

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO” - UNESP**

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

Murillo Longo Martins

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANO-COMPÓSITO, À BASE DE
FERRITAS NANOMÉTRICAS, QUITOSANA E HIDROXIAPATITA PARA
TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA**

Botucatu

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE
MESQUITA FILHO” - UNESP**

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

Murillo Longo Martins

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANO-COMPÓSITO, À BASE DE
FERRITAS NANOMÉTRICAS, QUITOSANA E HIDROXIAPATITA PARA
TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA**

**Tese apresentada ao Programa
Interunidades de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Materiais da
UNESP como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência e Tecnologia
dos Materiais**

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

Botucatu

2015

Martins, Murillo Longo.

Síntese e caracterização de nano-compósito, à base de ferritas nanométricas, quitosana e hidroxiapatita para tratamento de câncer de mama / Murillo Longo Martins, 2015

109 f. : il.

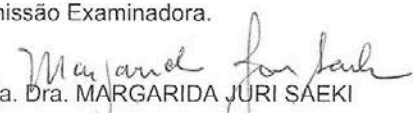
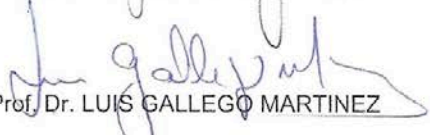
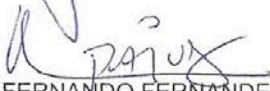
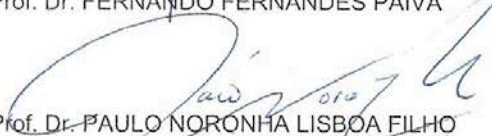
Orientador: Margarida Juri Saeki

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2015

1. Ferrita de Mn e Zn. 2. Hidroxiapatita. 3. Quitosana. 4. Câncer de mama I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MURILLO LONGO MARTINS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 27 dias do mês de fevereiro do ano de 2015, às 14:00 horas, no(a) Centro de aulas do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP), reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI do(a) Departamento de Química / Instituto de Biociências de Botucatu, Prof. Dr. LUIS GALLEG0 MARTINEZ do(a) Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais / Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Ipen, Prof. Dr. FERNANDO FERNANDES PAIVA do(a) Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo, Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências de Bauru, Prof. Dr. RAMON KANENO do(a) Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de MURILLO LONGO MARTINS, intitulado "Síntese e caracterização de nano-compósito, a base de ferritas nanométricas, quitosana e hidroxiapatita para tratamento de cancer de mama.". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI
Prof. Dr. LUIS GALLEG0 MARTINEZ
Prof. Dr. FERNANDO FERNANDES PAIVA
Prof. Dr. PAULO NORONHA LISBOA FILHO
Prof. Dr. RAMON KANENO

***Dedico aos meus pais Luiz
e Janet, aos irmãos Felipe
e Kamila, à avó Francisca***

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de desfrutar cada momento de alegria, e também pela luz e clareza para aprender com cada dificuldade encontrada ao longo deste caminho. Agradeço também a várias pessoas sem as quais este trabalho não seria possível, tanto sob ponto de vista profissional quanto pessoal.

Agradeço à minha orientadora Margarida Juri Saeki não somente pelas longas discussões e contribuições científicas ao trabalho, mas também pela amizade e paciência ao longo de todos estes anos.

Agradeço à Dra. Heloisa Nunes Bordallo da Universidade de Copenhague por todo o suporte, entusiasmo e ensinamentos durante todo o tempo em que estive na Dinamarca. Ainda sobre este período, agradeço também ao Professor Kell Mortensen, à Gitte Michelsen e Dorthe Djergskov por todo o suporte e atenção.

Agradeço a todos os alunos e funcionários do Depto de Química do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP), em especial aos amigos e eternos companheiros de laboratório João Luiz Parra e Rafael Innocenti. Agradeço também aos alunos e funcionários do grupo “*X-ray and neutron science*” do Instituto Niels Bohr (Universidade de Copenhague) em especial Julio Tedesco, Nikolaos Tsapatsaris e Rosanna Ignazzi.

Agradeço por todo o suporte técnico e experimental nos institutos LNLS, ISIS, PSI, ILL, HZB e LANSCE. Agradeço também à Dra. Rosana Zacarias Domingues e Dr. Ernesto Rafael González pelo auxílio nas análises de potencial zeta e ao Dr. Fabiano Colauto pelo auxílio com medidas de propriedades magnéticas dos materiais. Devo também agradecer imensamente ao Dr. Juergen Eckert pelo provimento dos cálculos de DFT, ao Dr. Ramon Kaneno e Dr. Willian Fernando Zambuzzi pela inestimável ajuda nos ensaios biológicos e ao Dr. Walter Kenji Yoshito pelo auxílio no preparo de materiais. Ao José Roberto Marques Silva e Dra. Maria Rosecler Miranda Rossetto da FCA, UNESP, Botucatu, pelas análises do fármaco por LCMS.

Agradeço ao programa de pós graduação POSMAT pela oportunidade de desenvolver este projeto e o auxílio financeiro oferecido pela CAPES, CNPQ, FAPESP e DANSCATT.

Me faltam palavras para descrever minha gratidão aos meus pais Luiz e Janet, aos meus irmãos Felipe e Kamila, à minha segunda mãe Kátia e aos queridos Luís Felipe, Tomás e Ana Luísa pelo amor e positividade que foram sem dúvidas o meu grande combustível ao longo destes anos. Agradeço à avó Francisca pelo eterno exemplo de força e dignidade e por todos os valores que carregarei para sempre.

Finalmente agradeço à minha grande companheira nos últimos anos Isabela, por sua amizade, carinho, amor e cumplicidade. A certeza de tê-la ao meu lado foi com certeza minha maior fonte de força nas situações mais desafiadoras.

Resumo

O câncer de mama é um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. A projeção é de que, entre 2014 e 2015, cerca de 58 mil novos casos com esta doença serão registrados no Brasil. Estes tumores são motivo de preocupação adicional dada sua grande tendência de evoluir para metástase. Nestes casos, a chance destas células se alojarem no tecido ósseo é particularmente considerável. Acredita-se que isso se deve à grande afinidade das células tumorais da mama pela hidroxiapatita, o principal componente inorgânico do osso. Este trabalho teve como objetivo a síntese de um nano-compósito que contém este composto para explorar tal afinidade no tratamento destes tumores. Além da apatita, foram inseridas nanopartículas magnéticas ao nanocompósito, combinando-se assim a possibilidade de aplicá-lo tanto no tratamento (carreamento magnético de fármacos e hipertermia magnética) como no diagnóstico de tumores [geração de contraste em diferentes técnicas de diagnóstico como, imagens por ressonância magnética nuclear (IRMN) e exames com biossusceptometria de corrente alternada (BAC)].

O nano-compósito preparado é formado por nanopartículas magnéticas de ferritas de Mn e Zn, de fórmula geral $Mn_{(1-x)}Zn_xFe_{(2-y)}O_4$, revestidas com o polímero quitosana modificada com nanocristais de apatita. Visando a aplicação deste sistema como carreador de fármaco antitumoral para o tratamento do câncer de mama, foi também incorporado o fármaco paclitaxel. O nanocompósito foi caracterizado após cada etapa da síntese com as seguintes técnicas físicas de estado sólido: difratometria de raios X (DRX) e difratometria de nêutrons (DN), ambos com refinamento estrutural pelo Método de Rietveld, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (FTIR), espectroscopia de raios X na borda de absorção (NEXAFS), microscopia de transmissão e varredura com raios X (STXM), espalhamento inelástico de nêutrons (INS) e caracterização das propriedades magnéticas. Por meio de testes *in vitro*, a citotoxicidade dos materiais em células saudáveis (NIH/3T3), bem como a capacidade de associação (incorporação) com células tumorais mamário (MCF-7) foram estudadas. Os resultados obtidos mostram que o entendimento da dinâmica de formação da fase ferrita nas nanopartículas, bem como

o seu revestimento polimérico e posterior modificação com apatita é fundamental para a compreensão das propriedades biológicas do material. Os resultados comprovam ainda que o fármaco encapsulado neste sistema se encontra em uma conformação provavelmente inativa mas que pode ser revertida após a liberação da molécula. Finalmente, os ensaios biológicos indicam não só que os materiais estudados não apresentam toxicidade, mas sugerem também forte interação e atividade anti-tumoral para células de câncer de mama.

Abstract

Breast cancer is one of the biggest worldwide health problems. In Brazil, 58.000 new cases of such a disease are expected to be diagnosed between 2014 and 2015. These tumors require additional concerns due to their great tendency in generating metastasis. In these cases, there is a considerable chance for the cancer cells to migrate to the bone tissue. Such a behavior is most likely due to the affinity between the breast cancer cells and hydroxyapatite, the main inorganic component of bones. This work aimed to synthesize a nanocomposite containing this compound in order to explore such affinity in the treatment of these tumors. Additionally to the apatite, magnetic nanoparticles have been incorporated to the nanocomposite, aiming to combine possible applications on both cancer treatment (magnetic drug delivery and magnetic hyperthermia approaches) and diagnosis [contrast generation in magnetic resonance imaging (MRI) and alternate current biosusceptometry (ACB) exams].

The obtained nanocomposite is composed by magnetic nanoparticles of Mn-Zn ferrites, with general formula $\text{Mn}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_{(2-y)}\text{O}_4$, coated with the polymer chitosan modified by apatite nanocrystals. Aiming the application of this system as an anti-tumor drug delivery tool for breast cancer treatment, the drug paclitaxel has also been incorporated to the material. The nanocomposite was characterized after each synthesis step with the following solid state physics techniques: X-ray and neutron powder diffraction (XRD and ND) with structure refinement by the Rietveld method, scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FTIR), near edge X ray absorption spectroscopy (NEXAFS), scanning transmission X ray microscopy (STXM), inelastic neutron scattering (INS) and magnetic characterization. By means of in vitro tests, the cytotoxicity of the materials in healthy cells (NIH/3T3) as well as their association to breast tumor cells (MCF7) were evaluated. The results show that understanding the dynamics of the ferrite phase formation into the magnetic nanoparticles as well as their polymeric coating and modification with apatite is a key step in order to elucidate the materials' biological properties. Additionally, the encapsulated drug is most likely in an inactive molecular conformation, which is reversible after the drug release. Finally, the biological assays indicate not only the

non-toxicity of the nanocomposite, but also their strong interaction and anti-tumor activity against breast cancer cells.

Lista de símbolos e abreviaturas

a	Parâmetro de rede
AA	Anel aromático
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAC	Biosusceptometria de Corrente Alternada
bio-NCP	bio-nanocompósito
DFT	Teoria do funcional de densidade
DN	difração de nêutrons
DRX	difração de raios X
EDX	Energia Dispersiva de raios X
Elisa	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
far-FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier na região do infravermelho longínquo
FC	<i>Field cooled</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HAP	hidroxiapatita
ICSD	<i>Inorganic Crystal Structure Database</i>
INS	Espalhamento Inelástico de Nêutrons
K _{ps}	Produto de solubilidade
MCF-7	Linhagem de células do câncer da mama
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NEXAFS	Espectroscopia de raios X na Borda de Absorção
NIH/3T3	Linhagem de células de fibroblasto
NPM	nanopartícula magnética
PBS	tampão fosfato salino
PTX	Paclitaxel
Q	Transferência do momento
R(F2)	Qualidade do modelo utilizado para o refinamento estrutural
RPMI	Meio de cultura
SBF	Soro Bovino Fetal

STXM	Microscopia de Transmissão de raios X
ZFC	<i>Zero field cooled</i>
π^*	Orbital molecular π antiligante
σ^*	Orbital molecular σ antiligante
χ^2	Qualidade do ajuste para o refinamento estrutural

1. Introdução.....	1
2. Nanopartículas magnéticas de ferritas de Mn e Zn: síntese e caracterização	6
2.1. Considerações iniciais.....	6
As ferritas de Mn e Zn e o método de síntese por co-precipitação.....	6
2.2. Parte experimental.....	11
Síntese das nanopartículas magnéticas (NPMs) de ferrita de Mn e Zn.....	11
Caracterização das nanopartículas de ferrita de Mn e Zn	12
2.3. Resultados e discussão.....	15
2.4. Considerações finais	35
3. Síntese do bio-nanocompósito	36
3.1. Considerações iniciais.....	36
O polímero quitosana e a formação de compósitos com apatitas.....	37
3.2. Parte experimental.....	38
Preparação das amostras.....	38
Caracterização dos materiais	41
3.3. Resultados e discussão.....	41
3.4. Considerações finais	51
4: Co-encapsulamento do fármaco anti-tumoral paclitaxel (PTX) no	53
bio-NCP.....	53
4.1. Considerações iniciais.....	53
Considerações sobre a molécula de paclitaxel (PTX)	54
Caracterização de fármacos encapsulados e limitações de técnicas tradicionais.....	56
4.2. Parte experimental.....	60
Encapsulamento do PTX no bio-NCP.....	60
Caracterização	61
4.3. Resultados e discussão.....	63
4.4. Considerações finais	74
5. Ensaios <i>in vitro</i>.....	76
5.1. Considerações iniciais.....	76
O potencial zeta e sua relação com propriedades biológicas de materiais.....	77
Monócitos e biomateriais	78
Testes com células cancerígenas da mama (MCF-7)	79
5.2. Parte experimental.....	79
Síntese das nanopartículas magnéticas de ferrita de Mn e Zn e magnetita	79
Síntese dos bio-NCP pelos métodos de micelas reversas e <i>spray</i> e coacervação.	80
Potencial zeta	80
Preparo das culturas de monócitos e células MCF-7 (câncer de mama) e testes biológicos.....	81
Estudo da internalização e aderência das nanopartículas	83
5.3. Resultados e discussão.....	85
5.4. Considerações finais	102
6. Desafios futuros.....	104
Referências	106

1. Introdução

O câncer é, sem dúvidas, um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Na Europa, são detectados cerca de 3,5 milhões de novos casos por ano com taxa de mortalidade em torno de 50% enquanto que somente nos Estados Unidos são diagnosticados cerca de 2,8 milhões de novos casos com percentual de mortalidade semelhante (FERLAY, PARKIN e STELIAROVA-FOUCHER, 2010 AND FERLAY et al., 2013). No Brasil, projeta-se a ocorrência de cerca de 576 mil novos casos entre 2014 e 2015, sendo que destes, 58 mil são prováveis pacientes com câncer de mama (INCA, 2014).

Os métodos mais utilizados no tratamento de tumores são a radioterapia e quimioterapia (BEIJER et al., 2013), senão a remoção cirúrgica dos tecidos afetados. A primeira se baseia na aplicação de doses de radiação criteriosamente definidas nos tecidos tumorais, enquanto que na quimioterapia são utilizados fármacos capazes de interromper o ciclo de reprodução das células cancerígenas: os agentes anti-mitóticos. Entretanto, ambos os métodos apresentam desvantagens e/ou limitações,

principalmente quando a doença evolui para metástases, caracterizadas pela migração de células tumorais para diferentes regiões do organismo. Enquanto a radioterapia é essencialmente uma técnica voltada para o tratamento de lesões bem localizadas, os prejuízos à qualidade de vida causados pela quimioterapia são bastante notórios devido aos danos causados também às células sadias dos pacientes (NAKAZAKI et al., 2013; MONSUEZ et al., 2010).

No caso específico dos tumores mamários, existe uma grande tendência à formação de metástases, em especial nos tecidos pulmonar e ósseo. Quanto ao último, presume-se que 80% dos casos de metástase óssea são evoluções do câncer mamário, sendo que o restante vem majoritariamente do câncer na próstata, pulmão e cólon. Este alto percentual de células neoplásicas da mama que se instalam nos ossos pode estar relacionado à grande afinidade destas células por cristais de hidroxiapatita (HAP), $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, o principal componente inorgânico do tecido ósseo (BELLAHCÉNE e CASTRONOVO, 1995; DIEL, et. al, 1998). Não obstante, a afinidade das células do câncer na mama por HAP pode ser usada em favor do tratamento destes tumores. Através da síntese de carreadores de fármacos antitumorais modificados com tal composto cerâmico, sua interação com as células tumorais pode ser favorecida e a ação do agente anti-mitótico poderia dar-se de maneira mais seletiva sobre as células cancerígenas, reduzindo danos às células sadias. Adicionalmente, cristais de HAP tem demonstrado por si só a capacidade de redução de volumes tumorais não somente em ensaio realizado com câncer de mama, mas também com células tumorais do cólon, próstata, fígado e outros, principalmente se as HAPs estiverem sob tamanho nanométrico (ANDRONESCU ET AL., 2010; YUAN ET AL., 2010; LIANG ET AL, 2011; VENKATESEN ET AL, 2011; MEENA ET AL., 2012; JIN ET AL., 2014).

A adição de nanopartículas magnéticas na formulação deste carreador conferiria outras possibilidades atrativas e importantes, como o carregamento magnético do material até a região anatômica de interesse e a redução da massa tumoral por meio de hipertermia magnética (HILGER, HERG E KAISER, 2005). Ainda, a presença destas nanopartículas no material carreador possibilita o seu rastreamento utilizando-se técnicas como a biosusceptometria de corrente alternada (BAC) (AMERICO et. al, 2010) ou Imagens por Ressonância Magnética, métodos estes que não fazem o uso de radiação ionizante.

Os materiais magnéticos mais utilizados em aplicações biomédicas são a magnetita (Fe_3O_4) (KIM et. al, 2006) e a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (LEE, et. al, 2004), por serem materiais de fácil obtenção e compostos unicamente por Fe, reconhecidamente um metal não tóxico. Entretanto, propriedades magnéticas otimizadas podem ser obtidas substituindo-se parte dos íons Fe^{2+} por íons de outros metais, tais como de Mn e Zn, dando origem às ferritas de Mn e Zn (GOLDMAN, 2006). Deste modo, as aplicações destas nanopartículas na medicina, sugeridas anteriormente, poderiam ser efetuadas usando-se uma menor quantidade do material.

A obtenção de um compósito de óxido de ferro e hidroxiapatita foi previamente descrita na literatura, com foco na aplicação em terapia de tumores ósseos por hipertermia magnética para posterior regeneração deste tecido, sendo o compósito conformado em pastilhas porosas (MURAKAMI et. al 2008). Contudo, visando a inserção de fármacos antitumorais, bem como para conferir o trânsito destes materiais ao longo de sistemas biológicos, a conformação destes materiais como nano-cápsulas seria mais adequada. Uma alternativa seria revestir as nanopartículas magnéticas com polímeros sobre os quais os cristais de hidroxiapatita fossem incorporados. Formar-se-iam, assim, nano-esferas poliméricas contendo material magnético no seu interior

enquanto sua superfície teria grande afinidade pelas células tumorais primárias ou metastáticas.

Neste sentido, o potencial do polímero quitosana para diversas aplicações biológicas tem sido reportada em vários trabalhos devido a características como não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades antifúngicas e bactericidas (COSTA et al, 2006). Este polímero permite o controle das aberturas da rede das cadeias poliméricas e é de fácil funcionalização para a formação de ligações semelhantes às da interação antígeno/anticorpo com diversas drogas (FELT, BURI e GURNI, 1998), sendo vastamente aplicado na engenharia de tecidos ósseos (DI MARTINO, SITTINGER e RISBUD, 2005; KONG et al, 2006). Logo, pode-se dizer que o polímero quitosana reúne propriedades importantes para a síntese do nano-compósito proposto.

Finalmente, a inclusão de um fármaco antitumoral a este bio-nanocompósito (bio-NCP) completaria o sistema carreador + fármaco. O fármaco paclitaxel é atualmente considerado um dos agentes mais efetivos para tratamento do câncer de mama (WANG, HO e LIM, 2010; YU e PISHKO, 2011). Trata-se de um diterpeno cuja atuação antitumoral, extensamente reportado na literatura (WANG, HO e LIM, 2010; YU e PISHKO, 2011), se dá pela agregação dos microtúbulos celulares promovendo sua estabilização, o que inibe, por sua vez, a reorganização dos microtúbulos (despolimerização), uma dinâmica essencial para o crescimento e replicação celular. Seu mecanismo de ação é distinto de outras drogas antitumorais, que atuam sobre os microtúbulos intensificando a despolimerização do fuso mitótico dos microtúbulos (MASTROPAOLO, et. al 1995). No entanto, sua baixa solubilidade em água e ação citotóxica pouco específica para células tumorais são consideradas limitantes na

aplicação clínica. Logo, é interessante que sejam elaborados novos veículos para reduzir os possíveis efeitos colaterais (WANG, HO e LIM, 2010).

A incorporação de paclitaxel em cápsulas de quitosana através de processos de dupla emulsão foi recentemente descrito (LV et. al, 2011), sendo demonstrado o aumento na eficiência do fármaco quando em tal veículo. Assim, a inclusão de partículas magnéticas ao sistema e a modificação do polímero com cristais de hidroxiapatita possibilitaria resultados ainda mais expressivos e uma maior versatilidade ao material final.

Diante o exposto, o objetivo deste trabalho foi o preparo de um bionanocompósito (bio-NCP) formado por nanopartículas magnéticas de ferrita de Mn e Zn, polímero quitosana e nanocristais de hidroxiapatita a ser utilizado como carreador para o fármaco paclitaxel, especialmente para o tratamento de células tumorais da mama. São descritas as diferentes etapas da síntese deste sistema, como a obtenção e caracterização das nanopartículas magnéticas, bem como o seu rastreamento com biossusceptômetro de corrente alternada (BAC) e ainda seu revestimento com o polímero e posterior modificação com cristais de hidroxiapatita. A inclusão do fármaco paclitaxel ao sistema é descrita sob ponto de vista de ciência de materiais sendo também discutida a influência do encapsulamento na dinâmica molecular deste fármaco. Finalmente, são apresentados testes *in vitro* com células do sistema imunológico e também com células tumorais.

2. Nanopartículas magnéticas de ferritas de Mn e Zn: síntese e caracterização

2.1. Considerações iniciais

Neste capítulo são apresentados resultados referentes à síntese das nanopartículas magnéticas de ferrita de Mn e Zn.

As ferritas de Mn e Zn e o método de síntese por co-precipitação

Em geral, as nanopartículas magnéticas (NPMs) são uma classe de materiais cujas propriedades únicas têm possibilitado sua aplicação em várias áreas, tais como

na absorção de micro-ondas (SHIMBA N. TEZUKA e S. SUGIMOTO, 2012), aplicações ambientais (BAGHERI et al., 2012), antibióticos (PARK et al., 2011) e medicina (PANKHURST et al., 2003). Em relação à última, que motivou este trabalho, as NPMs podem ser utilizadas no tratamento de doenças como câncer, servindo de carreadores de fármacos ou agentes para hipertermia magnética (ALEXIOU et al., 2007; DI CORATO et al., 2014). Alguns estudos indicam ainda que estes materiais podem por si só reduzir a proliferação de células cancerosas (WU et al., 2011) e, o mais importante, possibilitam a combinação de técnicas de tratamento e diagnóstico de tumores usando-se um único material, visto que são capazes também de gerar contraste em imagens obtidos por ressonância magnética nuclear (IRMN) (MIKHAYLOV et al., 2011) e exames com biossusceptometria de corrente alternada (BAC) (AMERICO et al., 2010).

Como mencionado no Capítulo 1, as NPMs mais utilizadas em aplicações biomédicas são a maguemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e a magnetita Fe_3O_4 (magnetita). No entanto, neste trabalho são utilizadas as ferritas de Mn e Zn, de estrutura cristalográfica semelhante, apenas com a diferença de que os íons Fe são parcialmente substituídos por cátions destes metais visando a obtenção de propriedades físicas e químicas otimizadas para a aplicação pretendida.

Os três compostos citados - maguemita, magnetita e ferrita - possuem arranjo cristalino com estrutura do tipo espinélio, que é uma estrutura cúbica de face centrada contendo sítios cristalográficos tetraédricos (sítios A) e octaédricos (sítios B). Em uma célula unitária do tipo espinélio, estão presentes 8 sítios A, sendo estes normalmente ocupados por metais bivalentes coordenados por 4 átomos de oxigênio, conforme mostrado na Figura 2.1. Na mesma célula unitária, estão ainda presentes 16 sítios B, normalmente ocupados por metais trivalentes coordenados por 6 átomos de

oxigênio. Apesar da estrutura dita espinélio normal, com íons bivalentes nos sítios A e íons trivalentes nos sítios B, são comuns estruturas do tipo espinélio invertido ou parcialmente invertido, nas quais os sítios A são parcial ou totalmente ocupados por íons trivalentes enquanto os sítios B se ocupam parcialmente com íons bivalentes (ZHANG et al., 1998). No caso específico das ferritas de Mn e Zn, é relevante pontuar que íons Zn^{+2} ocupam os sítios B somente em situações bastante específicas, como, por exemplo, em nanopartículas de ferritas de Zn ($ZnFe_2O_4$) (HASTINGS e CORLISS, 1953).

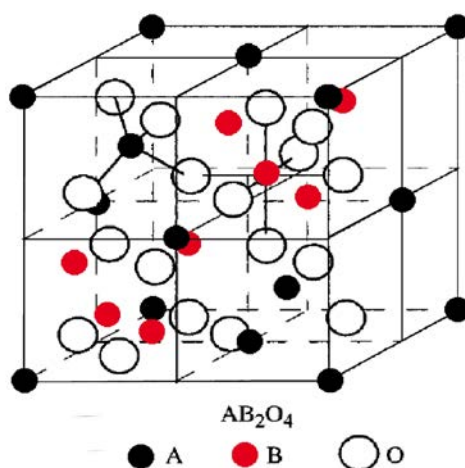


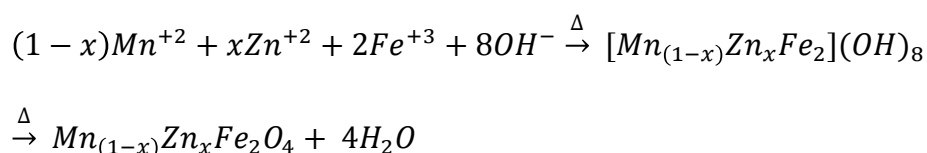
Figura 2.1. Estrutura de espinélio simplificada. Adaptado de Zhang et. al, 1998

Quando materiais com arranjo estrutural do tipo espinélio são submetidos a um campo magnético externo, os momentos magnéticos dos átomos localizados nos sítios A tendem a se alinhar anti-paralelamente ao campo, ao passo que aqueles nos sítios B tendem a se alinhar paralelamente sendo o momento magnético total da estrutura um vetor resultante entre os momentos de cada um dos sítios. Logo, pode-se inferir que as propriedades magnéticas finais do material dependem não somente de fatores morfológicos (tamanho de partícula), mas estão também intimamente ligadas à

distribuição iônica na estrutura cristalina. Assim, as ferritas de Mn e Zn possibilitam a obtenção de propriedades magnéticas distintas, visto que as proporções entre os metais que compõem o material bem como suas distribuições no interior do espinélio podem ser alteradas.

Em princípio, a alta magnetização nas ferritas de Mn e Zn seria alcançada se o momento magnético nos sítios A fosse reduzida ao máximo, por exemplo, ocupando-o plenamente com íons Zn^{+2} , cujo momento magnético é zero. No entanto, deve-se também considerar que as interações de troca intra e inter-sítios na estrutura do espinélio – interações AA, BB e AB - também possuem papel relevante na magnetização do material e podem ser afetadas quando há um excesso de íons com momento magnético nulo no material (BUSCHOW e De BOER, 2003).

NPMs de ferrita de Mn e Zn podem ser obtidas por diferentes métodos, como por exemplo: síntese hidrotermal, o método dos citratos e precursores poliméricos, método de co-precipitação etc. Este último, utilizado nesta tese, se baseia na adição de solução de sais dos metais componentes em solução alcalina em ebulição para a precipitação de tais metais na forma de hidróxidos. Em seguida é desidratado para a obtenção dos óxidos (ZHAO et al., 2009), conforme mostra a reação abaixo.



Em princípio, este método pode ser considerado simples. No entanto, considerando as diferenças na solubilidade de cada hidróxido metálico ($Mn(OH)_2 > Zn(OH)_2 > Fe(OH)_3$) (BRAUER et al., 1965), possibilidade de formação de compostos de coordenação de zinco, óxidos e intermediários, somados ao comportamento

termodinâmico distinto de cada espécie iônica, diferentes taxas de incorporação na estrutura do espinélio devem ser esperadas ($\text{Fe} > \text{Mn} > \text{Zn}$) (KOVTONENKO, 1997). Logo, as propriedades do material obtido podem ser profundamente afetadas pelos parâmetros de síntese.

Sendo assim, primeiramente estudou-se a influência da composição nominal nas nanopartículas de fórmula geral $\text{Mn}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_{(2-y)}\text{O}_4$, de modo que “y” define a quantidade de Fe e “x” exprime o grau de substituição de Mn por Zn. De fato, não são comuns trabalhos na literatura que admitem variações na estequiometria do Fe na estrutura da ferrita. Entretanto, observamos recentemente em micropartículas de ferrita que variações na concentração deste metal podem ocorrer (MARTINS et al, 2014b). Levando-se em consideração que nanopartículas são sistemas ainda menos estáveis e controláveis, o estudo deste fator nas propriedades do material se mostra ainda mais relevante. Por outro lado, diversos trabalhos relatam a influência da substituição de Mn por Zn nas ferritas de Mn e Zn. Sabe-se que máximas respostas magnéticas são geralmente alcançadas quando $x \sim 0,20$, mas que isso está ainda intimamente relacionada à cristalinidade do material (ARULMURUGAN et al., 2005). Assim, variações na rota de síntese podem levar a variações neste valor.

A influência da concentração da solução alcalina (solução precipitante) e tempo de reação dos metais nesta solução foram também estudadas. Quanto ao estudo da concentração na solução alcalina, esta se refere não somente às alterações no pH da solução, mas também em sua força iônica, sendo um parâmetro de grande relevância a ser investigado. Em relação ao tempo de síntese, espera-se, através deste estudo sistemático, melhor compreensão a respeito da dinâmica de nucleação e formação das nanopartículas magnéticas.

2.2. Parte experimental

Síntese das nanopartículas magnéticas (NPMs) de ferrita de Mn e Zn

NPMs de ferrita de Mn e Zn com composição nominal $\text{Mn}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_{(2-y)}\text{O}_4$, foram preparadas pelo método de co-precipitação (MARTINS et al, 2014a; ZHAO et al., 2009) utilizando-se $\text{Mn}(\text{NO}_2)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_2)_2$ e FeCl_3 (Sigma-Aldrich) como sais de partida. Em um procedimento de síntese padrão, uma solução aquosa dos sais metálicos é preparada com a proporção de metais desejada. Posteriormente, esta solução é gotejada em solução de NaOH em ebulição e a reação (digestão e desidratação) é conduzida sob agitação vigorosa por um determinado tempo, obtendo-se uma suspensão preta de NPMs. Estas são então recolhidas com um ímã e lavadas com água (18,3 MΩ cm) até que atinjam pH neutro.

O primeiro parâmetro de síntese investigados foi o valor de "y", ou simplesmente a deficiência na quantidade de Fe na fórmula de ferrita. Para tal estudo, "x", ou o teor de Zn, foi fixado como 0,25 e as ferritas foram sintetizados com $y = 0$ e 0,30. As soluções com os metais foram gotejadas em 300 mL de solução 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH em ebulição e as reações foram conduzidas por 120 minutos.

Em seguida, a influência do valor de "x" foi investigada. Neste caso, "y" foi fixado como 0,30 e as ferritas foram sintetizadas com $x = 0; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,50; 0,75$ e 1. As soluções com os metais foram gotejadas em 300 mL de solução 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH em ebulição e as reações foram mais uma vez conduzidas por 120 minutos.

A influência da concentração de NaOH foi também investigada fixando-se, neste caso, como $x = 0,25$ e $y = 0,30$. Os metais foram precipitados em 300 mL de soluções

de NaOH em ebulição, com as seguintes concentrações: 0,10 mol.L⁻¹, 0,5 mol.L⁻¹ e 1,0 mol.L⁻¹. O tempo de reação foi de 120 min em todos os casos.

Finalmente, a influência do tempo de reação na formação das nanopartículas foi avaliada. Em primeiro lugar, nanopartículas com $x = 0,25$ e $y = 0,30$ foram obtidas após as reações serem conduzidas por 0, 30 e 120 min em 300 mL de solução 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH em ebulição. Em seguida, foram investigados tempos de reação iguais a 30, 60 e 90 min em 200 mL de solução 0,25 mol.L⁻¹ de NaOH.

Caracterização das nanopartículas de ferrita de Mn e Zn

As fases cristalinas das nanopartículas foram investigadas por difração de raios X (DRX) em um difratômetro Brucker - D8 Discover equipado com um detector 2D (radiação de Co, $\lambda = 1.790\text{\AA}$) disponível no Departamento de Química do “*Niels Bohr Institute – University of Copenhagen*”. Os experimentos foram realizados com passo $6.37.10^{-4}\text{\AA}^{-1}$, durante 5 h entre $1\text{\AA}^{-1} \leq Q \leq 5\text{\AA}^{-1}$ sendo Q a transferência do momento da radiação espalhada, dada por:

$$|\vec{Q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta \quad (2.1)$$

Nos estudos relacionados à influência de: teor de zinco (valor de “x” entre 0,15 e 0,30), concentração da solução de NaOH e tempo de reação, as amostras foram analisadas com DRX usando-se radiação sincrotron de 10KeV ($\lambda = 1.24\text{\AA}$) na estação D10B-XPD no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Brasil). Nestes experimentos foi utilizado um detector Mythen e as amostras foram investigadas entre

$1\text{\AA}^{-1} \leq Q \leq 6.5\text{\AA}^{-1}$. As amostras foram montadas em porta-amostras planos de alumínio, mostrado na Figura 2.2(a).

No estudo do teor de ferro nas nanopartículas, ou simplesmente “y”, e do tempo de síntese, as amostras foram analisadas não só por difração de raios X (condições acima), mas também por difração de nêutrons pelo método do pó (DN) a fim de se avaliar a distribuição dos metais nos diferentes sítios do espinélio. Neste caso foi utilizado um porta-amostra cilíndrico de alumínio, mostrado na Figura 2.2(b), e as medidas foram feitas no difratômetro HRPT ($\lambda = 1.494\text{\AA}$) do Instituto Paul Scherrer (PSI, Suíça). Levando-se em conta que o objetivo de tais análises foi a determinação da composição atômica do espinélio, os picos em baixos ângulos foram negligenciados, evitando-se assim a contribuição oriunda da estrutura magnética. Portanto, as amostras foram analisadas entre $3.5\text{\AA}^{-1} \leq Q \leq 8\text{\AA}^{-1}$. Os dados da difração, tanto para DRX quanto para DN, foram submetidos ao refinamento estrutural, que consiste da construção matemática de um padrão de difração de raios X (simulação), baseando-se num modelo estrutural adotado (estrutura que se espera para o material estudado), de forma que o difratograma teórico se assemelhe ao máximo ao difratograma experimental. A comparação entre os padrões de difração para minimizar a diferença entre os difratogramas se dá pelo método dos mínimos quadrados. Todos os refinamentos estruturais foram realizados pelo método de Rietveld utilizando o pacote de software GSAS (LARSON e VON DREELE, 2004) com parâmetros de entrada obtidos no “*Inorganic Crystal Structure Database*” (ICSD).

As vibrações da rede cristalina das nanopartículas sintetizadas com diferentes tempos de reação (30, 60 e 90 min) foram analisados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier na região do infravermelho longínquo

(*far*-FTIR) usando um espectrômetro Nicolet, Nexus 670, disponível no Departamento de Química - IBB (UNESP). Para tanto, as amostras foram dispersas em KBr e os espectros foram coletados no modo transmissão usando-se frequências entre 300 e 700 cm^{-1} . As mesmas amostras foram também investigadas com Espectroscopia de raios X na Borda de Absorção (NEXAFS) concomitantemente com Microscopia de Transmissão de raios X (STXM), o que permitiu uma análise qualitativa (mapeamento) e distribuição das espécies metálicas na superfície das partículas aglomeradas. Para estes ensaios, as amostras foram preparadas dispersando-se em etanol e depositando sobre a membranas de nitreto de silício (5,0 mm x 5,0 mm - Silson, Inglaterra) mostradas na Figura 2.2.(c). Os espectros de NEXAFS foram coletados nos intervalos de energia das camadas L_3 e L_2 do Fe (700 - 730eV), Mn (620 - 660eV) e Zn (1000 - 1060eV) subtraindo-se o sinal obtido com a membrana sem amostras (referência). Os experimentos foram realizados na linha Pollux no “*Swiss Light Source*” (SLS, *Paul Scherrer Institute* - PSI), Suíça.

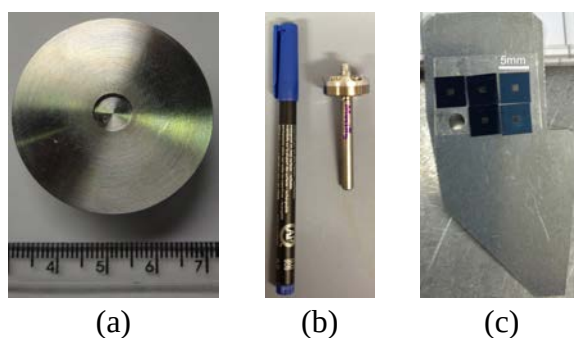


Figura 2.2. Porta- amostras utilizados em diferentes experimentos: (a) suporte plano de alumínio utilizado para os experimentos de DRX no LNLS, (b) porta-amostras cilíndrico utilizado para as medidas de DN no PSI e (c) membranas de nitreto de silício usadas nos experimentos de NEXAFS e STXM.

A caracterização magnética de nanopartículas obtidas com diferentes tempos de síntese foi realizada com um equipamento “*Physical Property Measurement System*” (PPMS), da Quantum Design. Foram obtidas curvas da magnetização em temperatura ambiente (298K) em função do campo magnético (MxH) aplicado entre -7000 Oe e 7000 Oe, e curvas FC/ZFC na faixa de 10K e 298K sob campo magnético de 100Oe.

Finalmente, considerando sua futura aplicação *in vivo*, a resposta magnética das nanopartículas obtidas foi avaliada rastreando-se seu sinal com a técnica de biosusceptometria de corrente alternada (BAC) num ensaio de esvaziamento gástrico. Para este estudo, 1mL de uma suspensão 20mg/mL de nanopartículas de ferrita, $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$, obtidas após 90 min de reação, foi administrado por gavagem em um rato macho (Wistar, 200–250 g), após um período de jejum de 24 h. Dois sensores gradiométricos de primeira ordem foram posicionados no estômago e no ceco (porção final do intestino delgado) do animal. Os sinais foram monitorados a cada intervalo de 15 min durante 240 min, obtendo-se assim perfis temporais do sinal magnético da saída das nanopartículas do estômago e sua chegada no intestino (MARTINS et al., 2015). Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biociências de Botucatu (CEEa-IBB - Protocolo 410).

2.3. Resultados e discussão

Primeiramente, a influência da quantidade de Fe, cuja deficiência é denotada pelo fator nominal “y”, nas ferritas de Mn e Zn com fórmula geral $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{(2-y)}\text{O}_4$ foi estudada. Amostras com $y = 0$ e 0,30 foram caracterizadas com DRX, inicialmente, cujos resultados são apresentados na Figura 2.3(a). A fase encontrada para as duas amostras foram espinélio de simetria Fd-3m (ICSD número

170911). Um aumento na cristalinidade do material pôde ser notado quando $y = 0,30$. Neste caso, o tamanho de cristalito calculado pela equação de Scherrer foi de 11,5 nm enquanto que para $y = 0$ foi de 9,0 nm (ver Tabela 2.1).

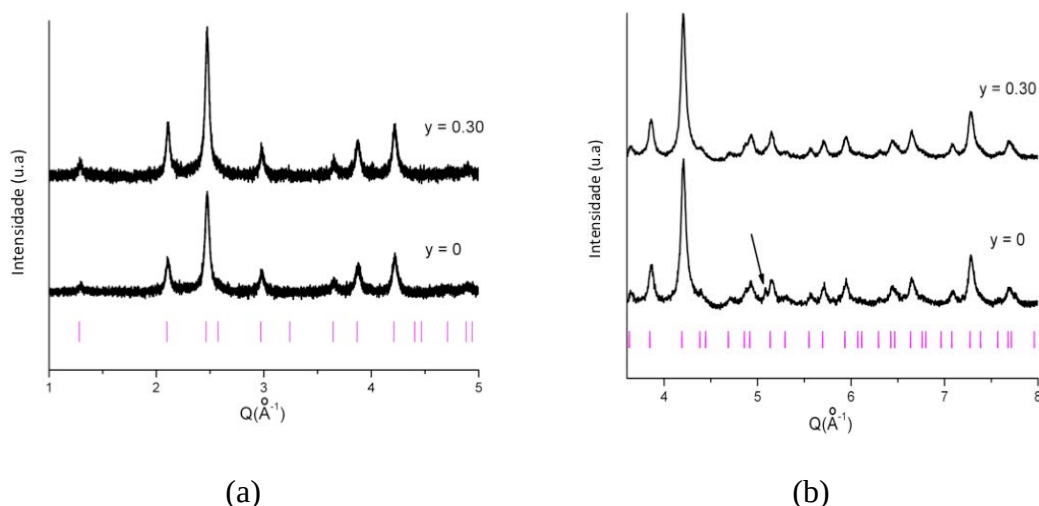


Figura 2.3. Dados de DRX (a) e DN (b) para amostras de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{(2-y)}\text{O}_4$ com $y = 0$ e 0,30. O pico atribuído à fase secundária FeO é indicado pela seta em (b). Os dados de DRX foram coletados em difratômetro convencional e as marcas em rosa indicam as posições dos picos esperados para a estrutura do espinélio (ICSD 170911).

Em seguida, as amostras foram analisadas com difração de nêutrons pelo método do pó (DN), cujos difratogramas estão dispostos na Figura 2.3(b). Como indica a seta na figura, um pequeno pico referente à fase secundária, provavelmente de FeO (ICSD 40089), foi detectado para a amostra com $y = 0$, além da fase principal de espinélio.

Tabela 2.1. Resultados obtidos através do refinamento estrutural de dados de DRX referentes às nanopartículas com composição nominal $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{(2-y)}\text{O}_4$.

Valor de y	Tempo de síntese (min)	a(Å)	Tamanho do cristalito (nm) ^a	χ^2 ^b	R(F2) ^c
0	90	8,418±0,003	9,0±0,7	1,134	0,0719
0,30	90	8,425±0,001	11,5±0,5	1,098	0,0511

^a Dispersão calculada com a equação de Scherrer utilizando o alargamento de cada pico dos difratogramas

^b Qualidade do “fit” para o refinamento estrutural

^c Qualidade do modelo utilizado para o refinamento estrutural

Quanto ao refinamento estrutural dos dados de DN, foi inicialmente realizado considerando que as amostras são constituídas por uma única fase (espinélio). No entanto, como pode ser visto na Figura 2.4(a), o modelo estrutural apresentou clara diferença em relação aos dados experimentais em torno dos valores de transferência do momento da radiação espalhada que corresponde aos planos (531) e (933), indicados com setas na figura.

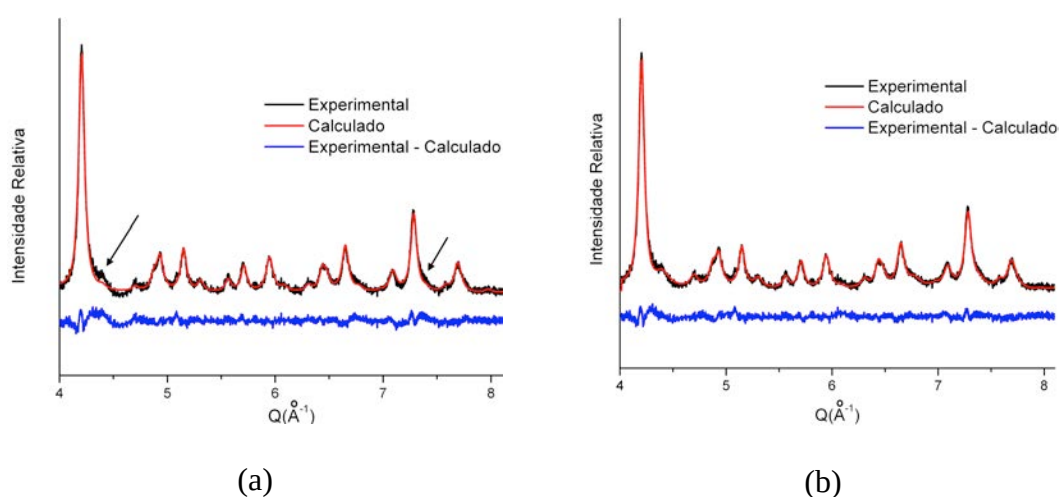


Figura 2.4. Exemplo dos ajustes resultantes dos refinamentos estruturais dos dados de DN sem (a) e após a inclusão de uma segunda fase de espinélio (b). As setas indicam os picos de Bragg referentes aos planos (531) e (933) do espinélio.

Embora os dados de DN possuam naturalmente deficiências quanto à uniformidade dos picos, advindas de características experimentais como o formato do pulso de nêutrons ou a própria divergência do feixe, acredita-se que o modelo requer a inclusão de uma segunda fase, com a mesma estrutura de espinélio, mas com composição distinta da fase principal. Deste modo, foi incluída no modelo uma segunda fase de espinélio contendo apenas Fe no sítio B e apenas Mn no sítio A, resultando no ajuste mostrado na Figura 2.4(b). Vale ressaltar que a baixa concentração desta fase nas amostras não nos permite discussões concretas acerca de sua composição. Tem-se ainda a fase FeO, encontrada em algumas amostras, que devido às quantidades ainda menores não nos permitem incluí-la no modelo de refinamento estrutural.

Deste modo, os refinamentos foram conduzidos considerando-se a segunda fase do espinélio e os resultados estão apresentados na Tabela 2.2. É interessante notar que tais resultados indicam deficiências de ferro em relação à proporção nominal nas duas amostras estudadas. Em parte, essa deficiência pode ter sido compensada com a substituição por Mn para que as nanopartículas pudessem se cristalizar como espinélio. Todavia, esperar-se-ia amostras com excesso de ferro uma vez que: (i) produto de solubilidade (K_{ps}) do hidróxido de ferro é menor que do zinco e manganês [K_{ps} do $\text{Fe}(\text{OH})_3$ é cerca de 10^{19} e 10^{23} vezes menor que o de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ e $\text{Mn}(\text{OH})_2$, respectivamente] e (ii) zinco pode formar compostos de coordenação solúveis $\text{Zn}(\text{OH})_3^-$ e $\text{Zn}(\text{OH})_4^{2-}$ em solução alcalina, sendo que as constantes de formação (K_f) destas espécies à partir de Zn^{2+} e OH^- são de 4×10^{13} e $6,3 \times 10^{14}$, respectivamente, a 25°C . A formação destes compostos solúveis seria intensificada quando $\text{pH} > 9,0$, o que levaria a estruturas deficientes em zinco e não em ferro (BRAUER, 1965).

Tabela 2.2. Parâmetros do refinamento estrutural dos dados de DN e distribuições iônicas no interior do espinélio obtidas para nanopartículas de ferrita de composição nominal $Mn_{(0,75)}Zn_{0,25}Fe_{(2-y)}O_4$.

Distribuição iônica em cada sítio do espinélio					
y = 0			y= 0,30		
	A	B		A	B
Zn	0,24	-	Zn	0,25	-
Mn	0,26	0,82	Mn	0,17	0,78
Fe	0,49	1,18	Fe	0,58	1,22
$\chi^2 = 1,754$			$\chi^2 = 2,010$		
R(F2) = 0,0269			R(F2) = 0,0210		
Segunda fase espinélio: 4,3%			Segunda fase espinélio: 8,8%		

Além disso, os resultados do refinamento mostram ainda que o conteúdo de ferro para amostra com $y=0$ é menor que quando comparada com a $y=0,30$. Tal observação sugere que o conteúdo permitido pela estrutura de espinélio para ferro é atingido quando $y > 0$ e que parte do excesso é segregado, sendo uma das formas como FeO, comprovado pela presença de pico de difração quando $y = 0$. As condições experimentais usados na síntese são tais que permitem formar FeO à partir do composto contendo Fe(III), espontaneamente (termodinâmica), conforme é discutido a seguir.

A redução de Fe(III) para Fe(II) pode ocorrer antes ou depois da precipitação, acompanhada da oxidação de Mn(II). O potencial que se estabelece antes da precipitação se refere à reação: $Mn^{2+}_{(aq)} + Fe^{3+}_{(aq)} \rightleftharpoons Mn^{3+}_{(aq)} + Fe^{2+}_{(aq)}$, e é dado por: $E = 0,738 + 0,0591 \log \frac{[Mn^{3+}][Fe^{2+}]}{[Mn^{2+}][Fe^{3+}]}$ (POURBAIX, 1974). Contudo, os cálculos considerando as condições de síntese indicam que somente 0,0001% de Mn^{2+} oxidaria. Em outras palavras, somente cerca de 0,00039% de Fe^{3+} poderia ser

reduzido à Fe^{2+} . Por outro lado, após a precipitação, a reação: $3\text{MnO}_{(s)} + \text{Fe}_3\text{O}_{4(s)} \rightleftharpoons \text{Mn}_3\text{O}_{4(s)} + 3\text{FeO}_{(s)}$ desenvolve um potencial de $E = 0,659 \text{ V}$. Esse potencial seria estabelecido quando os metais ainda não estão totalmente desidratados, ou seja, quando estão na forma de oxo-hidróxidos (POURBAIX, 1974). Cabe esclarecer que o potencial não corresponde ao dos metais sob outras formas de óxido (como por exemplo, espinélio) em que há também interferências de outros íons metálicos no potencial do óxido. Apesar disso, a redução de Fe(III) é passível de ocorrer, pois a não homogeneidade na formação de óxidos na amostra com $y > 0$ permite regiões com $E > 0$, onde a reação acima ocorre espontaneamente enquanto a desidratação não estiver completada.

Apesar das limitações das técnicas DRX e DN na análise de amostras nanométricas, conforme discutido no parágrafo abaixo, pode-se dizer que seus resultados indicam que amostras de ferritas homogêneas e monofásicas são produzidas quando a precipitação é feita sob deficiência em ferro na solução precursora.

Apesar do grande potencial oferecido pela técnica de DN, deve-se, no caso das ferritas de Mn e Zn, analisar os dados com certa cautela. Para estes materiais os refinamentos estruturais podem levar muitas vezes a um falso mínimo. Em uma das possíveis estruturas, a concentração de Zn é predominante em detrimento aos valores das concentrações de Fe. Este possível erro se dá devido aos valores positivos de comprimento de espalhamento tanto do Zn quanto do Fe, enquanto o Mn apresenta espalhamento negativo. Neste caso particular, a possibilidade de que o material analisado seja predominantemente formado por Zn pode ser excluída com base na composição nominal e dados obtidos por NEXAFS e STXM, conforme é discutido abaixo.

A Figura 2.5 mostra os espectros de NEXAFS da amostra $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$, isto é, quando $y=0$. Nota-se que a intensidade dos espectros para Zn é consideravelmente inferior aos dos metais Fe e Mn. Este é um primeiro indicativo de que a concentração daquele metal é de fato inferior às concentrações de Mn e Fe, o que é condizente com a composição nominal do material. Por sua vez, os mapas composicionais obtidos por STXM, construídos monitorando-se a intensidade das energias de pico para cada elemento, reforçam esta tendência, aonde o Zn é detectado em apenas alguns pontos, mostrados na cor azul na Figura 2.6. Os mapas composicionais apresentam ainda outra característica notável: para $y = 0,30$, apesar de ter partido com solução precursora deficiente em ferro, a superfície do agregado de partículas analisada mostra ser mais rica em Fe, denotado na cor vermelha, do que aquela detectado para $y = 0$.

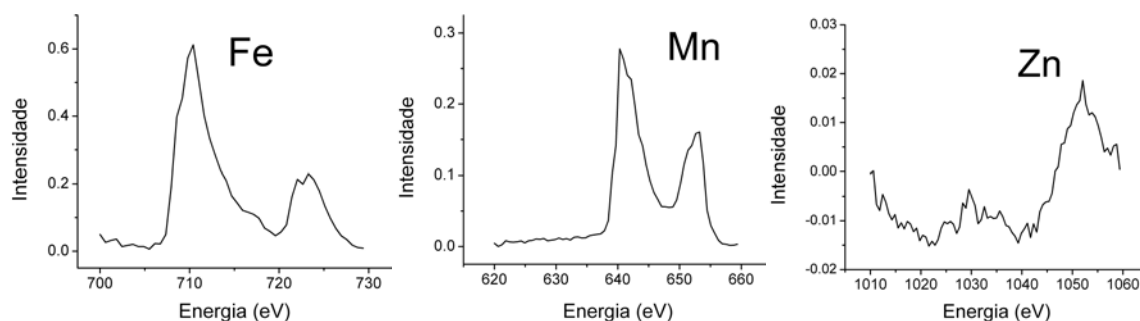


Figura 2.5. Espectros de NEXAFS para cada componente das nanopartículas de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$.

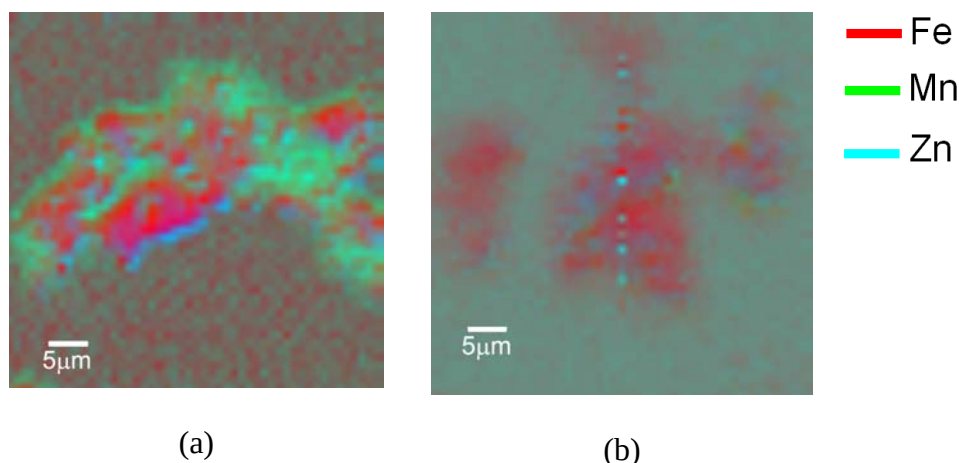


Figura 2.6. Imagens obtidas por STXM dos agregados de nanopartículas de composição nominal $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{(2-y)}\text{O}_4$ com $y = 0$ (a) e $y = 0,30$ (b).

Assim, $y = 0,30$ foi adotado como o teor de Fe padrão para os experimentos que seguem.

Na sequência, investigou-se a influência da quantidade relativa de manganês e zinco no sítio A, representado pelo valor de "x", na estrutura das nanopartículas com composição nominal $\text{Mn}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$. Primeiramente, foram preparados materiais com $x = 0; 0,25; 0,50; 0,75$ e $1,0$, os quais foram analisados por DRX convencional [Figura 2.7(a)]. Apesar da intensidade de fundo ser alta e com ruídos devido a fluorescência do ferro, nota-se que somente quando $x = 0,25$ a formação de fase secundária de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), caracterizada pelos picos da região em destaque na figura, é minimizada. Visto que este é um composto paramagnético, sua presença pode prejudicar a resposta magnética, sendo primordial que se evite a formação (ZHANG, PATERSON e LIU, 2012).

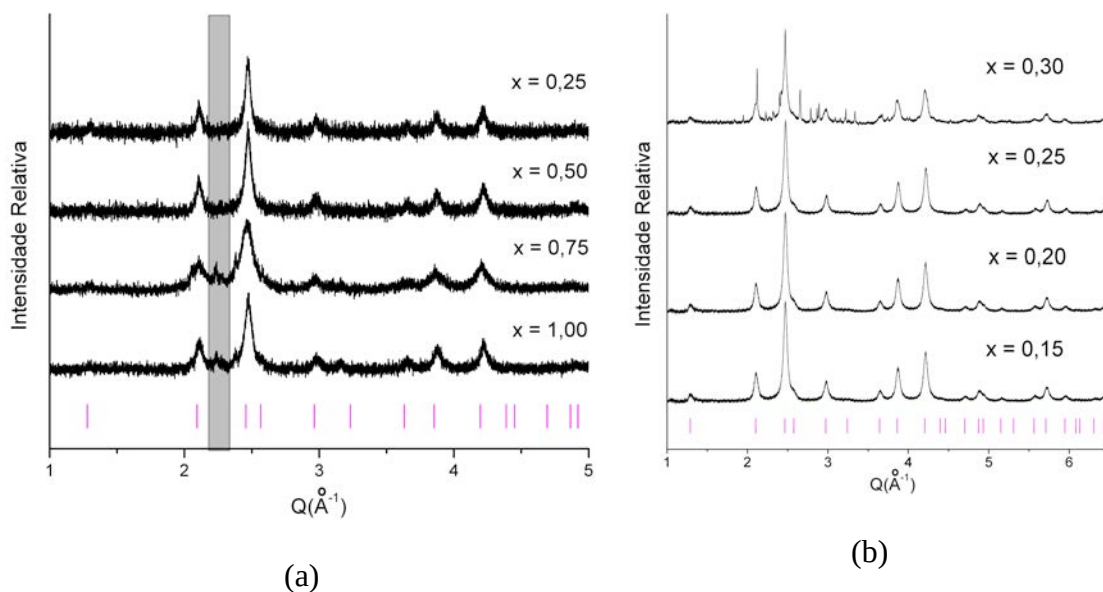


Figura 2.7. Padrões de DRX para nanopartículas com composição nominal $\text{Mn}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_{(1,70)}\text{O}_4$ sendo (a) $x = 0, 0,25, 0,50, 0,75$ e $1,0$, e (b) $x = 0,15, 0,20, 0,25$ e $0,30$. A região em destaque mostra o pico característico da segunda fase hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Os dados em (a) foram coletados em difratômetro convencional e os dados em (b) foram coletados usando radiação Sincrotron, no LNLS. As marcas em rosa mostram os picos esperados para a estrutura de espinélio da ferrita (ICSD 170911).

Deste modo, materiais com composições próximas a $x = 0,25$ foram sintetizadas e investigadas, sendo eles com $x = 0,15; 0,20; 0,25$ e $0,30$. A caracterização estrutural foi feita dessa vez com radiação sincrotron (LNLS), cujos difratogramas são mostrados na Figura 2.7(b). Para $x = 0,15, 0,20$ e $0,25$ as nanopartículas obtidas apresentam a formação do espinélio como fase única enquanto que para $x = 0,30$ foram detectadas fases contaminantes. A redução no parâmetro de rede à medida em que se aumenta “ x ”, como mostrado na Tabela 2.3, denota a substituição de Mn por Zn na ferrita (SHANNON e PREWITT, 1969). O tamanho do cristalito também apresenta uma pequena redução com o aumento do teor de Zn nas amostras monofásicas e atinge o valor mínimo de 10,1 nm para $x = 0,25$, que foi então adotado

como o valor padrão para os testes que seguem. Assim, desse ponto em diante as nanopartículas magnéticas foram sintetizadas com a composição nominal $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$.

Na próxima etapa do estudo avaliou-se a influência da concentração de NaOH, agente precipitante, na estrutura das nanopartículas magnéticas. Os materiais foram precipitados em soluções de NaOH 1 mol.L^{-1} , $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e os dados obtidos por DRX (não mostrado) indicam que apenas a estrutura de espinélio é encontrada em qualquer uma das condições. A Figura 2.8(a), na qual somente a reflexão de Bragg referente ao plano (311) da ferrita é apresentada, mostra que o aumento da concentração na solução de NaOH para 1 mol.L^{-1} faz com que produza estruturas pouco cristalina e não homogênea de ferrita. Como mostram as curvas em vermelho e azul na Figura 2.8(a), bem como os dados apresentados na Tabela 2.3, foi necessária a inclusão de pelo menos uma estrutura de espinélio com dois graus de cristalização distintos (cristalitos $\sim 15 \text{ nm}$ e 3 nm) no refinamento para que fosse alcançada um ajuste aceitável entre os dados teórico e experimental. Os picos largos, característicos das nanopartículas, restringem discussões aprofundadas quanto aos dados do refinamento estrutural, contudo, está claro que as amostras preparadas em soluções de NaOH $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ são mais homogêneas, estando os dados experimentais em boa concordância com um modelo teórico com base numa única estrutura de espinélio com único grau de cristalinidade (curvas em vermelho).

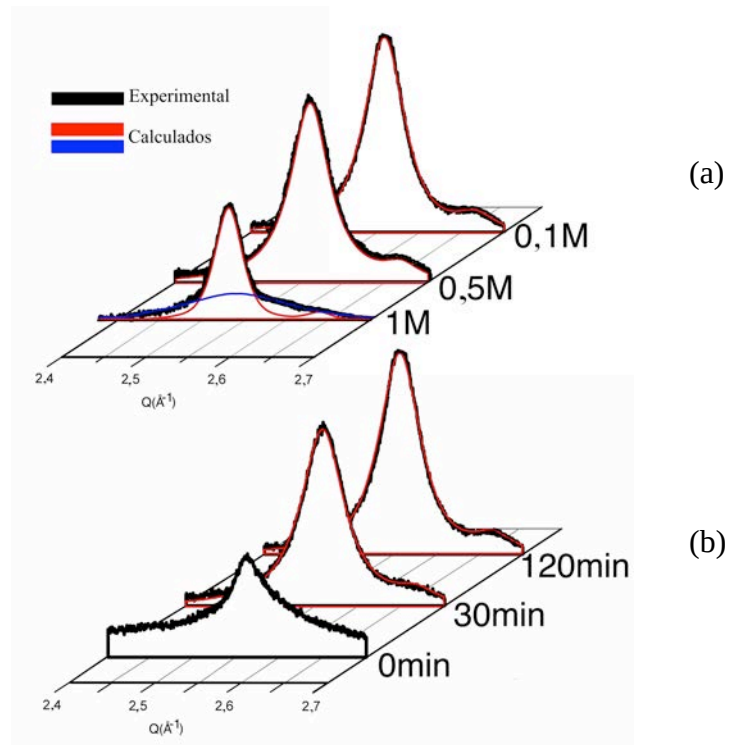


Figura 2.8. Picos de Bragg experimentais (obtidos por DRX) e calculados associados ao plano (311) da estrutura espinélio de ferritas com formula geral $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$ sintetizadas em soluções de NaOH com diferentes concentrações (a) e diferentes tempos de reação (b). A amostra preparada com tempo = 0 não foi considerada para o refinamento estrutural devido ao seu baixo grau de cristalização. As alinhas vermelhas são associadas com a fase espinélio principal e a linha em azul à fases secundárias também com estrutura espinélio. Os dados foram coletados com radiação Sincrotron (LNLS, Brasil).

Tabela 2.3. Parâmetros do refinamento estrutural das nanopartículas de ferrita com formula geral $Mn_{(1-x)}Zn_xFe_{1,70}O_4$. Os dados experimentais foram coletados por DRX no LNLS. Os resultados mostram a influência da concentração de NaOH e tempo de reação (digestão) nos tamanhos da cela unitária e cristalito. As amostras com $x = 0,30$ precipitada em solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ por 120 min, e aquela com $x = 0,25$ precipitada em solução de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ por 0 min não foram consideradas para o refinamento devido à presença de fases secundárias em grandes quantidades e baixo grau de cristalização respectivamente.

Valor de x	[NaOH] (mol.L ⁻¹)	Tempo de reação (digestão) (min)	a(Å)	Tamanho do cristalito (nm)	wt%*	χ ²	R(F2)
0,15	0,1	120	8,4479±0,0001	11,4±0,4	-	2,392	0,0354
0,20			8,4326±0,0002	10,8±0,3	-	2,257	0,0345
0,25	1		8,3989±0,0014	2,0±0,6	74%	2,354	0,029
	0,5		8,4413±0,0002	15,1±0,2	26%	-	-
			8,4300±0,0002	9,9±0,2	-	2,751	0,046
			8,4273±0,0001	10,1±0,2	-	2,515	0,039
0,1	30	8,4231±0,0002	9,7±0,4	-	2,751	0,046	

* percentual em massa

A formação de parte dos cristalitos excessivamente pequenos na amostra preparada em solução 1 mol.L^{-1} pode ser atribuído ao seguinte fato (AYYAPPAN, PHILIP e RAJ, 2009). A precipitação ocorre inicialmente pela supersaturação (S) da solução, seguida de nucleação, que depende da: energia interfacial (σ), volume da partícula (v) e energia térmica ($k_B T$), sendo que o raio crítico de equilíbrio (r^*) da partícula formada é dado por:

$$r^* = \frac{2v\sigma}{k_B T \ln(S)}$$

Assumindo que os cátions são adicionados à solução precipitante da mesma maneira, independente da concentração do agente precipitante (NaOH), e que a concentração desse agente não varia durante a precipitação (está em excesso), quanto maior for sua concentração tanto maior será o S e, assim, o r^* das partículas formadas será menor. Após a nucleação inicial, a energia livre de formação de núcleos diminui devido à diminuição na concentração dos reagentes (cátions metálicos), não formando novos núcleos.

Por outro lado, à medida em que a concentração dos reagentes diminui a supersaturação (S) também diminui, o que favorece o crescimento de tamanho até atingir um novo raio crítico de equilíbrio (r^*). Isso se dá pelos repetidos processos de redissolução e redeposição, processos estes conhecido como Envelhecimento ou Maturação de Ostwald (*Ostwald Ripening*), onde as partículas menores reprecipitam sobre a superfície de partículas maiores (LI et al., 2008). A temperatura, pressão, tempo e a concentração dos reagentes e outros íons, bem como dos aditivos (surfactantes etc), influenciam no crescimento dos cristais. No caso do presente trabalho, isso é feito em concorrência com a reação de desidratação, em temperatura próxima à de ebulição por 120 min. Essa etapa do processo é denominada de digestão, efetuada em temperatura elevada onde, além da recristalização e desidratação, as impurezas ocluídas nos precipitados são passadas para a água-mãe. Provavelmente, na síntese feita com NaOH a 1 mol.L^{-1} , houve a formação de cristais pequenos inicialmente, que coalesceram durante a digestão, mas o tempo e as condições não foram favoráveis para crescer, desidratar e produzir cristais de tamanho homogêneo (VAYSSIERES et al., 1998).

Como mostrado na Tabela 2.3, a amostra preparada em solução de NaOH a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ apresenta parâmetro de rede menor em comparação àquela obtida em

solução $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. Embora esta diferença seja pequena e os largos picos das nanopartículas limitem a discussão, há possibilidade de ocupação invertida de sítios (inversão). Neste caso, a substituição de parte dos íons Fe^{+2} (raio iônico $0,615 \text{ \AA}$ no sítio A) ou Mn^{+2} (raio iônico $0,655 \text{ \AA}$ no sítio A) no sítio A por íons Zn^{+2} (raio iônico $0,58 \text{ \AA}$ no sítio A), explicaria a redução da cela unitária. Considerando que a formação de complexos solúveis de zinco é maior quanto maior o pH da solução, é provável que em solução de NaOH a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ estes complexos tenham formado também. Assim, a concentração de NaOH a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foi adotada como padrão para o seguinte teste.

A próxima etapa do trabalho se deu de forma a avaliar a influência do tempo de reação (digestão) na síntese de nanopartículas de ferrita com a composição nominal $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$. As amostras foram precipitadas em soluções $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH e a reação foi conduzida por 0, 30 a 120 min. Os picos de Bragg referentes ao plano (311) para cada uma destas amostras são mostrados na Figura 2.8(b). Como esperado, existe uma grande diferença na cristalinidade das amostras preparadas com 0 e 30 min de digestão. Entretanto, essa diferença é pequena entre as amostras obtidas após 30 e 120 min, tanto no tamanhos do cristalito quanto em seus parâmetros de rede (Tabela 2.3), ou seja, após 30 min a influência (ou não) do tempo de reação no tamanhos de cristalito e parâmetros de rede das nanopartículas obtidas não é clara. Assim, um estudo complementar utilizando DN foi realizado para melhor elucidar a influência deste importante parâmetro da síntese, descrito a seguir.

Nanopartículas obtidas após 30, 60 e 90 min de reação foram estudadas por DN, cujos difratogramas são apresentados na Figura 2.9. Diferentemente do padrão de DRX, a linha de base dos dados de DN proporciona informações valiosas. Essa contribuição, oriunda do espalhamento difuso na amostra, ou simplesmente o

background, é originada principalmente da presença de átomos de hidrogênio na amostra (USKOKOVIC, DROFENIK e BAN, 2004; KAHANI e JAFARI, 2009). Os dados de DN, tal como obtidos no instrumento, são apresentados na Figura 2.9(a) e mostram que existe um aumento na intensidade do *background* na amostra obtida após 60 min em comparação àquela preparada com 30 min de reação. Entretanto, a intensidade diminui para a amostra obtida após 90 min de reação. Portanto, pode-se inferir que até um tempo de 60 min de reação os processos de redissolução e redeposição (maturação) ocorrem mais intensamente, sem muita variação na cristalinidade e parâmetros de rede, ao passo que a desidratação torna-se mais intensa após este período.

Na Figura 2.9(b) são apresentados os dados após a subtração dos respectivos *backgrounds* e os resultados obtidos com o refinamento estrutural estão na Tabela 2.4. A composição do espinélio na amostra obtida com 30 min de síntese foi determinada como sendo $\text{Mn}_{1,04}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,71}\text{O}_4$. Chama a atenção ao fato de que esta composição é semelhante àquela determinada previamente para a amostra com $y = 0$ quando se estudou a influência do teor de Fe na amostra, porém com uma maior quantidade da fase secundária constituída de espinélio de diferente composição (11% e 4,3%, respectivamente). Após 60 min uma diferença não significativa foi observada na composição no espinélio, determinada como $\text{Mn}_{1,06}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,69}\text{O}_4$. Entretanto, o percentual de fase secundária de espinélio cai de 11% para 9,2%. Quanto à amostra preparada após 90 min, uma alteração ocorre na composição da ferrita, sobretudo no sítio A. A nova composição encontrada foi $\text{Mn}_{0,95}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,80}\text{O}_4$, com o percentual de fase secundária de espinélio caindo para 8,8%. Resumindo, as principais alterações nas nanopartículas ocorrem entre 60 e 90 min e são mais notáveis no sítio A ou tetraédrico. Cabe destacar que a presença de FeO (fase secundária), caracterizada pelo

pequeno pico indicado com uma seta em $5.1\text{\AA}^{-1}$, é notada nas amostras obtidas com 30 e 60 min de reação. Após 90 min, apenas traços desta fase podem ser notados.

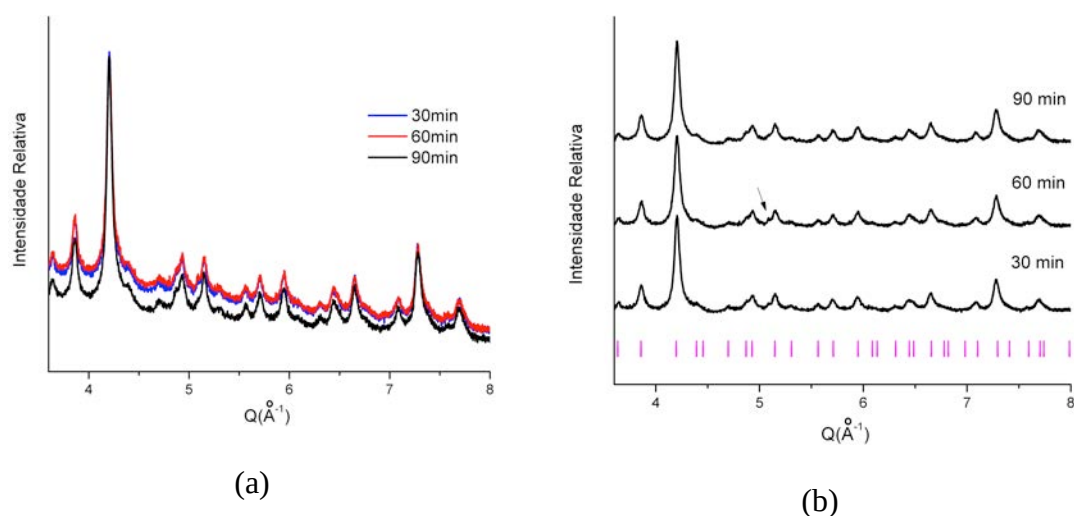


Figura 2.9. Dados de DN referentes à nanopartículas preparadas com formula nominal $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$ e obtidas após 30 min, 60 min e 90 min de reação. Os dados tais quais coletados são apresentados em (a) onde as variações na linha de base podem ser vistas. Em (b) são mostrados os dados após a subtração do *background*, assim como as posições esperadas para a estrutura de espinélio das ferritas. A seta indica o pico referente à fase secundária de FeO.

Tabela 2.4. Parâmetros do refinamento estrutural dos dados de DN e distribuições iônicas no interior do espinélio obtidas para nanopartículas de ferrita de composição nominal $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$ obtidas após diferentes tempos de reação.

Distribuição iônica em cada sítio do espinélio								
30 min			60 min			90 min		
	A	B		A	B		A	B
Zn	0,25	-	Zn	0,25	-	Zn	0,25	-
Mn	0,26	0,78	Mn	0,26	0,80	Mn	0,17	0,78
Fe	0,49	1,22	Fe	0,49	1,20	Fe	0,58	1,22
$\chi^2 = 1,890$			$\chi^2 = 1,698$			$\chi^2 = 2,010$		
R(F2) = 0,0199			R(F2) = 0,0164			R(F2) = 0,0210		
Segunda fase espinélio:			Segunda fase espinélio:			Segunda fase espinélio:		
11%			9,2%			8,8%		

As mesmas amostras foram também investigadas por *far*-FTIR, cujos dados são apresentados na Figura 2.10. Nota-se a presença de duas bandas características: ν_1 , em torno de 575 cm^{-1} e ν_2 , em torno de 400 cm^{-1} . A primeira corresponde às vibrações de estiramento das ligações entre metais e átomos de oxigênio nos sítios tetraédricos enquanto que a última corresponde às vibrações das ligações entre metais e átomos de oxigênio nos sítios octaédricos (OTTEMANN et al., 2011). Pode-se notar que em ambas as bandas um estreitamento com o aumento do tempo de síntese, sendo esta mudança mais notória para as bandas no sítio B ou octaédrico. Este estreitamento pode ser característico da redução na inversão do espinélio, ainda que os dados de DN refinados que se refere majoritariamente ao volume (*bulk*) tenham mostrado que os sítios B permanecem praticamente inalterados quanto à sua composição elementar com o aumento no tempo de síntese.

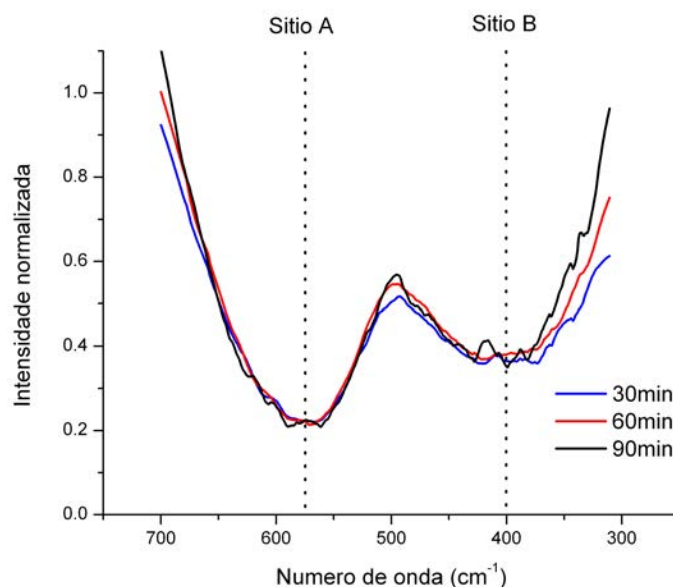


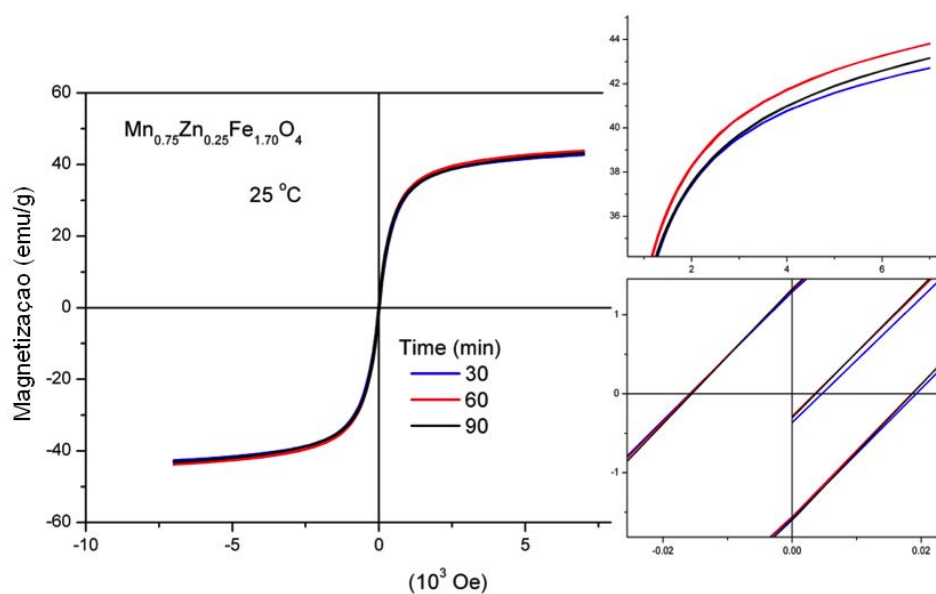
Figura 2.10. Espectros de *far*-FTIR de nanopartículas de ferrita com composição nominal $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$ obtidas após diferentes tempos de reação.

Finalmente, a influência do tempo de síntese nas propriedades magnéticas das nanopartículas foi investigada, conforme apresentado na Fig. 2.11. Na Fig. 2.11(a), as

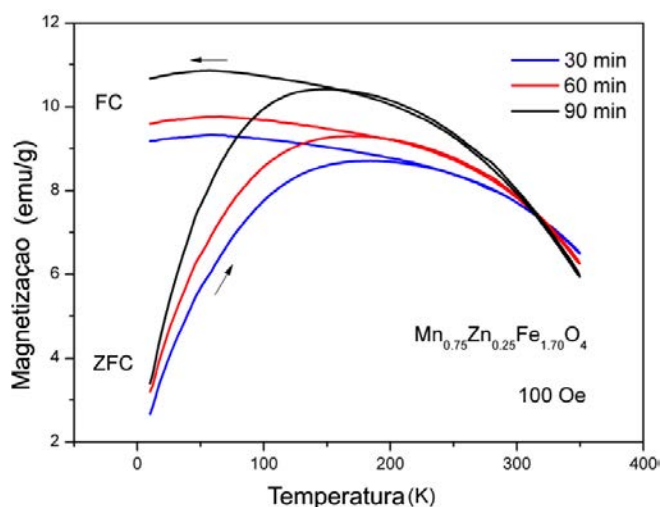
curvas *M versus H* (Magnetização *versus* Campo magnético aplicado) obtidas em temperatura ambiente não demonstram alterações significativas no que diz respeito à coercividade (caracterizado pelo alargamento das curvas de histerese) dos materiais, enquanto a saturação magnética é menor para a amostra obtida após 30 minutos de síntese. Este menor valor de magnetização não pode ser facilmente explicado com base nos dados obtidos até aqui (DN e *far*-FTIR). Visto que não existem diferenças consideráveis nos tamanhos de cristalito e, possivelmente, nem nos tamanhos das partículas das amostras obtidas com 30, 60 e 90 min de síntese, é possível que a maior inversão na estrutura do espinélio esteja prejudicando o alinhamento dos domínios magnéticos. A inversão detectada por *far*-FTIR se refere à estruturas superficiais impedindo discussões conjuntas mais aprofundadas. Nota-se também que a amostra obtida após 60 min de maturação apresenta saturação magnética maior do que aquela obtida com 90 min de síntese. Tal resultado pode ser explicado pelas curvas ZFC / FC mostradas na Figura 2.10(b), na qual a amostra após 90 min de maturação apresenta a menor temperatura de bloqueio (~150 K), ou seja, a temperatura na qual os materiais apresentam transição para o regime paramagnético, ou seja, quando passam a exibir magnetização decrescente com o aumento da temperatura. Esta observação denota uma menor anisotropia magnética, o que leva a baixos valores de saturação magnética (SHARIFI e SHOKROLLAHI, 2013). Visto que os cristalitos, e possivelmente as partículas, tem tamanhos semelhantes, maior anisotropia magnética para as amostras preparadas com 30 min e 60 min de reação é provavelmente devido a maior anisotropia na superfície, consequência da camada de óxido-hidróxido das nanopartículas, tal como discutido com base no *background* dos dados de DN (ZHANG et al, 2009).

Esta caracterização mostra que os materiais produzidos exibem anisotropia

(estrutural e magnética) e polidispersão típicas de materiais nanométricos, e que estas tendem a diminuir com o tempo de reação.



(a)



(b)

Figura 2.10. Curvas M versus H para nanopartículas preparada com composição nominal $\text{Mn}_{0.75}\text{Zn}_{0.25}\text{Fe}_{1.70}\text{O}_4$ e obtidas após 30 min, 60 min e 90 min de reação (a). O detalhe mostra a origem dos gráficos. Em (b), curvas ZFC/FC para as mesmas nanopartículas denotam a redução na temperatura de bloqueio à medida que o tempo de síntese aumenta.

A fim de se demonstrar que a resposta magnética destas nanopartículas em temperatura ambiente é suficiente para o seu rastreamento no interior de organismos vivos, foi realizado um ensaio com a técnica de BAC. Neste experimento, nanopartículas de ferrita $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$ obtidas após 90 min de síntese foram utilizadas como um traçador em exame de esvaziamento gástrico em um rato. Como pode ser visto na Figura 2.11, é possível detectar o trânsito das nanopartículas no estômago e ceco (porção final do intestino delgado) do animal ao longo de 240min, mostrando que a resposta magnética que os materiais sintetizados proporcionam é suficiente para futuras aplicações *in vivo*.

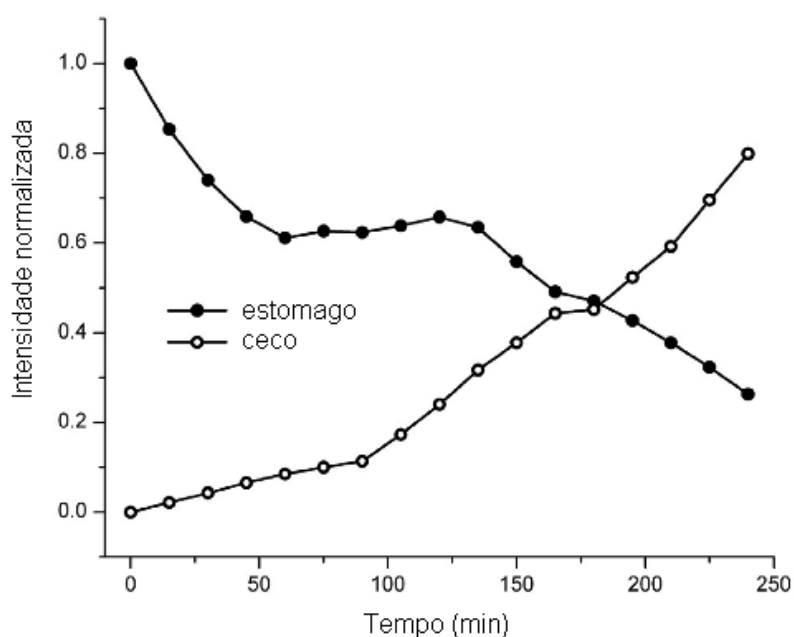


Figura 2.11. Resposta magnética em função do tempo do esvaziamento gástrico e trânsito no ceco do traçador magnético ($\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$ obtidas após 90 min) em rato, obtidos com a técnica de BAC.

2.4. Considerações finais

Neste capítulo estão apresentados os resultados referentes à síntese das nanopartículas de ferrita de Mn e Zn com fórmula geral $Mn_{(1-x)}Zn_xFe_{(2-y)}O_4$. Os experimentos foram realizados através de uma combinação de técnicas de espalhamento de raios X, nêutrons e luz. A variação de "y", ou simplesmente o parâmetro que representa a deficiência do conteúdo de Fe, mostra que as nanopartículas apresentam deficiência de Fe na estrutura, mesmo que estas sejam sintetizadas com uma composição nominal respeitando-se a estequiometria. Para $y = 0,30$, quando a deficiência de Fe é induzida no processo de síntese, são obtidas nanopartículas com um grau de cristalização mais elevado, com concentrações maiores de Fe no espinélio.

A quantidade máxima de zinco, de momento magnético nulo, admitida no espinélio sem que haja formação de fases secundárias, é quando $x = 0,25$ para $Mn_{(1-x)}Zn_xFe_{1,7}O_4$. Verificou-se também que a concentração de NaOH desempenha um papel importante na síntese pelo método de co-precipitação, uma vez que em altas concentrações há formação de complexos solúveis de Zn, bem como a alta concentração iônica levam a não homogeneidade das estruturas das nanopartículas.

A influência do tempo da reação ou digestão na rota de co-precipitação foi cuidadosamente investigada sendo possível verificar que: (i) a composição do espinélio pouco se altera para períodos de síntese inferiores a 60min; (ii) após 90 min de síntese, um aumento considerável na concentração de Fe, especialmente no sítio A é detectado, bem como uma possível redução na anisotropia magnética.

3. Síntese do bio-nanocompósito (bio-NCP)

3.1. Considerações iniciais

Neste capítulo são descritas as etapas realizadas para a modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de ferrita de Mn e Zn, revestindo-as com quitosana e depositando apatita sobre sua superfície. As nanopartículas magnéticas otimizadas conforme descrito no Capítulo 2 foram preparadas por co-precipitação em 300 mL de solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaOH sob a composição nominal de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_{1,70}\text{O}_4$. A modificação se deu com o encapsulamento dessas nanopartículas com o biopolímero quitosana e posterior modificação deste com nanocristais de hidroxiapatita, descrita a seguir. O material final foi então denominado como bio-nanocompósito (bio-NCP).

O polímero quitosana e a formação de compósitos com apatitas

A quitosana é o segundo polissacarídeo mais abundante no planeta, estando atrás apenas da celulose (FELT et al., 1998), sendo obtida da desacetilação da quitina, componente majoritário de exoesqueletos de crustáceos e outros animais marinhos (Dos SANTOS et al., 2003). A quitosana apresenta diversas propriedades biológicas atrativas tais como: não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, que possibilitam as mais diversas aplicações em sistemas biológicos. Dentre estas estão as aplicações na engenharia de tecidos (ALBANNA et al., 2013), síntese de compósitos para hipertermia magnética (LIN, LIN e LIN, 2012) ou carregamento de drogas (BERNKOP-SCHNÜRCH E DÜNNHAUPT, 2013).

As apatitas, por sua vez, são minerais baseados em fosfatos de cálcio, dentre os quais se enquadra a hidroxiapatita, que é o principal componente inorgânico da matriz óssea. Assim como a quitosana, as apatitas também apresentam propriedades de não-toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, que as credenciam para diferentes aplicações na medicina. Dentre estas aplicações, podem ser citadas o carregamento de drogas (BARROUG et al., 2013), o preparo de compósitos com sílica mesoporosa para o tratamento de tumores ósseos (IAFISCO e MARGIOTTA, 2012) e também sua combinação com nanopartículas magnéticas para constituir os agentes de hipertermia (MUZQUIZ-RAMOS et al., 2013). Mais importante para este trabalho, porém, são as propriedades anti-tumorais de nanopartículas de apatitas observadas em ensaios com diferentes células tumorais, inclusive aquelas da mama, com as quais estes materiais apresentam características peculiares de adesão celular (ANDRONESCU ET AL., 2010; YUAN ET AL., 2010; LIANG ET AL, 2011; PATHI et al., 2011; VENKATESEN ET AL, 2011; MEENA ET AL., 2012; JIN ET

AL., 2014). Assim, a união das propriedades da quitosana e das nanopartículas de apatita podem originar compósitos versáteis e promissores no tratamento de tumores.

Existem alguns trabalhos na literatura que relatam a síntese de compósitos de apatita e quitosana. Por exemplo, já foram preparados nanocompósitos de tamanho regular de 20–30 nm de largura e 50–60 nm de comprimento por coprecipitação (CHEN et al., 2002). Nanofios de composição semelhante também já foram sintetizados por rotas de síntese também semelhantes, com o objetivo de aplicar o material na fixação interna de ossos fraturados (HU et al., 2004). A obtenção de filmes finos pelo método de *dip coating* contendo apatitas e quitosana é também conhecida (PENA et al., 2006), entretanto, são escassos os trabalhos que relatam a síntese de nano cápsulas de quitosana modificadas com apatita, em especial contendo ainda um núcleo magnético. Neste capítulo, estão descritas as etapas percorridas para a obtenção de tal material.

3.2. Parte experimental

Preparação das amostras

Para o revestimento das nanopartículas com quitosana, foi utilizada a técnica de emulsão ou micelas reversas (MAITRA et al., 1999). Todos os reagentes citados abaixo foram da marca Sigma-Aldrich. Em um procedimento padrão, 20 mg de quitosana foram dissolvidos em solução aquosa de ácido acético (4%) e, a esta solução, 40 mg de ferrita foram adicionados (proporção em massa ferrita/quitosana = 2:1). A suspensão formada foi agitada durante 30 minutos e posteriormente adicionada a uma solução orgânica constituída de óleo de parafina e ácido oleico

(surfactante) na proporção 16:1 (volume). A mistura foi vigorosamente agitada até formar uma emulsão. Para promover a reação de reticulação, esquematizada na Figura 3.1, um volume de 0,1 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído a 25% foi adicionado à emulsão que foi mantida sob agitação durante 2 h. As nanopartículas revestidas foram lavadas com clorofórmio, etanol e acetona e secas em temperatura ambiente durante 48h.

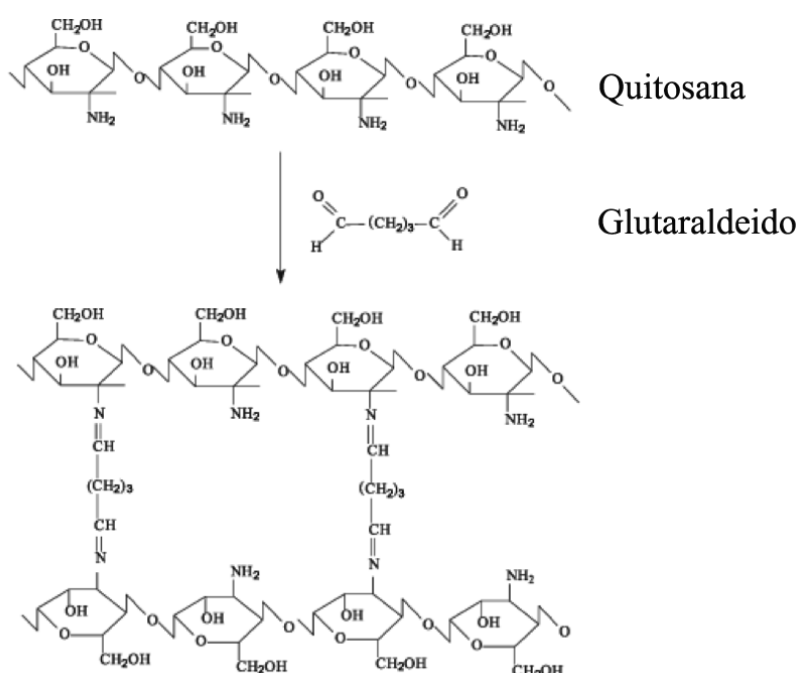


Figura 3.1. Reação de reticulação da quitosana usando o glutaraldeído como agente reticulante, adaptado de GONÇALVES et al., 2005.

Em seguida, as nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana foram modificadas com nanocristais de apatita utilizando-se a técnica de mimetização (MARTINS et al., 2014a). Para tanto, as nanopartículas revestidas foram dispersas em 100 ml de solução aquosa de CaCl_2 visando promover a adsorção dos íons Ca^{+2} nos grupos superficiais da quitosana. O tempo requerido para este passo foi denominado como "tempo de envelhecimento", ou "*aging time*". Foi então adicionado a este meio de reação o ácido fosfórico (H_3PO_4), sendo o pH ajustado para 7,4 com NaOH. A

reação foi mantida sob agitação a fim de facilitar a reação entre os íons e os grupos superficiais do polímero e também aos íons Ca^{+2} já adsorvidos. O tempo para este passo foi denominado de "tempo de mimetização". Depois de revestidas e modificadas, as nanopartículas foram lavadas com água deionizada ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$), separadas com a ajuda de um ímã e secas em temperatura ambiente.

A influência dos tempos de envelhecimento e mimetização foram estudados para razões molares de cálcio e fosfato $\text{Ca/P} = 1,50$ e $1,67$ usando uma razão em massa fixa de quitosana/apatita = 2. Primeiramente, a influência do envelhecimento foi estudado em tempos iguais a 1h, 2h, 4h, 12h e 24h com tempo de mimetização fixo em 4h. Em seguida, o tempo de envelhecimento foi fixado em 1h e foram estudados a influência do tempo de mimetização após 1h, 2h, 4h, 12h e 24 h.

A influência da relação em massa quitosana/apatita foi estudada mantendo-se o envelhecimento e a mimetização fixas em 1h e 4h, respectivamente. Foram testadas as seguintes razões mássicas ferrita/quitosana: 1:1, 2:1 e 4:1. Daqui em diante, as nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana e modificados com nanocristais de apatita serão referidas como bio-nanocompósitos (bio-NCP). Um esboço de tal composto é apresentado na Figura 3.2.

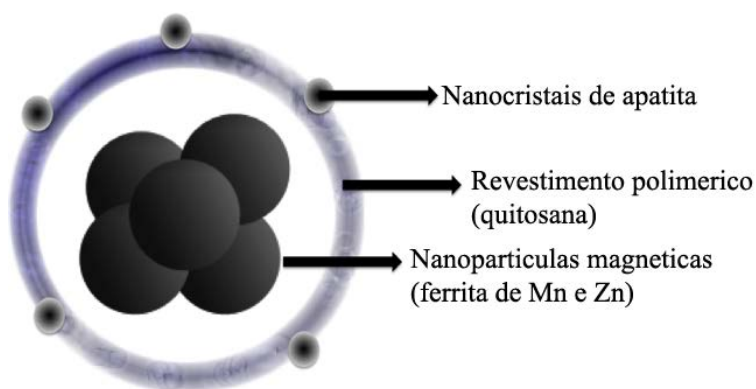


Figura 3.2. Desenho esquemático do bio-nanocompósito (bio-NCP). As nanopartículas de ferrita de Mn e Zn são revestidas com quitosana cuja superfície é modificada com nanocristais de apatita.

Caracterização dos materiais

As fases cristalinas do bio-NCP foram investigadas por DRX usando radiação sincrotron de 10KeV ($\lambda = 1,24\text{\AA}$) com um detector Mythen na estação D10B-XPD do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Brasil). Para estas análises, as amostras foram colocadas em suportes planos de alumínio e varridas entre $1\text{\AA}^{-1} \leq Q \leq 6.5\text{\AA}^{-1}$.

A presença de grupos orgânicos no bio-NCP, bem como o seu nível de hidratação, foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando um espectrômetro Nicolet, Nexus 670, com acessório DRIFT, no Departamento de Química - IBB (UNESP).

A análise morfológica dos materiais foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) analisando-se as imagens obtidas num microscópio FEI, Quanta 200 do Centro de Microscopia - IBB (UNESP). Nesta caracterização, 10 imagens foram capturadas para cada amostra e o tamanho médio das partícula foram determinados utilizando o *software* ImagePro®.

3.3. Resultados e discussão

Na Figura 3.3(a) são mostrados os espectros de FTIR para as nanopartículas de ferrita, quitosana comercial e para as nanopartículas de ferrita revestidas com quitosana. As setas indicam um ligeiro deslocamento da banda em 2900 cm^{-1} , atribuída às ligações C-H, para maiores números de onda, em comparação com a mesma banda na quitosana comercial. Um deslocamento semelhante foi também detectado na banda em 1744 cm^{-1} atribuída aos radicais amida do polímero. Uma

nova banda em 1633 cm^{-1} referente à vibração da ligação C-N aparece no espectro do material revestido devido à formação de bases de Schiff durante o processo de reticulação (KLINKAEWNARONG et al., 2010). A pequena banda em 565 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento das ligações Fe-O, característica das ferritas. A semelhança do perfil dos espectros, bem como na intensidade dos picos e bandas, da quitosana comercial e ferrita revestida com quitosana indicam que o recobrimento foi eficiente e que as substâncias (solventes, surfactante etc) usadas no processo foram eliminadas.

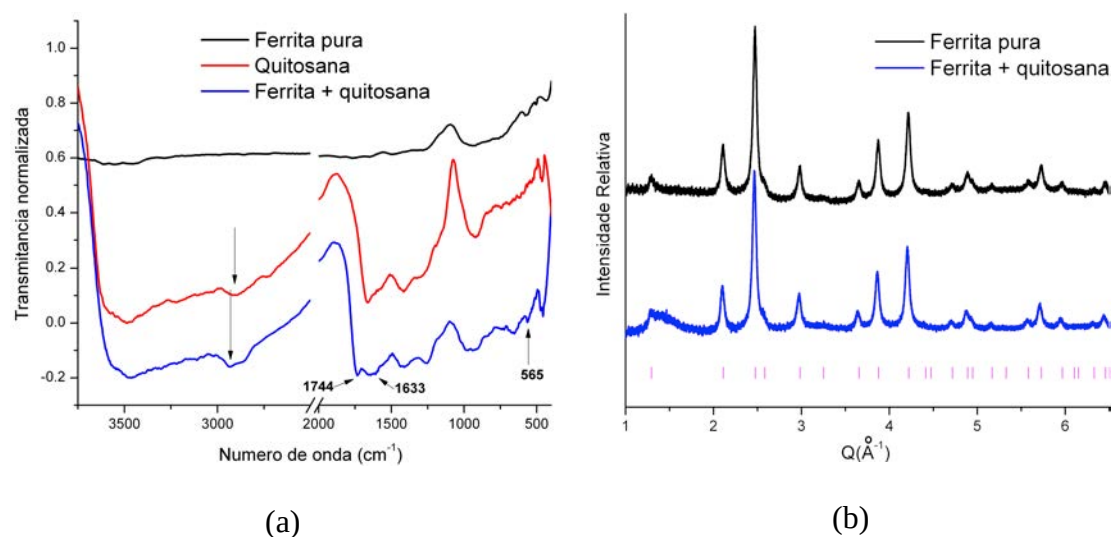


Figura 3.3. (a) Espectros de FTIR para as nanopartículas de ferrita (preto), quitosana commercial (vermelho) e nanopartículas de ferrita revestidas com quitosana (azul). (b) Padrões de DRX para as nanopartículas de ferrita e para as nanopartículas revestidas.

Os padrões de DRX para as nanopartículas sem e com revestimento são mostrados na Figura 3.3(b). Não há alterações aparentes na estrutura da ferrita após os processos de revestimento e modificação (mimetização), visto que a única diferença entre os padrões é o pico largo entre 1 e $2\text{\AA}^{-1}$ devido à presença da própria quitosana (ZHANG et al., 2008). A intensidade dos picos é também semelhante, indicando que o revestimento não é espesso.

Após revestir as nanopartículas magnéticas, o passo seguinte para a preparação de bio-NCP é a modificação da superfície com cristais de apatita pelo método de mimetização (envelhecimento + mimetização). Para tanto, os grupos OH e NH_2 do polímero devem ser lábeis (permissivo à trocas) na associação com as moléculas de água e os seus elétrons livres devem funcionar como sítios preferenciais para a adsorção dos íons Ca^{2+} ("troca iônica") e posterior nucleação dos nanocristais de apatita. Conforme apresentado no esquema da Figura 3.4, as nanopartículas revestidas são dispersas em solução de CaCl_2 cuja alta concentração iônica promove a troca das moléculas de água dos grupos funcionais superficiais do nanocompósito pelos íons Ca^{2+} que então se combinam com os pares de elétrons livres do polímero dos grupos como OH e NH_2 (MARTINS et al, 2014a).

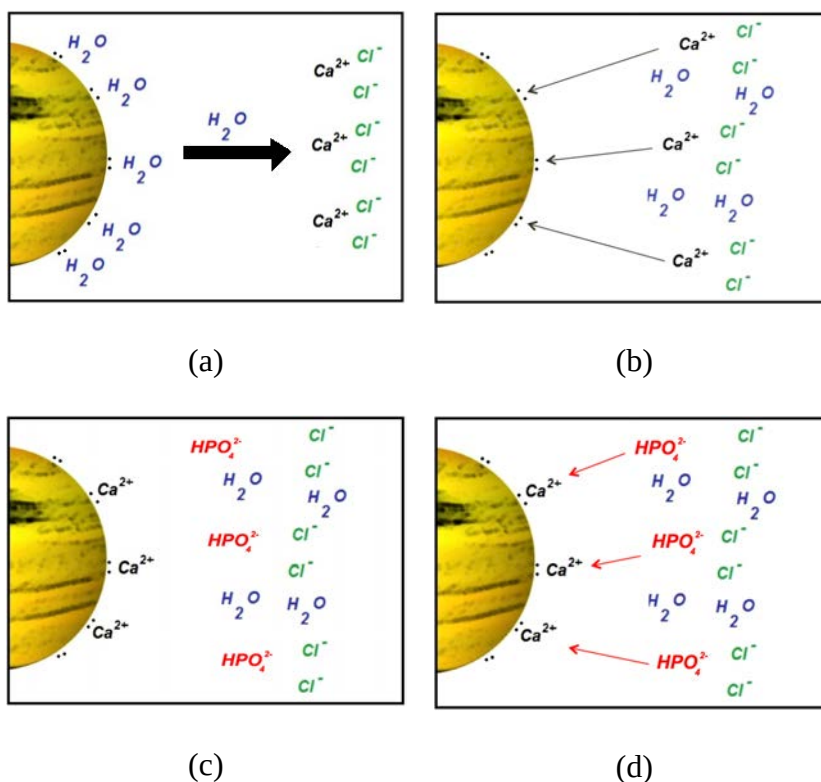


Figura 3.4. Esquema representativo da técnica de mimetização utilizada para modificar a nanopartícula revestida com cristais de apatita. As nanopartículas revestidas são dispersas em solução aquosa de CaCl_2 cuja alta concentração iônica leva a um movimento difusivo das moléculas de água das nanopartículas para a solução (a). Em seguida, os grupos com elétrons livres (OH e NH_2) podem atuar como sítios de adsorção para os íons Ca^{2+} (b e c). Posteriormente, grupos HPO_4^{2-} são adicionados à reação e interagem com os íons Ca^{2+} formando as nanoestruturas de apatita (d).

O deslocamento das moléculas de água dos nanocompósitos pelo cálcio mencionado anteriormente pode ser monitorado por FTIR, podendo ser notado na forma de deslocamentos das bandas referentes ao estiramento dos grupos OH entre 3750 e 3250 cm^{-1} para maiores números de onda. Embora isso não confirme a

adsorção de íons Ca^{2+} de forma direta, indica uma redução na quantidade de água ancorada nos grupos funcionais citados (MADEJOVÁ, 2003). Adicionalmente às bandas de OH, as bandas referente ao grupo fosfato entre 1100 e 800 cm^{-1} podem ser usadas na análise da eficiência da mimetização (KLINKAEWNARONG et al., 2010). Tais bandas nos possibilitam uma ideia acerca do crescimento dos cristais de apatita sobre a superfície do bio-NCP.

Na Figura 3.5(a) mostra-se os espectros de FTIR das nanopartículas recobertas com quitosana envelhecidas por 1, 2, 4, 12 e 24 horas com razão molar $\text{Ca/P} = 1,50$ sob tempo de mimetização fixo de 4h, enquanto que na Figura 3.5(b) mostra-se os espectros dos compósitos preparados com o tempo de envelhecimento fixo em 1h e tempos de mimetização iguais a 1, 2, 4, 12 e 24 horas, também com $\text{Ca/P} = 1,50$. Como pode ser visto (ver gráficos no detalhe), o potencial químico proporcionado quando $\text{Ca/P} = 1,50$ não é suficiente para deslocar as moléculas de água durante os períodos testados. Uma oscilação entre os processos de hidratação-desidratação ocorre nas partículas como pode ser visto pelas mudanças aleatórias na posição das bandas OH tanto para diferentes tempos de envelhecimento quanto para tempos de mimetização. Como consequência, o crescimento dos cristais de apatita é inibido e nenhum aumento sistemático da intensidade das bandas de fosfato é notado.

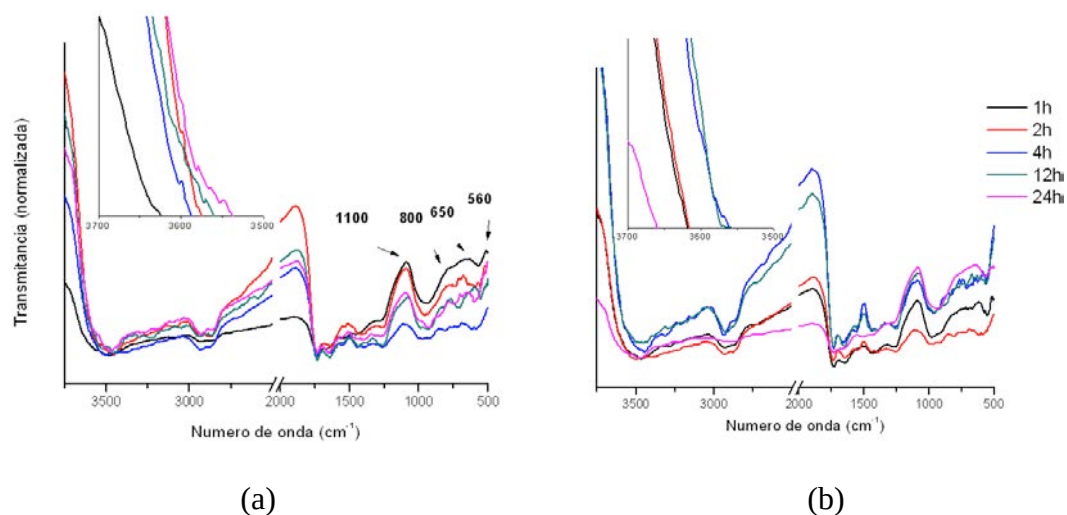


Figura 3.5. Espectros de FTIR para os compósitos de ferrita + quitosana modificados com apatita com razão molar Ca/P = 1,50. Em (a) os materiais foram envelhecidos por 1, 2, 4, 12 e 24h e mimetizados por 4h e em (b) foram envelhecidos por 1h e mimetizados por 1, 2, 4, 12 e 24h.

Utilizando uma proporção molar Ca/P = 1,67 e mantendo a razão mássica quitosana/apatita = 2 a força iônica foi aumentada favorecendo o deslocamento das moléculas de água dos grupos presentes na superfície do nanocompósito. Assim, como mostra o detalhe na Figura 3.6(a), mesmo após o envelhecimento de 24 horas, ainda é possível notar certo deslocamento nas bandas de OH para frequências mais elevadas, indicando provavelmente a perda de moléculas de água do bio-NCP. Concomitantemente, as bandas atribuídas aos grupos fosfato aumentam continuamente indicando o crescimento dos cristais de apatita. No entanto, nota-se que diferentes tempos de mimetização pouco influenciam na modificação dos materiais visto que a intensidade das bandas de fosfato pouco se altera bem como a posição das bandas de OH mesmo quando a mimetização é realizada por 24h [ver Figura 3.6(b)]. O fato indica que o envelhecimento é determinante na eficiência da deposição de apatitas.

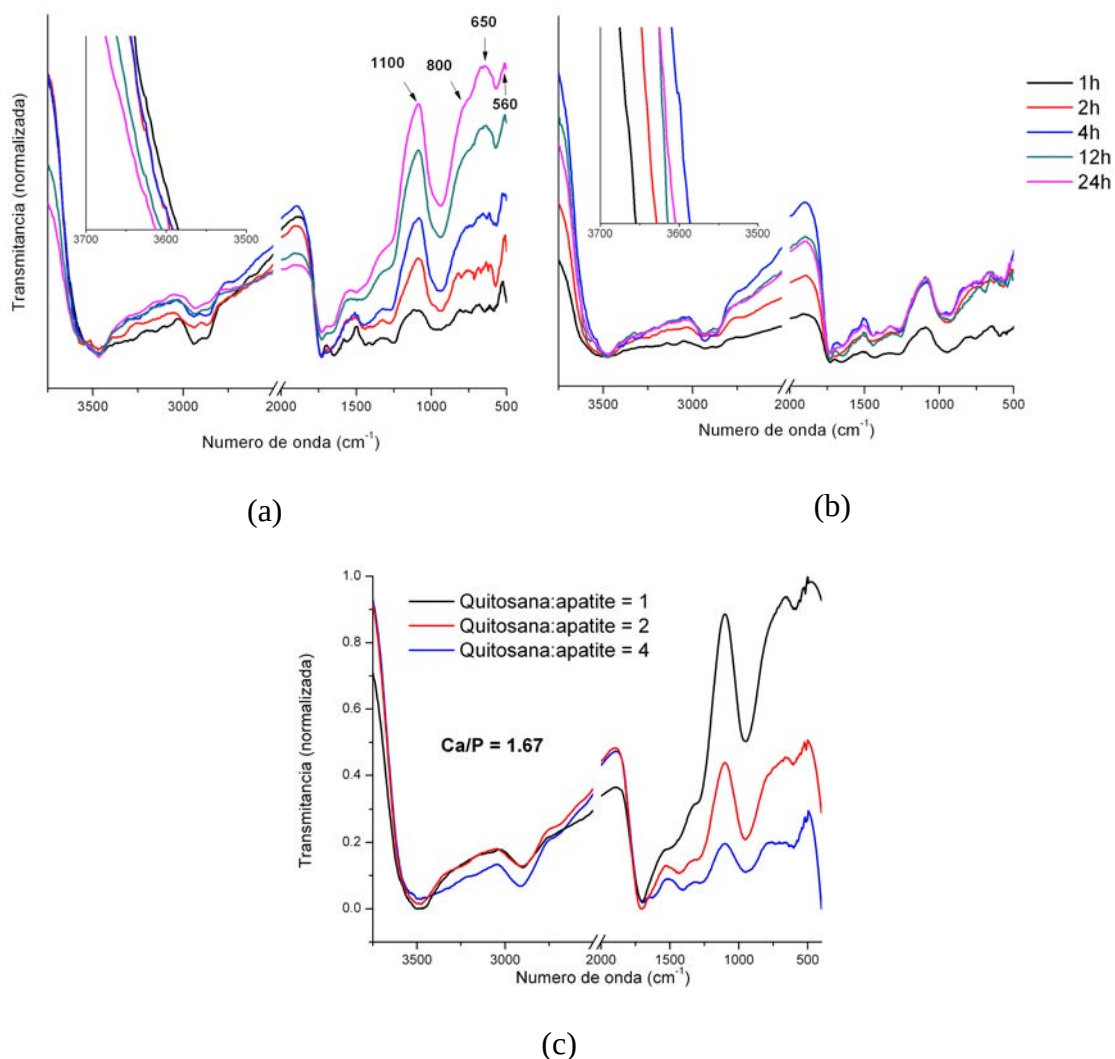


Figura 3.6. Espectros de FTIR para os compósitos de ferrita + quitosana modificados com apatita com razão molar Ca/P = 1,67. Em (a) os materiais foram envelhecidos por 1, 2, 4, 12 e 24h e mimetizados por 4h e em (b) foram envelhecidos por 1h e mimetizados por 1, 2, 4, 12 e 24h. Em (c) são mostrados os espectros referentes às amostras preparadas com envelhecimento e a mimetização fixas em 1h e 4h variando-se a razão mássica quitosana : apatita em 1:1, 2:1 e 4:1.

Finalmente, a Figura 3.6(c) mostra os espectros obtidos para amostras preparadas com diferentes razões mássicas de quitosana/apatita, sob quantidade fixa de quitosana. O deslocamento das bandas de OH, indicativo de desidratação, bem como

o aumento contínuo nas bandas de fosfato à medida que a quantidade de precursores de apatita é aumentada mostram que é possível ter um bom controle do grau de modificação do material simplesmente ajustando-se a razão quitosana/apatita, mesmo com tempos curtos de reação.

Para confirmar que o aumento na intensidade das bandas de fosfato está de fato relacionado com o aumento na quantidade de apatita na superfície do bio-NCP, as amostras poderiam ser caracterizadas por difração de raios X. No entanto, espera-se que as apatitas estejam em tamanhos pequenos com baixa cristalinidade. Adicionalmente, seu pico principal se sobrepõe ao pico de Bragg referente ao plano (311) das ferritas. Assim, para contornar este problema, foram coletados dados de DRX de compósitos sem partículas de ferrita, ou seja, contendo apenas quitosana com apatita em diferentes razões de massa (1, 2 e 4). Os dados estão na Figura 3.7, onde se nota um largo pico que sugere a formação da estrutura hexagonal característica da apatita. A intensidade deste pico aumenta à medida em que se aumenta a quantidade dos precursores de apatita nas soluções usadas no envelhecimento e mimetização, corroborando os resultados de FTIR.

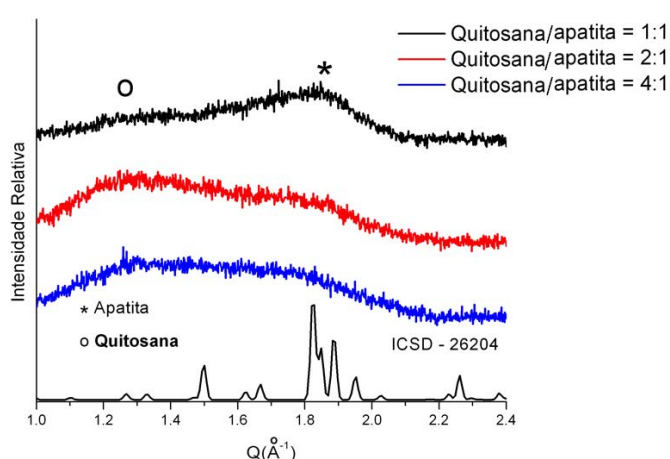


Figura 3.7. Padrões de DRX de compósitos contendo apenas quitosana e apatita (sem a presença de nanopartículas de ferrita). As amostras foram preparadas com tempos

de envelhecimento e mimetização fixos em 1h e 4h respectivamente variando-se a razão mássica quitosana/apatita em 1:1, 2:1 e 4:1.

As amostras de bio-NCPs foram então caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura para analisar as distribuições de tamanho das partículas dos bio-NCPs obtidos com tempos de envelhecimento e mimetização iguais a 1h e 4h, respectivamente, com diferentes razões em massa quitosana/apatita. As contagens foram feitas por meio do programa computacional comercial ImagePro e as distribuições são apresentadas na Figura 3.8, bem como seus dados estão sumarizados na Tabela 3.1.

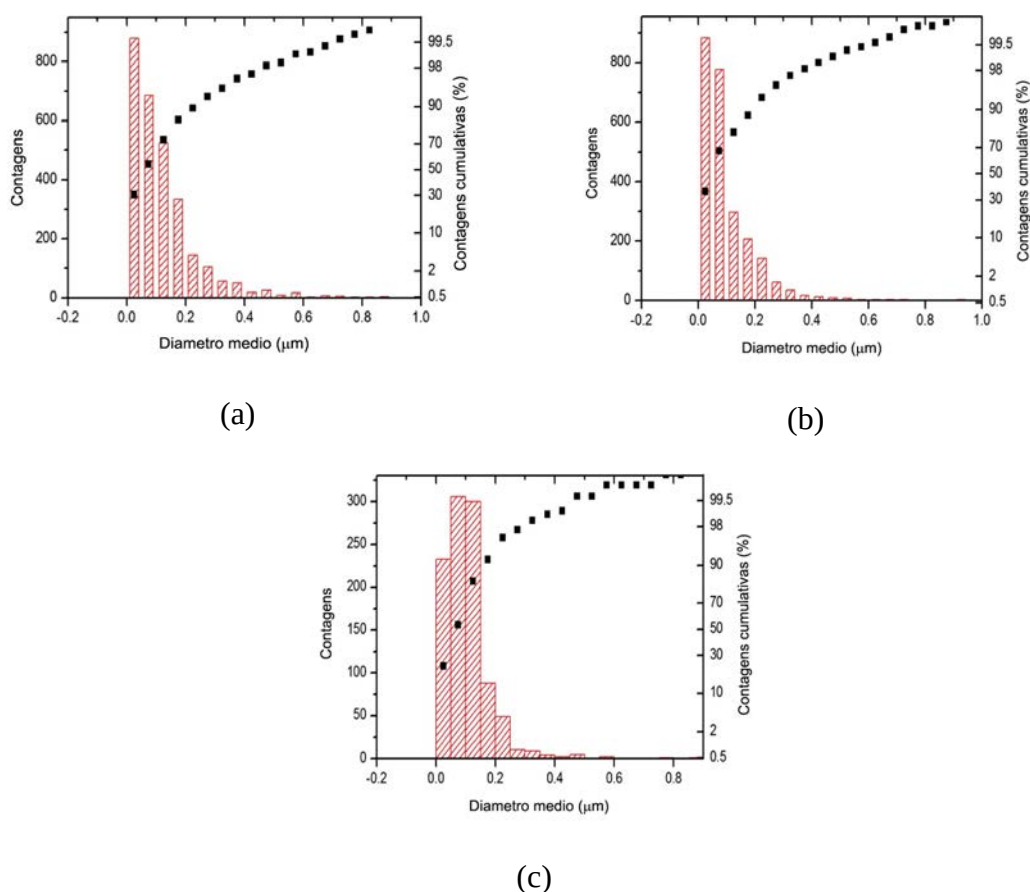


Figura 3.8. Distribuições de tamanho dos bio-NCP produzidos com tempos de envelhecimento e mimetização fixos em 1h e 4h respectivamente variando-se a razão mássica quitosana/apatita em 1:1(a), 2:1(b) e 4:1(c).

Tabela 3.1. Resultados obtidos pela análise da distribuição dos bio-NCP produzidos com tempos de envelhecimento e mimetização fixos em 1h e 4h, respectivamente, variando-se a razão mássica quitosana : apatita em 1:1, 2:1 e 4:1.

quitosana : apatita	n total	Tamanho médio (nm)	Mínimo (nm)	Máximo (nm)
1:1	2875	123±14	26	954
2:1	2464	100±10	26	970
4:1	1010	106±8	26	855

Na Figura 3.9 são mostradas algumas imagens representativas de MEV utilizadas nestas análises. Os desvios-padrão para as três amostras podem ser considerados baixos, o que reflete em distribuições razoavelmente estreitas (homogêneas quanto ao tamanho). No entanto, tal desvio aumenta claramente com aumento na quantidade de apatita no compósito bem como o tamanho médio das partículas, que chega a 123 nm para quitosana/apatita = 1:1. Por outro lado, partículas com um tamanho médio em torno de 100 nm podem ser produzidas reduzindo-se o grau de modificação na superfície do polímero.

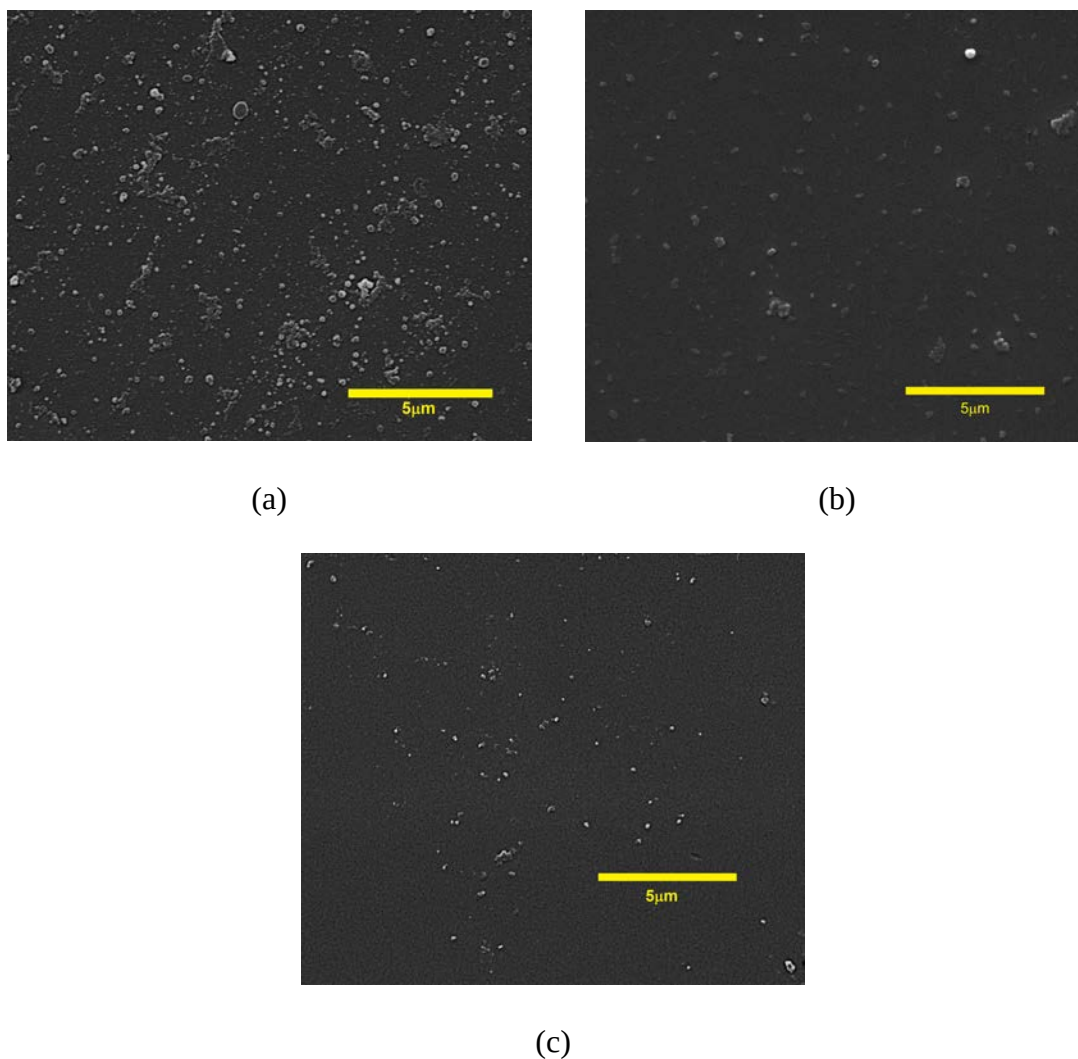


Figura 3.9. Micrografias (MEV) dos bio-NCP produzidos com tempos de envelhecimento e mimetização fixos em 1h e 4h, respectivamente, variando-se a razão mássica quitosana/apatita em 1:1(a), 2:1(b) e 4:1(c).

3.4. Considerações finais

Neste capítulo, foram apresentados resultados referentes ao encapsulamento das nanopartículas de ferrita de Mn e Zn com o polímero quitosana bem como a modificação superficial com nanocristais de apatita, a fim de se obter o bio-nanocompósito (bio-NCP).

A caracterização das etapas de síntese foi realizada principalmente por FTIR e os resultados mostram que o revestimento de quitosana foi feito com êxito e não causa alterações na microestrutura das nanopartículas, o que poderia comprometer as propriedades magnéticas do compósito final.

Em relação à modificação do polímero com nanocristais de apatita, observamos a grande relevância do deslocamento das moléculas de água a partir do bio-NCP para a solução para que os grupos com elétrons livres no polímero funcionem como sítios de adsorção dos componentes da apatita. Este processo pode ser controlado principalmente pela concentração de Ca^{2+} e tempo de envelhecimento (ou tempo de reação com Ca^{+2}), sendo que os efeitos causados pelas variações do tempo de mimetização não são significantes.

Finalmente, a análise morfológica mostra que o bio-NCP final apresenta forma esférica, com distribuição de tamanho variável entre 100 nm e 200 nm dependendo da extensão da modificação por apatita.

4: Co-encapsulamento do paclitaxel (PTX) no bio-NCP.

4.1. Considerações iniciais

Este capítulo aborda a inclusão do fármaco anti-tumoral paclitaxel (PTX) no nanocompósito formado por ferrita, quitosana e apatita, denominado bio-NCP, cuja síntese foi descrita no capítulo anterior. O encapsulamento de fármacos em matrizes biocompatíveis é um dos recursos mais utilizado na indústria farmacêutica afim de reduzir a toxicidade destas substâncias, bem como para controlar melhor sua atividade, por meio de mecanismos de liberação controlada e tempo de circulação prolongado.

As matrizes de encapsulamento mais comuns são polímeros, que inclui polissacarídeos, e compostos de sílica. Neste trabalho, propõe-se a inclusão do fármaco na porção polimérica do compósito, co-encapsulando-o com as partículas

magnéticas. Essa composição complexa levou a dificuldades particulares para a caracterização do sistema fármaco + encapsulamento, sendo tais dificuldades e os métodos utilizados para a caracterização do material descritos a seguir.

Considerações sobre a molécula de paclitaxel (PTX)

Paclitaxel (PTX) é um diterpeno já disponível comercialmente, cujas propriedades contra vários tipos de tumores têm sido amplamente relatados (WANG, HO e LIM, 2010; YU e PISHKO, 2010). Sua ação contra as células cancerosas se dá pela ligação da molécula aos microtúbulos celulares, que leva à sua estabilização e a inibição do desenvolvimento e replicação. Este mecanismo de ação é considerado muito peculiar, uma vez que outros fármacos antitumorais que agem sobre os microtúbulos, geralmente promovem a despolimerização e não a estabilização (MASTROPAOLO, et. Al, 1995).

A conformação molecular do PTX é também considerada peculiar. Como representado na Figura 4.1, a molécula deste fármaco é formada por uma porção rígida, ou cadeia terpênica, com três ciclos A, B e C, um ciclo oxetano, muitas vezes chamado como o ciclo D, e várias cadeias laterais flexíveis sendo 11 centros assimétricos. Diferentes autores tem opiniões divergentes sobre qual destes centros é de fato responsável pela ligação da molécula aos microtúbulos. Enquanto a maioria descreve a cadeia lateral ligada ao carbono C13, hachurada na Figura 4.1., como a responsável pela atividade do fármaco, outros atribuem esta função à cadeia lateral ligada a C2.

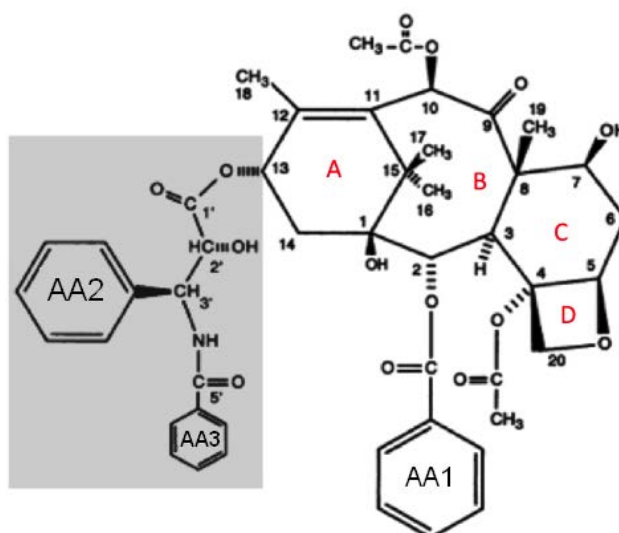


Figura 4.1. Estrutura da molécula de paclitaxel. A área em destaque mostra a cadeia lateral ligada ao carbon C13. Adaptado de Mastropaolo et al., 1995.

Devido à flexibilidade da molécula de PTX, tem sido relatadas diferentes informações a respeito da conformação e atividade biológica do fármaco, que dependem do meio de dispersão, ligantes e do grau de umidade do meio. Por exemplo, Mastropaolo et. al (1995) utilizaram ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de raios X em monocristais para estudar o PTX disperso em soluções de dioxano, água e xilenos. Duas estruturas moleculares distintas foram encontradas, sendo que as principais diferenças estão na cadeia lateral em C13. Porém, neste estudo particular, ambas as conformações moleculares possuíam arranjo estrutural monoclínico com um grupo espacial $P2_1$. Por outro lado, Harper et. al (2005) estudaram o PTX na forma de pó livre de solventes orgânicos, sendo encontrado sob grupo espacial $P2_12_12_1$. Portanto, é evidente que o PTX pode adquirir diferentes conformações e até mesmo sob diferentes arranjos cristalográficos, alterando simplesmente a sua vizinhança química. Neste sentido, o estudo da conformação deste fármaco quando o mesmo é encapsulado em um sistema complexo, tal como no bio-

NCP, é importante visto que as mudanças na molécula podem afetar sua atividade farmacológica. Além disso, a compreensão das interações entre o medicamento e o bio-NCP possibilitaria um melhor controle do processo de liberação no futuro.

Caracterização de fármacos encapsulados e limitações de técnicas tradicionais

O estudo de fármacos encapsulados é de fato desafiador, especialmente levando-se em conta um sistema de encapsulamento complexo como o bio-NCP. Devido à sua composição, na qual diferentes materiais estão presentes e que possivelmente interagem entre si, limitações são encontradas para o uso de técnicas de caracterização tradicional. Por exemplo, espectroscopia de infravermelho (FTIR) não possui grande poder de penetração no bio-NCP, cuja superfície é formada pelo polímero quitosana e o por cristais cerâmicos de apatita. Visto ainda que estes compostos interagem fortemente com a radiação infravermelha, a menos que o PTX esteja na superfície do bio-NCP, pouca informação pode ser obtida sobre este fármaco. Por sua vez, a espectroscopia de relaxação dielétrica não fornece informações sobre re-orientação dos grupos metil, que desempenham um papel importante na dinâmica do PTX e necessitam ser estudados para compreender sua relação com sua atividade. Além disso, a presença de nanopartículas magnéticas (NPMs) no compósito limita a aplicação da espectroscopia Raman, já que a amostra torna-se preta e não permite o espalhamento do feixe de laser. Ainda, devido à presença das NPMs, os estudos por ressonância magnética nuclear são também inviáveis, já que efeitos de despolarização seriam experimentados pela amostra. Outro fator agravante são as regras de seleção para as espectroscopias Raman e de infravermelho, que muitas vezes levam à perda de informação espectral relevante.

Considerando essas questões, o espalhamento inelástico de nêutrons (INS) é uma abordagem interessante, visto que nêutrons são partículas neutras, o que lhes garante alta penetração na matéria, possibilitando o estudo de fármacos encapsulados a despeito da composição do encapsulamento. Ainda, dada a relativa simplicidade da interação entre nêutrons e núcleos atômicos da amostra, não se observam regras de seleção. Além disso, devido à seção de choque especialmente alta para os átomos de hidrogênio em comparação com todos os outros elementos em experimentos de dinâmica molecular, os deslocamentos destes átomos dominam nos sinais dos modos de vibração observados, praticamente negligenciando os sinais referentes à presença das NPMs no material (TSAPATSARIS et al., 2013).

A interpretação de dados de INS, pode ser feita através da combinação de tais resultados experimentais com dados teóricos obtidos com cálculos de dinâmica molecular, que cobrem os mesmos domínios de tempo e espaço (de 0,1 fs a 10 ns, e 1 - 100Å) que os dos experimentos de INS. Especificamente, neste trabalho foram utilizados resultados obtidos pela teoria do funcional de densidade (DFT), fornecidos pelo Dr. Juergen Eckert – *University of South Florida*, EUA.

Em relação à quantificação do fármaco encapsulado no bio-NCP, as soluções usadas para a extração do fármaco foram analisadas num LCMS (cromatógrafo líquido de alto desempenho acoplado a um detector de massas), que não mostrou diferenças entre os resultados obtidos para o nanocompósito com e sem o PTX encapsulado, como mostra a Figura 4.2 abaixo. Nesse estudo, as amostras foram suspensas em acetonitrila por alguns dias visando a extração do fármaco, e posteriormente a separação do bio-NCP com a ajuda de um ímã para que o sobrenadante fosse então analisado.

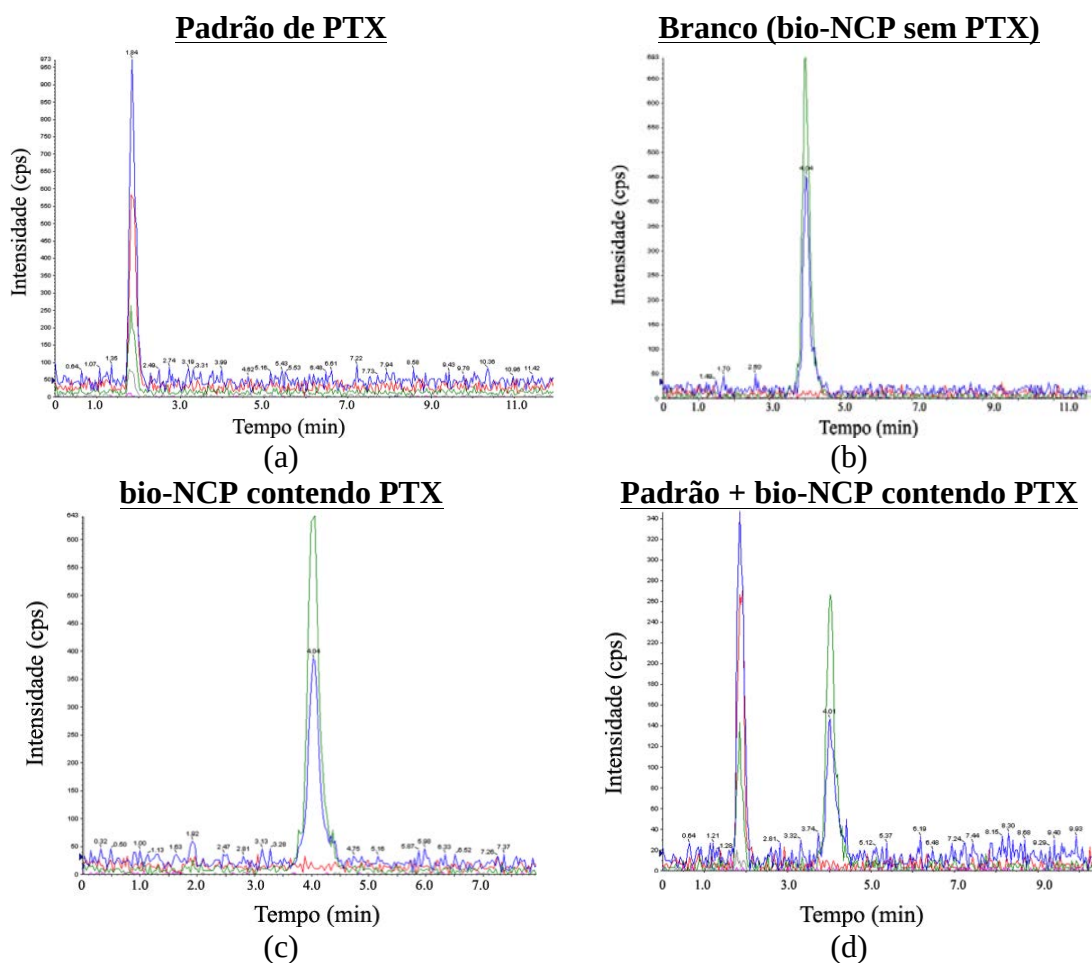


Figura 4.2. Cromatogramas obtidos com análise por HPLC (UFLC da Shimadzu, equipado com LC20AD, detector triplo quadrupolo da Applied BioSystem, mod. 3200 QTRAP e coluna C18) para quantificação do fármaco PTX contido no bio-NCP: (a) Amostras padrão com 4 concentrações diferentes de PTX; (b) sobrenadante após extração com acetonitrila do bio-NCP sem PTX; (c) sobrenadante após extração com acetonitrila do bio-NCP contendo PTX e (d) mistura do padrão de PTX e sobrenadante após extração com acetonitrila do bio-NCP contendo PTX.

Visto que o PTX não foi detectado no ensaio com HPLC, seja pela não liberação deste fármaco, seja por sua degradação, a utilização de outras técnicas que

nos possibilitassem comprovar sua presença no material se fez necessária. Uma técnica ainda pouco utilizada e inovadora para o estudo de compostos orgânicos encapsulados é a de Espectroscopia de raios X na Borda de Absorção (NEXAFS). Esta técnica, permite não somente a caracterização de metais como já citado no Capítulo 2, mas também a caracterização de grupos orgânicos, pois permite a utilização de raios X com energias próximas à camada K dos átomos de carbono (WATTS, THOMSEM e DASTOOR, 2012). Deste modo, tanto a estrutura da cápsula polimérica quanto do fármaco paclitaxel podem ser estudadas sem a interferências de sinais, por exemplo, com os das nanopartículas magnéticas presentes no interior do compósito, já que a energia utilizada neste caso é consideravelmente diferente daquela absorvida pelos metais.

Adicionalmente, as informações obtidas por NEXAFS podem ser então utilizadas para a construção de mapas composicionais do material com Microscopia de Transmissão de raios X (STXM). Nesta técnica, coleta-se imagens de transmissão utilizando-se raios X com energias nas quais os diferentes componentes da amostra apresentaram picos de absorção característico nos espectros de NEXAFS. As imagens são sobrepostas a fim de se construir um mapa de composição do material. Assim, foi possível uma análise visual não somente da presença, mas também da distribuição do fármaco ao longo do bio-NCP (WATTS e ADE, 2012).

Diante o exposto, este capítulo representa também o desenvolvimento de uma nova metodologia para a caracterização de fármacos encapsulados sob o ponto de vista da ciência dos materiais. Esta metodologia se baseia em técnicas e conceitos pouco utilizados sobretudo em pesquisas farmacêuticas, mas que se fizeram necessárias para este trabalho.

4.2. Parte experimental

Encapsulamento do PTX no bio-NCP

O método de dupla emulsão foi utilizado para encapsular o PTX no bio-NCP (LV et al., 2011). Todos os reagentes usados foram provenientes da Sigma-Aldrich. Primeiramente, 20 mg de quitosana foram dissolvidos em ácido acético diluído (4%). A esta solução, nanopartículas de ferrita de Mn e Zn na proporção mássica de 2:1 para quitosana e 0,25 mL de Tween 80 (tensoativo não-iônico) foram adicionados. A suspensão resultante foi agitada durante 30 min. Enquanto isso, uma quantidade suficiente para compor um nanocompósito com 8% de PTX foi dissolvida em 0,5 mL de diclorometano e adicionada à suspensão que foi agitada por 30 min adicionais. A suspensão resultante foi adicionada a uma solução orgânica de parafina/ácido oleico 16:1 (volume) e agitada durante 120min até a formação de uma emulsão. Após este período, 0,1 ml de glutaraldeído (25%) foi gotejada na emulsão e mantida sob agitação por 120 min em temperatura ambiente para promover a reticulação da quitosana. Posteriormente, a temperatura da emulsão foi elevada a 70°C e mantida nessa condição durante 12h. O material resultante foi lavado, tal como descrito no Capítulo 3, e secado a 60°C durante 12h. Para modificar a superfície de quitosana com apatita, foi utilizado o método de mimetização (MARTINS et al, 2014a) descrito também no capítulo anterior, sob as seguintes condições: razão molar Ca/P = 1,67, tempo de envelhecimento = 120 min, tempo mimetização = 60 min e quitosana/apatita = 1:1 (proporção em massa). Finalmente, a amostra foi separada com um ímã, lavada com água e secada a 60°C durante 72h. Daqui em diante, a amostra contendo o PTX encapsulado no bio-NCP será referida como bio-NCP +

PTX. Outra amostra, sem o PTX, também foi preparada seguindo os mesmos passos descritos acima e que será referido como bio-NCP.

Caracterização

Primeiramente, foi estudada a toxicidade dos materiais obtidos em células do tecido conjuntivo, os fibroblastos. Nestes ensaios, 10^4 células de fibroblastos da linhagem NIH/3T3 (*American Type Culture Collection*, ATCC® CRL-1658™) foram colocados em cada alvéolo (poço), numa placa de 96 alvéolos, para crescimento por 24h em meio de RPMI-1640 (da LGC) à 37°C em atmosfera de 5% em CO₂. Em seguida, os poços foram esgotados quanto ao meio e 10µg dos materiais nanoparticulados suspensos no mesmo meio de cultura foram colocados para promover o contato com as células, permanecendo por mais 24h. A suspensão sobrenadante foi descartada e 100 µL por alvéolo de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que está a 1 mg/mL, foram adicionados, deixando-se reagir por 3h. O sobrenadante foi descartado e 100µL de álcool absoluto foram adicionados, seguido de agitação por 10 min para solubilizar os cristais de formazana {(E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilformazana} formados. A densidade ótica foi determinada por leitor de microplaca Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) da Bio-Tek ELx800 (Software KC Junior) a 560 nm e os dados, processados com o *software* Prism para o tratamento estatístico. Utilizou como branco o poço com álcool. Os seguintes materiais foram submetidas a esta avaliação: NPMs, o bio-NCP e o bio-NCP + PTX. A análise da dissolução de componentes em nanopartículas não é uma tarefa fácil, portanto, é um teste fundamental. O teste está de acordo com o estabelecido pelo ISO 10993-5, com exceção da quantidade do material particulado

que foi a metade do estabelecido na norma, porém adotado para manter a mesma condição dos testes com células cancerígenas, apresentados no Capítulo 5.

Para a obtenção de um mapa composicional do sistema bio-NCP + PTX o PTX e bio-NCP, os materiais foram primeiramente analisados com Espectroscopia de raios X na Borda de Absorção (NEXAFS). Foram coletados espectros entre 250eV e 350eV, sendo estes valores próximos às energias de absorção na camada K do carbono. As amostras foram montadas em membranas de nitreto de silício, usando o mesmo processo descrito na seção 2.2, na linha de luz PoLlux no “*Swiss Light Source*” (SLS, PSI). Em seguida, com base nos dados de NEXAFS, os mapas composicionais foram montados usando-se a técnica de Microscopia de Transmissão de raios X (STXM). Para tanto, foram construídas imagens monitorando raios X de energias em que o PTX e o bio-NCP apresentaram alta absorção, com base nos espectros de NEXAFS. As energias selecionadas foram: 283eV, 286eV, 300eV e 320eV, para monitorar PTX, quitosana e átomos de carbono tanto do PTX quanto da quitosana, respectivamente, e 347eV para monitorar os cristais de apatita. Uma imagem também foi coletada com raios X de 275eV para servir de sinal de fundo (*background*). As imagens foram sobrepostas e o mapa composicional foi construído usando o software Axis 2000.

A fim de se investigar a liberação do fármaco do nanocompósito, bem como obter as primeiras informações acerca da dinâmica da molécula após sua liberação, 20 mg de bio-NCP + PTX foram dispersos em água por 7 dias sendo posteriormente secos, de modo que o fármaco pudesse ser liberado e depositado na superfície do material. O material foi analisado mediante FTIR, usando um espectrômetro Nicolet, Nexus 670, e os picos foram interpretados com auxílio de cálculos feitos por teoria do funcional de densidade (DFT) para a molécula de PTX livre. Nestes cálculos

considerou-se os modos de vibração do PTX como sendo movimentos harmônicos. Estes cálculos foram realizados como colaboração pelo Dr. Juergen Eckert - University of South Florida, EUA. Foram também analisados com FTIR o PTX, bio-NCP + PTX “original”, ou seja, não submetido à dispersão em água para liberação, e bio-NCP. Nestes casos, as análises foram feitas em temperatura ambiente usando-se um espectrômetro Bruker munido de acessório de reflectância total atenuada (ATR) e as amostras foram analisadas entre 400 e 4000 cm^{-1} . Estas análises possibilitaram ainda o estudo da influência da presença do fármaco na dinâmica vibracional do bio-NCP, visto que o polímero quitosana e os cristais de apatita são aqueles que mais contribuem para o sinal gerado nesta região do espectro.

Em seguida, estudou-se a influência do bio-NCP na dinâmica molecular do PTX. Para tanto, foi necessária a utilização de uma técnica de alta penetração na matéria para a interação com o fármaco encapsulado. Assim, foram coletados dados de espalhamento inelástico de nêutrons (INS) usando o espectrômetro FDS no “*Los Alamos Neutron Science Institute*” (EUA). Neste caso, PTX, bio-NCP e bio-NCP + PTX foram investigados a 10K. Para auxiliar na análise destes dados, foram também utilizados os resultados dos cálculos de DFT.

4.3. Resultados e discussão

Primeiramente, foram realizados testes de toxicidade em fibroblastos com as nanopartículas magnéticas (NPMs) não encapsuladas, bio-NCP e bio-NCP + PTX, cujos resultados são apresentados na Figura 4.3. Este teste baseia-se na avaliação da atividade mitocondrial devido à capacidade da enzima succinato desidrogenase de reduzir o MTT a cristais de formazana em mitocôndrias de uma célula viável.

Assume-se assim que há uma relação entre a atividade mitocondrial e a quantidade de células viáveis e a toxicidade pode ser expressa comparando-se com o controle, ou seja, células não tratadas com os materiais. Como representado na Figura 4.3, não existem diferenças significativas entre as densidades ópticas da formazana produzidas pelas células que estiveram em contato com as amostras em questão, mesmo com aquela contendo o PTX. Estes resultados indicam que as nanopartículas de ferrita (NPMs), bio-NCP e bio-NCP + PTX não apresentam citotoxicidade. Este fato não garante que o material não dissolva, nem que as propriedades magnéticas são preservadas, mas pelo menos não representa ameaças de toxicidade. Mais importante é que tais resultados sugerem que ou a concentração de PTX no interior do nanocompósito está abaixo daquela capaz de induzir toxicidade aos fibroblastos, ou que as moléculas do fármaco estão presas às cadeias poliméricas e não são liberadas sob as condições experimentais utilizadas.

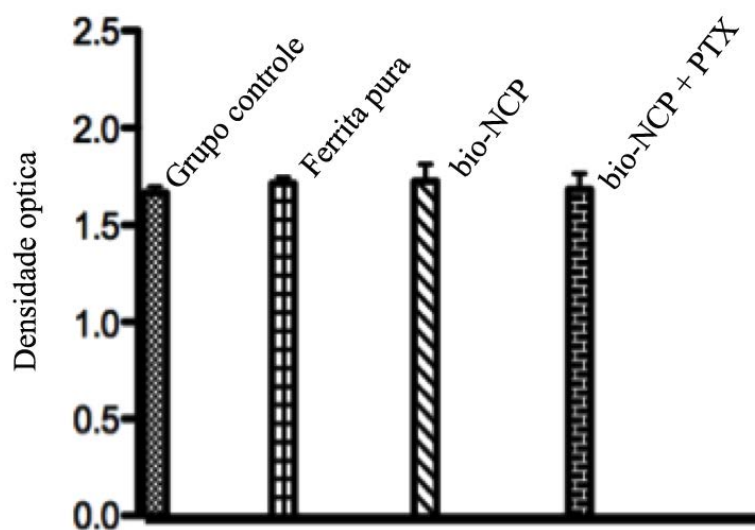


Figura 4.3. Teste de viabilidade celular de fibroblastos após 24h em contato com diferentes materiais. Não foram observadas diferenças significativas.

Diante de tal resultado, consideramos necessária uma compreensão adicional acerca da distribuição do fármaco no bio-NCP, principalmente levando-se em conta a composição complexa do nanocompósito. Foram então realizados experimentos com as técnicas de NEXAFS e STXM visando a obtenção de uma mapa composicional do sistema bio-NCP + PTX que permitiria uma visualização, de fato, da disposição do fármaco no bio-NCP. Os espectros de NEXAFS para o PTX e bio-NCP são apresentados na Figura 4.4(a). No espectro do PTX, dada a contribuição (convolução) do grande número de excitações da molécula, poucos picos podem ser realmente identificados. No entanto, um pico característico deste fármaco pode ser detectado em 283,3 eV, sendo este relacionado às ligações π^* oriundas de anéis aromáticos. No espectro do bio-NCP, o pico em 286eV pode estar relacionado à transições $C_{1s} \rightarrow \sigma^*$ de ligações C-OH, enquanto a banda larga centrada em 291eV pode ser atribuída às excitações de C, H e N presentes na quitosana reticulada (STÖHR, 2013). Existe ainda um último pico no espectro do bio-NCP em 347eV, sendo este valor próximo a da absorção pela camada L do Ca. Este sinal pode ser usado portanto para confirmar a adsorção de cálcio durante o envelhecimento, que antes fora feito de forma indireta por FTIR (usando o deslocamento da banda de -O-H e correlacionando com a intensidade da banda do grupo fosfato, que aumenta proporcionalmente à quantidade de cálcio adsorvido). Associado aos resultados do FTIR, que confirma a presença de fosfatos, o sinal de cálcio observado pelo NEXAFS confirma a presença da apatita na superfície do compósito (BENZEARA et al., 2004).

Através dos espectros de NEXAFS foram obtidas as informações necessárias para a construção do mapa composicional do bio-NCP + PTX com a técnica de STXM. Foram coletadas imagens de transmissão deste sistema com raios X nas energias aonde tais espectros indicam altas absorções tanto do bio-NCP quanto do

PTX, ou seja, com os sinais com as seguintes energias: 275eV, 283eV, 286eV, 300eV, 320eV e 347eV. A primeira energia é usada simplesmente como *background*, uma vez que não são detectados picos nesta região em nenhuma das amostras, enquanto a imagem com 283eV foi usada como uma impressão digital do PTX. As imagens com 286eV e 347eV foram usadas visando a detecção do bio-NCP e as imagens com 300eV, e 320eV foram tomadas para detectar átomos de carbono tanto do PTX quanto do bio-NCP. Um exemplo representativo dos mapas composicionais obtidos é mostrado na Figura 4.4(b). O PTX é representado pelos pontos amarelos enquanto o bio-NCP é denotado pela cor vermelha. O *background* é mostrado em azul, bem como as NPMs, que não são detectadas na faixa de energia utilizada neste experimento. Os pontos esverdeados indicam regiões com baixas concentrações de PTX, sendo uma mistura entre o amarelo e azul. Os mapas mostram que o fármaco está distribuído nas redes poliméricas ao passo que as NPMs formam o núcleo do nanocompósito. De fato, a distribuição do fármaco observada nos mapas corrobora o aprisionamento do fármaco sugerido anteriormente com base nos testes de toxicidade.

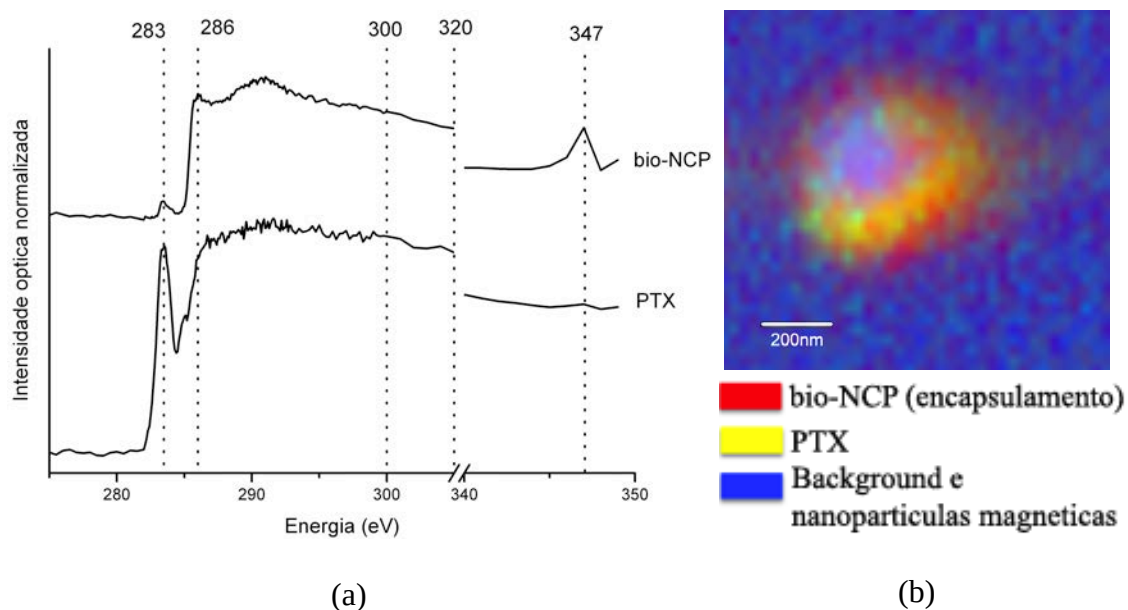


Figura 4.4. Espectros de NEXAFS para o PTX e bio-NCP (a) com o PTX apresentando seu pico característico em 283eV e o bio-NCP com transições características em 286eV, 291eV e 347eV. Em (b) um mapa composicional do bio-NCP + PTX é apresentado. O mapa foi obtido por STXM após a sobreposição de imagens coletadas usando-se raios X com energias iguais a: 275eV, 283eV, 286eV, 300eV, 320eV e 347eV.

Neste ponto, a possibilidade de liberar o PTX após períodos mais longos em meio aquoso foi investigada, assim como as primeiras informações acerca da dinâmica da molécula liberada foram também obtidas. Para tanto, inicialmente, o bio-NCP + PTX foi disperso em água durante 7 dias e então a amostra foi seca e analisada com FTIR, cujo resultado está representado na Figura 4.5. Na figura são também apresentados resultados para o PTX puro, o bio-NCP + PTX original e resultados teóricos obtidos com cálculos de DFT. É possível notar o aparecimento de dois picos adicionais, em comparação com a amostra bio-NCP + PTX original. O primeiro pico, centrado em 1456 cm^{-1} pode ser atribuído as vibrações dos grupos OH do próprio encapsulamento, que tendem a ser mais evidentes depois do compósito ser disperso

em água. O segundo pico compreende uma região entre 1503 e 1555 cm^{-1} , na qual, de acordo com os cálculos DFT, podem ser atribuídos ao PTX, a saber: existem três picos para PTX, sendo que o primeiro pico em 1503 cm^{-1} pode ser atribuído principalmente por rotações de grupos metil, o segundo em 1525 cm^{-1} formado por movimentos do anel aromático AA2 (ver Fig. 4.1) e o último pico em 1549 cm^{-1} formado principalmente por movimentos em AA3. Mesmo que as duas primeiras bandas possam ser atribuídas ao bio-NCP, não há qualquer contribuição do encapsulamento na região da segunda banda, indicando assim, que o fármaco foi provavelmente liberado e depositado sobre a superfície do compósito após a secagem da amostra.

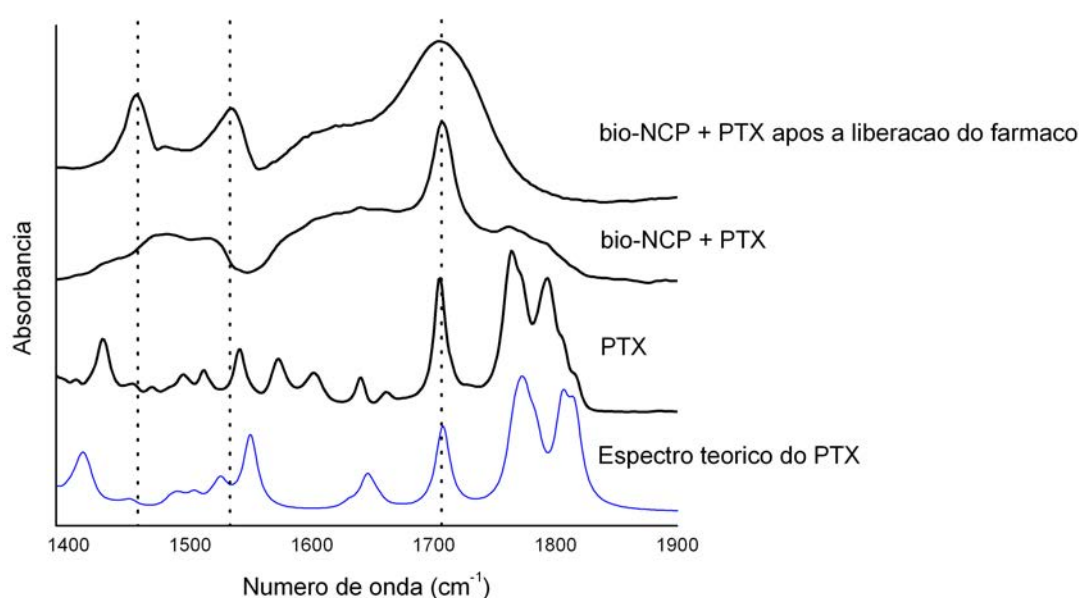


Figura 4.5. Espectros de FTIR para o PTX (teórico e experimental), bio-NCP+PTX e o bio-NCP + PTX após ser disperso em água por 7 dias para a aliberação do fármaco. Os espectros para o PTX e bio-NCP+PTX foram coletados em instrumento com maior resolução.

De fato, os experimentos demonstram que há a liberação do fármaco, mas fica claro também que este processo parece requerer um longo tempo. Assim, foram estudadas as interações entre o PTX e o bio-NCP com o objetivo de que sua compreensão possa, no futuro, permitir maior controle do processo de liberação. Primeiramente, foram investigados o efeito da presença do PTX no bio-NCP comparando-se os espectros de FTIR do bio-NCP e bio-NCP + PTX, como mostra a Figura 4.6. Quando da presença do fármaco (curva em vermelho) o espectro apresenta bandas referentes à vibrações dos grupos OH de álcoois primários (1480 cm^{-1}) e amina, NH (1618 cm^{-1}). Note também que o mesmo espectro apresenta ainda uma redução na banda de vibração de ligações C-N (1706 cm^{-1}), que indicam a presença de bases de Schiff formadas no processo de reticulação do polímero. Apresenta também uma banda de estiramento de ligações C=O (1761 cm^{-1}) de ésteres, oriunda do PTX. A observação destas bandas no bio-NCP + PTX mostra que a reação de reticulação no polímero, realizada como parte da síntese do bio-NCP, não ocorre com a mesma intensidade na presença do PTX, sugerindo que existe uma competição entre o fármaco e o agente reticulante glutaraldeído pelos grupos OH e NH da quitosana.

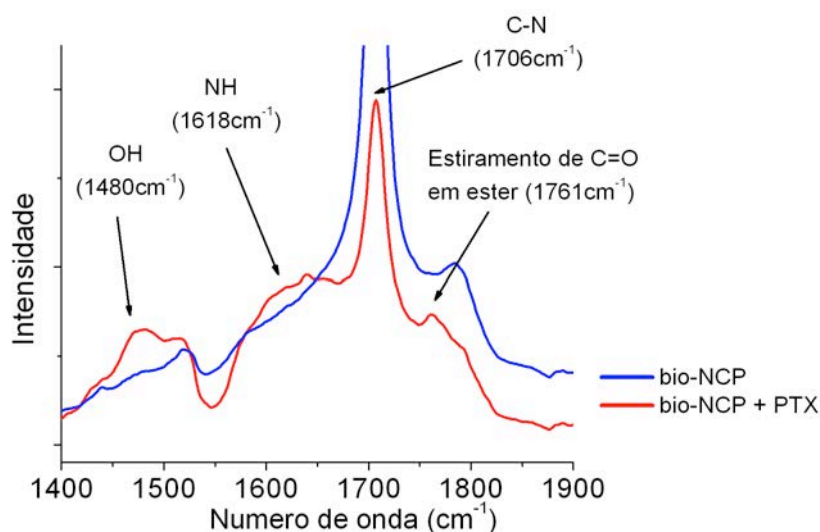


Figura 4.6. Comparação entre os espectros de FTIR do bio-NCP e bio-NCP + PTX

Além de mostrar como a presença do fármaco pode influenciar na dinâmica molecular do polímero, a compreensão da dinâmica do fármaco encapsulado é também um importante passo, principalmente se levar em conta os estudos adicionais necessários sobre a dinâmica do fármaco liberado. Deste modo, conduzimos um estudo baseado na combinação do espalhamento inelástico de nêutrons (INS) e DFT.

Os espectros de INS em baixas e altas frequências são apresentados na Figura 4.7 (a e b, respectivamente). Os dados referentes ao PTX são apresentados em preto ao passo que em vermelho é mostrada a diferença entre dados coletados para bio-NCP + PTX e bio-NCP. Os resultados teóricos obtidos por DFT são também mostrados na mesma figura em azul para as respectivas faixas de energia. Os resultados teóricos também estão apresentados na Tabela 4.1, com identificação dos grupos moleculares do fármaco que contribuem para as vibrações em função da frequência. Vale ressaltar que os cálculos de DFT são realizados levando-se em conta somente os movimentos harmônicos na molécula do PTX, porém sabe-se que as próprias amostras tendem a apresentar modos de vibração não harmônicos. Portanto, é de se esperar que as frequências calculadas apresentem valores superiores aos experimentais, exigindo certa cautela na comparação entre os dados teórico e experimental.

Pode-se observar na Figura 4.7 (a) que os modos em baixas frequências (inferiores a 80 cm^{-1}) praticamente desaparecem quando o PTX é encapsulado no bio-NCP. Comparando com os dados mostrados na Tabela 4.1 e os resultados da Figura 4.1, nota-se que os grupos que mais contribuem para as vibrações em frequências inferiores a 80 cm^{-1} são os grupos fenil (anéis aromáticos - AA), grupos acetil 1 e 2 ligados a C10 e C4, respectivamente, e o anel oxetano. Algumas vibrações que ocorrem em frequências entre 80 cm^{-1} e 150 cm^{-1} são preservadas no PTX

encapsulado. Embora a estrutura destas bandas tenha mudado sensivelmente, é possível notar que a intensidade destas vibrações é menor em relação ao do PTX puro, bem como um deslocamento para energias mais elevadas, especialmente para as bandas centradas em torno de 112 cm^{-1} e 137 cm^{-1} . Estas vibrações remanescentes no fármaco encapsulado são provavelmente oriundas da própria estrutura terpênica, principalmente dos átomos C6, C7 e C14. Nesta faixa de frequência são também observadas as vibrações da rede cristalina em moléculas orgânicas sugerindo portanto que a estrutura rígida bem como a organização cristalina de curto alcance são mantidas, mesmo que o deslocamento nas bandas indique que as moléculas encapsuladas estejam de alguma forma dobradas. Em tempo, os grupamentos metil também podem desempenhar um papel nestes modos de acordo com os cálculos de DFT, especialmente entre 80 cm^{-1} e 100 cm^{-1} . No entanto, a perda aparente de intensidade entre 150 cm^{-1} e 225 cm^{-1} , onde a maior contribuição vem de grupos metil e acetil, indicam que estes são altamente reprimidos.

Uma vibração remanescente no PTX encapsulado foi também detectada em torno de 270 cm^{-1} , muito provavelmente originada por vibrações em C14. Finalmente, os modos acima 300 cm^{-1} são extremamente atenuados no fármaco encapsulado. As vibrações observadas nesta região são atribuídos aos grupos metil, acetil e fenil, cuja supressão das vibrações já foram discutidas, como também ao grupo OH ligado a C7.

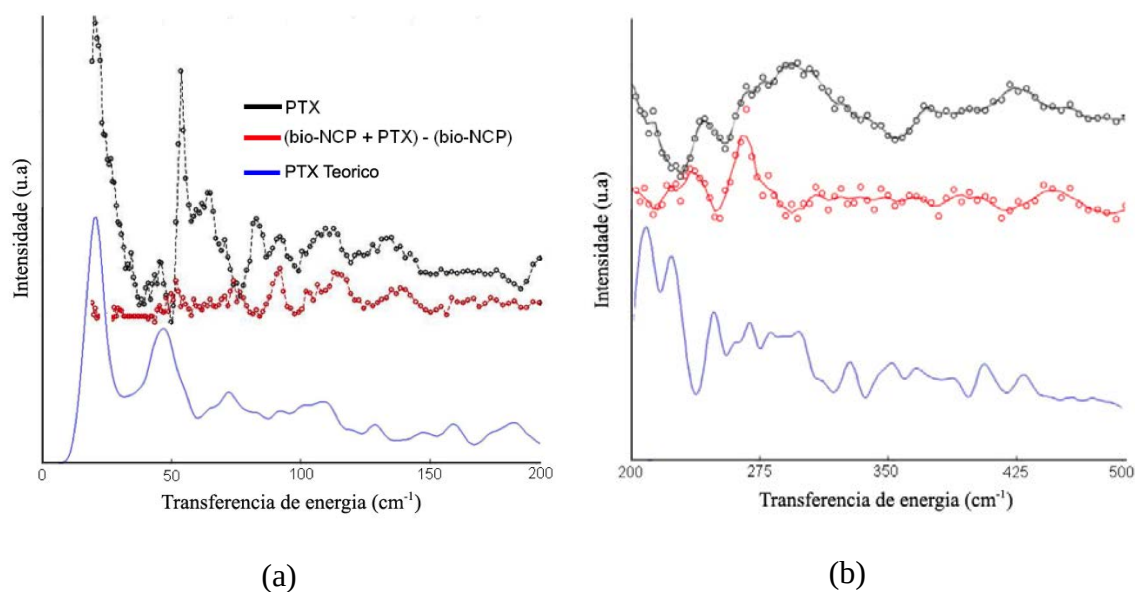


Figura 4.7. Espectros de INS coletados no espectrômetro FDS para baixas (a) e altas frequências (b). A curva em preto mostra os dados referentes ao PTX enquanto a curva em vermelho mostra a diferença entre o bio-NCP + PTX e bio-NCP, mostrando assim somente a contribuição do fármaco encapsulado. Os espectros obtidos teoricamente por DFT para a molécula livre também são mostrados em azul para os respectivos dados experimentais.

Portanto, os dados de INS nos levam a concluir que o fármaco encapsulado apresenta as vibrações reprimidas especialmente nos grupos metil, acetil e fenil, enquanto as vibrações moleculares do anel terpênico são preservadas, mesmo que existam indicativos de que a molécula esteja de alguma forma dobrada. Isso poderia corresponder a uma forma inativa do fármaco, uma vez que os grupos que mais conferem atividade biológica estão confinados para PTX encapsulado.

Tabela 4.1. Contribuições mais relevantes para a molécula de PTX nas vibrações do espectro de INS conforme calculado por DFT. A sigla AA denota os anéis aromáticos.

Frequência (cm⁻¹)	Contribuições principais
6,52	AA1, AA2, AA3
18,70	Cadeia lateral em C13 e AA1
29,24	AA1 e anel oxetano
45,39	AA1 e anel oxetano
52,89	AA2, AA3 e Acetil 1
57,27	Acetil 1
67,75	Acetil 1 e AA1
73,79	Acetil 1 e AA1
74,50	Acetil 1, Acetil 2, anel oxetano
85,48	Anel oxetano, grupos metil em C16, C17 e C19 e C6
95,60	Acetil 2, grupos metil em C16, C17, C18 e C19, AA1 e C6
109,5	C14, AA3, Acetil 2
130,7	C6, C7, anel oxetano e metil em C17
140,4	Cadeia lateral em C13 e grupos metil em C16 e C17
184,5	Grupos metil em C17 e C18, AA3, Acetil 2 e C14
205,3	C14 e grupos metil em C17 e C18
211,6	Grupos metil em C16, C17 e C19 e Acetil 1
221,6	Grupos metil em C16, C17 e C19 e C14
225,8	Metil em C19 e anel oxetano
253,5	Cadeia lateral em C13 e metil em C18
271,0	C16, C17

273,4	Grupos metil em C16 e C19 e Acetil 2
302,2	AA1, Acetil 2 e grupos metil em C18 e C19
335,0	Metil em C16, OH ligado a C7 e cadeia lateral em C13
387,5	OH ligado a C7 e cadeia lateral em C13
391,3	OH ligado a C7 e anel oxetano
411,2	OH ligado a C7, anel oxetano e grupos metil em C18 e C19

4.4. Considerações finais

Neste capítulo são mostrados os resultados referentes ao encapsulamento do PTX no bio-NCP. As caracterizações foram feitas sob o ponto de vista de ciências de materiais, visando contornar dificuldades encontradas quando da caracterização de fármacos encapsulados com técnicas tradicionais. Para tanto, foram utilizadas as seguintes técnicas de estado sólido: FTIR; NEXAFS, STXM e INS.

Inicialmente, demonstrou-se a não toxicidade dos materiais para fibroblastos, sejam eles nanopartículas magnéticas, bio-NCP ou bio-NCP + PTX. Em seguida, os mapas composicionais obtidos com a técnica de STXM mostraram que o fármaco encapsulado está distribuído ao longo da rede polimérica de quitosana no compósito. De fato, foi possível observar que o PTX e o polímero interagem especialmente através dos grupos NH e OH da quitosana, o que pode reduzir ou retardar o processo de reticulação polimérica.

A possibilidade de liberação do fármaco foi avaliada após dispersar o bio-NCP + PTX em água por 7 dias. Com este experimento, foi possível acessar as primeiras informações acerca da dinâmica molecular do fármaco liberado. Mesmo que sejam necessários estudos adicionais neste sentido, os resultados indicam que, mesmo com o

forte confinamento da molécula no interior do bio-NCP, esta é capaz de recuperar movimentos de partes de sua estrutura que podem ser determinantes para a atividade biológica.

Quanto ao confinamento em si, foi realizado um estudo combinando resultados experimentais obtidos por INS e dados teóricos obtidos com DFT, que permitiu deduzir que os grupos fenil, acetil e metil do PTX são as porções moleculares mais fortemente confinadas pelo encapsulamento. Estes resultados serão base para estudos futuros sobre a dinâmica molecular do fármaco liberada e também para que torne possível ter controle sobre os processos de liberação e retenção do fármaco.

5. Ensaaios *in vitro*

5.1. Considerações iniciais

Neste capítulo são apresentados resultados referentes aos experimentos de determinação de potencial zeta dos materiais preparados bem como dos testes realizados com culturas de células. Os testes biológicos foram feitos especialmente com base na análise morfológica das células monocíticas e do câncer da mama (MCF-7) e as reações nela provocadas quando colocadas em contato com os diferentes materiais nanoparticulados. Para fins de comparação, e muitas vezes para elucidar possíveis dúvidas sobre a origem de alguns dos efeitos observados nestes ensaios, foram também preparadas e testadas outras amostras como, nanopartículas magnéticas (NPMs) de magnetita (Fe_3O_4) e seus bio-nanocompósitos nos quais o encapsulamento das nanopartículas magnéticas com o polímero quitosana se deu também pelo método de “*spray*” seguido de “coacervação” ou coagulação. Tendo em vista a variedade de bio-nanocompósitos testados, que foram preparados com distintas

NPMs em seu interior, método e a presença ou não dos nanocristais de apatita na superfície, neste capítulo, estes detalhes serão explicitados também na nomenclatura dos materiais. Por exemplo, um bio-nanocompósito contendo NPMs de ferrita e preparado pelo método de micelas reversas e modificado com apatita será aqui denominado como bio-NCP/ferrita/micela/apatita.

Este capítulo representa também o desenvolvimento de uma nova metodologia para a avaliação da interação das células de defesa (monócitos) com os materiais desenvolvidos, bem como desses materiais com as células do câncer de mama.

O potencial zeta e sua relação com propriedades biológicas de materiais

Em termos gerais, o potencial zeta de um material descreve o seu potencial eletrocinético ou, no caso de moléculas ou nanopartículas, sua carga superficial. Particularmente, este parâmetro é de grande relevância no estudo de interações entre nanopartículas e células e/ou tecidos, visto que os últimos também possuem uma carga inerente e característica. Deste modo, a atração ou repulsão eletrostática pode ser fator preponderante na descrição de eventos que envolvam a reação entre células e nanopartículas. Entretanto, vale ressaltar que o potencial zeta não deve ser o único fator considerado para a descrição das reações que ocorrem no contato das células com um material, visto que células e tecidos são formados por uma estrutura amplamente complexa na qual um vasto número de mecanismos bioquímicos de interação é desencadeado.

Monócitos e biomateriais

Os monócitos são células que integram o sistema imunológico, ou seja, tem como principal função a defesa do organismo contra agentes externos. Em relação à aplicação específica de materiais na medicina, um biomaterial pode ser definido como “um material capaz de interagir com o tecido ao seu redor sem que induza uma resposta adversa ao hospedeiro, ou seja, um processo inflamatório” (PALAPURA et al., 1992). Logo, a resposta do sistema imunológico a um dado material é fator preponderante para sua definição como material biocompatível. Em alguns casos, a resposta imunológica pode ser benéfica à aplicação do biomaterial, por exemplo para implantes de prótese. Nestes casos o processo inflamatório moderado leva à degradação de componentes poliméricos do material que são gradativamente substituídos pelo tecido vivo (ANDERSON, 1988). Contudo, em se tratando de nanomateriais carreadores de fármacos, como o bio-NCP, a atividade do sistema imunológico pode levar à captação destes materiais pelos monócitos, reduzindo seu tempo de circulação no organismo e por vezes impedindo que ele alcance seu tecido alvo para a entrega do fármaco antitumoral.

Dentre outros fatores como o tamanho, a captação de nanopartículas pelos monócitos pode se dar pela sua carga superficial, que pode ser avaliada através do potencial zeta. Tendencialmente, menores partículas são menos captadas pelas células do sistema imunológico, mas podem ser excretadas rapidamente via renal além de reduzir significativamente o seu acúmulo passivo no tecido tumoral (GUPTA E GUPTA, 2005). Portanto, deve-se encontrar um tamanho ótimo para carreadores de fármacos, de modo que a captação pelos monócitos seja minimizada e sua deposição na região tumoral seja significativa.

Levando-se em conta não somente a carga superficial e tamanho das partículas, mas também a composição do bio-NCP, sabe-se que a quitosana pode estimular respostas imunológicas dependendo de seu grau de desacetilação, ou simplesmente do grau de substituição de seus grupamentos acetil por hidroxilas (PELUSO et al., 1994). Quanto à apatita, sabe-se também que além de sua cristalinidade, a proporção entre hidroxiapatita e outros fosfatos de cálcio no material é preponderante para a resposta pelos monócitos (HARADA et al., 1996).

Testes com células cancerígenas da mama (MCF-7)

A linhagem de células cancerígenas da mama testada neste trabalho foi a linhagem MCF-7. Esta linhagem foi observada pela primeira vez nos anos 1970 e é vastamente utilizadas em ensaios *in vitro* de tumores mamários. Embora não seja a linhagem mais agressiva do câncer de mama, podem apresentar crescimento confluyente (sobreposição de células) se estimuladas por fatores bioquímicos ou na presença de meio ou materiais que a estimulem.

5.2. Parte experimental

Síntese das nanopartículas magnéticas de ferrita de Mn e Zn e magnetita

As nanopartículas de ferrita de Mn e Zn foram preparadas de acordo com procedimento descrito no Capítulo 2. As nanopartículas de magnetita foram também obtidas pelo método de co-precipitação, como descrito a seguir. Em um procedimento padrão 3 g de FeCl_3 (Aldrich, 99%) foram dissolvidos juntamente com 3 g de FeCl_2 tetrahidratado (Aldrich, 99%) em 55,5 mL de água (18,2 M Ω cm). A solução foi

aquecida em banho maria borbulhando-se gás N₂ até que fosse atingida a temperatura de 80 °C. Em seguida, foram gotejados 25 mL de hidróxido de amônio à solução de ferro obtendo-se prontamente uma suspensão preta de nanopartículas que foi agitada por 30 min adicionais a 80 °C. As partículas foram separadas com um ímã e lavadas até que o pH do sobrenadante atingisse neutralidade.

Síntese dos bio-NCP pelos métodos de micelas reversas e *spray* e coacervação.

O encapsulamento das nanopartículas magnéticas pelo método de micelas reversas foi feito tal qual descrito no Capítulo 3. Para o revestimento com a técnica de *spray* e coacervação, cerca de 40 mg de nanopartículas foram adicionadas a 50 mL de uma solução de ácido acético (4%) contendo 10mg de quitosana dissolvida. A suspensão foi homogeneizada por 30 min e colocada em um reservatório acoplado a um *spray* atomizador. A aspersão da suspensão, com ar comprimido, foi feita sobre uma solução coagulante de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ (coacervação), posicionada a cerca de 30cm do atomizador, sob agitação. O material coagulado permaneceu na solução coagulante por 12h sob agitação lenta, quando foram adicionados 0,1 mL de uma solução de glutaraldeído a 25% e a agitação foi conduzida por mais 2 h. O material resultante foi separado com auxílio de um ímã e lavado até que atingisse pH neutro.

Potencial zeta

A determinação do potencial zeta (ζ) das nanopartículas foi feita mediante medidas de mobilidade eletroforética em equipamentos Zetasizer Nano ZS da Malvern (DQ-UFMG e IQSC-USP, São Carlos-SP). Os materiais foram suspensos em

solução de KNO_3 a 1×10^{-3} mol/L em quantidade suficiente para (q.s.p.) produzir uma suspensão de concentração menor que 0,2mg/L. O KNO_3 na concentração citada proporciona uma espessura da dupla camada elétrica de 92nm e a mobilidade eletroforética foi medida no pH próximo ao do sangue, utilizando para o seu ajuste KOH ou HNO_3 diluídos.

Os seguintes materiais foram analisados:

- Ferrita
- bio-NCP/ferrita/micela
- bio-NCP/ferrita/micela/apatita
- bio-NCP/ferrita/micela/apatita + PTX
- bio-NCP/ferrita/*spray*
- bio-NCP/ferrita/*spray*/apatita
- Magnetita
- bio-NCP/magnetita/micela
- bio-NCP/magnetita/micela/apatita
- bio-NCP/magnetita/*spray*
- bio-NCP/magnetita/*spray*/apatita

Testes biológicos

Monócitos

Monócitos humanos foram isolados de 40mL de sangue periférico obtido de doadores sadios coletados com heparina. A amostra de sangue foi diluída em 40mL de tampão fosfato salino (PBS) e células mononucleares foram obtidas através de

centrifugação por 30 min a 900 x g em um gradiente de solução Ficoll-Isopaque (d=1,077 g/mL). A suspensão de células mononucleares foi lavada três vezes com meio de cultura RPMI 1640 (LGC) suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal (SBF) e centrifugada em um gradiente Percoll 51% para que os monócitos fossem separados dos leucócitos.

A suspensão de monócitos foi lavada três vezes com meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), 1% de piruvato de sódio, 25 mM de tampão HEPES, 2 mM de L-glutamina, e 1% de solução anti-biótica/anti-mitótica (RPMI completo). As células foram suspensas em meio RPMI completo na concentração de 2×10^5 células/mL e 1 mL dessa suspensão celular foi adicionado aos poços (alvéolos) de uma placas de 24 orifícios contendo, no fundo de cada poço, lamínulas ($\varnothing=13\text{mm}$) revestidas com poli-L-lisina, todos esterilizados. O conjunto foi incubado a 37°C por 2h em atmosfera de 5% em CO₂ para promover a aderência das células e em seguida suplementado com 2 mL do meio completo e mantidos a 37°C por 24h em atmosfera de 5% em CO₂ para o crescimento celular.

Após esse tempo, células não aderentes foram removidas por lavagem das lamínulas com meio de cultura completo e 50µg de cada material nanoparticulado foram adicionados ao meios de cultura (suspensão em meio de cultura). Após 2h de contato, as lamínulas foram lavadas com PBS a 25°C, de modo que células mortas e nanopartículas não internalizadas ou não aderidas às células fossem retiradas, e fixados em solução de glutaraldeído a 2,5%.

Células MCF-7 (câncer de mama)

Para avaliar a interação dos compostos com células tumorais, as células MCF-7, derivadas de câncer mamário humano, foram cultivadas em garrafas contendo meio completo. No dia do ensaio, a monocamada de células tumorais foi descolada por tratamento com tripsina 0,05%. Após a lavagem e ressuspensão em meio completo, as células aderidas às lamínulas foram colocadas em contato com os diferentes materiais seguindo-se o mesmo procedimento descrito para os monócitos. Após 2h de contato, as lamínulas foram lavadas com PBS a 25°C, de modo que células mortas e nanopartículas não internalizadas ou não aderidas às células fossem retiradas, e fixados em solução de glutaraldeído a 2,5%.

Estudo da internalização e aderência das nanopartículas

Após o contato com os nanomateriais, posterior lavagem com PBS e fixação com solução de glutaraldeído, o processamento das células em lamínula consistiu inicialmente da desidratação em soluções de concentração crescente de etanol [7,5% (2x10min), 15% (2x10min), 30% (2x10min), 50% (2x10min), 70% (3x15min), 90% (2x15min) e 100% (2x10min)] e secagem em condições acima do ponto crítico (secagem supercrítica) em atmosfera de CO₂. As lamínulas foram então metalizadas e analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (num equipamento da FEI, modelo Quanta 200) e Espectroscopia de raios X com energia dispersiva (EDX) (Oxford Inca 250P20). A análise consistiu da detecção de ferro internalizado ou na superfície das células, via mapeamento deste elemento com EDX.

Vale aqui ressaltar que nem todas as partículas aderidas ou internalizadas às células são detectadas por EDX. Para que se tenha uma ideia acerca dos limites de detecção nestes experimentos, foi preparada uma amostra contendo apenas partículas de magnetita, porém, em quantidade suficiente para a formação de grandes aglomerados. A Figura 5.1 mostra micrografias de varredura desta amostra tal qual obtida (a) e com a marcação da presença de Fe feita por EDX, marcada em verde (b). É possível notar que a presença deste metal pode somente ser detectada no grande aglomerado, mas não nas pequenas partículas dispersas que estão ao redor (que possivelmente se tratam de pequenos aglomerados). Portanto, cabe enfatizar aqui que a eventual não detecção de Fe nas células não significa necessariamente a ausência de nanopartículas, enquanto que a detecção do metal indica que grandes quantidades de nanopartículas foram assimiladas.

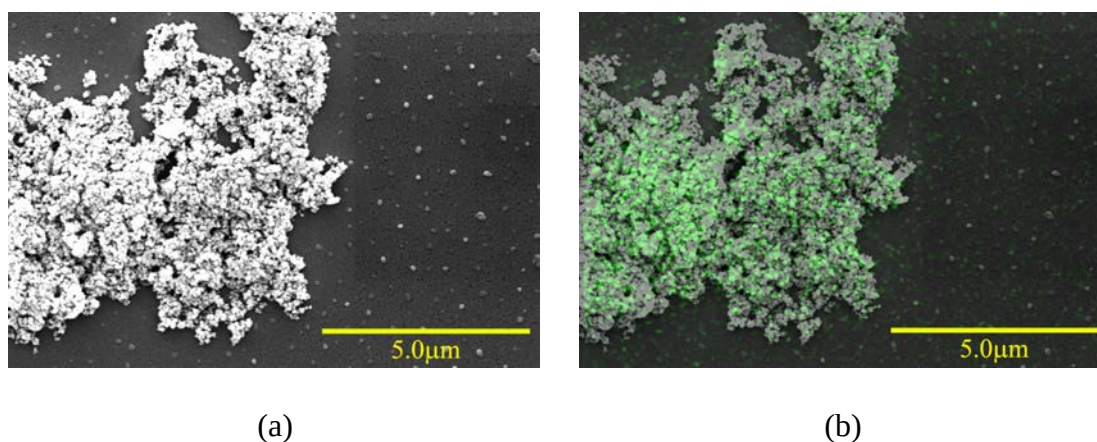


Figura 5.1. Micrografias de varredura de amostra contendo apenas partículas de magnetita em quantidade suficiente para a formação de grandes aglomerados. Em (a) a imagem é mostrada tal qual obtida e em (b) a mesma imagem com a marcação da presença de Fe feita por EDX, em verde. A imagem foi obtida com aumento de 20000x.

5.3. Resultados e discussão

Na Tabela 5.1 são mostrados os valores de potencial zeta, obtidos com medidas de mobilidade eletroforética em pH 7,4 para os diversos materiais estudados. Nota-se que os valores encontrados caracterizam que as cargas na superfície dos materiais no pH do sangue são negativas, estando de acordo com resultados encontrados na literatura tanto para as nanopartículas magnéticas (ZHANG et al., 2008) quanto para derivados de quitosana (ANITHA et al., 2009).

Comparando os valores encontrados, alguns aspectos chamam a atenção. O primeiro deles é a diferença entre os valores encontrados para a ferrita e a magnetita sem revestimento, sendo de -32,0mV e -15,5mV respectivamente. Chama-se também a atenção para os valores mais baixos encontrados para os materiais preparados pelo método das micelas reversas, sendo que a mimetização, ou presença da apatita, torna os materiais ainda mais negativos. Finalmente, é interessante comparar os valores obtidos para o material contendo o fármaco anti-tumoral, bio-NCP/ferrita/micela/apatita + PTX, e do nanocompósito preparado sem a etapa de reticulação (referido como: bio-NCP/ferrita/micela não reticulado). A proximidade entre estes valores corrobora a discussão feita no Capítulo 4, que: o PTX promove uma competição com o agente reticulante (glutaraldeído) pelos grupos OH e NH₂ da quitosana, prejudicando de certa forma o processo de reticulação.

Tabela 5.1. Valores de potencial zeta, determinados com medidas de mobilidade eletroforética em pH 7,4, para os diversos materiais estudados

Amostra	Potencial zeta em pH = 7,4 (mV)
Ferrita	-32,0 ± 1,8
Magnetita	-15,5 ± 0,8
bio-NCP/ferrita/micela	-29,1 ± 1,3
bio-NCP/ferrita/micela/apatita	-31,0 ± 1,2
bio-NCP/magnetita/micela	-23,0 ± 0,7
bio-NCP/magnetita/micela/apatita	-30,6 ± 0,8
bio-NCP/ferrita/spray	-20,5 ± 1,0
bio-NCP/ferrita/spray/apatita	-26,0 ± 2,0
bio-NCP/magnetita/spray	-19,2 ± 1,5
bio-NCP/magnetita/spray/apatita	-25,6 ± 0,5
bio-NCP/ferrita/micela/apatita + PTX	-34,1 ± 1,6
bio-NCP/ferrita/micela não reticulado	-33,7 ± 1,1

Na Figura 5.2 são mostradas imagens de MEV representativas de algumas das amostras estudadas neste capítulo. Mesmo que alguns aglomerados tenham sido formados, em nenhuma das amostras foram observados aglomerados com tamanho superior a 500nm. Vale ressaltar, ainda assim, que aprimorar a dispersão dos materiais é uma das etapas a serem cumpridas em trabalhos futuros.

Na Figura 5.3 são mostradas imagens representativas dos resultados referentes aos ensaios realizados com monócitos após contato com os diferentes materiais por 2h. Não foram detectadas altas concentrações de Fe nas células quando o ensaio foi feito com nanopartículas magnéticas sem revestimento. Entretanto, após o revestimento destas pelo método de micelas reversas, alguns monócitos indicaram internalização dos materiais, e consequentemente acusaram elevada concentração de Fe após o ensaio, como mostra o mapeamento deste elemento feito em verde nas figuras. Esta reação induzida às células de defesa é, no entanto, notadamente atenuada quando os cristais de apatita foram depositados na superfície dos nanocompósitos, mesmo quando o fármaco antitumoral PTX foi introduzido ao material. Chama

atenção ao comportamento oposto dos monócitos para os ensaios realizados com materiais recobertos pelo método de *spray*, nos quais a presença da apatita é quem leva a uma maior internalização dos nanocompósitos. No entanto, ainda assim pode-se afirmar que ~~que~~ nenhum dos materiais foi drasticamente internalizado pelos monócitos, indicando sua baixa ou não reconhecimento por estas células.

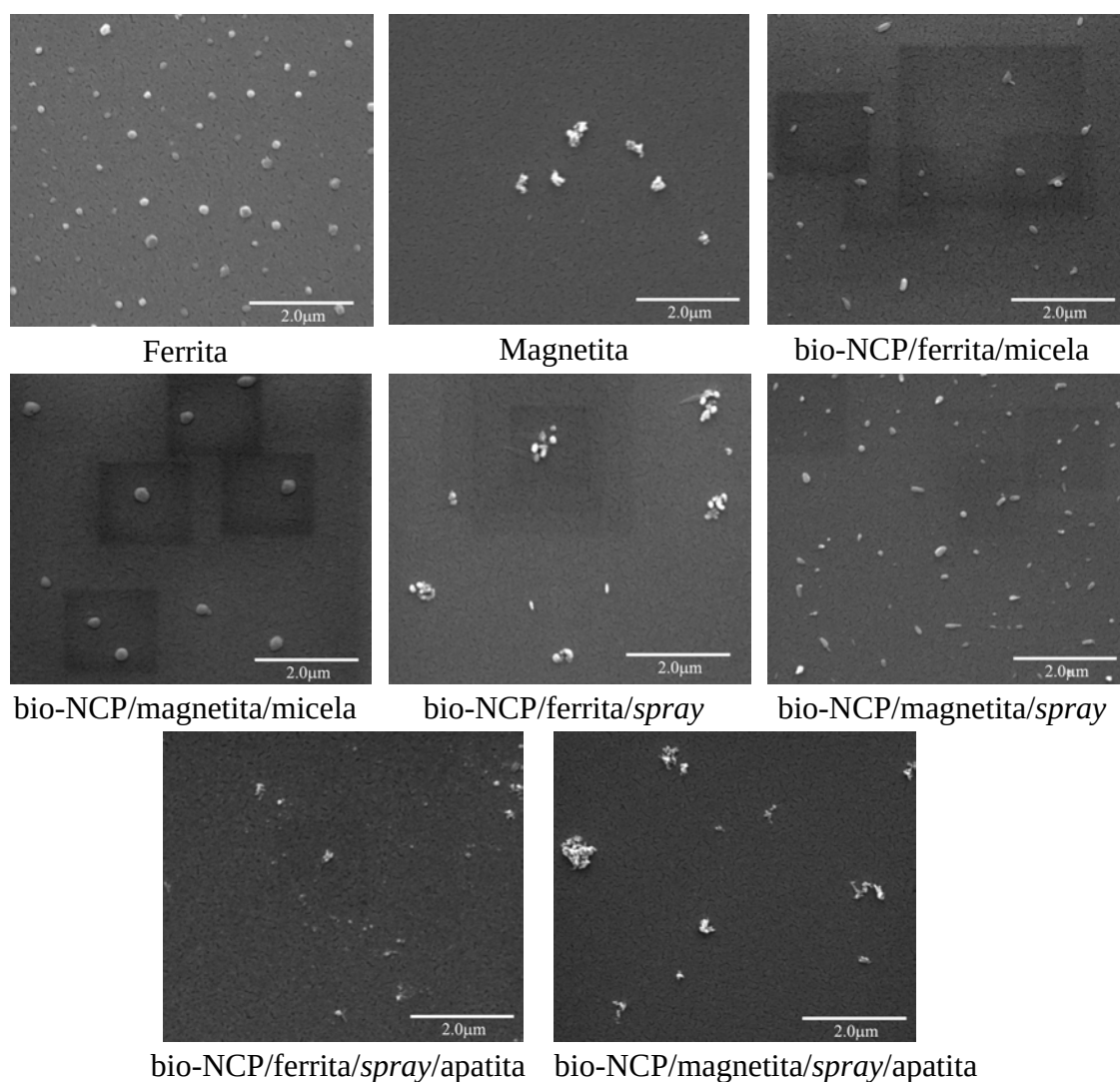


Figura 5.2. Micrografias representativas de algumas das amostras analisadas neste capítulo obtidas com aumento de 40000x.

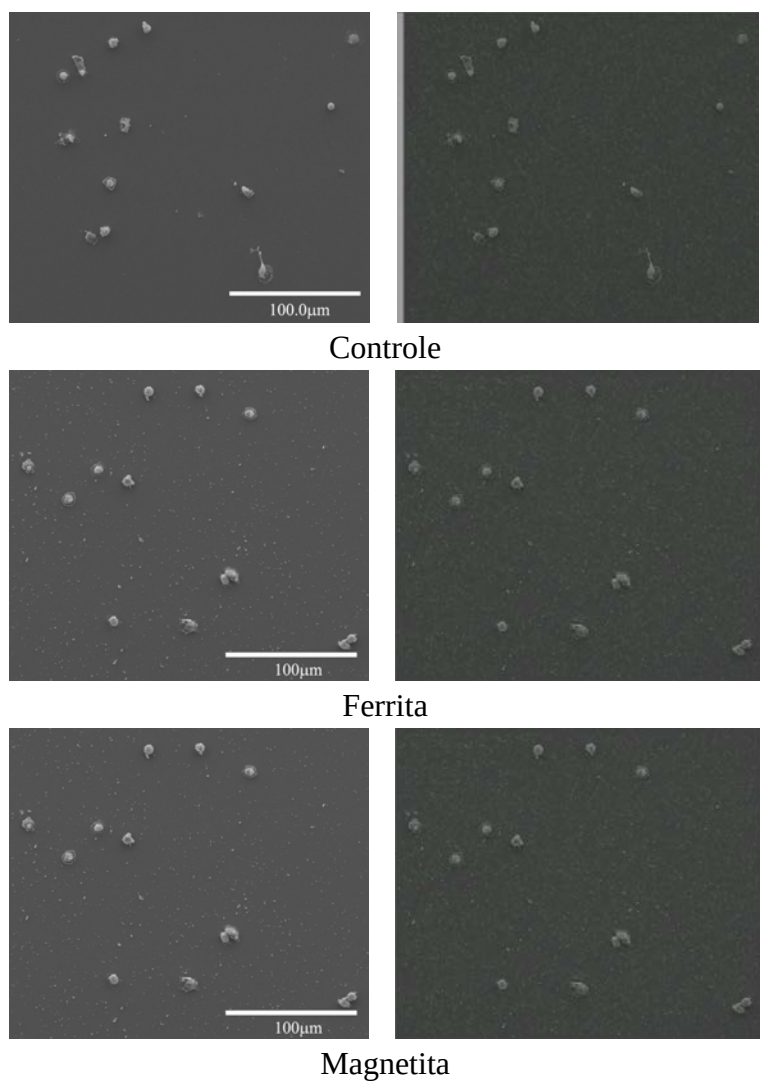


Figura 5.3. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) dos monócitos do grupo controle e após o contato por 2h com nanopartículas de ferrita e magnetita sem revestimento. As imagens foram tomadas com aumento de 1000x; imagens da direita são aquelas sobrepostas com as do mapeamento feito com o sinal do elemento Fe, destacadas na cor verde.

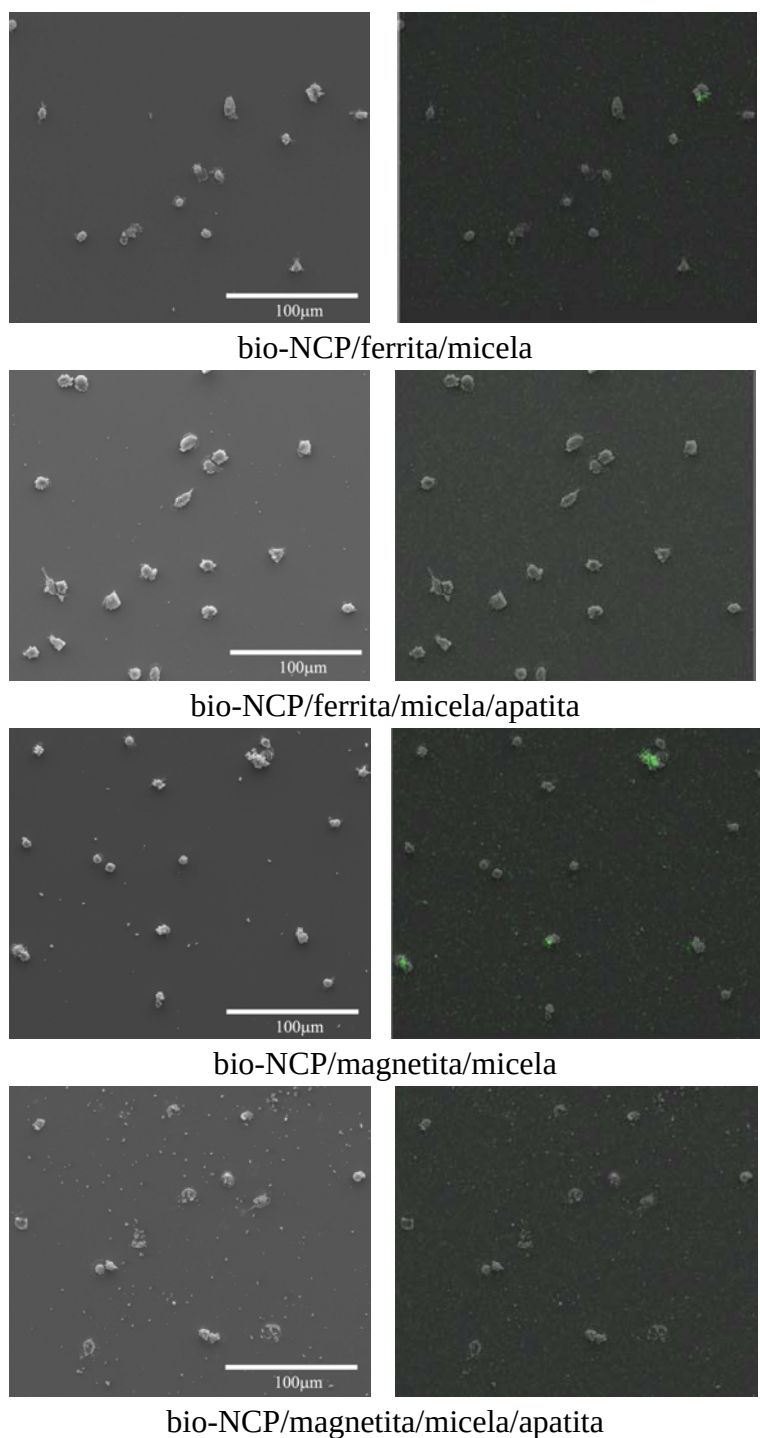


Figura 5.4. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) dos monócitos após o contato por 2h com nanopartículas de ferrita e magnetita recobertas pelo método de micelas reversas. As imagens foram tomadas com aumento de 1000x; imagens da direita são aquelas sobrepostas com as do mapeamento feito com o sinal do elemento Fe, destacadas na cor verde.

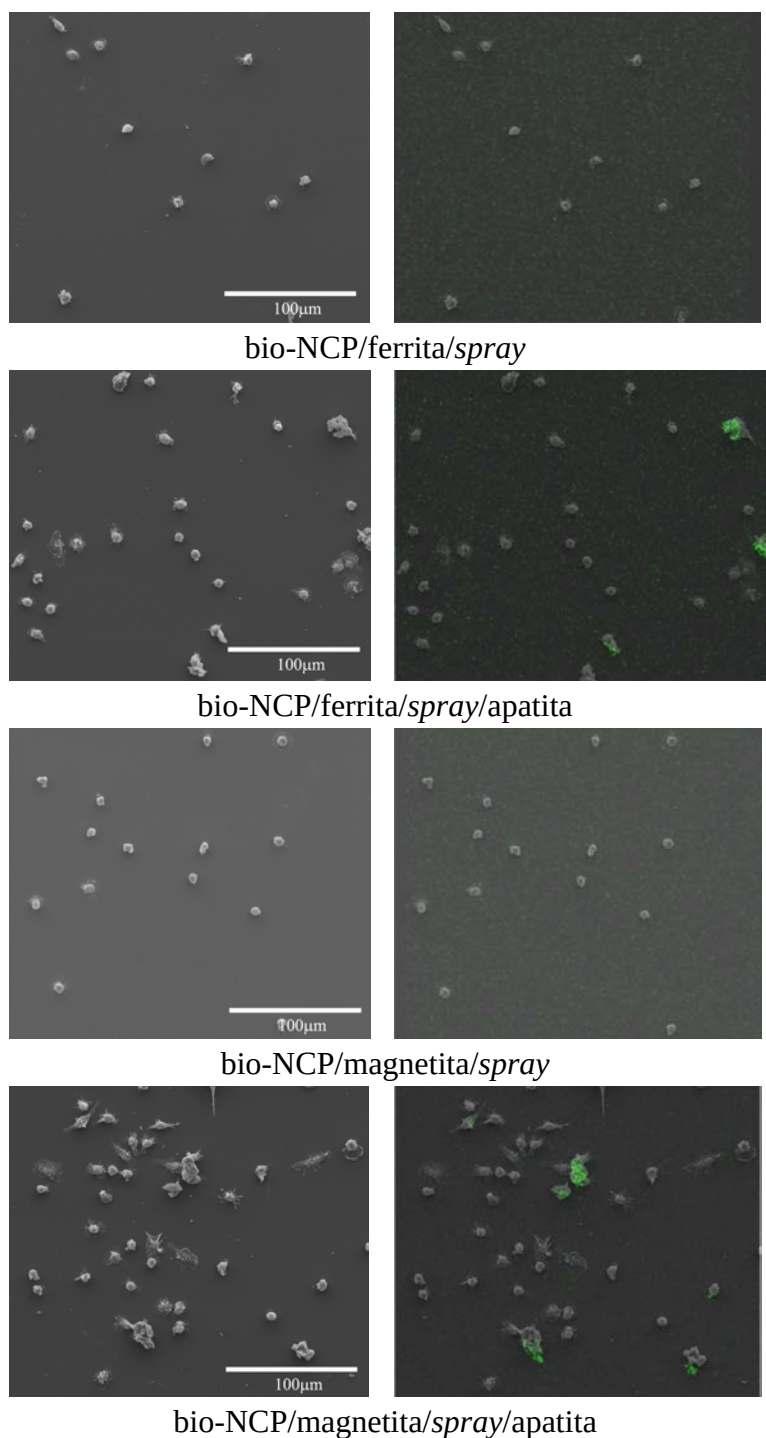
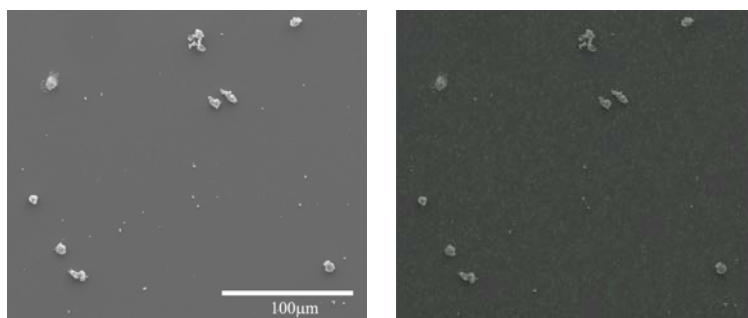


Figura 5.5. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) dos monócitos após o contato por 2h com nanopartículas de ferrita e magnetita recobertas pelo método de *spray*. As imagens foram tomadas com aumento de 1000x; imagens da direita são aquelas sobrepostas com as do mapeamento feito com o sinal do elemento Fe, destacadas na cor verde.



bio-NCP/ferrita/micela/apatita + PTX

Figura 5.5. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) dos monócitos após o contato por 2h com nanopartículas bio-NCP/ferrita/micela/apatita + PTX. As imagens foram tomadas com aumento de 1000x; imagens da direita são aquelas sobrepostas com as do mapeamento feito com o sinal do elemento Fe, destacadas na cor verde.

As Figuras 5.6 a 5.18 apresentam os resultados referentes aos ensaios realizados com células de adenocarcinoma da mama (MCF-7). As imagens referentes ao grupo controle mostram que a maioria das células tem aspectos que sugerem sua adesão à lamínula, o que é um indicativo de boa viabilidade celular (JIN et al., 2008).

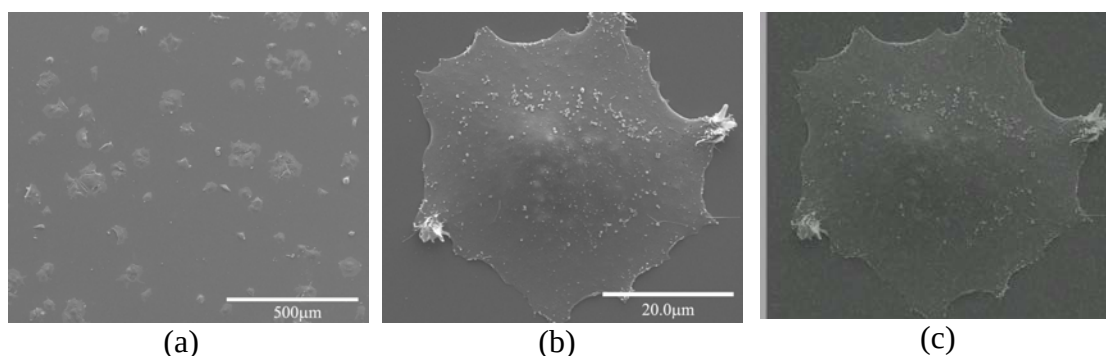


Figura 5.6. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células do adenocarcinoma de mama (MCF-7): grupo controle do ensaio realizado com materiais nanoparticulados. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

Entretanto, quando as células foram colocadas em contato com a ferrita por 2h nota-se que o número de células com o aspecto arredondado aumenta em comparação ao do grupo controle, como pode ser visto na Figura 5.7(a). Esse comportamento das células sugere menor adesão e pode ser indicativo da ocorrência de apoptose (Jin et al., 2008). Nas imagens obtidas com aumentos de 5000x, Figuras 5.7 (b) e (c), é possível notar a existência de estruturas internas porém muito próximas à superfície nas quais altas quantidades de Fe foram detectadas, sugerindo a internalização das nanopartículas. Na superfície da membrana pode-se ainda notar um aumento na quantidade de pequenas estruturas de aspecto fibroso (mostradas em branco na imagem), mostradas com maior aumento na Figura 5.8. Estas estruturas apresentam tamanho muito superior às das nanopartículas descartando a hipótese de que sejam simplesmente aglomerados destes materiais. Sua formação parece fazer parte do mecanismo celular para captura dos materiais e internalização.

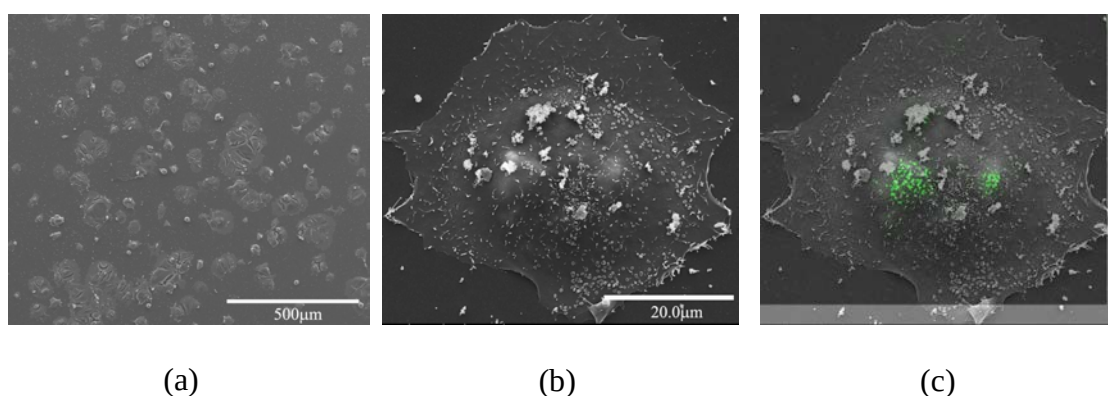


Figura 5.7. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de ferrita. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem

da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

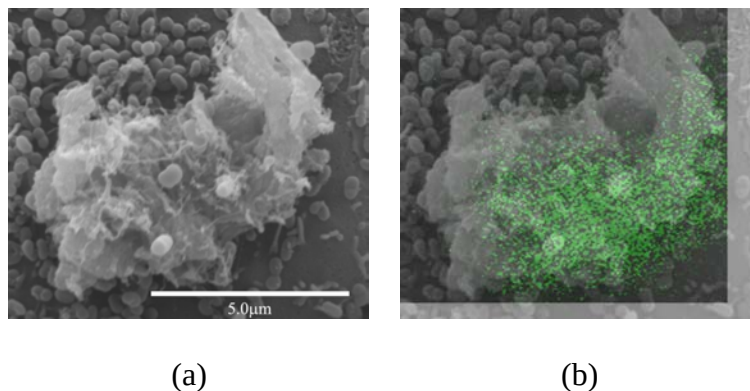


Figura 5.8. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) da estrutura externa formada pelas células do adenocarcinoma da mama (MCF-7) após o contato com nanopartículas de ferrita por 2h. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 30000x e (b) mostra a mesma imagem sobreposta ao mapeamento de análise de Fe.

Em contrapartida ao resultado encontrado no ensaio com as nanopartículas, o número de células diminuiu substancialmente quando o ensaio foi feito com nanopartículas de magnetita, como mostrado na Figura 5.9. Grande parte das células remanescentes apresentam aspecto arredondado, sugerindo morte celular. Provavelmente, algumas desprenderam da lamínula durante a lavagem após o teste, diminuindo o número de células observadas. A quantidade de Fe encontrada na superfície das células é notavelmente superior, especialmente no interior das estruturas fibrosas citadas anteriormente, sugerindo uma maior interação com as nanopartículas de magnetita. Tal interação pode, em princípio, ser explicada com base nos resultados de potencial zeta, visto que a magnetita apresenta potencial menos negativo em comparação à ferrita. As células da linhagem MCF-7 tendo potencial zeta negativo em pH sanguíneo (Zhang et al., 2008), sua interação com partículas

carregada menos negativamente seria favorecida. Quanto à toxicidade das nanopartículas de magnetita nas células tumorais, uma possível explicação pode residir na presença de Fe^{+2} no material, cuja concentração nas nanopartículas de ferrita é inerentemente inferior. A presença destes íons pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio tóxicas às células, através da reação abaixo (reação de Fenton):

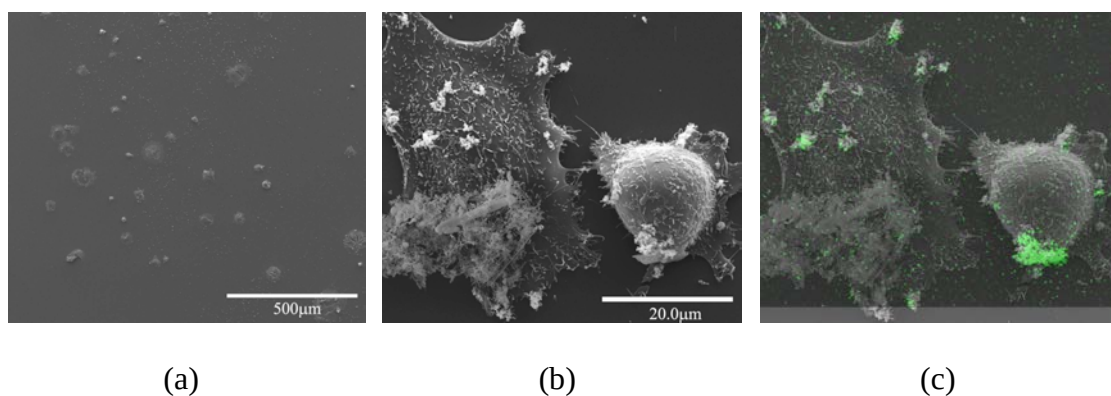
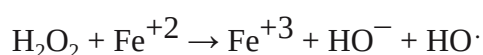


Figura 5.9. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de magnetita. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

O ensaio realizado com bio-NCP/ferrita/micela/apatita mostra pouca diferença em comparação ao grupo controle, com exceção da presença de estrutura extra-celular rica em ferro, como mostrado na Figura 5.10.

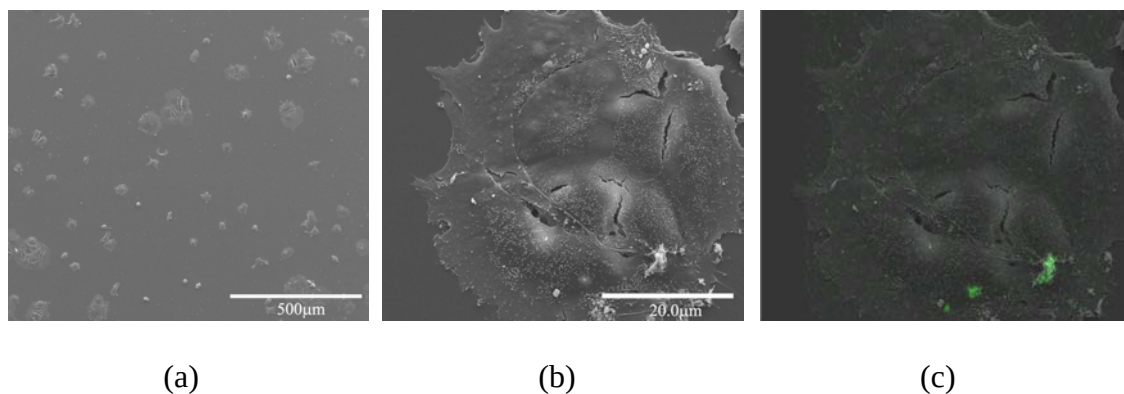


Figura 5.10. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de bio-NCP/ferrita/micela/apatita. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

Na Figura 5.11. são mostrados os resultados referentes ao ensaio realizado com bio-NCP/magnetita/micela. Chama a atenção para este caso, a saber: há um aumento no número de células em comparação ao grupo controle, ainda que não tenham sido encontradas estruturas ou células com altas concentrações de Fe, lembrando que o ferro pode estar presente numa concentração abaixo do nível de detecção por EDX. Tal aumento pode ser explicado pela presença do próprio polímero que consiste de um polissacarídeo e pode estimular o crescimento celular. Tem-se ainda que, a quitosana é dotada de grupos amino (NH_2) e, de acordo com alguns autores, podem promover a proliferação desta linhagem celular (Yan et al., 2013).

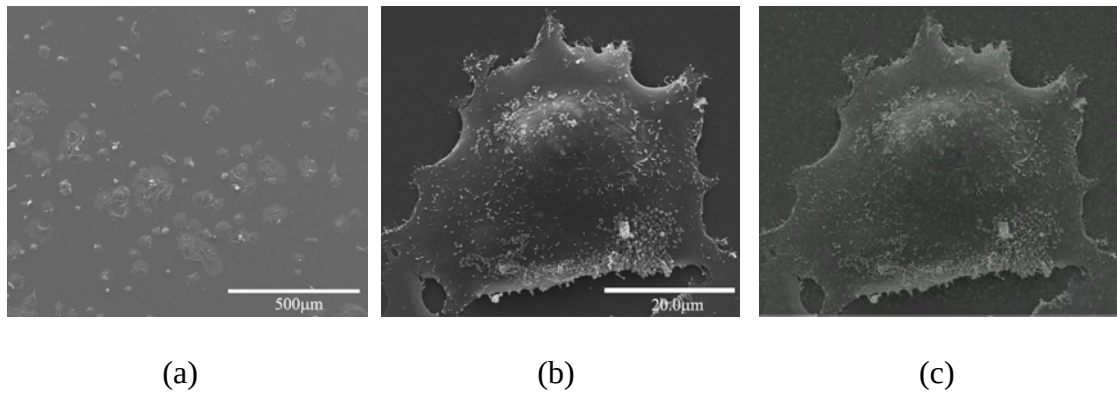


Figura 5.11. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de bio-NCP/magnetita/micela. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

Após o crescimento de cristais de apatita na superfície do material, formando bio-NCP/magnetita/micela/apatita, o comportamento das células tumorais foi consideravelmente distinto. Neste caso, praticamente todas as células se mostram marcadas com as estruturas fibrosas relatadas anteriormente, dentro das quais altas concentrações de Fe foram detectadas, como mostram as imagens representativas na Figura 5.12. Na Figura 5.12(a) nota-se uma grande quantidade destas estruturas espalhadas sobre a superfície das células e também na lamínula, denotando a resposta das células ao material testado.

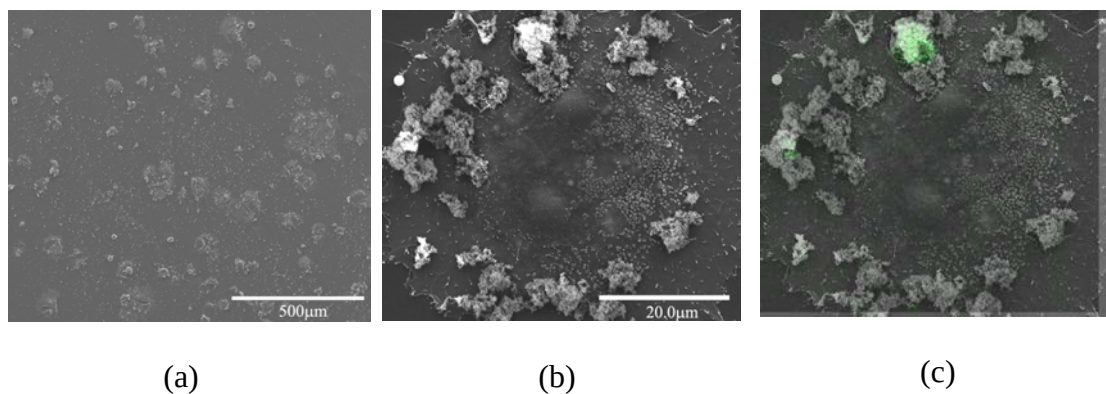


Figura 5.13. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de bio-NCP/magnetita/micela/apatita. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

É também interessante notar a diferença entre os nanocompósitos preparados com ferrita pelo método de *spray* sem e com a apatita, bio-NCP/ferrita/*spray* e bio-NCP/ferrita/*spray*/apatita, cujos ensaios são mostrados nas Figuras 5.14 e 5.15, respectivamente. Para o material sem a apatita, as células mais uma vez mostraram um aumento no número em comparação ao do grupo controle, apresentando inclusive situações de confluência, como mostrado na Figura 5.14(b). Entretanto, após a inserção de apatita no material, nota-se uma grande redução no número de células cancerígenas (Figura 5.15(a)), sendo que aquelas remanescentes apresentam, em sua maioria, aspecto esférico, sugerindo pouca adesão à lamínula, como mostrado no exemplo da Figura 5.15(b). Um aspecto importante é a presença de poucas estruturas fibrosas em comparação ao mesmo material preparado com magnetita usando o método de micelas reversas, como mostrado anteriormente na Figura 5.13.

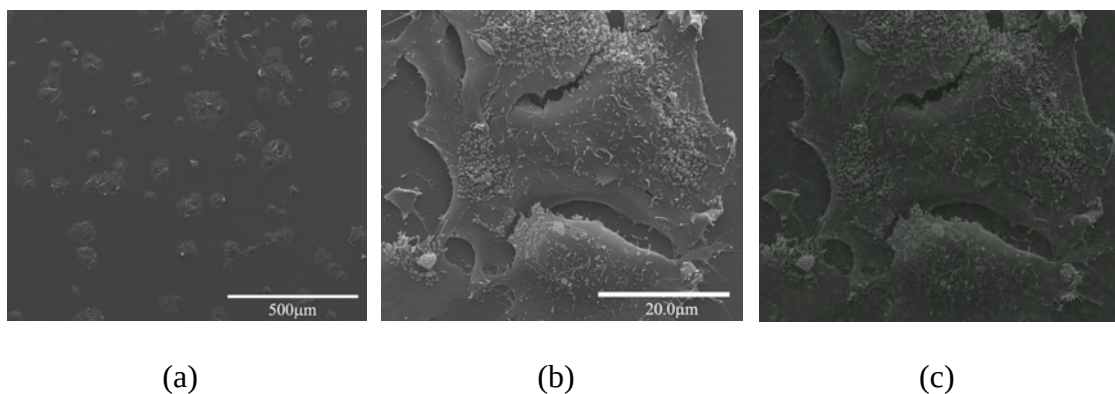


Figura 5.14. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de bio-bio-NCP/ferrita/spray. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

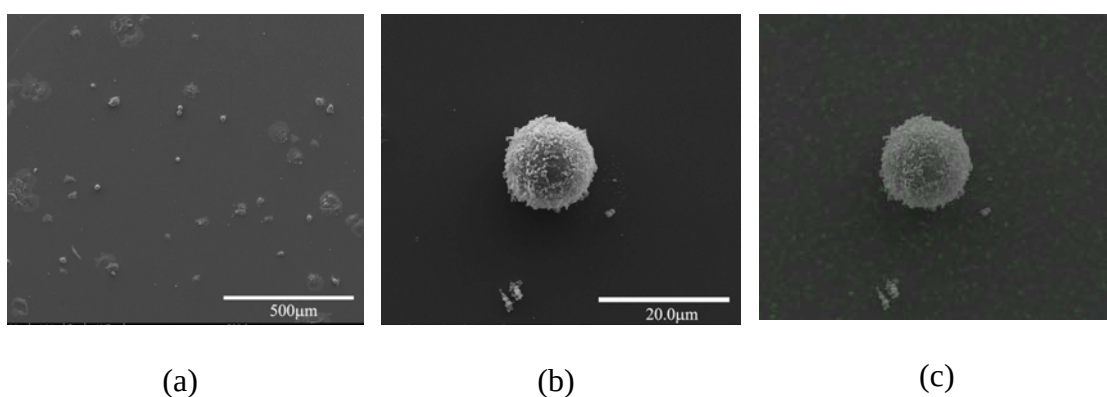


Figura 5.15. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de bio-bio-NCP/ferrita/spray/apatita. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

Nos nanocompósitos preparados com magnetita pelo método de *spray* o comportamento é ligeiramente diferente àquele observado para os materiais contendo nanopartículas de ferrita, principalmente no material sem a apatita. Como mostrado na Figura 5.16(a), existe uma clara redução na quantidade de células em comparação ao grupo controle, tal qual como foi observado para as nanopartículas de magnetita sem recobrimento. O potencial zeta da ferrita e magnetita recoberta por aspersão (*spray*) é praticamente igual. Diante destas observações, deve-se considerar a possibilidade de que parte das nanopartículas de magnetita não foram completamente recobertas pelo polímero quitosana, o que explicaria a semelhança nos resultados. Levando-se em conta o valor de potencial zeta das partículas de magnetita em comparação com as partículas de ferrita, que são -15,5mV e -32mV respectivamente, é de se esperar que o recobrimento das primeiras seja menos eficiente, visto que o polímero é protonado em solução acética previamente ao processo de encapsulamento. O polímero, adquirindo carga positiva, é natural que sua interação com partículas carregadas mais negativamente seja mais efetiva. Esta observação pode trazer implicações no encapsulamento do fármaco, reduzindo o rendimento do processo. Por outro lado, deve-se também considerar a hipótese de que a célula tumoral é capaz de metabolizar o recobrimento polimérico, ficando assim em contato direto com as nanopartículas de magnetita que podem levar a formação de espécies reativas de oxigênio tóxicas tal qual discutido anteriormente.

Após a modificação do material com apatita (bio-NCP/magnetita/*spray*/apatita) as células cancerígenas voltam a responder à presença do material através da liberação em excesso de estruturas fibrosas, podendo estas ser mais uma vez encontradas inclusive na própria lamínula (Figura 5.17).

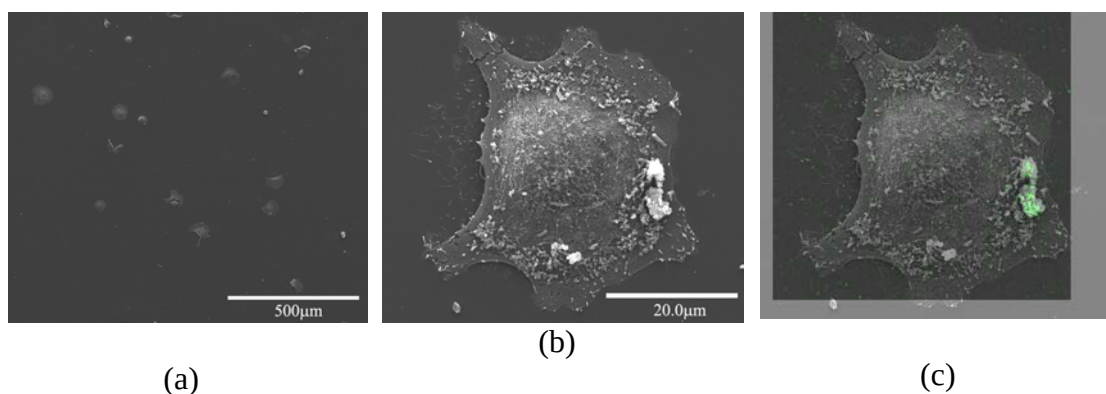


Figura 5.16. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de bio-bio-NCP/magnetita/*spray*. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

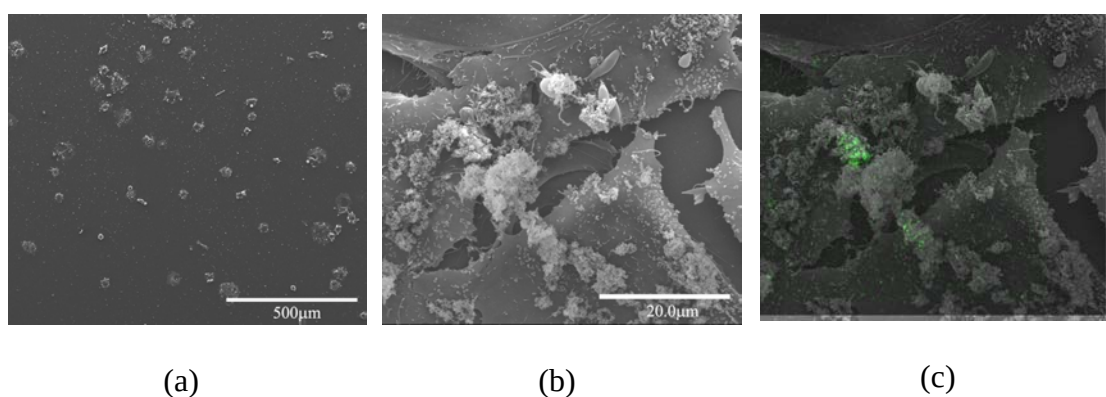


Figura 5.17. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de bio-bio-NCP/magnetita/*spray*/apatita. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

Finalmente foi testado com o material contendo PTX em seu interior (bio-NCP/ferrita/micela/apatita + PTX), cujo resultado é mostrado na Figura 5.18. É notável a redução no número de células e, ainda, a presença das estruturas fibrosas bastante dispersas sobre a lamínula. As células remanescentes, por sua vez, apresentam aspecto arredondado. Tais observações podem sugerir que as células de fato são capazes de metabolizar o recobrimento, o que levaria à liberação do fármaco, diferentemente do que foi observado nos ensaios com fibroblastos. Além disso, é possível que a liberação do fármaco seja auxiliada ainda pela dissolução dos cristais de apatita, pois o pH intracelular é menor que o do sangue (~ 4 nos lisossomos e ~ 5 nos endossomos) (RIM et al., 2011), e pela possível metabolização do revestimento polimérico, comentada anteriormente.

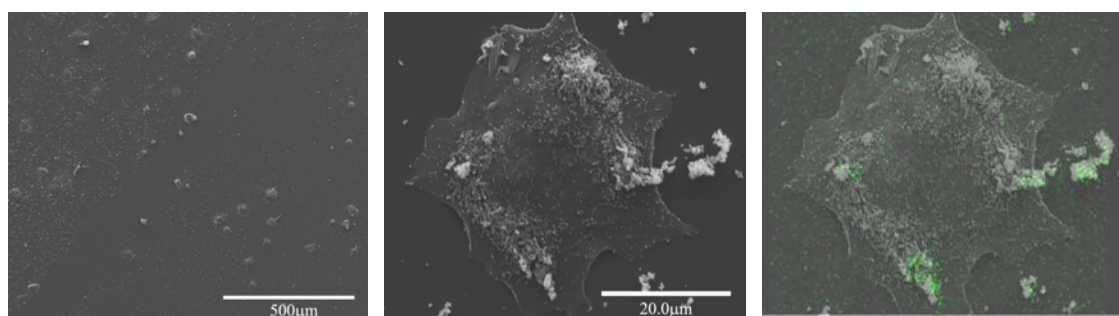


Figura 5.18. Micrografias eletrônicas de varredura (MEV) das células de adenocarcinoma da mama (MCF-7) após 2h de contato com nanopartículas de bio-NCP/ferrita/micela/apatita + PTX. Em (a) é mostrada uma imagem com aumento de 200x e (b) mostra o aumento de 5000x em uma célula representativa. Em (c) a mesma célula sobreposta com imagem da análise (mapeamento via EDX) de Fe. A concentração deste metal é proporcional à intensidade da coloração verde.

5.4. Considerações finais

Neste capítulo apresentamos os resultados referentes aos experimentos de potencial zeta e ensaios *in vitro* de diversos materiais. Para fins de comparação, foram também estudadas nanopartículas de magnetita bem como bio-nanocompósitos preparados pelo método de *spray*, uma rota distinta àquela que utilizamos ao longo de todo o restante do trabalho, o método de micelas reversas.

Quanto ao potencial zeta, foi possível observar que todos os materiais estudados apresentam carga superficial negativa e, de um modo geral, o crescimento dos cristais de apatita na superfície do material tendem a reduzir ainda mais tal carga.

Em seguida, foram realizados ensaios *in vitro* com monócitos, as células de defesa do organismo. De um modo geral os materiais não induziram grandes respostas destas células, denotando a não-toxicidade. Entretanto, nota-se que para os nanocompósitos preparados com o método de micelas a mimetização tende a reduzir ainda mais a ação fagocítica dos monócitos, enquanto que para os materiais preparados com a técnica de *spray* é observado um efeito contrário, com a mimetização induzindo certa ação das células de defesa.

Os resultados observados nos ensaios com células tumorais da mama indicam primeiramente que as nanopartículas de ferrita não encapsuladas podem estimular a viabilidade destas células, ao passo que as partículas de magnetita apresentam um provável efeito tóxico. De um modo geral, os nanocompósitos preparados sem a modificação com apatita parecem também estimular o crescimento e adesão das células tumorais. Contudo, após a mimetização destes materiais, observa-se um grande aumento em sua interação com as células cancerígenas, que passa a responder à presença dos nanocompósitos através da produção de estruturas de aspecto fibroso. Em alguns casos, como no ensaio do bio-NCP/ferrita/spray/apatita, fica clara a

mudança morfológica sofrida pela célula, passando a apresentar aspecto esférico que pode indicar perda de adesão até mesmo ser uma etapa de apoptose celular, o que pode ser investigado com cautela no futuro.

Finalmente, o ensaio com o nanocompósito contendo o fármaco anti-tumoral apresentou grande redução no número de células cancerígenas, além de mudança morfológica nas células remanescentes. Foi também observada uma grande quantidade das estruturas fibrosas que são provavelmente extravasadas pelas células como resposta ao contato com os materiais. Este resultado é particularmente interessante, visto que os resultados apresentados no Capítulo 4 sugeriram que o fármaco se encontram em uma forma inativa no interior do encapsulamento. Entretanto, o bom resultado apresentado pelo ensaio *in vitro* corrobora a hipótese de que a inativação da molécula é reversível após sua liberação.

Tanto os resultados como a metodologia para produzir esses resultados são inovadores e foram desenvolvidos com a valiosa colaboração do Prof. Ramon Kaneno do IB-UNESP.

6. Desafios futuros

Neste projeto desenvolvemos um nanocompósito magnético com potencial aplicação no tratamento do câncer de mama. O trabalho foi desenvolvido seguindo-se várias etapas que passam pela síntese das nanopartículas magnéticas e a busca por um melhor entendimento na dinâmica de formação de suas fases cristalinas, o recobrimento polimérico destes materiais e a posterior modificação da superfície com nanocristais de apatita. Finalmente, foi incluído a este sistema o fármaco anti-tumoral paclitaxel, seguindo-se então a aplicação do nanocompósito em ensaios *in vitro*.

Quanto à síntese das nanopartículas existem ainda etapas a serem percorridas haja vista o grande número de variáveis envolvidas no processo. Ainda, por vezes esbarramos nas limitações técnicas devido ao arranjo dos materiais na escala nonométrica, fazendo-se necessária a combinação de diferentes técnicas de bancada e/ou aquelas disponíveis em instalações que trabalham com radiação sincrotron ou de nêutrons.

Quanto ao recobrimento polimérico destas nanopartículas e a posterior modificação superficial com apatita, embora proporcionamos melhor compreensão dos eventos envolvidos nestes processos, existem ainda grandes perspectivas e

possibilidades para futuros trabalhos. Por exemplo, observamos recentemente a possibilidade de prepararmos nanocompósitos com diferentes características morfológicas e que provavelmente apresentarão propriedades físicas, químicas e biológicas bastante distintas.

Quanto ao encapsulamento do fármaco em si, são ainda necessários experimentos sob o ponto de vista farmacológico, visando a avaliação da dinâmica de liberação da molécula bem como da eficiência de encapsulamento do fármaco no nanocompósito. Foi possível compreender as alterações na dinâmica molecular do fármaco ainda que a composição do bio-NCP tenha gerado desafios adicionais a este estudo. Sob este ponto de vista, pode-se dizer que apresentamos uma nova metodologia para que estes estudos sejam feitos, combinando técnicas de espalhamento de nêutrons e raios X com resultados teóricos obtidos por cálculos de DFT. Em trabalhos futuros, temos como objetivo uma melhor compreensão acerca da dinâmica molecular do fármaco após a liberação, para a qual apresentamos os primeiros resultados nesta tese. Para este estudo, os dados referentes ao fármaco encapsulado serão de grande relevância, visto que estes oferecerão informações acerca da origem de possíveis alterações moleculares na droga liberada.

Finalmente, foram apresentados resultados referentes aos ensaios biológicos com o bio-NCP + PTX bem como com outros nanocompósitos preparados. Pode-se dizer que os primeiros resultados são de fato encorajadores e, mesmo que sejam análises estritamente morfológicas, mostram que a estrutura proposta para o material funciona para o tratamento e diagnóstico propostos e, principalmente, que o conceito envolvido em sua síntese e preparo, merecem atenção especial. Existe ainda grandes desafios no que diz respeito à ensaios biológicos, *in vitro* e posteriormente *in vivo*.

Referências

ALBANNA, M. Z.; BOU-AKL, T. H.; BLOWYTSKY, O.; WALTERS, H. L.; MATTHEW, H. W. T. Chitosan fibers with improved biological and mechanical properties for tissue engineering applications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 20, pp. 217–226, 2013.

ALEXIOU, C.; JURGONS, R.; SELIGER, C.; BRUNKE, O.; IROM, H. AND ODENBACH, S.. Delivery of Superparamagnetic Nanoparticles for Local Chemotherapy after Intraarterial Infusion and Magnetic Drug Targeting. *Anticancer Res.*, 27, 2019 - 2022, 2007.

AMERICO, M. F.; MARQUES, R. G.; ZANDONA, E. A.; ANDREIS, U. ; STELZER, M. ; CORA, L. A.; OLIVEIRA, R. B. ; MIRANDA, J. R. A. Validation of ACB *in vitro* and *in vivo* as a biomagnetic method for measuring stomach contraction. *Neurogastroenterol Motil*, v. 22, p.. 1340 – e374, 2010.

ANDERSON, J. M. Inflammatory response to implants. *ASAIO Trans*, v. 11, pp. 101-107, 1988.

ANDRONESCU, E.; FICAI, M.; VOICU, G.; FICAI, D.; MAGANU, M. ; FICAI, A. Synthesis and characterization of collagen/hydroxyapatite: magnetite composite material for bone cancer treatment. *J. Mater. Sci. Materials in Medicine*, 21, 7, 2237-2242, 2010.

ANITHA, A.; RANI, V. V. D.; KRISHNA, R.; SREEJA, V.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S. V.; TAMURA, H.; JAYAKUMAR, R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, pp. 672 – 677, 2009.

AYYAPPAN, S.; PHILIP, J.; RAJ, B. Effect of Digestion Time on Size and Magnetic Properties of Spinel CoFe_2O_4 Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C*, 113, pp. 590-596, 2009.

BAGHERI, H.; AFKHAMI, A.; SABER-TEHRANI, M.; KHOSHSAFAR, H. Preparation and characterization of magnetic nanocomposite of Schiff base/silica/magnetite as a preconcentration phase for the trace determination of heavy metal ions in water, food and biological samples using atomic absorption spectrometry. *Talanta*, v. 97, pp. 97-95, 2012.

BEIJER, Y. J.; KOOPMAN, M.; TERHAARD, C. H. J.; BRAUNIUS, W. W.; VAN

ES R. J. J. , DE GRAEFF A. Outcome and toxicity of radiotherapy combined with chemotherapy or cetuximab for head and neck cancer: Our experience in one hundred and twenty-five patients. Clin. Otolaryngology, 38, 1, 69-74, 2013.

BELLAHCÉNE, A.; CASTRONOVO, V. Increased Expression of Osteonectin and Osteopontin, Two Bone Matrix Proteins, in Human Breast Cancer. American Journal of Pathology, v. 146, n. 1, 1995.

BENZERARA, K.; YOON, T. H., TYLISZCZAK, T., CONSTANTZ, B.; SPORMANN, A. M.; BROWN JR, V. Scanning Transmission X-Ray Microscopy Study of Microbial Calcification. Geobiol., 2, 249-259, 2004.

BERNKOP-SCHNÜRCH , A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 81, 3, pp. 463 – 469, 2012.

BRAUER, G.. Handbook of Preparative Inorganic Chemistry, Volume 2. Academic Press, London, 1965.

BUSCHOW, K. H. J., de BOER, F. R. Physics of Magnetism and Magnetic Materials, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003.

CHEN, F.; WANG, Z.; LIN, C. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials. Materials Letters, v. 57, p. 858–861, 2002.

COSTA, T. A. C.; ANDRADE, A. L.; BINOTTO, T. E.; PLEPIS, A. M. G.; BEVILACQUA, L.; SOUZA, W. M. Avaliações clínica e morfométrica da capacidade angiogênica da membrana de quitosana em córneas de coelhos. Arq Bras Oftalmol, v.69(6), p. 817-21, 2006.

DI CORATO, R.; ESPINOSA, A.; LARTIGUE, L.; THARAUD, M.; CHAT, S.; PELLEGRINO, T.; MÉNAGER, C.; GAZEAU, F. AND WILHELM, C. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. Biomater., 35, 6400 – 6411, 2014.

DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. Biomaterials, v.26, p.. 5983–5990, 2005.

DIEL, I. J.; SOLOMAYER, E.; COSTA, S. D.; GOLLAN, C.; GOERNER, R.; WALLWIENER, D.; KAUFMANN, M.; G. BASTERT. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. The New England Journal of Medicine, v. 339, n. 6, 1998.

DOS SANTOS, J. E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO É. T. G. **Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n 4, p. 242-249, 2003

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.

FERLAY, J; PARKIN, D. M. ; STELIAROVA-FOUCHER, E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur. J. Cancer*, 46, 4, 764-781, 2010.

FERLAY, J.; STELIAROVA-FOUCHER, E.; LORTET-TIEULENT, J.; ROSSO, S.; COEBERGH, J.W.W.; COMBER, H.; FORMAN, D. ; BRAY, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer*, 49, 6, 1374-1403, 2013.

GOLDMAN, A. *Modern ferrite technology*. 2 ed. Springer, 2006. 438p.

GONÇALVES, V. L.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T.; PEDROSA, R. C. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros*, v. 15, n. 1, 2005.

GUPTA, A.K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, v. 26 (18), pp. 3995–4021, 2005.

HAI TAO ZHANG, JUN DING, GAN MOOG CHOW, MIN RAN, JIA BAO YI. Engineering Magnetic Properties of Ni Nanoparticles by Non-Magnetic Cores. *Chem. Mater.*, v. 21, 5222–5228, 2009.

HARADA, Y.; WANG, J.; DOPPALAPUDI, V. A.; WILLIS, A. A.; JASTY, M.; HARRIS, W. H.; NAGASE, M.; GOLDRING, S. R. Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. **31**, pp. 19-26, 1996.

HASTINGS, J. M.; CORLISS, L. M. Neutron Diffraction Studies of Zinc Ferrite and Nickel Ferrite. *Rev. Mod. Phys.* 25, 114, 1953.

HILGER A, I.; HERG T, B, R.; KAISER, W. A. Towards breast cancer treatment by magnetic heating. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 293, p. 314–319, 2005.

HU, Q.; LI, B.; WANG, M.; SHEN, J. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/ hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*, v. 25, p. 779–785, 2004.

IAFISCO, M.; MARGIOTTA, N. Silica xerogels and hydroxyapatite nanocrystals for the local delivery of platinum–bisphosphonate complexes in the treatment of bone tumors: A mini-review. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 117, pp. 237 – 247, 2012.

IBRAHIM SHARIFI, H. SHOKROLLAHI. Structural, Magnetic and Mössbauer evaluation of Mn substituted Co–Zn ferrite nanoparticles synthesized by co-precipitation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.83, pp. 36-40, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Incidência de cancer no Brasil. 2014. Disponível em < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>> Acesso em 26 Jan. 2015.

JIN, J.; ZUO, G.; XIONG, G.; LUO, H.; LI, Q.; MA, C.; LI, D.; GU, F.; MA, Y. ; WAN, Y. The inhibition of lamellar hydroxyapatite and lamellar magnetic hydroxyapatite on the migration and adhesion of breast cancer cells. *J Mater Sci: Mater Med.*, 25, 1025 – 1031, 2014.

KAHANI, S. A.; JAFARI, J. A new method for preparation of magnetite from iron oxyhydroxide or iron oxide and ferrous salt in aqueous solution. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1951-1954, 2009.

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* 6S1, p. 242–246, 2006

KLINKAEWNARONG, J.; SWATSITANG, E.; MASINGBOON, C.; SERAPHIN, S.; MAENSIRI, S. Synthesis and characterization of nanocrystalline HAp powders prepared by using aloe vera plant extracted solution *Curr. App. Phys.* v.10, pp. 521–525, 2010.

KONG, L.;GAO, Y.; LU, G.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X.A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 42, p. 3171–3179, 2006.

KOVTUNENKO, P. V. Defect formation in spinels in oxygen nonstoichiometry. *Glass and ceramics*, 54, 1997.

LARSON, A. C.; VON DREELE, R. B. General Structure Analysis System (GSAS). Los Alamos National Laboratory Report, LAUR 86 – 748, 2004.

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.

LI, G.Y.; JIANG, Y.R.; HUANG, K.L.; DING, P.; CHEN, J. Preparation and

properties of magnetic Fe₃O₄–chitosan nanoparticles. Journal of Alloys and Compounds, v. 466, pp. 451– 456, 2008.

LIANG, Z.; GUO B.; LI, Y.; LI, X.; LI, X.; ZHAO, L.; GAO, L.; YU, H.; ZHAO, X.; ZHANG L. ; YANG, B. Plasmid-based Stat3 siRNA delivered by hydroxyapatite nanoparticles suppresses mouse prostate tumour growth *in vivo*. Asian J. Andrology, 13, 481 – 486, 2011.

LIN, T.; LIN, F.; LIN, J. In vitro feasibility study of the use of a magnetic electrospun chitosan nanofiber composite for hyperthermia treatment of tumor cells. Acta Biomaterialia, v. 8, 7, pp. 2704–2711, 2012.

LV, P.; WEI, W.; YUE, H.; YANG, T.; WANG, L.; MA, G. Porous Quaternized Chitosan Nanoparticles Containing Paclitaxel Nanocrystals Improved Therapeutic Efficacy in Non-Small-Cell Lung Cancer after Oral Administration. Biomacromolecules, v. 12, pp. 4230-4239, 2011.

MADEJOVÁ, J. FTIR techniques in clay mineral studies. Vib. Spectrosc., v. 31, pp. 1–10, 2003.

MAITRA, A.N., GHOSH, P.K., DE, T.K., SAHOO, S.K., Process for the preparation of highly monodispersed hydrophilic polymeric nanoparticles of size less than 100 nm, US Patent. 5,874,111, 1999.

MARTINS, M. L; FLORENTINO, A. O.; CAVALHEIRO, A. A.; SILVA, R.I.V.; DOS SANTOS, D. I.; SAEKI, M. J. Mechanisms of phase formation along the synthesis of Mn–Zn ferrites by the polymeric precursor method. Ceramics International, v. 40, pp. 16023–16031, 2014b.

MARTINS, M. L.; CALABRESI, M. F.; QUINI, C.; MATOS, J. F.; MIRANDA, J. R. A.; SAEKI, M. J.; BORDALLO, H. N. Enhancing the versatility of alternate current biosusceptometry (ACB) through the synthesis of a dextrose-modified tracer and a magnetic muco-adhesive cellulose gel. Materials Science and Engineering C, 48, 80–85, 2015.

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 cancer. Journal of alloys and compounds, v. 584, pp. 514–519, 2014a.

MASTROPAOLO, D.; CAMERMAN, A.; LUO, Y.; BRAYER, G.D.; CAMERMAN, N. Crystal and molecular structure of paclitaxel (taxol). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 92, p. 6920-6924, 1995.

MEENA, R.; KESARI, K. K.; RANI, M. ; PAULRAJ, R. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human breast cancer cells (MCF-7). J. Nanopart. Res., 14, 712, 2012.

MIKHAYLOV G, MIKAC U, MAGAEVA A A, ITIN V I, NAIDEN E P, PSAKHIE I, BABES L, REINHECKEL T, PETERS C, ZEISER R, BOGYO M, TURK V, PSAKHIE S G, TURK B, VASILJEVA O. Ferri-liposomes as an MRI-visible drug-delivery system for targeting tumours and their microenvironment. Nature Nanotechnology (2011), 6, 594–602.

MOHAPATRA, J.; MITRA, A.; BAHADUR, D.; ASLAM, M. Surface controlled synthesis of MFe_2O_4 (M = Mn, Fe, Co, Ni and Zn) nanoparticles and their magnetic characteristics. CrystEngComm, v. 15, pp. 524–532, 2013.

MONSUEZ, J.; CHARNIOT, J.; VIGNAT, N. ; ARTIGOU, J. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. Intern. J. Cardiol., 144, 1, 3-15, 2010.

MURAKAMI, S.; HOSONO, T.; JEYDEVAN, B.; KAMITAKAHARA, M.; IOKU, K. Hydrothermal synthesis of magnetite/hydroxyapatite composite material for hyperthermia therapy for bone cancer. Journal of the Ceramic Society of Japan, v. 116, n. 9, p. 950-954, 2008.

MÚZQUIZ-RAMOS, E. M.; CORTÉS-HERNÁNDEZ, D. A.; ESCOBEDO-BOCARD, J. C.; ZUGASTI-CRUZ, A.; RAMÍREZ-GÓMEZ, X. S.; OSUNA-ALARCÓN, J. G. In vitro and *in vivo* biocompatibility of apatite-coated magnetite nanoparticles for cancer therapy. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 24, pp 1035-1041, 2013.

NAKAZAKI, K.; HIGUCHI, Y.; NAGANO, O. ; SERIZAWA, T. Efficacy and limitations of salvage gamma knife radiosurgery for brain metastases of small-cell lung cancer after whole-brain radiotherapy. Acta Neurochir. 155, 107–114, 2013.

NOUKRATI, B. H.; ERRASSIFI, F.; SARDA, S.; CAZALBOU, S.; COMBES, C.; REY, C.; GLIMCHER, M. J. Controlled adsorption and release onto calcium phosphates materials and drug delivery applications. MATEC Web of Conferences, v. 5, 03002, 2013.

OTTEMANN, K. M.; THORGEIRSSON, T. E.; KOLODZIEJ, A. F.; SHIN, Y.;

PALAPURA S.; KOHN J. Trends in the development of bioresorbable polymers for medical application. I Biomater Appl. v. 6, pp. 216-250, 1992.

PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. J. Phys. D: Appl. Phys. v.36 p.167–181, 2003.

PARK, H.; PARK, J.; AH KIM, J.; LEE, S. H.; KIM, J. H.; YOON, J.; PARK, T. H.

Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilms by hyperthermia using superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Microbiological Methods*, v. 84, pp. 41–45, 2011.

PELUSO, G.; PETILLO, O.; RANIERI, M.; SANTIN, M.; AMBROSIA, L.; CALABRÓ, D.; AVALLONE, B.; BALSAMO, G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*, v. 15, n. 15, 1994.

PENA, J.; IZQUIERDO-BARBA, I.; MARTÍNEZ, A.; VALLET-REGÍ, M. New method to obtain chitosan/apatite materials at room temperature. *Solid state sciences*, v. 8, pp 513 – 519, 2006.

POURBAIX, M. Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. Houston : NACE, 2. ed., 1974.

RAGHAVENDER, A.T.; BILISKOV, N.; SKOKO, Z. XRD and IR analysis of nanocrystalline Ni–Zn ferrite synthesized by the sol–gel method *Mater. Lett.*, v. 65, p. 677, 2011.

RIM, H. P.; MIN, K. H.; LEE, H. J.; JEONG, S. Y.; LEE, S. C. pH-Tunable Calcium Phosphate Covered Mesoporous Silica Nanocontainers for Intracellular Controlled Release of Guest Drugs. *Angew. Chem. Int.* v. 50, pp. 8853 –8857, 2011.

SHANNON, R. D.; PREWITT, C. T. Effective Ionic Radii in Oxides and Fluorides. *Acta Cryst.* v. 25, pp. 925 – 946, 1969.

SHIMBA, K.; TEZUKA, N.; SUGIMOTO, S. Magnetic and microwave absorption properties of polymer composites with amorphous Fe-B/Ni–Zn ferrite nanoparticles. *Materials Science and Engineering: B*, v. 177, pp. 251 – 256, 2012.

STÖHR, J. NEXAFS Spectroscopy, Second Printing Springer, 2003

TSAPATSARIS, N.; LANDSGESELL, S.; KOZA, M. M.; FRICK, B.; BOLDYREVA, E; BORDALLO, H. N. Polymorphic drugs examined with neutron spectroscopy: Is making more stable forms really that simple? *Chem. Phys.*, 427, 124 - 128, 2013.

USKOKOVIĆ, V.; DROFENIK, M.; BAN, I. The characterization of nanosized nickel-zinc ferrites synthesized within reverse micelles of CTAB/1–hexanol/water microemulsion. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 284, pp. 294–302, 2004.

VAYSSIÈRES, L.; CHANÉAC, C.; TRONC, E.; JOLIVET, J. Size Tailoring of Magnetite Particles Formed by Aqueous Precipitation: An Example of Thermodynamic Stability of Nanometric Oxide Particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 205, n. 2, pp. 205 – 212, 1998.

VENKATESAN, P.; PUVVADA, N.; DASH, R.; KUMAR, B. N. P.; SARKAR, D.; AZAB, B.; PATHAK, A.; KUNDU, S. C.; FISHER, P. B. ; MANDAL, M. The potential of celecoxib-loaded hydroxyapatite-chitosan nanocomposite for the treatment of colon cancer. *Biomater.*, 32, 3794 – 3806, 2011.

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.

WATTS, B.; ADE, H. NEXAFS imaging of synthetic organic materials. *Materials Today*, v. 15, pp. 148-157, 2012.

WATTS, B.; THOMSEN, L.; DASTOOR, P.C. Methods in carbon K-edge NEXAFS: Experiment and analysis. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, v. 151, 105–120, 2006.

WU, Y.; YANG, L.; SHI, X.; LI, I.; BIAZIK, J. M.; RATINAC, K. R.; CHEN, D.; THORDARSON, P.; SHIEH, D.; BRAET, F. The selective growth inhibition of oral cancer by iron core-gold shell nanoparticles through mitochondria-mediated autophagy. *Biomaterials*, v. 32, pp. 4565 – 4573, 2011.

YAN, H.; ZHANG, S.; HE, J.; YIN, Y.; WANG, X.; CHEN, X.; CUI, F.; LI, Y.; NIE, Y.; TIAN, W. Self-assembled monolayers with different chemical group substrates for the study of MCF-7 breast cancer cell line behavior. *Biomed. Mater.* v. 8, n. 035008, 2013.

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

YUAN, Y.; LIU, C.; QIAN, J.; WANG, J. ; ZHANG, Y. Size-mediated cytotoxicity and apoptosis of hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Biomater.* 31, 730 – 740, 2011.

ZHANG, C.; PATERSON, G. A.; LIU, Q. A new mechanism for the magnetic enhancement of hematite during heating: the role of clay minerals. *Studia Geophysica et Geodaetica*, v. 56, n. 3, pp 845-860, 2012.

ZHANG, Y.; VENUGOPAL, J.R.; EL-TURKI, A.; RAMAKRISHNA, S.; SU, B.; LIM, C.T. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 29, pp. 4314–4322, 2008.

ZHANG, Y.; YANG, M.; PORTNEY, N. G.; CUI, D.; BUDAK, G.; OZBAY, E.; OZKAN, M.; OZKAN, C. S. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells.

Biomed Microdevices, v. 10, pp. 321–328, 2008.

ZHANG, Z. J.; WANG, Z. L.; CHAKOUMAKOS, B. C.; YIN, J. S. Temperature Dependence of Cation Distribution and Oxidation State in Magnetic Mn-Fe Ferrite Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.*, v.120,p. 1800-1804, 1998

ZHAO D, WANG X, ZENG X, XIA Q, TANG J. Preparation and inductive heating property of Fe₃O₄-chitosan composite nanoparticles in an AC magnetic field for localized hyperthermia. *Journal of Alloys and Compounds* (2009), 477, 739 – 743.