

Patricia Oliveira Mello

Estudo da influência das
variáveis no Recobrimento de
nanopartículas magnéticas de
Ferrita
com Quitosana.

Orientadora: Prof^a Dr^a Margarida Juri Saeki

Botucatu 2014



Patricia Oliveira Mello

Estudo da influência das
variáveis no Recobrimento de
nanopartículas magnéticas de
Ferrita
com Quitosana.

Orientadora: Prof^a Dr^a Margarida Juri Saeki

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

Botucatu 2014

Dedicatória

À minha família que, mais do que apoio, foram responsáveis por cada impulso, que eu precisei, para continuar seguindo em frente.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*
Madre Tereza de Calcuta

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por sempre conduzir meu caminho e me dar forças, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai Euclécio que quando eu estava prestes a desistir, me pegou pela mão e me trouxe de volta ao caminho, estando sempre ao meu lado e oferecendo seus sábios conselhos para me ajudar com os obstáculos. À minha mãe Tânia, quem ouvia meus desabaços, me acalmava e incentivava. Com seu carinho e ternura fazia tudo parecer mais fácil de ser alcançado. Ao meu irmão Eduardo que com sua tranquilidade fazia meus problemas diminuírem de proporção. Ao Júnior, pelo amor, companheirismo e lealdade nos melhores e piores momentos.

A todos que me auxiliaram na execução deste trabalho, principalmente ao Msc. Murilo Longo Martins, ao meu amigo João Paulo Ruiz, ao Prof. Ramon Kaneno e em especial à minha orientadora Prof^a Dr^a Margarida Juri Saeki pela oportunidade, imensurável ajuda e por toda atenção.

A todos os professores que enriqueceram minha formação. Em especial aos Professores Giuseppina Pace Pereira Lima, Ney Lemke, José Luiz Rybarczyk Filho e Vladimir Eliodoro Costa, pessoas responsáveis não só por ensinamentos que contribuíram para minha formação intelectual, mas pessoas que abriram espaço para conversar sobre assuntos importantes para meu crescimento como pessoa, me auxiliando em momentos de dificuldade durante meu trajeto.

A todos os meus amigos da VII Turma, principalmente Marina, Thamiriz, Humberto, Lucas, Isabela e Ravan. E em especial a Helena, que trouxe para nossa turma esperança e energia renovada.

Resumo

O câncer é resultado de uma série de alterações genéticas que ocorrem ao acaso, não existindo casos geneticamente idênticos. A variedade de tipos de câncer origina-se dos diferentes tipos celulares, combinados a vasta possibilidade de mutações que desencadeia outras patologias, tornando a cura do câncer um grande desafio. Estes fatos conduzem à adoção de uma grande diversidade nas medidas terapêuticas e/ou condutas clínicas para seu diagnóstico e tratamento.

A utilização de nanopartículas magnéticas é uma alternativa interessante para diagnosticar tais doenças. Estas estruturas servem como agentes de contrastes em Imagens por Ressonância Magnética (IRM) ou Biossusceptometria de Corrente Alternada (BAC). Sendo possível utilizá-las também como agentes de terapia, carreando medicamentos anticancerígenos e/ou gerando calor (hipertermia). Por serem constituídas de material magnético, as nanopartículas podem ser manipuladas por um gradiente de campo magnético externo, resultando em muitas aplicações que envolvem o transporte e / ou imobilização em células alvo específicas. Resumindo, as nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas como marcadores para diagnóstico, carreadores e agentes de hipertemia para a terapia do câncer.

Neste trabalho a superfície de materiais magnéticos, ferrita de manganês e zinco, foi revestida com quitosana através do método de micela reversa, a fim de promover a incorporação seletiva dos nanocompósitos pelas células cancerígenas. Foram realizadas variações em parâmetros do processo de síntese desses nanocompósitos, sendo eles, a Proporção de Ferrita/Quitosana, Quantidade de Óleo, Quantidade Total de Água e Porcentagem de Ácido Acético, e essas amostras foram comparadas a um padrão, para analisar possíveis meios de otimização dessas estruturas. A condição que apresentou melhores resultados, que se manteve sendo a padrão, foi submetida a testes celulares primários com células cancerígenas, comprovando a absorção das nanopartículas pelas células.

Palavras – chave: nanocompósitos, nanopartículas, quitosana, ferrita, diagnóstico, terapia.

Abstract

Cancer is the result of a series of genetic changes that occur randomly, with no genetically identical cases. A variety of types of cancer stems from the different cell types, combined with vast possibility of mutations that trigger other diseases, making a cure for cancer a major challenge. These facts lead to the adoption of a wide diversity in the therapeutic measures and / or clinical procedures for its diagnosis and treatment.

The use of magnetic nanoparticles is an interesting alternative to diagnose such diseases. These structures serve as contrast agents for Magnetic Resonance Imaging (MRI) or alternate current biosusceptometry (BAC). It is also possible to use them as agents of therapy, carting anticancer drugs and / or generating heat (hyperthermia). Since it is formed by magnetic material, the nanoparticles can be manipulated by an external magnetic field gradient, leading to many applications involving the transportation and / or target specific cell immobilization. In short, the magnetic nanoparticles can be used as markers for diagnosis and carrier agents for hyperthermia cancer therapy.

In this work the surface of magnetic material, ferrite of manganese and zinc, was coated with chitosan by the method of reverse micelle in order to promote the selective incorporation of nanocomposites by cancer cells. Variations in parameters of the synthesis process of these nanocomposites were performed, namely, the ratio of ferrite / chitosan, Oil Volume, Total Water Volume and Percent of Acetic Acid, and these samples were compared to a standard, to analyze possible way to optimize these structures. The condition that presented the best results was that named standard. The primary cell tests with cancer cells proved the absorption of nanoparticles by cells.

Keywords: nanocomposites, nanoparticles, ferrite, chitosan, diagnosis, therapy.

Lista de Figuras

Figura 1 – Modelo esquemático de como acontece à formação dos dois tipos de micelas a) micela normal b) micela reversa. Figura Adaptada de Camilo (2006)	5
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo n o grau de polimerização. Figura Adaptada de Assis; Silva (2003)	6
Figura 3 – Esquematização das contribuições dos momentos orbitais do núcleo a) Momento Magnético Orbital b) Momento Magnético de Spin	7
Figura 4 – Esquema ilustrativo do processo de formação da Imagem por Ressonância Magnética. Figura Adaptada de Hobbie, 2007	10
Figura 5- Esquema do processo de síntese pelo método de micela reversa	13
Figura 6 – Difratoograma da amostra de $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ preparada por coprecipitação	17
Figura 7 - Imagem por MEV da amostra de $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ preparada por coprecipitação ..	18
Figura 8 – Imagens por MEV das nanopartículas de $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ revestidas com crescente quantidade de quitosana: (a) Amostra 1 (Proporção F/Q = 2/1) (b) Amostra 2 (Proporção F/Q = 1/1) (c) Amostra 3 (Proporção F/Q = 1/2).	19

Figura 9 – Imagens por MEV das nanopartículas de $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ revestidas, com diferentes quantidades de parafina no meio dispersor apolar: (a) Amostra 1 (50mL) e (b) Amostra 4 (100mL) 20

Figura 10 – Imagens por MEV das nanopartículas de $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ revestidas com quitosana, que foi diluída em diferentes quantidade de água: (a) Amostra 5 (1mL) (b) Amostra 6 (2mL) e (c) Amostra 1 (3mL) 21

Figura 11 – Imagens por MEV das nanopartículas de $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ revestidas com diferentes quantidades de ácido acético usado na solubilização da quitosana: (a) Amostra 7 (2%) (b) Amostra 1 (4%) e (c) Amostra 8 (10%) 21

Figura 12: Imagens de MEV por EDX para Fe para as células cancerígenas do cólon, mostrando o controle e o teste. (a) células do controle (b) células em contato com os nanocompósitos (c) EDX de Fe das células de controle e (d) EDX de Fe das células do tests 24

Figura 13: Imagens de MEV e EDX de Fe para células cancerígenas do cólon. (a) MEV de célula do controle (b) MEV de célula em contato com os nanocompósitos (c) EDX de Fe da célula de controle e (d) EDX de Fe da célula submetida ao teste 24

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros utilizados no recobrimento da ferrita com quitosana	14
---	----

Sumário

1 – Introdução	1
2 – Fundamentos	4
2.1 – Método de Micelas	4
2.2 - Propriedades Magnéticas dos nanocompósitos	7
3 – Objetivo	11
4 - Materiais e Métodos	11
4.1 – Preparação de compósitos	12
4.1.1 - Preparação da ferrita $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$	12
4.1.2 - Revestimento da ferrita $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ com quitosana	12
4.2 – Caracterização física do compósito	14
4.2.1 – Difractometria de Raio X (DRX)	14
4.2.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	15
4.4 – Teste com células cancerígenas do cólon	15
5 – Resultados e Discussão	16
5.1 – Influência da Proporção F/Q	18
5.2 – Influência da Quantidade de Parafina	19
5.3 – Influência da Quantidade total de Água	20
5.4 – Influência da Quantidade de Ácido Acético	21
5.5 – Teste com células tumorais do cólon (HCT 116).....	23
6 – Considerações Finais	25
7 – Proposta para trabalhos futuros	25
8 - Referências Bibliográficas	25

1 – Introdução

Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*) e Instituto Nacional do Câncer (INCA) definem "câncer" como células que se diferenciam das demais, crescendo rapidamente de forma desordenada (neoplasias). O acúmulo destas células cancerosas dá origem a tumores, que por sua vez podem migrar para tecidos próximos ou mesmo órgãos distantes, processo conhecido como metástase.

As células eucariontes, com as quais somos constituídos, são formadas basicamente por três partes: a membrana que é a parte mais externa da célula; o citoplasma, que é o corpo da célula; e o núcleo, que contém os cromossomos, os quais são compostos de genes. Os genes são por sua vez "arquivos" que guardam e fornecem instruções para a organização das estruturas, formas e atividades das células no organismo. Toda a informação genética encontra-se inscrita nesses genes, na forma de "memória química" em ácido desoxirribonucleico (DNA).

O fato de toda a informação genética estar dentro de cada célula proporciona grande versatilidade e autonomia, mas, por outro lado pode ser um risco, caso mutações genéticas que alteram o DNA aconteçam nas células. Assim, passarão a realizar funções de forma equivocada e essas células diferentes são denominadas de cancerosas.

A variedade de tipos de câncer origina-se dos diferentes tipos celulares. Por exemplo, é tratado como sarcoma se a origem do câncer acontecer nas células conjuntivas; quando se origina de células epiteliais o câncer é chamado de carcinoma. As causas são variadas, podendo ser externas como, por exemplo, traumas, exposição a agentes químicos ou biológicos, ou internas ao organismo como mudanças hormonais, hereditariedade, deficiência do sistema imunológico, entre outras (INCA, 2012).

A vasta combinação de mutações desencadeia outras patologias, tornando a cura do câncer um grande desafio. Após a célula sofrer mutações irreversíveis e se tornar cancerosa ela se multiplica mais rapidamente do que as normais devido à ausência de resposta a fatores de inibição de crescimento e evasão ao processo de apoptose (morte celular “programada”). Elas também poderão produzir novos vasos sanguíneos, chamados angiogêneses, e invadir tecidos saudáveis (INCA, 2012). Sendo as células tumorais pouco específicas em suas funções orgânicas, os tecidos invadidos acabam perdendo suas funcionalidades com o tempo e como consequência o órgão entra em falência. Esse é só o início do processo denominado carcinogênese que normalmente ocorre de forma lenta, podendo levar longos períodos até que as manifestações da doença sejam clinicamente observadas.

O câncer é resultado de uma série de alterações genéticas que ocorrem ao acaso, não existindo casos geneticamente idênticos. Cada tipo de câncer apresenta variados graus de malignidade e/ou agressividade de acordo com sua localização e os tipos celulares que lhe deram origem. Estes fatos conduzem à adoção de uma grande diversidade nas medidas terapêuticas e/ou condutas clínicas para seu diagnóstico e tratamento. Sendo assim, a diagnose e o tratamento clínico a serem empregados para conter a evolução, disseminação e possível eliminação do câncer são variados e requer cuidadosa seleção de uma ou mais intervenções, tais como: cirurgia(s), radioterapia(s), quimioterapia(s), transplantes entre outros.

Para determinados casos, o tratamento cirúrgico pode ser uma opção adequada. Entretanto os riscos são os mesmos que dos diversos procedimentos cirúrgicos como complicações durante a operação, alterações fisiológicas e mutilações. No caso do câncer de mama, as cirurgias consistem na remoção parcial ou total da mama e de nódulos linfáticos adjacentes. Esse procedimento, além de efeitos psicológicos como na auto-estima das pacientes, pode causar efeitos colaterais como, fraqueza e incomodo no braço adjacente a cirurgia, suor nas mãos, entre outros (Wang, et. al. 2011).

A radioterapia conta com fontes de radiação ionizante (eletromagnéticas ou corpusculares) que são utilizadas para extirpar ou impedir o crescimento tumoral em consequência das diversas reações químicas que restringem a multiplicação e/ou o funcionamento normal das células. Podem ser realizadas de forma externa ou cirúrgica (braquiterapia). No tratamento com radiação externa, um aparelho (elétrico, acelerador linear ou contendo radioisótopos) emite radiação sobre a região onde se encontra o tumor. Na braquiterapia, a radiação é aplicada através da introdução de um radioisótopo na região tumoral. Estes tratamentos podem atingir tecidos saudáveis circunvizinhos ao(s) tumor(es), causando efeitos indesejados.

As quimioterapias são tratamentos voltados para combater e eliminar tumores através do uso de antineoplásicos variados que causam efeitos citotóxicos em células tumorais inibindo a evolução do tumor por ataque a passos metabólicos essenciais à proliferação celular. Frequentemente são aplicados via venosa, podendo também ser administrados via oral, intramuscular, subcutânea, e outras. Quando administrados, os antineoplásicos se misturam aos fluidos corporais e são distribuídos sistemicamente, podendo atingir não somente o alvo pré-estabelecido ou ainda, a distribuição sistêmica pode não ocorrer da forma desejada. Nessas condições o fármaco atua tanto em células tumorais como também nas células saudáveis causando efeitos adversos. Seus efeitos terapêuticos também podem não ser plenamente alcançados sendo muitas vezes requisitadas doses elevadas de antineoplásicos.

A utilização de nanopartículas magnéticas é uma alternativa interessante para diagnosticar tais doenças. Estas estruturas servem como agentes de contrastes em Imagens por Ressonância Magnética (IRM) ou Biossusceptometria de Corrente Alternada (BAC), uma técnica ainda pouco experimentada para a detecção de células tumorais. Outra vantagem da utilização de nanopartículas magnéticas é que elas servem também como agentes de terapia, carreando medicamentos anticancerígenos e/ou gerando calor (hipertermia) (PANKHURST, et.al. 2003). Sendo as nanopartículas constituídas de material magnético, podem ainda ser manipuladas por um gradiente de campo magnético externo (guiadas até o local de interesse). Esta possibilidade de controle à distância, combinada com a penetrabilidade intrínseca de campos magnéticos em tecido humano, resulta em muitas aplicações que envolvem o transporte e / ou imobilização de nanopartículas magnéticas, ou entidades biológicas magneticamente marcadas por essas partículas (Wang, et. al. 2011).

Resumindo, as nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas como marcadores, para diagnóstico, e carreadores e agentes de hipertemia, para a terapia do câncer. Contudo, o desafio se encontra na obtenção de materiais com tamanho nanométrico e propriedades magnéticas adequados, respeitando as condições físicas (campo magnético, frequência, citotoxicidade e outras) que o organismo humano suporta. (AMERICO, et. al. 2010). Não menos importante, promover a incorporação seletiva dos materiais magnéticos pelas células do câncer é outro grande desafio.

Neste trabalho a superfície dos materiais magnéticos à base de $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$, desenvolvidos no grupo (MARTINS, et. al. 2014), foi modificada, afim de promover a incorporação seletiva destes pelas células cancerígenas.

Nos últimos anos, o polímero quitosana tem-se destacado nas diversas aplicações devido às características como não toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades antifúngicas e bactericidas (COSTA, et al, 2006). O uso desse polímero varia desde na engenharia de tecidos ósseos (MARTINO, SITTINGER e RISBUD, 2005; KONG et al, 2006) até carreadores de drogas e pode ser funcionalizados para promover interações específicas do tipo antígeno/anticorpo com drogas (FELT, BURI e GURNI, 1998). Componentes como anticorpos monoclonais, peptídeos, compostos magnéticos, hormônios, proteínas, lecitinas, entre outros, podem ser adicionados ao sistema de liberação de fármaco (DDS – Drug Delivery Systems) e direcioná-los a uma região específica.

Diversos métodos podem ser empregados para revestir nanopartículas magnéticas com quitosana. Dentre estes citam-se os métodos de emulsão, coacervação e precipitação (AKBUGA e DURMAZ, 1994), secagem com *spray* (HE, DAVIS e ILLUM, 1999), técnica

de micelas reversas, entre outras. Esta última tem como base a dissolução de um surfactante em solvente orgânico e posterior adição, sob agitação constante, de solução aquosa composta de quitosana e cerâmica a ser revestida. São formadas micelas reversas de formato esférico que, com a adição de solução alcalina e agente reticulante, adquirem estabilidade em sua conformação (BANERJEE et al, 2002). A grande vantagem deste método está na possibilidade de se obter nanoesferas com tamanhos uniformes e até inferiores a 10 nm (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA, e AMINABHAVI, 2004).

Além da possibilidade de serem guiadas, devido às propriedades magnéticas dos nanocompósitos, muitos medicamentos que têm problemas de estabilidade, insolubilidade em água, baixa seletividade, toxicidade elevada, efeitos secundários, entre outros, podem ser encapsuladas e transportadas. Os nanocompósitos à base de quitosana podem constituir um DDS, cuja vantagem é a liberação lenta e controlada de fármaco, evitando super ou sub dosagens, aumentando a eficácia e reduzindo a toxicidade para células sadias.

2 – Fundamentos

2.1 – Método de Micelas

Micelas são agregados moleculares, onde tanto as moléculas que as constituem (anfipáticas ou anfifílicas) como os agregados possuem ambas as partes ou regiões estruturais: hidrofílica e hidrofóbica. Dinâmica e espontaneamente as moléculas anfipáticas se associam formando agregados moleculares, geralmente globulares: se os agregados formarem em solução de constante dielétrica alta (polar), como a água, a micela se forma expondo a parte hidrofílica, para interagir com solvente polar, e a parte hidrofóbica é projetada para o interior da micela onde é estabilizada por interações do tipo van der Waals (ver Figura 1a); se a solução for apolar, forma-se a chamada micela reversa (Figura 1b).

Embora não sejam estequiométricos, as micelas são termodinamicamente estáveis e facilmente reproduzíveis: a tendência da região hidrofóbica de evitar contato com água (no caso da solução ser polar) leva à associação das moléculas em micelas para proteger o centro interno hidrofóbico e ao alinhamento da cabeça hidrofílica (capa) para atuar com a solução polar. Comportamento análogo e contrário é válido quando em contato com a solução apolar. Contudo por questões estéticas, esses agregados formam espontaneamente se o componente anfifílico estiver acima de uma determinada concentração, chamado concentração micelar crítica (CMC).

Qualquer que seja o tipo (micela normal ou reversa), podem seqüestrar soluções no seu interior, sendo que seu tamanho depende das condições do meio, cujas variáveis podem ser usados no controle do tamanho do agregado e no tamanho e forma do material a resultar da solução compartimentada interiormente. É usada freqüentemente na síntese de nanopartículas, sendo estas de menor diâmetro com estreita distribuição de tamanho quando comparadas com as preparadas por métodos convencionais de polimerização em emulsão (GOYMANN, 2004).

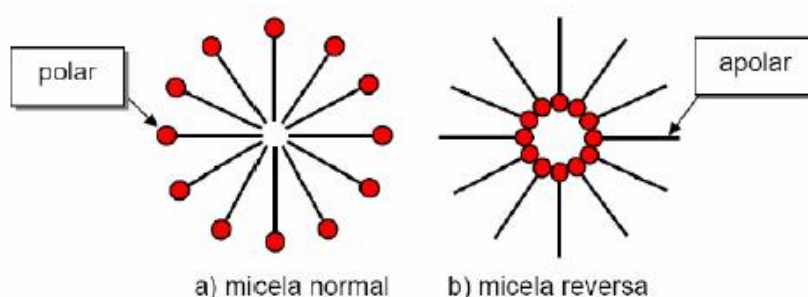


FIGURA 1: MODELO ESQUEMÁTICO DE COMO ACONTECE À FORMAÇÃO DOS DOIS TIPOS DE MICELAS
A) MICELA NORMAL, B) MICELA REVERSA. FIGURA ADAPTADA DE CAMILO (2006).

O método de micelas reversas pode ser usado para encapsular nanopartículas magnéticas com quitosana. A última é um polissacarídeo amino, derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos. Sendo assim, é considerado como segundo composto orgânico mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose. Enquanto a quitina é inerte e insolúvel, a quitosana é reativa e solúvel em ácidos fracos, podendo ser caracterizada como um polieletrólito catiônico, sendo geralmente purificada na forma neutra. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades β -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glucose (ou D-glucosamina). A fórmula molecular genérica pode ser expressa como $(C_6H_{11}O_4N)_n$ e está ilustrada na Figura 2. O encapsulamento pode ser feito a partir de uma suspensão de partículas magnéticas em solução de quitosana, produzindo um sistema de emulsões reversas de água em óleo, onde o meio de solubilização é um solvente apolar e as micelas são, dessa forma, de estrutura reversa.

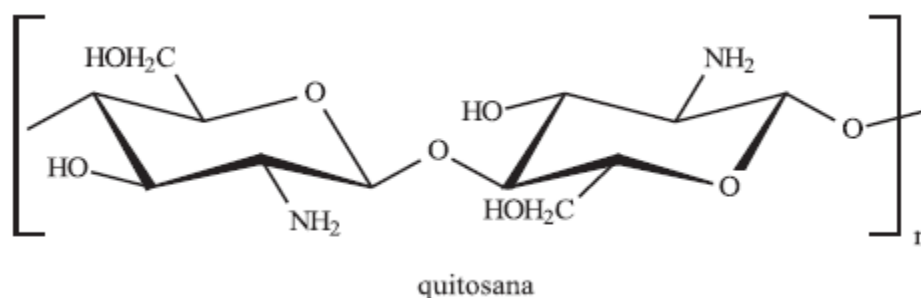


FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DA QUITOSANA, SENDO N O GRAU DE POLIMERIZAÇÃO. FIGURA ADAPTADA DE ASSIS; SILVA (2003)

O meio de solubilização apolar podem ser vários: parafina, óleo de soja, hexano etc, sendo a parafina uma substância de baixa toxicidade.

Surfactantes são substâncias conhecidas pela propriedade de melhorar a dispersão das micelas. São moléculas anfipáticas na essência que tendem a se distribuir nas interfaces entre as fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo) alterando as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. Surfactante é uma palavra que deriva da contração da expressão “surface active agent” (agente de atividade superficial) e a palavra "tensoativo" em português é usada para designar o mesmo tipo de substância. A propriedade fundamental e importante dos surfactantes é a tendência de diminuir a concentração micelar crítica (CMC) tornado seu uso adequado para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Em outras palavras, os surfactantes tendem a diminuir o tamanho das micelas. Normalmente, substâncias como ácidos graxos insaturados ou ácidos como sulfúrico, sulfônico e fosfórico ligados como substituinte de hidrocarboneto saturado ou insaturado são empregados como surfactante. (GEER, EYLAR e ANACKER, 1971).

2.2 – Propriedades magnéticas dos nanocompósitos.

Os nanocompósitos magnéticos são constituídos basicamente de um núcleo magnético, envolvido por uma camada polimérica com sítios ativos ou não, que podem ancorar metais ou compostos orgânicos seletivos. Estas partículas podem ser consideradas como materiais híbridos, orgânico – inorgânicos, com a particularidade de que suas propriedades, que não são encontradas nos materiais convencionais. As propriedades magnéticas dos nanocompósitos são resultado do seu núcleo magnético que é encapsulado.

O magnetismo é uma propriedade cuja natureza é de origem elétrica, e esta relacionada com carga em movimento, ou seja, as propriedades magnéticas dos materiais têm sua origem na estrutura eletrônica de seus átomos. São dois movimentos associados ao elétron e que podem explicar a origem dos momentos magnéticos: o movimento orbital do elétron ao redor do núcleo, e o movimento “spin” do elétron, ao redor do seu próprio eixo.

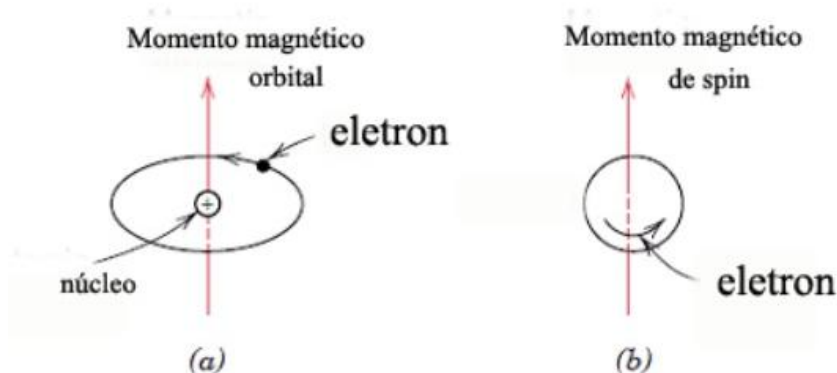


FIGURA 3: ESQUEMATIZAÇÃO DAS CONTRIBUIÇÕES DOS MOMENTOS ORBITAIS DO NÚCLEO. A) MOMENTO MAGNÉTICO ORBITAL B) MOMENTO MAGNÉTICO DE SPIN

Em cada átomo, os momentos magnéticos de orbital e de spin do conjunto de todos os elétrons se acoplam e, portanto, o momento magnético total de um átomo multieletrônico, é a soma dos momentos magnéticos de todos os seus elétrons, resultado das somas e cancelamentos das duas contribuições (spin e orbital).

Quando um material é submetido a um campo magnético externo (H), é originado, como resposta, um campo de magnetização do material (M). Uma vez que M resulta da aplicação de H , é aceitável que eles sejam proporcionais e a variável de proporcionalidade é a

$$\vec{M} = \chi \vec{H}$$

susceptibilidade magnética do material (χ). Cada material possui uma susceptibilidade magnética característica e, sendo assim, cada um responde ao campo magnético aplicado de uma forma diferente.

A maioria dos materiais exibe magnetismo reduzido e somente na presença de um campo magnético externo responde de maneira distinta interagindo e alinhando com os seus momentos de dipolo magnéticos. A susceptibilidade magnética de cada material permite classificá-los em 5 categorias: diamagnéticos, paramagnéticos, antiferromagnéticos,

ferromagnéticos e ferrimagnéticos. O prefixo refere-se à natureza das interações de ligação entre os dipolos dentro do material. (CULLITY, 1972; JILES, 1991).

- Materiais diamagnéticos: pequenos valores e negativos de χ (ou seja, o campo de magnetização opõe-se ao campo aplicado e desaparece quando se retira o campo aplicado). Ex.: Zn, Cd, Cu, Ag, Sn;
- Materiais Paramagnéticos: pequenos valores e positivos de χ (o campo de magnetização desaparece quando se retira o campo aplicado). Ex.: Al, Ca, Pt, Ti;
- Materiais Ferromagnéticos: χ é grande (>1). O campo de magnetização mantém-se quando se remove o campo aplicado. Ex.: Fe, o Ni e o Co;
- Materiais Antiferromagnéticos: $\chi=0$. Os dipolos magnéticos alinham-se antiparalelamente. Ex.: Mn, Cr;
- Materiais Ferrimagnéticos: os íons têm dipolos magnéticos de intensidade diferente. Logo existe sempre um momento resultante. Ex.: ferritas, magnetitas, em geral óxidos metálicos.

As ferritas de fórmula geral AB_2O_4 tem estrutura do tipo espinélio invertido, onde os cátions de valência $2+$ e $3+$ são distribuídos, respectivamente, nos sítios tetraédricos (A) e octaédricos (B) do retículo cristalino. Os vértices são ocupados por átomos de oxigênio (O^{2-}) formando um arranjo cúbico de face centrada. Considerando que a espécie O^{2-} é magneticamente neutra, as propriedades magnéticas dos espinélios dependem do tipo de cátion que ocupam tais sítios. (ZINIDARSIC e DROFENIC, 2000; DIAS et al., 2005; CALLISTER e WILLIAM, Ciência Engenharia de Materiais).

A classe das ferritas AF_2O_4 (ferrimagnéticos) reúne os principais quesitos de propriedades (químicas, físicas e biológicas) e custo para aplicação como biomarcador magnético. Para essa classe de material, espera-se que a espécie Fe^{3+} ocupe o sítio octaédrico onde os momentos de spin se alinham paralelamente ao campo aplicado. Entretanto, este cátion pode ocupar um sítio tetraédrico, quando os momentos se alinham antiparalelamente e

a magnetização líquida reduz em consequência do seu cancelamento com os do outro sítio. Essa inversão na ocupação de sítios é frequente e depende da composição e método de preparação. As ferritas são então desenvolvidas modificando, entre outras variáveis, as experimentais para otimizar a susceptibilidade magnética.

No que concerne à obtenção de materiais com propriedades estruturais e magnéticas adequadas, trabalhos com tal objetivo estão em curso em um grupo de pesquisa da mesma equipe no Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Unesp Botucatu. Em detalhes, desenvolvem-se ferritas de manganês e zinco de fórmula geral $Mn_xZn_{(1-x)}Fe_2O_4$, onde $0,15 \leq x \leq 0,30$, monofásica, com baixa impureza e baixa porosidade para minimizar as perdas magnéticas (MARTINS, et. al. 2014).

A elevada área superficial e as propriedades magnéticas das nanopartículas magnéticas podem limitar possíveis aplicações como biomaterial, ou ainda como materiais catalíticos e em remediações ambientais. Atribui-se o fato à rápida oxidação e hidrólise provocada pelo ambiente ou pelas condições experimentais convencionais, além da fácil agregação, ou seja as nanopartículas tendem a se juntar, formando aglomerados. Uma solução para este problema pode ser o recobrimento dessas partículas magnéticas com materiais poliméricos ou inorgânicos biocompatíveis. Além de atender as vantagens de recobrir, a quitosana possui uma estrutura linear com grupos amino livres abundantes, promovendo uma reticulação iônica com íons multivalentes, permitindo ligações químicas com diferentes moléculas, que poderão ser agregadas para funcionalizar a superfície, servindo de sítios de interação com células alvo.

A presença de resposta à magnetização destas partículas possibilita sua aplicação como agentes de contraste na formação de imagens por ressonância magnética nuclear (IRMN) (PANKHURST, et.al. 2003) e Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC), uma técnica pouco experimentada para a detecção de células tumorais.

A última técnica foi originalmente desenvolvida para avaliar funções gástricas e se baseia no trânsito ou acúmulo de um material magnético em um determinado tecido. Ao aplicar um campo magnético alternado externo, variações de fluxo magnético, devido à presença material magnético, são captadas por bobinas de indução as quais são instaladas em diversas posições do corpo.

A Ressonância Magnética baseia-se no comportamento de núcleos atômicos em um campo magnético, em particular, na orientação e movimento do momento magnético do núcleo no campo. Ela é o resultado da diferença na intensidade do sinal que cada tecido produz em resposta ao pulso da radiofrequência. Primeiramente, um campo magnético forte é usado para polarizar parcialmente os momentos dos prótons. Um pulso de radiofrequência (RF) é então aplicado para alterar o estado fundamental dos prótons e durante esse pulso, alguns dos sinais da radiofrequência são absorvidos pelos prótons causando o “flip” (estado de energia mais alto) no campo magnético. Ao final do pulso, os prótons relaxam voltando para um estado de energia mais baixo liberando uma radiação eletromagnética. Seu sinal é então registrado na bobina e convertido numa imagem.

Os fatores que governam a técnica de IRMN são basicamente a densidade de prótons e

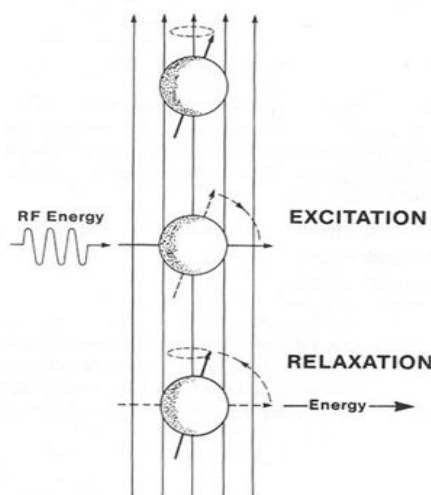


FIGURA 4: ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DA IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA. FIGURA ADAPTADA DE HOBIE, 2007.

o tempo de relaxação magnética, e o desequilíbrio desses fatores, ao ser detectado, é registrado como imagem.

O desenho de novos agentes de contraste é de grande interesse tendo em vista a possibilidade do mesmo material produzir contraste adequado para BAC e IRMN e gerar calor necessário para destruir o tecido maligno quando submetido a um campo magnético alternado de baixa frequência. No caso do RMN, o mesmo material (composto à base de nanopartículas magnéticas) e o mesmo equipamento de IRM (devidamente modificado para a aplicação de campos alternados) sejam utilizados sequencialmente para diagnóstico e terapia em uma única sessão.

3 – Objetivo

O presente trabalho teve por objetivo modificar a superfície da ferrita de manganês e zinco de fórmula $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$, preparado por coprecipitação, encapsulando-a com quitosana. Em especial, objetivou determinar as melhores condições para encapsular estudando a influência das variáveis que afetam na formação de micelas.

4 – Materiais e Métodos

Os reagentes utilizados na síntese foram:

- $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma, 97,0%)
- $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, 99,0%)
- $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, 98%)
- NaOH (Aldrich, P.A.)
- Quitosana (Aldrich, P.A.)
- Ácido Acético (J.T. Baker, 99,8%).
- Parafina (Sigma-Aldrich, P.A.)
- Ácido Oleico (Aldrich, P.A.)
- Glutaraldeído (Aldrich, P.A.)

A água utilizada tanto para lavagem dos materiais como para a preparação das soluções foi aquela purificada pelo sistema de marca Millipore, modelo Direct-Q ou obtida no sistema Elga, modelo Purelab Ultra água. A resistividade da água proporcionada era de $18,3 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

4.1 – Preparação de compósitos

4.1.1 - Preparação da ferrita $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$

A síntese da ferrita de composição nominal $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ consistiu primeiramente da dissolução de quantidade estequiométrica dos sais: $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, em água. Separadamente, foi preparada uma solução de NaOH a 0,1mol/L, a qual foi aquecida a $90^\circ\text{C} \leq T \leq 100^\circ\text{C}$. A solução contendo os cátions Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} foi então adicionada lentamente sob agitação à solução de NaOH e, posteriormente, mantida aquecida durante 1h. Após resfriar, as partículas foram lavadas decantando-as com o auxílio de um imã e descartando a solução sobrenadante até que o pH da solução atingisse um valor próximo a 7,0. A concentração da suspensão final foi controlada para que tivesse 40mg/mL em ferrita. As partículas foram submetidas à caracterização física mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), teste de magnetização e estudo reológico (pH isoelétrico). Tanto a preparação da ferrita como a caracterização foi conduzido pelo aluno de Iniciação Científica, João Paulo Ruiz Lúcio de Lima Parra, e de doutorado Murillo Longo Martins (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, UNESP).

4.1.2 - Revestimento da ferrita $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com quitosana

O método utilizado para recobrir as nanopartículas de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ foi o de micela reversa. Escolheu-se esse método por permitir o "co-encapsulamento" de droga apolar como o taxol (paclitaxel), considerado um antitumoral eficiente e indicado para tratamento de carcinomas avançados e como coadjuvante com quimioterapia no câncer de mama. (Maitra, et. al. 1999 e Mertins, 2008)

Inicialmente, foram preparadas duas soluções ou misturas. A primeira delas consistiu da dissolução da quitosana numa solução de água e ácido acético. Quando a dissolução se completou adicionou-se a ferrita, mantendo a mistura sob agitação. A suspensão resultante foi denominada de Mistura A. Variou-se a quantidade de ácido acético e o volume de água utilizado, conforme indicada na Tabela 1.

Em outro recipiente, o ácido oleico (surfactante) foi disperso em parafina (solvente apolar). Essa mistura é submetida à agitação intensa até ficar homogênea. A Mistura A contendo material magnético e polímero é então adicionada a esta solução apolar para a formação das micelas, os quais foram mantidas sob uma agitação vigorosa.

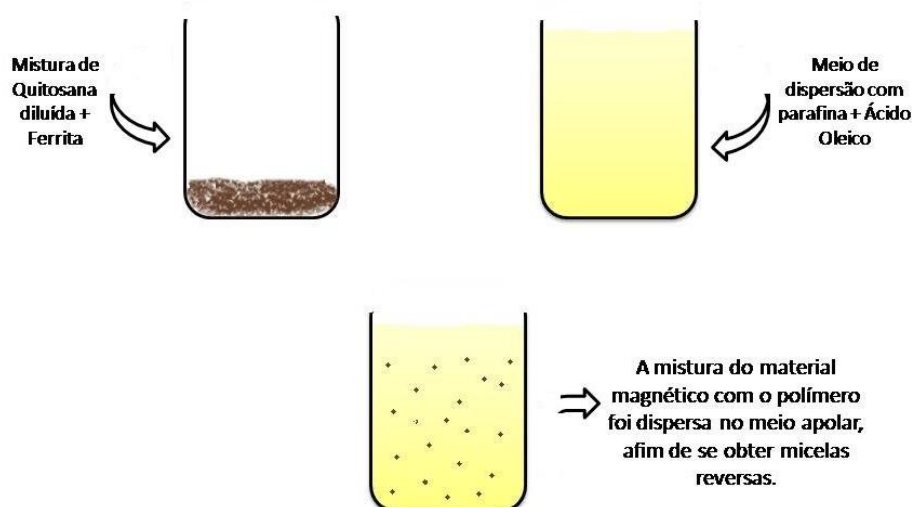


FIGURA 5: ESQUEMA DO PROCESSO DE SÍNTESE PELO MÉTODO DE MICELA REVERSA

Quando as partículas estavam dispersas, adicionou-se o glutaraldeído. A agitação foi diminuída, para apenas manter o material suspenso. Após duas horas de reação, para reticulação com glutaraldeído, a amostra foi lavada com álcool e submetida à sedimentação por centrifugação (marca Jouan, modelo 1812) com uma velocidade de aproximadamente 7500rpm, por cerca de 5 minutos a 12°C. O sobrenadante foi então descartado. Repetiu-se duas vezes esse procedimento de lavagem. Em seguida, lavou-se da mesma maneira com acetona e clorofórmio e secou-se em estufa para eliminação dos solventes.

Os parâmetros variados na preparação do compósito foram quatro: proporção Ferrita/Quitosana, quantidade de parafina, porcentagem de ácido acético e quantidade total de água, conforme indicados na Tabela 1, a fim de estudar a influência destas variáveis na morfologia do compósito resultante.

TABELA 1: PARÂMETROS UTILIZADOS NO RECOBRIMENTO DA FERRITA COM QUITOSANA.				
Amostra	Proporção em massa F/Q	Quantidade de Parafina (mL)	Quantidade Total de Água (mL)	Porcentagem de Ácido Acético (%)
1	2/1	50	3	4
2	1/1	50	3	4

3	$\frac{1}{2}$	50	3	4
4	2/1	100	3	4
5	2/1	50	1	4
6	2/1	50	2	4
7	2/1	50	3	2
8	2/1	50	3	10

As amostras assim obtidas foram submetidas a seguintes análises: (i) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), para análise morfológica e (ii) testes biológicos com células do câncer do cólon.

4.2 - Caracterização física do compósito

4.2.1 - Difratometria de Raios X (DRX)

A formação da ferrita sob estrutura de espinélio, para o material preparado conforme o procedimento descrito no item anterior, foi verificada mediante difratometria de raios X (DRX) utilizando um equipamento da marca Rigaku, modelo Ultima VI (radiação K_{α} do cobre de comprimento de onda $1,5452\text{\AA}$, munido de monocromador) do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do IPEN, sob colaboração do Prof. Luis Gallego Martinez e doutorando Rodrigo Ichikawa (Programa de Pós-graduação em Tecnologia Nuclear, USP/IPEN). Para obtenção de padrões de difração com intensidades adequadas, as medidas foram feitas no modo de tempo fixo, com tempo de coleta de 2s e passo de 0,02 graus, variando o ângulo de análise (2θ) de 10 a 100 graus. A identificação das fases presentes nas amostras foi feita confrontando-se o perfil de difração experimental com os perfis do banco de padrões de difração para estruturas cristalinas ICCD (Versão PDF-2).

4.2.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras preparadas conforme o procedimento descrito no item anterior foram dispersas em álcool isopropílico com o auxílio do banho ultrassônico (Unique, modelo USC 1800). Pequenas gotas foram colocadas sobre lamínulas de vidro, colada sobre a base ("stub") em alumínio. As amostras foram então secas, metalizadas com ouro (Au) numa espessura de 30nm num equipamento da Balzers, modelo MED 010, e analisadas num microscópio eletrônico de varredura marca FEI, modelo Quanta 200, equipado com detector de elétrons secundários, elétrons retroespalhados e energia dispersiva de raios X (EDX). Para a construção de imagens foi utilizada o detector de elétrons secundários (Everhart-Thornley); para análise semiquantitativa dos elementos utilizou-se um detector de EDX da Oxford, modelo Inca 250P20, onde os elétrons foram acelerados a uma diferença de potencial de 25kV.

4.3 - Teste com células cancerígenas do cólon

O compósito magnético foi suspenso em uma solução de NaCl a 0,7%, esterilizado em uma autoclave e diluído em uma solução tampão fosfato salino (PBS) estéril. Em seguida foi adicionado à cultura (sobre lamínula) de células cancerígenas do cólon (HCT 116) em quantidade suficiente para uma concentração de 100µg/mL de nanocompósito e mantida em contato com as células por 2h a 37°C para verificar a afinidade. Após 2h, uma solução de glutaraldeído (2,5%) foi adicionado ao meio para fixar e interromper a atividade celular e nela mantido por pelo menos 24h. A amostra foi então desidratada usando uma sequência de soluções com teor crescente de álcool etílico (de 7,5% a 100%) e submetido à secagem acima do ponto crítico (secagem supercrítica) em CO₂ (num equipamento da Balzers, modelo CPD 020). Os espécimes foram metalizados com ouro (Balzers, modelo MED 010) e examinados no Microscópio Eletrônico de Varredura da FEI, modelo Quanta 200, usando detector de elétrons secundários (Everhart-Thornley) e de EDX (potencial de aceleração, 25kV).

Como controle negativo, o teste foi feito da mesma maneira com células HCT 116, porém sem o contato com os nanocompósitos.

Em tempo, as células HCT 116 foram cultivadas sobre lamínula, no dia anterior ao teste, a 37°C. A lamínula foi previamente revestida com polilisina (DEDAVID, GOMES e MACHADO 2007) e colocada em poços da placa de cultura. A cultura foi mantida em solução tampão fosfato salino (PBS) obtendo, após um dia, lamínulas com cerca de 10^4 células.

A metodologia para o teste com células cancerígenas foi desenvolvido pelo Prof. Ramon Kaneno do Departamento de Imunologia e Microbiologia do IB, bem como todos os testes biológicos foram realizados com sua colaboração.

5 – Resultados e Discussão

Inicialmente, a ferrita $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sintetizada conforme o procedimento descrito no item 4.1.1 foi caracterizada por difração de raios X. O padrão obtido está na Figura 6. Comparando com os perfis do banco de padrões, foi identificado como sendo de estrutura tipo espinélio de grupo espacial $\text{Fd}3\text{m}$, similar ao ICSD 28515 (PDF – 742401, referente ao $\text{Mn}_{0,6}\text{Zn}_{0,4}\text{Fe}_2\text{O}_4$). O deslocamento dos picos para maior ângulo em relação ao da ficha citada pode ser esperado uma vez que os raios iônicos do Mn^{2+} e Zn^{2+} tetraedricamente coordenados são, respectivamente, 0,49Å e 0,60Å e ferrita deste trabalho é mais rica em Mn^{2+} . Embora exiba ainda grande desordem estrutural em função da baixa temperatura de tratamento, caracterizado pelos picos ainda largos, a amostra é monofásica em ferrita.

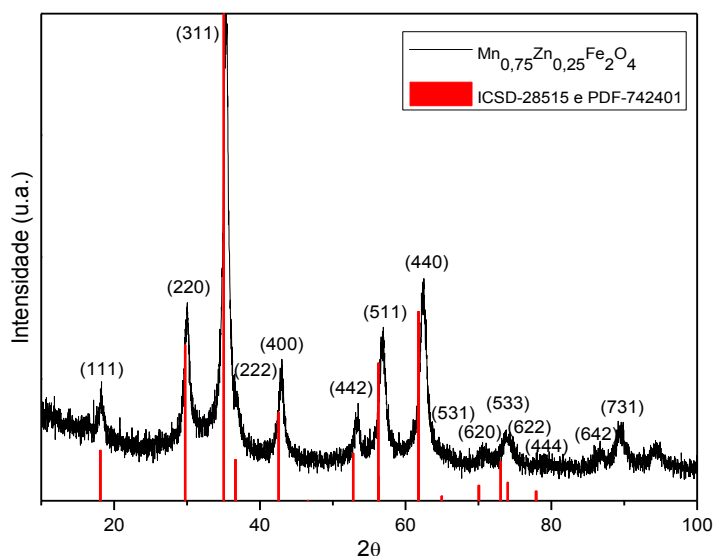


FIGURA 6: DIFRATOGRAMA DA AMOSTRA DE $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ PREPARADA POR COPRECIPITAÇÃO.

Com base nos dados do pico referente ao plano (400) da ferrita e equação de Scherrer, o tamanho médio dos cristalitos (d) que constituem as partículas do material foi estimado. Dado a equação de Scherrer,

$$d = \frac{K\lambda}{(FWHM)\cos\theta}$$

onde K é uma constante numérica com valor aproximado de 0,93, λ é o comprimento de onda da radiação utilizada (1,5452Å), FWHM é a largura do pico à meia altura (*Full Width at Half Maximum*, dado em radianos) e θ é ângulo de Bragg.(CULLITY, 1978), o tamanho calculado foi de 13nm.

Em seguida, o material acima foi analisado por MEV, cuja imagem está na Figura 7. Nota-se que as partículas são esféricas com tamanho de cerca de 100-200nm. Uma característica marcante é a uniformidade no tamanho, com distribuição bastante estreita. Lembrando que o tamanho dos cristalitos é de 13 nm, significa que as partículas são constituídas por uma média 80-90 cristalitos.

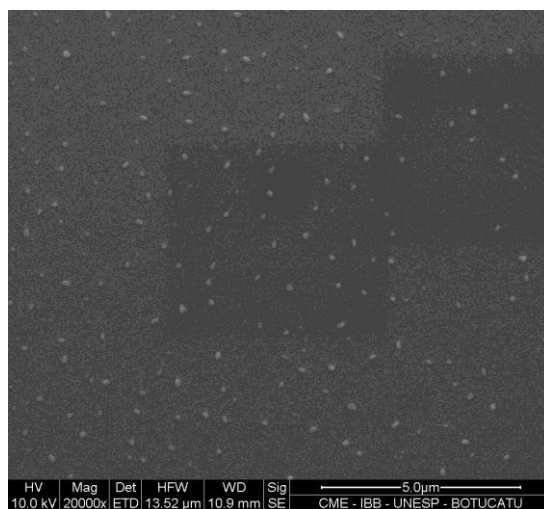


FIGURA 7: IMAGEM POR MEV DA AMOSTRA DE $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ PREPARADA POR COPRECIPITAÇÃO

A área mostrada na Figura 7 (magnificação: 20 mil vezes) foi integralmente mapeada com EDX, acompanhando a variação na concentração de ferro, manganês ou zinco. Vale comentar que o contraste devido a variação na quantidade desses elementos nos pontos em

que claramente as nanopartículas estão presentes não foi notado. Este contraste não foi observado nem mesmo com magnificação menor: de 5 mil e 1 mil vezes, indicando que a internalização das nanopartículas pelas células não serão notadas se a concentração de partículas nas células for semelhante a da Figura 7.

5.1 – Influência da Proporção Ferrita/Quitosana (F/Q)

A Figura 8 mostra as imagens das nanopartículas recobertas com quantidade de quitosana crescente, ou seja, nas proporções em massa 2/1, 1/1 e 1/2 de ferrita/quitosana.

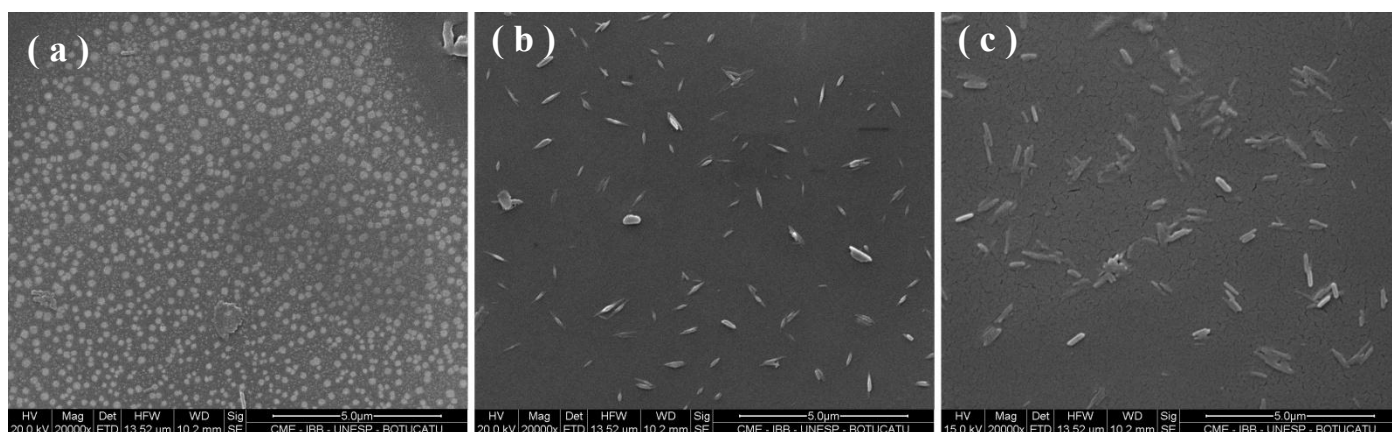


FIGURA 8: IMAGENS POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ REVESTIDA COM CRESCENTE QUANTIDADE DE QUITOSANA

(A) AMOSTRA 1 (PROPORÇÃO F/Q=2/1); (B) AMOSTRA 2 (PROPORÇÃO F/Q=1/1) (C) AMOSTRA 3 (PROPORÇÃO F/Q=1/2)

Na amostra com proporção 2/1, as partículas de nanocompósitos são globulares e dispersas, quando comparadas com as das amostras feitas sob proporção de 1/1 e 1/2, as quais tem formato alongado, que aumentam de tamanho e se agregam com o aumento da quantidade de quitosana. Essa mudança de formato e aumento do tamanho dos nanocompósitos com o excesso de quitosana pode ser explicada com o seguinte: enquanto a quitosana se encontra em baixa quantidade, o polímero se limita a encapsular a ferrita, formando uma camada sobre a superfície da nanopartícula magnética seguindo seu formato esférico (comparar Figura 7 e 8a). À medida que a quantidade de polímero superar o necessário para encapsular o núcleo magnético, a quitosana tende a adquirir seu formato natural. Quanto maior a quantidade do polímero, menor é a influencia do material magnético e o formato das partículas se torna mais alongado.

5.2 – Influência da Quantidade de Parafina

Na amostra que corresponde a imagem da esquerda (Figura 9a), o volume de parafina utilizado como meio dispersor foi 50 mL. Esta quantidade foi dobrada na amostra correspondente à imagem da Figura 9b. Vale esclarecer que este meio dispersor contém ácido oleico como surfactante. Assim, para manter a proporção solvente/surfactante uniforme, a quantidade do ácido oleico foi também dobrado ao aumentar a da parafina de 50 mL para 100 mL.

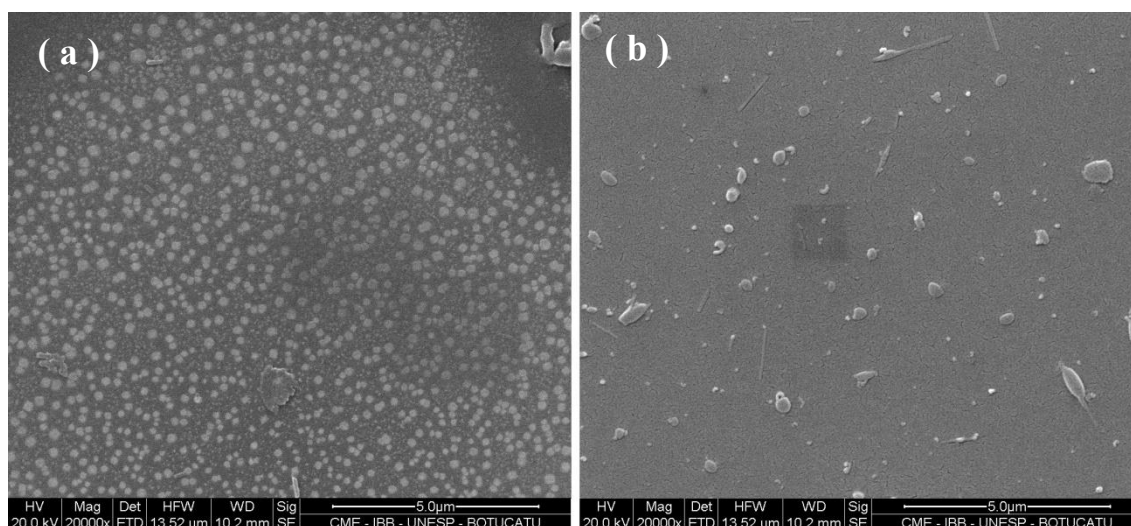


FIGURA 9: IMAGENS POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE $Mn_{0.75}Zn_{0.25}Fe_2O_4$ REVESTIDA COM DIFERENTES QUANTIDADES DE PARAFINA NO MEIO DISPERSOR APOLAR: (A) AMOSTRA 1 (50 ML) E (B) AMOSTRA 4 (100ML)

A imagem mostra que o formato das partículas é semelhante (globular) e que, embora o tamanho seja semelhante, a dispersão no tamanho é maior quando a quantidade de parafina é maior, contrário ao esperado. A agitação para homogeneização do polímero e ferrita no meio dispersor pode não ter sido eficiente, já que o volume aumentou. Adicionalmente, como a quantidade de parafina e ácido oleico foi maior, o processo de lavagem usando a centrifuga para extrair o óleo foi feito com mais repetições, o que pode ter acarretado uma maior perda no final alterando a distribuição no tamanho.

5.3 – Influência da Quantidade total de Água

A Figura 10 mostra a imagem dos compósitos obtidos solubilizando-se quitosana com diferentes quantidades de água. Nota-se que à medida que a quantidade de água é diminuída a quantidade de partículas de compósitos de formato alongado aumenta, bem como o tamanho médio. Quanto menor a quantidade de água, maior é a viscosidade e ao mesmo tempo, menor é o volume da solução de quitosana. Assim, a influência do núcleo magnético para formar compósito globular, bem como a eficiência no recobrimento são prejudicados com a diminuição da água. Amostra 1, na qual utilizou-se 3mL de água, tem o formato esférico e melhor dispersão das partículas, sendo favorável como biomaterial com aplicação pretendida.

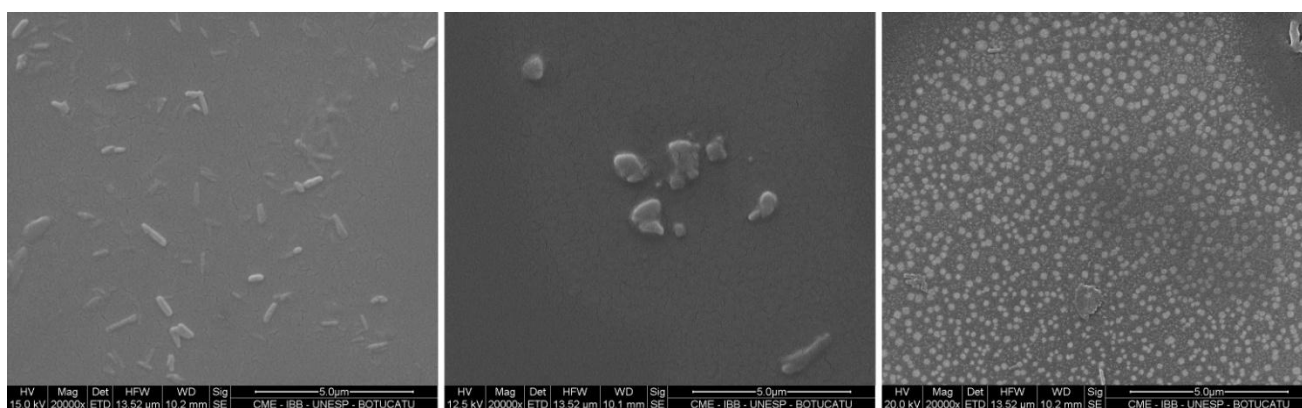


FIGURA 10: IMAGENS POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ REVESTIDAS COM QUITOSANA, QUE FOI DILUÍDA EM DIFERENTES QUANTIDADES DE ÁGUA: (A) AMOSTRA 5 (1ML) (B) AMOSTRA 6 (2ML) E (C) AMOSTRA 1 (3ML)

5.4 – Influência da Quantidade de Ácido Acético

Assim como a quantidade de água, a porcentagem de ácido acético afeta a solubilização da quitosana. Na amostra correspondente à imagem da esquerda da Figura 11, a porcentagem de ácido acético foi de 2%, menor que quando comparada com a usada para

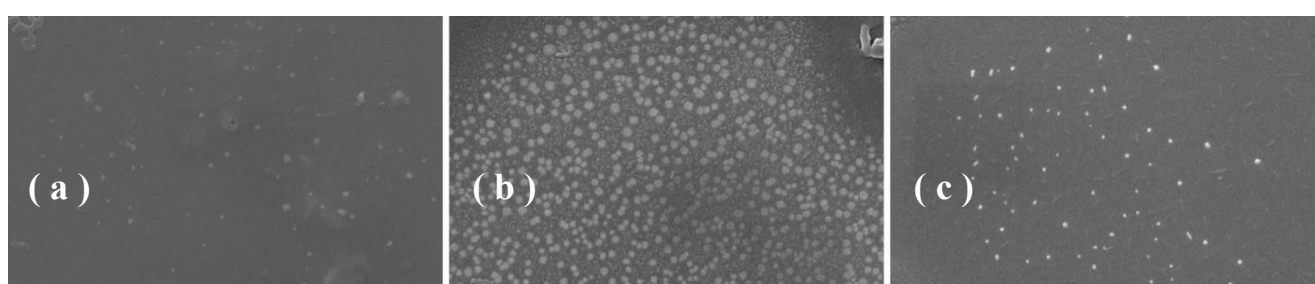


FIGURA 11: IMAGENS POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE $Mn_{0,75}Zn_{0,25}Fe_2O_4$ REVESTIDA COM DIFERENTES QUANTIDADES DE ÁCIDO ACÉTICO USADO NA SOLUBILIZAÇÃO DA QUITOSANA: A) AMOSTRA 7 (2%) B) AMOSTRA 1 (4%) E C) AMOSTRA 8 (10%)

amostra da imagem do meio, na qual foi colocado 4% de ácido acético. Isso indica que, sendo a quantidade de ácido baixa, a solubilização da quitosana pode ser comprometida, afetando assim a eficiência do recobrimento do núcleo magnético.

Por outro lado, o aumento na quantidade de ácido acético para 10% fez com que o tamanho médio do nanocompósito diminuísse. Não obstante, notou-se a formação simultânea de compósitos de formato alongado. Sabe-se que a solubilização da quitosana em solução aquosa de ácido acético se dá pela protonação do grupo amino, formando grupos carregados positivamente ($-\text{NH}_3^+$) ao longo da cadeia polissacarídica. Em tempo, as medidas de potencial zeta feitas num equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern (IQSC, USP, São Carlos) revelaram que o pH isoeletrico das nanopartículas magnéticas sintetizadas conforme descrito no item 4.1.1 está em torno de $\text{pH}=4$. Significa que, abaixo deste pH tais partículas têm carga positiva e acima, carga negativa. O aumento na concentração de ácido acético na solução provavelmente fez com que as partículas adquirissem carga positiva e que experimentassem repulsão eletrostática com as cadeias de quitosana, diminuindo a eficiência do recobrimento. Pode-se notar que as partículas mais claras da Figura 11c assemelham-se às da Figura 7. Em outras palavras, é possível que as partículas magnéticas não estejam recobertas e que a quitosana tenha se estruturado separadamente em partículas de formato alongado.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a melhor condição para recobrir as nanopartículas magnéticas de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com quitosana por meio do método de micela reversa é usando a proporção de ferrita/quitosana igual a 2/1, quantidade de parafina de 50mL, água total sendo 3mL e 4% em ácido acético.

A caracterização magnética desse nanocompósito, feita pelo doutorando Murillo Longo Martins, a 300K num equipamento Quantum Design Magnetometer, no LaMMB – MagLab em Helmholtz-Zentrum, Berlin (HZB), revelou que o material tem uma magnetização de saturação (máxima magnetização) de 50 a 55 emu/g (MARTINS et.al., 2014). O resultado é promissor se compararmos com o valor obtido por Shi et. al.. de 55 emu/g e ~ 5 emu/g para amostras de Fe_3O_4 sem e com recobrimento de quitosana, respectivamente (SHI et.al., 2012).

Assim, o nanocompósito de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ com quitosana, sintetizado sob a condição acima, foi testado quanto a interação com as células cancerígenas do cólon.

5.5 – Teste com células tumorais do cólon (HCT 116)

A Figura 12 mostra imagens obtidas após as células cancerígenas do cólon HCT 116 serem incubadas por 2h na presença e ausência (controle negativo) de nanocompósitos que estavam a 100µg/mL e respectivos resultados de mapeamento de ferro. Observando essas imagens, é possível afirmar que:

- (i) o procedimento desenvolvido para o teste é adequado uma vez que, o ferro, proveniente do sangue não foi detectado nas células do teste controle;
- (ii) houve incorporação do nanocompósito de $\text{Mn}_{0,75}\text{Zn}_{0,25}\text{Fe}_2\text{O}_4$ e quitosana pelas células HCT 116;
- (iii) Analisando a imagem de uma das células obtida com uma magnificação maior (5000 vezes, ver Figura 13) nota-se que a incorporação se deu na forma de secreção de alguma substância para interagir e fixar a ferrita revestida no corpo da célula. Não se observou a internalização propriamente dita, ao menos em 2h de contato, o que era esperado uma vez que as células cancerígenas do cólon não são células fagocíticas. A secreção não foi observada em células que não estiveram em contato com o compósito;
- (iv) a detecção de ferro por EDX em algumas células indica que houve um acúmulo substancial do compósito. Cabe lembrar que o compósito não foi detectado quando estava espalhado sobre a lamínula, sem a célula. Indica, por outro lado que, o fato de não ter sido detectado em algumas células, não significa que não foi por elas incorporado.

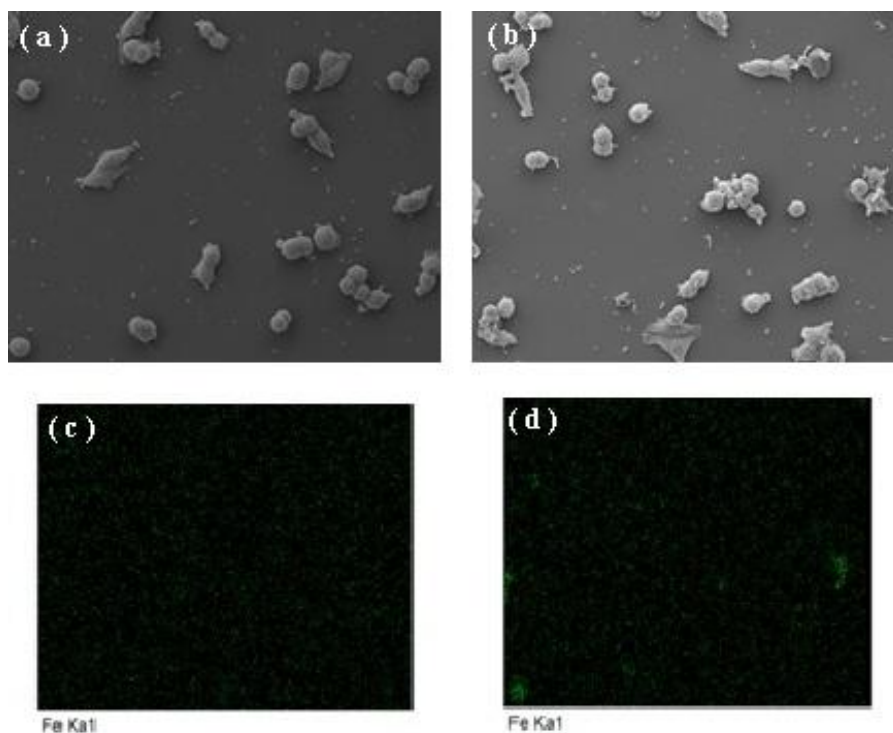


FIGURA 12 : IMAGENS DE MEV E MAPEAMENTO POR EDX PARA FE PARA AS CÉLULAS CANCERÍGENAS DO CÓLON: (A) CÉLULAS DO CONTROLE NEGATIVO (B) CÉLULAS EM CONTATO COM OS NANOCOMPÓSITOS (C) EDX DE FE DAS CÉLULAS CONTROLE E (D) EDX DE FE DAS CÉLULAS DO TESTE.

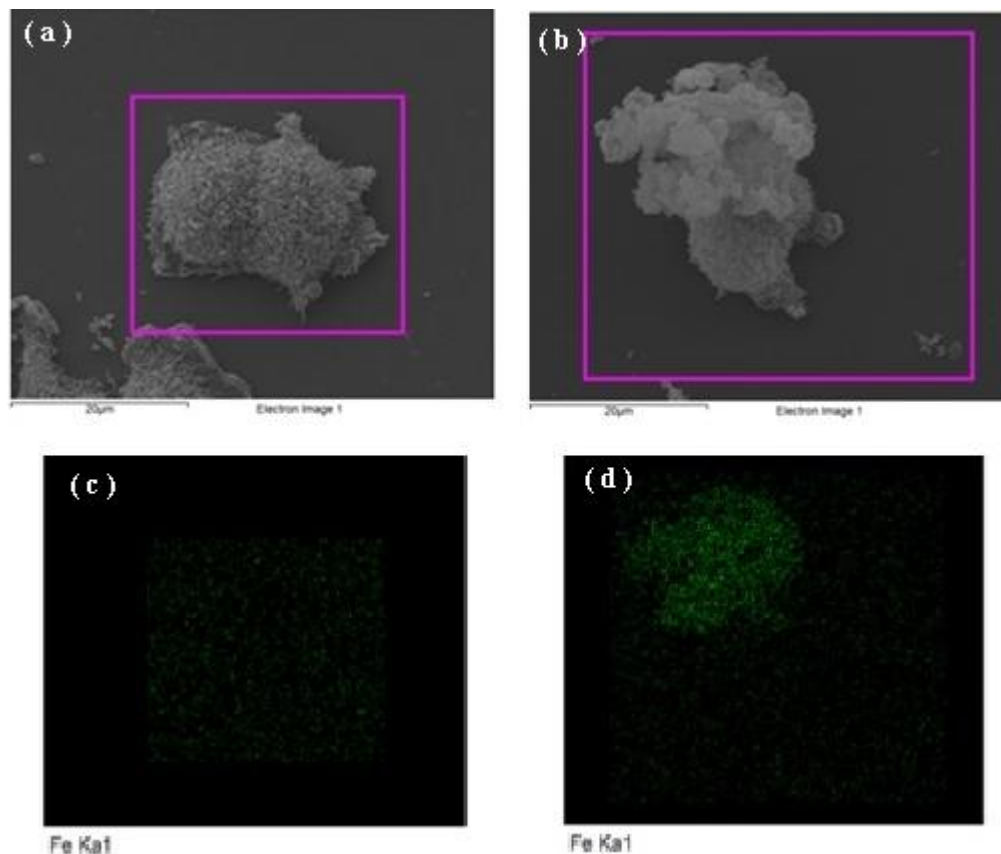


FIGURA 13: IMAGENS DE MEV E EDX DE FE PARA CÉLULAS CANCERÍGENAS DO CÓLON. (A) MEV DE CÉLULA DO CONTROLE (B) MEV DE CÉLULA EM CONTATO COM OS

*NANOCOMPÓSITOS (C) EDX DE FE DA CÉLULA DE CONTROLE E
(D) EDX DE FE DA CÉLULA SUBMETIDA AO TESTE.*

6 – Considerações Finais

Mediante o objetivo proposto, de estudar a influência das variáveis experimentais para o encapsulamento da ferrita com quitosana usando o método de micelas reversas, as condições para promover o adequado recobrimento foi determinado.

As nanopartículas magnéticas assim recobertas foram submetidas ao teste de interação com células cancerígenas do cólon, cujo resultado sugeriu que houve interação com o acúmulo substancial do nanocompósito junto às células tumorais.

7 – Proposta para trabalhos futuros

Uma vez que no presente trabalho foram analisados a influência de apenas alguns dos parâmetros da síntese dos nanocompósitos, propõem-se como possíveis trabalhos futuros o estudo da influência dos demais parâmetros, como por exemplo, temperatura da síntese, variação no meio dispersor, mudança no sistema de agitação, levando talvez, a uma solubilização mais eficiente.

Além disso, futuros trabalhos podem ser concentrados na funcionalização da superfície desses nanocompósitos, mesmo porque a quitosana permite tais modificações.

É importante ressaltar ainda que é necessário dar continuidade em testes celulares, e que os próximos passos podem ser voltados para a melhora da absorção dessas partículas e estudar o comportamento das defesas do organismo para com essas partículas.

8 – Referências Bibliográficas

Agnihotri , S. A.; Mallikarjuna, N. N.; Aminabhavi, T. M. – Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. Drug Delivery Center os Escellende in Polymer Science, India.

ASSIS, Odilio. B. G.; da SILVA, Valmir. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 223 – 228, 2003.

Azevedo, V. V. C. ; Chaves, S. A.; Bezerra, D. C.; Lia Fook, M. V.; Costa, A. C. F. M. – Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de Campina Grande. Artigo Técnico, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol.13, nº4, p.223-228, 2003.

Brigger, I.; Dubermer C.; Couvreur P. – Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. University of Paris-Sud XI, UMR CNRS 8612, Faculty of Pharmacy – Malabry, France.

CAMILO, Ruth. L. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriethoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia**. 2006. Tese (Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo.

Callister Jr.;; Willian, D. – Livro: Ciência Engenharia de Materiais – Uma Introdução-. 8ª Edição. 2012.

Cullity, B. D. – Introduction to magnetic materials. Addison Wesley Publishing Company.

CULLITY, B. D. **Elements of x-ray diffraction**, 2ed. Massachusetts: Addison-Wesley, 1978.

Da SILVA, Mônica. F. **Engenharia de superfície de nanopartículas magnéticas para biomedicina: recobrimentos com macromoléculas visando estabilização e compatibilidade em meio fisiológico**. 2013. Dissertação (Título de Mestre em Química) . Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, Departamento de Físico Química, Grupo de Materiais Coloidais.

HOBBIE, Russel. K.; ROTH, Bradley. J. – **Intermediate Physics for Medicine and Biology**. Fourth Edition. New York, USA : Springer Science + Business Media, LLC, 2007. págs: 515 – 540.

Jiles, D. – Introduction to magnetism and magnetic materials. Chappman&Hall.

Li, G.; Jiang, Y.; Huang, K.; Ding, P.; Chen, J. – Preparation and properties of magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles. Human Vocational College of Science and Technology, Changsha, Hunan 410118, China. College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Hunan 410083, China.

Maitra, A. – Determination of size parameters of water-aerosol OT-oil reverse micelles from their nuclear magnetic resonance data. Department of chemistry, University of Delhi, India.

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.; 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 Alloy and Compounds, 584, 514-519, 2014.

Mertins, O. – Estudos Físicos-Químicos e Estruturais de Lipossomas Compósitos de Fosfatidilcolina e Quitosana. 2008. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Pankhurst, Q. A.; Connolly, J.; Jones, S.K.; Dobson, J. – Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine.

SANTOS, C. M. B. **Efeito da variação do processo de síntese nas propriedades estruturais de nanopartículas de $CoFe_2O_4$** . 2008. Dissertação (Pós-Graduação em Física) – Universidade de Brasília, Instituto de Física.

Shi, S. F.; Jia, J. F.; Guo, X. K.; Zhao, Y. K.; Chen, D. S.; Guo, Y. Y.; Cheng, T.; Zhang, X. L. Biocompatibility of chitosan-coated iron oxide nanoparticles with osteoblast cells, **International Journal of Nanomedicine**, 7, 5593-5602, 2012.

Siegel, R. – Cancer Statistics, 2013. Deepa Naishadham, MA

Instituto Nacional do Câncer (INCA) . Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 23, jan. 2014.

Wang, J. J.; Zeng, Z.W.; Xiao, R. Z.; Xie, T.; Zhou, G. L.; Zhan, X. R.; Wang, S. L. – Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers.

ZHANG, J. et al. – Size control and photoluminescence enhancement of CdS nanoparticles prepared via reverse micelle method. **Solid State Communications**, Republic of China, v. 124, n. 45-48, 2002.