se crucial o desenvolvimento de estratégias de modificação da superfície dos nanomateriais a fim de promover maior estabilidade e dispersão e potencializar a aplicação destes, sobretudo no campo biotecnológico (LIU *et al.*, 2020).

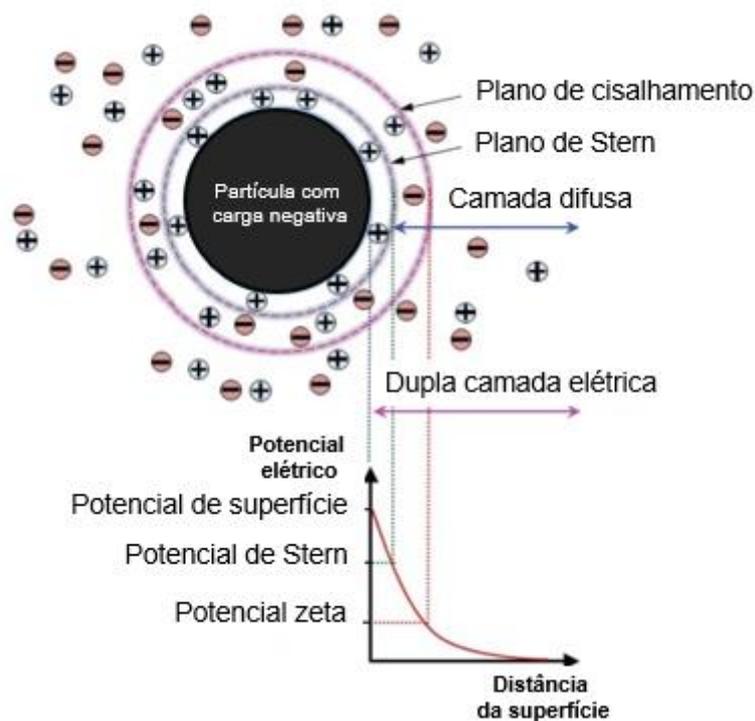
O potencial eletrocinético é uma das propriedades exploradas no *design* de nanossistemas para imunoterapia do câncer. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com superfície eletricamente carregada em meio biológico revelaram resultados promissores de captação celular e repolarização de macrófagos em comparação aos

nanomateriais com potencial eletrocinético nulo. Desta forma, para o presente estudo, é essencial a compreensão aprofundada dessa variável.

2.2.3. Potencial eletrocinético

O potencial eletrocinético, ou potencial zeta, é o potencial estabelecido na interface hidrodinâmica, ou seja, no plano de cisalhamento, de um sistema coloidal em decorrência do contato de partículas carregadas com um meio dispersante. Na interface sólido-líquido, a superfície carregada atrai íons provenientes do líquido, provocando o acúmulo espontâneo dessas espécies ao redor da partícula que origina a camada elétrica dupla (CED). A estrutura da CED é composta por uma camada mais interna (Stern) originada por contra-íons fortemente ligados à superfície e por uma segunda camada (difusa) de íons livres (Figura II.12) (ZHANG *et al.*, 2009; BUTT *et al.*, 2011).

Figura II.12 Diagrama representativo das camadas elétricas ao redor da partícula negativamente carregada e os respectivos potenciais elétricos.



Fonte: Adaptado de PARK *et al.*, 2011.

De acordo com o modelo de Gouy-Chapman para a CED, próximo à interface sólido-líquido, a concentração de contra-íons é maior devido ao predomínio das forças atrativas sobre o processo térmico, o que provoca a queda do potencial elétrico. Já em regiões mais afastadas da interface, onde há maior dispersão dos contra-íons, as forças repulsivas exercem maior influência e o potencial elétrico cai gradualmente (BARD *et al.*, 2002). Com relação aos íons de mesma carga da superfície, os co-íons, presentes na dupla camada elétrica, estes possuem perfil de concentração oposto. Quanto maior a distância da superfície, maior a concentração dessas espécies, uma vez que tendem a ser repelidos pela superfície de carga oposta. No equilíbrio, fica estabelecido o perfil de concentração dos contra-íons, e conseqüentemente de co-íons, constituindo a camada difusa. O potencial elétrico não varia linearmente com a distância da superfície sólida, mas decai exponencialmente (MEUNIER *et al.*, 2010; HUNTER, 2001).

A distribuição de potencial elétrico na CED pelo modelo de Gouy-Chapman pode ser formulada a partir da equação de Poisson-Boltzmann que relaciona o potencial com a densidade volumétrica de cargas (BUTT *et al.*, 2011). Para baixos valores de potencial de superfície, considerando uma geometria plana unidimensional, a relação entre o potencial Ψ a uma distância x da superfície da partícula tem a seguinte forma, conhecida como simplificação de Debye-Huckel (HUNTER, 2001):

$$\Psi = \Psi_0 e^{-\sigma x} \quad (\text{Equação II.1})$$

Ψ_0 é o potencial elétrico na superfície da partícula. O parâmetro σ pode ser calculado a partir da Equação 2.2 e equivale a $\frac{1}{\lambda_D}$, onde λ_D é denominada espessura de Debye e tem dimensão de distância. Para uma distância x igual ou maior ao da espessura de Debye, o potencial sofre a queda por um fator exponencial ($\Psi = \Psi_0/e$), o que se traduz em efeitos muito baixos de campo elétrico (BARD *et al.*, 2002).

$$\sigma = \left(\frac{2n_\infty z^2 e^2}{\delta \epsilon_0 k_B T} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Equação II.2})$$

Sendo,

n_∞ : concentração iônica na fase bulk;

z : valência do íon;

e : carga elementar;

δ : constante dielétrica do meio no interior da CED;

ϵ_0 : a permissividade no vácuo;

k_B : constante de Boltzman;

T : temperatura absoluta.

Da expressão 2.2, nota-se que, além das constantes e da temperatura, σ depende da concentração e da valência dos eletrólitos presentes no sistema. Dessa forma, com o aumento da concentração (n^∞) e/ou da valência (z), espera-se a redução do parâmetro λ_D e, portanto, a contração da CED (BARD *et al.*, 2002).

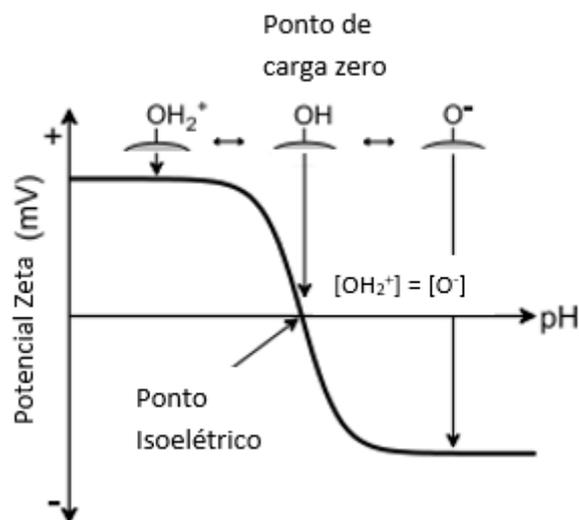
A teoria de Gouy-Chapman é capaz de descrever com precisão sistemas com potencial de superfície de até 25 mV à temperatura ambiente, além de fornecer boas estimativas para soluções com concentração inferior a 0.2 M contendo íons monovalentes e submetidas a potenciais maiores que 80 mV (BUTT *et al.*, 2011). Fora dessas condições, o modelo apresenta falhas, como valores superestimados de capacitância, uma vez que trata dos íons como cargas pontuais que se aproximam da superfície a uma distância irreal (menor que seu raio iônico). Desse modo, permite o aumento infinito da capacitância com o potencial. Além disso, desconsidera o efeito do solvente na interface sólido-líquido e as interações íon-íon. Outros modelos têm sido desenvolvidos visando contornar essas limitações, porém o modelo de Gouy-Chapman continua sendo muito empregado e é útil para entender o efeito das variáveis sobre o potencial elétrico num meio com partículas carregadas (BARD *et al.*, 2002; MEUNIER *et al.*, 2010).

Como visto inicialmente, o potencial no plano de cisalhamento é conhecido como potencial eletrocinético ou potencial zeta. O método mais empregado na determinação do potencial zeta se dá por meio da medida de mobilidade eletroforética, que caracteriza a velocidade das partículas do sistema mediante a aplicação de um campo elétrico. A medida de potencial zeta é amplamente utilizada para o estudo de diversos processos interfaciais, atuando como parâmetro de estabilidade de sistemas coloidais; como critério de modificação de uma superfície e, mais recentemente, como ferramenta de prova de ativação celular e interação entre biomoléculas e nanossistemas (ZHANG, 2015). Por ser uma propriedade interfacial, o valor de potencial zeta é também governado pelas

condições do meio. O pH e a natureza do meio; o tipo de eletrólito; a concentração iônica e a temperatura do sistema são algumas das principais variáveis que exercem influência sobre o valor de potencial zeta (LU *et al.*, 2010)

O pH do meio aquoso pode afetar o potencial zeta de uma partícula à medida que atua sobre o equilíbrio de protonação dos grupos da superfície e na adsorção dos íons H^+ ou OH^- . Considerando a superfície anfotérica de um óxido metálico, em meio ácido ocorre a protonação dos grupos hidroxila, gerando uma densidade de cargas positivas na superfície e, conseqüentemente, um potencial zeta positivo. Por outro lado, se o pH da solução for aumentado, o excesso de íons OH^- provocará a desprotonação dos grupos hidroxila, a superfície assumirá uma densidade de cargas negativas e o potencial zeta será negativo (ZHANG *et al.*, 2020) (Figura II.13)

Figura II.13 Perfil de potencial zeta de um óxido metálico em função do pH do meio.



Fonte: Adaptado de Matter *et al.*, 2020

Em determinado valor de pH, a densidade superficial de cargas positivas equivale à de cargas negativas, ou seja, ocorre o equilíbrio entre o número de grupos OH protonados (OH_2^+) e desprotonados (O^-) na superfície. Nesta condição, o sistema atingiu o ponto de carga zero (PCZ) e a superfície se torna neutra (potencial de superfície nulo). Já no plano de cisalhamento, o valor de pH correspondente ao potencial zeta nulo é conhecido como ponto isoelétrico (PI). Se não houver adsorção específica na camada

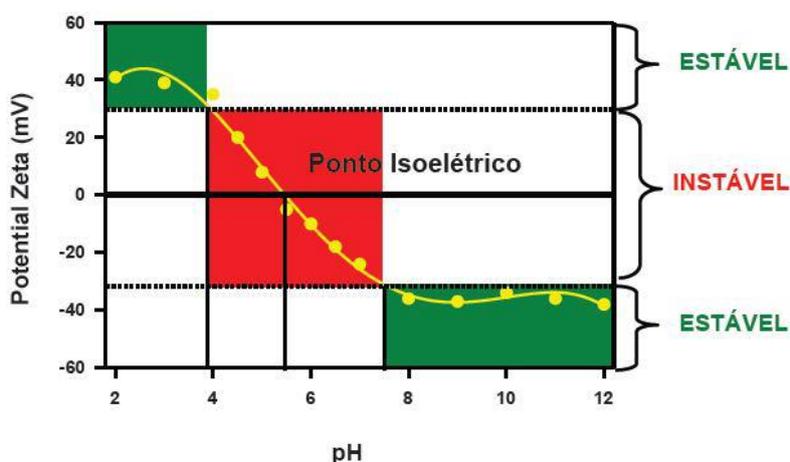
Stern, $PCZ = PI$. Se houver efeitos de adsorção específica, a CED pode sofrer expansão e o potencial zeta pode não ser nulo, mesmo a superfície possuindo carga líquida nula (GULICOVSKI *et al.*, 2008).

A adição de um eletrólito na suspensão influencia diretamente o potencial zeta. Pode haver uma redução na sua magnitude, quando os contra-íons provocam a contração da CED, uma vez que exercem um efeito de blindagem eletrostática, atenuando o alcance do potencial de superfície. Contrariamente, o potencial zeta pode aumentar quando a força de adsorção dos íons na superfície é predominante sobre as forças eletrostáticas repulsivas, ocasionando um aumento na concentração de co-íons próximo a superfície e, conseqüentemente, elevando a magnitude do potencial zeta (WNEK *et al.*, 1977).

Da mesma forma, o aumento da temperatura pode provocar o aumento do potencial zeta por promover o aumento de energia e mobilidade dos íons e expandir a CED. Em contrapartida, o aumento significativo da temperatura pode ocasionar a dessorção dos íons da camada de Stern, gerando a contração da CED e redução do potencial zeta. Com relação ao meio dispersante do sistema, quanto maior a constante dielétrica, maior a polaridade e intensidade dos fenômenos eletrocínéticos, o que resulta em maior valor de potencial zeta (DAS, 2017).

A estabilidade de uma dispersão coloidal é resultado do balanço entre as forças de atração e repulsão eletrostáticas existentes entre as partículas. De modo que, quando o potencial zeta é elevado, em módulo, as forças de repulsão são predominantes e as partículas permanecem separadas. Se os valores de potencial zeta são baixos, as forças de atração tornam-se relevantes e as partículas ficam mais próximas, conduzindo à instabilidade coloidal. Como visto anteriormente, no ponto isoelétrico, a carga líquida no plano de cisalhamento é nula. Logo, em regiões de pH próximas ao valor do ponto isoelétrico, as partículas possuem repulsão eletrostática mínima e tendem a se aglomerar, ocasionando grande instabilidade da dispersão (Figura II.14) (SHARMA *et al.*, 2014).

Figura II.14 Diagrama de perfil de potencial zeta em função do pH do meio.



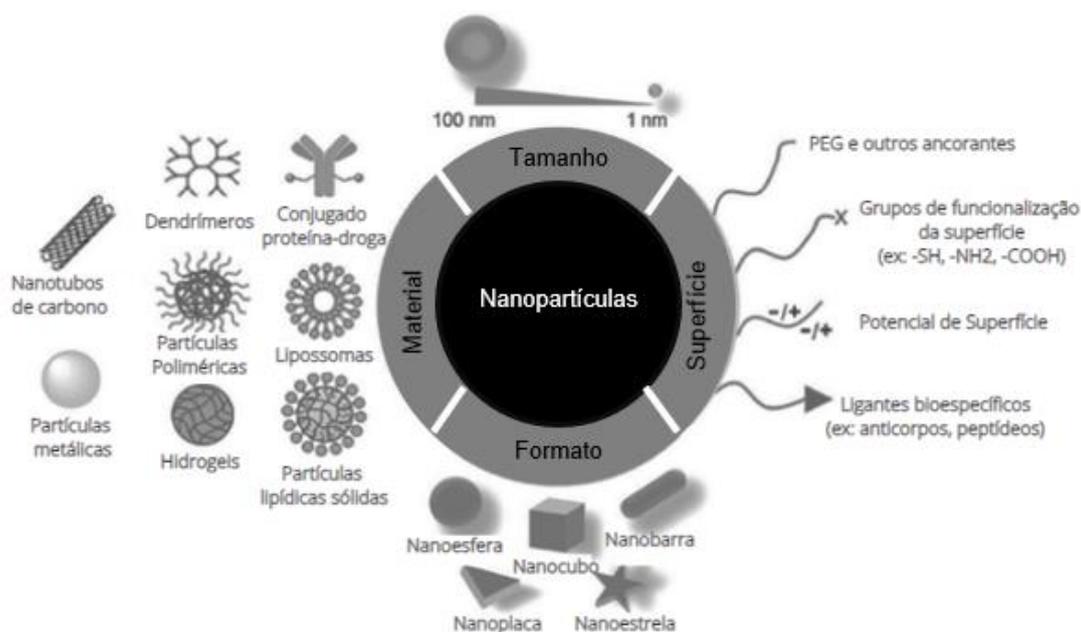
Fonte: Adaptado de PATE *et al.*, 2016.

Para promover o deslocamento do ponto isoelétrico, a natureza do potencial electrocinético (positivo ou negativo) e a estabilidade da dispersão em determinado valor de pH, uma das principais estratégias é a modificação de superfície, como, por exemplo, a funcionalização química com grupos que aumentem a densidade de cargas de interesse, a magnitude do potencial de superfície e, conseqüentemente, do potencial zeta. No caso específico de NPM pode ser feito, além da funcionalização, o recobrimento da superfície com sílica e outros compostos que reduzam a atração magnética que também pode conduzir a dispersão à instabilidade (LIU *et al.*, 2024).

2.2.3. Modificação de superfície de nanopartículas

A funcionalização de superfícies em nanoescala integra a geração emergente de estratégias empregadas no desenvolvimento de nanossistemas multifuncionais. O estudo da natureza, da forma, do tamanho e das propriedades de superfície é elemento base para a engenharia de materiais no combate ao câncer. O uso de técnicas de funcionalização é fundamental para o ajuste do potencial de superfície de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, propriedade que tem despertado o interesse, especialmente, em abordagens imunoterapêuticas. A Figura II.15 ilustra a variedade de materiais aplicados em nanomedicina, os quais podem ser obtidos a partir de compostos inorgânicos, orgânicos ou poliméricos, com tamanho e forma controlados.

Figura II.15 Principais nanossistemas empregados em terapia e diagnóstico de câncer.



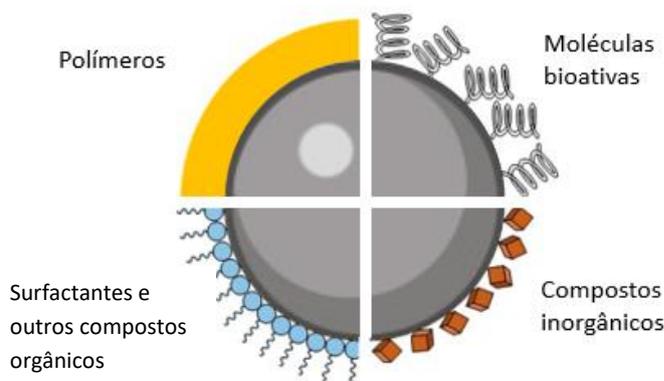
Fonte: Adaptado de SUN *et al.*, 2014.

De forma mais geral, os métodos de funcionalização podem ser classificados como covalentes e não covalentes, dependendo do tipo de conjugação feita entre a superfície da nanoestrutura e a molécula incorporada. A primeira abordagem, covalente, se baseia na ligação química dos grupos reativos da superfície com os ligantes de interesse e se destaca pela estabilidade diante de condições ambientais, como pH, temperatura e força iônica, e por possibilitar a formação de estruturas multifuncionais complexas por meio de funcionalização sequencial (SANITÀ *et al.*, 2020). O mecanismo não-covalente de modificação envolve diferentes tipos de interação de menor força, como ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de Van der Waals. Por ser um fenômeno físico, possui técnicas de modificação bem mais simples que as do tipo covalente, além da possibilidade de conservar a estrutura e as propriedades originais do ligante. Por outro lado, devido à natureza dessas interações, a funcionalização é mais facilmente afetada pelas condições do meio (SANITÀ *et al.*, 2020).

No contexto das aplicações biomédicas, a funcionalização da superfície de NPM é tida como essencial. A elevada energia superficial decorrente do aumento da área específica nessa escala, instabilidade, oxidação, bem como a formação de radicais livres e ligações não específicas no ambiente biológico configuram algumas das razões para o desenvolvimento de estratégias de funcionalização do material (PROPECSU *et al.*, 2019).

A Figura II.16 ilustra as principais modificações feitas em nanopartículas de magnetita com o objetivo de contornar os problemas enfrentados na terapia de câncer.

Figura II.16 Ilustração esquemática das principais modificações feitas na superfície das NPM.



Fonte: Adaptado de MYLKIE *et al.*, 2021.

Polímeros são amplamente utilizados para recobrimento da superfície de nanopartículas. Dentre as principais vantagens conferidas pelo material, destaca-se a elevação de biocompatibilidade, prevenção da oxidação das partículas, possibilidade de posterior funcionalização e liberação controlada dos nanossistemas (MITRA *et al.*, 2011; MYLKIE *et al.*, 2021). Quanto à natureza dos polímeros, estes podem ser sintéticos, como polietilenoglicol (PEG), poli(vinilpirrolidona) (PVP), álcool polivinílico (PVA) e polimetilmetacrilato (PMMA); e naturais, como a quitosana e a dextrana. A funcionalização pode ser feita durante ou após a síntese das partículas. No primeiro caso, são empregadas técnicas como polimerização em mini ou microemulsão e processo sol-gel. No segundo caso, os polímeros formados podem formar ligação química ou interagir fisicamente com o núcleo magnético (WU *et al.*, 2015).

Compostos orgânicos são comumente empregados por promoverem estabilidade às NPM, bem como contribuírem para o aumento da interação e penetração em importantes barreiras biológicas para o tratamento de câncer. Assim como os polímeros, os surfactantes, lipídios e outras pequenas moléculas integram a classe de compostos orgânicos aplicados na funcionalização, a qual também pode ser feita durante ou após a síntese dos nanomateriais (PROPECSU *et al.*, 2019).

Os compostos inorgânicos ampliam o escopo de aplicações biomédicas para as NPM. Dentre os materiais mais testados estão: os metais nobres, como ouro e prata, uma

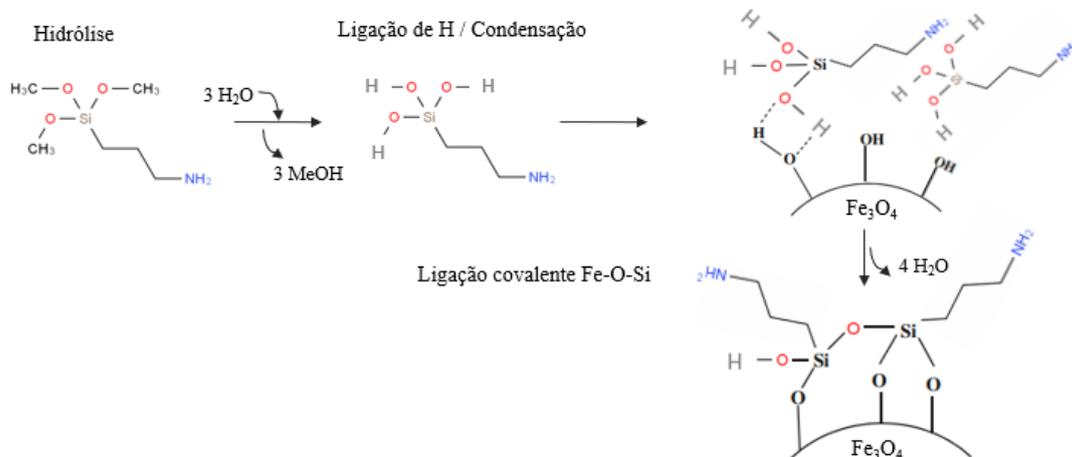
vez que atribuem maior resistência química e biocompatibilidade no meio biológico; os sulfetos e óxido, como CdS, ZnS, TiO₂ e ZnO, este último com propriedades anticâncer e, em especial, os derivados de sílica, que conferem maior dispersão, durabilidade e resistência ao nanossistema em meio ácido (MYLKIE *et al.*, 2021).

Dentre os grupos funcionais mais visados para funcionalização das NPM, os grupos amino se destacam pela promoção de biocompatibilidade, bioconjugação específica, aumento da captação celular das partículas, baixa toxicidade ao sistema e, em especial, como ferramentas de modificação de potencial de superfície dos nanomateriais. Nanopartículas de magnetita modificadas com grupos amino podem desenvolver potencial eletrocinético positivo em pH tumoral (MUGICA *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2008).

2.2.4. Estratégias para conferir potencial eletrocinético positivo por adição de silanos

A principal metodologia pós-síntese de inserção de grupos amino na superfície das NPM se dá via ligação covalente em meio aquoso por meio do ancoramento de agentes de silanização, usualmente um alcoxisilano devido aos grupos amino terminais. O processo está representado na Figura II.17. Tomando como referência a superfície da magnetita, a funcionalização pode ser resumida em 4 etapas: (i) inicialmente, ocorre a hidrólise dos grupos alcóxi presentes no agente silanizante acompanhada da liberação de moléculas de álcool; (ii) em seguida, há a condensação das hidroxilas presentes nos grupos silanois (Si-OH) formados com os grupos OH da superfície metálica (Fe-OH) via ligação de hidrogênio; (iii) como resultado, ocorre a formação das ligações Fe-O-Si e a perda de água; (iv) dessa forma, os grupos NH₂ presentes no radical (R) do organosilano original passam a integrar a superfície da magnetita (WU *et al.*, 2008).

Figura II.17 Resumo das etapas de funcionalização das NPM com grupos amino pelo procedimento de silanização em meio aquoso.

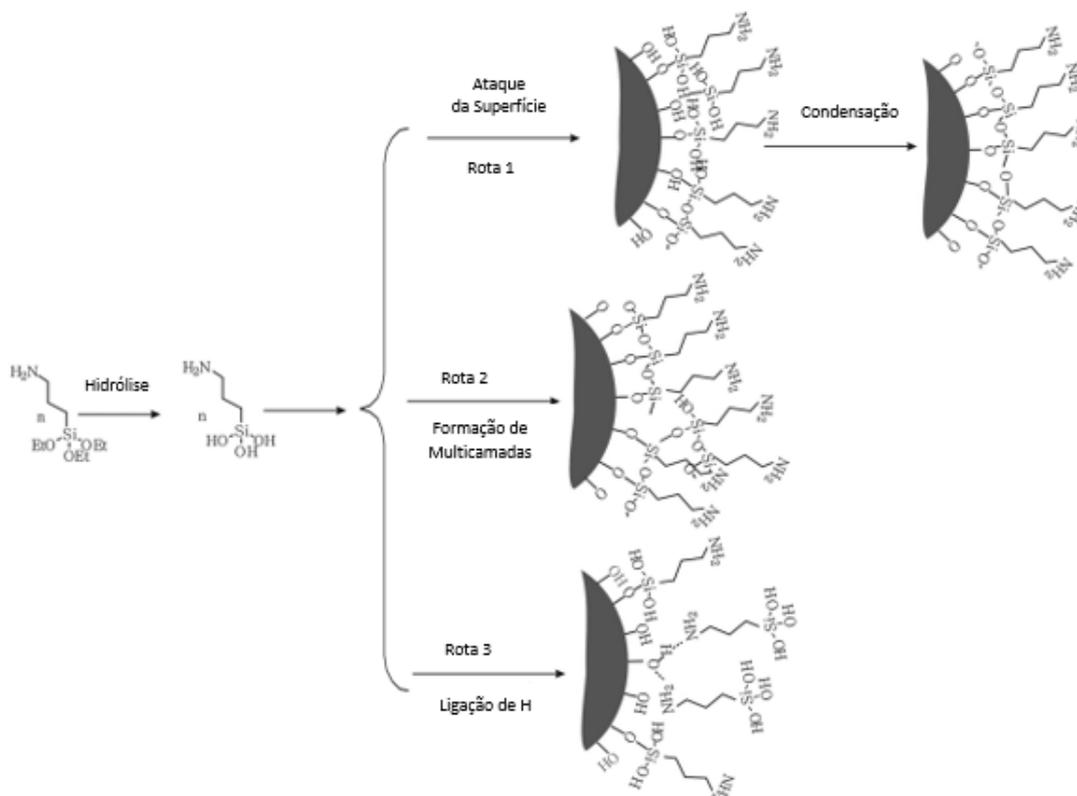


Fonte: Adaptado de AHANGARAN *et al.*, 2020.

É importante frisar que, após a reação inicial de hidrólise, as etapas de condensação e formação de ligação não necessariamente ocorrem de forma sequencial, mas podem acontecer simultaneamente na superfície da partícula. Além disso, dependendo das condições experimentais, o processo pode se desenvolver por meio de outras rotas reacionais, levando à formação de estruturas de ligantes em monocamada, multicamada ou policondensada com alto nível de ramificação (LIU *et al.*, 2013)

Alternativamente, a Figura II.18 ilustra algumas das possíveis rotas reacionais de silanização em nanopartículas de magnetita, empregando APTES como agente silanizante. A primeira rota está de acordo com o mecanismo anteriormente descrito, em que os grupos silanois formados, após a hidrólise, reagem com as hidroxilas da superfície da magnetita e condensam, formando uma monocamada de aminoligantes. Na segunda rota, acontece a autocondensação descontrolada do agente silanizante, provocando a construção de um arranjo em multicamadas linkado pelos novos grupos siloxanos (Si-O-Si) formados. Já na terceira rota, acontece a reação dos grupos Si-OH com os grupos Fe-OH superficiais, mas, paralelamente, ocorre a interação dos grupos silanois com os grupos amino terminais via ligação de hidrogênio, potencializando a ramificação da estrutura (LIU *et al.*, 2013).

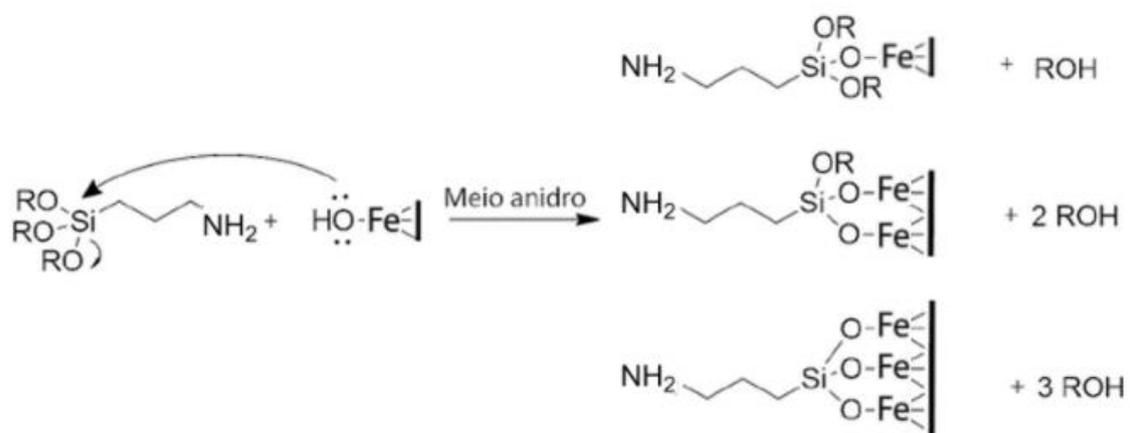
Figura II.18 Possíveis rotas de sinalização das NPM em meio aquoso contendo (3-Aminopropil)trietoxissilano (APTES).



Fonte: Adaptado de Liu *et al.*, 2013.

A funcionalização por silanização também pode ser feita em meio anidro, de acordo com o mecanismo representado na Figura II.19. Em sistema não aquoso, ocorre a condensação direta do agente silanizante na superfície do óxido metálico. Tal fenômeno se dá por meio dos grupos hidroxila presentes na superfície, os quais atuam como nucleófilos, atacando o centro positivo do organossilano utilizado (RAHMAN; PADAVETTAN, 2012).

Figura II.19 Representação do mecanismo de reação das NPM com o aminossilano em meio anidro, sendo R = CH₃ ou CH₂CH₃.



Fonte: Adaptado de SANTOS, 2018.

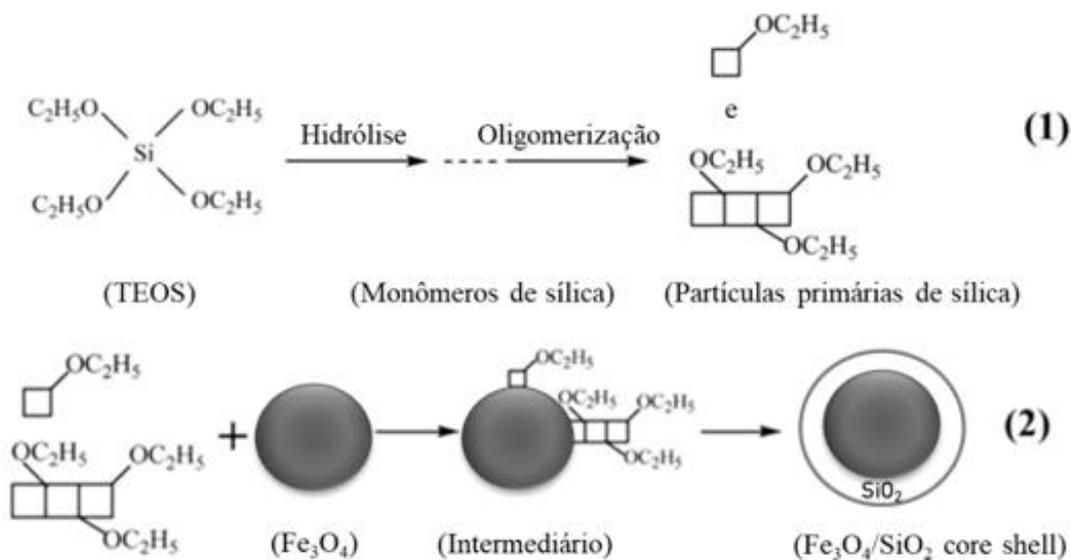
A metodologia em meio anidro é frequentemente adotada para funcionalização de superfícies recobertas com sílica, uma vez que, em meio aquoso, a hidrólise descontrolada do agente silanizante pode provocar a policondensação deste na superfície e, portanto, o descontrole sobre o processo de funcionalização (MUGICA *et al.*, 2016). Contudo, devido à baixa quantidade de grupos OH na superfície da magnetita comparada à de sílica, fica escassa a hidrólise do agente silanizante e, conseqüentemente, o ancoramento deste na superfície dos óxidos metálicos. Portanto, opta-se, preferencialmente, pelo procedimento em meio aquoso (KIM *et al.*, 2009)

A escolha do solvente também revelou forte influência sobre a eficiência de funcionalização. As principais características responsáveis pelo efeito do solvente no sistema são a polaridade e habilidade de dissolução do aminossilano no meio reacional. Solventes polares, como álcoois, são comumente empregados em procedimentos de silanização de NPM, uma vez que a polaridade tende a promover o rompimento das ligações de hidrogênio realizadas entre as moléculas de água, favorecendo a forma livre e movimentação destas espécies para a reação de hidrólise. Além de aumentarem a solubilidade do aminossilano no meio reacional, os álcoois possuem caráter prótico, ou seja, capacidade de formar ligações de hidrogênio. Apesar desta propriedade gerar a possibilidade de competição pelas hidroxilas presentes nas nanopartículas, é relatado que a solvólise promovida pelo álcool permite maior controle da funcionalização e evita a policondensação desordenada na superfície (JAKŠA *et al.*, 2014).

A temperatura configura-se como um fator determinante para a velocidade da reação de hidrólise e grau de funcionalização. É estabelecido que quanto maior a temperatura maior a taxa de hidrólise e, em temperaturas mais altas, são favorecidas as interações do silanois com a superfície da partícula. (BRUCE *et al.*, 2005). As temperaturas de referência para preparação de uma monocamada de aminossilnana na superfície das NPM (rota 1 da Figura 2.18) empregando etanol como solvente ficam em torno de 70° C. Em temperaturas mais altas, a silanização torna-se menos dependente da concentração inicial de silano. Quanto ao tempo de reação, em 70 °C, apesar de a silanização ser alcançada dentro da primeira hora de reação, a saturação de equilíbrio pode demorar até 24 h para acontecer. (LIU *et al.*, 2013).

O recobrimento das NPM com sílica é uma das estratégias visadas para aumento da quantidade de hidroxilas na superfície dos nanomateriais, podendo impactar no grau de funcionalização. O principal método de recobrimento atualmente utilizado é o de Stöber modificado, empregando tetraetilortosilicato (TEOS) como reagente e etanol como solvente (SANTOS *et al.* 2017). O processo de recobrimento é similar ao de silanização e pode ser simplificado em 2 etapas: (i) inicialmente ocorre a hidrólise do reagente de sílica (TEOS) e formação de monômeros, os quais sofrem condensação e formam as partículas primárias de sílica; (ii) no segundo estágio, ocorre o crescimento, agregação e deposição das partículas primárias na superfície da magnetita, formando uma nanoestrutura núcleo-casca com núcleo de magnetita e casca de sílica (LIU *et al.*, 2007) (Figura II.20).

Figura II.20 Representação das etapas do mecanismo de recobrimento da superfície das nanopartículas de magnetita com sílica.



Fonte: LIU *et al.*, 2007.

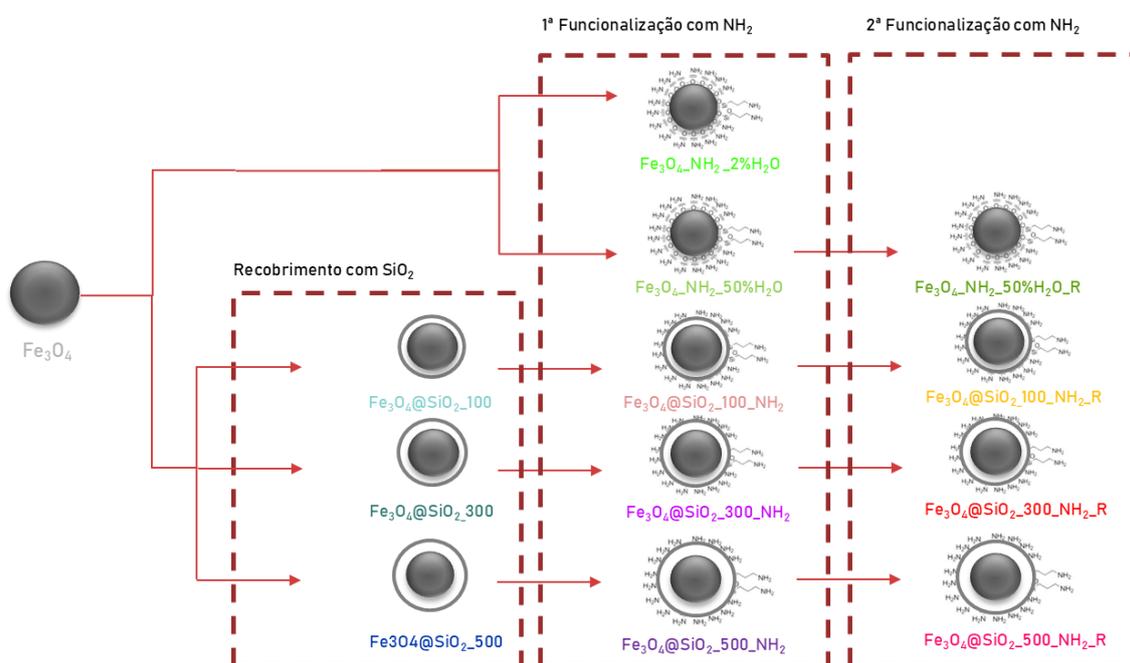
A adição da camada de sílica na superfície das NPM pode promover maior grau de ancoramento de grupos amina e, conseqüentemente, maior deslocamento do ponto isoelétrico dos nanomateriais. Neste sentido, o presente trabalho visa empregar tais abordagens de modificação de superfície (recobrimento com sílica e/ou funcionalização com aminossilano) para conferir potencial eletrocinético positivo aos nanossistemas em pH correspondente ao do ambiente biológico tumoral (6,8).

III. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção dos nanossistemas

Visando o desenvolvimento de nanocompostos repolarizadores de macrófagos, foi planejada a produção de 13 tipos de nanossistemas magnéticos de óxido de ferro, como ilustrado na Figura III.1.

Figura III.1 Esquema dos 13 nanossistemas magnéticos de óxido de ferro a serem desenvolvidos.



Fonte: Autoria própria.

Os nanomateriais de partida são as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM). Estas são submetidas a funcionalização com aminosilano e/ou recobrimento com sílica.

As NPM foram funcionalizadas com aminosilano em condições reacionais distintas quanto à proporção de água/etanol: (i) 2%/98% (NPM_ NH_2 2% H_2O) e (ii) 50%/50% (NPM_ NH_2 50% H_2O). Sendo esta última refuncionalizada na mesma condição (NPM_ NH_2 50% H_2O R).

O recobrimento com sílica, para formação de nanoestruturas núcleo-casca, foi realizado variando o teor de precursor de sílica, resultando em nanossistemas que se diferenciam pelo aumento da espessura da camada de sílica (NPM@SiO₂_100; NPM@SiO₂_300 e NPM@SiO₂_500). Após o recobrimento com sílica, as nanopartículas foram submetidas a uma primeira funcionalização com aminosilano (NPM@SiO₂_100_NH₂; NPM@SiO₂_300_NH₂ e NPM@SiO₂_500_NH₂) e, posteriormente, foram novamente funcionalizadas (NPM@SiO₂ refuncionalizadas: NPM@SiO₂_100_NH₂R, NPM@SiO₂_300_NH₂R e NPM@SiO₂_500_NH₂R).

As metodologias envolvidas para obtenção destes nanossistemas estão detalhadas a seguir.

3.1.1. Síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM)

As NPM foram preparadas pelo método de co-precipitação, de acordo com o procedimento descrito por Bedê e colaboradores (2017).

Para realizar a síntese das nanopartículas foi empregado o aparato experimental ilustrado na Figura III. 2. A unidade experimental é composta de um reator de vidro borossilicato encamisado com capacidade de 500 mL e com tampa contendo cinco entradas. Na boca central foi inserido um agitador mecânico com haste e impelidor tipo pá vertical, por uma boca lateral foi acoplado um condensador de refluxo e os reagentes foram adicionados por intermédio das demais bocas laterais. Além disso, foi utilizado um suporte universal com garra para sustentar e alinhar o conjunto reator-agitador, e um banho termostático de recirculação, garantindo a temperatura constante ao longo da reação.

Todos os reagentes utilizados na síntese estão listados na Tabela III. 1 e o procedimento via método de co-precipitação está ilustrado na Figura III.3. A metodologia consiste, inicialmente, da obtenção das soluções aquosas dos sais precursores (FeCl₂ e FeCl₃) da magnetita (Fe₃O₄). As soluções precursoras de Fe²⁺ e Fe³⁺ são misturadas em proporção equimolar e não estequiométrica a 60 °C. Por fim, a precipitação das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro é induzida pela adição de base, até alcançar a faixa de pH 9-11 no meio reacional.

Figura III. 2 Aparato experimental utilizado na síntese das nanopartículas.



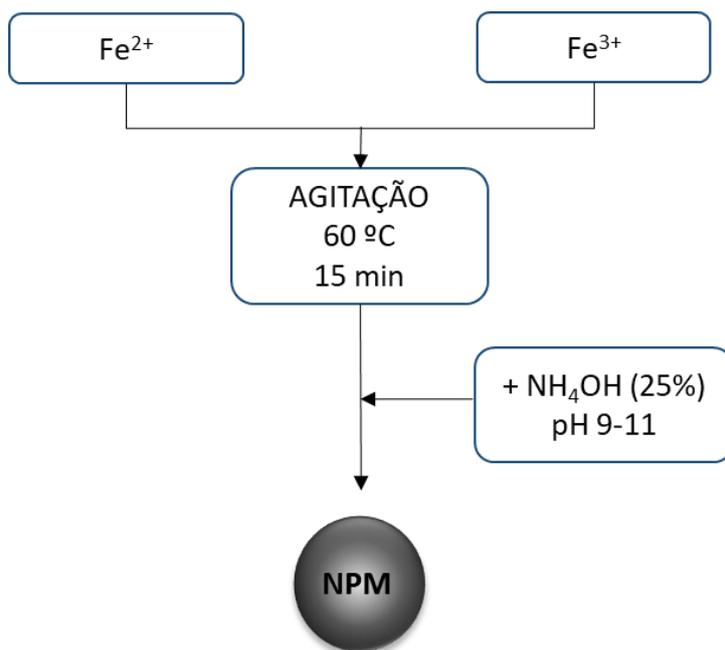
Fonte: A autoria própria.

Tabela III. 1 Reagentes empregados na síntese das NPM.

Reagente	Fórmula Química	Fornecedor	Grau de Pureza / %	Massa Molar (g.mol ⁻¹)
Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	Vetec Química Fina (Brasil)	> 97%	147,01
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	Vetec Química Fina (Brasil)	> 99%	277,00
Cloreto férrico hexahidratado	FeCl ₃ .6H ₂ O	Vetec Química Fina (Brasil)	≥ 97%	270,30
Solução de amônia	NH ₄ OH	Merck (Brasil)	-	35,05
Água Deionizada	H ₂ O	-	-	18

Fonte: A autoria própria.

Figura III.3 Resumo esquemático da síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM) por co-precipitação química.



Fonte: Autoria própria.

A solução de FeCl_2 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ foi preparada a partir da mistura de uma solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7,25 g) em água (40 mL) com outra solução contendo 13,90 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 40 mL de água. A mistura foi homogeneizada, utilizando um bastão de vidro, e pode-se observar a formação de um precipitado esbranquiçado (CaSO_4). A reação pode ser descrita pela Equação 3.1. Fez-se a filtração a vácuo da mistura e a lavagem do sólido com 20 mL de água deionizada, obtendo um volume final de 100 mL de solução. O precipitado foi descartado e o filtrado (FeCl_2 $0,5 \text{ M}$) foi reservado para ser utilizado na síntese das NPM.



O sulfato ferroso utilizado na obtenção da solução de FeCl_2 foi previamente purificado por recristalização, a fim de garantir a pureza dos íons Fe^{2+} . Para tal, o sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foi solubilizado em uma solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1:3 (p/v), sob aquecimento e agitação, com o auxílio de um bastão de vidro. Ao atingir a temperatura de 60°C , foram adicionadas pequenas quantidades de ferro metálico à mistura, até se obter uma solução saturada. No momento da adição, pode-se observar a efervescência do meio, indicando a ocorrência da reação (Equação 3.2) e formação de H_2 gasoso. A adição de Fe^0 foi interrompida quando não houve mais evolução de gases. A

presença do ferro metálico na mistura reacional provoca o deslocamento do equilíbrio da reação redox para a direita, gerando uma abundância dos íons Fe^{2+} em solução. Além disso, ao se oxidar, o ferro metálico evita a oxidação dos íons Fe^{2+} presentes no sólido, garantindo que este permaneça no estado de oxidação mais reduzido.

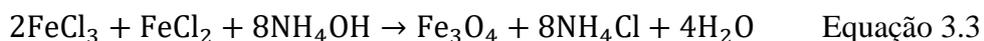


Em seguida, a mistura reacional foi filtrada a vácuo, a quente, para remoção das impurezas formadas. O filtrado, de coloração azul-esverdeada, foi resfriado em banho de gelo e submetido à recristalização induzida por atrito entre o recipiente e o bastão de vidro.

Os cristais azul-esverdeados obtidos foram filtrados a vácuo, lavados com água gelada durante a filtração para a remoção do excesso de ácido e, posteriormente, armazenados em um recipiente na geladeira

A solução de FeCl_3 0,5 M foi preparada por meio da dissolução de 13,52 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água deionizada. Após o preparo das soluções de FeCl_3 e FeCl_2 , ambas foram misturadas em um reator encamisado previamente aquecido a uma temperatura de 60 °C. Após a homogeneização completa, fez-se a adição de 25 mL de uma solução de NH_4OH (28-30% p/v), tornando o meio básico (pH entre 9 e 10). Neste momento, pode-se observar a formação do precipitado preto característico da magnetita.

A equação 3.3 descreve a reação dos precursores FeCl_3 e FeCl_2 empregados em proporção equimolar em meio básico para obtenção da magnetita



O sistema reacional foi mantido sob aquecimento e agitação durante 30 min. Posteriormente, fez-se o resfriamento da mistura até a temperatura ambiente e a sedimentação da fase sólida com o auxílio de um ímã. O sobrenadante apresentou aspecto límpido e foi descartado. O precipitado composto prioritariamente pelas NPM foi lavado com água deionizada até que fosse atingida a neutralidade do pH do meio. Finalmente, as nanopartículas foram ressuspensas em água e armazenadas.

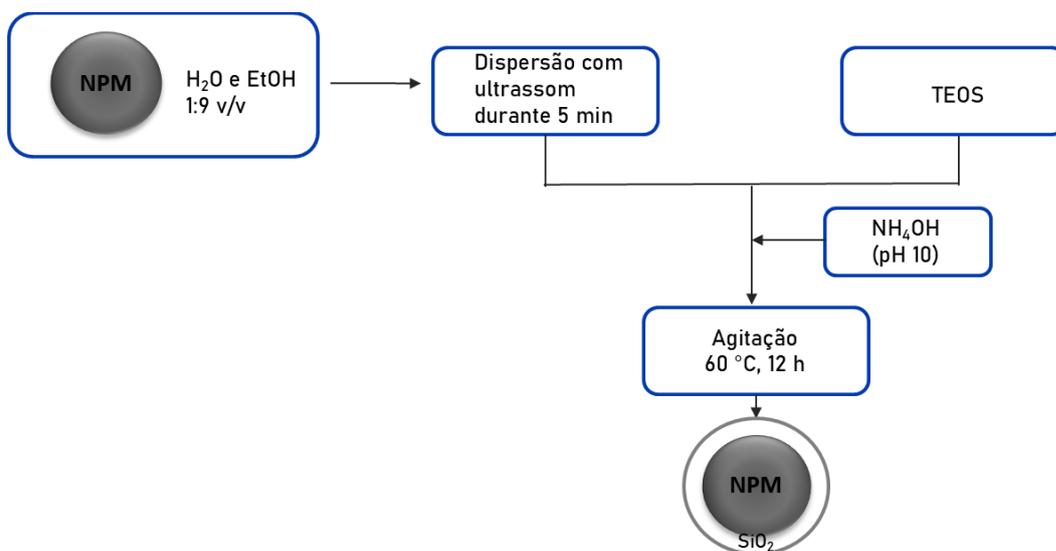
3.1.2. Recobrimento das NPM com sílica

O recobrimento das NPM com sílica foi realizado segundo o método de Stober modificado relatado por Santos e colaboradores (2017). O aparato experimental utilizado no procedimento de recobrimento com sílica é formado por uma incubadora shaker (NL-343-01, New Lab) com agitação orbital e aquecimento controlado, contendo garras, nas quais foram fixados os recipientes empregados como reatores. Todos os reagentes utilizados no recobrimento das NPM com sílica estão listados na Tabela III.2 e as etapas do procedimento estão ilustradas na Figura III. 4.

Tabela III.2 Reagentes empregados no recobrimento das NPM.

Reagente	Fórmula Química	Fornecedor	Grau de Pureza (%)	Massa Molar (g.mol ⁻¹)
Tetraetilortossilicato (TEOS)	Si(OC ₂ H ₅) ₄	Merck (Brasil)	99	208,33
Etanol Absoluto PA	C ₂ H ₆ O	Merck (Brasil)	99,95	46,07
Solução de amônia	NH ₄ OH	Merck (Brasil)	-	35,05
Água Deionizada	H ₂ O	-	-	18

Figura III. 4 Etapas do procedimento de recobrimento das NPM pelo método de Stober modificado.



Fonte: Autoria própria.

A metodologia de recobrimento consistiu inicialmente da ressuspensão de 500 mg de NPM em 100 mL de uma mistura de água e etanol na proporção 1:9 v/v em triplicata (considerando a variação posterior do teor do precursor de sílica). Cada suspensão obtida foi dispersa durante 5 min com o auxílio de uma sonda de ultrassom (Branson Digital Sonifier®, modelo 450, com 120 W de potência em frequência constante de 20 KHz). Após homogeneização, os sistemas foram submetidos à agitação na incubadora shaker descrita na seção 3.2 e foi feita a adição de 3 mL de solução de NH₄OH para ajustar o pH de cada meio para 10. Após a alcalinização, os sistemas foram submetidos a aquecimento (60 °C) e mantidos sob agitação. Após 10 min de estabilização da temperatura, foi feita a adição de TEOS em três diferentes volumes e proporções mássicas (SiO₂:Fe₃O₄): 100 µL (1:18,52); 300 µL (1:6,21) e 500 µL (1:3,73) em cada um dos sistemas. Após a adição do precursor de sílica, os sistemas foram vedados e mantidos sob agitação e aquecimento durante 12 h. Após o término do procedimento, o sólido obtido foi lavado 3 vezes com etanol, ressuspendido em água e armazenado.

3.1.3. Funcionalização das NPM com grupo amino

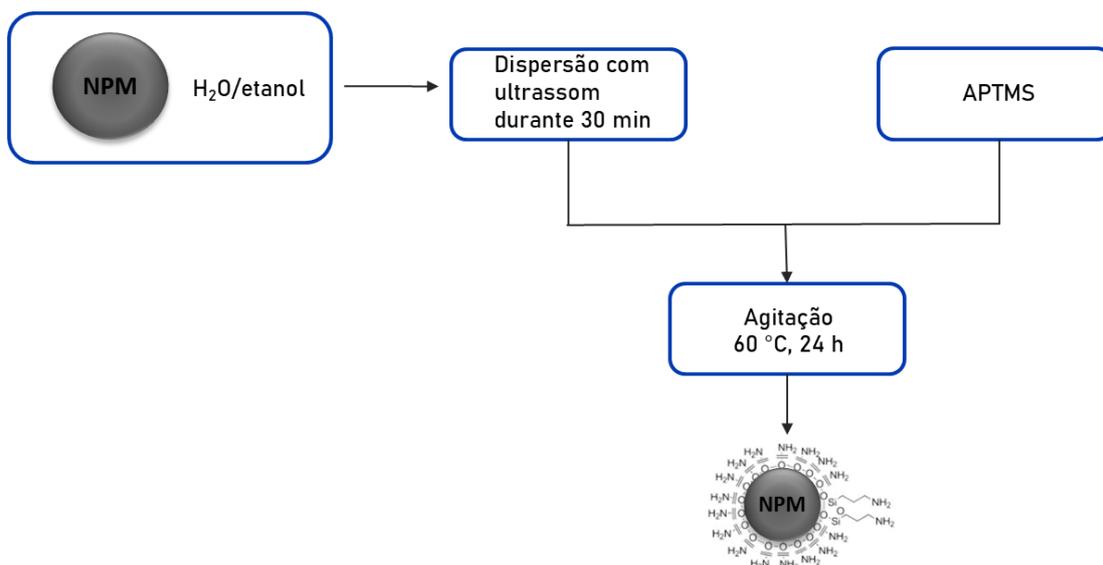
A funcionalização das NPM com grupo amino foi feita pelo método pós-síntese de silanização, segundo o procedimento descrito por Santos *et al.* (2018).

O aparato experimental utilizado a incubadora shaker descrita na seção anterior. Os reagentes empregados no procedimento estão dispostos na Tabela III. 3 e as etapas do procedimento estão ilustradas na Figura III.5.

Tabela III. 3 Reagentes empregados na funcionalização das NPM.

Reagente	Fórmula Química	Fornecedor	Grau de Pureza / %	Massa Molar (g.mol ⁻¹)
(3-aminopropil) trimetoxisilano (APTMS)	C ₆ H ₁₇ NO ₃ Si	MERCK	97	179,29
Etanol Absoluto PA	C ₂ H ₆ O	MERCK	99,95	46,07
Água Deionizada	H ₂ O	-	-	18

Figura III.5 Etapas do procedimento de funcionalização das NPM pelo método de silanização.



Fonte: Autoria própria.

A metodologia de silanização empregada no presente trabalho utilizou o reagente 3-aminopropil-trimetoxissilano (APTMS) como agente silanizante em meio aquoso e etanol como solvente.

No procedimento, inicialmente, foram ressuspensos 500 mg das nanopartículas de magnetita em 100 mL de uma mistura de água deionizada e etanol, em duplicata, nas proporções volumétricas de 1:1 (50% H₂O / 50% etanol) e 1:49 (2% H₂O / 98% etanol). As suspensões foram dispersas com o auxílio da mesma sonda de ultrassom descrita na seção anterior durante 30 min e, após este tempo, o sistema foi submetido à agitação e aquecimento à 60 °C. Após a estabilização da temperatura, fez-se a adição de APTMS na proporção mássica de 0,016:1 APTMS:NPM à suspensão final do material magnético. O sistema foi vedado e mantido sob agitação e temperatura 60°C durante 24 h. Ao final do experimento, o precipitado contendo as nanopartículas funcionalizadas (NPM-NH₂) foi sedimentado com o auxílio de um ímã e o sobrenadante descartado. Ao final do procedimento, o material foi lavado três vezes com etanol, ressuspensado em água e armazenado.

3.2. Caracterizações

Os nanossistemas desenvolvidos foram caracterizados por diferentes técnicas físico-químicas. Cada técnica foi empregada com um objetivo específico, portanto, nem todos os sistemas foram submetidos a todas as caracterizações. A Tabela III.4 correlaciona as técnicas adotadas para cada nanossistema.

Tabela III.4 Técnicas de caracterização físico-química empregadas para os nanossistemas e objetivos da caracterização.

Técnica de Caracterização	Nanossistema	Objetivo da caracterização
Difração de raios X (DRX)	NPM NPM@SiO ₂ _100 NPM@SiO ₂ _300 NPM@SiO ₂ _500	Avaliação estrutural
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	NPM NPM@SiO ₂ _100 NPM@SiO ₂ _300 NPM@SiO ₂ _500 NPM_NH ₂ _50%H ₂ O_R	Avaliação morfológica
Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	NPM NPM_NH ₂ _2%H ₂ O NPM_NH ₂ _50%H ₂ O NPM_NH ₂ _50%H ₂ O_R	Identificação de grupos funcionais Análise de composição elementar
Análise Elementar (CHN) Potencial Zeta (PZ)	NPM@SiO ₂ _100 NPM@SiO ₂ _300 NPM@SiO ₂ _500 NPM@SiO ₂ _100_NH ₂ NPM@SiO ₂ _300_NH ₂ NPM@SiO ₂ _500_NH ₂ NPM@SiO ₂ _100_NH ₂ _R NPM@SiO ₂ _300_NH ₂ _R NPM@SiO ₂ _500_NH ₂ _R	Identificação de potencial isoelétrico
Magnetometria (MxH) Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	NPM NPM_NH ₂ _50%H ₂ O_R	Magnetização Diâmetro hidrodinâmico

Fonte: Autoria própria.

Foi feita a avaliação estrutural dos nanossistemas NPM e NPM@SiO₂ pela técnica de difração de raios X (DRX) a fim de avaliar a influência do recobrimento com sílica

sobre a estrutura cristalina dos nanomateriais. Os nanossistemas funcionalizados não foram analisados neste aspecto, uma vez que não se espera alterações na estrutura cristalina por meio da adição de aminosilano (KRISTL *et al.*, 2024).

A análise da morfologia dos nanossistemas NPM e NPM@SiO₂ foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) com objetivo de identificar, principalmente, a camada de sílica ao redor das partículas e o impacto sobre o formato e tamanho dos nanomateriais. A morfologia do nanossistema NPM_NH₂_50%H₂O_R também foi investigada, pois este foi selecionado para ensaios biológicos (conforme seção 4.4). Complementarmente, foi realizada a avaliação das composições elementares (EDS, do inglês *Energy-dispersive X-ray Spectroscopy*) dos nanossistemas contendo sílica.

A identificação de grupos funcionais, composição elementar e potencial zeta foram realizadas para todos os nanossistemas, empregando as técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*), análise elementar de CHN e dispersão de luz eletroforética (DLE), respectivamente.

As medidas de magnetização e de diâmetro hidrodinâmico foram realizadas apenas para os nanossistemas selecionados para os ensaios biológicos (NPM e NPM_NH₂_50%H₂O_R), empregando as técnicas de Magnetometria (MxH) e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*)

3.2.1. Difração de raios X (DRX)

A análise da estrutura cristalina dos nanomateriais foi realizada por meio da técnica de DRX. Os difratogramas das amostras dos nanossistemas foram obtidos utilizando o equipamento Empyrean 3^a geração da Panalytical, disponível no Laboratório Multiusuário de Raios X do CBPF (LabX), operando na geometria Bragg-Brentano. Este equipamento utiliza uma fonte de raios X proveniente de um tubo de cobre com comprimento de onda $K\alpha = 1,54184 \text{ \AA}$ e conta com um detector 2D híbrido de estado sólido, segmentado em pixels, modelo PIXcel3D. As amostras, todas na forma de pó, foram preparadas sobre substrato de silício de baixo ruído (background zero) e as medidas foram realizadas varrendo 2θ de 10° a 90° , com passo de $0,0263^\circ$. As fases cristalinas

foram identificadas através de padrões da base de dados de estrutura cristalina inorgânica (ICSD).

3.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As características morfológicas, estruturais e de tamanho dos nanossistemas foram obtidas por análises de imagens geradas por MET. Para tal, as amostras foram dispersas em álcool etílico e submetidas a banho ultrassônico a 40 kHz por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram depositadas em grades de cobre recobertas com carbono e resina polimérica. As imagens foram obtidas com magnificação de 80.000x e 100.000x no microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução JEOL 2100F com voltagem de aceleração igual a 200kV e sistema de espectroscopia por dispersão de energia de raios-X (EDS) Noran Seven do Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (LABNANO).

3.2.3. Espalhamento dinâmico de luz e dispersão de luz eletroforética

Para analisar a distribuição de tamanho dos nanossistemas em suspensão foi empregada a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os valores de diâmetro hidrodinâmico foram obtidos no equipamento Zeta Sizer da Malvern Instruments, Nano series, modelo Nano-ZS do Laboratório de Engenharia de Polimerização (Engepol – UFRJ). As medidas foram realizadas nas amostras dos nanossistemas ressuspendidos em água deionizada, em meio de cultura contendo soro fetal bovino e em meio de cultura sem soro fetal bovino, estando todas as amostras na concentração de 0,1 mg/mL.

As medidas de potencial eletrocinético foram realizadas no mesmo equipamento utilizado para as medições de diâmetro hidrodinâmico, empregando a técnica de dispersão de luz eletroforética (DLE). Para o preparo das amostras, todos os nanossistemas foram ressuspendidos em uma solução de KCl 1 mM, de modo a obter as amostras na concentração de 0,1 mg/mL. Nos casos em que foram geradas curvas para determinação do ponto isoelétrico, o pH do meio foi ajustado para valores ácidos com adição de HCl em solução aquosa e para valores alcalinos com a adição de NaOH em solução aquosa.

3.2.4. Magnetometria (MxH)

As medidas de magnetização das amostras foram realizadas no aparelho Physical Property Measurement System (PPMS) DynaCool da Quantum Design do Laboratório de Magnetometria da Infraestrutura de Pesquisa Multiusuária para Materiais Avançados do CBPF - RJ, utilizando a opção Vibrating Sample Magnetometer (VSM) sob campo variável de 30.000 a -30.000 Oe, em temperatura fixa de 300 K. Para a preparação das amostras, as massas foram determinadas utilizando uma balança analítica Mettler Toledo modelo AB204 antes do início da caracterização magnética. Em seguida, as amostras foram envolvidas por uma fita de teflon e posicionadas no porta amostras de latão do equipamento.

3.2.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para caracterizar a composição química das NPM, bem como o recobrimento destas com sílica e a presença dos grupos funcionais amina foi utilizada a técnica de FTIR. As análises foram realizadas pelo Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano (IMA – UFRJ) no equipamento Perkin Elmer Spectrum versão 10.4.2 e modelo Frontier FTIR/FI. Para o preparo das amostras, os nanomateriais foram secos em estufa a 37 °C, o sólido foi diluído em KBr e então prensado como pastilha. Os espectros de FTIR foram obtidos em uma faixa de 500 a 4000 cm^{-1} com passo de 1 cm^{-1} .

3.2.6. Análise elementar (CHN)

A análise das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio presentes nas amostras de cada nanossistema foi realizada pelo Instituto SENAI de Inovação em Biossintéticos e Fibras do SENAI CETIQT no analisador elementar Flashmart da Thermo Scientific. Para o procedimento, as amostras foram submetidas à combustão em atmosfera de oxigênio puro e foi feita a detecção da condutividade térmica dos gases liberados na reação.

3.3. Ensaios biológicos

Para a realização dos ensaios biológicos, foi realizada uma seleção prévia dos melhores nanossistemas em termos de potencial de superfície (um sistema carregado positivamente e outro carregado negativamente) e magnitude de potencial eletrocinético no pH de interesse, tendo como objetivo a validação destes nanossistemas na repolarização de macrófagos, foco do presente estudo.

3.3.1. Obtenção dos monócitos

Os monócitos precursores dos osteoclastos foram isolados de sangue humano por gradiente de densidade (CAAE: 1612481960000528, número do parecer de aprovação do Comitê de ética: 3.525.362). Sangue humano de doadores voluntários foi coletado, diluído com uma solução salina de *Hanks' Balanced Salt solution (HANKs)* 1:1 e estratificado ainda na proporção 1:1, delicadamente em uma solução de *Ficoll-Paque*. As amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 400 rcf sem freios e sem aceleração e o anel na interface (*buffy coat*), contendo monócitos, linfócitos e plaquetas, foi coletado e lavado com PBS 1X e centrifugado a 570 rcf durante 10 minutos. O plaqueamento foi realizado em DMEM *high glucose* (Thermo Fisher) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) em garrafas de 75 cm².

3.3.2. Diferenciação dos macrófagos em M1 e M2

Para purificação dos monócitos obtidos na etapa anterior foi feito o plaqueamento destes em uma densidade de 150.000 células/cm² e, após 24 h, fez-se a adição de 50 ng/mL de fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) nos poços contendo as células. Após a adesão dos monócitos, foram feitas duas trocas do meio de cultivo para remoção das impurezas (células não aderentes), sendo a primeira troca após 3 dias e a segunda após 6 dias. Após a purificação dos monócitos, estes foram diferenciados em macrófagos M0, M1 e M2. Para diferenciação em macrófagos M0, foi realizada a adição de 5 ng/ml de PMA (*Phorbol Myristate Acetate*, PEPROTECH) durante 24 h. Em seguida, o meio foi substituído e as células cultivadas durante 72 h sem a presença de PMA. Após este tempo, para diferenciação dos macrófagos em M1, foram adicionadas 20 ng/ml de Interferon- γ e 250 ng/ml de LPS (lipopolissacarídeo de E.Coli, SIGMA)

durante 48 h; alternativamente, para diferenciação em macrófagos M2 foram adicionadas 30 ng/ml de IL-4 e IL-13 durante 48h.

3.3.3. Exposição dos macrófagos aos nanossistemas

As células de macrófagos M0, M1 e M2 foram plaqueadas durante 24h em uma densidade de 43000 células por poço de 96 (ensaio de MTT) e $4,8 \times 10^6$ células/ poço de 24 contendo lamínulas de vidro (LV). Em seguida, as células foram ressuspendidas em 100 μ l de volume de meio completo para cada poço e plaqueadas em forma de gota em cima das LV. Após uma incubação das células por 4h, foram adicionadas 300 μ l de meio adicional. Posteriormente, as células foram incubadas em atmosfera umidificada, com 5% CO₂ e 37°C durante 24h. Foi feita a ressuspensão das partículas dos nanossistemas selecionados em meio DMEM *high glucose* 10% SFB e 1% PS na concentração de 1 mg/ml. Após sonicação em banho de ultrassom para dispersão do conteúdo, as células previamente plaqueadas foram expostas a 20, 90 e 200 μ g/ml de cada sistema durante 24h.

3.3.4. Imunofluorescência

As células dos macrófagos M1 e M2 foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos e, em seguida, incubadas durante 30 minutos com NH₄Cl 20 mM, lavadas 3x com PBS e permeabilizadas por 30 minutos com Tritox X-100 0,1%. Antes da marcação com anticorpos, foi realizada uma incubação de 30 min com 3% de albumina para diminuir a interação inespecífica. As marcações foram realizadas por anticorpos primários *goat* anti ITGAM, marcador de M1 reconhecido pelo anticorpo secundário *donkey anti-goat* 488 (A11055) com marcação em verde e em seguida anticorpos secundários *mouse* anti MRC1, marcador de M2, reconhecido pelo anticorpo secundário *donkey anti-mouse* 568 (A10037) com marcação em vermelho. Cada anticorpo primário foi incubado *overnight* enquanto a marcação com anticorpo secundário foi realizada durante 2h à temperatura ambiente. Ademais, os macrófagos foram marcados com faloidina 675 (marcação em branco do citoesqueleto celular, que delimita o contorno da célula) e selada com o DAPI-*fluorshield*, contendo o corante nuclear DAPI para visualização no microscópio de fluorescência confocal Leica TCS SPE da Unidade Multiusuária de Microscopia Confocal do Instituto de Ciências Biomédicas.

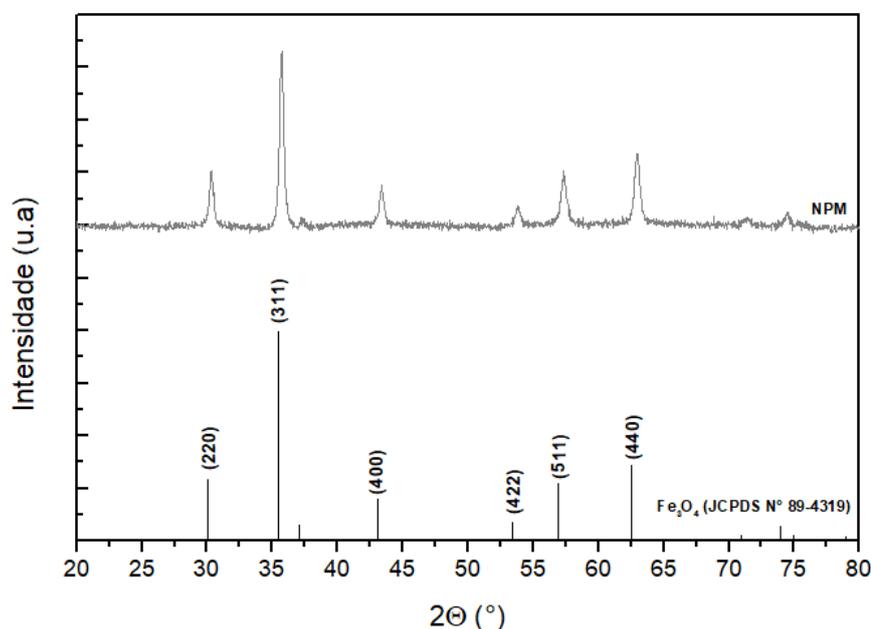
IV. Resultados e Discussões

4.1. Nanopartículas magnéticas (NPM)

4.1.1. Caracterização estrutural, morfológica e magnética

As NPM sintetizadas foram caracterizadas quanto à estrutura cristalina pela técnica de difração de raios X. A Figura IV.1 ilustra o difratograma obtido para a amostra de NPM e o padrão de picos de difração da magnetita (JCPDS N° 89-4319). O difratograma das NPM é compatível com a estrutura cristalina da magnetita, uma vez que as posições dos picos de difração obtidos para a amostra em 2Θ : 30.32° , 35.72° , 43.40° , 53.77° , 57.32° e 62.99° refletem a presença dos respectivos planos cristalográficos (220), (311), (400), (422), (511) e (440) característicos da magnetita.

Figura IV.1 Difratograma obtido para a amostra de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sintetizadas e o padrão de picos de difração da magnetita identificados com os respectivos planos cristalográficos (JCPDS N° 89-4319).

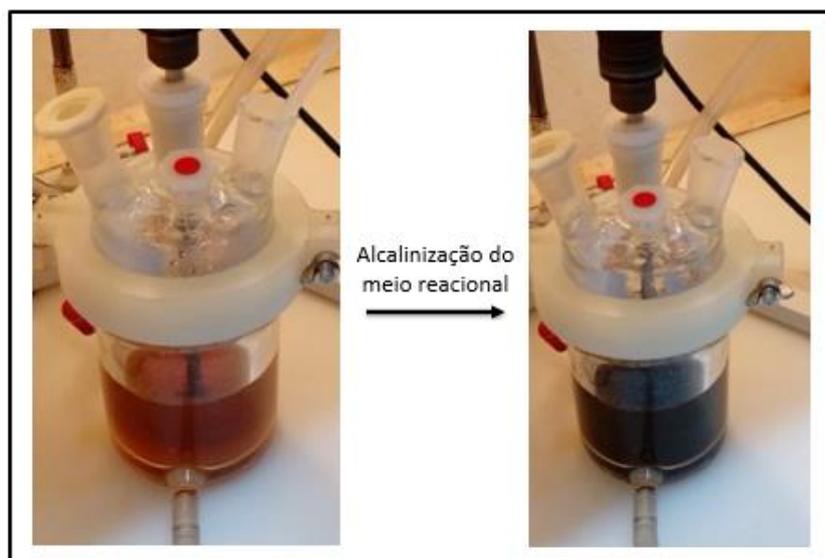


Fonte: Autoria própria.

É conhecida a similaridade entre as estruturas cristalinas e, conseqüentemente, os padrões de difração da magnetita (Fe_3O_4) e maghemita, ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (KIM *et al.*, 2012). Neste sentido, a técnica de difração de raios X é insuficiente para a diferenciação das

fases, sendo necessárias outras técnicas de caracterização que serão discutidas ao longo desta seção. Por outro lado, o pH básico do meio reacional empregado na síntese e a coloração preta do sólido final sugerem fortemente o predomínio da fase da magnetita na composição das NPM, uma vez que a maghemita possui coloração marrom avermelhada (WINSET *et al.*, 2019; SAATCI *et al.*, 2022). A Figura IV.2 ilustra a mudança da coloração do meio reacional de ocre para preto após a alteração do pH.

Figura IV.2 Transição da coloração do meio reacional após o ajuste do pH para 10.



Fonte: Autoria própria.

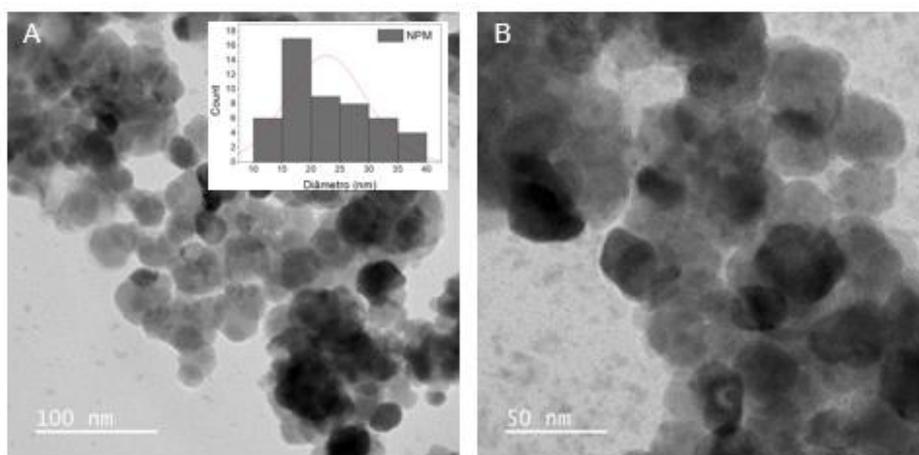
O diâmetro médio do cristalito (L_c) da amostra de NPM pode ser calculado, com base no difratograma da amostra, pela Equação de Scherrer (Equação 4.1), que estabelece a relação desta grandeza com: a largura à meia altura do pico de difração de maior intensidade (β); o ângulo de difração (θ) referente a tal pico; a constante de proporcionalidade ($k = 0,94$ para partículas esféricas de simetria cúbica) e o comprimento de onda de radiação para $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,1542$ nm) (SCHERRER, 1918; LANGFORD *et al.*, 1978).

$$L_c = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)} \quad (\text{Equação 4.1})$$

A partir do difratograma da amostra de NPM, foi obtido o valor de $\beta = 0,42^\circ$ referente a $2\theta = 35,72^\circ$. Aplicando a Equação 4.1, o valor de diâmetro médio de cristalito

calculado para NPM sintetizadas foi de 20 nm. A partir das imagens de microscopia eletrônica de transmissão obtidas (Figura IV.3), foi possível estimar o diâmetro de partícula (D_{MET}) de 22,6 nm para as NPM. Este resultado revela que o tamanho do cristalito estimado por DRX é compatível com o tamanho das partículas de NPM, evidenciando a dimensão nanométrica destas e sugerindo a propriedade superparamagnética dos nanomateriais, uma vez que o diâmetro está abaixo do diâmetro crítico para nanopartículas de magnetita (PUCCI *et al.*, 2022).

Figura IV.3 Imagens de MET obtidas com menor (A) e maior (B) magnificação para a amostra de NPM.

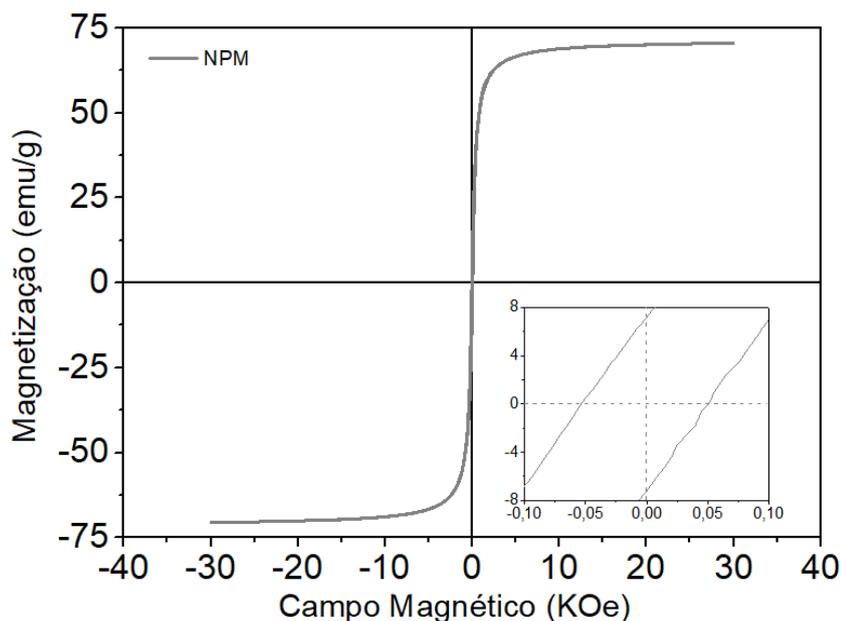


Fonte: Autoria própria.

Além da dimensão das partículas, as imagens demonstram o formato esférico destas e indicam a formação de aglomerados e/ou agregados. Aglomerados podem ser resultado de atração magnética e outras interações atrativas mais fracas, como forças de Van der Waals, entre os nanomateriais durante a dispersão da amostra para a análise (FADLI *et al.*, 2019; GUTIÉRREZ *et al.*, 2019). Agregados são formados pela interação permanente (coalescência cristalina) e espontânea entre os nanocristais primários de NPM vizinhos durante a síntese e pode ocorrer em virtude da não utilização de agentes estabilizantes. Tais observações são comumente relatadas para nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas via método de co-precipitação (BUI *et al.*, 2018).

As propriedades magnéticas das NPM foram investigadas por meio das medidas de magnetização em função do campo magnético aplicado em temperatura fixa de 300 K, obtendo-se o gráfico ilustrado na Figura IV.4.

Figura IV.4 Curva de magnetização em função do campo magnético aplicado na temperatura fixa de 300 K para a amostra de NPM.



Fonte: Autoria própria.

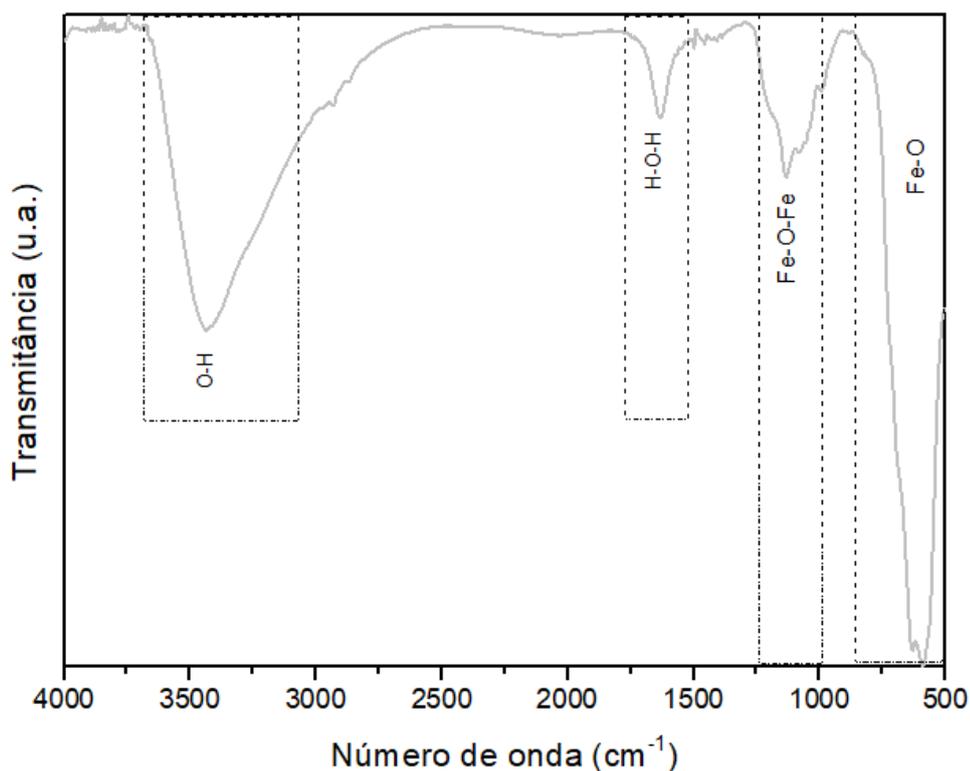
Os valores de magnetização de saturação (M_s), magnetização remanescente (M_r) e campo coercivo (H_c) obtidos através do gráfico de magnetização foram de, respectivamente, 70,5 emu/g, 7,2 emu/g e 0,05 KOe e corroboram com os relatados na literatura para nanopartículas de magnetita (ANDRADE *et al.*, 2012; DAOUSH *et al.* 2017). A razão entre os valores de M_r e M_s foi de 0,1, o que indica que a histerese da curva de magnetização é desprezível. A ausência de histerese na curva caracteriza e confirma o comportamento superparamagnético esperado para as nanopartículas sintetizadas (PUCCI *et al.*, 2022).

Daoush e colaboradores (2017) estudaram as propriedades magnéticas de nanopartículas de magnetita sintetizadas pelo método de co-precipitação. Foram obtidas partículas de 30 nm que exibiram valores de M_s de 88,1 emu/g, M_r de 12,65 emu/g e H_c de 0,2 KOe quando submetidas a um campo magnético variando de -20.000 Oe e 20.000 Oe à temperatura ambiente. A curva de magnetização revelou histerese praticamente desprezível e condizente com o baixo valor de campo coercivo, apesar da retentividade de 12,65 emu/g. A partir dos resultados, os autores concluíram o comportamento superparamagnético dos materiais e atribuíram a pequena retentividade de magnetização à possíveis defeitos de rede no limite dos cristais, o que pode interferir na propagação da ordem magnética.

4.1.2. Composição química

A composição química das NPM foi analisada por espectroscopia na região do infravermelho. O espectro obtido para a amostra de NPM está ilustrado na Figura IV.5.

Figura IV.5 Espectro de FTIR obtido para a amostra de NPM.



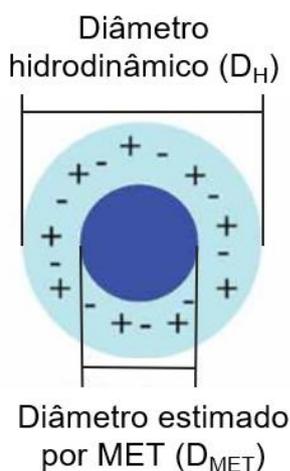
Fonte: Autoria própria.

A formação da partícula magnética de óxido de ferro é confirmada pela intensa banda de absorção na faixa de comprimento de onda de 570 a 630 cm^{-1} , acompanhada pela banda na faixa de 570 a 1300 cm^{-1} , uma vez que representam, respectivamente, a deformação axial da ligação Fe-O e a deformação angular da ligação Fe-O-Fe nos sítios tetraédricos do material (NASRAZADANI; RAMAN, 1993). Já as bandas localizadas nas faixas de comprimento de onda de 1500 a 1800 cm^{-1} e 2500 a 3750 cm^{-1} são atribuídas aos modos vibracionais da água, possivelmente, adsorvida na superfície das NPM. No menor comprimento de onda é caracterizada a deformação angular (flexão em tesoura) da molécula de água e no maior pode-se notar uma banda mais larga referente à sobreposição dos dois tipos de deformação axial, simétrica e assimétrica, da ligação O-H (ELDERDERI, 2020).

4.1.3. Propriedades coloidais

O diâmetro hidrodinâmico (D_H) representa o diâmetro das partículas estimado por MET (D_{MET}) acrescido da camada de solvatação ou dupla camada elétrica de moléculas de solvente ao redor da partícula (Figura IV.6), a qual pode ser estimada pela técnica de DLS (MAGUIRE et al., 2018).

Figura IV.6 Representação do diâmetro hidrodinâmico de uma partícula dispersa em um meio qualquer.



Fonte: Adaptado de Maguire et al., 2018.

Por ser uma propriedade coloidal, O D_H não é fixo e depende do meio de dispersão e da força das interações feitas entre a superfície da partícula e as moléculas do solvente. A estimativa do D_H por DLS utiliza como aproximação a partícula sendo uma esfera rígida com mesmo coeficiente de difusão e, portanto, representa o tamanho aparente da partícula solvatada (MAGUIRE et al., 2018).

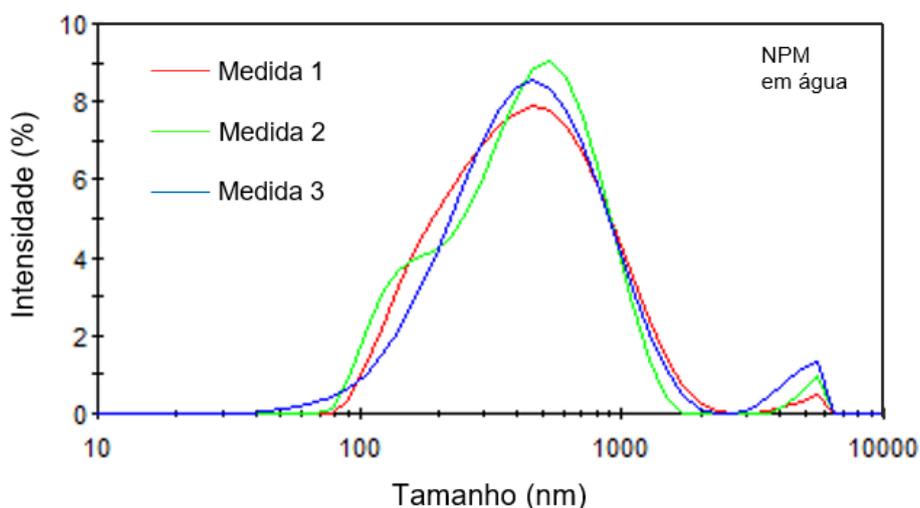
Além disso, o D_H corresponde à média ponderada dos tamanhos estimados para as partículas em suspensão e, por isso, vem acompanhado de um valor de desvio padrão e de um índice de polidispersão, o qual representa a amplitude da distribuição de tamanhos e, em termos práticos, o grau de não homogeneidade da dispersão. Valores de PDI inferiores a 0.1 expressam que a amostra é monodispersa ou perfeitamente uniforme; entre 0.1 e 0.4 indicam polidispersão moderada e superiores a 0.4 indicam que a amostra possui larga distribuição de tamanho (GALEANO et al., 2021).

Em virtude da elevada energia superficial e atração magnética, nanopartículas magnéticas frequentemente tendem a se aglomerar em dispersão aquosa. Desta forma,

para este caso, é esperado um índice de polidispersão de moderado a amplo (ENGELMANN et al., 2017).

A análise de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das NPM dispersas em água foi investigada (Figura IV.7), empregando a técnica de DLS. A distribuição é dada pela intensidade de espalhamento da luz em função do diâmetro das partículas.

Figura IV.7 Curvas de distribuição de tamanho hidrodinâmico da amostra de NPM dispersa em água deionizada.



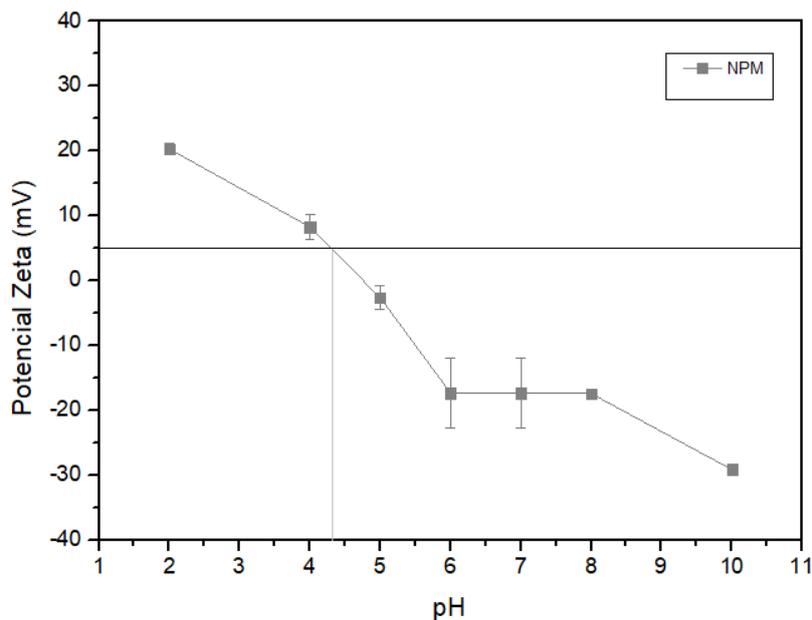
Fonte: Autoria própria.

As curvas obtidas para as medidas 1, 2 e 3 realizadas nas NPM revelam uma distribuição bimodal de tamanhos, com o predomínio da população de partículas com diâmetro hidrodinâmico centrado em 500 nm. A existência de uma segunda população (com baixa intensidade) com D_H na ordem de micrômetros, pode representar a formação de grandes aglomerados, mas em princípio não deve ser considerada, uma vez que extrapola a sensibilidade da medida, que apresenta confiabilidade apenas até 1000 nm. Portanto as NPM dispersas em meios aquoso, com auxílio de ultrassom, mas sem adição de qualquer agente de suspensão ou estabilizante, apresentaram D_H centrado em 500 nm, considerando uma distribuição de 50 a 2000 nm. Considerando toda a faixa de distribuição e o diâmetro médio de 20 nm medido por MET, pode-se inferir que as partículas se apresentam em solução de maneira tanto monodispersa quanto dispersas na forma de aglomerados formados por diferentes quantidades de partículas (ENGELMANN et al., 2017).

O incremento de tamanho da partícula apresentado pelo perfil de distribuição obtido por DLS (Figura IV.7), comparado ao histograma obtido para as imagens geradas por MET, é coerente, dada a tendência de aglomeração das nanopartículas em meio aquoso e ao incremento de tamanho que pode ser atribuído à camada de solvatação nas partículas e/ou aglomerados. O valor de PDI estimado foi de 0,33 e confirma a polidispersão moderada esperada para as NPM sintetizadas (GALEANO et al., 2021).

Para complementar as caracterizações de dispersão coloidal das NPM em meio aquoso, foi avaliado o potencial eletrocinético das NPM dispersas em solução aquosa de KCl 1,0 mM. Para tal, foram realizadas medidas de potencial zeta em função do pH do meio, que variou entre 2 e 10, como demonstrado na Figura IV.8.

Figura IV.8 Curva de potencial zeta em função do pH do meio obtida para as NPM dispersas em solução aquosa de KCl 1mM.



Fonte: Autoria própria.

A variação do potencial zeta de acordo com a mudança do pH do meio reflete a concentração das espécies iônicas H^+ e OH^- em solução, que influenciam no equilíbrio de cargas na superfície das NPM. Em valores de pH menores (meio ácido), ou seja, com o aumento da concentração dos íons H^+ , foi provocada a protonação das hidroxilas superficiais em OH^{2+} . Neste caso, houve o aumento da densidade de cargas positivas que se refletiu em valores positivos de potencial zeta (MATTER et al., 2020). Em valores maiores de potencial zeta (meio alcalino), o aumento da concentração de OH^- causou a

desprotonação das hidroxilas superficiais e conversão destas espécies em O^- , o que aumenta a densidade de cargas negativas na superfície das NPM e proporciona valores de potencial zeta negativos em dispersão (ZHANG, J. et al, 2020). Além disso, pode-se notar a ocorrência do ponto isoelétrico em valor de pH próximo a 4,5, o qual corrobora com valores descritos na literatura para nanopartículas de magnetita obtidas por coprecipitação (SOARES et al., 2019; SHARMA et al., 2018). Cabe ressaltar que no valor de pH correspondente ao tumoral (pH 6,8), as NPM exibiram potencial eletrocinético de carga negativa e módulo em torno de 20 mV.

A estabilidade coloidal das NPM também pode ser avaliada pelas medidas de potencial zeta, uma vez que é estabelecido que nanodispersões com potencial maior ou igual a ± 30 mV geralmente exibem considerável estabilidade (SOUZA et al., 2023). Neste sentido, a curva de potencial das NPM revela que o nanossistema tem baixa estabilidade em água em grande parte da faixa de pH avaliada, com predomínio das forças atrativas de Van der Waals e consequente aglomeração.

Em pH a partir de 10, o sistema adquiriu valor de potencial zeta próximo a - 30 mV e, portanto, maior estabilidade. Neste caso, a elevada concentração de íons OH^- , possivelmente, promoveu a adsorção destas espécies na superfície das partículas, expandindo a dupla camada elétrica e aumentando o valor de potencial zeta. Com esta magnitude, as forças de repulsão superam as de atração, evitando a aglomeração das nanopartículas (MONTES et al., 2019). No entanto, este valor de pH não é compatível com aplicações biológicas. Portanto as NPM em meio biológico tendem a aglomerar.

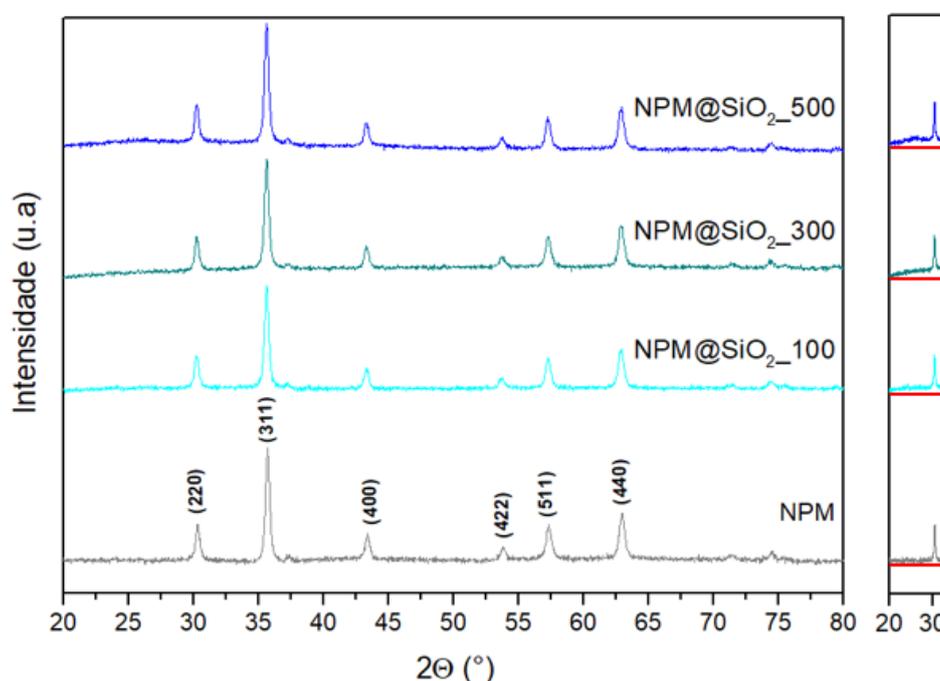
Para considerações relativas a condições biológicas, a abordagem aqui apresentada é simplista. Portanto, uma análise mais aprofundada será feita na seção 4.5.1, levando em consideração a influência de outros analitos comumente presentes em fluidos biológicos.

4.2. Recobrimento com sílica (NPM@SiO₂)

As NPM foram recobertas com sílica com a finalidade de promover o aumento da quantidade de hidroxilas na superfície dos nanossistemas e, assim, aumentar a densidade de grupos amino adicionados, posteriormente, na etapa de funcionalização (KIM et al., 2009; NASEH et al., 2024). Para este cenário, foram obtidos 3 tipos de nanossistemas com núcleo magnético e casca de sílica com espessuras distintas em cada caso: NPM@SiO₂_100 com menor espessura; NPM@SiO₂_300 com espessura intermediária e NPM@SiO₂_500 com maior espessura.

As estruturas cristalinas das NPM@SiO₂ foram investigadas pela técnica de difração de raios X e os respectivos difratogramas estão apresentados na Figura IV.9. Nota-se que todos os nanossistemas apresentam o padrão de difração característico da NPM, sugerindo a magnetita como fase predominante, mesmo após o recobrimento com sílica.

Figura IV.9 Difratogramas obtidos para as amostras de NPM@SiO₂_100, NPM@SiO₂_300 e NPM@SiO₂_500.



Fonte: Autoria própria.

Considerando que a sílica pura apresenta um halo amorfo no intervalo de 2θ entre 20° e 30°, há um leve indício deste padrão nas amostras recobertas com sílica, sobretudo na nanoestrutura recoberta com maior teor de sílica, evidenciando a modificação da

superfície dos nanomateriais (MENDONÇA et al., 2019). Para analisar de forma mais minuciosa este incremento de sílica nos nanossistemas, os difratogramas foram comprimidos na região do halo característico da sílica (2θ entre 20° e 30°), para que o sinal fosse potencializado nessa região (destaque à direita na Figura IV.9). Assim, confirma-se o incremento do sinal amorfo, correlacionado ao incremento do teor de sílica no nanossistema.

A partir dos difratogramas (Figura IV.9) foram estimados, pela equação de Scherrer, os diâmetros médios dos cristalitos de óxido de ferro contidos nas NPM@SiO₂ (Tabela IV.1). Vale ressaltar que apesar do recobrimento ter sido feito com sílica, o tamanho de cristalito estimado a partir dos difratogramas é referente ao óxido de ferro, uma vez que o pico analisado é o correspondente ao plano cristalográfico (311) da NPM. É possível observar que o diâmetro médio dos cristalitos de óxido de ferro (NPM) não sofreu variação significativa após o recobrimento com sílica, confirmando que o procedimento de recobrimento em meio aquoso não é agressivo à estrutura de óxido de ferro obtida previamente, não induzindo solubilização parcial dos cristalitos originais.

Tabela IV.1 Diâmetros médios de cristalito de NPM estimados para as amostras de NPM@SiO₂.

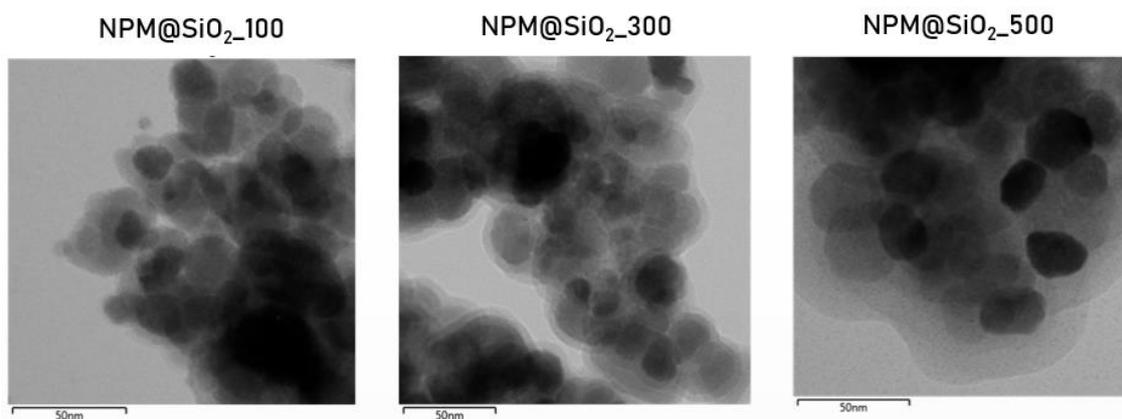
Amostra	2θ ($^\circ$)	β ($^\circ$)	d (nm)
NPM	35,72	0,42	20
NPM@SiO ₂ _100	35,63	0,42	21
NPM@SiO ₂ _300	35,64	0,42	21
NPM@SiO ₂ _500	35,63	0,43	20

Fonte: Autoria própria.

A morfologia e a composição química das NPM@SiO₂ foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS). As imagens de MET e os mapas de composições elementares de EDS obtidos estão ilustrados nas Figura IV.10 e Figura IV.11, respectivamente.

Nas imagens de MET (Figura IV.10), as NPM são identificadas pelas regiões escuras, consequência da maior densidade eletrônica do óxido de ferro em relação à sílica. O recobrimento com sílica pode ser indicado pelo contorno acinzentado nas partículas, uma vez que a casca de sílica apresenta menor eletrodensidade (TORRES et al. 2022). Neste sentido, é possível observar nas micrografias que o aumento do teor do precursor de sílica promoveu o aumento da espessura da camada de sílica sobre as partículas de óxido de ferro.

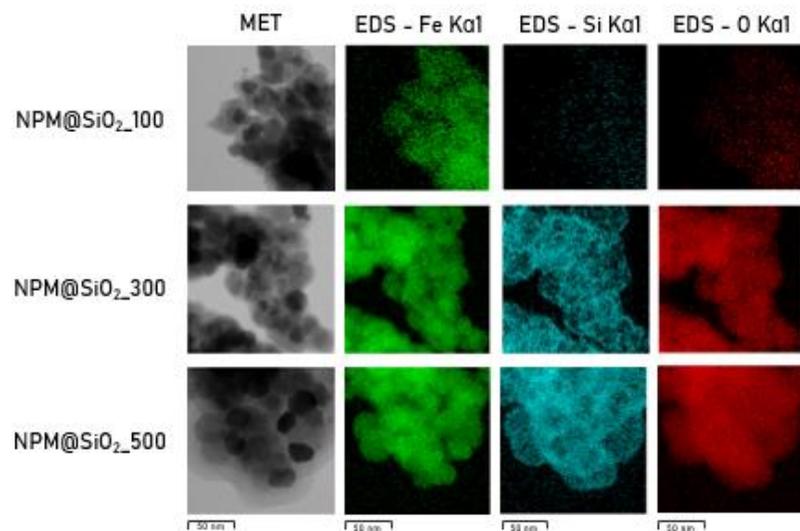
Figura IV.10 Imagens de MET das amostras de NPM@SiO₂.



Fonte: Autoria própria.

Para analisar a composição elementar das amostras, foram obtidos os mapas de EDS (Figura IV.11) A partir das intensidades de energia K α 1 características dos elementos Fe, O e Si, foram definidos empiricamente os percentuais mássicos de tais elementos nas amostras, como disposto na Tabela IV.2. Confrontando tais composições empíricas, e assumindo que a casca de sílica (SiO₂) apresenta uma composição mássica teórica de 47% de Si e 53% de O, foi possível estimar teoricamente o teor de SiO₂ em cada nanossistemas magnético. Assim, pode-se constatar que o teor de SiO₂ em relação à NPM varia de 7,6% a 36,1%, na composição do sistema NPM@SiO₂_100 para o sistema NPM@SiO₂_500, confirmando o incremento da casca dos nanossistemas com o aumento do teor de precursor de sílica empregado no procedimento de recobrimento das NPM. Este resultado de análise elementar corrobora o observado nas micrografias de transmissão. Além disso, o percentual de ferro em relação à NPM varia de 79,3% a 55,9% do sistema NPM@SiO₂_100 para o sistema NPM@SiO₂_500, sendo um indício da oxidação da partícula magnética com o incremento do teor de precursor de sílica no meio reacional (SANTOS et al., 2021).

Figura IV.11 Mapas elementares obtidos por EDS para as amostras de NPM@SiO₂.



Fonte: Autoria própria.

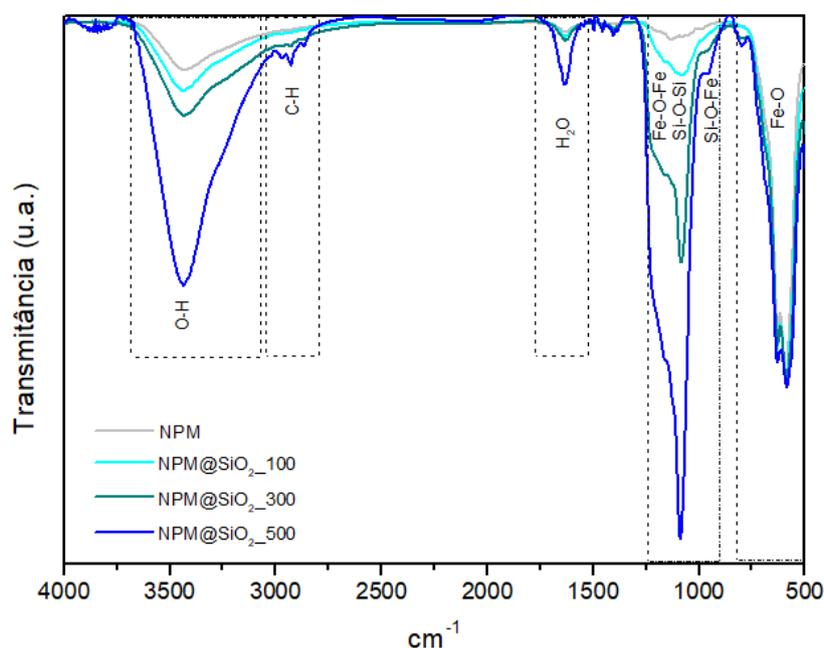
Tabela IV.2 Percentual mássico de Fe, O e Si presentes nas amostras de NPM@SiO₂ estimados por EDS.

Amostra	Fe (% p/p) empírico	O (% p/p) empírico	Si (% p/p) empírico	%SiO ₂ em NPM@SiO ₂ estimado	%SiO ₂ referente à NPM estimado	%NPM em NPM@SiO ₂ estimado	%Fe referente à NPM estimado
NPM@SiO ₂ _100	73,7	23,0	3,3	7,1	7,6	92,9	79,3
NPM@SiO ₂ _300	55,7	34,9	9,4	20,1	25,2	79,9	69,7
NPM@SiO ₂ _500	41,1	46,5	12,4	26,5	36,1	73,5	55,9

Fonte: Autoria própria

A composição química dos nanossistemas recobertos por sílica (NPM@SiO₂) também foi avaliada por espectroscopia na região do infravermelho (Figura IV.12). Assim como no caso das NPM, apresentado na seção anterior, os espectros das amostras de NPM@SiO₂ revelaram a presença das bandas características de deformação angular (1630 cm⁻¹) e axial (3200 a 3600 cm⁻¹) de água, provavelmente adsorvida, e de estiramento da ligação Fe-O (570 a 630 cm⁻¹) e deformação angular Fe-O-Fe (1130 cm⁻¹), esta última indicando a presença do óxido de ferro na composição do nanossistema.

Figura IV.12 Espectros de FTIR das amostras de NPM@SiO₂.



Fonte: Autoria própria.

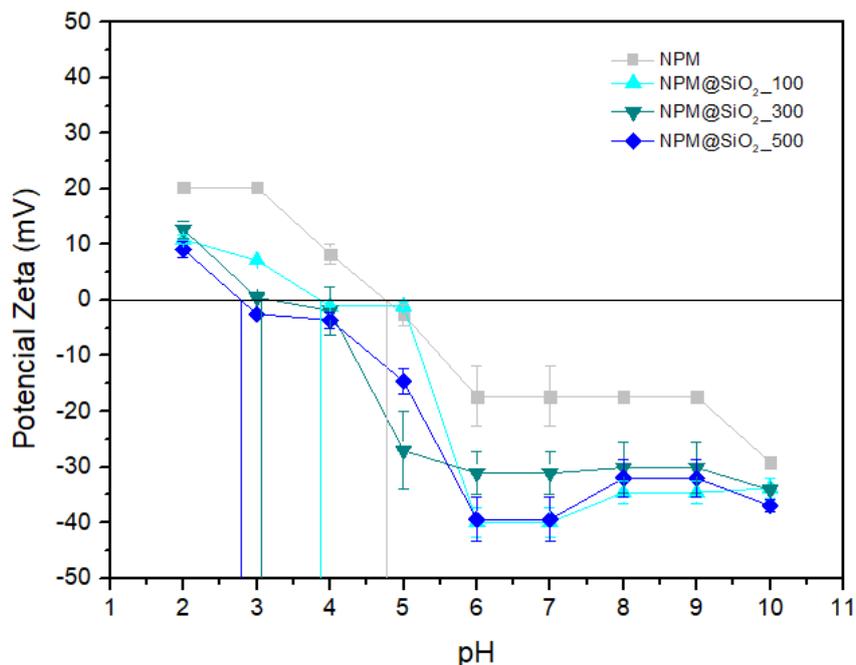
Após o recobrimento das NPM, nota-se o surgimento da banda de absorção na faixa de comprimento de 850 cm⁻¹ e 1250 cm⁻¹ (com máxima intensidade em 1080 cm⁻¹), que pode ser atribuída à deformação axial da ligação Si-O-Si (NASEH et al., 2024). Embora o comprimento de onda típico dessa deformação seja 1100 cm⁻¹, é relatado que o recobrimento de nanopartículas de óxido de ferro com sílica provoca o deslocamento desta banda para menores comprimentos devido à formação das ligações Fe-O-Si que interferem na ponte de siloxano (Si-O-Si) (MENDONÇA et al., 2019). Além disso, observa-se o aumento da intensidade desta banda com o aumento do teor de sílica, confirmando a formação da camada de sílica ao redor das partículas. Em particular, na amostra de NPM@SiO₂_500 é perceptível uma banda na região de 2930 cm⁻¹ que pode

ser atribuída à deformação axial de grupos etóxi não hidrolisados (proveniente do precursor de sílica, TEOS) na superfície do nanomaterial (MARIÑO et al., 2023).

Os potenciais eletrocinéticos das amostras de NPM@SiO₂, dispersas em solução aquosa de KCl 1,0 mM, foram investigados e comparados com os potenciais das NPM nas mesmas condições. As curvas de potencial zeta em função do pH do meio, variando de 2 a 10, estão dispostas na Figura IV.13. Comparando as curvas de potencial zeta, é possível notar o deslocamento do ponto isoelétrico das NPM para menores valores de pH após o recobrimento com sílica. Tal fenômeno era esperado, uma vez conhecido que o ponto isoelétrico da sílica se aproxima de 2 (WU et al., 2013), corroborando ao fato de que quanto maior o teor de sílica do nanossistema, menor o PI do sistema.

Além disso, para as amostras de NPM@SiO₂ foram obtidas magnitudes de potencial zeta acima de 30 mV, em módulo, em pH a partir de 6, e, portanto, pode-se concluir que o recobrimento aumentou a estabilidade coloidal das nanopartículas em água (SOUZA et al., 2023). Contudo, no valor de pH correspondente ao tumoral (pH 6,8), todos os nanossistemas *core-shell*, possuíram potencial eletrocinético de carga negativa.

Figura IV.13 Curvas de potencial zeta em função do pH do meio obtidas para as amostras de NPM e NPM@SiO₂ dispersas em solução aquosa de KCl 1mM.



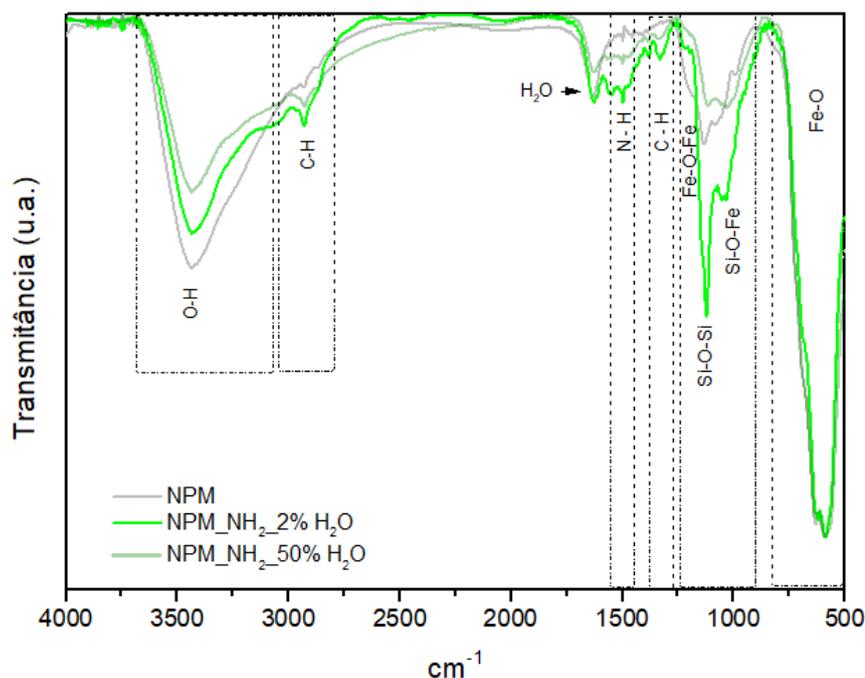
Fonte: Autoria própria.

4.3. Funcionalização da NPM (NPM_NH₂)

As NPM puras (discutidas na seção 4.1) foram submetidas à funcionalização com grupos NH₂, de acordo com o método de silanização. Inicialmente foi avaliada a influência da proporção de água/etanol no meio reacional no processo de funcionalização. Foram escolhidas duas proporções para estudo: (i) 2%/98% (NPM_NH₂_2% H_2O) e (ii) 50%/50% (NPM_NH₂_50% H_2O). A primeira proporção de solventes foi baseada em metodologia descrita na literatura (SANTOS *et al.*, 2018) enquanto a segunda consistiu de uma modificação do procedimento para avaliar se o aumento da quantidade de água no meio reacional favoreceria a etapa de hidrólise e, conseqüentemente, maior ancoramento de grupos amina (LIU *et al.*, 2013). É importante ressaltar que o maior grau de funcionalização foi visado com o objetivo de promover maior deslocamento do PI das NPM para maiores valores de pH e potencial eletrocinético positivo no pH correspondente ao tumoral.

Foi investigado o efeito da funcionalização sobre a composição química dos nanossistemas. Para tal, a identificação dos grupos funcionais após a funcionalização das NPM (NPM_NH₂) foi realizada a partir de análises por FTIR (Figura IV.14).

Figura IV.14 Espectros de FTIR das amostras de NPM_NH₂_2% H_2O e NPM_NH₂_50% H_2O comparados com o de NPM.

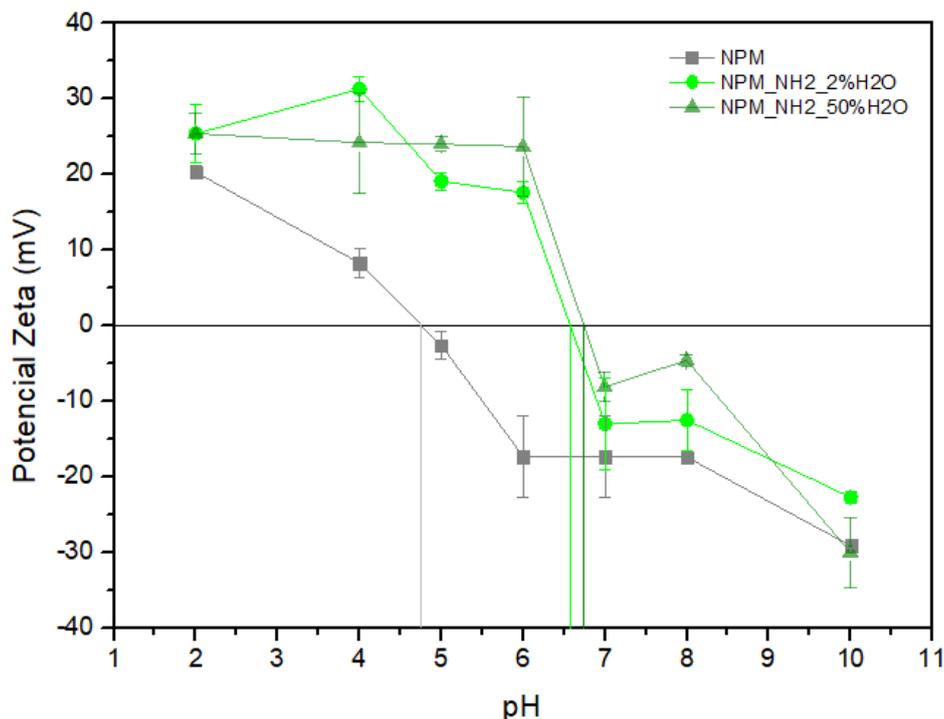


Fonte: Autoria própria.

Após a funcionalização com grupos amina, o espectro de FTIR das NPM apresentou aumento na intensidade da banda de absorção na faixa de 850 cm^{-1} a 1250 cm^{-1} e novas bandas nos comprimentos 1330 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} e 2930 cm^{-1} . A banda de 860 cm^{-1} a 1260 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação axial das ligações Fe-O-Si e Si-O-Si na superfície da partícula, assim como observado nos nanossistemas recobertos com sílica, sugerindo assim a formação de uma monocamada de sílica promovida pelo procedimento de silanização (NASEH et al., 2024). A diferença de intensidade de tal banda nos espectros sugere maior grau de funcionalização para o nanomaterial obtido com menor proporção de água. As bandas referentes a 1330 cm^{-1} e 1500 cm^{-1} diferem os nanossistemas funcionalizados dos recobertos com sílica e podem ser atribuídas, respectivamente, à deformação axial assimétrica da ligação C-H e à deformação angular da ligação N-H, oriundos do aminossilano (MARIÑO et al., 2023). Em 2930 cm^{-1} , a banda pode ser atribuída a vibrações de estiramento simétrico da ligação C-H presentes nos grupos propila (proveniente do agente silanizante, APTMS) ancorados na superfície do nanomaterial (GEMEAY et al., 2020). Tais observações são evidências da funcionalização dos nanomateriais.

O potencial eletrocinético das partículas amino-funcionalizadas dispersas em solução aquosa de KCl 1,0 mM foi avaliado em relação ao pH do meio (Figura IV.15). As curvas de potencial zeta confirmam a ocorrência da funcionalização, haja vista o deslocamento do PI das NPM para maiores valores de pH. O deslocamento apresentado é condizente com o ancoramento de grupos amina, uma vez que estes são básicos e possuem forte tendência à protonação em meio aquoso, aumentando a densidade de cargas positivas na superfície das partículas (KRISTL et al., 2024) Este aumento de cargas positivas na superfície das NPM eleva o ponto isoelétrico, pois, neste caso, é necessário um pH mais alto para a neutralização da carga líquida superficial (GEMEAY et al., 2020; YAKASAI et al., 2023).

Figura IV.15 Curva de potencial zeta das amostras de NPM, NPM_NH₂_2%H₂O e NPM_NH₂_50%H₂O dispersas em solução de KCl 1 mM.

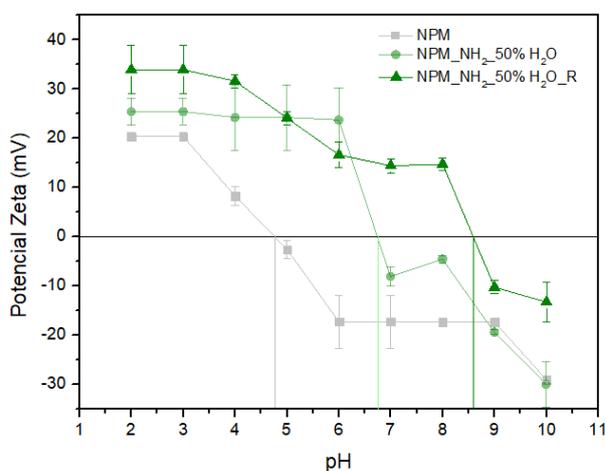


Fonte: Autoria própria.

Em suma, o maior grau de funcionalização foi atribuído ao procedimento com menor teor de água (maior intensidade da banda N-H em 1500 cm⁻¹, Figura IV.14). No entanto, é necessária a análise do potencial eletrocinético do nanossistema para confirmação de que a funcionalização com menor proporção de água favoreceu o ancoramento de grupos amino disponíveis para protonação, haja vista a complexidade de interações possíveis envolvendo estes grupos durante a silanização, como apresentado na seção 2.2.4 (ZHU et al., 2012). Observa-se que o desvio de PI (Figura IV.15) na amostra de NPM_NH₂_50%H₂O foi levemente maior do que na amostra de NPM_NH₂_2%H₂O, sugerindo maior presença de grupos amino disponíveis para protonação na superfície do nanossistema funcionalizado com maior proporção de água. Uma outra explicação relatada na literatura para este fenômeno é a de que o excesso de água no sistema favorece o aumento da quantidade relativa de grupos amino protonados (CARVAJAL et al., 1988). Portanto, pode-se concluir que maior grau de funcionalização não garante o maior deslocamento do ponto isoelétrico, uma vez que este depende da quantidade de grupos amino protonados ou disponíveis para protonação.

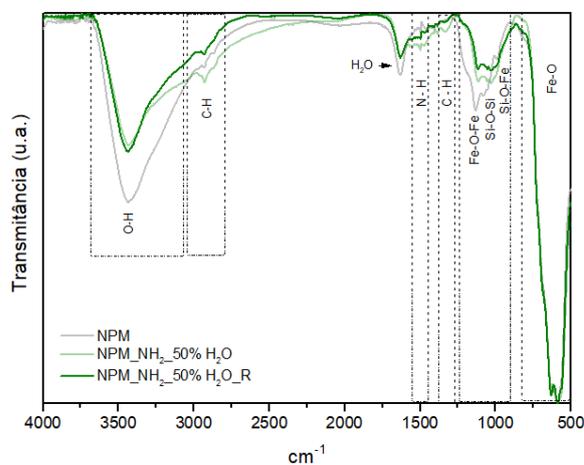
Uma vez que o ponto isoelétrico das amostras funcionalizadas se situou próximo à região de pH de interesse (tumoral) e, considerando a elevada instabilidade coloidal neste ponto, foi realizada mais uma etapa de funcionalização dos nanossistemas, empregando a maior proporção de água (NPM_NH₂_50%H₂O). A nova curva de potencial zeta da amostra depois da segunda etapa de funcionalização está ilustrada na Figura IV.16, bem como a Figura IV.17 ilustra o espectro de FTIR obtido para análise dos grupos funcionais presentes na amostra de NP_NH₂_50% H₂O_R, em comparação com as amostras da qual foi derivada.

Figura IV.16 Curva de potencial zeta em função do pH do meio obtida para a amostra de NPM_NH₂_50%H₂O_R dispersas em solução de KCl 1 mM e comparação com as curvas de potencial zeta das amostras de NPM e NPM_NH₂_50%H₂O.



Fonte: Autoria própria.

Figura IV.17 Espectro de FTIR da amostra de NPM_NH₂ 50% H₂O_R comparado com os de NPM e NPM_NH₂ 50% H₂O.



Fonte: Autoria própria.

Como esperado, nota-se (análise Figura IV.16) o aumento do desvio do PI para maiores valores de pH das nanopartículas com a repetição da etapa de funcionalização. Isto, sugere o aumento da disponibilidade de grupos NH_2 protonados e/ou protonáveis na superfície dos nanomateriais. Vale destacar, que o valor do ponto isoelétrico do nanossistema refuncionalizado (NPM_ NH_2 _50% H_2O _R) foi 8,6 e o potencial electrocinético revelou natureza positiva (+14,86 mV) em pH correspondente ao tumoral (6,8), diferentemente dos outros dois nanossistemas comparados (-2,29, para NPM_ NH_2 _50% H_2O e -17,35 mV, para NPM).

Apesar do apreciável desvio positivo do PI, associado a (re)funcionalização, nota-se pouca diferença entre os espectros de FTIR (Figura IV.17) obtidos para a amostra de NPM após a primeira e segunda funcionalização, utilizando a mesma proporção de água. Como diferencial, o espectro da amostra de NPM_ NH_2 _50% H_2O revelou intensidade levemente maior da banda característica das ligações Fe-O-Si ou Si-O-Si, N-H e C-H. Porém, como visto, anteriormente, a maior intensidade não implica no predomínio de grupos NH_2 livres ou protonados, os quais são fundamentais para o aumento da densidade de cargas positivas na superfície do nanossistema (CARVAJAL et al., 1988, LIU et al., 2013).

Os teores de nitrogênio, carbono e hidrogênio foram analisados após a funcionalização dos nanossistemas. A Tabela IV.3 reúne os valores obtidos para as amostras de NPM, NPM_ NH_2 _2% H_2O , NPM_ NH_2 _50% H_2O e NPM_ NH_2 _50% H_2O _R.

Tabela IV.3 Análise elementar de HCN das amostras de NPM antes e após a primeira e segunda etapa de funcionalização.

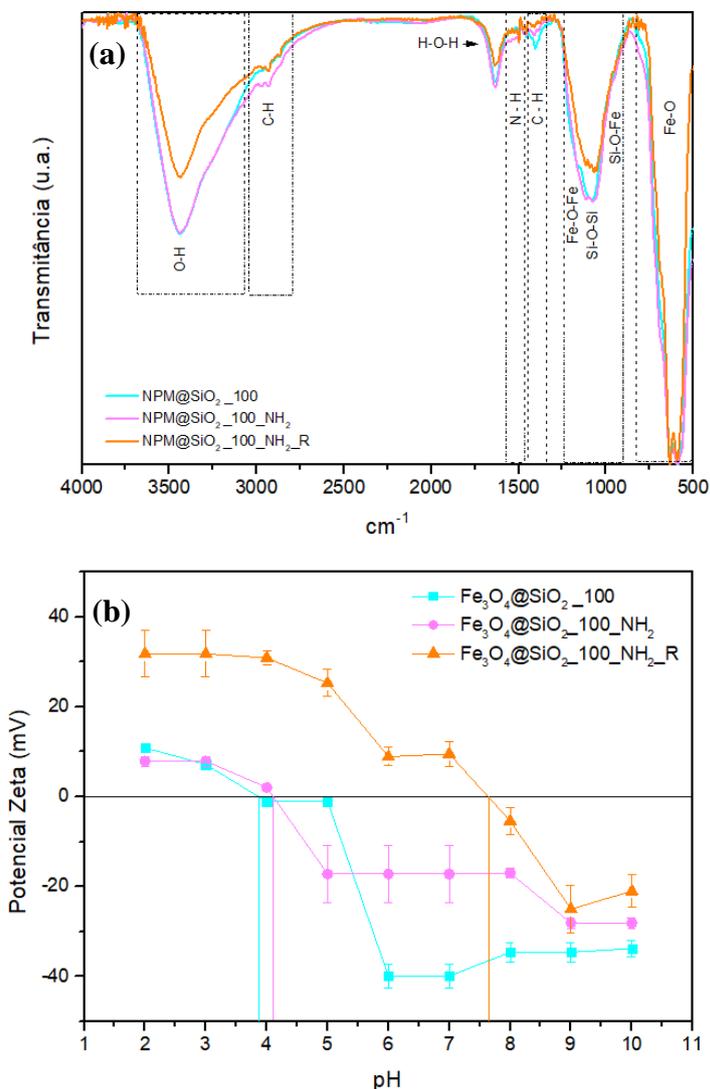
Nanossistema	Elemento (% em massa)		
	N	C	H
NPM	0,01	0,14	0,30
NPM_ NH_2 2% H_2O	1,17	3,39	0,99
NPM_ NH_2 50% H_2O	0,49	1,49	0,49
NPM_ NH_2 50% H_2O _R	0,32	1,07	0,37

Os resultados da análise elementar corroboram com os de espectroscopia da região do infravermelho. Como previsto, antes da funcionalização, foram obtidos valores desprezíveis de teor de N, C e H para a amostra de NPM. Na funcionalização com menor proporção de água, obteve-se o maior percentual mássico dos elementos analisados na composição dos nanomateriais e, na modificação com maior percentual de água, observa-se o decréscimo do percentual dos elementos após a segunda etapa de funcionalização. Uma possível explicação para este fenômeno é a de que o aumento da quantidade de água no sistema pode provocar a polimerização descontrolada dos grupos silanois formados pela hidrólise, o que reduz a extensão de ligações Fe-O-Si na superfície das NPM e, conseqüentemente, o ancoramento dos grupos amino (MARIÑO et al., 2023).

4.4. Funcionalização da NPM recoberta com sílica (NPM@SiO₂-NH₂)

As NPM recobertas com sílica (discutidas na seção 4.2) também foram submetidas a duas etapas de funcionalização com grupos NH₂, de acordo com o método de silanização, utilizando a maior proporção de água (50%). Os nanossistemas formados foram caracterizados quanto à composição química e ao potencial eletrocinético em meio aquoso. Os espectros de FTIR e as curvas de potencial zeta obtidos para os nanossistemas NPM@SiO₂_100, NPM@SiO₂_300 e NPM@SiO₂_500 após as duas funcionalizações estão ilustrados nas Figura IV.18, Figura IV.19 e Figura IV.20, respectivamente.

Figura IV.18 Espectros de FTIR (a) e curvas de potencial zeta em função do pH do meio (b) obtidos para as amostras de NPM@SiO₂_100, NPM@SiO₂_100_NH₂ e NPM@SiO₂_100_NH₂_R.



Fonte: Autoria própria.

Os espectros de FTIR das NPM@SiO₂_100 funcionalizadas (Figura IV.18 (a)) revelam a permanência das bandas características dos modos vibracionais das ligações Fe-O (570 a 630 cm⁻¹), Si-O-Si e Si-O-Fe (850 cm⁻¹ a 1250 cm⁻¹) e O-H (1630 cm⁻¹ e 3427 cm⁻¹), respectivamente. Isto sugere a preservação do material magnético e do revestimento de sílica e a presença de água no sistema. Por outro lado, pode-se notar o aparecimento da banda no comprimento de onda de 2930 cm⁻¹, a qual pode ser atribuída à ligação C-H devido à introdução do aminosilano, não sendo esta observada na amostra antes da funcionalização (apenas encapsulada em sílica). Além disso, é perceptível a baixa intensidade das bandas referentes às ligações C-H (1330 cm⁻¹) e N-H (1500 cm⁻¹)

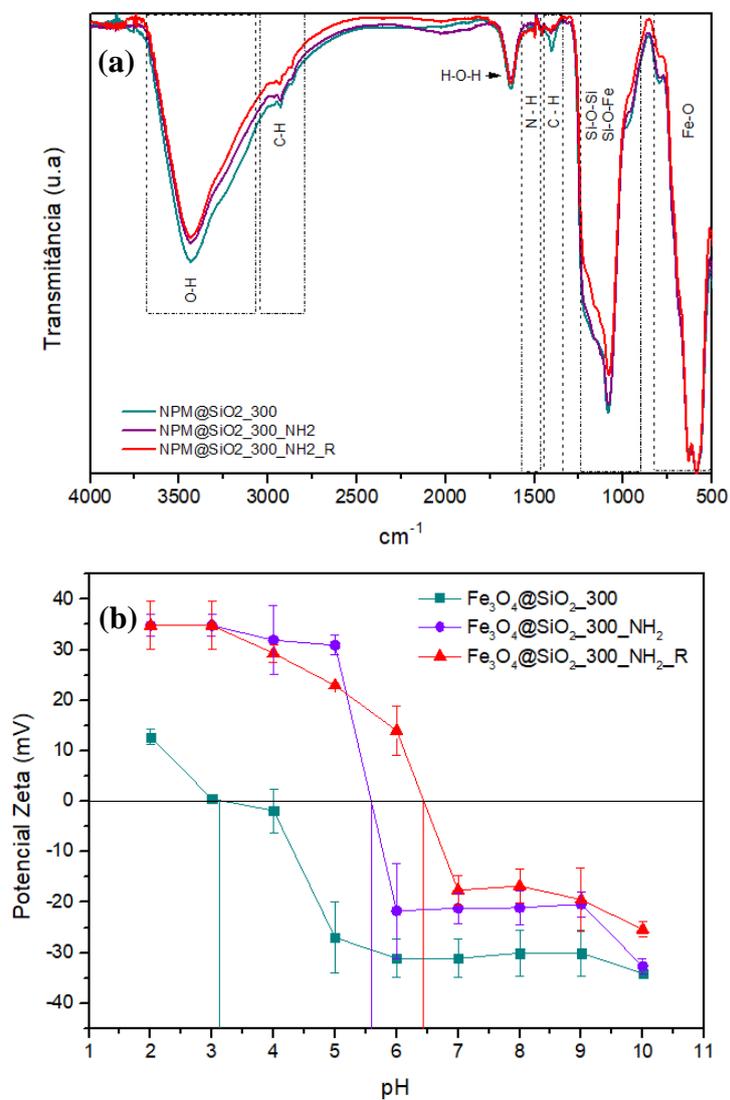
depois das duas funcionalizações em comparação aos nanossistemas não recobertos com sílica e funcionalizados (NPM_NH₂), podendo sugerir menor densidade de grupos amino ancorados (KRALJ et al. 2011).

As curvas de potencial zeta (Figura IV.18 (b)) evidenciam o deslocamento do PI do nanossistema recoberto com sílica para maiores valores de pH, confirmando a funcionalização dos materiais. Além disso, pode-se notar a redução da magnitude do potencial zeta após as funcionalizações, o que provoca a queda de estabilidade coloidal do nanossistema. Quanto à natureza da carga no pH de interesse (6,8), esta se apresentou negativa após a primeira funcionalização e positiva após a segunda, com módulo aproximado de 9,4 mV ao final dos processos de funcionalização.

Para as amostras dos nanossistemas com maior teor de sílica (Figura IV.19(a) e Figura IV.20(a)), são observadas as mesmas bandas de absorção na região do infravermelho. Em particular, a banda em 2930 cm⁻¹ também aparece para as amostras recoberta com sílica sem funcionalização (NPM@SiO₂), podendo ser indicativa de grupos siloxanos não hidrolisados durante o recobrimento com sílica. Assim como nos nanossistemas com menor camada de sílica funcionalizados (NPM@SiO₂_100_NH₂ e NPM@SiO₂_100_NH₂R), são observadas as baixas intensidades das bandas em 1330 cm⁻¹ e 1500 cm⁻¹ referentes às respectivas ligações C-H e N-H, sugerindo menor grau de funcionalização em relação às NPM_NH₂.

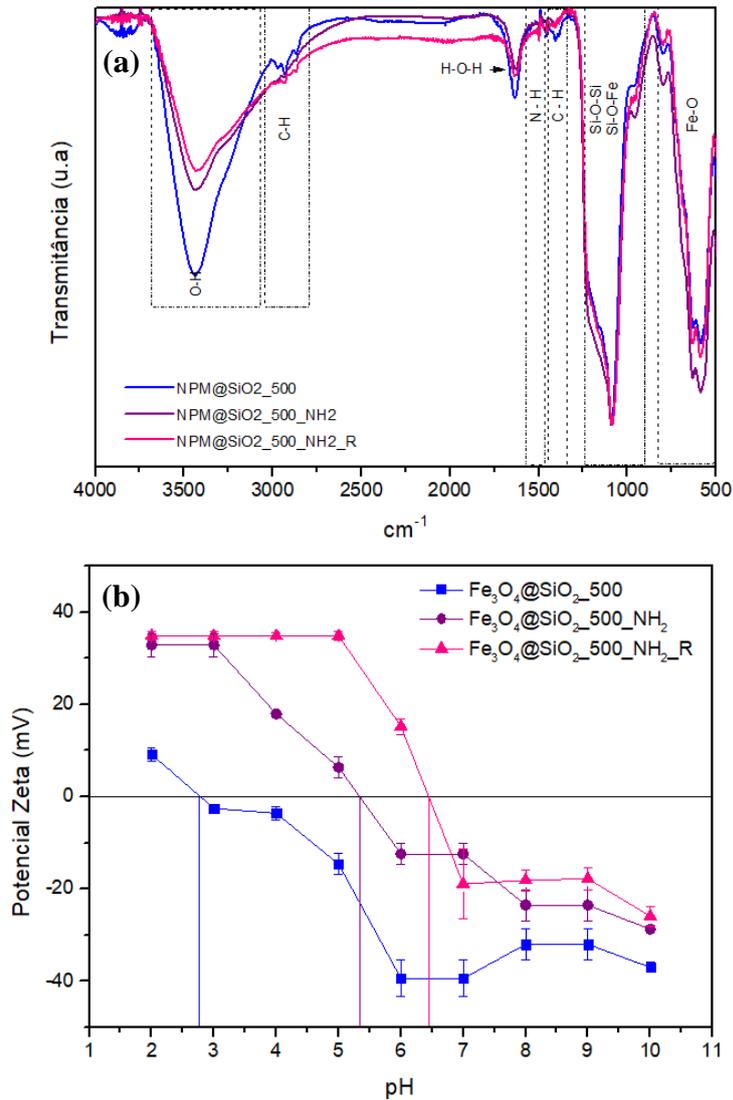
A análise de potencial zeta (Figura IV.19(b) e Figura IV.20(b)) revela, aproximadamente, o mesmo desvio positivo global do PI dos nanossistemas NPM@SiO₂_300 e NPM@SiO₂_500. Isto pode indicar que o aumento do teor de sílica não favoreceu o incremento de grupos amino disponíveis para protonação na superfície das partículas. Cabe ressaltar que, assim como observado para os nanossistemas com menor quantidade de sílica, ocorreu a redução do valor absoluto de potencial zeta e da estabilidade coloidal após a funcionalização. Além disso, os nanossistemas apresentaram potenciais eletrocinéticos negativos no pH 6,8 (correspondente ao tumoral).

Figura IV.19 Espectros de FTIR (a) e curvas de potencial zeta em função do pH do meio (b) obtidos para a amostra de NPM@SiO₂_300, NPM@SiO₂_300_NH₂ e NPM@SiO₂_300_NH₂_R.



Fonte: Autoria própria.

Figura IV.20 Espectros de FTIR (a) e curvas de potencial zeta em função do pH do meio (b) obtidos para a amostra de NPM@SiO₂_500, NPM@SiO₂_500_NH₂ e NPM@SiO₂_500_NH₂_R.



Fonte: Autoria própria.

A Tabela IV.4 demonstra os teores dos elementos nitrogênio, carbono e hidrogênio presentes nas amostras de NPM@SiO₂ funcionalizadas. A análise elementar revelou o aumento do percentual de N após a silanização de todos os nanossistemas encapsulados, o que corrobora com a análise de FTIR e indica a ocorrência do ancoramento de grupos amino nos materiais.

Tabela IV.4 Análise elementar de CHN das amostras de NPM@SiO₂ antes e após a primeira e segunda etapa de funcionalização

Nanossistema	Elemento (% em massa)		
	N	C	H
NPM@SiO ₂ _100	0,14	0,10	0,28
NPM@SiO ₂ _100_NH ₂	0,27	0,67	0,38
NPM@SiO ₂ _100_NH ₂ _R	0,36	1,04	0,43
NPM@SiO ₂ _300	0,08	0,05	0,28
NPM@SiO ₂ _300_NH ₂	0,24	0,60	0,44
NPM@SiO ₂ _300_NH ₂ _R	0,29	0,89	0,47
NPM@SiO ₂ _500	0,19	0,18	0,42
NPM@SiO ₂ _500_NH ₂	0,27	0,87	0,56
NPM@SiO ₂ _500_NH ₂ _R	0,24	0,89	0,54

No caso do nanossistemas NPM@SiO₂_100 nota-se que o incremento de N já é expressivo na primeira etapa de funcionalização, confirmando a eficiência de silanização das partículas e ancoragem dos grupos amino na superfície destas. A segunda etapa de funcionalização, ainda resulta em incremento de funcionalização, demonstrando que a área de superfície das partículas ainda não havia sido saturada na primeira etapa. Estes resultados corroboram os deslocamentos de PI (apresentados na Figura IV.18 (b)), que foi mais expressivo na segunda etapa de funcionalização.

Em contrapartida, os nanossistemas NPM@SiO₂_300 e NPM@SiO₂_500 apresentaram um incremento de N na primeira etapa de funcionalização, confirmando a ancoragem dos grupamentos amina, no entanto este teor se manteve praticamente constante na segunda etapa de funcionalização. Tal comportamento, também corrobora os deslocamentos de PI (apresentados na Figura IV.19(b) e Figura IV.20(b)), que apresentaram um deslocamento expressivo referente a primeira etapa de funcionalização, mas se mantiveram praticamente inalterados na segunda etapa.

Este comportamento do sistema NPM@SiO₂_100 diferente ao dos NPM@SiO₂_300 e NPM@SiO₂_500, se justifica pela análise elementar ser em proporções mássicas e as últimas amostras apresentarem uma contribuição significativa da massa relacionada a capa de sílica, como visto nas micrografias de transmissão (Figura

IV.10 da seção 4.2). Portanto, o número de partículas, para uma mesma massa de nanossistemas é maior para o primeiro nanossistema. Assim, este apresenta maior área superficial, podendo ancorar mais moléculas (grupamentos amino) na superfície, justificando o maior teor de funcionalização para o primeiro nanossistema na segunda etapa de funcionalização e a saturação da funcionalização das demais amostras já na primeira funcionalização (LIU et al., 2013).

Kralj e colaboradores estudaram a funcionalização com grupos amino de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com sílica. Os pesquisadores testaram a influência da concentração de aminossilano sobre o potencial eletrocinético dos nanossistemas. Para concentrações de até $5\mu\text{mol.m}^{-2}$ foi observado o deslocamento do PI para maiores valores de pH e o PI mais alto exibido foi de 6.4, assim como ocorreu com as amostras com maior teor de sílica no presente trabalho. Após essa concentração, foi constatado o desvio de PI para menores valores de pH. Os autores justificaram este fenômeno pela provável aglomeração estérica do silano após a saturação da superfície das partículas, o que favorece a policondensação descontrolada e homonucleação do silano (KRALJ et al., 2011).

Após esta análise, fica evidente a natureza complexa das interações de superfície envolvendo a funcionalização via silanização das NPM. Como visto nos resultados, embora as análises químicas por FTIR e teor de HCN corroborem e indiquem que a funcionalização ocorreu, não são preditivos absolutos sobre os valores de potencial eletrocinético, uma vez que, não basta os grupos amino integrarem a composição do nanossistemas, eles precisam estar disponíveis para protonação na superfície dos nanomateriais.

Neste sentido, para a aplicação almejada no presente trabalho, o potencial eletrocinético foi escolhido como variável crítica e, por isso, foi utilizado como principal critério para seleção dos nanossistemas a serem empregados nos ensaios biológicos.

4.5. Seleção dos nanossistemas

Os nanossistemas mais relevantes para a aplicação de interesse foram selecionados com base nos maiores valores absolutos de potencial eletrocinético positivo e negativo exibidos em pH correspondente ao tumoral (6,8), sendo ponderada também a simplicidade de obtenção do nanossistema. A Tabela IV.5 reúne os resultados desta variável para todos os 13 nanossistemas obtidos no presente trabalho.

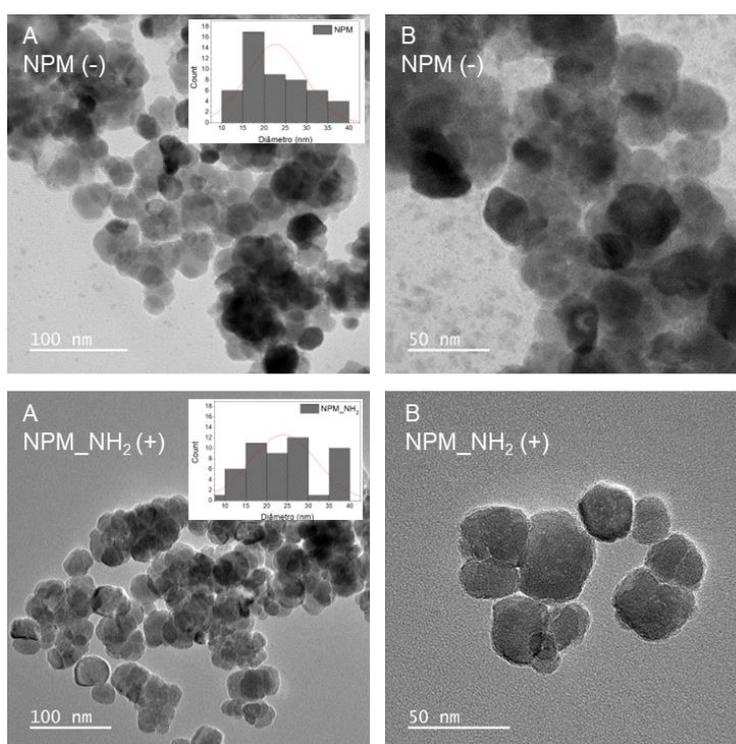
Tabela IV.5 Potencial eletrocinético dos nanossistemas obtidos em pH 6,8.

Nanossistema	Potencial Eletrocinético (mV) em pH 6,8
NPM	- 17,35
NPM_NH ₂ _2%H ₂ O	- 6,81
NPM_NH ₂ _50%H ₂ O	- 2,29
NPM_NH ₂ _50%H ₂ O_R	+ 14,86
NPM@SiO ₂ _100	- 39,89
NPM@SiO ₂ _100_NH ₂	- 17,25
NPM@SiO ₂ _100_NH ₂ _R	+ 9,40
NPM@SiO ₂ _300	- 30,92
NPM@SiO ₂ _300_NH ₂	- 21,39
NPM@SiO ₂ _300_NH ₂ _R	- 11,20
NPM@SiO ₂ _500	- 39,18
NPM@SiO ₂ _500_NH ₂	- 12,53
NPM@SiO ₂ _500_NH ₂ _R	- 12,17

Aplicando os critérios anteriormente explicitados, foram selecionados os nanossistemas NPM e NPM_NH₂_50%H₂O_R. O primeiro foi escolhido devido à exibição do potencial eletrocinético negativo e à simplicidade da forma de obtenção, uma vez que não foi aplicado nenhum procedimento de modificação do material. Já o segundo foi selecionado, pois apresentou maior magnitude de potencial eletrocinético dentre os de carga positiva. A fim de facilitar a identificação, os nanossistemas NPM e NPM_NH₂_50%H₂O_R serão referidos a partir deste ponto como NPM (-) e NPM_NH₂ (+), respectivamente.

A morfologia do nanossistema NPM_NH₂ (+) foi analisada e o diâmetro das partículas foi estimado por microscopia eletrônica de transmissão (MET), sendo ambos os resultados comparados com os apresentados na seção 4.1.1 para o nanossistema NPM (-) (Figura IV.21),

Figura IV.21 Imagens de MET com menor (A) e maior magnificação (B) obtidas para as amostras de NPM (-) e NPM_NH₂ (+).



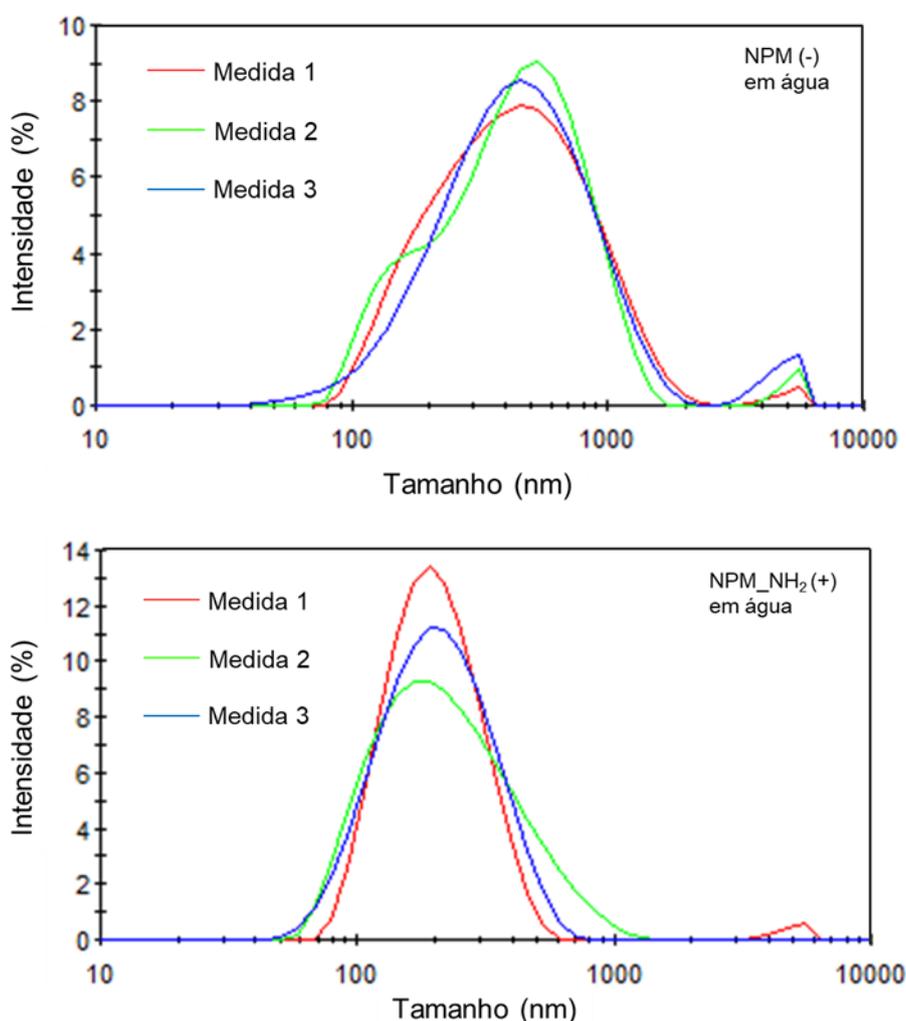
Fonte: Autoria própria.

As imagens de microscopia indicam que os nanomateriais mantiveram o formato esférico e a dimensão nanométrica após a funcionalização, sendo estimado o D_{MET} de 26,6 nm, compatível com o obtido para as NPM não modificadas (NPM (-)). Além disso,

comparando com as imagens de MET das NPM (-), é perceptível a redução da agregação e/ou aglomeração das partículas, o que pode ser ocasionado pela formação da fina monocamada de aminossilano ao redor das partículas (LIU et al., 2013).

A distribuição de tamanho das partículas de NPM_NH₂(+) dispersas em água foi obtida pela técnica de DLS e comparada com a apresentada na seção 4.1.3 para o nanossistema NPM (Figura IV.22).

Figura IV.22 Curvas de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das amostras de NPM (-) e NPM_NH₂(+) dispersas em água deionizada.



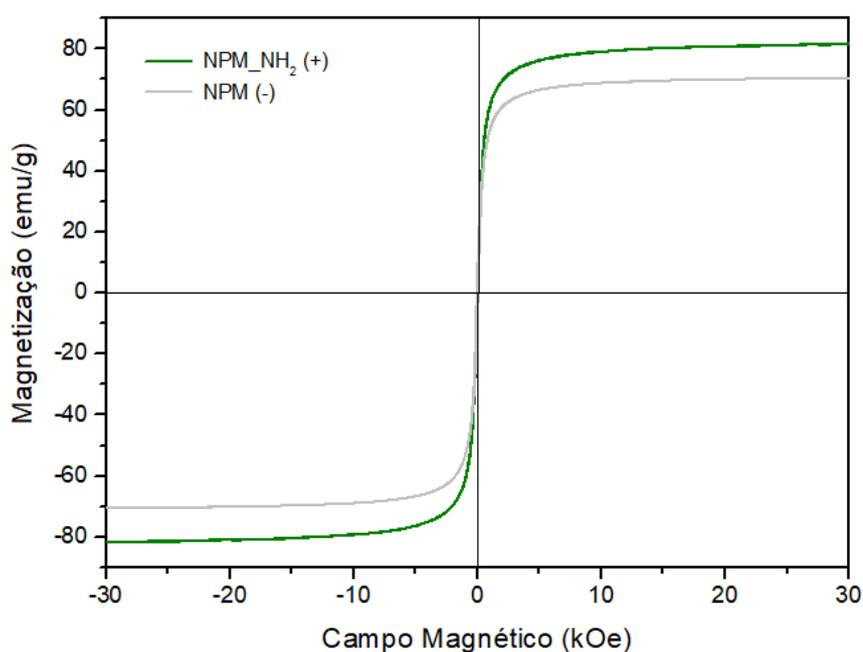
Fonte: Autoria própria.

Os gráficos das 3 medições para a amostra de NPM_NH₂(+) demonstram um pico principal em torno de 100 a 200 nm, o que significa que a maioria das partículas apresenta diâmetro hidrodinâmico centrado nesta faixa, e com largura similar nos 3 momentos de medição, evidenciando variações semelhantes e consistentes de tamanho. Além disso, a

medida 1 revela um segundo pico de menor intensidade situado na região de micrômetros, o que indica a existência de uma pequena parcela de partículas maiores ou aglomerados, assim como observado para o nanossistema NPM (-). O índice de polidispersão (PDI) estimado para a amostra de NPM_NH₂ (+) foi de 0,2 e o diâmetro hidrodinâmico (D_H) obtido foi de 184 nm, os quais corroboram com a distribuição observada na Figura IV.22. Ambos os valores de D_H e PDI são menores que os exibidos pelas partículas de NPM (-), bem como a distribuição de tamanho mais estreita. Tais resultados convergem com o leve aumento de estabilidade e diminuição da aglomeração esperados após a funcionalização, sendo esta última constatada nas imagens de microscopia (WU et al., 2008; KRISTL et al., 2024).

A Figura IV.23. ilustra a curva de magnetização obtida para os nanossistemas NPM_NH₂ (+) e NPM (-), sendo este último detalhado na seção 4.1.1.

Figura IV.23 Gráfico de magnetização em função do campo magnético aplicado na temperatura fixa de 300 K para as amostras de NPM (-) e NPM_NH₂ (+).



Fonte: Autoria própria.

As medidas de magnetização confirmaram o comportamento superparamagnético das NPM_NH₂(+), uma vez que os valores de Mr e Hc obtidos foram, respectivamente, 3,08 emu.g⁻¹ e 0,02 kOe, ou seja, desprezíveis, e a curva de magnetização não apresentou histerese (RODRIGUEZ et al., 2017). A magnetização de saturação (M_s), para este

sistema positivamente carregado, foi de $81,6 \text{ emu.g}^{-1}$ e é coerente com os valores apresentados para nanopartículas de magnetita (NGUYEN et al., 2021).

Embora não seja esperado o aumento do valor de M_s e a redução de H_c após as funcionalizações devido ao acréscimo de conteúdo não magnético no volume do nanossistema (YAMAURA et al., 2004), a distribuição de tamanho mais estreita observada para as partículas de NPM-NH₂(+) em comparação às partículas de NPM(-) depõe a favor do efeito observado. A distribuição mais estreita de tamanho pode provocar maior uniformidade de comportamento magnético, ou seja, menor anisotropia magnética, que favorece a elevação da magnetização de saturação média da amostra analisada (AGUIRRE et al., 2024)

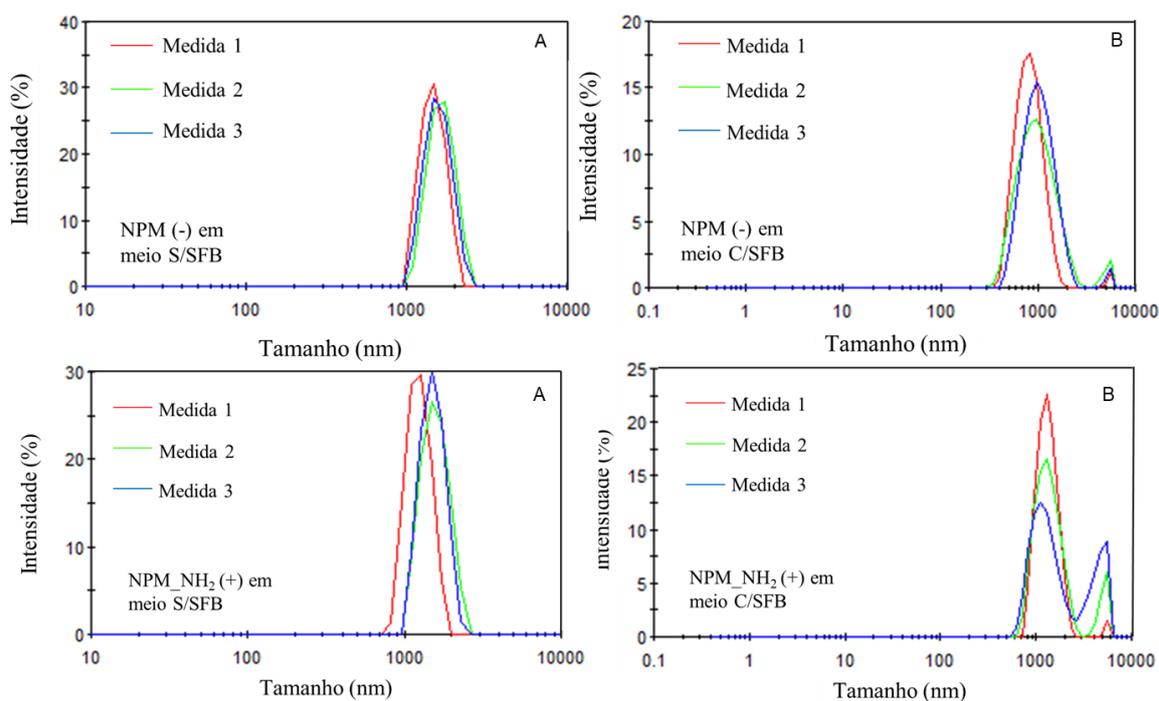
Para investigar a influência da modificação de superfície sobre as propriedades magnéticas de nanopartículas, Vestal e colaboradores estudaram a superfície de nanopartículas de MnFe₂O₄ antes e após a introdução de uma série de ligantes orgânicos. Os resultados revelaram a queda de H_c em, aproximadamente, 50% e o aumento de M_s em todos os casos. Os autores concluíram que o revestimento dos nanomateriais reduziu a anisotropia de superfície, a qual representa o grau de desordem dos spins desta região e, desta forma, produziu um efeito de liberação dos spins, que faz com que estes se alinhem mais facilmente durante a magnetização (VESTAL et al., 2003).

4.5. Ensaios biológicos

4.5.1. Comparação dos nanossistemas em meio biológico

Foi analisada a distribuição de diâmetro hidrodinâmico dos nanossistemas selecionados (de NPM (-) e NPM_NH₂ (+)) em meio de cultura com e sem soro fetal bovino (SFB) a fim de simular o tamanho dos sistemas nas condições mais próximas às empregadas nos ensaios biológicos. As curvas de distribuição de tamanho estão ilustradas na Figura IV.24 e os valores de D_H e PDI estão dispostos na Tabela IV.6.

Figura IV.24 Curvas de distribuição de tamanho hidrodinâmico das amostras de NPM (-) e NPM_NH₂ (+) dispersas em meio sem SFB (A) e em meio contendo SFB (B).



Fonte: Autoria própria.

Tabela IV.6 Diâmetro hidrodinâmico e PDI obtidos para as amostras de NPM (-) e NPM_NH₂ (+) dispersas em água e meio de cultura sem e com SFB.

Nanossistema	Diâmetro hidrodinâmico (nm) / PDI		
	Em água	Em meio S/SFB	Em meio C/SFB
NPM (-)	362 ± 12,43 / 0,33	1658 ± 39,58 / 0,31	838 ± 43,13 / 0,36
NPM_NH ₂ (+)	183 ± 2,85 / 0,20	1735 ± 59,35 / 0,36	1588 ± 78,40 / 0,33

No primeiro cenário, as 3 medidas feitas para os dois nanossistemas dispersos em meio sem SFB demonstram uma distribuição monomodal de tamanhos, ou seja, apenas um pico de intensidade, sugerindo que o a maior parte das partículas apresenta dimensão na ordem de micrômetro (acima da sensibilidade da técnica). Além disso, para a amostra de NPM (-), observa-se a quase sobreposição dos picos de intensidade, indicando pouca variação de distribuição de tamanho ao longo do tempo de medição. Para a amostra funcionalizada (NPM(+)), é perceptível uma leve diferença entre a posição do pico de intensidade da primeira medida para as outras duas, o que pode ser explicado pela tendência de aglomeração das partículas que conduziu ao aumento aparente de tamanho nas duas últimas medições. O incremento na ordem de tamanho observada pode ser resultado da adsorção de componentes do meio de cultura, como aminoácidos, sais inorgânicos e a glicose presente em grande quantidade (LLANOS et al., 2021). Além disso, a presença de íons em solução resulta em uma contração da dupla camada elétrica das nanopartículas, com redução da magnitude do potencial zeta e consequente aglomeração.

No meio contendo SFB, a distribuição de tamanhos de ambos os nanossistemas é bimodal, caracterizada por um pico de maior intensidade na região próxima a 1 micrômetro e outro de menor intensidade referente a 5 micrômetros. Como na primeira medida é indicada a existência de uma população de partículas de maior diâmetro, pode ser incluída como causa a formação de corona proteica nas partículas em decorrência da inclusão de SFB no meio. Além disso, nota-se a redução do diâmetro hidrodinâmico dos dois nanossistemas dispersos no meio com SFB em relação ao sem SFB. É relatada como explicação para isto a redução da aglomeração das partículas em virtude do impedimento estérico promovido pelas proteínas séricas do SFB aderidas na superfície (LLANOS et al., 2021).

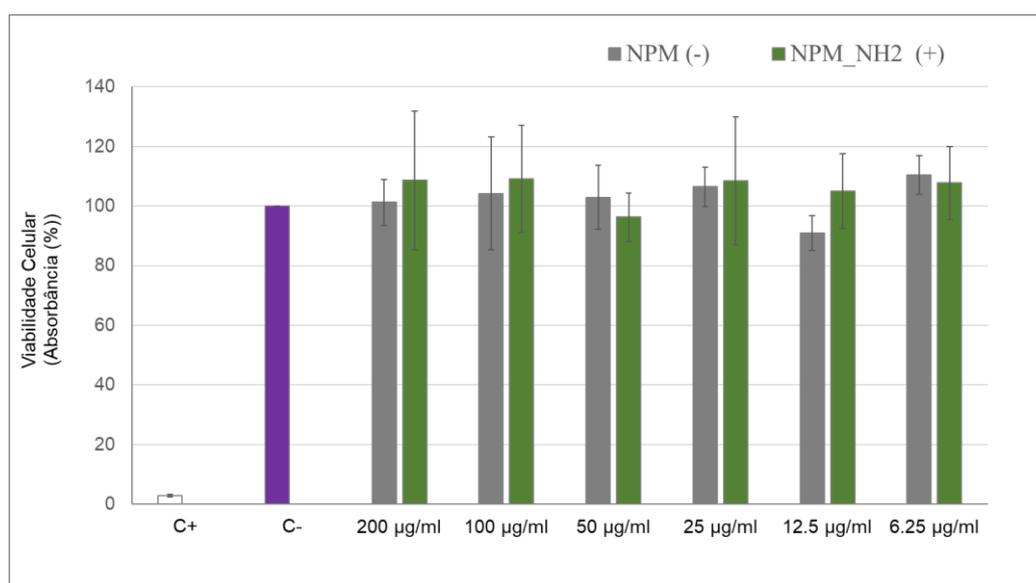
4.5.2. Viabilidade celular

A citotoxicidade dos nanossistemas selecionados aos macrófagos M0 foi investigada pelo ensaio de MTT, que se baseia na conversão do reagente MTT (de coloração amarela) a formazan (de coloração roxa). A viabilidade é avaliada pela capacidade da célula de fazer essa conversão, de modo que quanto maior a medida de absorbância do reagente convertido no comprimento de onda 590 nm maior a viabilidade da célula.

No presente trabalho, o ensaio de citotoxicidade foi realizado em triplicata para os dois nanossistemas, sendo empregado um controle positivo para mostrar a resposta de morte apropriada; um controle negativo, atóxico, como referência de vida, contendo apenas as células não expostas às partículas e um branco contendo apenas as nanopartículas a fim de avaliar a influência do nanomaterial sobre os valores de absorbância.

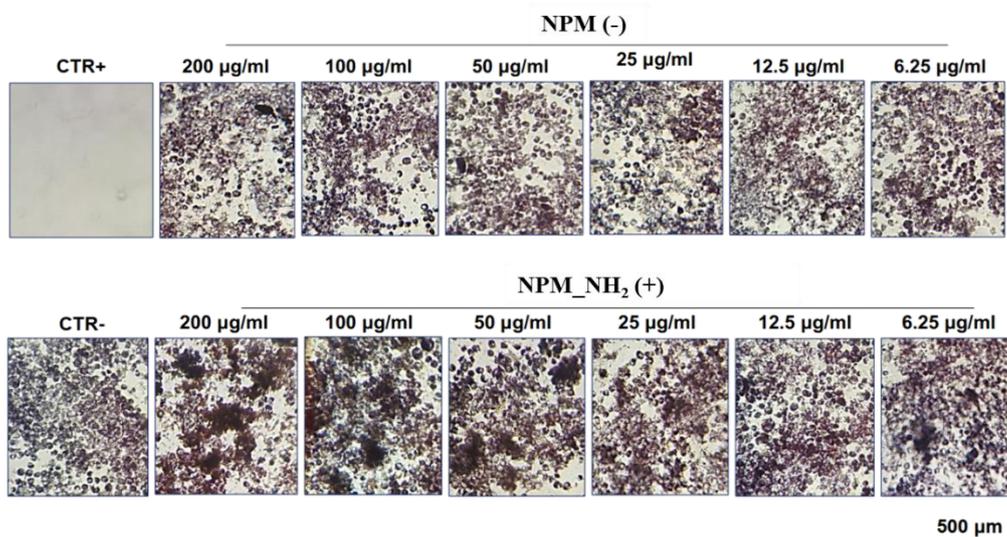
Foram realizados 3 experimentos independentes, nos quais as células foram analisadas após a exposição aos dois nanossistemas selecionados em 6 diferentes concentrações variando de 6,25 a 200 $\mu\text{g/mL}$. A Figura IV.25 exibe os resultados de viabilidade celular média e a Figura IV.26 ilustra as micrografias obtidas para os dois casos.

Figura IV.25 Viabilidade celular dos macrófagos M0 após exposição aos nanossistemas puro e funcionalizado.



Fonte: Autoria própria.

Figura IV.26 Micrografias dos macrófagos M0 após o ensaio de citotoxicidade dos nanossistemas selecionados (NPM(-) e NPM_NH₂(+)).



Fonte: Autoria própria.

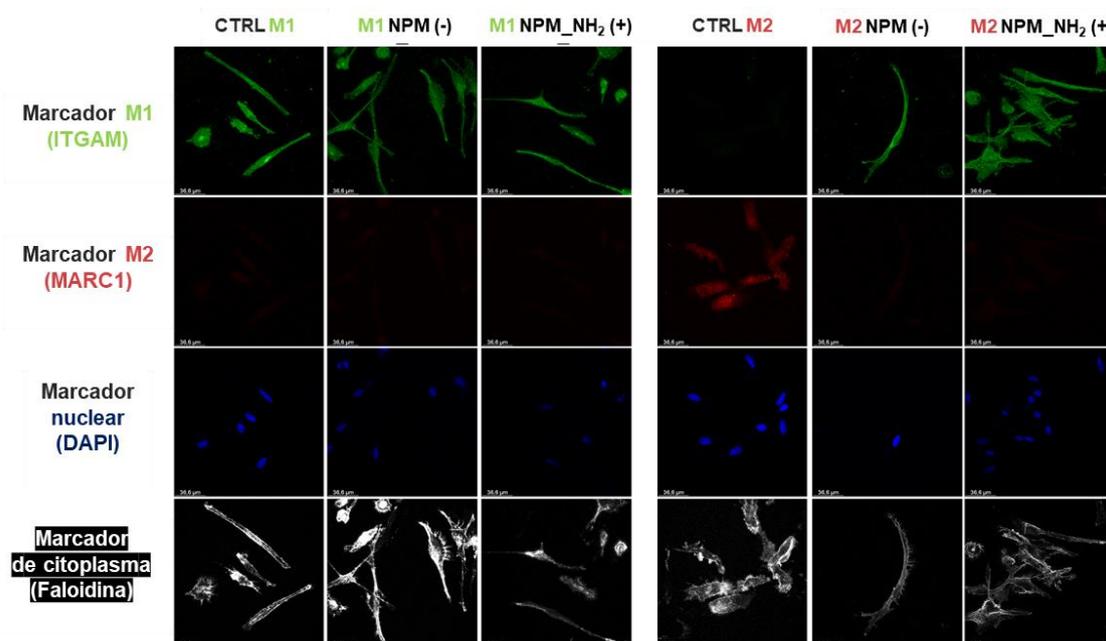
O ensaio de viabilidade revelou pouca viabilidade confirmando a toxicidade da substância usada como referência, o dodecil sulfato de sódio. A viabilidade integral das células na ausência das partículas foi demonstrada pelo controle negativo, que apresentou viabilidade de 100%, com a qual foram comparados os demais resultados. Pode-se observar que em todas as concentrações testadas, ambos os nanossistemas, puro e funcionalizado, não apresentaram citotoxicidade apreciável, uma vez que a viabilidade celular permaneceu próxima a 100%. Cabe ressaltar que todos os valores obtidos, comparados com os dos controles e apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0.05$). As imagens de microscopia óptica (Figura IV.26) confirmam tais resultados, pois revelam a alta densidade de células viáveis para todas as concentrações dos nanossistemas, assim como observado no controle negativo.

4.5.3. Repolarização de macrófagos

Para avaliar o efeito dos nanossistemas selecionados sobre os fenótipos dos macrófagos M1 e M2, foi realizado o ensaio de imunofluorescência, empregando os marcadores específicos para M1 (ITGAM) e M2 (MRC1), nuclear (DAPI) e de citoplasma (FALOIDINA). A Figura IV.27 ilustra as micrografias obtidas após a

exposição das células aos nanossistemas selecionados com potenciais eletrocinéticos positivo e negativo na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Figura IV.27 Imagens de microscopia de fluorescência obtidas para os macrófagos M1 (em verde) e M2 (em vermelho) expostos aos dois nanossistemas (NPM(-) e NPM_NH₂(+)) na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$.



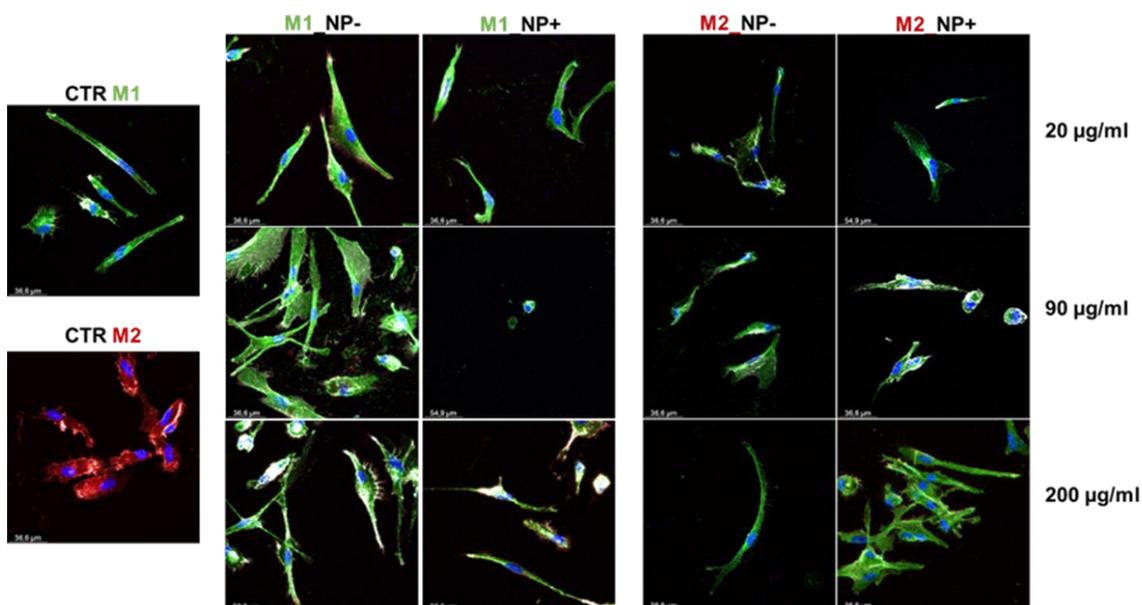
Fonte: Autoria própria.

As imagens demonstram a marcação dos macrófagos M1 (em verde) e M2 (em vermelho), do núcleo (em azul) e citoplasma (em branco) das células na coluna dos controles negativos de ambas as células, indicando a integridade das células utilizadas no experimento.

Após o contato dos macrófagos M1 com os dois nanossistemas, puro e funcionalizado, (NPM-NH₂ (+)) observam-se as mesmas marcações presentes nas células do controle negativo, sugerindo que os nanomateriais não interferiram no fenótipo M1 dos macrófagos. Por outro lado, nos macrófagos M2, a interação com os nanossistemas provocou a conversão do fenótipo das células de M2 (pró-tumoral) para M1 (anti-tumoral), uma vez que foi observada a marcação específica para M1 e não foi observada a mesma marcação específica de M2 (em vermelho) presente no controle negativo.

Com o objetivo de investigar se o efeito de repolarização dos macrófagos se mantém em menores doses dos nanossistemas, o ensaio de imunofluorescência foi realizado em 3 diferentes concentrações: 20 µg/mL, 90 µg/mL e 200 µg/mL, revelando as imagens de microscopia que estão dispostas na Figura IV.28.

Figura IV.28 Imagens de microscopia de fluorescência obtidas para os macrófagos M1 (em verde) e M2 (em vermelho) expostos aos dois nanossistemas (NPM(-) e NPM_NH2(+)) na concentrações de 20 µg/mL., 90 µg/mL. e 200 µg/mL.



Fonte: Autoria própria.

As imagens de fluorescência obtidas demonstram, para todas as concentrações testadas, a preservação do fenótipo para os macrófagos M1 e a ocorrência da repolarização dos macrófagos de M2 para M1 após a exposição das células aos nanossistemas. Portanto, os dois ensaios de imunofluorescência evidenciam o potencial das NPM com potenciais eletrocinéticos positivo e negativo como agentes repolarizadores de macrófagos do fenótipo anti-inflamatório para o pró-inflamatório

V. Conclusões

Nesta pesquisa, foi possível demonstrar o efeito esperado de repolarização de macrófagos na presença de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (NPM). Para tanto, foram inicialmente obtidas nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (NPM) com diâmetro médio de 20,8 nm, formato esférico, moderada estabilidade coloidal e potencial eletrocinético negativo. A modificação da superfície dos nanomateriais foi realizada por recobrimento com diferentes cargas de sílica e funcionalização com grupos amino com diferentes proporções de água. Na primeira abordagem, foi constatada a formação das nanoestruturas *core-shell* com diferentes espessuras de sílica, formato esférico e diâmetros médios e estruturas cristalinas similares às das NPM. Após o recobrimento, os nanossistemas exibiram menores valores de ponto isoelétrico (PI) e maior estabilidade coloidal em relação às NPM. Na segunda abordagem, foi confirmado o ancoramento dos nanossistemas com grupos amino e evidenciado o deslocamento do ponto isoelétrico para maiores valores de pH, bem como o maior desvio de PI para os nanomateriais funcionalizados com maior proporção de água no meio reacional.

Dentre os nanossistemas obtidos, selecionou-se a nanopartícula magnética sem modificação, denominada NPM, como fonte de potencial eletrocinético negativo (- 17,35 mV) em pH correspondente ao ambiente tumoral e por ter condições mais simples de produção. E como fonte de potencial eletrocinético positivo, empregou-se a nanopartícula magnética funcionalizada em duas etapas com grupos aminos, denominada NPM_NH₂ 50%H₂O_R, a qual exibiu potencial eletrocinético de + 14,86 mV.

A avaliação do potencial dos nanossistemas selecionados na repolarização pró-inflamatória de macrófagos foi bem sucedida e revelou a habilidade dos nanossistemas desenvolvidos na preservação do fenótipo M1 e na conversão dos macrófagos M2 (pró-tumorais) em M1 (anti-tumorais). Desta forma, os nanossistemas produzidos têm potencial para uso em terapias emergentes para tratamento de câncer de pulmão.

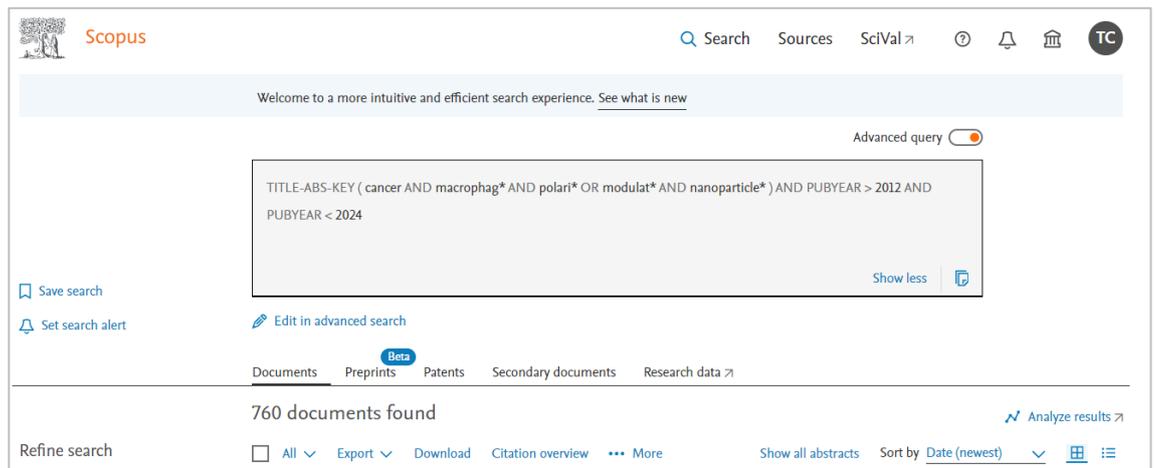
VI. Propostas Futuras

- Avaliação do grau de internalização celular dos nanossistemas com diferentes potenciais eletrocínéticos;
- Avaliação do efeito de outras variáveis associadas ao nanossistema sobre o grau de repolarização, como tamanho, formato e concentração;
- Realização de ensaios com cultivos de células 3D (esferoides celulares), para investigar a repolarização de macrófagos pelos nanossistemas em condições representativas do microambiente tumoral pulmonar;
- Realização de ensaios biológicos 3D, empregando macrófagos repolarizados pelos nanossistemas no tratamento de células tumorais de câncer de pulmão;
- Desenvolvimento de nanocarreadores terapêuticos contendo macrófagos associados ao tumor repolarizados por nanopartículas magnéticas e estudo da eficiência de entrega via migração preferencial (*homing*).

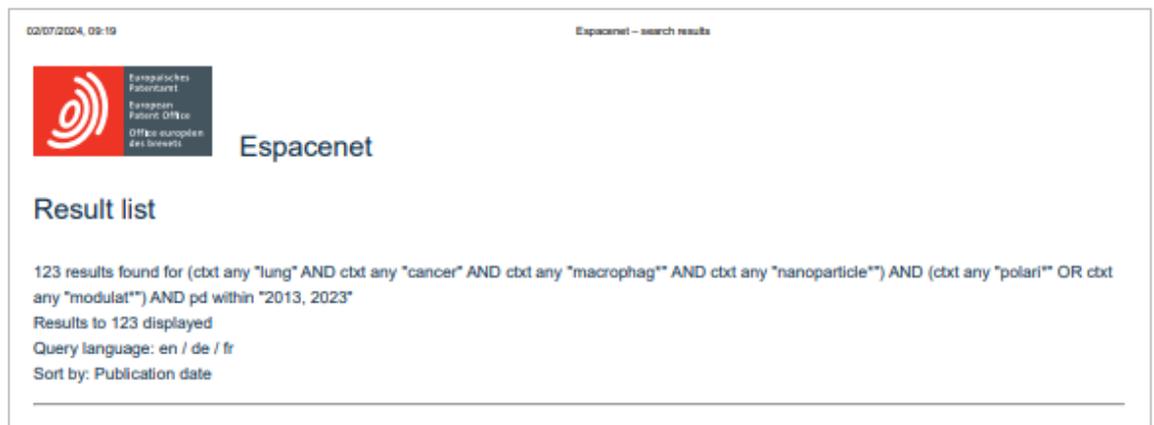
Apêndice

Busca de anterioridade

Na plataforma SCOPUS, a busca foi feita com base no título, resumo e palavras-chave presentes nos artigos.



No espacenet, a busca foi feita com base no título, resumo e reivindicações presentes nos documentos de patente



No INPI, a busca foi feita com base no título e resumo (opções disponíveis para a busca)

 BRASIL	Acesso à informação	Participe	Serviços	Legislação	Canais
Instituto Nacional da Propriedade Industrial Ministério da Economia					
Consulta à Base de Dados do INPI					
[Início Ajuda?]					
RESULTADO DA PESQUISA (24/07/2024 às 09:59:01)					
Pesquisa por:					
Todas as palavras: 'CÂNCER MACRÓFAG* (POLARI* MODULA*) NANOPART* no Título' \					
- Nenhum resultado foi encontrado para a sua pesquisa. Para efetuar outra pesquisa, pressione o botão de VOLTAR.					
AVISO: Depois de fazer uma busca no banco de dados do INPI, ainda que os resultados possam parecer satisfatórios, não se deve concluir que a Patente poderá ser concedida. O INPI no momento do exame do pedido de Patente realizará nova busca que será submetida ao exame técnico que decidirá a respeito da concessão da Patente.					
Dados atualizados até 23/07/2024 - Nº da Revista: 2794					
Rua Mayrink Veiga, 9 - Centro - RJ - CEP: 20090-910					

 BRASIL	Acesso à informação	Participe	Serviços	Legislação	Canais
Instituto Nacional da Propriedade Industrial Ministério da Economia					
Consulta à Base de Dados do INPI					
[Início Ajuda?]					
RESULTADO DA PESQUISA (24/07/2024 às 10:03:12)					
Pesquisa por:					
Todas as palavras: 'CÂNCER MACRÓFAG* (POLARI* MODULA*) NANOPART* no Resumo' \					
- Nenhum resultado foi encontrado para a sua pesquisa. Para efetuar outra pesquisa, pressione o botão de VOLTAR.					
AVISO: Depois de fazer uma busca no banco de dados do INPI, ainda que os resultados possam parecer satisfatórios, não se deve concluir que a Patente poderá ser concedida. O INPI no momento do exame do pedido de Patente realizará nova busca que será submetida ao exame técnico que decidirá a respeito da concessão da Patente.					
Dados atualizados até 23/07/2024 - Nº da Revista: 2794					
Rua Mayrink Veiga, 9 - Centro - RJ - CEP: 20090-910					

Referências Bibliográficas

A. C. CAMARGO CANCER CENTER (A. C. CAMARGO). **Pulmão**. Disponível em: < <https://accamargo.org.br/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/pulmao#:~:text=J%C3%A1%20o%20c%C3%A2ncer%20de%20pulm%C3%A3o,corpo%2C%20incluindo%20os%20g%C3%A2nglios%20linf%C3%A1ticos>> Acesso em: 29 jun. 2023.

ADEPU, S.; RAMAKRISHNA, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. **Molecules**, v. 26, 2021.

AGUIRRE, R. Y.; AGUILERA, M. M.; HERNANDEZ, R. A. Facet-dependent magnetic properties of magnetite nanoparticles coated with dodecyl amine and their biological effect in hepatocarcinoma cell line. **Journal of Materials Science**, v. 59, p. 991–1009, 2024.

AHANGARAN, F.; NAVARCHIAN, H. A. Recent advances in chemical surface modification of metal oxide nanoparticles with silane coupling agents: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 286, 2020.

AISSA, B. A. Magnetic molecularly imprinted polymer for the isolation and detection of biotin and biotinylated biomolecules. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 88, p. 101–108, 2017.

AKAL, Z. U. *et al.* A. Superparamagnetic iron oxide conjugated with folic acid and carboxylated quercetin for chemotherapy applications. **Ceramics International**, v. 42, n. 7, p. 9065–9072, 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **About lung cancer: overview and types**. 2019 a. Disponível em: < <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8703.00.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Non-Small Cell Lung Cancer Stages**. 2019 b. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/staging-nsclc.html>>. Acesso em: 30 ago. 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Treatment Choices for Non-Small Cell Lung Cancer, by Stage**. 2023 a. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/treating-non-small-cell/by-stage.html>>. Acesso em: 04 set. 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Radiation Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer**. 2023 b. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/treating-non-small-cell/radiation-therapy.html>>. Acesso em: 06 set. 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Immunotherapy**. 2024 Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/managing-cancer/treatmenttypes/immunotherapy.html>>. Acesso em: 23 ago. 2024.

- ANDRADE, L. A.; VALENTE, A. M.; FERREIRA, F. M. J. *et al.* Preparation of size-controlled nanoparticles of magnetite. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, p. 1753-1757, 2012.
- ANDRADE, R.; REIS, B.; COSTAS, B. *et al.* "Modulation of Macrophages M1/M2 Polarization Using Carbohydrate-Functionalized Polymeric Nanoparticles". **Polymers (Basel)** v. 13, n. 1, pp. 88, 2021.
- ANSARI, J. M.; KADHIM, M. M.; HUSSEIN, A. B. *et al.* Synthesis and Stability of Magnetic Nanoparticles. **BioNanoScience**, v. 12, p. 627-638, 2022.
- ARIAS, M. V.; ROJAS, M. J.; YAGUE, P. S. *et al.* Polyethylenimine-coated SPIONs trigger macrophage activation through TLR-4 signaling and ROS production and modulate podosome dynamics. **Biomaterials**, p. 494-506, 2015.
- BAK, P. S.; WALTERS, J. J.; TAKEYA, M. Scavenger Receptor-A-Targeted Leukocyte Depletion Inhibits Peritoneal Ovarian Tumor Progression. **Cancer Research**, v. 67, n. 10, p. 4783-4789, 2007.
- BARD, J. A.; FAULKNER, R. L. **Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications**. 2ed. Austin. Wiley. 2002
- BAUER, A. T.; HORVAT, K. N.; MARQUES, O. *et al.* Core Cross-Linked Polymeric Micelles for Specific Iron Delivery: Inducing Sterile Inflammation in Macrophages. **Adv. Healthc Mater.**, v. 10, n. 2100385, 2021.
- BEDÊ, P. M. *et al.* Nanostructured magnetic alginate composites for biomedical applications. **Polímeros**, v. 27, n. 4, p. 267-272, 2017.
- BINNEMARS-POSTMA, K. *et al.* Nanomedicine Strategies to Target Tumor-Associated Macrophages. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 5, p: 979, 2017.
- BONAPACE, L.; COISSIEUX, M.; WYCKOFF, J. *et al.* Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. **Nature**, v. 515, p: 130-133, 2014.
- BRUCE, J. I.; SEN, T. Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with Alkoxysilanes and Their Application in Magnetic Bioseparations. **Langmuir**, v. 21, n. 15, p. 7029-7035, 2005.
- BUI, Q. T.; NGO, M. T. H.; TRAN, T. H. Surface-protective assistance of ultrasound in synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles and in preparation of mono-core magnetite-silica nanocomposites. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 3, p. 323-300, 2018.
- BUONAGURO, L. *et al.* Selecting Target Antigens for Cancer Vaccine Development. **Vaccines (Basel)**, v. 8, n. 4, p. 615, 2020.
- BUTT, H. *et al.* **Physics and Chemistry of Interfaces**. Wein-heim. Wiley-VCH. 2003.
- CALLISTER, W. **Fundamentos da Ciência e Engenharia de Materiais**. 2ed. São Paulo. Gen, 724 p, 201, 2011.

CANADIAN CANCER SOCIETY (CCS). **Endobronchial therapies for lung cancer**. 2023. Disponível em: <<https://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/lung/treatment/endobronchial-therapies>>. Acesso em: 13 de setembro. 2023.

CARAVAJAL, S. G.; LEYDEN, E. D.; QUINTING, R. G. *et al.* Structural characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-modified silicas by silicon-29 and carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Anal. Chem.**, v. 60, n. 17, p. 1776–1786, 1988.

CARVALHO, A. H. Radioterapia no câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 8, n. 6, 2002.

CHAUDHARY, V; CHAUDHARY, R. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Functionalization, and Applications. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, v. 28, p. 153-183, 2018.

CHEN, D. *et al.* Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1. p. 1-10, 2013.

CHENG, Y. *et al.* Potential of poly(amidoamine) dendrimers as drug carriers of camptothecin based on encapsulation studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 8, p. 1791-1795, 2008.

CREWS, D. *et al.* Prophylactic Cancer Vaccines Engineered to Elicit Specific Adaptive Immune Response. **Front Oncol**, v. 11, n. 626463, 2021.

CANCER RESEARCH UK (CRUK). **TNM staging for lung cancer**. 2023. Disponível em: < <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/stages-types-grades/tnm-staging>>. Acesso em: 23 de julho de 2024.

DALEN, V. J. F.; SETEVENDAAL, V. H. M.; FENNEMAN, L. F. *et al.* Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages. **Molecules**. v. 24, n. 1, 2019.

DALTON, J. H.; ARMAIZ-PENA, G.; GONZALEZ-VILLASANA, V. Monocyte Subpopulations in Angiogenesis. **Cancer Research**, v. 74, n. 5, p. 1287-1293, 2014.

DAOUSH, M. D. Co-Precipitation and Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles for Potential Biomedical Applications. **Journal of Nanomedicine Research**, v. 5, n. 3, 2017.

DAS, K. P. Effect of temperature on zeta potential of functionalized gold nanorod. **Microfluid Nanofluid**, 2017.

DEMIN, A. M. *et al.* 3-Aminopropylsilane-modified iron oxide nanoparticles for contrast-enhanced magnetic resonance imaging of liver lesions induced by *Opisthorchis felineus*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4451–4463, 2016.

ELDERDERI, S.; LOUBIÈRE, L. C.; WILS, L. *et al.* ATR-IR spectroscopy for rapid quantification of water content in deep eutectic solvents. **Journal of Molecular Liquids**, v. 311, n. 113361, 2020.

ENGELMANN, U.; BUHL, M. E.; BAUMANN, M. *et al.* Agglomeration of magnetic nanoparticles and its effects on magnetic hyperthermia. **Current Directions in Biomedical Engineering**, v. 3, n. 2, p. 457-460, 2017.

- EZHILARASAN *et al.* Nano-based targeted drug delivery for lung cancer: therapeutic avenues and challenges. **Nanomedicine**, v. 17, n. 24, p. 1855-1869, 2022.
- FADLI, A.; KOMALASARI, K.; ADNAN, A. et al Synthesis of Magnetite Nanoparticles via Co-precipitation Method. **IOP Conference Series Materials Science and Engineering**, v. 622, n. 1, 2019.
- FENG, X.; XU, W.; LI, Z. Immunomodulatory Nanosystems. **Advanced Science**, v. 6, n. 17, 2019.
- FILHO, A. C. G. **Estudo da estrutura e propriedades magnéticas e elétricas de ferritas de Ni²⁺/Zn²⁺ dopadas com Nd³⁺**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2014.
- FRIÁK, M.; SCHINDLMAYR, A.; SCHEFFLER, M. Ab initio study of the half-metal to metal transition in strained magnetite. **New Journal of Physics**, v. 9, 2007.
- FU, X.; CAIB, J.; ZHANG, X. *et al.* Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 132, 2018.
- FUCHS, K. A.; SYROVETS, T.; HAAS, A. K. Carboxyl- and amino-functionalized polystyrene nanoparticles differentially affect the polarization profile of M1 and M2 macrophage subsets. **Biomaterials**, v. 85, p 78-87, 2016.
- GADGEEL, S. M. *et al.* Treatment of Lung Cancer. **Radiologic Clinics of North America**, v. 50, n. 5, p. 961–974, 2012.
- GALE, P . R. **Desenvolvimento e propagação do câncer**. Disponível em: <<https://www.msmanuals.com/pt-br/casa/c%C3%A2ncer/considera%C3%A7%C3%B5es-gerais-sobre-o-c%C3%A2ncer/desenvolvimento-e-propaga%C3%A7%C3%A3o-do-c%C3%A2ncer>>. Acesso em: 23 ago. 2023.
- GALEANO, G. A.; HUERTAS, M. E. C. Hydrodynamic diameter and zeta potential of nanostructured lipid carriers: Emphasizing some parameters for correct measurements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 620, 2021.
- GANAPATHE, S. L.; MOHAMED, A. M.; YUNUS, M. R. *et al.* Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation. **Magnetochemistry**, v. 6, n. 4, 2020.
- GARCÍA-PARDO, M. *et al.* Vaccine Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. **Vaccines (Basel)**. v. 10, n. 5, p. 740, 2022.
- GARON, B. E. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. **The Lancet**. v. 384, n. 9944. p. 665-673, 2014.
- GAUVIN, H. Synthesis of magnetic and thermosensitive iron oxide based nanoparticles for biomedical applications. **Chemical Physics**. Université de Bordeaux, 2017.
- GEERAERTS, X.; BOLLI, E.; FENDT, S. *et al.* "Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity". **Front. Immunol.** v. 8, n.

289, 2017.

GEMEAY, A.; KESHTA, E. B.; SHARKAWY, E. G. R. *et al.* Chemical insight into the adsorption of reactive wool dyes onto amine-functionalized magnetite/silica core-shell from industrial wastewaters. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p. 32341–32358, 2020.

GENARD, G.; LUCAS, S.; MICHIELS, C. "Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages with Anticancer Therapies: Radiotherapy versus Chemo- and Immunotherapies", *Front. Immunol.* v. 8, n. 828, 2017.

GONÇALO, A. M.; LODEIRO, C.; CAPELO, L. J. *et al.* Magnetic, fluorescent and hybrid nanoparticles: From synthesis to application in biosystems. *Materials Science and Engineering: C*, v. 106, 2020.

GRIDELLI, C. *et al.* Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. v.1, n. 15009, 2015.

GRIMNES, S.; MARTINSEN, G. O. Electrodes. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. 3ed. Academic press, 2015.

GULICOVSKI, J. J. *et al.* Point of Zero Charge and Isoelectric Point of Alumina. *Materials and Manufacturing Processes*. v 6, p. 615–619, 2008.

GUTIÉRREZ, L.; CAVERNA, L.; MOROS, M. Aggregation effects on the magnetic properties of iron oxide colloids. *Nanotechnology*, v. 30, n. 11, 2019.

HAGEMANN, T.; LAWRENCE, T.; MCNEISH, I. *et al.* "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF- κ B. *Journal of Experimental Medicine*. v. 205, n. 6, p. 1261–1268, 2008.

HASANY, F. S.; AHMED, I.; RAJAN, J. *et al.* Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology*, v. 2, n. 6, p. 148-158, 2012.

HELMHOLTZ, H., Studien über elektrische Grenzschichten, *Ann. Phys.*, p. 337-382 1879.

HOLLINGSWORTH, R. *et al.* Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ Vaccines*, v. 4, n. 7, 2019.

HORVAT, K. N.; CHOCARRO, S.; MARQUES, O. *et al.* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Reprogram the Tumor Microenvironment and Reduce Lung Cancer Regrowth after Crizotinib Treatment. *ACS Nano*, v. 18, n. 17, p. 11025–11041, 2024.

HOSONUMA, M.; YOSHIMURA, K. Association between pH regulation of the tumor microenvironment and immunological state. *Front Oncol.*, v. 13, n. 1175563, 2023.

HUNTER, J. R. *Foundations of Colloid Science*. 2 ed. Oxford. Oxford University Express. 2001.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Como surge o câncer?**. Publicado em 14/07/2022. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>>. Acesso em: 23 ago 2023.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Câncer de pulmão: saiba mais sobre como prevenir o câncer de pulmão, sinais e sintomas, tratamento, entre outras informações.** Publicado em 04/06/2022. Disponível em: < <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pulmao> >. Acesso em: 23 Jun 2023.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020.** Press Release, n° 292, Lyon, France, 2020.

JAKŠA, G. et al. Influence of different solvents on the morphology of APTMS-modified silicon surfaces. **Applied Surface Science**, v. 315, n. 1, p. 516-522, 2014.

JAMES, M.; REVIA, A. R.; STEPHEN, Z. *et al.* Microfluidic Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 10, n. 11, p. 2113, 2020.

JAMIL, A. *et al.* Lung Metastasis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553111/> >. Acesso em: 30 Ago 2023.

JAMKHANDE, G. P.; GHULE, W. N.; BAMER, H. A. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 53, 2019.

JANA, S. Advances in nanoscale alloys and intermetallics: low temperature solution chemistry synthesis and application in catalysis. **Dalton Transactions**, v. 44, p. 18692-18717, 2015.

JIN, R.; LIU, L.; ZHU, W. *et al.* Iron oxide nanoparticles promote macrophage autophagy and inflammatory response through activation of toll-like Receptor-4 signaling. **Biomaterials**, p. 23-30, 2019.

JOLIVET, PJ. **Metal Oxide Chemistry and Synthesis - From Solution to Solid State**, 3. ed, England, John Wiley and Sons, 2000.

KHAN, R. Magnetic Particles-Based Analytical Platforms for Food Safety Monitoring. **Magnetochemistry**, v. 5, n. 63, 2019.

KIM, M. J.; CHANG, M. S.; KONG, M. S. Control of hydroxyl group content in silica particle synthesized by the sol-precipitation process. **Ceramics International**, v 35, n. 3, p. 1015-1019, 2009.

KIM, W.; SUH, Y. C.; CHO, W. S. A new method for the identification and quantification of magnetite–maghemite mixture using conventional X-ray diffraction technique. **Talanta**, v. 94, p. 348-352, 2012.

KIM, H.; CHUNG, H. J. PD-L1 Testing in Non-small Cell Lung Cancer: Past, Present, and Future. **J Pathol Transl Med**, v. 53, n. 4, p. 199-206, 2019.

KRALJ, S. *et al.* Controlled surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles with terminal amino and carboxyl groups. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, p. 2829–2841, 2011.

KRISTL, M.; OSTROŠKO, U.; BAN, I. Thermal study of APTES-functionalized magnetite nanoparticles with citric acid and polyacrylic acid for advanced forward

- osmosis systems. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2024.
- LANGFORD, J. I.; WILSON, A. J. C. Scherrer after sixty years: A survey and some new results in the determination of crystallite size. **Journal of Applied Crystallography**, v. 11, n. 2, p. 102–113, 1978.
- LARIONOVA, I. *et al.* Tumor-Associated Macrophages in Human Breast, Colorectal, Lung, Ovarian and Prostate Cancers. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n° 566511, 2020.
- LARSEN, B. A. Mono and dialkoxysilane surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for application as magnetic resonance imaging contrast agents. **Journal of Materials Research**, v. 27, n 14, p. 1846–1852, 2012.
- LEE, K. " M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review". **Medical Biological Science and Engineering** v. 2, n. 1, pp. 1-5, 2019.
- LEHENKARI, P. P.; KELLINSALMI, M.; NÄPÄNKANGAS, P. J. *et al.* Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. **Mol. Pharmacol**, v. 61, n. 5, p. 1255-1262, 2002.
- LI, Y *et al.* Emerging Biomaterials for Downstream Manufacturing of Therapeutic Proteins. **Acta Biomaterialia**, v. 95, p. 73-90, 2019.
- LIAO, X. Z.; OU, L. D.; HSIEH, J. M. *et al.* Synergistic Effect of Repolarization of M2 to M1 Macrophages Induced by Iron Oxide Nanoparticles Combined with Lactate Oxidase. *Int J Mol Sci.*, v. 22, n. 24, p. 13346, 2021.
- LIN, X. *et al.* Stimuli-Responsive Drug Delivery Systems for the Diagnosis and Therapy of Lung Cance, **Molecules**. v. 27, n. 3, p. 948, 2022.
- LIU, B.; WANG, D.; HUANG, W. *et al.* Preparation of Magnetite Nanoparticles Coated with Silica via a Sol-gel Approach. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 115, n. 1348, p. 877–881, 2007.
- LIU, C.; HAN, Y.; WANG, Z. *et al.* Preparation of (3-Aminopropyl)triethoxysilane-Modified Silica Particles with Tunable Isoelectric Point. **Langmuir**, v. 40, n. 24, 2024.
- LIU, S.; YU, B.; WANG, C. Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 281, n. 102165, 2020.
- LIU, J. *et al.* Cancer vaccines as promising immuno-therapeutics: platforms and current progress. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 28, 2022.
- LIU, Y.; LI, Y.; LI, X. *et al.* Kinetics of (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) Silanization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **Langmuir**, v. 29, n. 49, 2013.
- LLANOS, R. A. G. *et al.* Collagen Type I Biomaterials as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Polymers**, v. 13, n. 4. p. 599, 2021.
- LU, T.; WANG, J.; YIN, J. Surfactant effects on the microstructures of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by microemulsion method. **Colloids and Surfaces A:**

Physicochemical and Engineering Aspects, v. 436, p. 675-683, 2013.

LU, W. G.; GAO, P. "Non-Invasive and Minimally-Invasive Drug Delivery Systems for Pharmaceutical and Personal Care Products" In: Kulkarni, V. (ed) **Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems**, 1 ed., chapter 3, Oxford, UK, William Andrew, Elsevier, 2010

LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION (LCRF). **Why research?**. Disponível em: < <https://www.lungcancerresearchfoundation.org/research/why-research/>>. Acesso em: 20 Set. 2023.

MADUBUONU, N.; AISIDA, O. S.; ALI, A. *et al.* Biosynthesis of iron oxide nanoparticles via a composite of Psidium guajava-Moringa oleifera and their antibacterial and photocatalytic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 199, 2019.

MAGUIRE, M. C.; RÖSSLEIN, M.; WICK, P. *et al.* Characterisation of particles in solution – a perspective on light scattering and comparative technologies. **Sci Technol Adv Mater**, v. 19, n. 1, p. 732-745, 2018.

MATTER, F. *et al.* From colloidal dispersions to aerogels: How to master nanoparticle gelation. **Nano Today**, 1008277, 2020.

MALVERN. **Dynamic Light Scattering Common terms defined**. Disponível em: < <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/DLS%20terminology.pdf>>. Acesso em: 16 de julho de 2024.

MARIÑO, A. M.; MORETTI, P.; TASIC, L. Immobilized commercial cellulases onto amino-functionalized magnetic beads for biomass hydrolysis: enhanced stability by non-polar silanization. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, p. 9265–9275, 2023.

MAYO CLINIC. Lung Cancer. Publicado em 14/07/2022. Disponível em: < <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/lung-cancer/diagnosis-treatment/drc-20374627>>. Acesso em: 30 abril 2024..

MENDONÇA, T. D. S. E.; FARIA, B. C. A.; DIAS, L. C. S. *et al.* Effects of silica coating on the magnetic properties of magnetite nanoparticles. *Surfaces and Interfaces*, v. 14, p. 34-43, 2019.

MEUNIER, V. *et al.* "Modern Theories of Carbon-Based Electrochemical Capacitors: A Short Review". **International Mechanical Engineering Congress & Exposition IMECE 2010**, Volume 11, Vancouver, Canada, 2010.

MITRA, A.; DEY, B. Chitosan Microspheres in Novel Drug Delivery Systems. *Indian J Pharm Sci.* 2011 Jul-Aug; 73(4): 355–366.

MONTES, C.; VILLASEÑOR, J.; RÍOS, A. Analytical control of nanodelivery lipid-based systems for encapsulation of nutraceuticals: Achievements and challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 90, p. 47-62, 2019.

MOTZ, G. *et al.* Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. **Immunity**, v. 39, n.1, p 61-73, 2013.

MUGICA, C. M.; MOLINA, R. B.; RAMOS, S. *et al.* Surface functionalization of silica

particles for their efficient fluorescence and stereo selective modification. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 500, p. 79-87, 2016.

MYLKIE, K. et al. Polymer-Coated Magnetite Nanoparticles for Protein Immobilization. **Materials**, v. 14, n. 2, p. 248, 2021.

NAM, J. *et al.* Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 5, p. 622–648, 2013.

NANDAGOPAL *et al.* Fabrication of multifunctional Nanocomposite containing INP coated with chitosan coupled with folic acid and loaded with quercetin in diagnosis and its possible treatment in cancer. **RSC Advances**. v.6, p. 99514-99523, 2016.

NASCIMENTO, C.; CASTRO, F.; DOMINGUES, M. *et al.* Reprogramming of tumor-associated macrophages by polyaniline-coated iron oxide nanoparticles applied to treatment of breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 636, n. 122866, 2023.

NASEH, M.; FARAJOLLAH, E.; MOGHANIAN, H. Silica-coated magnetite nanoparticles functionalized with sulfosalicylic acid: a highly active and magnetically reusable nanocatalyst for the Biginelli reaction. *Research on Chemical Intermediates*, v. 50, p. 1679–1696, 2024.

NASRAZADANI, S.; RAMAN, A. The application of infrared spectroscopy to the study of rust systems-ii . Study of cation deficiency in magnetite (Fe₃O₄) produced during its transformation to maghemite (γ-Fe₂O₃) and hematite (α- Fe₂O₃). **Corrosion Science**, v. 34, n. 8, p. 1355–1365, 1993

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **PDQ Small Cell Lung Cancer Treatment**. 2023 a. Disponível em:< <https://www.cancer.gov/types/lung/patient/small-cell-lung-treatment-pdq>>. Acesso em: 29 jun. 2023.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ)**. 2023 b. Disponível em:< https://www.cancer.gov/types/lung/hp/non-small-cell-lung-treatment-pdq#_549>. Acesso em: 04 set. 2023.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Types of Radiation Therapy**. 2023 c. Disponível em:< <https://training.seer.cancer.gov/treatment/radiation/types.html> >. Acesso em: 06 set. 2023.

NGUYEN, D. M.; TRAN, V. H.; XU, S. *et al.* Fe₃O₄ Nanoparticles: Structures, Synthesis, Magnetic Properties, Surface Functionalization, and Emerging Applications. **Appl. Sci.**, v. 11, n. 23, 2021.

NICULESCU, G. A.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, M. A. Magnetite nanoparticles: Synthesis methods – A comparative review. *Methods*, v. 199, p. 16-27, 2021.

OHTA, R. *et al.* Improving TCR affinity on 293T cells. **J. Immunol. Methods**. n. 466, p. 1–8, 2019.

PAL, R.; CHAKRABORTY, B.; NATH, A. Noble metal nanoparticle-induced oxidative stress modulates tumor associated macrophages (TAMs) from an M2 to M1 phenotype: An in vitro approach. *International Immunopharmacology*, v. 38, p. 338-341, 2015.

PARASHAR, M.; SHUKLA, K. V.; SINGH, E. Metal oxides nanoparticles via sol–gel method: a review on synthesis, characterization and applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, v. 31, p. 3729-3749, 2020.

PARK, J. S.; SEO, K. M. Interface Science and Composites. **Interface Science and Technology**, v. 18, p. 1-57, 2011.

PARK, YI. *et al.* pH-sensitive multi-drug liposomes targeting folate receptor β for efficient treatment of non-small cell lung cancer. **J. Control Release**. v. 330, p. 1–14, 2021.

PATE, H.; SAFIER, P. Chemical metrology methods for CMP quality. *Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP)*, p. 299-325, 2016.

PHISARNCHANANAN, N. The Effect of Particles on the Phase Separation of Waxy Corn Starch plus Galactomannan gums. *Materials Science*. 2015.

PROPECSU, C. R. *et al.* Recent Advances in Magnetite Nanoparticle Functionalization for Nanomedicine. **Nanomaterials**, v. 9, n. 1791, 2019.

PUCCI, C.; DEGL'INNOCENTI, A.; GÜMÜŞ, B. M. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia: recent advancements, molecular effects, and future directions in the omics era. **Biomaterials Science**, v. 10, p. 2103-2121, 2022.

RAJPUT, N. Methods of preparation of nanoparticles – a review. **International Journal of Advances in Engineering & Technology**, v. 7, n. 4, p. 1806-1811, 2015.

THIRUPPATHI, R. *et al.* Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging. **Advanced Science**, v. 4, n 3, 2016.

RAHMAN, I. A.; PADAVETTAN, V. Synthesis of Silica nanoparticles by Sol-Gel: 7 Size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-8 polymer nanocomposites a review. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012.

RAPOPORT, A. P. *et al.* NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. **Nat. Med.** v. 21, n. 8, p. 914–921, 2015.

RAWAL, S. *et al.* Surface-engineered nanostructured lipid carrier systems for synergistic combination oncotherapy of non-small cell lung cancer. **Drug Deliv. Transl. Res.** v. 11 n. 5, p. 2030–2051, 2021.

RODRIGUEZ, R. F. A.; COSTA, P. T.; BINI, A. R. *et al.* Surface functionalization of magnetite nanoparticle: A new approach using condensation of alkoxy silanes. **Physica B**, v. 521, 141-147, 017.

SAATCI, M.; DELIORMANLI, M. A.; ATMACA, H. Synthesis and in vitro characterization of superparamagnetic γ -Fe₂O₃-containing 13–93 bioactive glasses for bone cancer therapy. **Ceramics International**, v. 48, n. 23, p. 34382-34394, 2022.

SALVADOR, M; GUTIÉRREZ, G.; NORIEGA, S. Microemulsion Synthesis of Superparamagnetic Nanoparticles for Bioapplications. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 1, 2021.

SAMRAT, V. A.; SAHITHYA, S. C.; SELVARANI A. J. *et al.* A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide

nanoparticles. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**. v. 4, n. 100042, 2021.

SANITÀ, G. *et al.* Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 2020.

SANTOS, EVELYN C. S. *et al.* AMF-responsive doxorubicin loaded β -cyclodextrin-decorated superparamagnetic nanoparticles. **New Journal of Chemistry**, v. 42, p. 671-680, 2017.

SANTOS, EVELYN C. S. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e nanoválvulas como sistemas de veiculação de fármacos para o tratamento do câncer. 242 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química - Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2018.

SANTOS, EVELYN C. S. *et al.* Curcuminoids-conjugated multicore magnetic nanoparticles: Design and characterization of a potential theranostic nanoplatform. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 879, 2021.

SCARLATTA, S. *et al.* The technique of endoscopic airway tumor treatment. **Journal of Toracic Disease**, v. 9, n. 8, p. 2619–2639.

SCHERRER, P. " Bestimmung der Größe und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen". In: Kolloidchemie Ein Lehrbuch. **Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Mathematisch-Physikalische Klasse**, p. 98-100, 2018.

SCHMICKLER, W. ELECTROCHEMICAL THEORY | Double Layer. Encyclopedia of Electrochemical Power Sources, p. 8-13, 2009.

SEABRA, B. A. ; PELEGRINO, T. M.; HADDAD, S. P. Antimicrobial Applications of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Perspectives and Challenges. In: Ficai, A., Grumezescu, A. M. **Nanostructures for Antimicrobial Therapy**, chapter 4, Elsevier, pp 531-550, 2017.

SHARMA, A.; CORNEJO, C.; MIHALIC, J. Physical characterization and in vivo organ distribution of coated iron oxide nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

SHARMA, S.; SHUKLA, P.; MISRA, A. *et al.* Interfacial and colloidal properties of emulsified systems: Pharmaceutical and biological perspective. **Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development**, p 149-172, 2014.

SHEN, L.; LI, H.; SHI, Y. M2. Tumour-associated macrophages contribute to tumour progression via legumain remodelling the extracellular matrix in diffuse large B cell lymphoma. **Scientific Reports**. v. 6, n. 30347, 2016.

SHIELDS, C. *et al.* Cellular backpacks for macrophage immunotherapy. **Science advances**, v. 6, n. 18, 2020.

SIDDIQUI, I. A. *et al.* Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1, n. 1348, p. 20–31, 2015.

SOARES, F. S.; FERNANDES, T.; TRINDADE, T. *et al.* Trimethyl Chitosan/Siloxane-

Hybrid Coated Fe₃O₄ Nanoparticles for the Uptake of Sulfamethoxazole from Water. **Molecules**, v. 24, n. 10, 2019.

SOCINSKI, A. M. Cytotoxic Chemotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of Standard Treatment Paradigms. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 12, p. 4210-4214, 2004.

SORIA, G.; BEN-BARUCH, A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. **Cancer Letters**, v. 267, n. 2, p. 271-285, 2008.

SOUZA, L. D. I.; SAEZ, V.; MANSUR, E. R. C. Lipid nanoparticles containing coenzyme Q10 for topical applications: An overview of their characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 230, 2023.

SU, L.; ZHANG, W.; WU, X. Glycocalyx-Mimicking Nanoparticles for Stimulation and Polarization of Macrophages via Specific Interactions. **Small**, v. 11, n. 33, p. 4191-4200, 2015.

SUN, T.; et al. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 53, n. 46, p. 12320-64, 2014.

SUN, L.; CHEN, B.; JIANG, R. *et al.* Resveratrol inhibits lung cancer growth by suppressing M2-like polarization of tumor associated macrophages. **Cellular Immunology**, v. 311, p. 86-93, 2017.

TORRES, B. M.; FIERRO, R. D.; NUÑEZ, E. J. *et al.* Polymeric Composite of Magnetite Iron Oxide Nanoparticles and Their Application in Biomedicine: A Review. **Polymers**, v. 14, n. 752, 2022.

TYAGI, A.; GUPTA, K. R. "Carbon Nanostructures from Biomass Waste for Supercapacitor Applications". In: Krishnamoorthy, S.; Iniewski, K. (eds), **Nanomaterials**, 1 ed., chapter 11, Boca Raton, USA, Taylor & Francis Group, 2016.

VANGIJZEGEM, T.; LECOMTE, V.; TERNAD, I. *et al.* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION): From Fundamentals to State-of-the-Art Innovative Applications for Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 236, 2023.

VESTAL, R. C.; ZHANG, J. Z. Effects of Surface Coordination Chemistry on the Magnetic Properties of MnFe₂O₄ Spinel Ferrite Nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 9828-9833, 2003.

WALLYN, J.; ANTON, N.; VANDAMME, F. T. Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications—A Review. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p 601, 2019.

WANG, W. *et al.* Nanomedicine in lung cancer: Current states of overcoming drug resistance and improving cancer immunotherapy. **WIREs Nanomed Nanobiotechnol**, v. 13, n 1, 2020.

WANG, X. *et al.*, Polycarbonate-based ultra-pH sensitive nanoparticles improve therapeutic window, v. 11, n. 5828, 2020.

WANG, Y.; LIN, Y.; QJAO, H. *et al.* Polymeric nanoparticles promote macrophage reversal from M2 to M1 phenotypes in the tumor microenvironment. **Biomaterials**, v.

112, n. 153-163, 2017.

WEN, H.; JUNG, H.; LI, X. Drug Delivery Approaches in Addressing Clinical Pharmacology-Related Issues: Opportunities and Challenges. *The AAPS Journal*, v. 17, p. 1327-1350, 2015.

WINSETT, J.; MOILANEN, A.; PAUDEL, K. *et al.* Quantitative determination of magnetite and maghemite in iron oxide nanoparticles using Mössbauer spectroscopy. *SN Appl. Sci.*, v. 1, n. 1636, 2019.

WNEK, J. W.; DAVIES, R. An analysis of the dependence of the zeta potential and surface charge on surfactant concentration, ionic strength, and pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 60, p 361-375, 1977.

WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL (WCRF International). **Lung Cancer**. Disponível em: <<https://www.wcrf.org/diet-activity-and-cancer/cancer-types/lung-cancer/>>. Acesso em: 23 Jun 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019; 2020. Disponível em: who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death.

WU, H. S.; MOU, Y. C.; LIN, P. H. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chem Soc Rev*, v. 42, n. 9, 2013.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters*, v. 3, n. 397, 2008.

WU, W. *et al.* Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2015, v. 16, n. 23501, 2015.

YAKASAI, F.; JAAFAR, Z. M.; SIDEK, A. M. *et al.* Co-precipitation and grafting of (3-Aminopropyl) triethoxysilane on Ferro nanoparticles to enhance oil recovery mechanisms at reservoir conditions. *Journal of Molecular Liquids*, v. 371, 2023.

YAMAURA, M.; CAMILO, L. R.; SAMPAIO, C. L. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 273, n. 2-3, p. 210-217, 2004.

ZAPPA, C. *et al.* Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research*, v. 5, n. 3, 2016.

ZANGANEH, S.; HUTTER, G.; SPITLER, R. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nature Nanotechnology*, v. 11, p.986-995, 2016.

ZHANG, F.; PARAYATH, N. N.; ENE, I. C. *et al.* Genetic programming of macrophages to perform anti-tumor functions using targeted mRNA nanocarriers. *Nature Communications*, v. 10, n. 3974, 2019.

ZHANG, J.; LI, H.; LI, S. *et al.* Effects of metal ions with different valences on colloidal aggregation in low-concentration silica colloidal systems characterized by continuous

online zeta potential analysis. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 481, p. 1-6, 2015.

ZHANG, J.; LIN, S.; HAN, M. *et al.* Adsorption Properties of Magnetic Magnetite Nanoparticle for Coexistent Cr(VI) and Cu(II) in Mixed Solution. **Water**, 12, n. 446, 2020

ZHANG, J.; PATEL, L.; PIENTA, J. K. CC chemokine ligand 2 (CCL2) promotes prostate cancer tumorigenesis and metastasis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 21, n. 1, p. 41-48, 2010.

ZHANG, L. L. *et al.* Carbon-based materials as supercapacitor electrodes. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 2520-2531, 2009.

ZHANG, W.; CAO, S.; LIANG, S. *et al.* Differently Charged Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles Preferentially Induced M1-Like Phenotype of Macrophages. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 8, n. 537, 2020.

ZHANG, X.; XU, Q.; YU, X. *et al.*, What Is Long-Term Survival and Which First-Line Immunotherapy Brings Long-Term Survival for Advanced Wild-Type Non-Small Cell Lung Cancer: A Network Meta-Analysis Based on Integrated Analysis. **Front. Immunol.** v. 13, n. 764643, 2022

ZHAO, Q. *et al.* Engineered TCR-T cell immunotherapy in anticancer precision medicine: Pros and cons. **Front. Immunol.** v. 12, n. 658753, 2021.

ZHU, M.; LERUM, Z. M.; CHEN, W. How To Prepare Reproducible, Homogeneous, and Hydrolytically Stable Aminosilane-Derived Layers on Silica. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 416–423, 2012.