

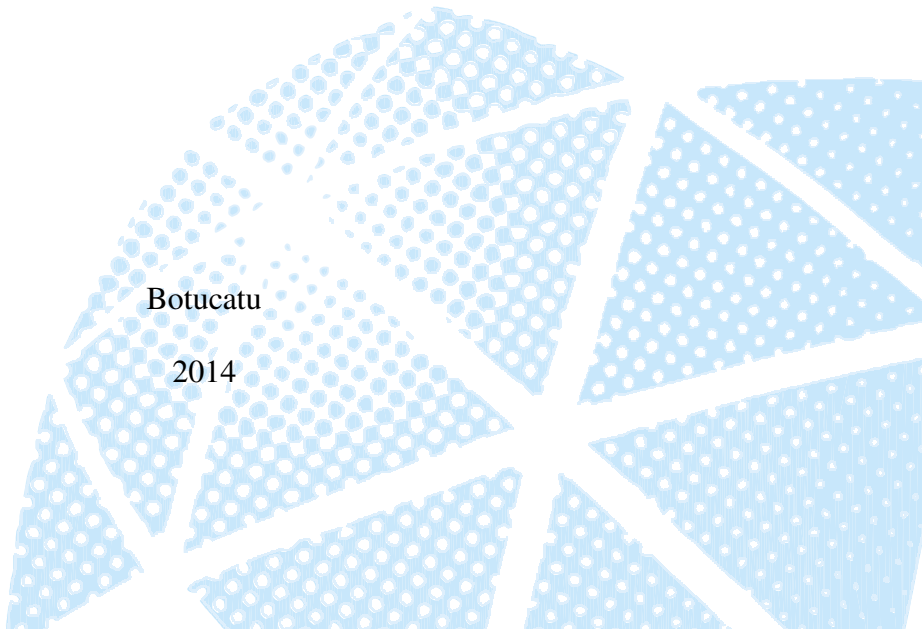
Marina de Carvalho

Marcadores magnéticos à base de nanopartículas de ferrita recoberta com quitosana: Influência da quantidade de quitosana na morfologia e na deposição de apatita

Orientadora: Prof^a. Dr^a.Margarida Juri Saeki

Botucatu

2014



Marina de Carvalho

Marcadores magnéticos à base de nanopartículas de ferrita recoberta com quitosana: Influência da quantidade de quitosana na morfologia e na deposição de apatita

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margarida Juri Saeki

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,
para a obtenção do título de Bacharel em
Física Médica.

Botucatu

2014

Dedicatória

A toda minha família, pais, irmãos, tias(os), avós(os), primos que sempre me incentivaram a lutar pelos meus ideais e estão sempre na torcida para minha vitória.

Em especial aos meus pais, que além de me apoiarem, foram eles que se esforçaram fazendo o possível e o impossível para eu chegar onde estou e me manter firme e forte.

"Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!"

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para chegar até aqui e não desistir nunca.

Aos meus pais que sem o esforço e amor deles não estaria onde estou.

A universidade, seu corpo docente, direção e administração que me ensinaram e me orientaram na minha formação.

A minha orientadora Margarida, por todo o suporte mesmo na correria, pelas suas correções e incentivos.

Ao Murillo que me ensinou e ajudou muito todo o tempo na iniciação científica.

A meu amigo João que sintetizou todas as amostras.

Ao Rafael pela força e ajuda nos momentos difíceis.

Ao professor Ramon pelo desenvolvimento da metodologia para o teste biológico, bem como os experimentos conduzidos por ele.

A todos os meus amigos(as) que estiveram sempre do meu lado me apoiando, dando força e me ajudando sempre.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

"Que minha coragem seja maior que meu medo, e que minha força seja tão grande quanto minha fé" Clarice Lispector

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. FUNDAMENTOS.....	6
2.1. Nanocarreadores.....	6
2.2. Nano partículas Magnéticas.....	7
2.3. Hidroxiapatita.....	10
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Revestimento da ferrita com quitosana.....	11
4.2. Mimetização da ferrita revestida com quitosana.....	12
4.3. Caracterização física do compósito.....	12
4.3.1. Difratomia de raios-x (DRX).....	12
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	13
4.3.3. Medidas Magnéticas.....	13
4.3.4. Medidas de mobilidade eletroforética e análise de distribuição de tamanho.....	13
4.3.5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	14
4.4. Teste biológico (monócitos).....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5.1. Caracterização da ferrita.....	15
5.2. Caracterização da ferrita revestida com quitosana.....	17
5.3. Caracterização da ferrita revestida com quitosana e mimetizada.....	18
5.4. Teste biológico.....	20
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
7. TRABALHOS FUTUROS.....	22
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

RESUMO

Os medicamentos antitumorais podem ser encaminhados a seus alvos através de nanocarreadores, entretanto direcionar esses fármacos de forma específica para células malignas é uma tarefa ainda difícil.

Não obstante, presume-se que as células de câncer de mama têm uma grande afinidade pela hidroxiapatita (fase mineral principal do osso) dado que, na sua evolução, a ocorrência da metástase óssea é frequente. Essa propriedade poderia ser usada para aumentar a especificidade na associação dos carreadores com as células de câncer de mama.

No presente trabalho, carreadores à base de: nanopartícula magnética (ferrita), revestida com um polímero biocompatível, biodegradável e não tóxico (quitosana), contendo em sua superfície partículas de apatita, foram desenvolvidos. A influência da proporção ferrita/quitosana na morfologia da partícula, bem como procedimento para melhor ancorar a apatita foram avaliadas no presente estudo.

Espera-se que esta estrutura permita guiar os carreadores até o alvo com aplicação de campo magnético externo, bem como encapsular o fármaco na porção polimérica do nanocarreador. Além disso espera-se que a apatita aumente a afinidade da célula cancerígena pelo carreador.

Os materiais obtidos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) e medidas de mobilidade eletroforética para determinação de potencial de superfície das partículas (zeta) e análise de distribuição de tamanho.

A proporção ferrita/quitosana 2:1 proporcionou partículas mais esféricas. O tratamento com NaOH das partículas de ferrita revestidas com quitosana proporcionou um aumento na quantidade ancorada de apatita. Esse estudo pode contribuir no aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico e tratamento do câncer por técnicas que utilizam materiais magnéticos como sonda e que dispensam o uso de radiação ionizante tais como biossusceptometria de corrente alternada (BAC) e hipertermia magnética.

ABSTRACT

The antitumor drugs can be forwarded to their target by nanocarriers, however direct these drugs specifically to malignant cells is still difficult. However, it is assumed that the breast cancer cells have a high affinity for hydroxyapatite (main mineral phase of bone) because in its development, the occurrence of bone metastases is common. This property could be used to increase the specificity in the association of carriers with breast cancer cells.

In this paper, carriers based on: magnetic nanoparticle (ferrite), coated with a biocompatible polymer, biodegradable and non-toxic (chitosan), containing on its surface particles of apatite, were developed. The influence of the proportion of ferrite / chitosan in particle morphology as well as to better anchor the procedure apatite, were evaluated in this study.

It is expected that this structure allows to guide the carrier to the target with application of external magnetic field and to encapsulate the drug in the polymer portion of the nanocarrier. Furthermore it is expected that the apatite will increase the affinity of the cancer cell by the carrier.

The materials were analyzed by scanning electron microscopy (MEV), infrared spectroscopy (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) and electrophoretic mobility measurements to determine the particle surface potential (zeta) and size distribution analysis.

The proportion of ferrite/chitosan 2: 1 yielded more spherical particles. The treatment with NaOH ferrite particles coated with chitosan resulted in an increase in the amount anchored apatite. This study may contribute to the improvement of methods of diagnosis and treatment of cancer by techniques using magnetic materials as a probe and not require the use of ionizing radiation such as biosusceptometry (BAC) and magnetic hyperthermia.

1. Introdução

O câncer é uma doença que tem como principal característica o crescimento desordenado de células. Invadem órgãos e tecidos, sendo registrada mais de uma centena de tipos. Dentre eles o câncer de mama, próstata, pulmão, fígado e tireoide, são temidos devido à metástase.

O câncer de mama é considerado hoje um problema de saúde pública devido a alta incidência (GEBRIM e QUADROS, 2006). A taxa de incidência aumentou cerca de 3% ao ano durante a década de 90, segundo as informações do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. Este dado se deve, em parte, à melhora na resolução das técnicas de detecção desta doença e aos programas de saúde para diagnóstico. Após o ano de 2003, o número de casos registrados diminuiu, o que pode indicar, entre outras causas, à limitação na capacidade de detecção, o que aponta a necessidade de aprimorar ainda mais as técnicas em uso bem como desenvolver novas técnicas de diagnóstico, além de disseminar novos programas de rastreamento de diagnóstico. (TIEZZI, 2009).

No tratamento de câncer, o uso de agentes quimioterápicos é o mais comum. Infelizmente vem associado aos indesejáveis efeitos secundários e afetam a saúde dos pacientes. São atribuídos à ação inespecífica destes agentes que se dão principalmente pela forma como eles chegam a seu alvo. Por isso, durante os últimos 20 anos, diferentes métodos que permitem aplicar a drogas diretamente no local do tumor foram desenvolvidos. Isso melhoraria a eficácia da atuação dos fármacos no tumor alvo e protegeria o tecido saudável da droga.

Devido à ação relativamente inespecífica de agentes quimioterápicos, desenvolver métodos que sejam capazes de levar o agente antineoplásico ao seu alvo (tumor) de forma mais seletiva é de grande importância. Isso reduziria a distribuição sistêmica generalizada e seus efeitos sistêmicos tóxicos secundários. Poderá reduzir também a dose, o que consequentemente levaria a uma redução da toxicidade.

Há relatos de resultados satisfatório de quimioterapia utilizando microesferas de albumina e material magnético dirigida por campos magnéticos (ALEIXOU et al., 2000). Neste experimento, feito em animais (camundongos e ratos) com carcinoma de células escamosas, a droga antitumoral de mitoxantrona ligada às partículas magnéticas (ferrofluidos vinculados a mitoxantrona, FF-MTX) foi injetada e usando um campo magnético externo (ímã permanente com intensidade do campo magnético de 0,5-0,8

Tesla) essa droga foi dirigida para o tumor. Essa forma de condução ao tumor foi bem sucedida, havendo a remissão completa e permanente do carcinoma de células escamosas, sem sinais de toxicidade. Depois desse experimento, Lübbe *et al* realizou esse mesmo procedimento em pacientes com doença avançada de câncer ou sarcoma tratado sem sucesso. Esta abordagem, do fármaco com alvo magnético, foi bem sucedida, havendo a retenção do complexo FF no alvo reduzindo sistema reticuloendotelial (RES) e facilitando a absorção extravascular.

Para otimizar a concentração de partículas magnéticas intratumoral, várias características devem ser consideradas: (a) as partículas devem ser de um tamanho que permita a atração pelo campo magnético, e introduzi-las no interior do tumor ou no sistema vascular circundante do tumor; (b) a intensidade do campo magnético deve ser suficiente para atrair as nanopartículas magnéticas para a área desejada, mas não trazer outras consequências ao paciente; (c) o complexo FF-MTX deve entregar a droga antitumoral ao alvo (tumor) e liberar uma quantidade suficiente de agente anticancerígeno sob taxa adequada e (d) o método de injeção deve ter um bom acesso à vascularização tumoral e deve evitar apuramento (*clearance*) pelo sistema retículo-endotelial ("efeito de primeira passagem") (ALEXIOU et al, 2000).

O objetivo do estudo foi comparar diferentes aplicações de direcionar a droga magnética para tratamento de células escamosas. Os ferro-fluidos são visíveis histologicamente e por técnicas de imagens visíveis, como a ressonância magnética, também pretendia mostrar a distribuição morfológica intratumoral das partículas magnéticas em contato com um campo magnético externo direcionado na região do tumor (ALEXIOU et al, 2000).

Targeting de drogas magnéticas (MDT) é um sistema de entrega de fármacos que pode ser utilizado no tratamento do câncer local. Consiste de partículas magnéticas revestidas com amido e/ou quitosana que podem ser ionicamente e reversivelmente ligadas a um agente quimioterapêutico (ALEXIOU et al, 2005). Depois da injeção intra-arterial são atraídos para a região do tumor por um campo magnético externo. A atração das nanopartículas magnéticas depende da intensidade do campo magnético. O agente quimioterapêutico é liberado do compósito magnético cuja taxa é dependente do tempo. Segundo os autores, as nanopartículas de ferrita são enriquecidas e metabolizadas no baço e fígado após o tratamento (ALEXIOU et al, 2005).

A quitosana e seus derivados têm sido amplamente utilizados em muitas aplicações

biomédicas devido suas propriedades biológicas e químicas que lhe conferem biocompatibilidade e biodegradabilidade. A quitosana é uma macromolécula hidrofílica (graças aos grupos -OH e NH₂) derivada do segundo polímero natural mais abundante da crosta terrestre: a quitina (componente principal do crustáceo). É obtida pela desacetilação parcial da quitina, em condições alcalinas. Dependendo do seu grau de desacetilação e o peso molecular, a quitosana é solúvel em soluções de ácidos fracos, quando mostra seu carácter policatiónico. Partículas de quitosana pode ser obtida por reticulação química, utilizando glutaraldeído para estabilizar a partícula. Sabe-se ainda que a abertura entre as cadeias em polímeros como a quitosana depende de fatores como temperatura e pH do meio, possibilitando um maior controle da liberação da droga com a mudança destas variáveis. (ACIKGOZ et al., 1996).

Recentemente, a quitosana foi utilizada no desenvolvimento de sistemas de carregamento de drogas. No trabalho de Acikgoz et al. (1996) microesferas de quitosana grandes (>100 µm) foram preparadas por método de emulsão e foram utilizadas na entrega por vias diferentes os anti-inflamatórios diclofenaco sódico, a mitoxantrona, agente antineoplásico e outras substâncias bio-ativas, tais como a furosemda (KBUGA E DURMAZ, 1994), teofilina, griseofulvina e aspirina (THANOO et al., 1992). A liberação foi prolongada para todas as drogas. As pequenas microesferas de quitosana (<10 µm) foram também desenvolvidas para entrega específica de agentes anticancerígeno, tais como oxantrazole (HASSAN et al., 1992) e 5-fluorouracil (OHAYA et al., 1993).

Vários classes de fármacos foram testadas em sistemas de liberação controlada, sendo que uma delas é antibiótico, como a doxiciclina (SHANMUGANATHAN et. al, 2008), e outros, anti-tumorais como a metoxantrona (ALEXIOU et. al, 2006) e dextran (QI et. al, 2010). Outra droga em destaque é o paclitaxel com ação anti-neoplásica alta. É considerado um dos agentes mais eficaz disponíveis dos últimos anos (WANG, HO e LIM, 2010; YU e PISHKO, 2010). No entanto, sua aplicação clinica ainda não é ampla devido a sua baixa solubilidade em água e ação pouco específica para células tumorais. Estudos para que permita reduzir seus possíveis efeitos colaterais é interessante (WANG, HO e LIM, 2010).

Em 2008, Zhang e colaboradores propuseram a síntese de micelas à base de quitosana modificada com N-octil-O-sulfato para a liberação controlada de paclitaxel (ZHANG et al., 2008). Com isso, foi observada uma redução dos efeitos tóxicos sendo mantida a ação anti-tumoral. Os órgãos de ratos (Kumming) foram submetidos a diversas doses deste fármaco, revestidos e não revestidos com quitosana, e analisados quanto aos efeitos tóxicos. A ação antitumoral de ambas as formulações foram também avaliadas em ratos (Kumming) nos quais encontravam-se inoculados Sarcoma 180, Hepatoma, Câncer de Pulmão Lewis ou Câncer de Pulmão Humano A-549.

Deste modo, a síntese de esferas de quitosana modificada e carregadas com paclitaxel e partículas de hidroxiapatita embebidas em sua superfície seriam interessantes para proporcionar maior especificidade na interação com os tecidos tumorais em comparação ao sadio e liberação controlada dessa droga. Adicionalmente, a introdução de nanopartículas magnéticas neste sistema permitiria, não somente o carregamento da droga com aplicação de um campo magnético externo, mas também o monitoramento, controle do tempo de permanência no tecido, utilizando a técnica de biosusceptometria de corrente alternada (BAC), bem como o controle da liberação da droga por aquecimento (hipertemia) (KIM et. al, 2005; KIM et. al, 2006; BAE, LEE e TAKEMURA, 2006).

2. Fundamentos

2.1. Nanocarreadores

Inúmeras estratégias vêm sendo desenvolvidas e utilizadas na terapia de câncer, sendo a maioria destas para melhorar a entrega do medicamento no local do tumor, como é o caso dos nanocarreadores. Estes, além de trazer vários benefícios terapêuticos, podem também superar casos de resistência a múltiplas drogas pelas células cancerosas. (JABIR et al., 2012).

Entre as vantagens deste sistema estão o uso de menor quantidade de medicamento, seletividade em relação ao alvo biológico (tecido ou células), reduzidos efeitos colaterais e liberação controlada evitando os picos de dosagem, típicos de medicamentos convencionais. (CERIZE, 2012; ASAI, 2012).

Os medicamentos são encaminhados para seus locais de ação através dos nanocarreadores, que direcionam essas drogas de forma específica para células

malignas. Os nanocarreadores mais utilizados são nanopartículas lipossomais, micelares, de ouro, de carbono, dendrítica e nanopartículas magnéticas, sendo a última a utilizada no presente trabalho. Esta pode ser associada ainda a outros procedimentos, como a hipertermia, que promove o aquecimento dessas nanopartículas levando à lise das células cancerosas.

No presente trabalho foram utilizados nanocarreadores, onde o revestimento do material magnético com quitosana foi feito pelo método de micela reversa. O método, com pequena modificação, permite que incorpore o fármaco na fase polimérica. Micelas são agregados de moléculas anfifílicas, formadas de maneira espontânea em meio aquoso, onde possuem propriedades hidrofílicas na parte externa e hidrofóbicas na parte interna. Pode apresentar estrutura de caroço ou casca, com tamanhos que variam desde 10 a 100 nm. O objetivo primário da micela é proteger e melhorar a solubilidade e estabilidade hidrofóbica (lipofílica) dos fármacos. Demonstrou-se que a solubilidade aquosa de nanopartículas micelares podem ser aumentadas em até 30 mil vezes em relação aos tamanhos macromoleculares. (HOLTZ, 2009; BOULAIZ et al., 2011; KATAOKA et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2012), (CAIXETA, A. V. E NINSFELD, C. P.). De maneira similar, a micela reversa é formada espontaneamente em meio apolar constituída de moléculas anfifílicas com parte hidrofóbicas na parte externa e hidrofílicas na parte interna.

2.2. Nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas têm recebido atenção especial para a utilização no tratamento do câncer pela técnica de hipertermia por poderem ser guiadas ou localizadas em um alvo específico por campos magnéticos externos. A possibilidade da vetorização de nanopartículas magnéticas através de gradientes de campos magnéticos levou ao desenvolvimento de várias técnicas de encapsulamento de partículas magnéticas de forma que os sistemas obtidos se tornassem efetivos carreadores de drogas com especificidade tumoral para a liberação controlada de agentes quimioterápicos.

Um pré-requisito importante para a utilização clínica da magneto-hipertermia é que as nanopartículas devem apresentar baixos níveis de toxicidade, assim como um elevado momento magnético de saturação para minimizar as doses requeridas do material. Neste contexto, cerâmicas com composição do tipo Ítrio-Ferro-Alumínio

(YFeAl) aparecem como um candidato promissor, visto que possuem uma alta temperatura de Curie (T_C) e elevado momento de saturação (CASTRO et.al, 2010). Entretanto, tais partículas possuem elevada citotoxicidade, sendo necessária técnicas de encapsulamento que imputem as nanopartículas ferromagnéticas às propriedades biocompatíveis necessárias para aplicação de modo clinicamente seguro (CASTRO et.al, 2010).

Nanopartículas magnéticas oferece possibilidades importantes a biomedicina tais como: para carreadores de droga, agentes de contraste em imagens de ressonância magnética nuclear para diagnóstico por imagem, separação magnética de células ou moléculas biológicas variadas, marcadores para célula-alvo, terapia do câncer e bio-engenharia. A imunolocalização de células tumorais com o uso de nanopartículas superparamagnéticas permite detectar precocemente os tumores e micrometástases por ressonância magnética nuclear. A impregnação de células tumorais com nanopartículas também pode facilitar a erradicação de tumores, mediante uma lise celular focal e dirigida pelo processo de magneto-hipertermia.

Quanto ao quesito "tamanho das partículas magnéticas", podem variar desde alguns nanômetros até dezenas de nanômetros, que são de dimensões menores ou comparáveis àqueles de uma célula (10-100 μ m), vírus (20-450 nm), proteínas (5-50 nm) ou de genes (2 nm de largura e 1-10 nm de comprimento). Significa que podem se associar a uma entidade biológica de interesse, podendo ser revestidos com moléculas biológicas ou mesmo ligados proporcionando interação interessantes para "tagging".

Em segundo lugar, as nanopartículas são magnéticas, o que significa que obedecem a lei de Faraday, e podem ser manipuladas por um gradiente de campo magnético externo. Esta "ação à distância", combinado com a penetração de campos magnéticos intrínsecos no tecido humano, proporciona inúmeras aplicações envolvendo o transporte e/ou imobilização de nanopartículas magnéticas, ou de marcar magneticamente as entidades biológicas. Dessa forma, as nanopartículas magnéticas podem carrear desde uma droga anticâncer até um corte de átomos de radionuclídeos, a uma região-alvo do corpo como um tumor.

Terceiro, as nanopartículas magnéticas podem responder a um campo ressonante magnético variável no tempo, com resultados vantajosos relacionados com a transferência de energia do campo excitante para a nanopartícula. Por exemplo, a partícula pode ser feita para aquecer, como agentes de hipertermia, fornecendo quantidades tóxicas de energia térmica aos órgãos alvo (tumores), ou como tratamento

coadjuvante à quimioterapia e radioterapia. Estas e outras aplicações, disponibilizadas na área da biomedicina devido às propriedades físicas de nanopartículas magnéticas constam no livro: *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine* (PANKHURST Q.A., et al.).

As nanopartículas magnéticas devem atravessar a barreira endotelial e se acumular especificamente nas células alvo, sem dano às células normais. Estas características podem ser atingidas por meio do recobrimento das partículas com um material biologicamente ativo, do controle de seus parâmetros físicos, tais como o tamanho da partícula, a suscetibilidade magnética da solução e o conhecimento do seu comportamento no organismo.

O carregamento de drogas por sistemas nanoparticulados é considerado uma técnica valiosa para otimizar a liberação controlada de drogas. A miniaturização de um sistema carreador de drogas até a escala nanométrica permite boa estabilidade, absorção e transferência tissular quantitativa excelente, e, assim, a esperada atividade farmacodinâmica. Além disso, os efeitos colaterais e as reações por corpo estranho podem ser evitados, simultaneamente à obtenção de tolerância local e sistêmica. Tais propósitos podem ser atingidos ao liberar a dose correta da droga especificamente nos tecidos ou nas células-alvo, sem sobrecarregar o organismo com doses massivas, o que é verdadeiro, sobretudo, para drogas com efeitos colaterais graves, como os quimioterápicos para câncer.

Muitos sistemas nanoparticulados estão sendo usados atualmente e, entre eles, os baseados nas nanopartículas magnéticas assumem papel importante em virtude da propriedade de serem conduzidos e retidos em uma região específica do corpo por meio de gradiente de campo magnético externo. Com o objetivo de aumentar a especificidade, o conjugado NPM (nanopartícula magnética)-fármaco pode ser associado com outra molécula capaz de reconhecer e se ligar especificamente ao sítio do alvo. Tais moléculas podem ser anticorpos, proteínas, lectinas e hormônios, entre outros. Dessa forma, acreditam que uma administração sítio-dirigida do conjugado NPM-droga associado ao anticorpo monoclonal específico atingiria especificamente as células-alvo tumorais (PAVON E OKAMOTO, 2007).

2.3. Hidroxiapatita

As células de câncer de mama têm uma grande afinidade com a hidroxiapatita (presente no osso), motivo que conduz a uma ocorrência elevada de metástase óssea. Assim, poderia usar essa afinidade pela apatita para desenvolver um método de diagnosticar e tratar o câncer.

A partir dessa ideia, no grupo de pesquisa em que foi desenvolvido o presente trabalho, foi desenvolvido um bio-nanocompósito (bio-PCN), o qual poderia ser usado tanto para o diagnóstico e como para tratamento do câncer de mama. Esse bio-PCN consiste em nanopartículas magnéticas encapsuladas por um polímero cuja superfície é modificada com minúsculos cristais de apatita. (MARTINS, et.al. 2014)

3. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi revestir a superfície da ferrita de manganês e zinco de fórmula $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_{2,8}O_4$ com quitosana, previamente preparada pelo método de coprecipitação. O revestimento foi feito usando três proporções diferentes de ferrita/quitosana os quais podem influenciar na forma do nanocompósito. Após o revestimento, foi feita a mimetização das partículas de apatita sobre a ferrita revestida com quitosana, usando modos diferentes para suspender o nanocompósito.

4. Materiais e métodos

Os reagentes utilizados na preparação foram:

- Ferrita- 40 mg/L
- NaOH (Aldrich, P.A.)- 0,5 mol/L
- Quitosana (Aldrich, P.A.)
- Ácido Acético (J.T. Baker, 99,8%).
- Parafina (Sigma-Aldrich, P.A.)
- Ácido Oleico (Aldrich, P.A.)
- Glutaraldeído (Aldrich, P.A.)
- Água deionizada
- Acetona (Sygma-Aldrich)
- Clorofórmio (Synth)
- Agitador magnético

- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Pro Analysi-Merck)
- H_3PO_4 (Sigma-Aldrich)
- KBr (Vetec, grau espectroscópico)

A água utilizada para lavagem dos materiais e preparação das soluções foi a purificada pelo sistema de marca Millipore, modelo Direct-Q com resistividade de $18,3 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$.

A ferrita utilizada tinha uma composição nominal de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$, preparada primeiramente pela dissolução de quantidade correspondente dos sais: $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, em água. Esta foi gotejada numa solução de NaOH a $0,2 \text{ mol/L}$, que estava a uma temperatura maior que 90°C . Após a co-precipitação na forma de hidróxidos, a mistura foi mantida por 1h sob agitação. O precipitado foi lavado até o pH da solução sobrenadante atingir um valor próximo a 7,0. A suspensão final foi controlada para que tivesse uma concentração de 40 mg/mL em ferrita. As medidas de mobilidade eletroforética das partículas foi feita na forma de suspensão. A amostra foi secada para a caracterização física mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX) e teste de magnetização.

4.1. Revestimento da ferrita com quitosana

O método utilizado para o revestimento da ferrita foi o método de micela reversa. Primeiramente a quitosana foi dissolvida em água e ácido acético. Depois, a ferrita sob proporção de 2:1 e 1:1 (em massa em relação à quitosana foi adicionada a esta solução sob vigorosa agitação magnética.

Em outra solução, que consistia de mistura de parafina e ácido oleico, a suspensão de ferrita e quitosana foi adicionada sob agitação até obter uma mistura uniforme (formação de micelas reversas).

Na etapa seguinte, adicionou-se glutaraldeído para a reticulação das cadeias de quitosana e a amostra foi lavada diversas vezes com álcool etílico com o auxílio de um banho de ultrassom (Unique, modelo USC 1800) e sedimentação por centrifugação (marca Jouan, modelo 1812) com uma velocidade de aproximadamente 7500 rpm , por cerca de 5 minutos a 12°C . Finalmente, a amostra foi lavada com clorofórmio e acetona para ser secada em estufa por meia hora.

4.2. Mimetização da ferrita revestida com quitosana

As amostras obtidas conforme acima descrito (com ferrita/quitosana 2:1, 1:1, 3:1), foram divididas cada qual em duas partes iguais e submetidas ao processo de mimetização.

Uma das partes foi suspenso diretamente numa solução de cloreto de cálcio a 0,002 mol/L e mantido nela sob agitação por 2h (processo de envelhecimento). Após essa etapa, uma solução de fosfato de sódio a 0,006 mol/L e pH 7,4 foi adicionada numa quantidade suficiente para que a proporção cálcio/hidroxiapatita (Ca/P) fosse 1,67 e agitada por 1 hora (processo de mimetização). Após esse tempo a amostra foi lavada com água deionizada gelada e secada durante 30 min na estufa.

A outra parte foi suspensa numa solução de NaOH a 0,5 mol/L permanecendo lá por uma hora. Em seguida, o sobrenadante foi removido e lavada com água até pH neutro, certificando-se com isso que o excesso de NaOH foi removido. Posteriormente, foi submetida aos processos de envelhecimento e mimetização, seguindo o descrito acima. O efeito do pré-tratamento com NaOH foi estudado comparando-se com os espectros no infravermelho das amostras que não passaram por esse tratamento.

4.3. Caracterização física do compósito

4.3.1. Difratometria de Raios X (DRX)

A formação da ferrita sob estrutura de espinélio foi certificada mediante difratometria de raios X (DRX), num equipamento da marca Rigaku, modelo Ultima VI (radiação K_{α} do cobre de comprimento de onda 1,5452 Å, munido de monocromador). Os dados foram coletados no modo de tempo fixo, com passo de 0,02 graus e tempo de coleta igual a 2s variando o ângulo de análise (2θ) de 10 a 100 graus. A identificação das fases presentes nas amostras foi feita comparando-se com os dados do banco de padrões de difração para estruturas cristalinas ICDD (Versão PDF-2).

4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras na forma de pó foram suspendidas em isopropanol com o auxílio do banho ultrassônico (Unique, modelo USC 1800). A amostra foi transferida sobre lamínulas de vidro, colada sobre a base ("stub") em alumínio, com o auxílio de um bastão de vidro e secas. Após a metalização com ouro (Au), foram analisadas num microscópio eletrônico de varredura marca FEI, modelo Quanta 200. Para a obtenção de imagens foi utilizada o detector de elétrons secundários (Everhart-Thornley) e para análise semiquantitativa dos elementos utilizou-se um detector de EDX da Oxford, modelo Inca 250P20.

4.3.3. Medidas magnéticas

As medidas foram feitas a 300K num equipamento "*Physical Property Measurement System*" (PPMS), da Quantum Design USA Inc, do laboratório do Grupo de Supercondutividade e Magnetismo (GSM) da UFSCar.

4.3.4. Medidas de mobilidade eletroforética e análise de distribuição de tamanho

Estas medidas foram feitas num equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern. A suspensão foi diluída com KNO_3 a 1×10^{-3} mol/L até que atingisse uma concentração menor que 0,2 mg/L em partículas. A mobilidade foi medida em diferentes pHs, os quais foram ajustados usando-se KOH e HNO_3 diluídos.

A carga de partículas coloidais é expressa em termos de potencial zeta (ζ), que é o potencial eletrostático estabelecido na interface da dupla camada elétrica formada entre sólidos e solução. É um parâmetro importante, tendo em vista que a estabilidade de suspensão coloidal, bem como muito dos mecanismos de reconhecimento celular dependem dessa propriedade.

O potencial zeta é determinado a partir das medidas de mobilidade (v_E) das partículas quando submetidas a um campo elétrico, segundo a equação de Smoluchowsky (HUNTER, 1981):

$$v_E = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r \frac{\zeta}{6\pi\mu} (1 + \kappa r)$$

onde ϵ_0 e ϵ_r são as constantes dielétrica relativa e permissividade elétrica do vácuo, respectivamente, μ é a viscosidade da solução, r é o raio da partícula, $\kappa = (2\eta_0 Z^2 e^2 / \epsilon_r \epsilon_0 k_B T)^{1/2}$ é o parâmetro de Debye-Hückel, η_0 é a concentração iônica no seio da solução, Z é a valência do íon, e é a carga de um elétron, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta.

Normalmente, uma célula capilar é usada para tais medidas que dão origem a um potencial zeta adicional, entre a parede e a solução no capilar, produzindo um efeito chamado de eletro-osmose. Um campo elétrico alternado é aplicado, a uma frequência suficientemente alta para que o efeito eletro-osmótico seja minimizado. A mobilidade eletroforética das partículas coloidais, proporcional a suas cargas, é medida nestas condições [técnica é conhecida como *fast field reversal* (FFR)]. Uma vez que as cargas dependem das condições do meio, as medidas foram feitas em diferentes pHs para a determinação do pH isoelétrico.

O mesmo equipamento foi utilizada para a análise da distribuição de tamanho das partículas (espalhamento de radiação medida sob ângulo de 173°).

4.3.5. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras, em quantidade suficiente para formar uma mistura a 1% com KBr, foram pesadas e maceradas com KBr. Em seguida foram pastilhadas sob pressão de 3000 psi, formando-se um disco de 1,2 cm de diâmetro. As medidas foram feitas no modo transmissão num equipamento da marca Nicolet, modelo Nexus 670.

4.4 Teste biológico (monócitos)

Inicialmente, os monócitos foram isolados do sangue periferal de um doador sadio coletando-o com heparina e submetendo-o à centrifugação em gradiente Ficoll-Isopaque e Percoll. Em seguida, foram expandidos até obter uma suspensão celular de 2×10^5 células/mL, sendo que 1 mL por cada lamínula de 13 mm foi cultivada numa placa de 24 alvéolos. O conjunto foi suplementado com 1 mL de meio completo e incubado a 37°C por 24h em atmosfera de 5% em CO₂ para promover a aderência. Passado esse tempo, uma massa de 100 µg do material nanoparticulado foi adicionado à cultura e após 2h de contato as lamínulas foram gentilmente lavadas com PBS a 25°C e fixados com glutaraldeído a 2,5%.

A amostra sobre lamínula foi então processada (desidratada e secada sob condições acima do ponto crítico), sendo metalizada com ouro para ser examinada no Microscópio Eletrônico de Varredura da FEI, modelo Quanta 200, usando detector de elétrons secundários (Everhart-Thornley) e energia dispersiva de raios X.

Como controle, o teste foi feito da mesma maneira, porém sem os nanocompósitos.

A metodologia para o teste biológico, bem como os experimentos foram conduzidos pelo Prof. Ramon Kaneno do Departamento de Imunologia e Microbiologia do IB.

5. Resultados e discussão

5.1. Caracterização da ferrita

A Figura 1 mostra o padrão de difração de raios X da ferrita usada neste trabalho, de composição nominal de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ obtida por coprecipitação com NaOH 0,2 mol/L (PARRA., et al, 2014). A ferrita é constituída de uma fase única do tipo espinélio, grupo espacial Fd3m, de ICSD 28515 (PDF – 742402).

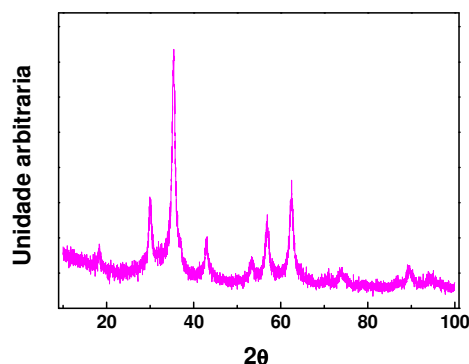


Figura 1: Difratoograma da amostra de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ preparada por coprecipitação em NaOH 0,2 mol/L.

Usando o Método Warren-Averbach (WA) (WARREN e AVERBACH, 1950; TORAYA, 1989) determinou-se que o tamanho médio de cristalito ponderados pela área é de 7,3 nm.

A análise da distribuição de tamanho de partículas, Figura 2, mostra que o tamanho hidrodinâmico médio das partículas é de 205 nm. A imagem mostrada na Figura 3, obtida num microscópio eletrônico de varredura das partículas, corrobora com esse resultado. Essa imagem mostra ainda que as partículas são esféricas.

O pH isoelétrico determinado foi de 3,6 (resultado não mostrado), o que significa que: se as partículas estiverem num meio cujo $\text{pH} < 3,6$ ou $\text{pH} > 3,6$, elas adquirem carga resultante positiva ou negativa, respectivamente; se estiverem num meio onde pH é próximo de 3,6, as partículas não terão carga e aglomerarão. Sendo o pH da solução de quitosana dissolvida em água contendo 5% em ácido acético entre 3-4 e que os grupos amino das cadeias de quitosana estão carregadas positivamente ($-\text{NH}_3^+$) neste pH, espera-se que a interação com as partículas de ferrita favoreça o recobrimento.

A magnetização de saturação foi cerca de $37 \mu\text{Am}^2/\text{kg}$ a 25°C .

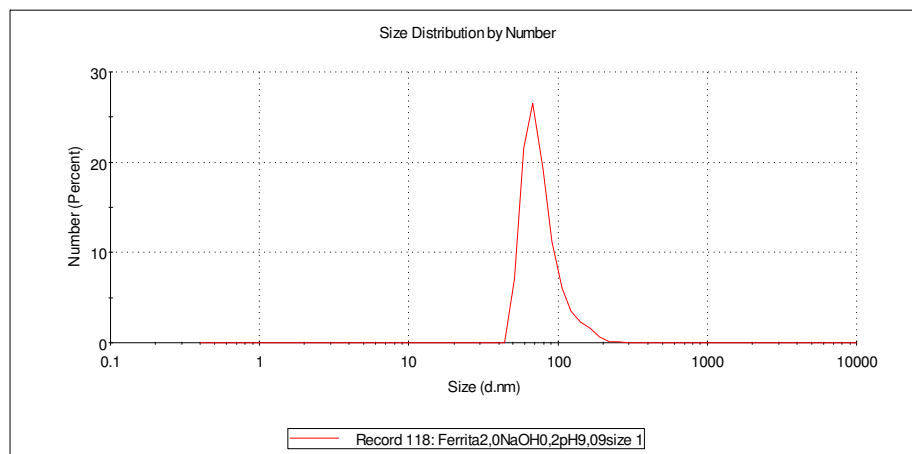


Figura 2: Distribuição do tamanho de partículas de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ preparada por coprecipitação em NaOH 0,2 mol/L.

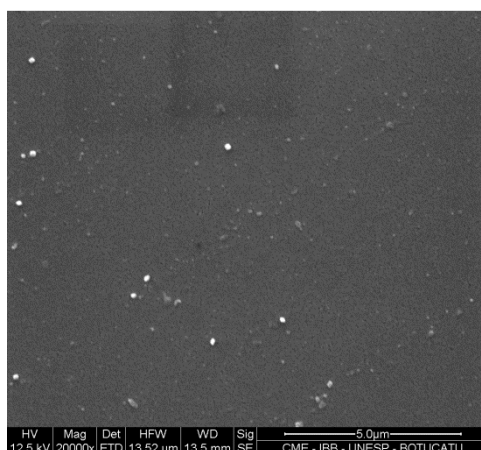


Figura 3: Imagem obtida num microscópio eletrônico de varredura das partículas de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ preparada por coprecipitação em NaOH 0,2 mol/L.

5.2. Caracterização da ferrita revestida com quitosana

As amostras de ferrita revestida com quitosana, pelo método de micelas reversas sob proporção de ferrita/quitosana (F/Q) iguais à 2/1 e 1/1, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) cujas imagens estão mostradas na Figura 4.

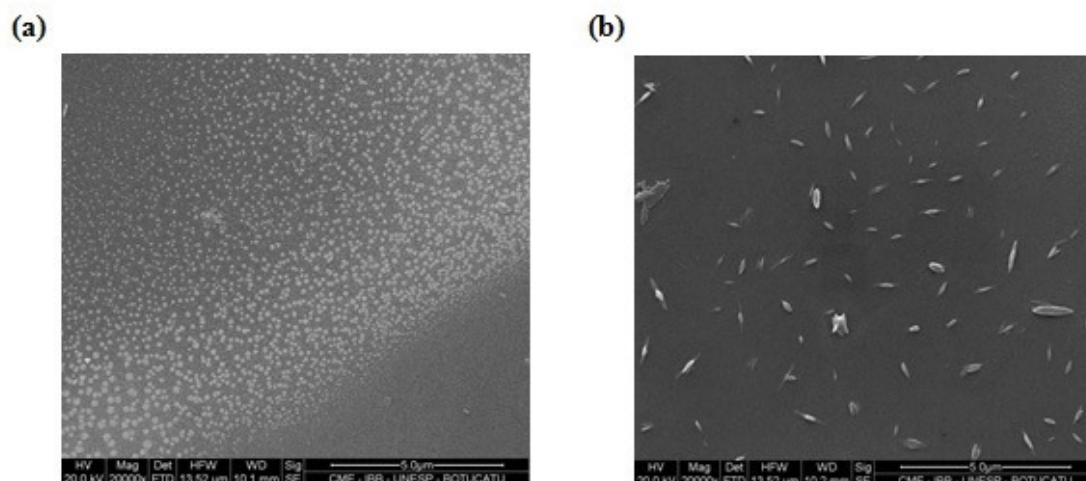


Figura 4: Imagens por MEV das nanopartículas de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ revestida com quitosana: (a) $F/Q=2/1$ e (b) $F/Q=1/1$

Nota-se que sob proporção 2/1, Figura 4(a), as partículas são mais arredondadas e dispersas. Já com proporção 1/1, as partículas tendem a ficar com formato mais alongado, provavelmente semelhante ao formato da quitosana sem ferrita.

Isso pode ser interpretado como seguinte: sob $F/Q=2/1$, o polímero se limita a encapsular a ferrita, adquirindo o formato esférico da partícula. Conforme a quantidade do polímero é aumentada, supera o necessário para encapsular a partícula e a quitosana tende então a adquirir seu formato natural, alongado.

O potencial zeta (ζ), determinado por medidas de mobilidade eletroforética, foi de -24,5 mV e o tamanho médio das partículas do nanocompósito foi de 355 nm com distribuição monomodal.

5.3. Caracterização da ferrita revestida com quitosana e mimetizada

Inicialmente, a influência do tratamento de ferrita revestida com quitosana com solução de NaOH a 0,5 mol/L na mimetização com cálcio e fosfato foi analisada.

A Figura 5(a) mostra os espectros no infravermelho (FTIR) da amostra de ferrita revestida com quitosana, sob proporção F/Q 1:1, mimetizada, sem e com o uso anterior da solução de NaOH.

As bandas entre 3400 a 3650 cm^{-1} referem-se às vibrações de estiramento e flexão da ligação -O-H; duplete em $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, às vibrações N-H das aminas primárias; picos em $2800\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$, às deformações angulares das ligações C-H; picos

em 2350 cm^{-1} , ao estiramento assimétrico das ligações O-C-O do CO_2 do ambiente ou adsorvido sobre a amostra; pico em 1730 cm^{-1} , à vibração do C=O; dupletes em $1560\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$, à amina primária; picos em $1050\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$, às vibrações da ligação C-O; $1020\text{--}1230\text{ cm}^{-1}$ à ligação C-N e vibração fundamental *bending* do CO_2 em 666 cm^{-1} e primeiro *overtone* do *bending* em 1334 cm^{-1} . As absorções das radiações nas frequências listadas referem-se todas às ligações presentes na quitosana reticulada com glutaraldeído e ao CO_2 da atmosfera.

A banda característica do grupo fosfato é a observada somente em torno de 1080 cm^{-1} . O aumento na intensidade dessa banda quando a amostra foi tratada com NaOH (ver Figura 5b) indica aumento na quantidade de apatita formada na superfície do nanocompósito. Cabe comentar que, embora o cálcio não possa ser analisado por esta técnica, a mimetização do fosfato depende sensivelmente da quantidade de cálcio ancorada, conforme demonstrada por Martins (2014). Sendo assim, o aumento na quantidade de fosfato observado significa que o tratamento com NaOH promoveu um aumento na quantidade de cálcio ancorada e, como consequência, aumentou a quantidade de fosfato depositada.

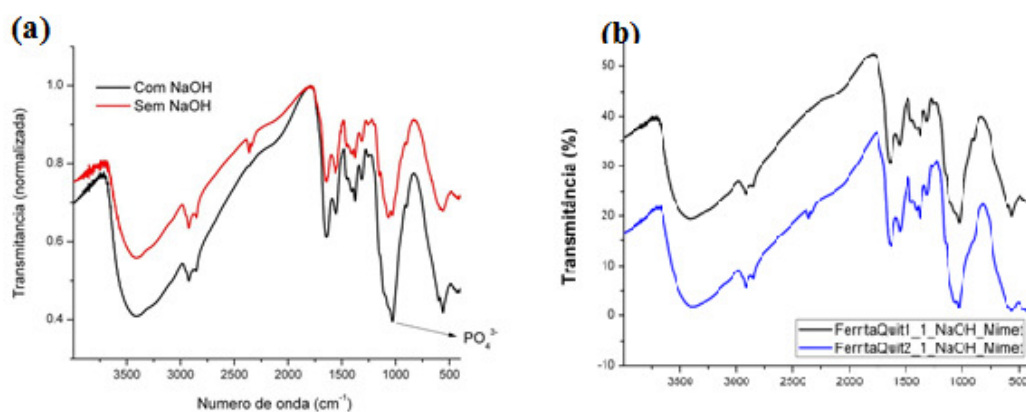


Figura 5: Espectro no infravermelho ferrita revestida com quitosana e mimetizada: (a) mimetizada sob proporção F/Q 1/1, pré-tratada ou não com NaOH e (b) amostras sob proporção F/Q 1/1 e 2/1 mimetizada após tratar com solução de NaOH.

Para entender melhor o processo, determinou-se o potencial zeta da ferrita revestida com quitosana (F/Q=2/1), em pH 7,4, antes e depois de tratar com o KOH (pH=10,0) durante 2h. Inicialmente, o pH da suspensão em KNO_3 a $1 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ contendo o compósito foi ajustado para 7,4. O potencial zeta nessa condição foi de -24,5

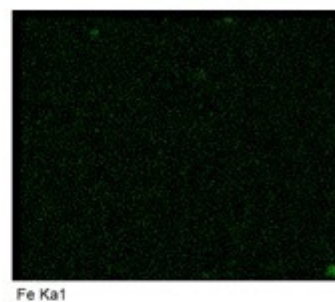
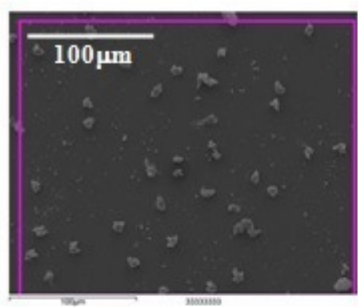
mV. Em seguida, adicionou-se KOH até a suspensão atingir pH=10,0 e o potencial zeta foi determinado imediatamente, sendo de -37,8 mV. Depois de 4 min, o potencial diminuiu para -42,6 mV. Após 2h, o pH reduziu de 10,0 para 9,84 e o potencial zeta estabilizou em -41,3 mV. O pH da suspensão foi então ajustado para 7,27 e o potencial zeta determinado logo após o ajuste foi de -33,3 mV e 4 min depois, diminuiu para -36,7 mV. Uma vez que se esperaria um potencial zeta mais negativo que o último valor em pH 7,4, o tratamento com KOH a uma concentração na ordem de 10^{-4} mol/L promoveu um aumento (em módulo) de cerca de 13 mV no potencial zeta do compósito. Lembrando que o tratamento do nanocompósito foi feito com NaOH 0,5 mol/L, esperar-se-ia um efeito maior. Pode-se concluir, dessa forma, que a base provoca mudanças na conformação da cadeia polimérica da quitosana de forma a diminuir a carga superficial e favorecer a deposição de apatitas.

A análise da distribuição de tamanho da amostra mimetizada (F/Q=2/1) após o tratamento com NaOH foi cerca de 636 nm (determinado em pH=7,4), indicando que a mimetização provoca aglomeração das partículas.

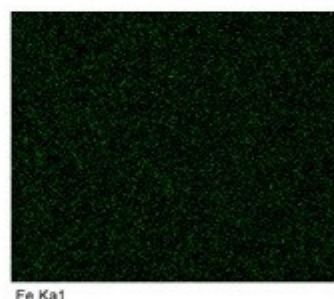
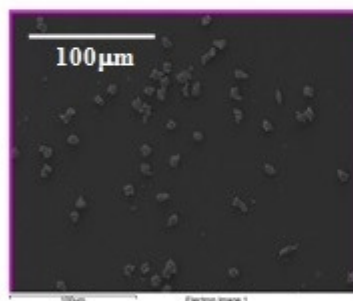
5.4. Teste biológico

A Figura 6 mostra os resultados da avaliação da incorporação do nanocompósito (F/Q=2/1) feita por microscopia eletrônica de varredura. A figura mostra claramente que a apatita é indispensável para que o compósito não seja interpretado como corpo estranho pelas células de defesa e que a quantidade de apatita mimetizada com ou sem o tratamento com NaOH é suficiente para não ser internalizado pelos monócitos.

(a)



(b)



(c)

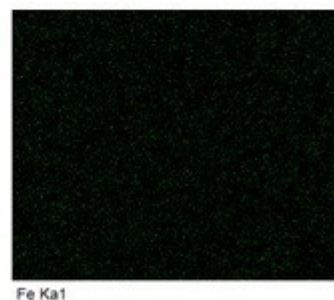
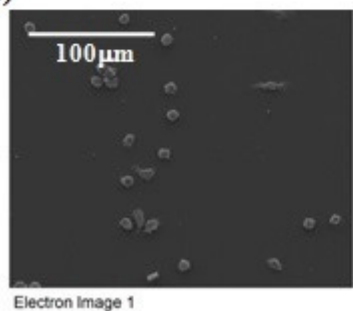


Figura 6. Imagens de MEV e mapeamento por EDX do monócito humano após contato por 2h com ferrita revestida com quitosana (F/Q=2/1): (a) sem mimetização; (b) sem tratamento com NaOH e mimetizada e (c) com tratamento com NaOH 0,5 mol/L por 1h e mimetizada.

6. Considerações finais

De acordo com os resultados do trabalho, a melhor condição para revestimento é usar uma proporção de ferrita e quitosana de 2/1. O tratamento com NaOH da ferrita

revestida com quitosana promove uma deposição de maior quantidade de apatita e que é indispensável para que não seja internalizado pelos monócitos.

7. Trabalhos futuros

Propõe-se como trabalho futuro os seguintes:

- preparar e caracterizar amostra com F/Q=3/1;
- FTIR das amostras com F/Q=3/1, 2/1 e 1/1 sem mimetizar, bem como aquelas tratadas com NaOH;
- MEV das amostras sem mimetizar assim como aquelas mimetizadas
- teste biológico com células do câncer de mama;
- teste de citotoxicidade com fibroblastos 3T3 (conforme estabelece a Norma ISO 10993-5).

8. Referencias Bibliográficas

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. **Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery.** Journal of Controlled Release, v. 100, p. 5 –28, 2004.

ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMANN, C.; ERHARDT, W.; WAGENPFEIL, S.; LUBBE, A. S. **Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting.** Cancer research, v. 60, p. 6641-6648, 2000.

ALEXIOU, C.; JUERGONS, R.; SCHMID, R.; HILPERT, A.; BERGEMANN, C.; PARAK, F.; IRO, H. **In vitro and in vivo investigations of targeted chemotherapy**

with magnetic nanoparticles. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 293, p. 389–393, 2005.

ALEXIOU, C.; SCHMID, R. J.; JURGONS, R.; KREMER, M.; WANNER, G.; BERGEMANN, C.; HUENGES, E.; NAWROTH, T.; ARNOLD, W.; PARAK, F. G. **Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers.** Eur Biophys Journal, v. 35, p 446–450, 2006.

FELT, O.; BURI, P.; GURNY, R. **Chitosan: A Unique Polysaccharide for Drug Delivery**. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 24(11), p. 979-993, 1998.

HUNTER, R. J. Zeta Potential in Colloid Science, Academic Press, New York 1981.

JABIR, N. R.; TABREZ, S.; ASHRAF, G. M. et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International Journal of Nanomedicine**, n.7, p. 4391-4408, aug. 2012.

JOÃO P. R.L.L.PARR, MURILLO L. MARTINS, GUSTAVO M. MORETTO, RODRIGO ICHIKAWA, LUIZ GALLEGU MARTINEZ, FABIANO CORAUTO, JOSÉ R. A. MIRANDA, MARGRIDA J. SAEKI, **Síntese de traçadores magnéticos $Mn_{0.75}Zn_{0.25}Fe_{2.8}O_4$ para diagnóstico por bac: influência da variável de síntese na estrutura e resposta magnética**, X CONFIAM, 2014.

KIM, D.; LEE, S.; IM, K.; KIM, K.; KIM, K.; KIM, K.; PARK, H.; SHIM, I.; LEE, Y. **Biodistribution of Chitosan-Based Magnetite Suspensions for Targeted Hyperthermia in ICR Mice**. IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS, v.. 41, n. 10, 2005.

KIM, D. H.; LEE, S. H.; IM, K. H.; KIM, K.N.; KIM, K.M.; SHIM, I.B.; LEE, M.H.; LEE, Y.-K. **Surface-modified magnetite nanoparticles for hyperthermia: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies**. Current Applied Physics, v. 61, p. 242–246, 2006.

LEE, S.; JEONG, J.; SHIN, S.; KIM, J.; KIM, J. **Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique**. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. v. **282**, p.. 147–150, 2004.

MARTINS, M. L. **Síntese e Caracterização de Nano-compósito, à Base de Ferritas Nanométricas, Quitosana e Hidroxiapatita para Tratamento de Câncer de Mama**, manuscrito apresentado para o Exame Geral de Qualificação, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT), UNESP, 2014.

MARTINS M. L.; SAEKI, M. J.; TELLING, M. T. F.; PARRA, J. P. R. L. L.; LANDSGESELL S.; SMITH, R. I.; BORDALLO, H. N. **Development and characterization of a new bio-nanocomposite (bio-NCP) for diagnosis and treatment of breast câncer**, Journal of Alloys and Compounds, p. 514-519, 2014.

PANKHURST, Q. A.; THANH, N. K. T.; JONES, S. K.; DOBSON, J. **Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine**. J. Phys. D. Appl. Phys., v. 42, 2009.

QI, J.; YAO, P.; HE, F.; YU, C.; HUANG, C. **Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core Doxorubicin loading and delivery**. International Journal of Pharmaceutics, v. 393, p. 176–184, 2010.

SHANMUGANATHAN, S.; SHANUMUGASUNDARAM, N.; ADHIRAJAN, N.; LAKSHMI, T. S. R.; BABU, M. **Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery.** Carbohydrate Polymers, v.73,p 201–211, 2008.

TIEZZI, D. G. **Epidemiologia do câncer de mama.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet. v.31, n.5, 2009.

TORAYA, H. THE RIGAKU, **Journal**, v. 6, p. 28-34, 1989.

VINÍCIUS F. CASTRO, JULIANA CALESTINO, ALVARO A.A. DE QUEIROZ E FILIBERTO G. GARCIA. **Propriedades magnéticas e biocompatíveis de nanocompósitos para utilização em magneto-hipertermia,** Revista Brasileira de Física Médica, p. 79-82, 2010.

WANG, C.; HO, P. C.; LIM, L. Y. **Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells.** International Journal of Pharmaceutics, v. 400, p. 201–210, 2010.

WARREN, B. E.; AVERBACH, B. L. J. APPL. PHYS., v. 21, p. 595-599, 1950.

YU, X.; PISHKO, M. V. **Nanoparticle-Based Biocompatible and Targeted Drug Delivery: Characterization and in Vitro Studies.** Biomacromolecules , v. 12, p. 3205–3212, 2010.