

UFMG/ICEx/DQ 1009<sup>a</sup>

D 548<sup>a</sup>

Ana Paula de Figueiredo Monteiro

**Preparação e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas  
Multifuncionais para Imageamento e Liberação Controlada de Fármacos**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do  
Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Química – Química Inorgânica

Belo Horizonte

2014

M775p Monteiro, Ana Paula de Figueiredo  
2014 Preparação e caracterização de nanopartículas  
D magnéticas multifuncionais para imageamento e  
liberação controlada de fármacos [manuscrito] / Ana  
Paula de Figueiredo Monteiro. 2014.  
[xv], 91 f. : il.

Orientador: Rubén Dario Sinisterra Millán.

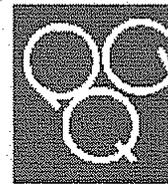
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica - Teses 2. Ciclodextrinas -  
Teses 3. Preparações de liberação controlada - Teses  
4. Agentes antineoplásicos - Teses 5. Ferrita  
(Materiais magnéticos) - Teses 6. Nanopartículas -  
Teses I. Sinisterra Millán, Rubén Dario, Orientador  
II. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3409-5732.  
FAX: 031 - 3409-5711  
E-MAIL: pgquimic@.qui.ufmg.br



**"Preparação e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas Multifuncionais  
para Imageamento e Liberação Controlada de Fármacos"**

**Ana Paula de Figueiredo Monteiro**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador  
UFMG

Profa. Elene Cristina Pereira Maia  
UFMG

Profa. Maria Irene Yoshida  
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2014.

# Agradecimentos

---

A Deus, fonte inesgotável de força, esperança e paz.

Ao meu querido noivo, Cayo, que esteve em todos os momentos me auxiliando com muito amor, carinho, compreensão e paciência.

A minha família que sempre foi minha base, refúgio e exemplo. Em especial minha mãe, Paulina, sempre presente no meu coração; minhas tias: Romilda, Arlete e Célia que nunca mediram esforços para me ajudar; minha avó Preta pelos ensinamentos e orações; e meus irmãos Paulo e Alessandro pelos conselhos, confiança e apoio.

Ao Professor Dr. Rubén pela orientação e apoio necessário para realização desse trabalho;

A Professora Dra. Maria Esperanza Cortés pela colaboração e contribuição nos ensaios biológicos realizados;

Aos amigos do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais (LEMB): Larissa, Joel, Ana Delia, Alinne, Michele, Pedro, Diego, Ricardo, Marcelo, Gabriela, Michel, Eduardo, Frederico, Ângelo, Jéssica, Karina, Sávio, Alfonso, Liliane, por toda ajuda e companheirismo.

Ao Professor Emílio Osório Neto (meu futuro avô) pelo apoio, companhia, amizade e realização das análises de Absorção Atômica.

Ao Dr. José Domingos Ardisson pela prontidão, ensinamentos e realização das análises de Magnetização e Mössbauer.

Ao velho amigo Rubens Moreira, uma ótima companhia para qualquer momento.

Aos amigos da Química Teórica, Márcio e Bárbara, por compartilharem boas conversas e sugestões, e me permitirem usufruir do harmonioso ambiente do laboratório 221.

Aos Professores: Lucienir Pains Duarte, Jacqueline Aparecida Takahashi, Frederic Frezard, José Dias de Souza Filho, Arilza de Oliveira Porto e José Domingos Fabris pelo aprendizado adquirido nas disciplinas cursadas.

As professoras Maria Irene Yoshida e Elene Cristina Pereira Maia pela participação como membros da banca e pelas contribuições na conclusão desse trabalho.

As agências de fomento CNPq e Capes.

*“Quem elegeu a busca não pode recusar a travessia.”*

*Guimarães Rosa*

# Resumo

---

Nanopartículas magnéticas têm sido alvo de grande interesse em aplicações biológicas, principalmente devido ao seu caráter multifuncional. Nanopartículas de óxido de ferro, por exemplo, podem atuar como agente de contraste em ressonância magnética de imagem e como veículo guiado magneticamente, transportando o fármaco até um local específico no organismo. Por outro lado, ciclodextrinas desempenham papéis importantes em muitos campos, como em sistema de entrega de fármacos através da formação de compostos de inclusão.

No presente trabalho, nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina (HPbetaCD) e  $\beta$ -ciclodextrina (BetaCD) foram obtidas pelo método de co-precipitação e em seguida revestidas com o ânion citrato. Neste caso, o sistema foi testado para liberação do fármaco aprovado para uso clínico em seres humanos, o irinotecano (IRI), que é um agente antineoplásico administrado por via intravenosa, mas ainda com muitos efeitos colaterais. Assim, foram preparados quatro tipos de dispositivos diferentes: ferrita-betaCD-IRI, ferrita-HPbetaCD-IRI, ferrita-betaCD-citrato-IRI e ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI. Nesse contexto, pode-se entender como ferrita o óxido de ferro com fórmula  $Fe_3O_4$ , apesar do termo “ferrita” abranger também óxidos de ferro contendo outros metais divalentes.

As nanopartículas preparadas foram caracterizadas por FTIR, medições de tamanho e potencial Zeta com base na técnica de espalhamento de luz dinâmico, difração de raios X, microscopia eletrônica de transmissão,

termogravimetria, análise elementar de CHN, medidas de magnetização e espectroscopias Mössbauer e de absorção atômica. O perfil de liberação *in vitro* do irinotecano e ensaios biológicos de citotoxicidade em células tumorais (A431) pelo método MTT também foram avaliados.

Os resultados mostraram que as nanopartículas têm morfologia esférica com diâmetros entre 8-10 nm, apresentando comportamento superparamagnético à temperatura ambiente. O recobrimento com citrato se mostrou importante na proteção contra oxidação e na diminuição da agregação das nanopartículas, garantindo também uma maior interação com o fármaco e uma cinética de liberação ligeiramente mais lenta. A funcionalização das ferritas com  $\beta$ -ciclodextrina se mostrou mais eficiente do que com a 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina, possuindo um percentual em massa desses dois componentes em torno de 6% e 3%, respectivamente.

Os ensaios de MTT mostraram que todos os dispositivos apresentaram citotoxicidade dose-dependente frente à linhagem de células tumorais A431 com  $IC_{50}$  próximo à do fármaco puro.

Palavras chaves: Liberação de fármacos, irinotecano, ciclodextrinas, ferritas, nanopartículas magnéticas.

# Abstract

---

Magnetic nanoparticles are being extensively studied for biomedical applications due to their multifunctional character. Nanoparticles of iron oxide, for example, can act not only as a contrast agent in MRI but also as magnetically guided vehicle, taking the drug to a specific part of the body. On the other hand, cyclodextrins play major roles in many fields such as drug delivery system through the inclusion compounds formation.

In the present work, iron oxide nanoparticles functionalized with  $\beta$ -cyclodextrin (betaCD) and 2-hydroxy-propyl- $\beta$ -cyclodextrin (HPbetaCD) were obtained by coprecipitation method and coated with the anion citrate. In this case, the system was tested to deliver the drug approved for use in humans, irinotecan (IRI), which is an intravenous antineoplastic agent, but still with many side effects. Thus, were prepared four different devices: ferrite-betaCD-IRI, ferrite-HPbetaCD-IRI, ferrite-betaCD-citrate-IRI and ferrite-HPbetaCD-citrate-IRI. In this context, one can understand the ferrites as iron oxides with the formula  $Fe_3O_4$ , although the "ferrite" term includes iron oxides with other divalent metals.

The nanoparticles were characterized by FTIR, measurements of particles size and Zeta potential based on dynamic light scattering principle technique, X-ray diffraction, transmission electron microscopy, thermogravimetric analysis, elemental analysis of CHN, measurements of magnetization, Mössbauer and atomic absorption spectroscopy. The *in vitro*

irinotecan release profile and its cytotoxicity biological assays, in cancer cells, were assessed by the MTT method.

The results showed that the nanoparticles have a spherical morphology, with diameters varying between 8-10 nm, with superparamagnetic behavior at room temperature. The citrate coating proved important against the oxidations and for a reduced aggregation of the nanoparticles, also assuring a higher interaction with the drug and slightly slower release kinetics. The ferrites functionalization with betaCD has proven better than with HPbetaCD, with a mass percentage of these two compounds of 6% and 3%, respectively.

The MTT assay showed that all devices have a concentration-dependent cytotoxicity toward the A431 lineage of cancer cells, with  $IC_{50}$  near of the pure drug.

Keywords: Drug Delivery; Irinotecan; cyclodextrin; ferrite; magnetic nanoparticles.

## Lista de Figuras

---

Figura 1 – Taxa de incidência e mortalidade de câncer no mundo (GLOBOCAN 2008 – International Agency for Research on Cancer).....	2
Figura 2- Estruturas das formas lactônica e carboxilada da camptotecina. ....	4
Figura 3 - A) Camptotecina, B) Irinotecano e C) SN-38. ....	4
Figura 4 - Representação estrutural da $\beta$ -ciclodextrina na geometria de cone truncado. ....	8
Figura 5- Representação esquemática da ciclodextrinas. (a) $\alpha$ -ciclodextrina, (b) $\beta$ -ciclodextrina e (c) $\gamma$ -ciclodextrina. ....	9
Figura 6 – Representação da estrutura cristalina da magnetita .....	13
Figura 7 – Fórmula estrutural da $\beta$ -ciclodextrina .....	18
Figura 8 – Fórmula estrutural da 2-Hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina.....	19
Figura 9 – Fórmula estrutural do cloridrato de irinotecano .....	20
Figura 10 – Fórmula estrutural do citrato de sódio .....	20
Figura 11 – Reação de conversão do íon tetrazólio em formazan. ....	29
Figura 12 - Micrografias (TEM) das nanopartículas (aumento de 145000): (A) Ferrita pura; (B) Ferrita citrato; (C) Ferrita-betaCD; (D) Ferrita-betaCD-citrato; (E) Ferrita-HPbetaCD e (F) Ferrita-HPbetaCD-citrato.....	34

Figura 13 - Micrografias (TEM) das nanopartículas (aumento de 285000): (A) Ferrita pura; (B) Ferrita citrato (C) Ferrita-betaCD; (D) Ferrita-betaCD-citrato; (E) Ferrita-HPbetaCD e (F) Ferrita-HPbetaCD-citrato.....	35
Figura 14 – Difractogramas das nanopartículas sintetizadas: (A) Ferrita-HPbetaCD-citrato; (B) Ferrita-HPbetaCD; (C) Ferrita-betaCD-citrato; (D) Ferrita-betaCD; (E) Ferrita-citrato e (F) Ferrita Pura.....	38
Figura 15 – Curvas TG das substâncias puras: citrato de sódio, 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina e $\beta$ -ciclodextrina.....	39
Figura 16 – Curvas DTG (a) e DTA (b) das substâncias puras: (A) citrato de sódio, (B) 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina e (C) $\beta$ -ciclodextrina. ....	40
Figura 17 – Curvas TG das nanopartículas: Ferrita pura, Ferrita-betaCD e Ferrita-betaCD-citrato.....	42
Figura 18 – Curvas TG das nanopartículas: Ferrita pura, Ferrita-HPbetaCD e Ferrita-HPbetaCD-citrato.....	43
Figura 19 – Curvas DTG das nanopartículas sintetizadas: (A) Ferrita-HPbetaCD-citrato; (B) Ferrita-betaCD-citrato; (C) Ferrita-HPbetaCD; (D) Ferrita-betaCD e (E) Ferrita Pura.....	44
Figura 20 – Curvas DTA das nanopartículas sintetizadas: (A) Ferrita-HPbetaCD-citrato; (B) Ferrita-betaCD-citrato; (C) Ferrita-HPbetaCD; (D) Ferrita-betaCD e (E) Ferrita Pura.....	45

Figura 21 – Espectros Mössbauer das nanopartículas a temperatura ambiente: (A) Ferrita-HPbetaCD-citrato, (B) Ferrita-HPbetaCD, (C) Ferrita-betaCD-citrato, (D) Ferrita-betaCD e (E) Ferrita pura. ....	46
Figura 22 – Espectros Mössbauer das nanopartículas à 20K : (A) Ferrita pura, (B) Ferrita-betaCD, (C) Ferrita-HPbetaCD, (D) Ferrita-betaCD-citrato e (E) Ferrita-HPbetaCD-citrato.....	48
Figura 23 – Espectro de Infravermelho das nanopartículas: (a) Ferrita- HPbetaCD (A), Ferrita-HPbetaCD-citrato (B) e Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI (C); (b) Ferrita-betaCD(D), Ferrita-betaCD-citrato(E) e Ferrita-betaCD-citrato-IRI (F). .....	51
Figura 24 – Espectro de Infravermelho da ferrita-betaCD-irinotecano e sua mistura física.....	52
Figura 25 – Espectro de Infravermelho da ferrita-HPbetaCD-irinotecano e sua mistura física.....	53
Figura 26- Curva de histerese das nanopartículas: Ferrita-betaCD, Ferrita- HPbetaCD, Ferrita-betaCD-citrato e Ferrita-HPbetaCD-citrato. ....	55
Figura 27 - Curva de histerese das nanopartículas com irinotecano: Ferrita- betaCD-IRI, Ferrita-HPbetaCD-IRI, Ferrita-betaCD-citrato-IRI e Ferrita- HPbetaCD-citrato-IRI. ....	56
Figura 29 - Equação da curva de liberação com os valores das constantes de velocidade de liberação de cada formulação sintetizada: A) Ferrita pura, (B)	

Ferrita-HPbetaCD, (C) Ferrita-HPbetaCD-citrato, (D) Ferrita-citrato, (E) Ferrita-betaCD-citrato e (F) Ferrita-betaCD. ....	59
Figura 30–Porcentagem de liberação do irinotecano nas formulações. ....	61
Figura 32 – Determinação do valor de IC <sub>50</sub> das formulações e do fármaco irinotecano em células tumorais A431 após 48 horas de contato:(A) Ferrita-betaCD-IRI, (B) Ferrita-HPbetaCD-IRI, (C) Ferrita-betaCD-citrato-IRI, (D) Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI e (E) IRI. ....	64
Figura 33 –Ensaio de MTT de cada componente das formulações em células tumorais A431 após 48 horas de contato. ....	66

## Lista de Tabelas

---

Tabela 1 - Complexos fármaco-ciclodextrina aprovados e comercializados em vários mercados mundiais(Davis and Brewster, 2004). .....	11
Tabela 2 – Medidas de tamanho de partículas, distribuição e potencial Zeta baseadas na técnica de espalhamento de luz dinâmico. ....	32
Tabela 3 – Percentual de Carbono, Hidrogênio e Ferro das amostras sintetizadas. ....	36
Tabela 4 – Parâmetros hiperfinos dos espectros Mössbauer à temperatura de 20K das nanopartículas ( $\delta$ deslocamento isomérico, $\epsilon$ quadripolo, $B_{hf}$ campo hiperfino). ....	49
Tabela 5– Parâmetros gerais das nanopartículas sintetizadas. ....	60

## Sumário

---

1. Introdução.....	1
1.1. Câncer – Quadro atual .....	1
1.1.1. Irinotecano.....	2
1.2. Nanotecnologia e Liberação controlada de fármacos .....	6
1.2.1. Sistemas formados por ciclodextrinas .....	7
1.2.2. Nanopartículas Magnéticas .....	12
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivos gerais.....	17
2.2. Objetivos específicos .....	17
3. Experimental.....	18
3.1. Reagentes utilizados.....	18
3.1.1. $\beta$ -ciclodextrina .....	18
3.1.2. 2-Hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina .....	19
3.1.3. Cloridrato de irinotecano.....	20
3.1.4. Citrato de sódio dihidratado .....	20
3.1.5. Cloretos de Ferro II e III.....	21
3.1.6. Outros reagentes .....	21
3.2. Equipamentos .....	22
3.2.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho ...	22

3.2.2. Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) .....	22
3.2.3. Liofilização .....	22
3.2.4. Espectroscopia de Absorção Atômica .....	23
3.2.5. Espectroscopia Mössbauer .....	23
3.2.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) .....	23
3.2.7. Difractometria de Raios X .....	24
3.2.8. Espalhamento de Luz Dinâmico .....	24
3.2.9. Análise Elementar de CHN .....	25
3.2.10. Espectroscopia de Absorção UV-Visível .....	25
3.2.11. Medidas de magnetização .....	25
3.3. Síntese das nanopartículas magnéticas .....	25
3.3.1. Nanopartículas magnéticas puras .....	25
3.3.2. Nanopartículas magnéticas modificadas com ciclodextrinas: 2-Hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina e $\beta$ -ciclodextrina .....	26
3.3.3. Nanopartículas magnéticas recobertas com citrato .....	27
3.3.4. Incorporação do fármaco no dispositivo .....	27
3.4. Perfil de liberação do fármaco .....	27
3.5. Testes de Citotoxicidade .....	28
3.5.1. Ensaio de MTT .....	28
3.5.2. Análise estatística .....	30
4. Resultados e Discussão .....	31

4.1. Síntese das nanopartículas magnéticas.....	31
4.2. Caracterização da Nanopartículas Magnéticas .....	32
4.2.1. Morfologia e tamanho das nanopartículas .....	32
4.2.2. Análise Elementar e Espectroscopia de Absorção Atômica .	36
4.2.3. Difratomia de Raios X.....	37
4.2.4. Termogravimetria (TG) .....	38
4.2.5. Espectroscopia Mössbauer .....	45
4.2.6. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho ...	50
4.2.7. Medidas de magnetização .....	54
4.3. Perfil de Liberação .....	56
4.4. Testes de citotoxicidade.....	61
5. Conclusões .....	68
6. Referências.....	70
Anexos.....	78

# 1. Introdução

---

## 1.1. Câncer – Quadro atual

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2008) o câncer representa a segunda causa de morte nos países desenvolvidos e o terceiro lugar nos países em desenvolvimento, sendo responsável por 13% do total de mortes em todo mundo. A Organização Mundial de Saúde (WHO) enfatiza que no ano de 2030 a incidência de casos pode chegar a 15 milhões e levar 11 milhões de pessoas ao óbito no mesmo ano, caso não seja promovida uma ação eficaz para sua prevenção e controle.

Atualmente são empregados para o tratamento oncológico cerca de 50 agentes quimioterápicos (FDA – Food and Drug Administration, 2013). A quimioterapia antineoplásica ou a utilização de agentes químicos isolados ou em combinação tem sido uma das principais formas de tratamento para esta doença. Esses agentes afetam tanto células malignas quanto normais, porém acarretam maiores danos a células malignas que possuem um maior processo metabólico devido ao crescimento acelerado. Entretanto, a capacidade das células neoplásicas de sofrerem mutações que as tornam resistentes aos agentes quimioterápicos, e os intensos efeitos colaterais causados por esses medicamentos tornam a pesquisa nessa área um desafio e a busca por estratégias alternativas uma necessidade urgente (Melancon et al., 2011; Namiki et al., 2011). Um exemplo de quimioterápico é o fármaco de nome

comercial Camptosar®, cujo princípio ativo é o irinotecano. Ele se tornou o principal antineoplásico no combate ao câncer de colorretal nos últimos anos.

### 1.1.1. Irinotecano

O irinotecano é um fármaco aprovado comercialmente para uso clínico como agente antineoplásico intravenoso, sendo empregado em diferentes modalidades no tratamento de câncer colorretal metastático (Herben et al., 1998), sendo este tipo de câncer o quarto mais incidente no mundo, apresentando alta taxa de mortalidade (Figura 1). No Brasil esse tipo de câncer foi responsável por quase 15 mil mortes no ano de 2010, atingindo o terceiro maior índice de mortalidade em mulheres com câncer (WHO-2010).

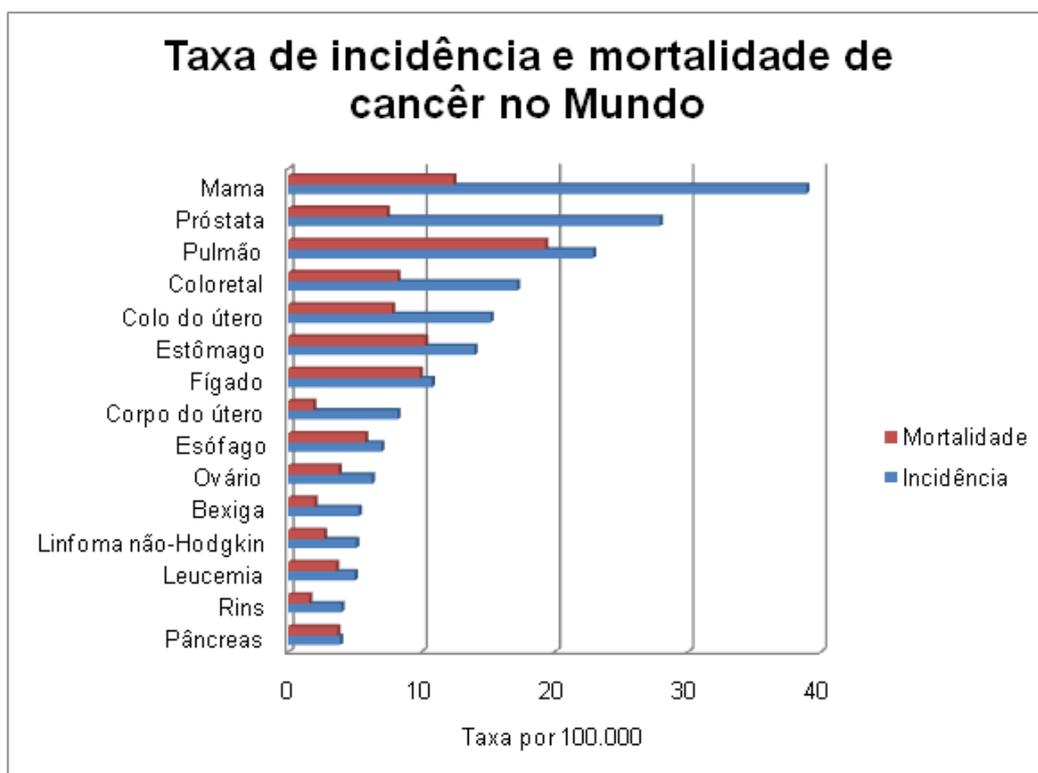


Figura 1 – Taxa de incidência e mortalidade de câncer no mundo (GLOBOCAN 2008 – International Agency for Research on Cancer)

O uso desse fármaco vem sendo investigado também no tratamento de outros tipos de câncer tais como: câncer de pulmão, ovário, pâncreas, colo uterino e mama (Kokawa et al., 2008; Rosen, 1998; Sugiyama et al., 2000; Takagi and Saotome, 2001; Takiguchi et al., 2007).

O irinotecano é um derivado semi-sintético da camptotecina, um alcalóide isolado pela primeira vez por Wall e colaboradores em 1966 através do extrato da *Camptotheca acuminata*, uma árvore nativa da China. (Wall et al., 1966). Os alcalóides constituem uma das classes mais importantes de fármacos antitumorais, caracterizados por apresentarem um nitrogênio heterocíclico. A camptotecina e seus análogos possuem uma estrutura química baseada em um anel pentacíclico insaturado com uma porção pirroquinolina, um anel piridona e um anel  $\alpha$ -hidroxilactona terminal, apresentando um centro quiral na qual apenas a forma enantiomérica S tem atividade antitumoral (Wani et al., 1987).

Contudo, a aplicação terapêutica da camptotecina é limitada devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso e rápida inativação causada pela hidrólise de seu anel lactônico em pH fisiológico. O processo é reversível e espontâneo, gerando a forma carboxilada correspondente (Figura 2). O equilíbrio entre as duas formas depende do pH, sendo a forma lactônica predominante em meio ácido (Fassberg and Stella, 1992).

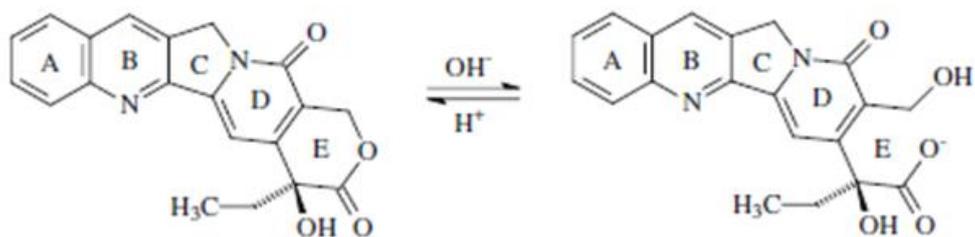


Figura 2- Estruturas das formas lactônica e carboxilada da camptotecina.

No irinotecano a estrutura da camptotecina é modificada pela adição de um grupo piperidino responsável por aumentar a solubilidade em água. Sua síntese foi realizada pelo grupo de Sawada em 1991 através da reação entre um radical etil e a camptotecina. O radical foi gerado a partir de propanal na presença de  $\text{FeSO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  em solução aquosa levemente ácida. A reação com camptotecina dá origem ao composto 7-etil-camptotecina que após ser oxidado e foto irradiado na presença de ácido produz um intermediário 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38) com 49% de rendimento. Finalmente, o tratamento deste com cloreto de (1,4')-bipiperidinil-1'-carbonil produz o irinotecano com 80% de rendimento (Sawada et al., 1991).

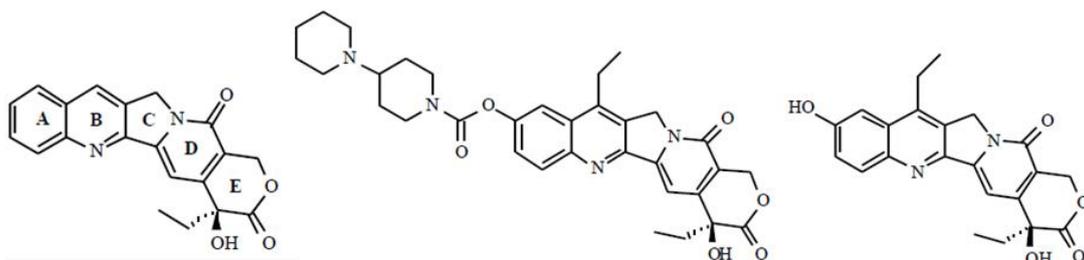


Figura 3 - A) Camptotecina, B) Irinotecano e C) SN-38.

O intermediário SN-38 é cerca de mil vezes mais citotóxico do que o irinotecano, porém a ligação dele com as proteínas plasmáticas pode ser em torno de 30% maior, aumentando sua toxicidade. Assim, o irinotecano é um pro-fármaco que a partir da clivagem enzimática na cadeia lateral gera o metabólito biologicamente mais ativo SN-38. Essa conversão é realizada nos organismos pelas enzimas carboxilesterases que possuem uma concentração mais elevada em tumores do que em células normais (Vanderbeeken et al., 2013).

O mecanismo de ação envolve a inibição da topoisomerase I, que é uma enzima nuclear responsável pela replicação do DNA. Logo, essa inibição ocorre apenas em células que se encontram na fase S do ciclo celular, na qual acontece a auto-replicação das moléculas de DNA. Como as células cancerosas são rapidamente replicadas e passam mais tempo na fase S em relação aos tecidos saudáveis, tal seletividade garante uma maior eficiência terapêutica do fármaco. O efeito citotóxico ocorre devido à ligação covalente entre o derivado ativo (SN-38) e a topoisomerase I através de um ataque nucleofílico, na posição acila do anel lactônico do SN-38. Tal ligação dá origem a um complexo estável que impede a síntese de RNA no processo de replicação (Fassberg and Stella, 1992; Herben et al., 1998).

Apesar do irinotecano contornar o problema em relação a pouca solubilidade da camptotecina, a abertura do anel lactônico e consequentemente a inativação do fármaco, ainda se faz presente. Segundo Hatefi e Amsden (2002) a perda de atividade da sua forma carboxilada é devida a uma menor interação com a membrana celular em relação à forma lactônica, gerando uma diminuição da difusibilidade e consequentemente menor potencial de ação

contra a topoisomerase. Estudos mostraram que no final da infusão, somente 66% do fármaco encontra-se na sua forma lactônica no plasma sanguíneo, diminuindo para 25% dentro de 24 horas (Herben et al., 1998). Assim, o aumento na dosagem do fármaco para atingir os níveis terapêuticos acaba acentuando e causando vários eventos adversos tais como: problemas gastrointestinais (diarréia, náuseas e vômitos), hematológicos (anemia e febre), metabólico (desidratação e perda de peso) e cardiovascular (trombose e infarto) (Pfizer- 2007). Nesse sentido, torna-se interessante a utilização de sistemas de liberação controlada do irinotecano, que possam contornar esses problemas decorrentes do seu uso.

## **1.2. Nanotecnologia e Liberação controlada de fármacos**

Nas últimas décadas um novo conceito farmacológico tem sido desenvolvido em relação à vetorização de compostos biologicamente ativos através da utilização de agregados moleculares com o intuito de obter sistemas de liberação de fármacos mais seguros e eficazes. Uma grande vantagem desses sistemas é a possibilidade de modificar a biodisponibilidade do fármaco sem alterar a sua estrutura química, assegurando uma distribuição do medicamento em concentrações adequadas no organismo e sua proteção contra a degradação. Assim, uma liberação controlada do fármaco seria capaz de proporcionar uma redução dos efeitos adversos, diminuição do número de doses, e conseqüentemente maior facilidade da adesão do paciente ao tratamento mantendo o efeito terapêutico desejado (Langner and Ugorski, 2000).

Dentro disso, pesquisas envolvendo sistemas nanoparticulados têm sido bastante exploradas nas últimas décadas. Esses sistemas podem melhorar a biodisponibilidade de um fármaco, reduzir sua imunogenicidade e toxicidade, modificar seu metabolismo, e ainda aumentar seu tempo de meia vida após a administração sistêmica (De Jong and Borm, 2008). Em geral, eles podem ser constituídos por diversos materiais, tais como: polímeros, metais, semicondutores, compósitos, biomateriais e materiais magnéticos. E, a alternativa de acoplar vários componentes, podem ainda fornecer múltiplas funções ao mesmo sistema (Lobenberg, 2003).

A pesquisa de diferentes sistemas com o objetivo de aperfeiçoar a ação de diversos fármacos é um grande desafio. Então, uma abordagem integrada na composição dessas nanopartículas bem como tamanho, forma e a modificação de superfície são estratégias usadas a fim de minimizar seu potencial tóxico e melhorar sua biodistribuição no organismo (Naahidi et al., 2013; Xie et al., 2011).

### *1.2.1. Sistemas formados por ciclodextrinas*

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha$  (1-4) que possuem uma cavidade central, permitindo a inclusão de moléculas hóspedes. Sua cavidade possui caráter lipofílico, permitindo a formação de compostos de inclusão principalmente com substâncias hidrofóbicas. Essa propriedade bem como a biocompatibilidade fazem com que as ciclodextrinas sejam utilizadas em várias aplicações farmacêuticas, incluindo na melhoria de biodisponibilidade de fármacos.

A geometria da ciclodextrina pode ser representada por um cone truncado, na qual as hidroxilas primárias encontram-se na borda de menor diâmetro e as hidroxilas secundárias na borda de maior diâmetro. A Figura 4 mostra uma representação estrutural da  $\beta$ -ciclodextrina na geometria de cone truncado. A parte exterior da ciclodextrina possui um caráter hidrofílico, pois apesar das hidroxilas estarem comprometidas com as ligações de hidrogênio elas proporcionam à molécula alto poder de solvatação. Já no interior da cavidade, o caráter lipofílico prevalece com a presença de grupos (C<sub>1</sub>-O-C<sub>4</sub>) das ligações glicosídicas do anel (Szejtli, 1998).

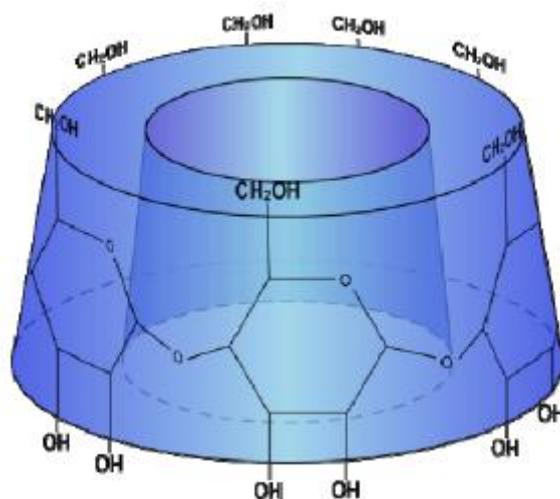


Figura 4 - Representação estrutural da  $\beta$ -ciclodextrina na geometria de cone truncado.

As ciclodextrinas foram descritas pela primeira vez em 1891 por Villiers, um cientista francês. Villiers fez o isolamento desses compostos a partir da digestão bacteriana do amido, na qual a composição química do produto cristalino obtido foi determinada como  $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$  (Loftsson and Duchene, 2007). Existem três principais ciclodextrinas naturais:  $\alpha$ -ciclodextrina,

$\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina. Essas se diferenciam estruturalmente pelo número de unidades glicosídicas, sendo formadas por 6, 7 e 8 unidades respectivamente (Figura 5).

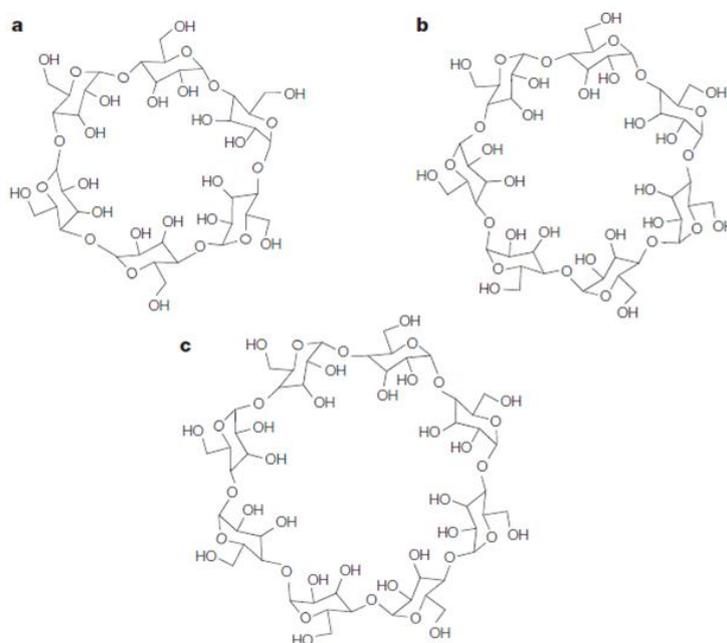


Figura 5- Representação esquemática da ciclodextrinas. (a)  $\alpha$ -ciclodextrina, (b)  $\beta$ -ciclodextrina e (c)  $\gamma$ -ciclodextrina.

As ciclodextrinas formam ligações de hidrogênio em solução aquosa através dos grupos hidroxilas da sua molécula, conferindo-lhe um caráter hidrofílico. Apesar disso, a solubilidade em água das ciclodextrinas é limitada devido às ligações de hidrogênio intramoleculares e sua energia de rede cristalina relativamente elevada. Dentre as ciclodextrinas citadas a  $\beta$ -ciclodextrina é a que possui menor solubilidade ( $18,5 \text{ g.L}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ ). Essa diferença de solubilidade pode ser explicada pelo número de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas secundárias da molécula. A  $\beta$ -ciclodextrina apresenta uma estrutura mais rígida, formando um anel completo de ligações

de hidrogênio que lhe garante uma menor solubilidade. A  $\alpha$ -ciclodextrina possui um anel incompleto devido a uma unidade de glicose em posição distorcida, assim diferente das seis ligações de hidrogênio presentes na  $\beta$ -ciclodextrina, a  $\alpha$ -ciclodextrina tem somente quatro ligações, o que a torna mais solúvel (145 g.L<sup>-1</sup> a 25°C). Na  $\gamma$ -ciclodextrina a estrutura é mais flexível, dando-lhe uma maior solubilidade comparada às outras (232 g.L<sup>-1</sup> a 25°C) (Szejtli, 1998).

A fim de aumentar a solubilidade, algumas modificações químicas nas ciclodextrinas geralmente no grupo das hidroxilas primárias foram realizadas. Como exemplo temos o derivado 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina que possui solubilidade em água superior a 60% (m/v). Esse aumento da solubilidade acontece devido à formação de produtos quimicamente amorfos durante a substituição (Uekama et al., 1998). Essa propriedade se tornou extremamente útil no uso de soluções aquosas injetáveis de ciclodextrinas.

A Tabela 1 mostra a vasta gama de compostos de inclusão formados com ciclodextrinas atualmente aprovados e comercializados na indústria farmacêutica. Verifica-se a relação entre solubilidade da ciclodextrina e a via de administração, sendo as ciclodextrinas mais solúveis, como a 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina, aprovadas para uso em administrações intravenosas.

Tabela 1 - Complexos fármaco-ciclodextrina aprovados e comercializados em vários mercados mundiais(Davis and Brewster, 2004).

Fármaco	Administração	Nome comercial	Mercado
<b><math>\alpha</math>-ciclodextrina</b>			
Alprostadil	Intravenosa	Prostavastin, Caverject, Edex	Europa, Japão e EUA
Cefotiamhexetil HCl	Oral	Pansporin T	Japão
<b><math>\beta</math>-ciclodextrina</b>			
Benexate	Oral	Ulgut, Lonmiel	Japão
Dexamethasone	Derme	Glymesason	Japão
Iodine	Tópica	Mena-Gargle	Japão
Nicotine	Sublingual	Nicorette	Europa
Nimesulide	Oral	Nimedex, Mesulid	Europa
Nitroglycerin	Sublingual	Nitropen	Japão
Omeprazole	Oral	Omebeta	Europa
Dinoprostone	Sublingual	Prostarmon E	Japão
Piroxicam	Oral	Brexin	Europa
Tiaprofenicacid	Oral	Surgamyl	Europa
<b>2-hidroxiopropil-<math>\beta</math>-ciclodextrina</b>			
Cisapride	Retal	Propulsid	Europa
Hydrocortisone	Bucal	Dexocort	Europa
Indomethacin Eye drops Indocid Europe	Colírio	Indocid	Europa
Itraconazole	Oral, intravenosa	Sporanox	Europa, EUA
Mitomycin	Intravenosa	Mitozytrex	EUA

Na literatura há vários estudos envolvendo também a formação de compostos de inclusão entre ciclodextrinas e camptotecinas objetivando um sistema de liberação controlada eficaz para essa classe de fármacos (Cirpanli et al., 2009; Jiang et al., 2010; Minelli et al., 2012; Saetern et al., 2004). Particularmente podemos citar os compostos de inclusão com o fármaco irinotecano que podem ser formados tanto com a 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina quanto com a ciclodextrina natural,  $\beta$ -ciclodextrina (Haran et al., 2011).

Além das ciclodextrinas outras matrizes como as nanopartículas poliméricas e/ou magnéticas vem sendo exploradas para a liberação controlada de fármacos, especialmente de quimioterápicos (Park et al., 2012; Zhou et al., 2012).

### *1.2.2. Nanopartículas Magnéticas*

Nanopartículas magnéticas são partículas que podem ser manipuladas a partir de um campo magnético externo e têm sido alvo de grande interesse tecnológico. Estudos de aplicações biomédicas mostram que essas nanopartículas são biocompatíveis e podem atuar simultaneamente como agentes de diagnóstico em imagem molecular e como transportadores de fármacos (Yoo et al., 2011); (Gao et al., 2009; Wu et al., 2008). Isso possibilita que essas nanopartículas possam ser monitoradas em células vivas tanto por ressonância magnética, quanto por imagem de fluorescência permitindo um acompanhamento não invasivo desses compostos dentro do organismo. Além disso, essas nanopartículas podem ser empregadas no tratamento por hipertermia, que provoca a morte de células cancerígenas por aquecimento local a partir de um campo magnético alternado (Colombo et al., 2012).

Pesquisas envolvendo nanopartículas magnéticas ainda incluem seu uso como agente quelante de ferro em doenças neurodegenerativas, quando o excesso desse metal está associado à doença (Liu et al., 2006).

Esse tipo de material quando constituído de ferro é conhecido como ferrita, as quais são óxidos compostos por átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  e um metal divalente  $\text{M}^{2+}$  ( $\text{M} = \text{Mn}, \text{Zn}, \text{Cu}, \text{Co}, \text{Ni}$  e  $\text{Fe}$ ) dentro de uma estrutura de empacotamento cúbico de átomos de oxigênio – estrutura em espinélio. Um exemplo é a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), um óxido de ferro comum que se difere dos demais óxidos por possuir em sua estrutura ferro (II) e ferro (III). Ela apresenta um sistema de cristalização cúbico com estrutura do tipo espinélio invertido, possuindo célula unitária cúbica de face centrada, com oito íons  $\text{Fe}^{3+}$  localizados no sítio tetraédrico (sítio A), dezesseis átomos de ferro localizados no octaédrico (sítio B, sendo oito íons  $\text{Fe}^{3+}$  e oito  $\text{Fe}^{2+}$ ) e trinta e dois átomos de oxigênio ( $\text{O}^{2-}$ ) (Cornell and Schwertmann, 2003) (Figura 6).

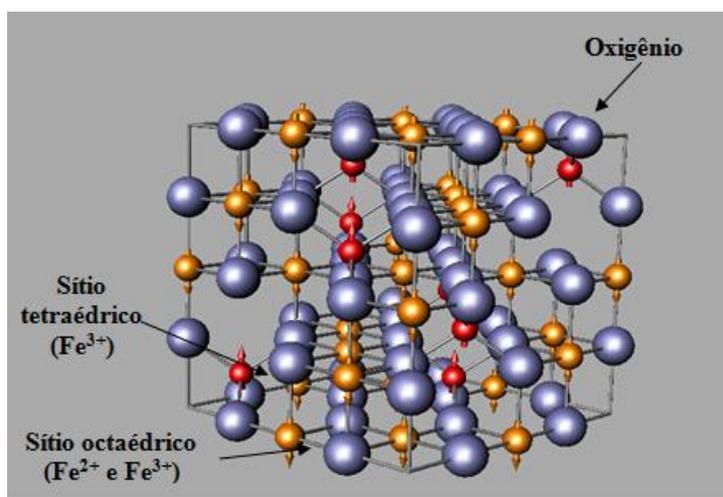


Figura 6 – Representação da estrutura cristalina da magnetita

O uso clínico de algumas formulações com nanopartículas de magnetita já são aprovadas como agentes de contraste em Ressonância Magnética, como por exemplo, o agente de contraste para fígado *Resovist-Ferucarbotran* (Arbab et al., 2006).

Para promover o uso seguro e eficaz das nanopartículas magnéticas é necessário desenvolver um sistema no qual se obtenham nanopartículas que atendam principalmente os seguintes critérios:

- Tamanhos inferiores a 25 nm – as nanopartículas magnéticas apresentam uma propriedade particular que depende do seu tamanho. Partículas com tamanhos inferiores a 25 nm podem apresentar um único domínio magnético exibindo superparamagnetismo à temperatura ambiente. O caráter superparamagnético é importante porque uma vez que o campo magnético externo é removido, desaparece a magnetização e assim a aglomeração (e a possível embolização dos vasos capilares) é evitada. Nanopartículas à base de Fe, por exemplo, se tornam superparamagnéticas com tamanhos < 25 nm (Lee et al., 1996).

- Controle da agregação das nanopartículas – as nanopartículas magnéticas tendem a agregar a fim de diminuir sua elevada energia superficial (Lu et al., 2007; Xia et al., 2009). O controle do tamanho desses agregados é bastante difícil. Segundo Kievit e Zhang (Kievit and Zhang, 2011), em sistemas de vetorização de fármacos é essencial que os agregados formados não ultrapassem 100 nm devido à maior facilidade do sistema imune em reconhecer partículas com tamanhos >100 nm e conseqüentemente removê-las da circulação.

- Estabilidade – as nanopartículas magnéticas sem recobrimento são facilmente oxidadas, gerando perda de magnetização. Além disso, um revestimento pode proteger a superfície de absorver componentes do sangue e melhorar a estabilidade coloidal das nanopartículas no meio biológico (Kievit and Zhang, 2011).

Outra questão bastante discutida é a toxicidade que essas nanopartículas podem apresentar ao organismo. A resistência a biodegradação e sua alta reatividade principalmente devida à grande área superficial podem elevar o grau de toxidez (Chaubey et al., 2007). No entanto, estudos *in vivo* mostram que elas não causam implicações ao organismo mesmo quando utilizados em longo prazo. Mesmo havendo acumulações de ferro nos tecidos não houve alterações histológicas em órgãos vitais (Ma et al., 2008).

Alguns sistemas de liberação de fármacos envolvendo ferritas/ciclodextrinas podem ser encontrados na literatura (Banerjee and Chen, 2009; Cao et al., 2009; Li et al., 2011; Luo et al., 2012; Xia et al., 2007; Yallapu et al., 2011), nos quais a ciclodextrina desempenha um papel importante na inclusão do fármaco de interesse. Wang e colaboradores (Wang et al., 2003) mostraram que a ciclodextrina também é capaz de aumentar a estabilidade das nanopartículas magnéticas em água, melhorando sua dispersão no meio aquoso por longo período.

O presente trabalho propõe o uso nanopartículas magnéticas, ferritas, modificadas com ciclodextrinas como estratégia para obtenção de sistema multifuncional de liberação controlada de antineoplásicos para tumores sólidos. Nesse contexto, pode-se entender como ferrita o óxido de ferro com fórmula

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , apesar do termo “ferrita” abranger também óxidos de ferro contendo outros metais divalentes.

Busca-se com esse sistema obter um veículo transportável magneticamente, que pode ser direcionado até um alvo específico e que proporcione uma proteção ao fármaco durante o percurso através da formação de composto de inclusão deste com a ciclodextrina. Adicionalmente, pode ser empregado o tratamento por hipertermia para auxiliar na morte das células cancerosas. Esse sistema permite também um acompanhamento não invasivo das nanopartículas dentro do organismo.

O fármaco utilizado nesse sistema multifuncional foi o irinotecano, um dos principais antitumorais prescrito para o tratamento do câncer colorretal. Como mencionado anteriormente, o irinotecano é capaz de formar compostos de inclusão com ciclodextrinas e, além disso, a literatura dispõe trabalhos que sugerem que sua atividade citotóxica pode ser elevada com o aumento da temperatura (Le Page et al., 2006), o que pode ser adquirido pelo sistema proposto através de hipertermia induzida por um campo magnético alternado.

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivos gerais

Preparação e caracterização de nanopartículas magnéticas modificadas com ciclodextrinas como sistemas de liberação de fármacos quimioterápicos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Preparação do dispositivo de liberação do irinotecano utilizando ferrita/ $\beta$ -ciclodextrina e ferrita/2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina.
- Caracterização físico-química do sistema obtido através de técnicas de Difractometria de raios X, Espalhamento de Luz Dinâmico, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Espectroscopia Mössbauer, Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho, Análise Térmica e Medidas Magnéticas.
- Avaliação do perfil cinético de liberação *in vitro* de irinotecano presente nos dispositivos preparados;
- Avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade dos materiais preparados, em células normais (fibroblastos) e células de linhagem tumoral (Caco-2 e A431).

## 3. Experimental

---

### 3.1. Reagentes utilizados

#### 3.1.1. $\beta$ -ciclodextrina

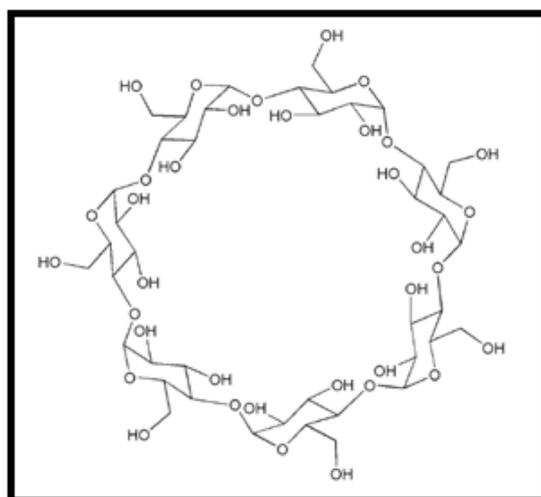


Figura 7 – Fórmula estrutural da  $\beta$ -ciclodextrina

Nomenclatura IUPAC: ciclo-hepta-glucoamilose.

Fórmula molar:  $C_{42}H_{70}O_{35} \cdot 11H_2O$

Massa molar média:  $1135 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade em água (25°C):  $15,9 \text{ mmol L}^{-1}$

Ponto de fusão:  $311,3^\circ\text{C}$

Aspecto: sólido branco semicristalino

Fabricante: Xiamem Mchem Pharma LTD

Lote: 20031210

### 3.1.2. 2-Hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina

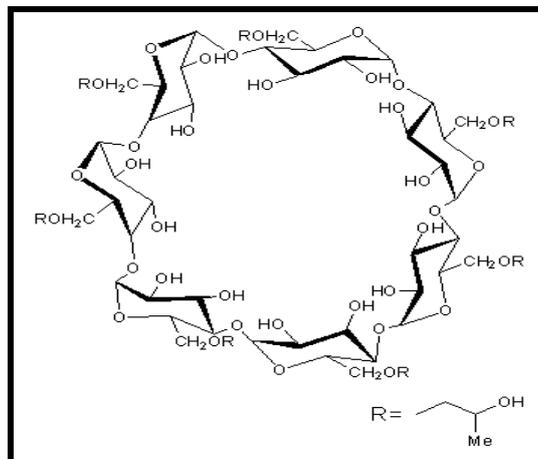


Figura 8 – Fórmula estrutural da 2-Hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina

Nomenclatura IUPAC: 2-hidroxi-propil-ciclo-hepta-glucoamilose

Fórmula molar: (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>)<sub>7</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O)<sub>4,5</sub>

Massa molar média: 1450 g mol<sup>-1</sup>

Solubilidade em água (25°C): 100 mmol L<sup>-1</sup>

Ponto de fusão: 305°C

Aspecto: sólido branco semicristalino

Fabricante: CERESTAR USA, INC.

Lote: Y1470-185

### 3.1.3. Cloridrato de irinotecano

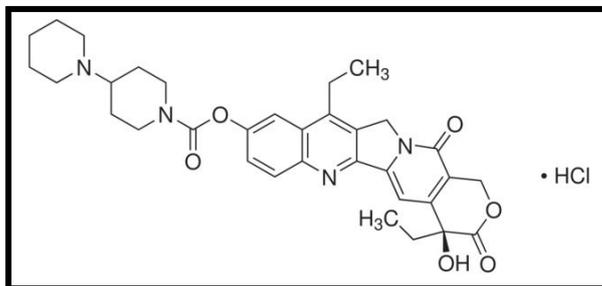


Figura 9 – Fórmula estrutural do cloridrato de irinotecano

Nomenclatura IUPAC: (S)-4,11-dietil-3,4,12,14-tetrahidro-4-hidroxi-3,14-dioxo1H-pirano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-b]quinolin-9-il-[1,4'bipiperidine]-1'-carboxilato

Fórmula molar:  $C_{33}H_{38}N_4O_6 \cdot HCl$

Massa molar:  $623.1 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade em água (25°C):  $0,107 \text{ mmol L}^{-1}$

Ponto de fusão:  $256,5^\circ\text{C}$

Aspecto: sólido amarelo claro

Fabricante: Sigma-Aldrich

Lote: SLBC5648V

### 3.1.4. Citrato de sódio dihidratado

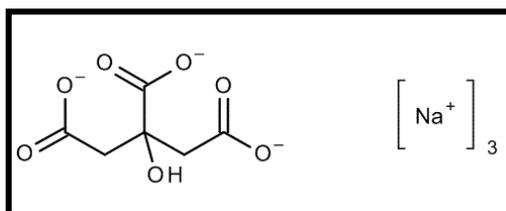


Figura 10 – Fórmula estrutural do citrato de sódio

Nomenclatura IUPAC: trisódio 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxilato.

Fórmula molar:  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Massa molar média:  $294,10 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade em água (25°C):  $425 \text{ g mL}^{-1}$

Ponto de decomposição: 150°C

Aspecto: sólido branco cristalino

Fabricante: Synth

Lote:133675

### 3.1.5. Cloretos de Ferro II e III

Nomenclatura IUPAC: (a) Cloreto de ferro(II) (b) Cloreto de ferro(III)

Fórmula molar: (a)  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (b)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Massa molar: (a)  $198,8 \text{ g mol}^{-1}$  (b)  $270,3 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade em água: (a)  $1600 \text{ g mL}^{-1}$ (10°C) (b)  $920 \text{ g mL}^{-1}$  (20°C)

Ponto de fusão: (a) 105°C (b) 37°C

Aspecto:(a) sólido verde claro (b) sólido alaranjado

Fabricante: (a) Merck (b) Synth

Lote: (a) F1653461 (b) 79327

### 3.1.6. Outros reagentes

Hidróxido de amônio (Synth)

Água destilada

## 3.2. Equipamentos

### 3.2.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos pelo aparelho Perkin Elmer Spectrum GX do DQ-UFMG. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e analisadas na região entre 4.000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ . Os dados foram tratados pelo programa ACD/SpecManager 6.0, ACDLabs.

### 3.2.2. Termogravimetria (TG), Termogravimetria Derivada (DTG) e Análise Térmica Diferencial (DTA)

As curvas de TG/DTG e DTA foram obtidas no equipamento de Marca TA Instruments, Modelo SDT-Q600, utilizando cadinhos de alumina com quantidades de amostras entre 5-10 mg e conduzidas com fluxo de 50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de  $\text{N}_2$ . Foram empregadas taxas de aquecimento 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para cada experimento, elevando a temperatura até 1000 $^{\circ}\text{C}$ . O equipamento pertence ao LEMB/DQ-UFMG.

### 3.2.3. Liofilização

Para secagem dos materiais sintetizados foi utilizado o Liofilizador Savant Mdulyo D – Freeze Dryer, Thermo Electron Corp. pertencente ao LEMB/DQ-UFMG.

### *3.2.4. Espectroscopia de Absorção Atômica*

A análise elementar de ferro foi realizada através do aparelho Espectrofotômetro de Absorção Atômica Perkin-Elmer, modelo Analyst 300, pertencente ao Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais da UFMG.

Foram preparadas soluções contendo 15 mg de cada amostra em balões volumétricos de 250 mL. A abertura foi feita utilizando-se 10 mL de ácido nítrico 1:1 sob aquecimento a aproximadamente 140°C até quase secar a solução. O processo descrito para abertura da amostra foi realizado duas vezes, até que a amostra tornou-se límpida.

### *3.2.5. Espectroscopia Mössbauer*

Os espectros Mössbauer foram realizados em um espectrofotômetro Mössbauer convencional CMTE modelo MA250 pertencente ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). As análises foram conduzidas a temperatura ambiente e a 20K, utilizando fonte de  $^{57}\text{Co}$  em matriz de Rh e  $\alpha\text{-Fe}$  como referência. Os espectros foram ajustados com o software Win-Normos-for-IGOR.

### *3.2.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)*

As imagens por transmissão foram obtidas pelo Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-20, SuperTwin FEI - 200 kV do Centro de Microscopia da UFMG.

Para as análises, as amostras inicialmente foram dispersas em água e sonicadas por aproximadamente 2 minutos. Em seguida, as suspensões foram depositadas em telas esféricas de cobre com fundo de carbono que posteriormente foram recobertas com formvar, um filme polimérico utilizado na preparação de amostras magnéticas.

### *3.2.7. Difratometria de Raios X*

Os difratogramas foram obtidos pelo aparelho da marca SHIMADZU, modelo XRD-7000 X-RAY utilizando tubo de cobre e radiação  $\text{Cu K}\alpha=1,54051$ . As análises foram feitas em ângulos de  $2\theta$  variando de 4 a 60 graus e velocidade de varredura de  $4\theta \text{ min}^{-1}$ . O aparelho pertence ao DQ-UFMG.

### *3.2.8. Espalhamento de Luz Dinâmico*

As medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizadas no equipamento Zetasizer ZS NanoSeries, Malvern Instruments, com feixe monocromático de laser He-Ne de 10 mW e comprimento de onda de 632,4 nm, pertencente ao LEMB/DQ-UFMG. Foram utilizadas cubetas de poliestireno (DTS 0112) nas análises de tamanho de partículas, sendo feita uma média entre três medidas com 10 leituras cada uma. Nas análises de Potencial Zeta utilizou-se medidor Green sendo feitas médias entre três medidas com 30 leituras cada uma.

A análise foi realizada com concentração de  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  das amostras de ferritas dispersas em água, cujo índice de refração é  $n = 1,330$ . Após 3

minutos no banho de ultrassom, foi retirado 1mL de suspensão de partículas para medições de tamanho e Potencial Zeta.

### *3.2.9. Análise Elementar de CHN*

A análise elementar de CHN foi realizada no equipamento Perkin Elmer CHN 2400 pertencente ao DQ-UFMG.

### *3.2.10. Espectroscopia de Absorção UV-Visível*

Os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (200 - 500 nm) foram registrados em espectrofotômetro Thermo Scientific, Multiskan Spectrum pertencente ao LEMB/DQ-UFMG.

### *3.2.11. Medidas de magnetização*

As medidas de magnetização das amostras foram feitas em um magnetômetro *VSM – Vibrating Sample Magnetometer*, equipamento pertencente ao Centro de Desenvolvimento de Tecnologias Nucleares (CDTN). O estudo foi feito mediante a variação do campo magnético externo (15.000 a 15.000 Oe) em função da intensidade desse campo à temperatura de 298K.

## **3.3. Síntese das nanopartículas magnéticas**

### *3.3.1. Nanopartículas magnéticas puras*

As nanopartículas magnéticas foram preparadas pelo método de co-precipitação de íons  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  com solução concentrada de amônia sob

atmosfera de nitrogênio. Foi preparada uma solução aquosa contendo 2,10 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 0,994 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 200 mL de água que foi desoxigenada por fluxo de nitrogênio durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados ao sistema 15 mL de solução concentrada de amônia sob vigorosa agitação. Uma suspensão de partículas negras foi formada imediatamente. O sistema foi mantido aberto e sob agitação por 18 horas para remoção do excesso de amônia. O produto obtido foi lavado com água várias vezes até pH neutro, sendo removido por decantação magnética. O material foi congelado com nitrogênio líquido e submetido ao processo de liofilização para remoção de água.

### *3.3.2. Nanopartículas magnéticas modificadas com ciclodextrinas:*

#### *2-Hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina e $\beta$ -ciclodextrina*

De modo similar ao método acima, as nanopartículas modificadas com ciclodextrinas foram preparadas usando 2,10 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,994 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 450 mg de ciclodextrina (2-Hidroxipropil- $\beta$ -Ciclodextrina ou  $\beta$ -Ciclodextrina) dissolvidos em 200 mL de água. Após desoxidação por fluxo de nitrogênio durante 30 minutos, foram adicionados 15 mL amônia concentrada sob vigorosa agitação. Após 18 horas de agitação em sistema aberto, o material foi neutralizado com água destilada até pH neutro através de decantação magnética. Em seguida, o material foi liofilizado para remoção da água.

### 3.3.3. Nanopartículas magnéticas recobertas com citrato

O recobrimento com citrato foi feito adicionando 2mL de solução de citrato de sódio  $0,5 \text{ g.mL}^{-1}$  em cada uma das amostras preparadas anteriormente. O sistema foi mantido sob agitação por 18 horas. O produto foi lavado com água para remoção do excesso do sal, e liofilizado para remoção da água.

### 3.3.4. Incorporação do fármaco no dispositivo

A inclusão do fármaco irinotecano foi feita adicionando 100  $\mu\text{L}$  de solução de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  do fármaco em 900  $\mu\text{L}$  de suspensão de  $3,3 \text{ mg.mL}^{-1}$  de nanopartículas magnéticas, mantendo o sistema sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. O pH das soluções para inclusão do fármaco foi acidificado até pH 4,5 com adição de HCl diluído, a fim de manter a maior concentração do fármaco em sua forma lactônica.

A quantidade do fármaco incorporado foi determinada através de uma curva de calibração e leituras em 256 nm no Espectrofotômetro de UV-Visível. Essa quantificação foi realizada de forma indireta a partir do sobrenadante do sistema que foi inicialmente centrifugado para separação das nanopartículas. Assim, a partir da quantidade não incorporada determinou-se a quantidade do fármaco na ferrita. A análise foi feita em seis replicatas.

## 3.4. Perfil de liberação do fármaco

O estudo de liberação *in vitro* do irinotecano foi realizado utilizando 3 mg de nanopartículas magnéticas contendo o fármaco. A liberação foi conduzida

em temperatura constante de 37°C sob agitação, utilizando como meio 1 mL de solução tampão salina de fosfato (PBS) com pH 7,4.

Foram coletadas alíquotas de 1mL nos tempos de : 0, 15 e 30 minutos; 1, 2, 4, 8, 24, 48 e 96 horas. A cada coleta as amostras eram inicialmente centrifugadas a 12.500 rpm por 3 minutos e todo o sobrenadante era removido para análise (1mL). Assim, a cada coleta repunha-se 1mL de PBS em cada amostra. A quantificação de irinotecano liberado pelo sistema foi realizada por meio do espectrofotômetro de UV-Visível a 256 nm. O teste foi feito em cinco replicatas para contornar possíveis erros causados pela heterogeneidade do material.

### **3.5. Testes de Citotoxicidade**

Os testes de citotoxicidade contaram com a colaboração da Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés do Departamento de Odontologia da UFMG e responsável pelo Laboratório de cultura celular do LEMB-DQ/UFMG.

Foram realizados testes *in vitro*, utilizando modelos de células de carcinoma epidermóide A431 (ATCC CRL-1555), seguindo o método de MTT descrito por Mosmann (Mosmann, 1983).

#### **3.5.1. Ensaio de MTT**

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico capaz de avaliar a viabilidade celular indiretamente, através da atividade enzimática das enzimas mitocondriais redutases. Nesse teste o reagente de MTT, o íon tetrazólio é oxidado pelas enzimas mitocondriais redutases dando origem aos cristais de

formazan de coloração azul (Figura 11). Assim, a formação dos cristais azuis indicam atividade mitocondrial, ou seja, a presença de células vivas.

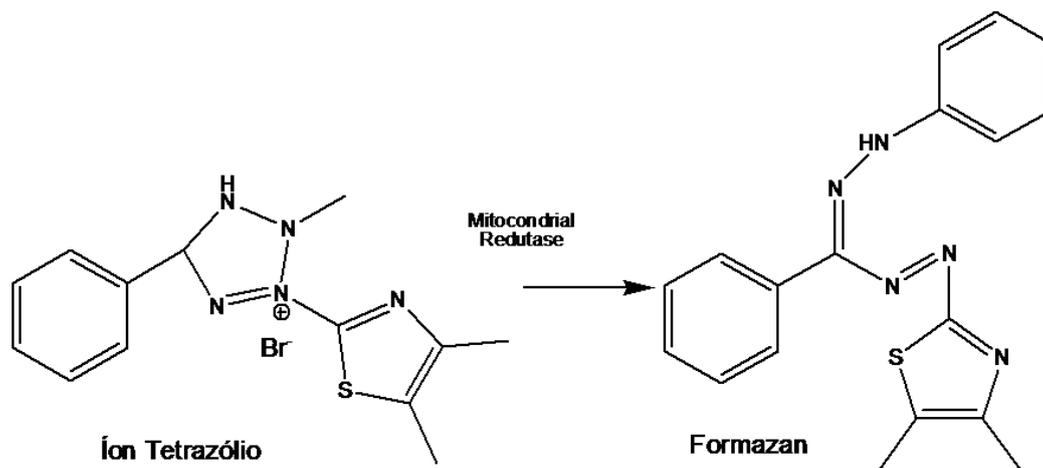


Figura 11 – Reação de conversão do íon tetrazólio em formazan.

As células foram cultivadas em meio DMEM com alta concentração de glicose suplementado com 10% FBS, 3% aminoácidos essenciais, 1% (v/v) L-glutamina, 1% (v/v) HEPES, antibióticos (0,1 mg/mL estreptomicina e 100 U/mL penicilina), e antimicóticos. A cultura foi mantida a 37°C em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir confluência, elas foram transferidas para placas de 96 poços com concentração em torno de 1x10<sup>5</sup> células/poço. A contagem das células foi realizada através da câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio.

Após 70% de confluência, foram adicionadas em cada poço as soluções contendo os materiais a serem testados, os testes foram feitos em seis replicatas e em quatro concentrações diferentes de cada material. O tempo de contato (incubação) de cada material foi de 48 horas à temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

Estabelecido o tempo de incubação, foi realizada a remoção dos materiais testados, utilizando solução de PBS estéril. Após essa lavagem, o reagente de MTT foi adicionado. As placas foram protegidas da luz devido à fotossensibilidade do reagente de MTT. Depois de 4 horas de incubação à 37°C e formação dos cristais azuis de formazan, foi adicionado uma solução detergente de dodecilsulfato de sódio (SDS), que ficou 18 horas em contato com as células. Por fim, a leitura das placas foi feita através do Espectrofotômetro de UV-Visível no comprimento de onda de 570 nm. É importante ressaltar que foram feitos os controles negativos e brancos referentes a cada placa.

### *3.5.2. Análise estatística*

A análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad 5.0. As comparações múltiplas entre grupos foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste de hoc Bonferroni.

## 4. Resultados e Discussão

---

### 4.1. Síntese das nanopartículas magnéticas

Existem vários métodos descritos na literatura para produzir nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro compatíveis para a aplicação biomédica. Dentre eles podemos citar: co-precipitação, decomposição térmica, microemulsão e síntese hidrotérmica (Lu et al., 2007). Eles têm como principais objetivos obter partículas uniformes, biodisponíveis, com boa estabilidade em solução aquosa, tamanhos inferiores a 20 nm e funcionalizações de superfície que permitam um melhor efeito desejado, como, por exemplo, uma maior capacidade de encapsulação do fármaco.

Nesse trabalho a síntese por co-precipitação foi empregada por ser uma metodologia simples, reprodutível, viável para produção em grande escala e mais barata em relação às demais. Além disso, ela apresenta a vantagem de fornecer produtos mais hidrofílicos por ser conduzida em solução aquosa.

A utilização do citrato no recobrimento das nanopartículas surgiu como estratégia para diminuir a oxidação e minimizar o grau de agregação das nanopartículas, como relatado a seguir.

## 4.2. Caracterização da Nanopartículas Magnéticas

### 4.2.1. Morfologia e tamanho das nanopartículas

O estudo de tamanho das partículas em meio aquoso foi realizada por meio de espalhamento de luz dinâmico. Os dados estão apresentados na Tabela 2, onde observamos que o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas diminui tanto com a incorporação da ciclodextrina quanto do íon citrato, que concomitantemente gera um valor mais negativo do potencial Zeta.

Tabela 2 – Medidas de tamanho de partículas, distribuição e potencial Zeta baseadas na técnica de espalhamento de luz dinâmico.

Nanopartículas	Tamanho das partículas (nm)	Polidispersão (%)	Potencial Zeta (mV)
Ferrita pura	344,6	0,310	-2,82
Ferrita-betaCD	94,96	0,137	-5,31
Ferrita-HPbetaCD	176,0	0,192	-13,0
Ferrita-betaCD-citrato	43,50	0,251	-33,8
Ferrita-HPbetaCD-citrato	86,99	0,251	-41,2

Segundo Yallapu e colaboradores (Yallapu et al., 2011), o potencial Zeta mais negativo pode ser responsável pela diminuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas devido ao aumento da repulsão entre elas e conseqüentemente menor agregação. Entretanto, as nanopartículas com  $\beta$ -ciclodextrina tiveram tamanhos menores em relação as que continham HP- $\beta$ -

ciclodextrina, mesmo possuindo um potencial Zeta ligeiramente menos negativo. Ademais, observamos que a polidispersão das nanopartículas teve um decréscimo ao comparar a ferrita pura com as demais ferritas, ou seja, houve uma menor dispersão de tamanho das ferritas funcionalizadas em relação a ferrita pura.

As micrografias de TEM apresentadas nas Figuras 12 e 13 permitem uma visualização do tamanho individual das nanopartículas.

As micrografias da Figura 12 mostram que as nanopartículas sintetizadas são bem semelhantes, apresentando morfologia esférica. Notamos que a ferrita pura possui uma dispersão maior de diâmetros das partículas comparada às outras ferritas preparadas. As ferritas contendo  $\beta$ -ciclodextrina (C e D) tiveram diâmetros menores, de acordo com os dados postados na Tabela 2. De modo geral, observa-se que o uso do citrato e/ou das ciclodextrinas provoca um aumento da uniformidade e diminuição de tamanho nas nanopartículas.

Não foi verificada diferença no grau de agregação entre as nanopartículas com ciclodextrina e/ou citrato, ao contrário do que foi observado nas medidas por espalhamento de luz. Porém, deve-se considerar que as imagens foram realizadas em estado sólido e não em suspensão, o que gera maior agregação das nanopartículas e inviabiliza a percepção da diferença no grau de agregação entre elas.

Com uma aproximação maior das imagens percebemos que o diâmetro das partículas é inferior a 10 nm em todas as ferritas, exceto a ferrita pura que apresenta partículas de diâmetros variáveis, sendo algumas superiores a 20 nm (Figura 13).

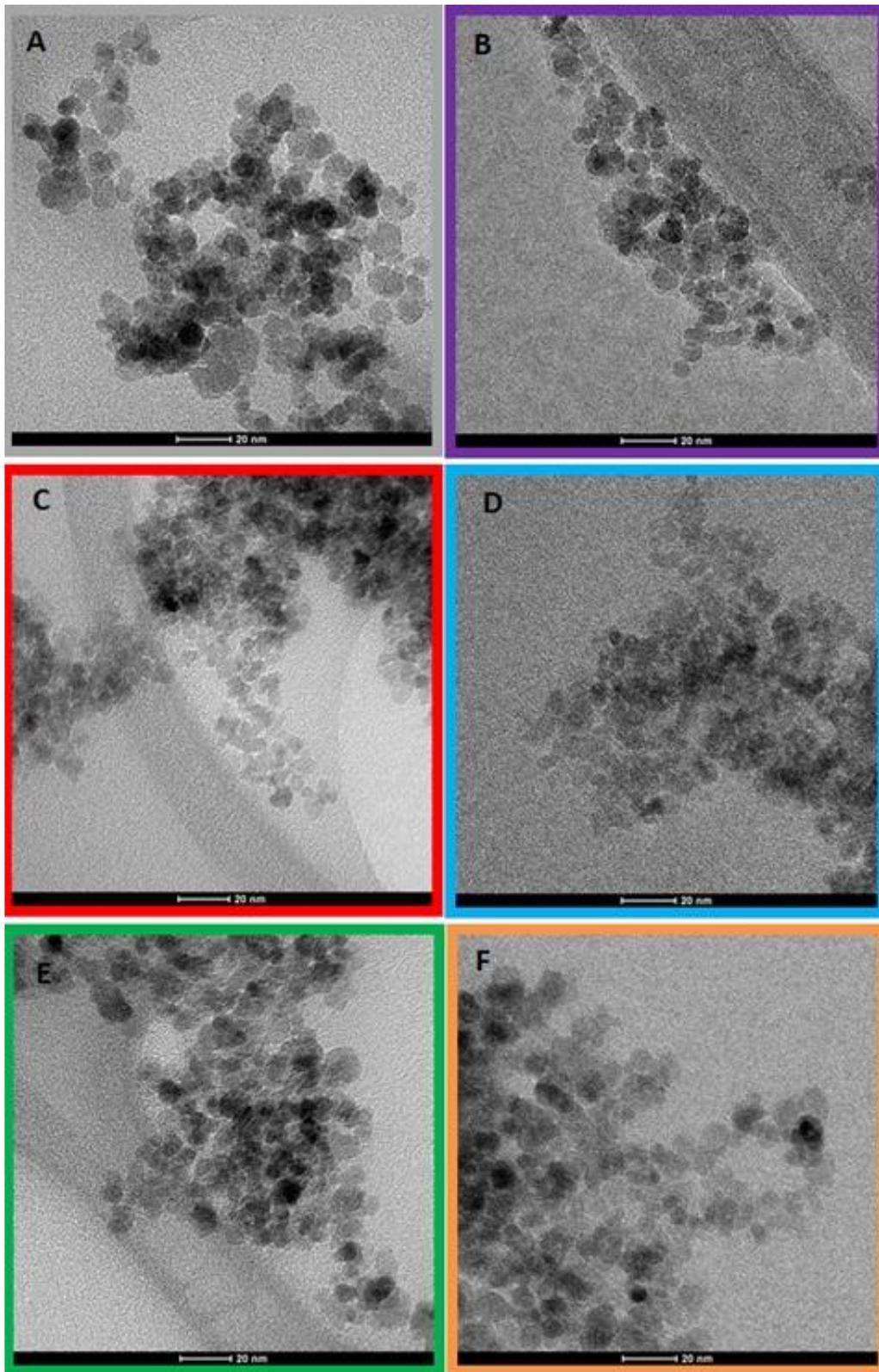


Figura 12 - Micrografias (TEM) das nanopartículas (aumento de 145000): (A) Ferrita pura; (B) Ferrita citrato; (C) Ferrita-betaCD; (D) Ferrita-betaCD-citrato; (E) Ferrita-HPbetaCD e (F) Ferrita-HPbetaCD-citrato.

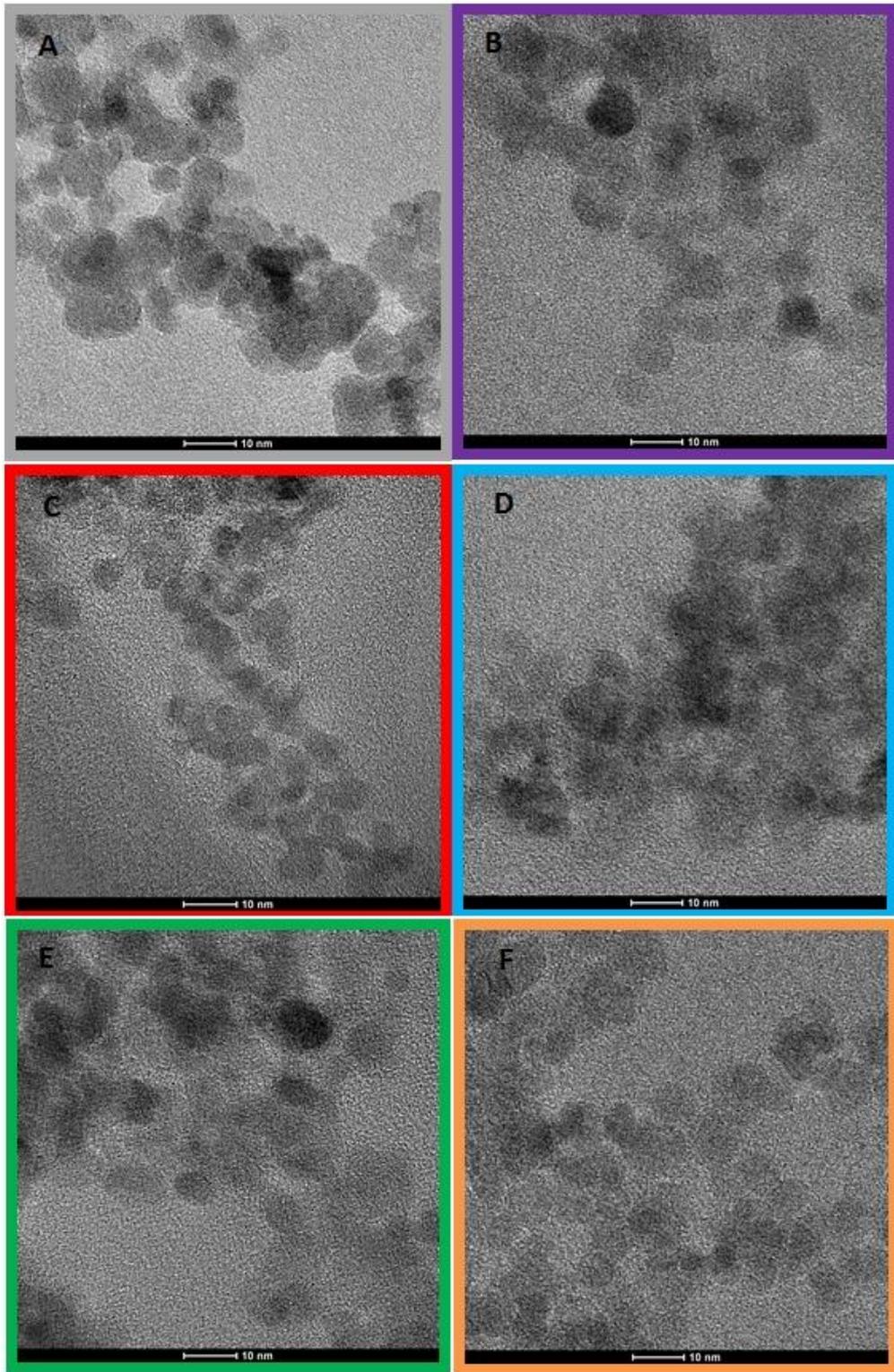


Figura 13 - Micrografias (TEM) das nanopartículas (aumento de 285000): (A) Ferrita pura; (B) Ferrita citrato (C) Ferrita-betaCD; (D) Ferrita-betaCD-citrato; (E) Ferrita-HPbetaCD e (F) Ferrita-HPbetaCD-citrato.

#### 4.2.2. Análise Elementar e Espectroscopia de Absorção Atômica

A quantificação do percentual de ferro, carbono e hidrogênio das amostras sintetizadas estão apresentadas na Tabela 3. A partir desses dados é possível estipular qual a quantidade de material orgânico presente nas amostras, ou seja, quanto de ciclodextrina e citrato foi incorporado nas ferritas. A Ferrita-betaCD e Ferrita-betaCD-citrato mostraram um percentual de carbono superior às demais amostras, o que indica que essas possuem uma maior quantidade de ciclodextrina e oportunamente melhor eficiência de encapsulação do fármaco.

Tabela 3 – Percentual de Carbono, Hidrogênio e Ferro das amostras sintetizadas.

	<b>Carbono/(%)</b>	<b>Hidrogênio/(%)</b>	<b>Ferro/(%)</b>
<b>Ferrita Pura</b>	-	-	68,35
<b>Ferrita-betaCD</b>	3,43	0,930	61,91
<b>Ferrita-HPbetaCD</b>	1,86	0,510	63,51
<b>Ferrita-betaCD-citrato</b>	3,92	0,820	58,18
<b>Ferrita-HPbetaCD-citrato</b>	2,00	0,575	64,63

O percentual de carbono obtido em torno de 3% na ferrita-betaCD e de 2% na ferrita-HPbetaCD indica que grande parte das ciclodextrinas inicialmente adicionadas na síntese são removidas e descartadas pelo processo de lavagem e neutralização das nanopartículas com água. Uma alternativa para elevar esse percentual, seria adicionar uma maior quantidade inicial de

ciclodextrina no sistema. No entanto, o trabalho de Yallapu e colaboradores mostrou que quantidades superiores de ciclodextrinas nesse sistema acarretam em uma maior agregação das nanopartículas, gerando um maior tamanho hidrodinâmico destas.

#### *4.2.3. Difratomia de Raios X*

Os difratogramas de Raios X das amostras permitem uma determinação das suas fases cristalinas bem como seu grau de cristalinidade. Em todas as amostras foram identificados picos de  $2\theta$  em  $30,1^\circ$ ;  $35,5^\circ$ ;  $43,1^\circ$ ;  $53,5^\circ$ ;  $57,1^\circ$  e  $62,7^\circ$  correspondentes aos valores  $d_{hkl}$  220, 311, 400, 422, 440 e 511 do sistema cristalino  $Fe_2O_3$  (Figura 14). A ausência de dois picos de baixa intensidade (213 e 210) em torno de  $31^\circ$  característicos da maghemita (Cornell and Schwertmann, 2003) sugere que as amostras sejam constituídas de magnetita e não de maghemita. A maghemita tem a mesma estrutura da magnetita, se diferenciando apenas pela ausência de Fe(II). Nesse contexto, a maghemita pode ser considerada como primeiro produto de oxidação da magnetita.

Apesar do material orgânico gerar um certo grau de amorficidade à amostra, não foi verificado entre os espectros da ferrita pura e as outras ferritas diferenças significativas de intensidade e largura dos picos. Essa equivalência entre os difratogramas pode ser justificada pelo baixo teor de ciclodextrinas e/ou citrato nas amostras.

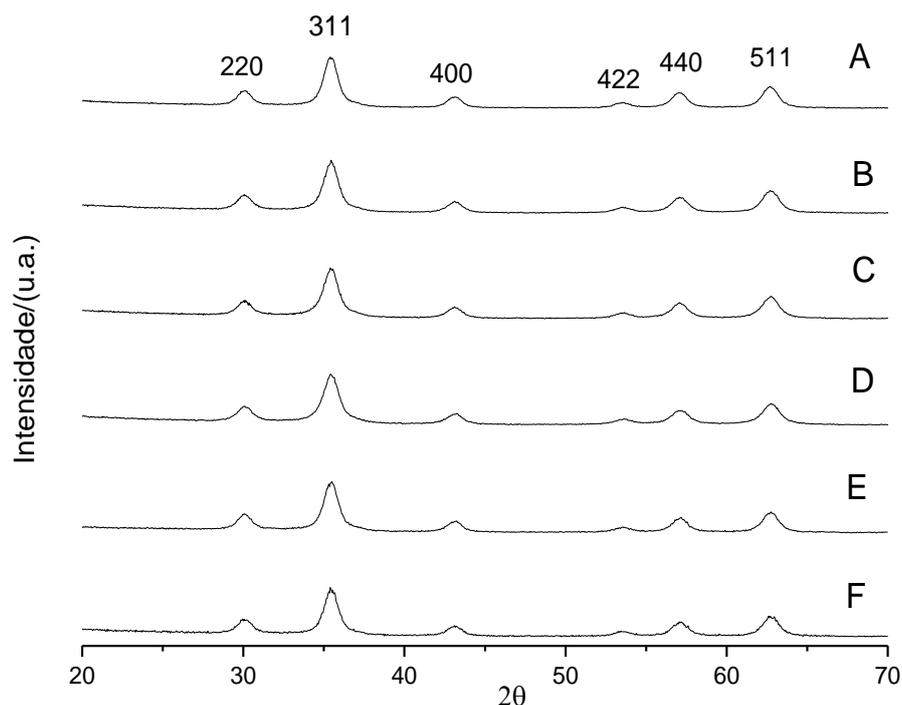


Figura 14 – Difratoogramas das nanopartículas sintetizadas: (A) Ferrita-HPbetaCD-citrato; (B) Ferrita-HPbetaCD; (C) Ferrita-betaCD-citrato; (D) Ferrita-betaCD; (E) Ferrita-citrato e (F) Ferrita Pura.

#### 4.2.4. Termogravimetria (TG)

A Figura 15 apresenta o comportamento térmico das substâncias puras:  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina e citrato de sódio. As curvas TG das duas ciclodextrinas são similares, onde a primeira etapa que inicia na temperatura ambiente até a temperatura de aproximadamente 100°C está relacionada à perda de água, seguida por um patamar de estabilidade térmica e a segunda etapa se refere a uma decomposição da amostra que ocorre a partir de aproximadamente 300°C na  $\beta$ -ciclodextrina e a partir de 200°C na 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina (Giordano et al., 2001).

A curva TG do citrato de sódio pode ser dividida em quatro etapas de decomposição. A primeira em aproximadamente 170°C, seguida de uma segunda perda de massa em aproximadamente 300°C correspondente a um estágio inicial de descarboxilação, a terceira etapa em torno de 400°C que representa uma etapa de pirólise do citrato e uma degradação final em torno de 700°C (Li and Kirkpatrick, 2007; Rajendran and Subba Rao, 1994).

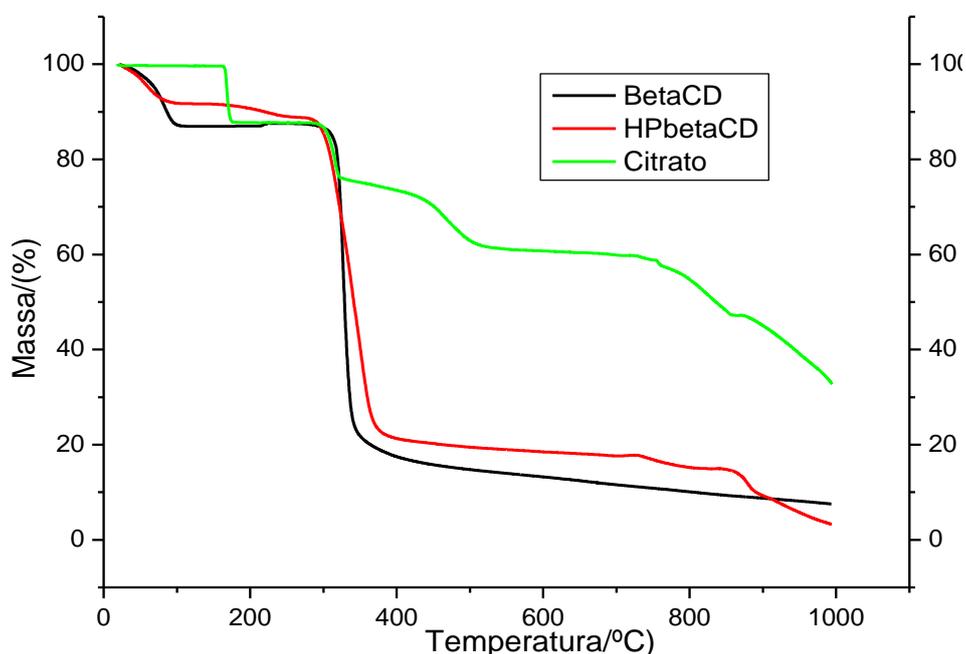


Figura 15 – Curvas TG das substâncias puras: citrato de sódio, 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina e  $\beta$ -ciclodextrina.

A partir das curvas TG dessas substâncias foram realizadas as curvas DTG e DTA que estão apresentadas na Figura 16. Nas curvas DTG observamos os eventos já discutidos, correspondentes às perdas de massa de todas as substâncias. Analisando as curvas de DTA das ciclodextrinas, verificamos as temperaturas onde ocorrem os eventos relacionados à

desidratação e a termodegradação da  $\beta$ -ciclodextrina, com picos em 87°C e 333°C, e da 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina, em 62°C e 324°C, respectivamente. Na curva DTA do citrato de sódio observamos as temperaturas relacionadas às etapas ao primeiro estágio de decomposição, em 173 °C, de descarboxilação, em 318 °C e de pirólise em torno de 455 °C.

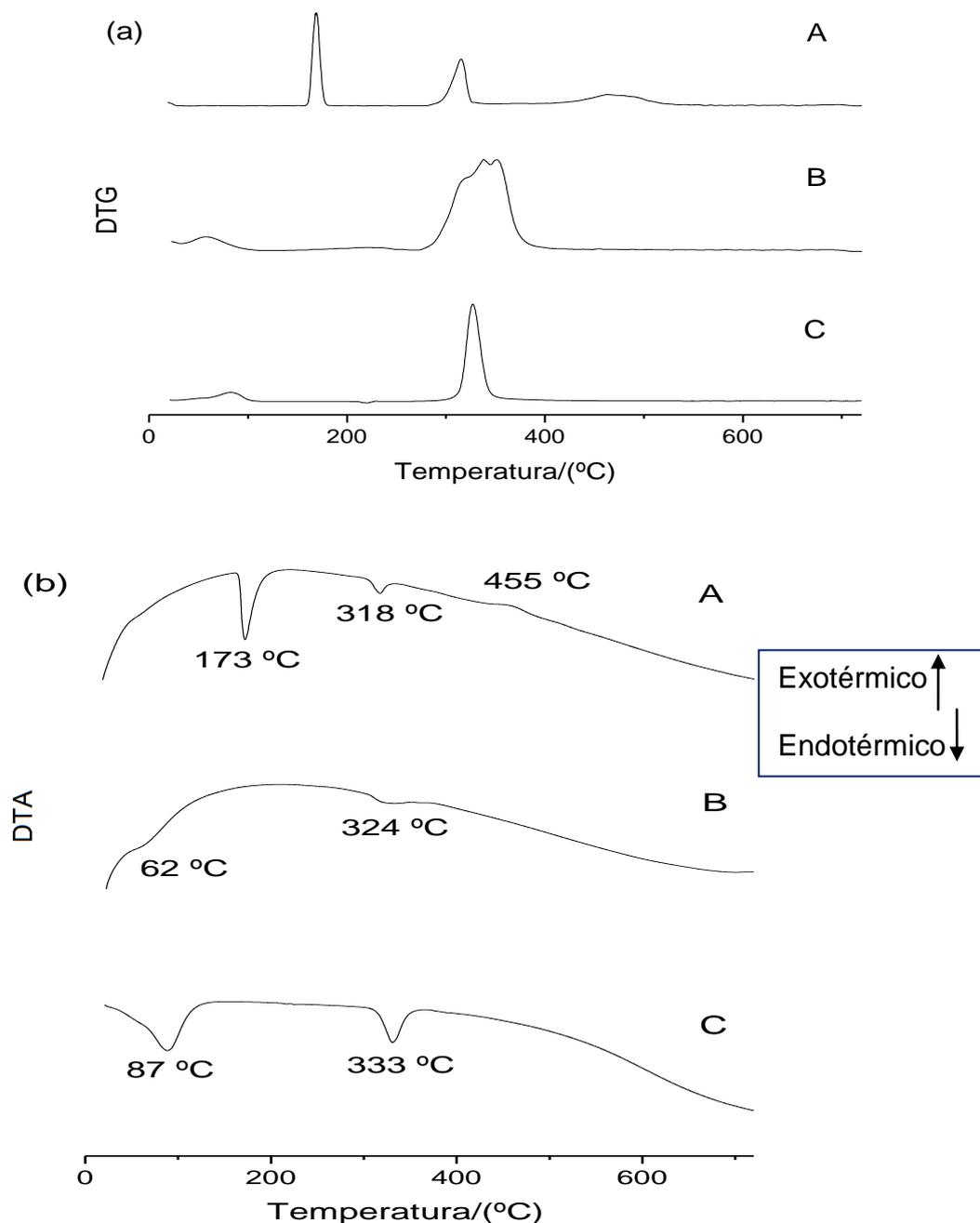


Figura 16 – Curvas DTG (a) e DTA (b) das substâncias puras: (A) citrato de sódio, (B) 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina e (C)  $\beta$ -ciclodextrina.

Pode-se verificar a presença de ciclodextrina e de citrato nas curvas TG das nanopartículas sintetizadas, que estão apresentadas nas Figuras 17 e 18.

Pela Figura 17 é possível identificar que o percentual de  $\beta$ -ciclodextrina é de 6,2% na ferrita-betaCD. Esse valor é obtido pela subtração da massa residual da ferrita pura (89,4%) pela massa residual de ferrita-betaCD (83,2%). O valor encontrado é um pouco superior ao obtido por Yallapu e colaboradores (Yallapu et al., 2011) que obtiveram por essa mesma técnica um percentual de 4,6% na incorporação de  $\beta$ -ciclodextrina em uma ferrita similar a esse trabalho. Fazendo os mesmos cálculos para a ferrita-betaCD-citrato com massa residual de 84,5%, obtemos 4,9% de  $\beta$ -ciclodextrina mais citrato. O percentual encontrado de  $\beta$ -ciclodextrina mais citrato nessa ferrita é 1,3% inferior ao de  $\beta$ -ciclodextrina na ferrita-betaCD. Contudo, a temperatura de 1.000°C não é suficiente para consumir totalmente o citrato. Ao contrário da curva TG das ciclodextrinas, na curva TG do citrato tem-se ainda cerca de 30% de resíduo até a temperatura de 1.000°C como mostrado na Figura 15. Isso mostra que há um percentual de citrato que não está incluído na percentagem de 4,9% e que provavelmente a uma temperatura superior a 1000°C o patamar na curva TG da ferrita-betaCD-citrato fique abaixo do da curva TG da ferrita-betaCD.

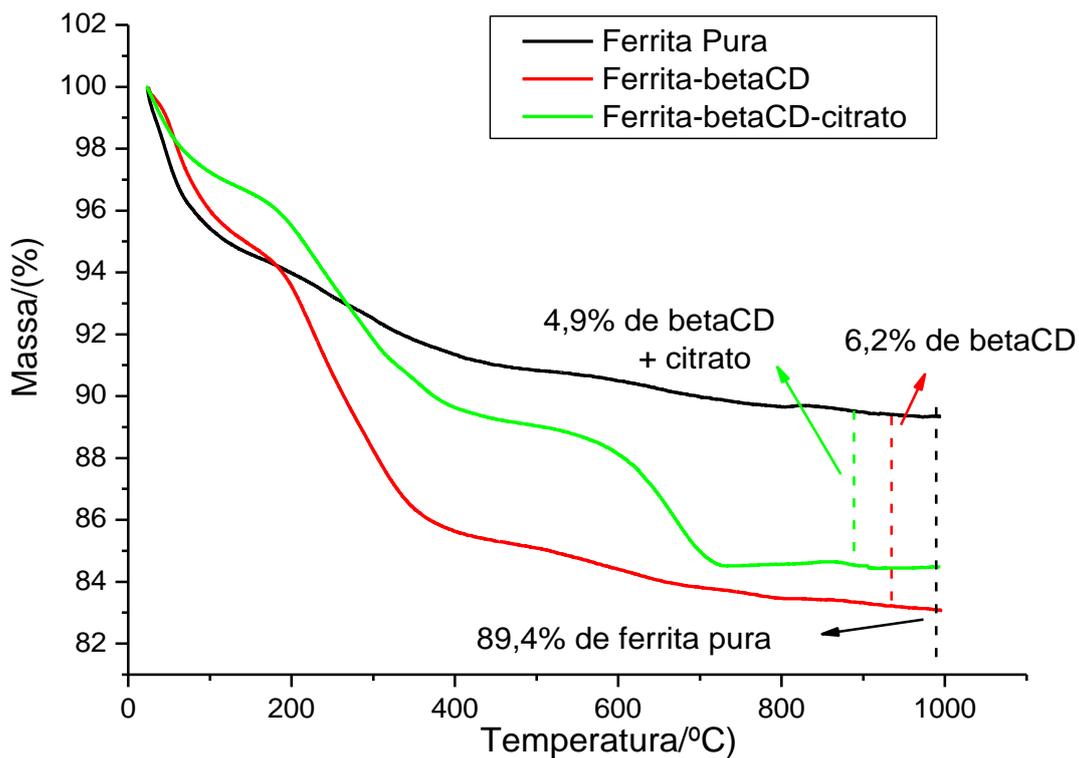


Figura 17 – Curvas TG das nanopartículas: Ferrita pura, Ferrita-betaCD e Ferrita-betaCD-citrato.

Já a Figura 18 mostra que a ferrita-HPbetaCD-citrato teve uma perda de massa adicional de 1,3% em relação à ferrita modificada somente com a ciclodextrina, o que permite uma melhor percepção do revestimento com íons citrato. Deste modo, apesar de apresentar um percentual menor de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (2,8%) do que a ferrita-betaCD (6,2%), a perda adicional de 1,3% sugere um revestimento maior com íon citrato.

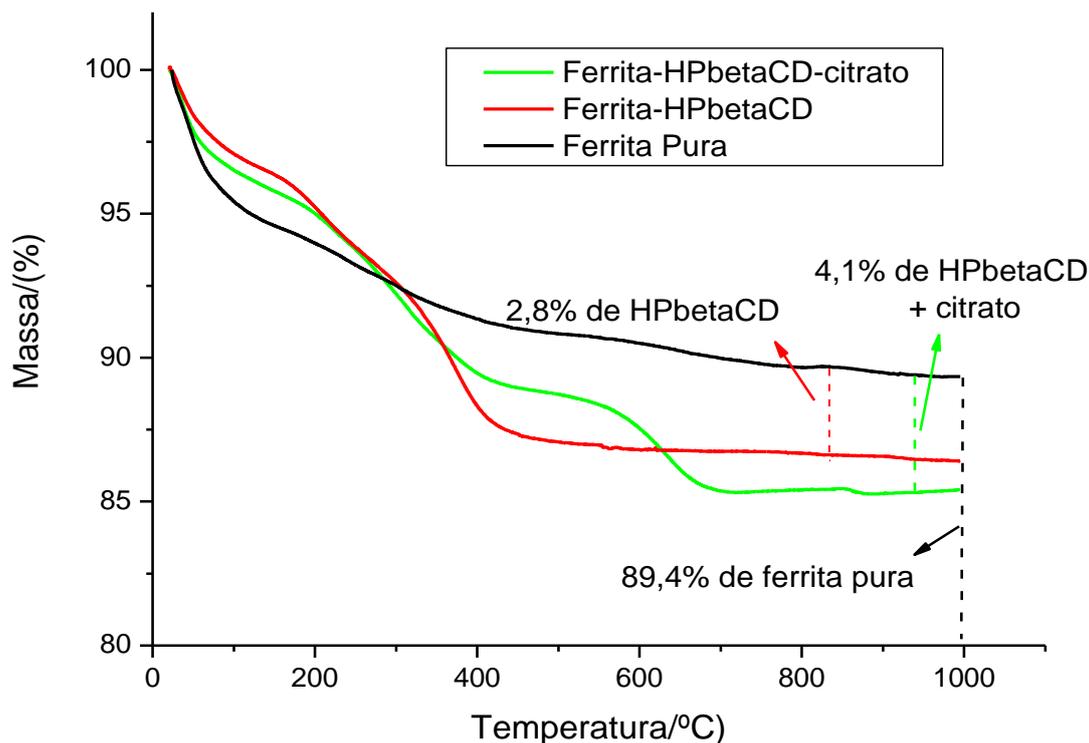


Figura 18 – Curvas TG das nanopartículas: Ferrita pura, Ferrita-HPbetaCD e Ferrita-HPbetaCD-citrato.

A Figura 19 mostra as curvas DTG das ferritas sintetizadas. Observa-se que todas apresentam uma perda de massa inicial em torno de 50°C correspondente a etapa de desidratação dos materiais. Na curva 19E percebemos a estabilidade térmica da ferrita pura, que não possui outro evento de perda de massa até 800°C. Nas demais curvas, observamos outra perda de massa em torno de 300°C que pode ser atribuída a termodegradação das ciclodextrinas, e no caso das curvas 19A e 19B pode ser referente também a descarboxilação do citrato. Nas curvas 19A e 19B temos ainda uma perda de massa com pico da DTG em torno de 650°C que pode ser correspondente a última etapa de decomposição do citrato, apesar dessa ser observada em torno de 700°C no citrato de sódio livre.

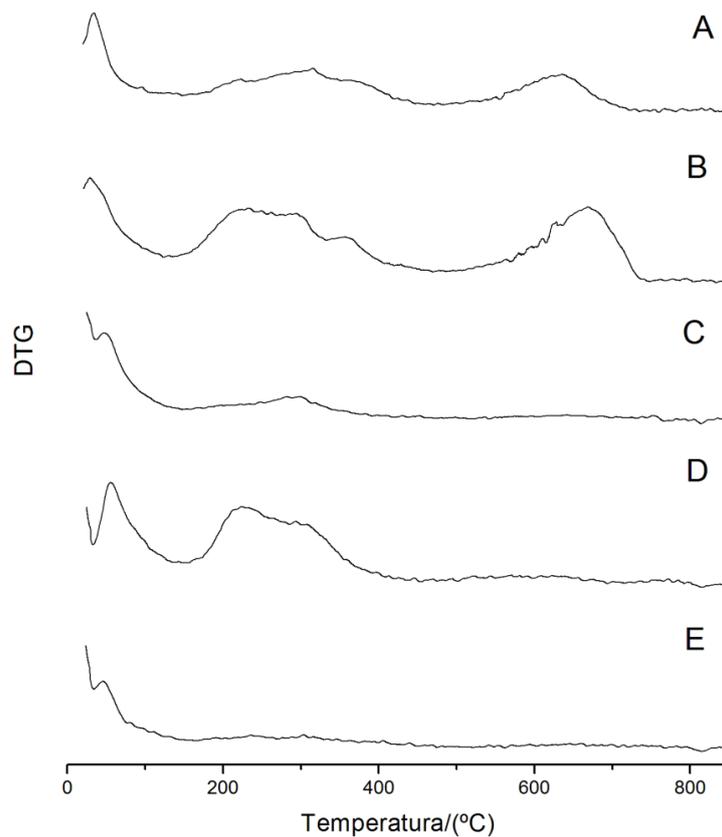


Figura 19 – Curvas DTG das nanopartículas sintetizadas: (A) Ferrita-HPbetaCD-citrato; (B) Ferrita-betaCD-citrato; (C) Ferrita-HPbetaCD; (D) Ferrita-betaCD e (E) Ferrita Pura.

Na Figura 20 estão apresentadas as curvas DTA das nanopartículas sintetizadas. Analisando as curvas DTA percebemos a ausência dos eventos mencionados acima. Entretanto, um evento importante característico da mudança de fase cristalina da ferrita é observado nas curvas 20C, 20D e 20E. Essa mudança corresponde à transformação da maghemita em hematita (Thickett and Odlyha, 2005), ocorrendo em torno de 576°C na ferrita pura e em temperaturas menores na ferrita-betaCD (520°C) e ferrita-HPbetaCD (551°C).

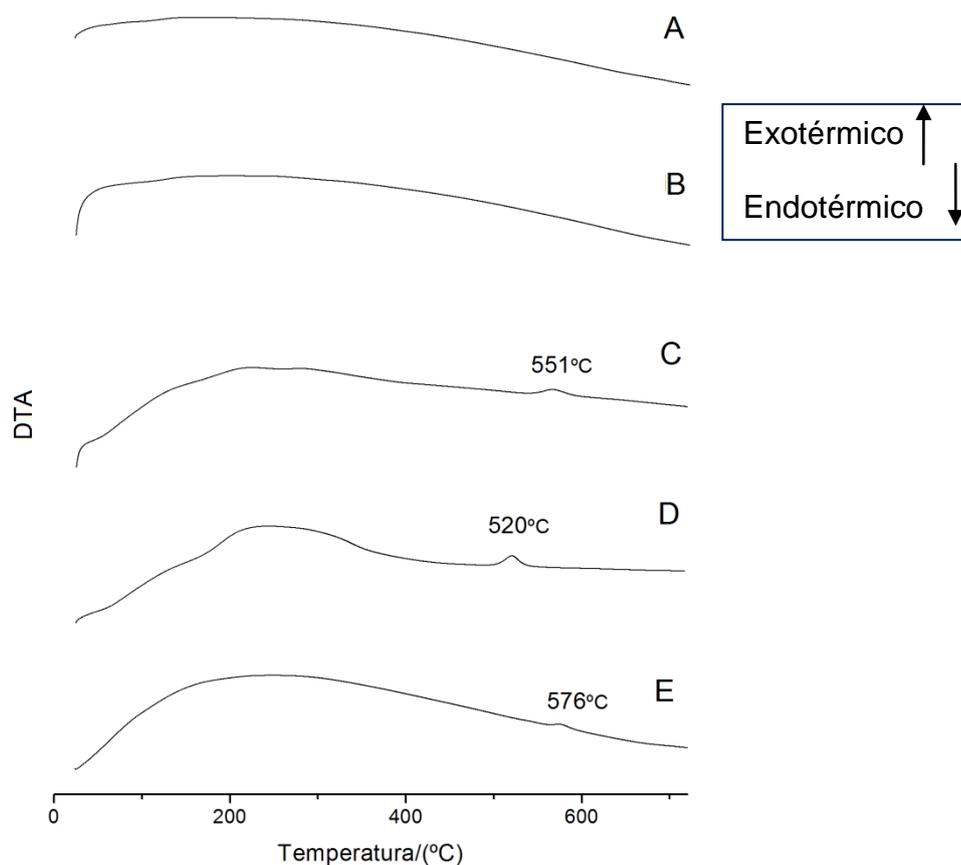


Figura 20 – Curvas DTA das nanopartículas sintetizadas: (A) Ferrita-HPbetaCD-citrato; (B) Ferrita-betaCD-citrato; (C) Ferrita-HPbetaCD; (D) Ferrita-betaCD e (E) Ferrita Pura.

#### 4.2.5. Espectroscopia Mössbauer

As amostras foram submetidas a duas análises no aparelho de Mössbauer: a primeira à temperatura ambiente (298K) e a segunda à baixa temperatura (20K). Os respectivos espectros estão apresentados nas Figuras 21 (298K) e 22 (20K).

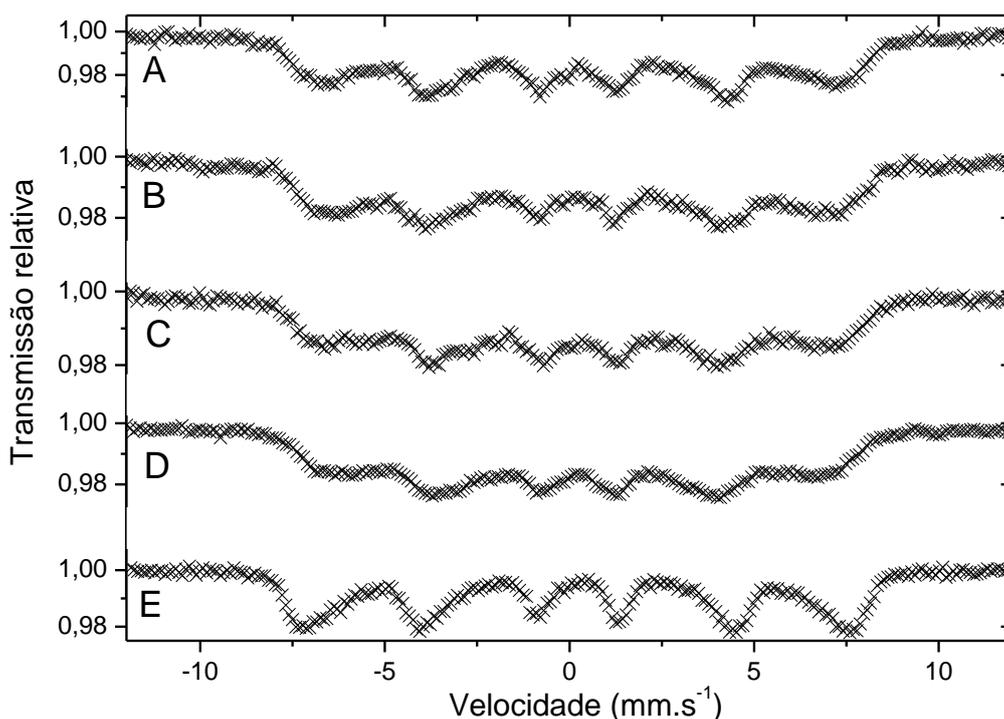


Figura 21 – Espectros Mössbauer das nanopartículas a temperatura ambiente: (A) Ferrita-HPbetaCD-citrato, (B) Ferrita-HPbetaCD, (C) Ferrita-betaCD-citrato, (D) Ferrita-betaCD e (E) Ferrita pura.

O espectro realizado a temperatura ambiente (Figura 21) sugere um caráter superparamagnético das amostras, caracterizado pela deformidade da linha de base. O superparamagnetismo faz com que o material se comporte como paramagnético apresentando apenas um duplete no espectro, sem interação hiperfina magnética. Esse fato ocorre porque o tempo de medida do aparelho é superior ao tempo de relaxação do material, ou seja, o momento magnético das partículas oscila rapidamente em direções aleatórias tornando nula a média temporal da magnetização do sistema durante a medida. A formação do sexteto nos espectros em questão se deve ao fato da amostra apresentar uma distribuição de tamanho de partículas, sendo o superparamagnetismo inexistente a aquelas com tamanho superiores a ~20

nm. Analisando ainda a Figura 21, percebemos que o espectro referente a ferrita pura (21E) possui um sexteto mais definido, com uma intensidade maior e um campo hiperfino superior aos demais espectros. Isso pode indicar um tamanho maior dos cristalitos, sugerindo que a ferrita pura tem partículas maiores que as outras ferritas sintetizadas.

O próprio caráter superparamagnético da amostra impossibilita uma interpretação mais detalhada do espectro. Assim, tornou-se necessário o abaixamento da temperatura de análise a fim de permitir uma melhor visualização e caracterização do material. Ao reduzir a temperatura, o efeito de relaxação progressivamente tende a ser bloqueado promovendo o ordenamento magnético do material (Cornell and Schwertmann, 2003).

Os espectros de Mössbauer obtidos a 20 K estão apresentados na Figura 22. A interpretação desses espectros é difícil, devido à transição Verwey, que causam uma estrutura hiperfina no material. Na magnetita, essa transição ocorre em torno de 118K, temperatura na qual as nanopartículas ainda não atingiram sua temperatura de bloqueio. Assim, a análise a 20K viabiliza o ajuste dos espectros, porém dificulta a interpretação e identificação da magnetita.

Os espectros a 20 K foram ajustados com quatro sítios atribuídos ao  $\text{Fe}^{3+}$  localizado no sítio tetraédrico,  $\text{Fe}^{3+}$  em sítios octaédricos, Fe com os estados de valência intermediária, e  $\text{Fe}^{2+}$  em sítios octaédricos. Os pequenos valores de alteração dos parâmetros hiperfinos para as amostras estão listadas na Tabela 4. Os valores obtidos indicam que apesar do objetivo de síntese ser a produção nanopartículas de magnetita, a ausência do ponto isomérico correspondente ao  $\text{Fe}^{2+}$  (ISO ~ 0,67) contido no sítio octaédrico da magnetita,

sugere que a magnetita supostamente sintetizada foi oxidada a maghemita. Esse fato, não apresenta grandes problemas ao sistema já que a maghemita apresenta propriedades semelhantes à magnetita, como por exemplo, alta magnetização de saturação.

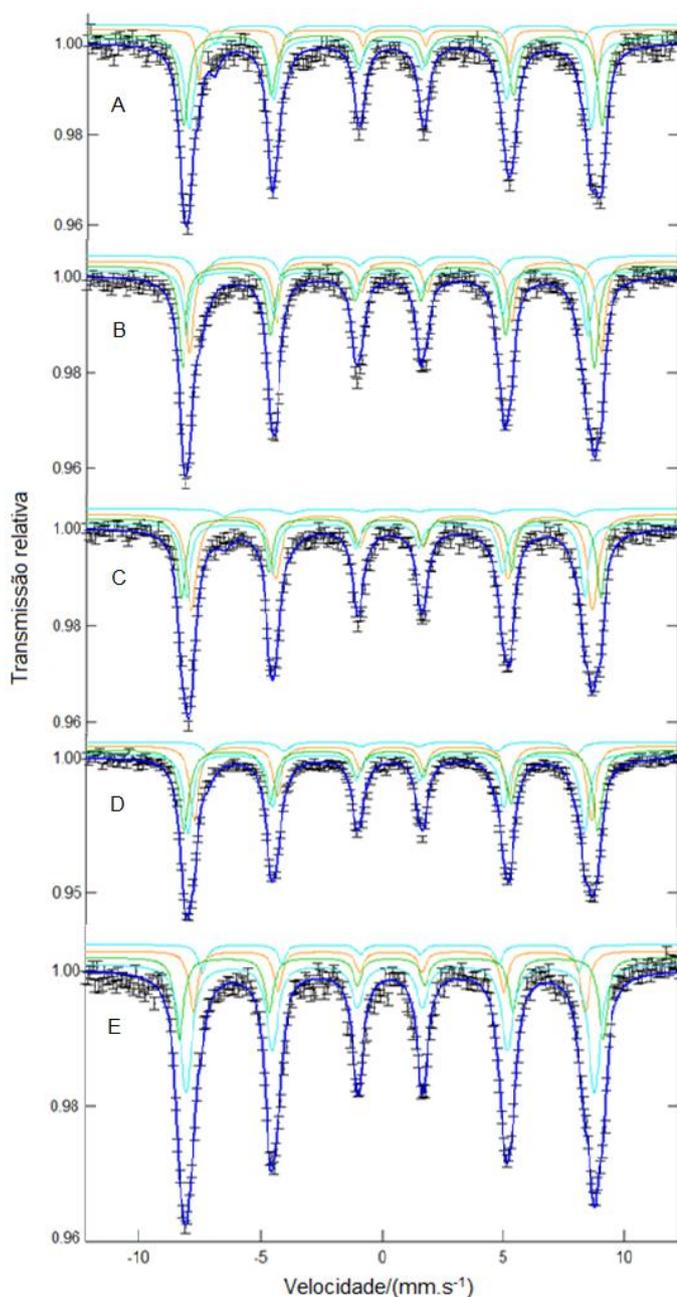


Figura 22 – Espectros Mössbauer das nanopartículas à 20K : (A) Ferrita pura, (B) Ferrita-betaCD, (C) Ferrita-HPbetaCD, (D) Ferrita-betaCD-citrato e (E) Ferrita-HPbetaCD-citrato.

Tabela 4 – Parâmetros hiperfinos dos espectros Mössbauer à temperatura de 20K das nanopartículas ( $\delta$  deslocamento isomérico,  $\epsilon$  quadrupolo,  $B_{hf}$  campo hiperfino).

Amostras	$\delta$ (mm/s)	$\epsilon$ (mm/s)	$B_{hf}$ (T)	Área (%)
<b>(A) Ferrita pura</b>	0,29	0	52,3	41
	0,39	0,02	54,4	43
	0,54	0,15	51,8	8
	0,54	0,18	47,7	8
<b>(B) Ferrita-betaCD</b>	0,23	- 0,06	51,2	20
	0,25	0	52,4	35
	0,53	0,06	52,3	30
	0,34	0,05	48,4	15
<b>(C) Ferrita-HPbetaCD</b>	0,18	-0,07	50,7	22
	0,36	0,03	53,5	22
	0,41	0,02	51,2	49
	0,56	0,34	44,7	7
<b>(D) Ferrita-betaCD-citrato</b>	0,23	-0,05	50,7	30
	0,36	0,04	52,9	36
	0,45	0,02	50,8	26
	0,39	0,09	46,9	8
<b>(E) Ferrita-HPbetaCD-citrato</b>	0,33	0,01	51,9	58
	0,38	0	53,9	21
	0,33	-0,07	49,9	14
	0,35	0	47,9	6

#### 4.2.6. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Na Figura 23 estão apresentados os espectros de absorção na região do infravermelho das ferritas.

Analisando os espectros de infravermelho, observamos que todas as amostras apresentaram uma intensa e larga banda em torno de  $580\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação (Fe-O-) da ferrita. Os espectros 23A e 23D permitiram confirmar a presença da  $\beta$ -ciclodextrina e da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina nas ferritas devido à presença das bandas de estiramento (-C-O-C-) referente à ligação  $\alpha$  (1-4) glicosídica entre  $1010$  e  $1060\text{ cm}^{-1}$ ; a banda em  $1197\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao acoplamento dos estiramentos (-C-C/-C-O-); e alguns modos referentes a deformações (-C-H) entre  $1300$  e  $1450\text{ cm}^{-1}$  (indicadas pelo quadro pontilhado na Figura 23).

O aumento da intensidade das bandas na região de  $1600\text{ cm}^{-1}$  características dos estiramentos das ligações (-COO-Fe-) nos espectros 23B e 23E (indicado pela seta) sugere uma possível reação entre os radicais hidroxil da superfície da ferrita com o ânion carboxilato do citrato, observado também por Yan Wei *et al.* (Wei *et al.*, 2012) e Racuciu *et al.* (Racuciu *et al.*, 2006).

Nos espectros 23C e 23F das formulações contendo o fármaco irinotecano, o surgimento de um ombro em torno de  $1700\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído ao estiramento da ligação (-C=O) da carbonila no anel lactônico ou do estiramento (-C=O)  $\alpha$ -cetoéster desse fármaco. O aparecimento das bandas em  $2850\text{ cm}^{-1}$  e em torno de  $2940\text{ cm}^{-1}$  é atribuído, respectivamente, aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação (-CH<sub>2</sub>) do grupo metileno da molécula de irinotecano. O estiramento (-C-H) dos grupos metilenos possui

frequência menor que o estiramento (-C-H) dos anéis aromáticos (Babu et al., 2012). Por fim, uma diminuição de intensidade e um pequeno alargamento da banda em torno de  $1380\text{ cm}^{-1}$  sugerem uma interação do fármaco com as ferritas sintetizadas.

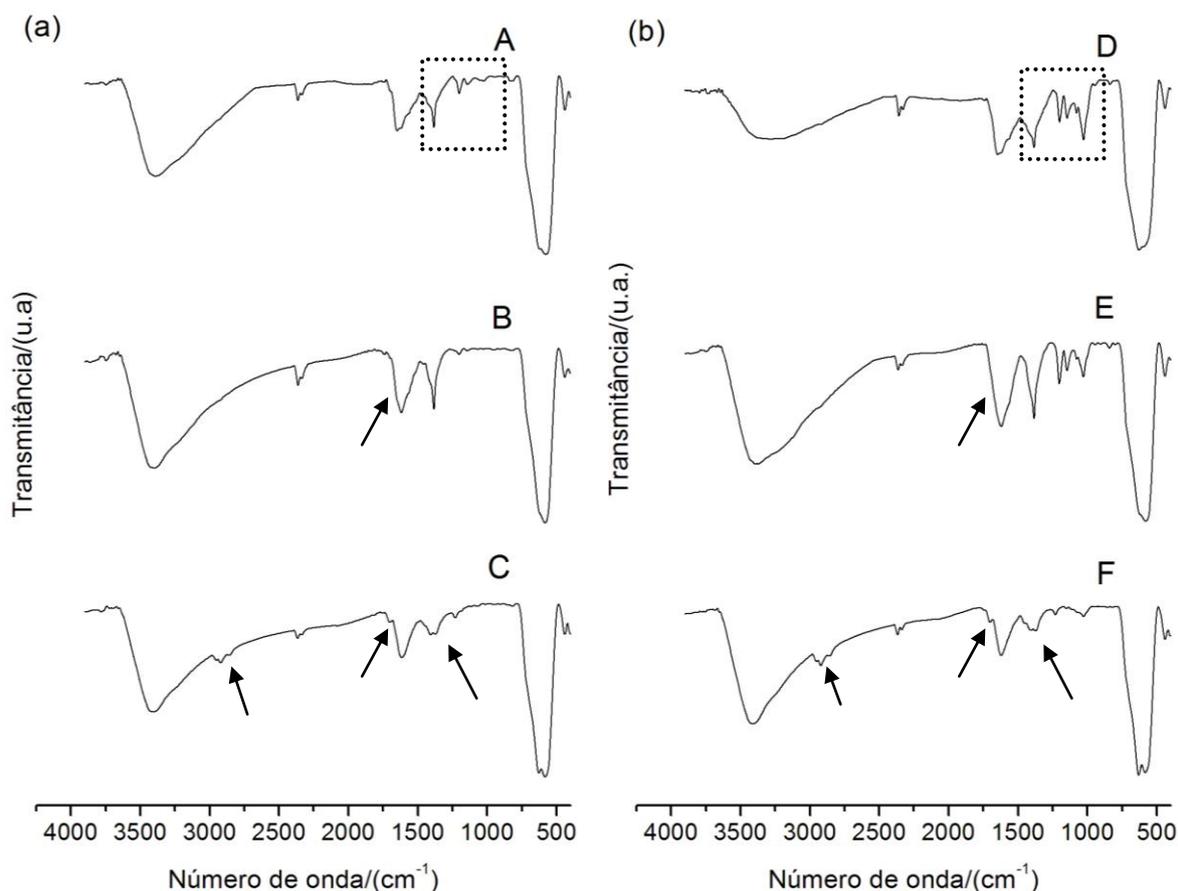


Figura 23 – Espectro de Infravermelho das nanopartículas: (a) Ferrita-HPbetaCD (A), Ferrita-HPbetaCD-citrato (B) e Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI (C); (b) Ferrita-betaCD(D), Ferrita-betaCD-citrato(E) e Ferrita-betaCD-citrato-IRI (F).

As Figuras 24 e 25 fazem uma comparação entre as ferritas com  $\beta$ -ciclodextrina e da hidroxil-propil- $\beta$ -ciclodextrina suas respectivas misturas físicas. As misturas físicas foram baseadas nos dados de massa encontrados na análise térmica, em que a quantidade de  $\beta$ -ciclodextrina e da 2-hidroxil-

propil- $\beta$ -ciclodextrina foram 6% e 3%, respectivamente. Assim, para mistura física da ferrita-betaCD foi utilizado ferrita pura com adição de 6% de  $\beta$ -ciclodextrina e 1% de cloridrato de irinotecano. De modo similar, para mistura da ferrita-HPbetaCD foi utilizado ferrita pura, 3% de 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina e 1% do fármaco. A porcentagem de irinotecano foi determinada como descrito no item 3.3.4 e alocada na Tabela 5 no item 4.3.

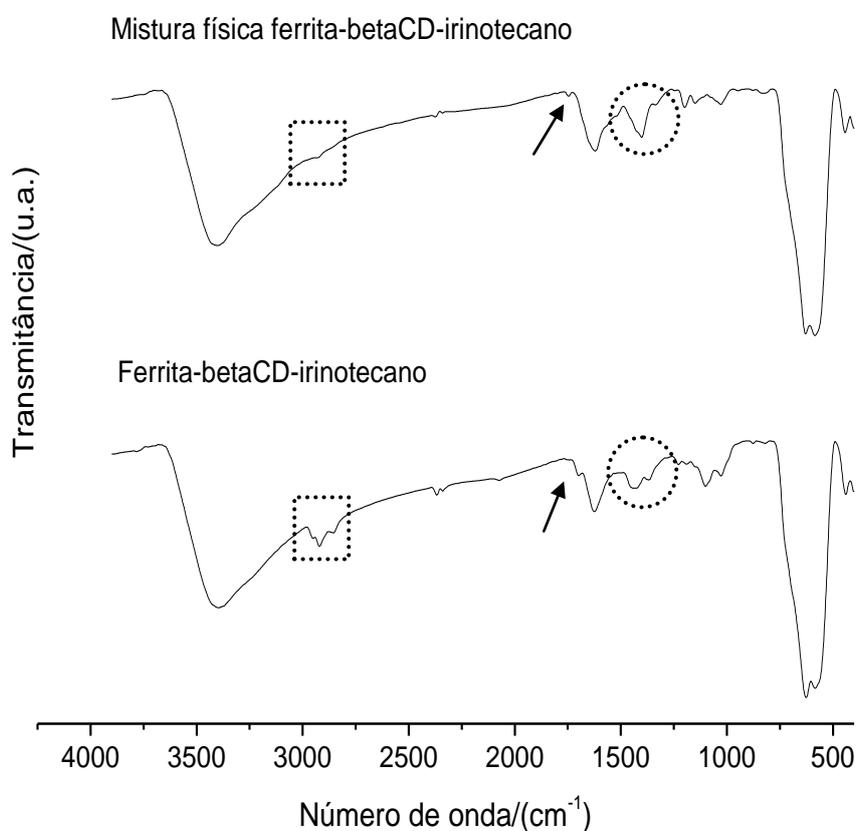


Figura 24 – Espectro de Infravermelho da ferrita-betaCD-irinotecano e sua mistura física.

Alisando a Figura 24 verificamos algumas diferenças entre as nanopartículas de ferrita-betaCD-irinotecano e sua mistura física. As mais perceptíveis são o alargamento e a diminuição da intensidade da banda entre

1300 e 1450  $\text{cm}^{-1}$  referentes à alguns modos de deformações (-C-H) da  $\beta$ -ciclodextrina (indicado pelo círculo pontilhado), o deslocamento da banda de pouca intensidade de 1750  $\text{cm}^{-1}$  para 1700 $\text{cm}^{-1}$  que pode ser atribuída ao estiramento da ligação (-C=O)  $\alpha$ -cetoester ou da carbonila no anel lactônico do irinotecano (indicado pela seta) e o aumento da intensidade das bandas em 2850  $\text{cm}^{-1}$  e em torno de 2940  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes aos estiramentos da ligação (-CH<sub>2</sub>-) do grupo metileno do fármaco (indicado pelo quadro pontilhado).

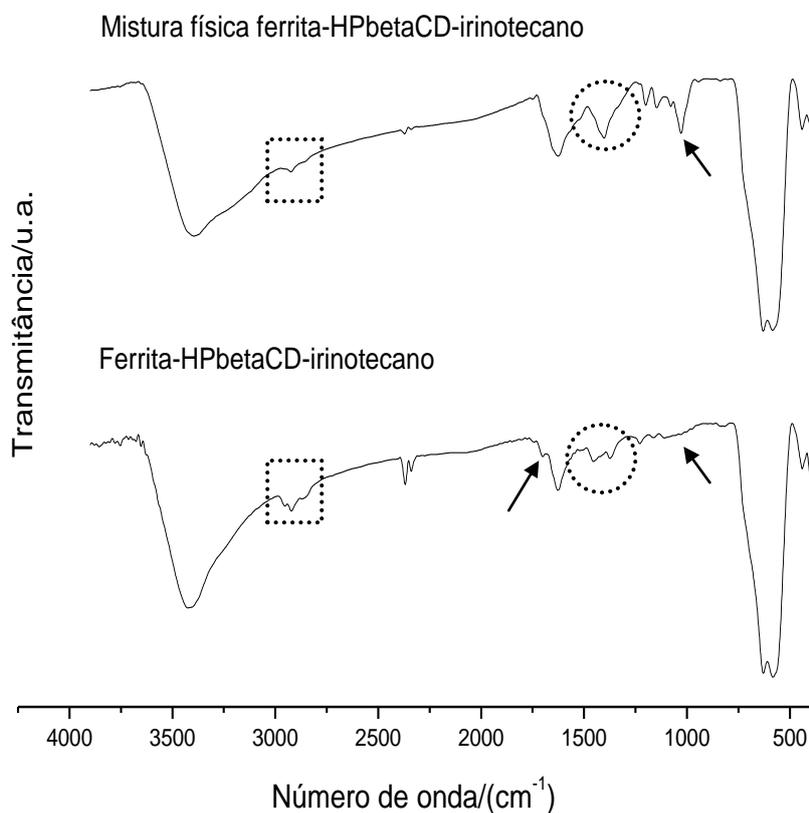


Figura 25 – Espectro de Infravermelho da ferrita-HPbetaCD-irinotecano e sua mistura física.

As mesmas observações podem ser realizadas comparando os espectros de IV da ferrita-HPbetaCD-irinotecano e sua mistura física, como

mostrada na Figura 25. Nessa figura percebemos ainda uma diminuição da intensidade das bandas entre 1000 e 1200  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes ao estiramento (-C-O-C-) da ligação  $\alpha$  (1-4) glicosídica e ao acoplamento dos estiramentos (-C-C/-C-O-) da 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina.

Essas observações sugerem a formação de compostos de inclusão entre o irinotecano e as ciclodextrinas. Essa hipótese geralmente é confirmada através de análises por Ressonância Magnética Nuclear que permite determinar os sítios de interação entre a molécula hóspede e a hospedeira e suas interações dipolares. Contudo, esse tipo de análise é inviável aos sistemas magnéticos, e a formação do composto de inclusão não pode ser comprovada nesses casos.

#### *4.2.7. Medidas de magnetização*

A Figura 26 mostra que todas as nanopartículas sintetizadas apresentam comportamento superparamagnético, caracterizado pela presença de um único caminho passando pelo ponto zero. Os valores da magnetização de saturação são bem próximos uns dos outros, sendo verificada uma magnetização um pouco superior das ferritas com  $\beta$ -ciclodextrina em relação às ferritas com hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina. Observa-se também que a incorporação do citrato diminuiu a magnetização comparando-se às suas respectivas ferritas contendo apenas ciclodextrinas.

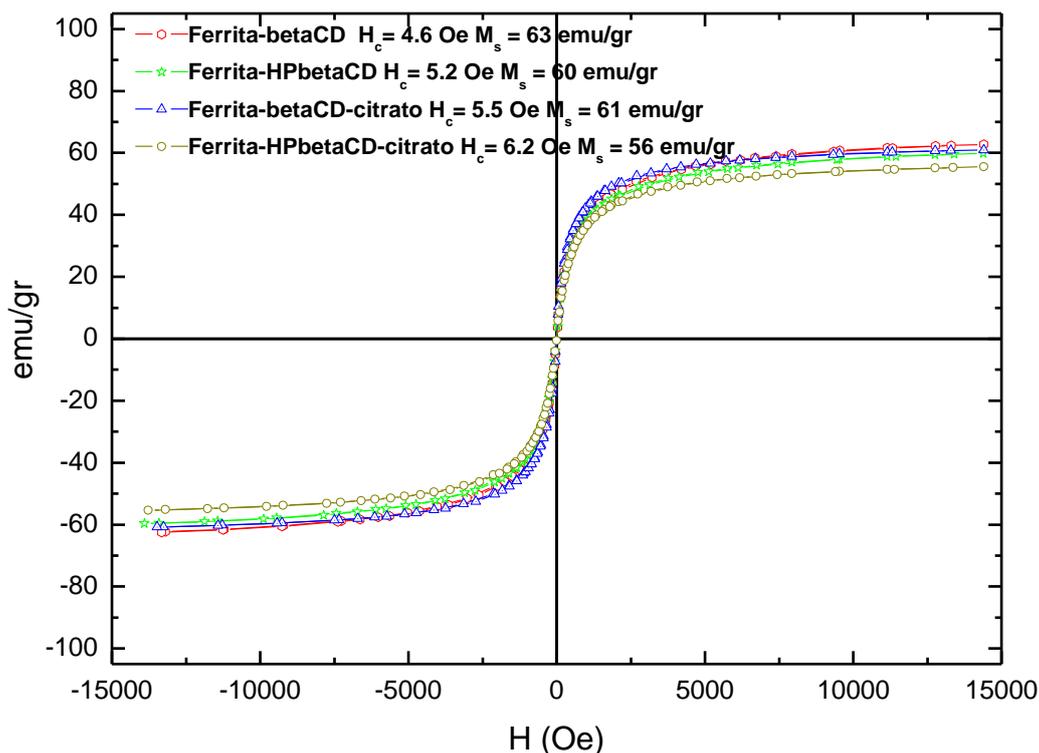


Figura 26- Curva de histerese das nanopartículas: Ferrita-betaCD, Ferrita-HPbetaCD, Ferrita-betaCD-citrato e Ferrita-HPbetaCD-citrato.

A Figura 27 mostra as curvas de histerese das nanopartículas já contendo o fármaco irinotecano. Ao analisar as Figuras 26 e 27, observamos que houve uma diminuição da magnetização de saturação de todas as amostras, principalmente da ferrita-betaCD que teve seu valor reduzido de 63 emu/gr para 14 emu/gr. Essa redução pode ter sido causada pela oxidação da ferrita, favorecida pelo processo de inclusão do fármaco que foi conduzida em meio ligeiramente ácido. Isso sugere que apesar de obter um valor mais elevado de magnetização inicialmente, a ferrita-betaCD é mais suscetível a oxidação que as demais, possivelmente por ter um tamanho menor como observado em suas micrografias. Observamos ainda que as ferritas contendo citrato tiveram uma redução menor da magnetização, indicando que o recobrimento com esse íon pode proteger da oxidação.

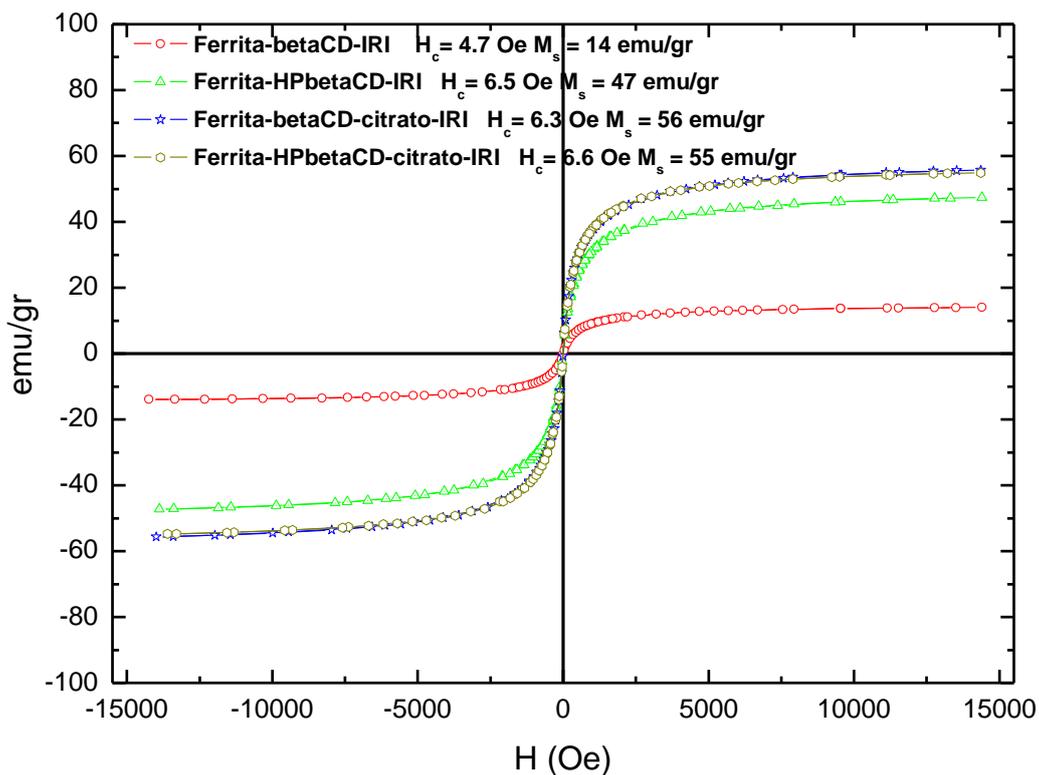


Figura 27 - Curva de histerese das nanopartículas com irinotecano: Ferrita-betaCD-IRI, Ferrita-HPbetaCD-IRI, Ferrita-betaCD-citrato-IRI e Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI.

### 4.3. Perfil de Liberação

Na Figura 28 está apresentado o perfil de liberação do fármaco irinotecano a partir das diferentes formulações de ferrita.

As curvas mostram que todas as formulações tendem ao mesmo patamar de equilíbrio em torno de 2 horas de liberação, apresentando perfis semelhantes. Vale a pena salientar que os valores de concentração estão normalizados com a concentração inicial, o que exclui a necessidade de determinação dos valores absolutos de concentração.

As curvas de liberação do irinotecano foram modeladas por meio da equação exponencial:

$$\left(\frac{[Ir]}{[Ir]_0}\right)_t = B + \left(\frac{[Ir]}{[Ir]_0}\right)_{t=0} e^{-kt} \quad (1)$$

Onde os parâmetros  $\left(\frac{[Ir]}{[Ir]_0}\right)_t$ ,  $\left(\frac{[Ir]}{[Ir]_0}\right)_{t=0}$ ,  $k$ , e  $B$  são respectivamente a concentração normalizada de irinotecano no tempo  $t$ , a concentração normalizada de irinotecano no tempo  $t=0$ , a constante de velocidade de liberação e um fator de estagnação. Neste modelo, o parâmetro  $B$  tem relação com a ativação do processo de liberação.

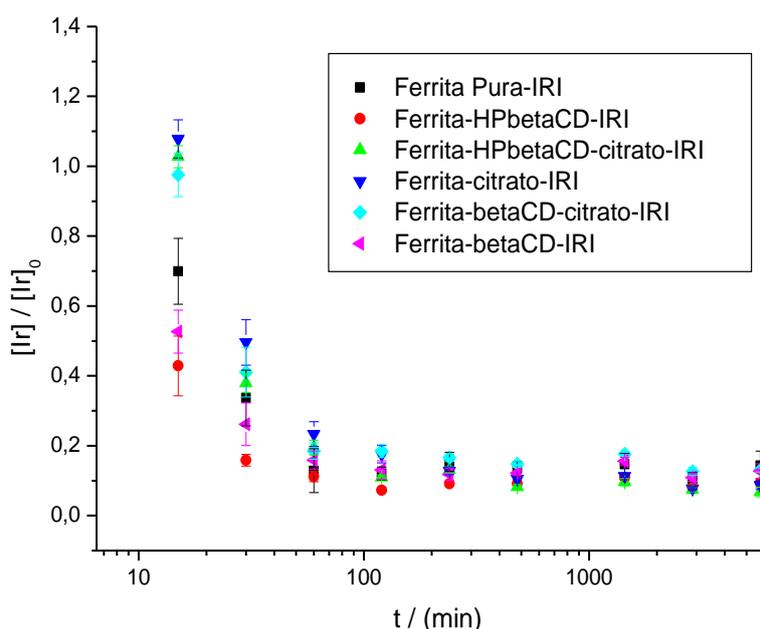


Figura 28 - Perfil de liberação do irinotecano nas formulações sintetizadas.

A Figura 29 mostra os valores de  $k$ , obtidos por meio da Equação 1, que estão também compilados na Tabela 5.

Como pode ser observado, todas as amostras apresentam tempo de equilíbrio próximo a 100 minutos. Por outro lado, as formulações contendo citrato possuem uma cinética de liberação mais lenta, caracterizado por um valor menor dessa constante. Essa liberação mais lenta sugere que a presença do citrato nas ferritas induz uma interação eletrostática entre o fármaco e a

superfície da ferrita que gera uma barreira eletrostática difusiva entre o fármaco e o ambiente, dificultando sua liberação.

Esse comportamento pode ser explicado por uma maior interação eletrostática entre as nanopartículas com citrato, que possuem um potencial Zeta mais negativo que as demais, e o fármaco catiônico irinotecano (cloridrato de irinotecano). Na Tabela 5, observamos também que a quantidade de irinotecano presente nas formulações com citrato é em torno de 20% superior que nas demais formulações, sugerindo novamente uma maior interação dessas ferritas com o fármaco.

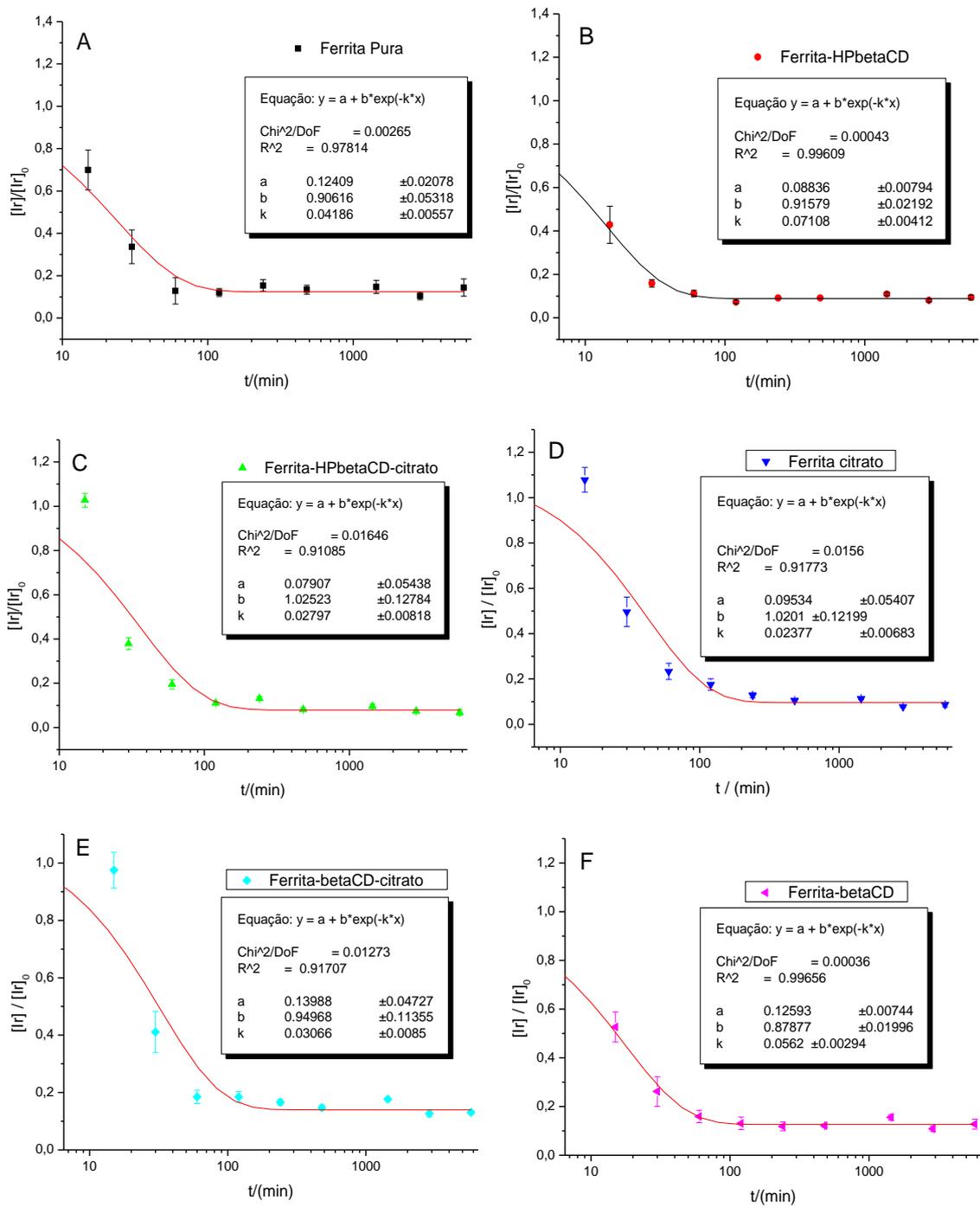


Figura 29 - Equação da curva de liberação com os valores das constantes de velocidade de liberação de cada formulação sintetizada: A) Ferrita pura, (B) Ferrita-HPbetaCD, (C) Ferrita-HPbetaCD-citrato, (D) Ferrita-citrato, (E) Ferrita-betaCD-citrato e (F) Ferrita-betaCD.

Tabela 5– Parâmetros gerais das nanopartículas sintetizadas.

Material	Massa de Irinotecano*	k	Potencial Zeta (mV)	Tamanho das partículas (nm)
Ferrita Pura	54,0 ± 3,38	0,04186	-2,82	344,6
Ferrita-betaCD	66,6 ± 5,11	0,05620	-5,31	94,96
Ferrita HPbetaCD	63,4 ± 6,47	0,07108	-13,0	176,0
Ferrita-betaCD-citrato	78,4 ± 9,14	0,03066	-33,8	43,50
Ferrita HPbetaCD-citrato	76,8 ± 7,40	0,02797	-41,2	86,99
Ferrita citrato	80,9 ± 12,1	0,02377	-30,7	48,08

\* Quantidade (µg) presente de irinotecano em 1 mg de nanopartículas.

A Figura 30 mostra as curvas de liberação acumulativa do irinotecano em função do tempo. Em todas elas observamos um “burst effect” (efeito explosão) em que na primeira hora é liberado cerca de 80% do fármaco. Após essa hora o fármaco é liberado de forma mais lenta sendo uma pequena quantidade de irinotecano detectada até 4 horas de liberação. As análises foram realizadas até 96 horas, porém a quantidade de fármaco liberada não foi significativa após 8 horas de liberação.

O tempo zero analisado corresponde à liberação imediata do fármaco, onde percebemos uma menor quantidade liberada de irinotecano nas formulações contendo citrato em relação às demais. Observamos também dentre essas formulações, as que continham ciclodextrinas (Ferrita-betaCD-citrato e Ferrita-HPbetaCD-citrato) atingiram um patamar maior de liberação, ou seja, quase chegou a 100% de liberação do fármaco, sugerindo um papel modulador das ciclodextrinas na liberação do fármaco irinotecano. Por outro

lado, a ferrita-citrato provoca uma retenção maior do fármaco que pode ser causada pela interação eletrostática discutida anteriormente.

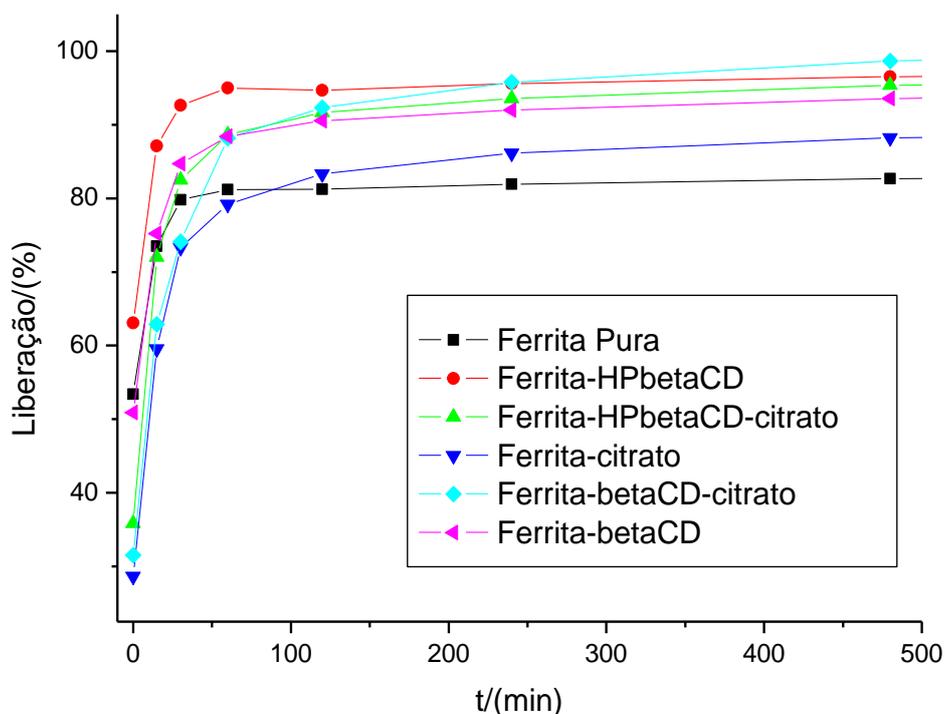


Figura 30—Porcentagem de liberação do irinotecano nas formulações.

#### 4.4. Testes de citotoxicidade

Os ensaios de MTT em células tumorais A431 foram realizados utilizando quatro concentrações diferentes de irinotecano: 240, 80, 20 e 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A quantidade de irinotecano presente nas formulações foi determinada como descrito na seção 3.3.4., e estão apresentadas na Tabela 5. Assim, as formulações foram previamente diluídas a fim de obter as concentrações de irinotecano a serem testadas.

A Figura 31 contém os resultados do ensaio de MTT. Tanto o irinotecano sozinho quanto as formulações testadas tiveram uma citotoxicidade dose dependente frente as células de A431. Verifica-se que todas as formulações foram efetivas na inibição dessas células tumorais mesmo em baixas concentrações. Porém, o fármaco sozinho obteve uma maior citotoxicidade em relação à formulação em todas as concentrações analisadas. O teste avaliando a concentração 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  obteve uma menor diferença da citotoxicidade entre as formulações e o fármaco sozinho. Já na concentração de 240 de  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  não houve diferença estatística na citotoxicidade.

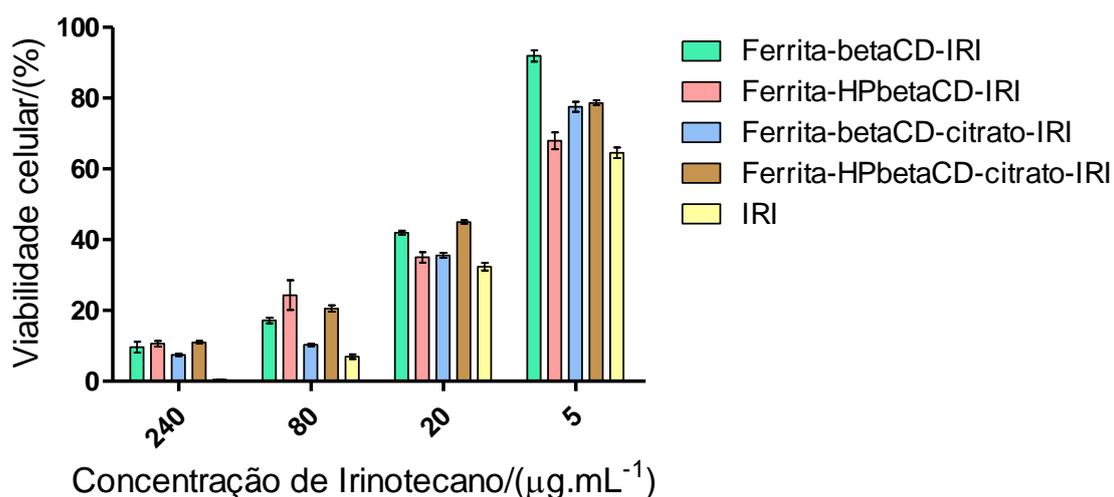


Figura 31 – Ensaio de MTT das formulações e do irinotecano em células tumorais A431 após 48 horas de contato.

A Figura 32 apresenta os valores de  $\text{IC}_{50}$  das formulações preparadas e do irinotecano puro.

Observa-se que apesar da citotoxicidade do irinotecano ser superior a das formulações nas concentrações testadas, como mostrado na Figura 31, os valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos têm uma diferença máxima de apenas  $7\mu\text{g.mL}^{-1}$  entre o irinotecano sozinho e as formulações. Essa diferença pode ser considerada

pouco relevante do ponto de vista biológico, principalmente quando considerado a atuação dessas formulações como veículo transportável magneticamente, na qual o fármaco é direcionado até um alvo específico, não sendo necessária sua circulação em todo o organismo. Além disso, como discutido na seção 1.2.2. a citotoxicidade do irinotecano nessas formulações pode ser intensificada pelo aumento de temperatura local através do tratamento por hipertermia, viabilizada por esse sistema.

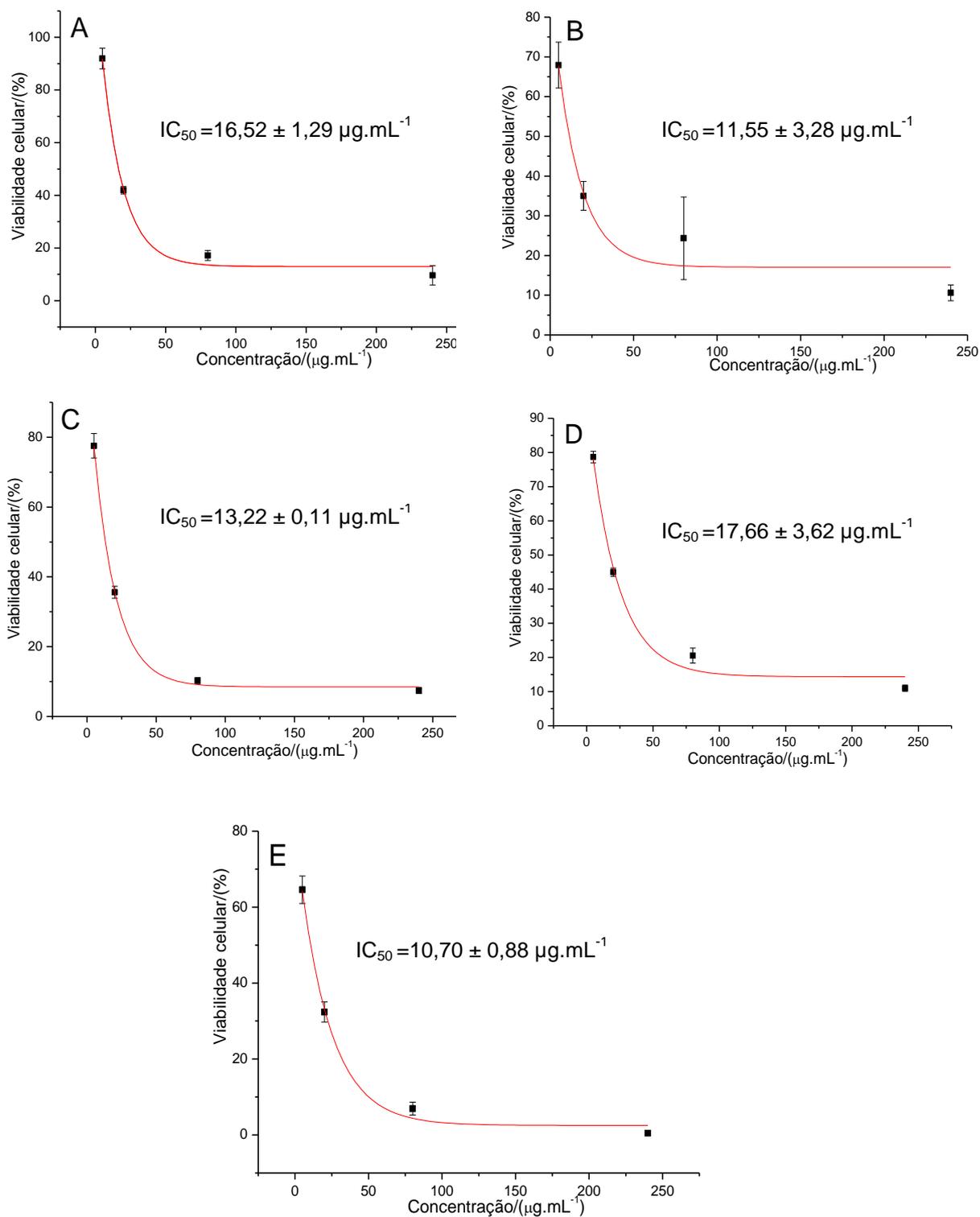


Figura 32 – Determinação do valor de  $IC_{50}$  das formulações e do fármaco irinotecano em células tumorais A431 após 48 horas de contato:(A) Ferrita-betaCD-IRI, (B) Ferrita-HPbetaCD-IRI, (C) Ferrita-betaCD-citrato-IRI, (D) Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI e (E) IRI.

Testes envolvendo cada material presente nas formulações também foram realizados para avaliação da citotoxicidade. As concentrações desses materiais foram calculadas de acordo com os resultados das curvas TG e com a massa de cada componente contida na formulação de irinotecano a ser testada.

Nas curvas TG temos que a massa de  $\beta$ -ciclodextrina e 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina nas formulações correspondentes foram de aproximadamente 6% e 3%, respectivamente. A massa de citrato foi determinada, considerando o valor de 1,3% correspondente a subtração das porcentagens de perda de massa adicional da ferrita-HPbetaCD-citrato (4,1%) e ferrita-HPbetaCD (2,8%). Porém a massa de citrato foi arredondada para 2%, já que há cerca de 30% de resíduo de citrato na curva TG de 1000°C. Para a ferrita pura considerou o valor de 96%, uma média na qual a porcentagem dos componentes incorporados foi subtraída de 100% (Exemplo: 100% - 6% de  $\beta$ -ciclodextrina = 94%).

Assim, para preparar 1mL com concentração igual a  $20 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de irinotecano da formulação de ferrita-betaCD, temos de acordo com a Tabela 5:

1mg de ferrita-betaCD ----- 66,6  $\mu\text{g}$  de irinotecano

x----- 20  $\mu\text{g}$  de irinotecano

x = 0,300 mg de ferrita-betaCD

Então, a massa de ferrita pura e  $\beta$ -ciclodextrina testada para representar essa concentração é:

96% de 0,300 mg = 0,288 mg de ferrita pura

6% de 0,300 mg = 0,018 mg de  $\beta$ -ciclodextrina

Os demais cálculos para as outras formulações foram realizados da mesma forma para cada concentração testada de irinotecano. Para facilitar a análise na Figura 33, foram mostradas no eixo X do gráfico as faixas de concentrações desses materiais avaliadas no teste. Nessas concentrações, os materiais não apresentaram citotoxicidade aparente, nem diferença estatística entre eles. Isso indica que somente o fármaco apresenta atividade citotóxica e que os demais componentes das formulações são biocompatíveis frente a essa linhagem de células A431.

Contudo, estudos mostram que a  $\beta$ -ciclodextrina administradas por via parenteral podem causar nefrotoxicidade, devido à formação de complexos de baixa solubilidade que precipitam nos rins (Bekers et al., 1991). Assim, para administrações intravenosas os dispositivos com 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina se torna mais vantajoso que os formados com  $\beta$ -ciclodextrina.

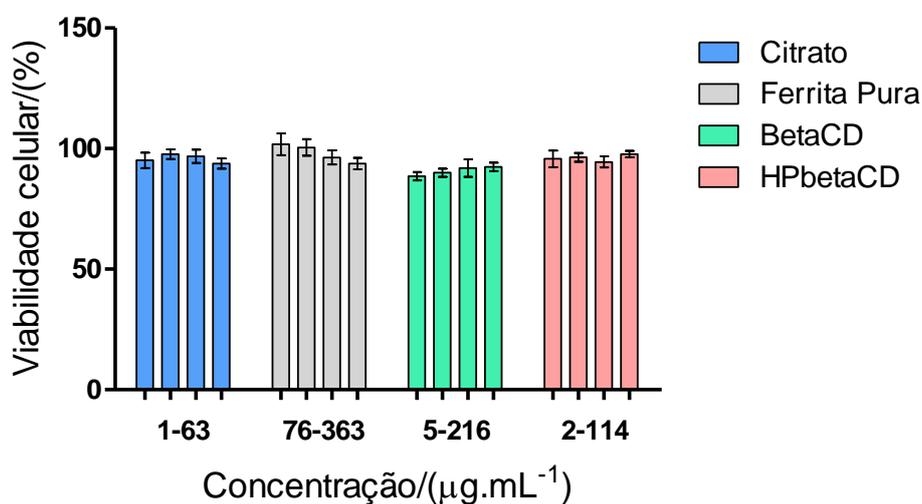


Figura 33 –Ensaio de MTT de cada componente das formulações em células tumorais A431 após 48 horas de contato.

A avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade dos materiais preparados em fibroblastos e Caco-2 não pode ser concluída, pois durante o processo de limpeza com PBS as células foram descoladas e descartadas juntamente com os materiais testados.

Na literatura existem vários trabalhos demonstrando internalizações de nanopartículas de óxido de ferro em células (Davis, 2012; Mahmoudi et al., 2011; Mi et al., 2011; Schmidtke-Schrezenmeier et al., 2011). Esse fator pode influenciar na adesão e/ou viabilidade das células e, portanto ser um dos responsáveis pelo comportamento observado nos testes de MTT das células de Caco-2 e fibroblastos.

## 5. Conclusões

---

As técnicas físico-químicas de análise indicaram que as funcionalizações da ferrita com ciclodextrinas e citrato foram efetivas para todos os sistemas preparados.

O recobrimento com o íon citrato se mostrou importante na proteção contra oxidação e na diminuição da agregação das nanopartículas, garantindo também uma maior interação com o fármaco, além de uma cinética de liberação ligeiramente mais lenta.

A funcionalização das ferritas com  $\beta$ -ciclodextrina se mostrou mais eficiente do que com a 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina.

As nanopartículas funcionalizadas têm morfologia aproximadamente esférica com diâmetros entre 8-10nm, e tamanhos mais uniformes que a ferrita pura.

As ciclodextrinas bem como o citrato apresentaram um caráter modulador do tamanho das nanopartículas magnéticas.

Os espectros de Mössbauer e as curvas de histerese apontaram que as nanopartículas possuem um comportamento superparamagnético à temperatura ambiente. Os valores de magnetização de saturação satisfazem a aplicabilidade do sistema como carreadores magnéticos, apesar dos resultados sugerirem uma oxidação do material à maghemita.

O estudo de citotoxicidade demonstrou que os dispositivos carreadores de irinotecano foram eficazes na inibição de células tumorais A431 sendo dose-

dependente nas concentrações de 5 – 240  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com valores de  $\text{IC}_{50}$  próximos ao do fármaco puro.

#### Perspectivas Futuras:

Outras análises, como Microscopia de Força Atômica e Microscopia Confocal deverão ser realizadas futuramente a fim de avaliar a interação e possível internalização das nanopartículas com as células A431, Caco-2 e fibroblastos.

Testes biológicos como, hemocompatibilidade, interação com BSA (Albumina), Ressonância Magnética de Imagem (*in vivo*), e outros testes *in vivo* serão realizados em trabalhos posteriores.

## 6. Referências

---

- Arbab, A. S., W. Liu, and J. A. Frank, 2006, Cellular magnetic resonance imaging: current status and future prospects: *Expert Review of Medical Devices*, v. 3, p. 427-439.
- Babu, P. C., N. Sundaraganesan, S. Sudha, V. Aroulmoji, and E. Murano, 2012, Molecular structure and vibrational spectra of Irinotecan: A density functional theoretical study: *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 98, p. 1-6.
- Banerjee, S. S., and D.-H. Chen, 2009, Cyclodextrin-conjugated nanocarrier for magnetically guided delivery of hydrophobic drugs: *Journal of Nanoparticle Research*, v. 11, p. 2071-2078.
- Bekers, O., E. V. Uijtendaal, J. H. Beijnen, A. Bult, and W. J. M. Underberg, 1991, Cyclodextrins in the pharmaceutical field: *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 17, p. 1503-49.
- Cao, H., J. He, L. Deng, and X. Gao, 2009, Fabrication of cyclodextrin-functionalized superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/amino-silane core-shell nanoparticles via layer-by-layer method: *Applied Surface Science*, v. 255, p. 7974-7980.
- Chaubey, G. S., C. Barcena, N. Poudyal, C. Rong, J. Gao, S. Sun, and J. P. Liu, 2007, Synthesis and stabilization of FeCo nanoparticles: *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, p. 7214-+.
- Cirpanli, Y., E. Bilensoy, A. L. Dogan, and S. Calis, 2009, Comparative evaluation of polymeric and amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for effective camptothecin delivery: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 73, p. 82-89.

- Colombo, M., S. Carregal-Romero, M. F. Casula, L. Gutierrez, M. P. Morales, I. B. Boehm, J. T. Heverhagen, D. Prosperi, and W. J. Parak, 2012, Biological applications of magnetic nanoparticles: Chemical Society Reviews, v. 41, p. 4306-4334.
- Cornell, R. M., and U. Schwertmann, 2003, The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses: The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses: Weinheim, WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA.
- Davis, M. E., 2012, Fighting cancer with nanoparticle medicines-The nanoscale matters: Mrs Bulletin, v. 37, p. 828-835.
- Davis, M. E., and M. E. Brewster, 2004, Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future: Nature Reviews Drug Discovery, v. 3, p. 1023-1035.
- De Jong, W. H., and P. J. A. Borm, 2008, Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards: International Journal of Nanomedicine, v. 3, p. 133-149.
- Fassberg, J., and V. J. Stella, 1992, A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogs: Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 81, p. 676-684.
- FDA- Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso: Dezembro 2013.
- Gao, J., H. Gu, and B. Xu, 2009, Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications: Accounts of Chemical Research, v. 42, p. 1097-1107.
- Giordano, F., C. Novak, and J. R. Moyano, 2001, Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds: Thermochimica Acta, v. 380, p. 123-151.

- Haran, D. H., M. A. Kumar, S. Dinesh, M. Mohan, A. N. Sujith, G. Raghunath, C. V. S. Rao, and S. Dey, 2011, Preparation of amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles by solvent evaporation method influence of the surfactant on preparation and hydrophobic drug loading: *Drug Invention Today*, v. 3, p. 216-218.
- Herben, V. M. M., W. W. T. Huinink, J. H. M. Schellens, and J. H. Beijnen, 1998, Clinical pharmacokinetics of camptothecin topoisomerase I inhibitors: *Pharmacy World & Science*, v. 20, p. 161-172.
- Jiang, Y., X. Sha, W. Zhang, and X. Fang, 2010, Complex of 9-nitro-camptothecin in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: In vitro and in vivo evaluation: *International Journal of Pharmaceutics*, v. 397, p. 116-121.
- Kievit, F. M., and M. Zhang, 2011, Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy: *Accounts of Chemical Research*, v. 44, p. 853-862.
- Kokawa, K., N. Umesaki, K. Yamamoto, K. Takizawa, I. Konishi, K. Hasegawa, and G. Japan Gynecologic Oncology, 2008, Phase I Study of Irinotecan Combined with Mitomycin-C and 5-Fluorouracil for Gynecological Malignancies: The JGOG Study: *Anticancer Research*, v. 28, p. 2933-2939.
- Langner, M., and M. Ugorski, 2000, The macromolecular aggregate as a drug carrier: *Cellular & Molecular Biology Letters*, v. 5, p. 433-440.
- Le Page, S., F. Kwiatkowski, C. Paulin, F. F. Mohamed, D. Pezet, J. Chipponi, M. Benhamed, F. N. Gilly, and O. Glehen, 2006, In vitro thermochemotherapy of colon cancer cell lines with irinotecan alone and combined with mitomycin C: *Hepato-Gastroenterology*, v. 53, p. 693-697.
- Lee, J., T. Isobe, and M. Senna, 1996, Preparation of ultrafine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles by precipitation in the presence of PVA at high pH: *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 177, p. 490-494.

- Li, Q., and R. J. Kirkpatrick, 2007, Organic anions in layered double hydroxides: an experimental investigation of citrate hydrotalcite: *American Mineralogist*, v. 92, p. 397-402.
- Li, R., S. Liu, J. Zhao, H. Otsuka, and A. Takahara, 2011, Preparation of superparamagnetic  $\beta$ -cyclodextrin-functionalized composite nanoparticles with core-shell structures: *Polymer Bulletin (Heidelberg, Ger.)*, v. 66, p. 1125-1136.
- Liu, G., P. Men, P. L. R. Harris, R. K. Rolston, G. Perry, and M. A. Smith, 2006, Nanoparticle iron chelators: A new therapeutic approach in Alzheimer disease and other neurologic disorders associated with trace metal imbalance: *Neuroscience Letters*, v. 406, p. 189-193.
- Lobenberg, R., 2003, Smart materials: Applications of nanotechnology in drug delivery and drug targeting: *International Conference on Mems, Nano and Smart Systems, Proceedings*, 82-83 p.
- Loftsson, T., and D. Duchene, 2007, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications: *International Journal of Pharmaceutics*, v. 329, p. 1-11.
- Lu, A.-H., E. L. Salabas, and F. Schueth, 2007, Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application: *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 46, p. 1222-1244.
- Luo, Z., K. Cai, Y. Hu, J. Li, X. Ding, B. Zhang, D. Xu, W. Yang, and P. Liu, 2012, Redox-Responsive Molecular Nanoreservoirs for Controlled Intracellular Anticancer Drug Delivery Based on Magnetic Nanoparticles: *Advanced Materials*, v. 24, p. 431.
- Ma, H.-L., X.-R. Qi, W.-X. Ding, Y. Maitani, and T. Nagai, 2008, Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 84, p. 598-606.

- Mahmoudi, M., K. Azadmanesh, M. A. Shokrgozar, W. S. Journeay, and S. Laurent, 2011, Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle: Chemical Reviews, v. 111, p. 3407-3432.
- Melancon, M. P., M. Zhou, and C. Li, 2011, Cancer Theranostics with Near-Infrared Light-Activatable Multimodal Nanoparticles: Accounts of Chemical Research, v. 44, p. 947-956.
- Mi, Y., K. Li, Y. Liu, K.-Y. Pu, B. Liu, and S.-S. Feng, 2011, Herceptin functionalized polyhedral oligomeric silsesquioxane - conjugated oligomers - silica/iron oxide nanoparticles for tumor cell sorting and detection: Biomaterials, v. 32, p. 8226-8233.
- Minelli, R., R. Cavalli, L. Ellis, P. Pettazzoni, F. Trotta, E. Ciamporcerro, G. Barrera, R. Fantozzi, C. Dianzani, and R. Pili, 2012, Nanosponge-encapsulated camptothecin exerts anti-tumor activity in human prostate cancer cells: European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 47, p. 686-694.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays: Journal of Immunological Methods, v. 65, p. 55-63.
- Naahidi, S., M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, and P. Chen, 2013, Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery: Journal of Controlled Release, v. 166, p. 182-194.
- Namiki, Y., T. Fuchigami, N. Tada, R. Kawamura, S. Matsunuma, Y. Kitamoto, and M. Nakagawa, 2011, Nanomedicine for Cancer: Lipid-Based Nanostructures for Drug Delivery and Monitoring: Accounts of Chemical Research, v. 44, p. 1080-1093.
- Park, S., H. S. Kim, W. J. Kim, and H. S. Yoo, 2012, Pluronic@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with robust incorporation of doxorubicin by thermo-responsiveness: International Journal of Pharmaceutics, v. 424, p. 107-114.

Pfizer - Disponível em : <[www.pfizer.com.br](http://www.pfizer.com.br)>. Acesso: Novembro de 2013.

Racuciu, M., D. E. Creanga, and A. Airinei, 2006, Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications: *European Physical Journal E*, v. 21, p. 117-121.

Rajendran, M., and M. Subba Rao, 1994, Formation of BaTiO<sub>3</sub> from citrate precursor: *Journal of Solid State Chemistry*, v. 113, p. 239-47.

Rosen, L. S., 1998, Irinotecan in lymphoma, leukemia, and breast, pancreatic, ovarian, and small-cell lung cancers: *Oncology-New York*, v. 12, p. 103-109.

Saetern, A. M., N. B. Nguyen, A. Bauer-Brandl, and M. Brandl, 2004, Effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin-complexation and pH on solubility of camptothecin: *International Journal of Pharmaceutics*, v. 284, p. 61-68.

Sawada, S., S. Okajima, R. Aiyama, K. Nokata, T. Furuta, T. Yokokura, E. Sugino, K. Yamaguchi, and T. Miyasaka, 1991, Synthesis and antitumor-activity of 20(s)-camptothecin derivatives - carbamate-linked, water-soluble derivatives of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 39, p. 1446-1454.

Schmidtke-Schrezenmeier, G., M. Urban, A. Musyanovych, V. Mailaender, M. Rojewski, N. Fekete, C. Menard, E. Deak, K. Tarte, V. Rasche, K. Landfester, and H. Schrezenmeier, 2011, Labeling of mesenchymal stromal cells with iron oxide-poly(L-lactide) nanoparticles for magnetic resonance imaging: uptake, persistence, effects on cellular function and magnetic resonance imaging properties: *Cytotherapy*, v. 13, p. 962-975.

Sugiyama, T., M. Yakushiji, K. Noda, M. Ikeda, R. Kudoh, A. Yajima, Y. Tomoda, Y. Terashima, S. Takeuchi, M. Hiura, F. Saji, T. Takahashi, N. Umesaki, S. Sato, M. Hatae, Y. Ohashi, and C. P. T. S. G. Japan, 2000, Phase II study of irinotecan and cisplatin as first-line chemotherapy in advanced or recurrent cervical cancer: *Oncology*, v. 58, p. 31-37.

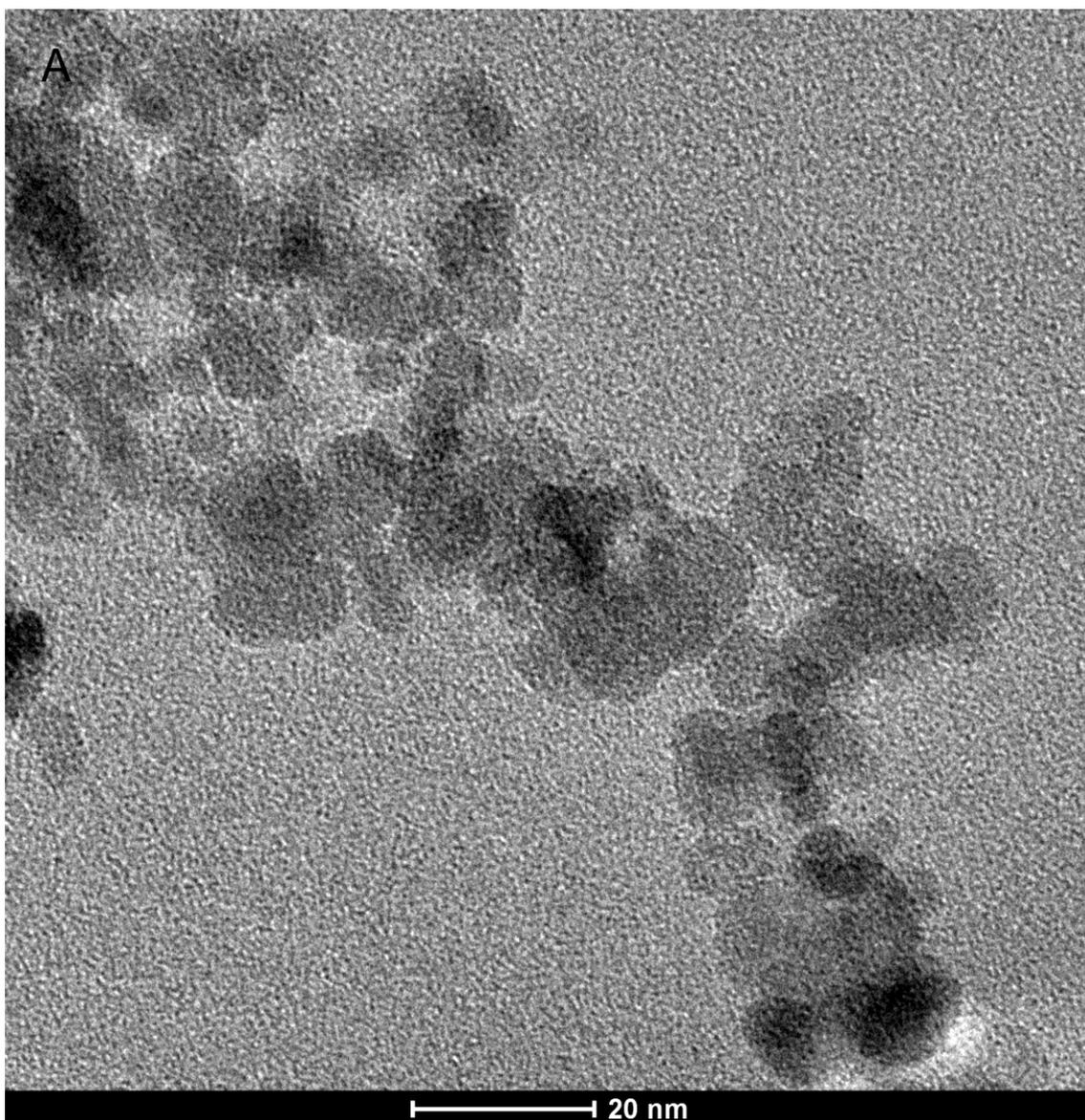
- Szejtli, J., 1998, Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry: *Chemical Reviews*, v. 98, p. 1743-1753.
- Takagi, T., and T. Saotome, 2001, Chemotherapy with irinotecan (CPT-11), a topoisomerase-I inhibitor, for refractory and relapsed non-Hodgkin's lymphoma: *Leukemia & Lymphoma*, v. 42, p. 577-586.
- Takiguchi, Y., T. Moriya, Y. Asaka-Amano, T. Kawashima, K. Kurosu, Y. Tada, K. Nagao, and T. Kuriyama, 2007, Phase II study of weekly irinotecan and cisplatin for refractory or recurrent non-small cell lung cancer: *Lung Cancer*, v. 58, p. 253-259.
- Thickett, D., and M. Odlyha, 2005, Application of thermomagnetometry to corrosion studies of archaeological iron: *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 80, p. 565-571.
- Uekama, K., F. Hirayama, and T. Irie, 1998, Cyclodextrin drug carrier systems: *Chemical Reviews*, v. 98, p. 2045-2076.
- Wall, M. E., M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, and G. A. Sim, 1966, Plant antitumor agents .I. Isolation and structure of camptothecin a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata*: *Journal of the American Chemical Society*, v. 88, p. 3888-3890.
- Wang, Y., J. F. Wong, X. Teng, X. Z. Lin, and H. Yang, 2003, "Pulling" Nanoparticles into Water: Phase Transfer of Oleic Acid Stabilized Monodisperse Nanoparticles into Aqueous Solutions of  $\alpha$ -Cyclodextrin: *Nano Letters*, v. 3, p. 1555-1559.
- Wani, M. C., A. W. Nicholas, and M. E. Wall, 1987, Plant antitumor agents .28. Resolution of a key tricyclic synthon, 5'(rs)-1,5-dioxo-5'-ethyl-5'-hydroxy-2'h,5'h,6'h-6'-oxopyrano 3',4'-f DE LTA-6,8-tetrahydroindolizine - total synthesis and antitumor-activity of 20(s)-camptothecin and 20(r)-camptothecin: *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 30, p. 2317-2319.

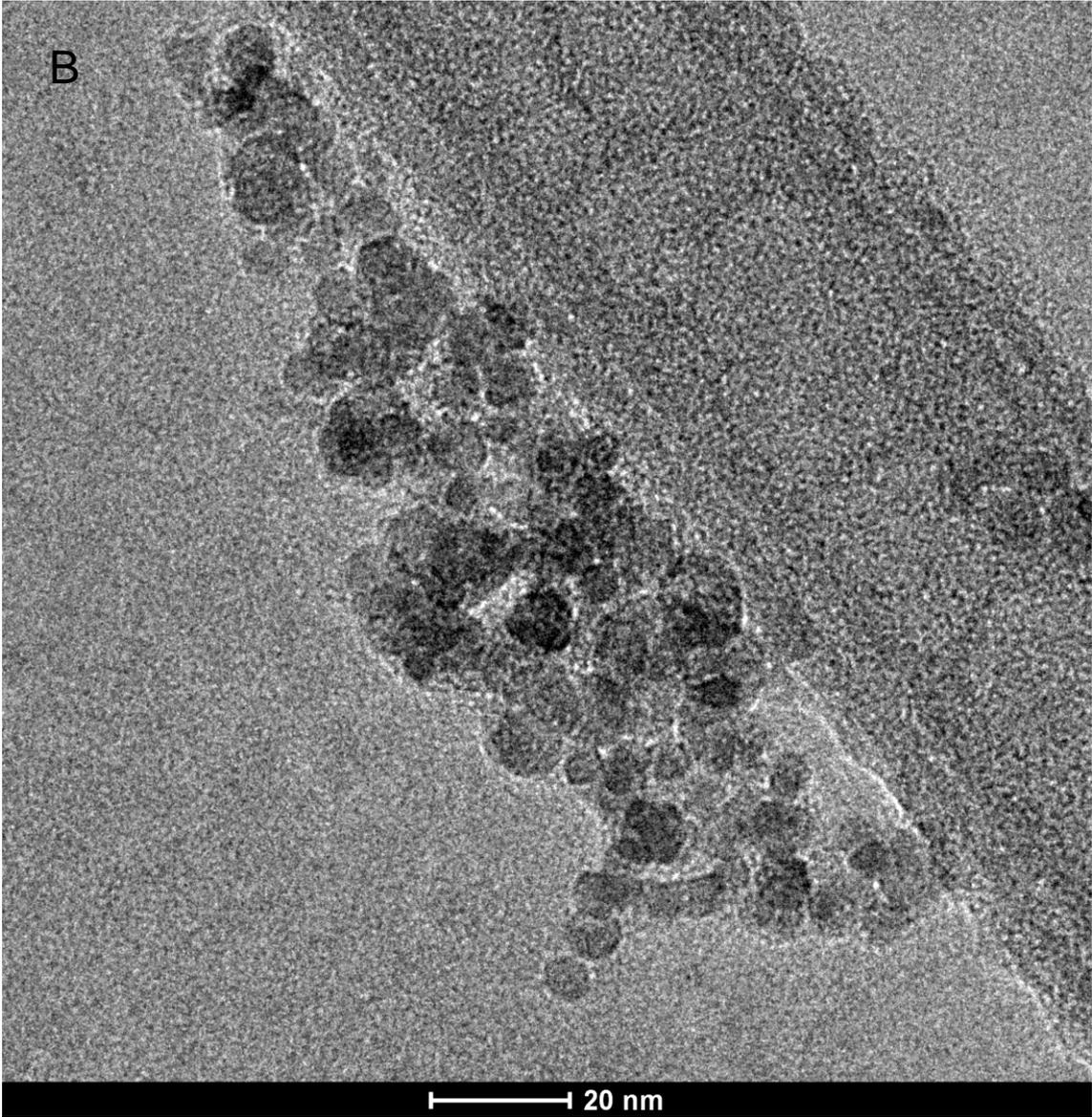
- Wei, Y., B. Han, X. Hu, Y. Lin, X. Wang, and X. Deng, 2012, Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles and their Magnetic Properties: *Procedia Engineering*, v. 27, p. 632-637.
- WHO - World Health Organization. Disponível em: <[www.who.int](http://www.who.int)>. Acesso: Novembro de 2013.
- Wu, W., Q. He, and C. Jiang, 2008, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies: *Nanoscale Research Letters*, v. 3, p. 397-415.
- Xia, H.-b., P. Foo, and J. Yi, 2009, Water-Dispersible Spherically Hollow Clusters of Magnetic Nanoparticles: *Chemistry of Materials*, v. 21, p. 2442-2451.
- Xia, H.-B., J. Yi, P.-S. Foo, and B. Liu, 2007, Facile fabrication of water-soluble magnetic nanoparticles and their spherical aggregates: *Chemistry of Materials*, v. 19, p. 4087-4091.
- Xie, J., G. Liu, H. S. Eden, H. Ai, and X. Chen, 2011, Surface-Engineered Magnetic Nanoparticle Platforms for Cancer Imaging and Therapy: *Accounts of Chemical Research*, v. 44, p. 883-892.
- Yallapu, M. M., S. F. Othman, E. T. Curtis, B. K. Gupta, M. Jaggi, and S. C. Chauhan, 2011, Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy: *Biomaterials*, v. 32, p. 1890-1905.
- Yoo, D., J.-H. Lee, T.-H. Shin, and J. Cheon, 2011, Theranostic Magnetic Nanoparticles: *Accounts of Chemical Research*, v. 44, p. 863-874.
- Zhou, L., B. He, and F. Zhang, 2012, Facile One-Pot Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Cross-linked Magnetic Poly(vinyl alcohol) Gel Beads for Drug Delivery: *Acs Applied Materials & Interfaces*, v. 4, p. 192-199.

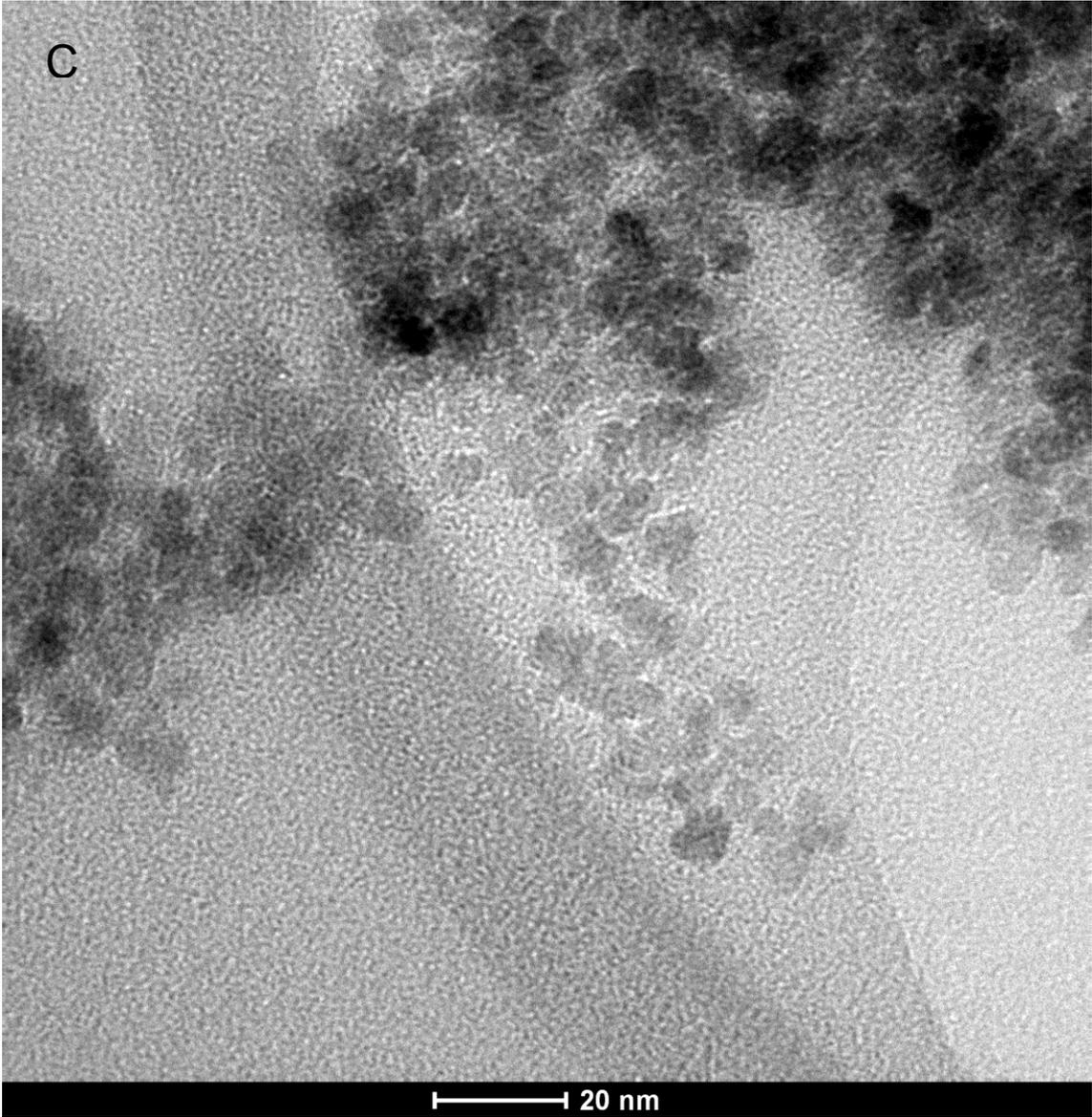
# Anexos

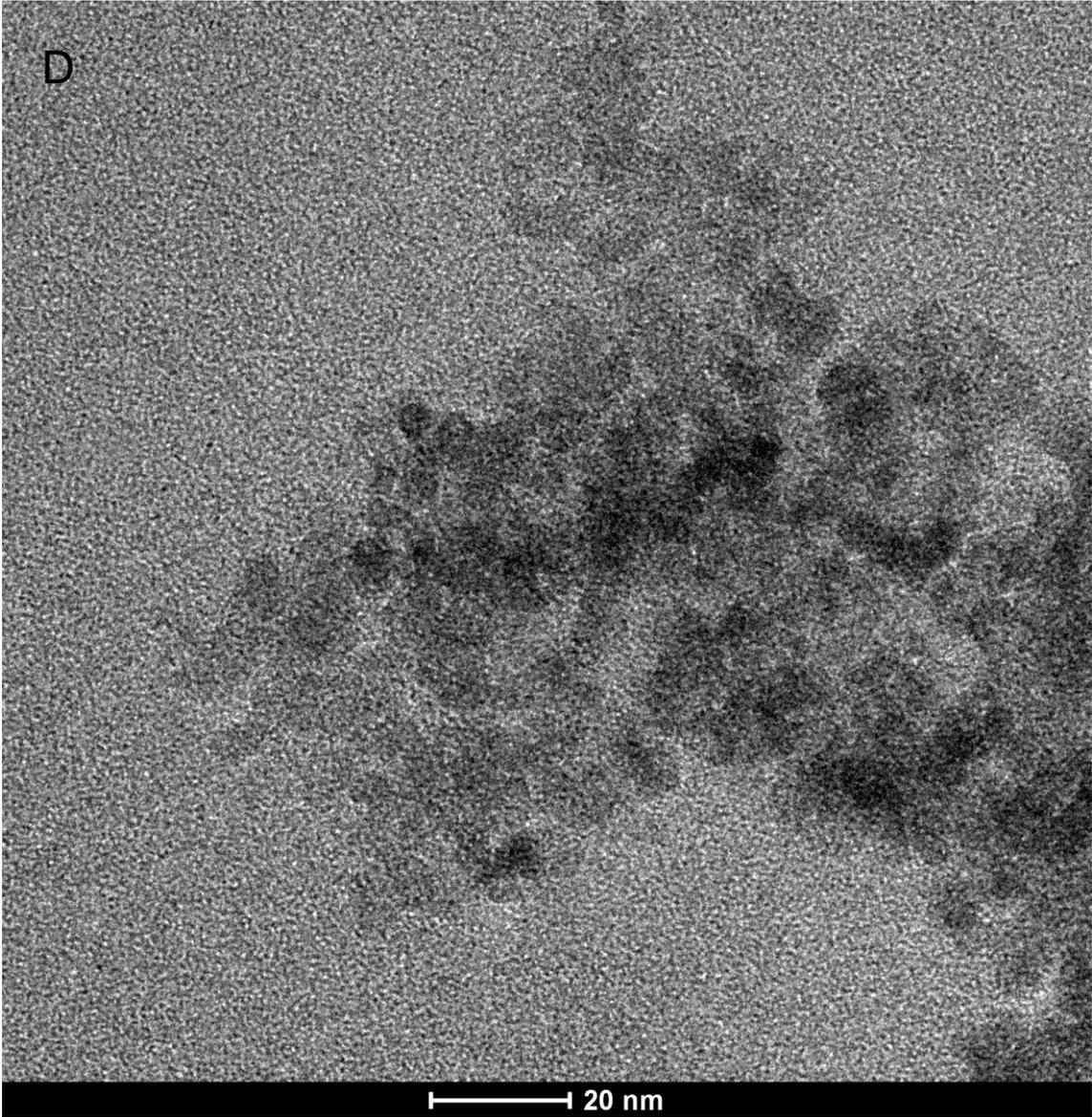
---

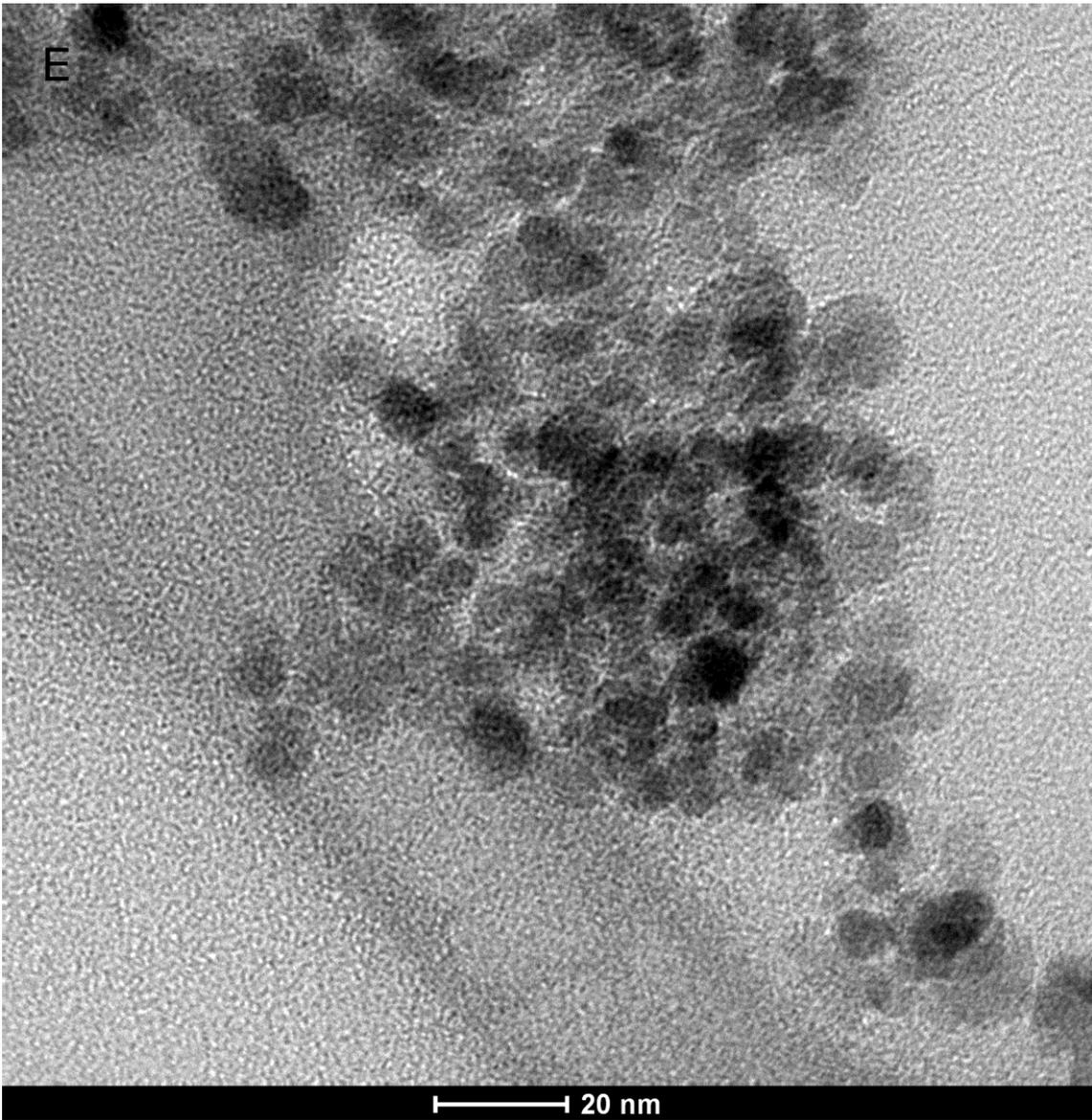
**A**– Micrografias (TEM) das nanopartículas (aumento de 145000): (A) Ferrita pura; (B) Ferrita citrato; (C) Ferrita-betaCD; (D) Ferrita-betaCD-citrato; (E) Ferrita-HPbetaCD e (F) Ferrita-HPbetaCD-citrato.

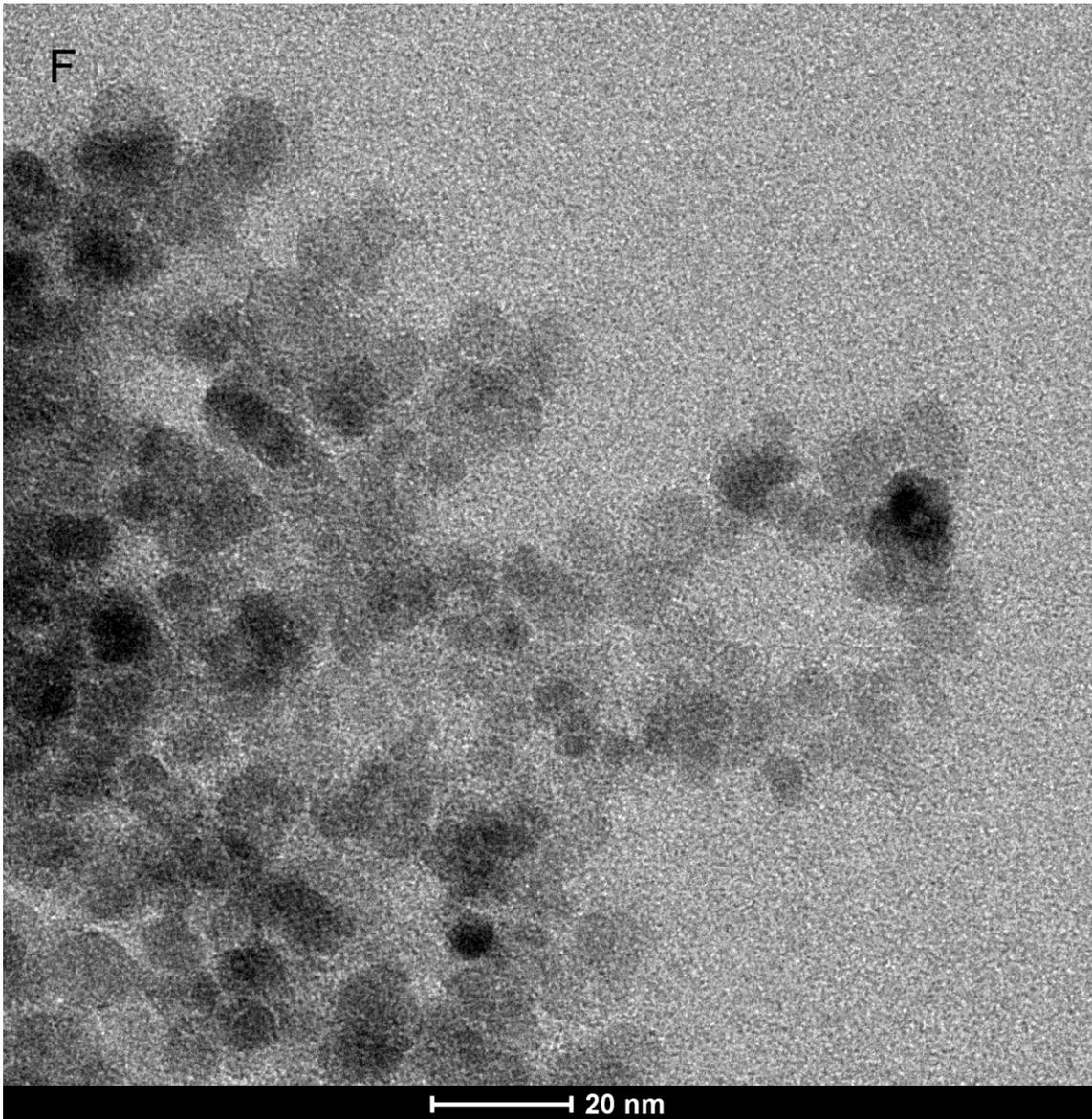




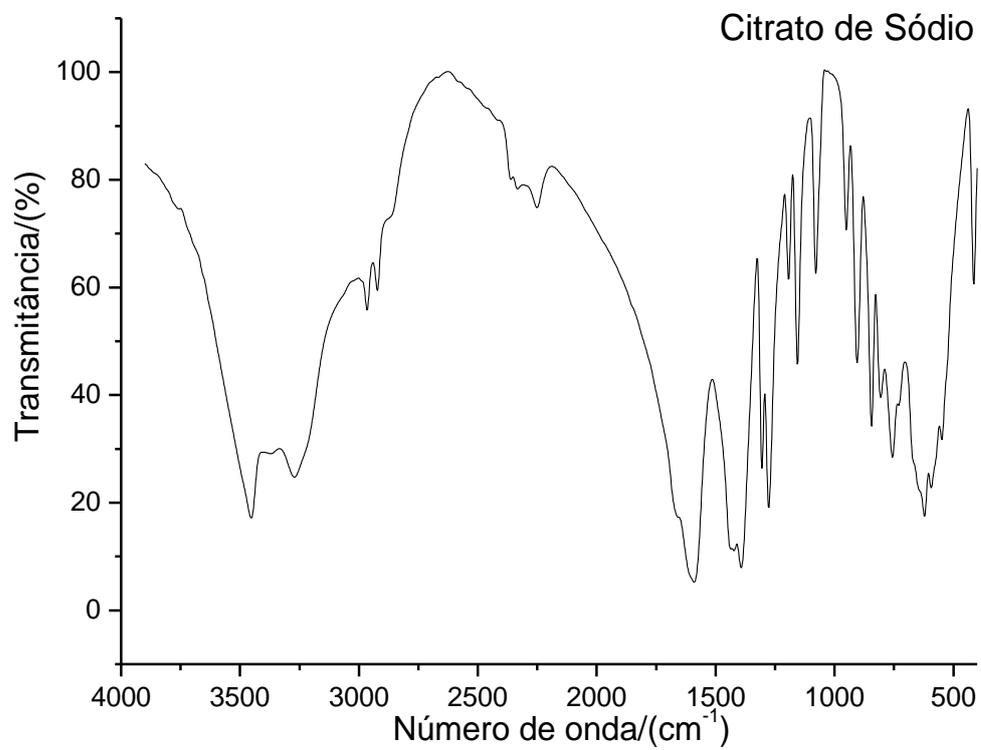
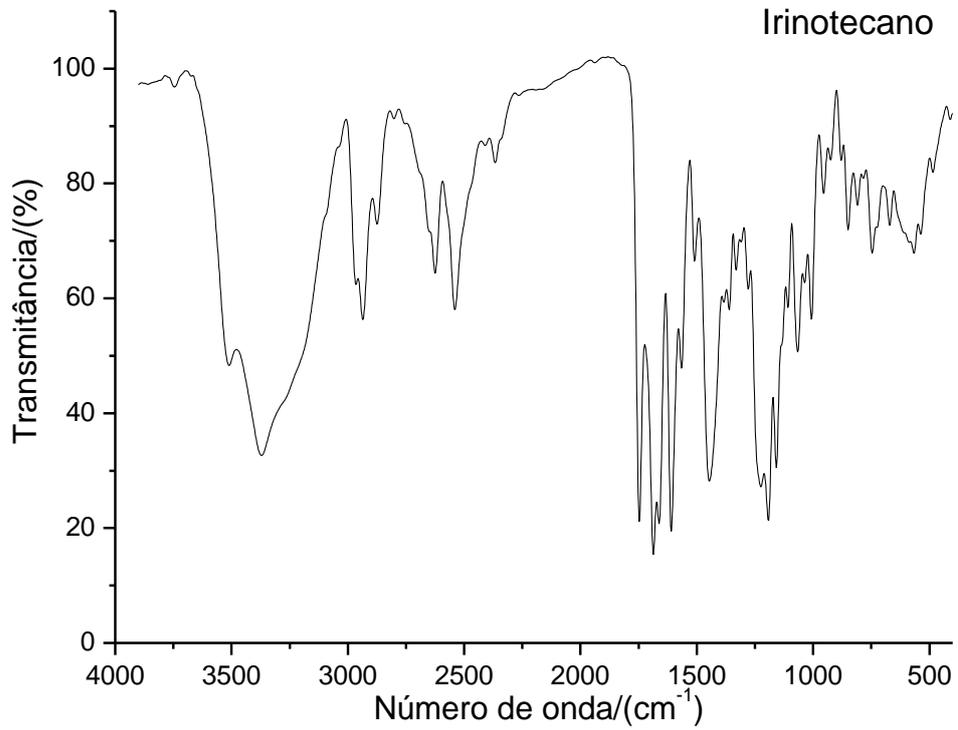




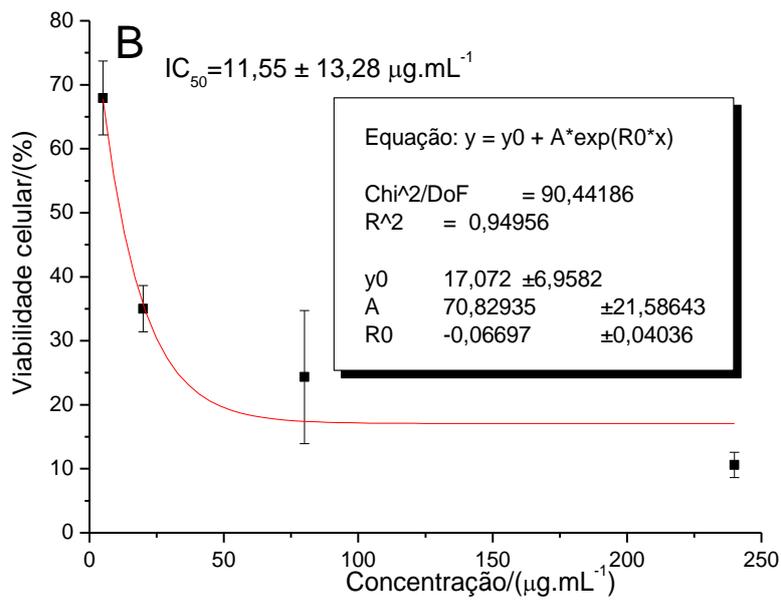
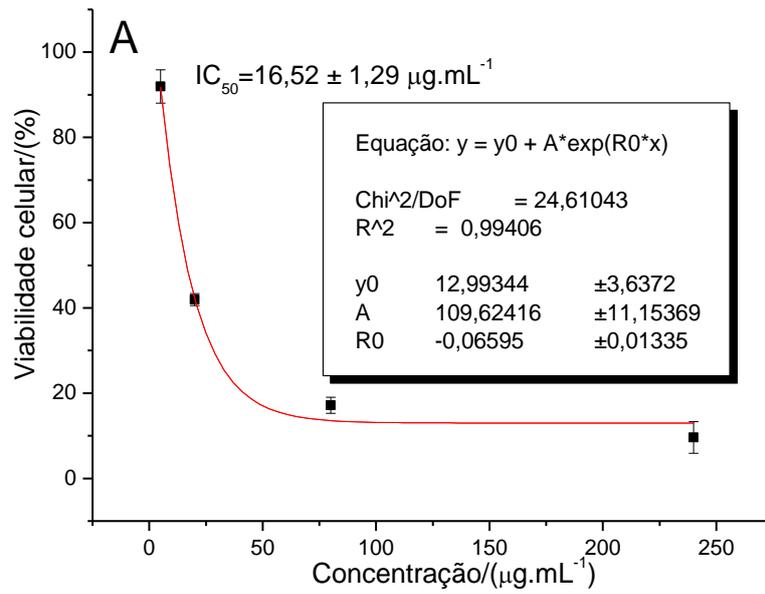


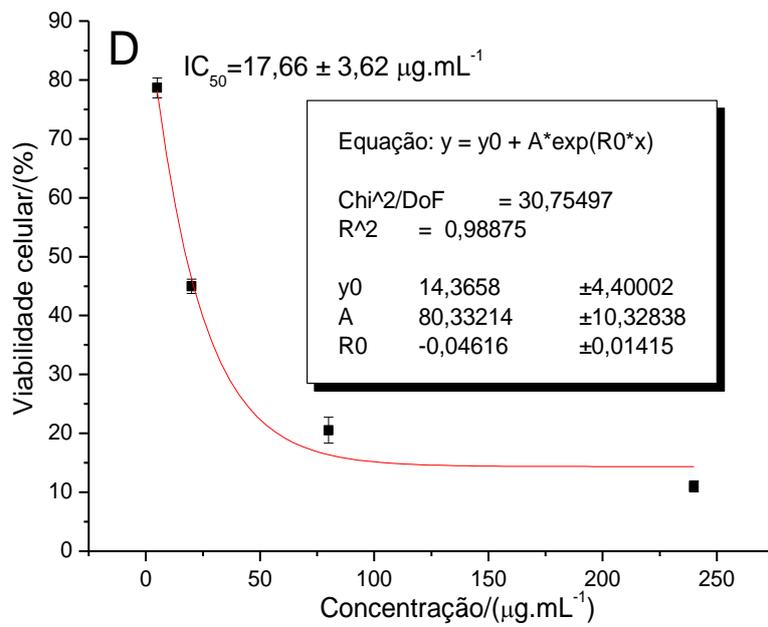
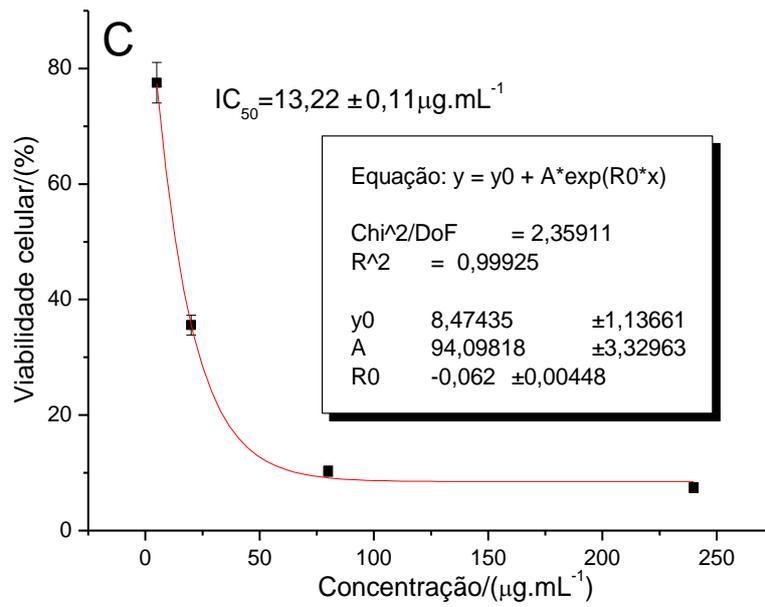


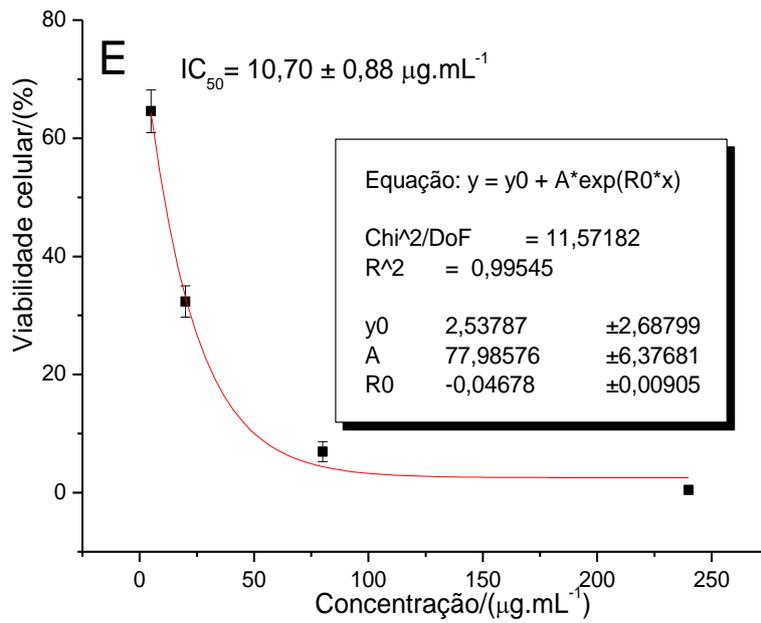
**B – Espectros de Absorção na Região do Infravermelho das substâncias puras**



**C – Determinações do IC<sub>50</sub> das formulações e do fármaco puro.**







Determinação do valor de  $IC_{50}$  das formulações e do fármaco irinotecano em células tumorais A43 após 48 horas de contato:(A) Ferrita-betaCD-IRI, (B) Ferrita-HPbetaCD-IRI, (C) Ferrita-betaCD-citrato-IRI, (D) Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI e (E) IRI.

## D – Análises estatísticas referentes aos testes de MTT

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-IRI 80	-7.554	3.755	No	ns	-15.16 to 0.05745
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-IRI 20	-32.34	16.08	Yes	***	-39.96 to -24.73
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-IRI 5	-82.31	40.92	Yes	***	-89.92 to -74.70
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 240	-0.9684	0.4815	No	ns	-8.579 to 6.643
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 80	-14.71	7.315	Yes	***	-22.32 to -7.102
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 20	-25.39	12.62	Yes	***	-33.00 to -17.78
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 5	-58.31	28.99	Yes	***	-65.92 to -50.70
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240	2.178	1.083	No	ns	-5.433 to 9.789
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80	-0.6430	0.3197	No	ns	-8.254 to 6.968
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	-25.95	12.90	Yes	***	-33.56 to -18.34
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-67.92	33.77	Yes	***	-75.53 to -60.31
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	-1.366	0.6790	No	ns	-8.977 to 6.245
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80	-10.91	5.425	Yes	***	-18.52 to -3.300
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20	-35.35	17.58	Yes	***	-42.96 to -27.74
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-69.04	34.33	Yes	***	-76.65 to -61.43
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs IRI 240	9.168	4.558	Yes	**	1.558 to 16.78
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs IRI 80	2.678	1.332	No	ns	-4.933 to 10.29
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs IRI 20	-22.75	11.31	Yes	***	-30.36 to -15.14
Ferrita-betaCD-IRI 240 vs IRI 5	-54.95	27.32	Yes	***	-62.56 to -47.34
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-IRI 20	-24.79	12.33	Yes	***	-32.40 to -17.18
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-IRI 5	-74.76	37.17	Yes	***	-82.37 to -67.15
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 240	6.585	3.274	No	ns	-1.026 to 14.20
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 80	-7.159	3.560	No	ns	-14.77 to 0.4515
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 20	-17.84	8.868	Yes	***	-25.45 to -10.22
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 5	-50.76	25.24	Yes	***	-58.37 to -43.15

Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240	9.731	4.838	Yes	***	2.120 to 17.34
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80	6.910	3.436	No	ns	-0.7005 to 14.52
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	-18.40	9.147	Yes	***	-26.01 to -10.79
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-60.36	30.01	Yes	***	-67.97 to -52.75
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	6.188	3.077	No	ns	-1.423 to 13.80
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80	-3.358	1.669	No	ns	-10.97 to 4.253
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20	-27.80	13.82	Yes	***	-35.41 to -20.19
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-61.49	30.57	Yes	***	-69.10 to -53.88
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs IRI 240	16.72	8.314	Yes	***	9.111 to 24.33
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs IRI 80	10.23	5.087	Yes	***	2.621 to 17.84
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs IRI 20	-15.19	7.555	Yes	***	-22.81 to -7.584
Ferrita-betaCD-IRI 80 vs IRI 5	-47.39	23.56	Yes	***	-55.00 to -39.78
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-IRI 5	-49.97	24.84	Yes	***	-57.58 to -42.35
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 240	31.38	15.60	Yes	***	23.76 to 38.99
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 80	17.63	8.766	Yes	***	10.02 to 25.24
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 20	6.955	3.458	No	ns	-0.6560 to 14.57
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 5	-25.97	12.91	Yes	***	-33.58 to -18.36
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240	34.52	17.16	Yes	***	26.91 to 42.13
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80	31.70	15.76	Yes	***	24.09 to 39.31
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	6.392	3.178	No	ns	-1.219 to 14.00
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-35.57	17.69	Yes	***	-43.18 to -27.96
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	30.98	15.40	Yes	***	23.37 to 38.59
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80	21.43	10.66	Yes	***	13.82 to 29.04
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20	-3.009	1.496	No	ns	-10.62 to 4.602
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-36.70	18.25	Yes	***	-44.31 to -29.09
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs IRI 240	41.51	20.64	Yes	***	33.90 to 49.12

Ferrita-betaCD-IRI 20 vs IRI 80	35.02	17.41	Yes	***	27.41 to 42.63
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs IRI 20	9.596	4.771	Yes	**	1.985 to 17.21
Ferrita-betaCD-IRI 20 vs IRI 5	-22.60	11.24	Yes	***	-30.21 to -14.99
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 240	81.34	40.44	Yes	***	73.73 to 88.95
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 80	67.60	33.61	Yes	***	59.99 to 75.21
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 20	56.92	28.30	Yes	***	49.31 to 64.53
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 5	24.00	11.93	Yes	***	16.39 to 31.61
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240	84.49	42.01	Yes	***	76.88 to 92.10
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80	81.67	40.60	Yes	***	74.06 to 89.28
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	56.36	28.02	Yes	***	48.75 to 63.97
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	14.39	7.156	Yes	***	6.783 to 22.00
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	80.94	40.24	Yes	***	73.33 to 88.56
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80	71.40	35.50	Yes	***	63.79 to 79.01
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20	46.96	23.35	Yes	***	39.35 to 54.57
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	13.27	6.596	Yes	***	5.656 to 20.88
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs IRI 240	91.48	45.48	Yes	***	83.87 to 99.09
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs IRI 80	84.99	42.25	Yes	***	77.38 to 92.60
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs IRI 20	59.56	29.61	Yes	***	51.95 to 67.17
Ferrita-betaCD-IRI 5 vs IRI 5	27.36	13.60	Yes	***	19.75 to 34.97
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 80	-13.74	6.834	Yes	***	-21.36 to -6.134
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 20	-24.42	12.14	Yes	***	-32.03 to -16.81
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 5	-57.34	28.51	Yes	***	-64.95 to -49.73
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240	3.146	1.564	No	ns	-4.465 to 10.76
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80	0.3254	0.1618	No	ns	-7.286 to 7.936
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	-24.98	12.42	Yes	***	-32.59 to -17.37
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-66.95	33.29	Yes	***	-74.56 to -59.34
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	-0.3972	0.1975	No	ns	-8.008 to 7.214
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80	-9.943	4.943	Yes	***	-17.55 to -2.332
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20	-34.38	17.10	Yes	***	-42.00 to -26.77
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-68.07	33.85	Yes	***	-75.69 to -60.46
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs IRI 240	10.14	5.040	Yes	***	2.526 to 17.75
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs IRI 80	3.647	1.813	No	ns	-3.964 to 11.26
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs IRI 20	-21.78	10.83	Yes	***	-29.39 to -14.17
Ferrita-HPbetaCD-IRI 240 vs IRI 5	-53.98	26.84	Yes	***	-61.59 to -46.37
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 20	-10.68	5.308	Yes	***	-18.29 to -3.065
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 5	-43.60	21.68	Yes	***	-51.21 to -35.99
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240	16.89	8.398	Yes	***	9.280 to 24.50
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80	14.07	6.995	Yes	***	6.459 to 21.68
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	-11.24	5.588	Yes	***	-18.85 to -3.628
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-53.20	26.45	Yes	***	-60.81 to -45.59
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	13.35	6.636	Yes	***	5.736 to 20.96
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80	3.802	1.890	No	ns	-3.809 to 11.41
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20	-20.64	10.26	Yes	***	-28.25 to -13.03
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-54.33	27.01	Yes	***	-61.94 to -46.72
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs IRI 240	23.88	11.87	Yes	***	16.27 to 31.49
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs IRI 80	17.39	8.647	Yes	***	9.780 to 25.00
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs IRI 20	-8.035	3.995	Yes	*	-15.65 to -0.4243
Ferrita-HPbetaCD-IRI 80 vs IRI 5	-40.23	20.00	Yes	***	-47.84 to -32.62
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-IRI 5	-32.92	16.37	Yes	***	-40.53 to -25.31
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240	27.57	13.71	Yes	***	19.96 to 35.18
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80	24.75	12.30	Yes	***	17.14 to 32.36
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	-0.5630	0.2799	No	ns	-8.174 to 7.048

Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-42.53	21.14	Yes	***	-50.14 to -34.92
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	24.02	11.94	Yes	***	16.41 to 31.63
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80	14.48	7.198	Yes	***	6.867 to 22.09
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20	-9.964	4.954	Yes	***	-17.57 to -2.353
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-43.65	21.70	Yes	***	-51.26 to -36.04
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs IRI 240	34.56	17.18	Yes	***	26.95 to 42.17
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs IRI 80	28.07	13.95	Yes	***	20.46 to 35.68
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs IRI 20	2.641	1.313	No	ns	-4.970 to 10.25
Ferrita-HPbetaCD-IRI 20 vs IRI 5	-29.56	14.70	Yes	***	-37.17 to -21.95
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240	60.49	30.07	Yes	***	52.88 to 68.10
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80	57.67	28.67	Yes	***	50.06 to 65.28
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	32.36	16.09	Yes	***	24.75 to 39.97
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-9.605	4.776	Yes	**	-17.22 to -1.994
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	56.95	28.31	Yes	***	49.33 to 64.56
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80	47.40	23.57	Yes	***	39.79 to 55.01
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20	22.96	11.41	Yes	***	15.35 to 30.57
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-10.73	5.336	Yes	***	-18.34 to -3.121
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs IRI 240	67.48	33.55	Yes	***	59.87 to 75.09
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs IRI 80	60.99	30.32	Yes	***	53.38 to 68.60
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs IRI 20	35.56	17.68	Yes	***	27.95 to 43.17
Ferrita-HPbetaCD-IRI 5 vs IRI 5	3.364	1.673	No	ns	-4.247 to 10.98
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80	-2.821	1.402	No	ns	-10.43 to 4.790
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	-28.13	13.99	Yes	***	-35.74 to -20.52
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-70.09	34.85	Yes	***	-77.71 to -62.48
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-3.543	1.762	No	ns	-11.15 to 4.068
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 24	-13.09	6.508	Yes	***	-20.70 to -5.478
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 80	-37.53	18.66	Yes	***	-45.14 to -29.92
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 20	-71.22	35.41	Yes	***	-78.83 to -63.61
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs IRI 240	6.991	3.476	No	ns	-0.6202 to 14.60
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs IRI 80	0.5007	0.2490	No	ns	-7.110 to 8.112
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs IRI 20	-24.93	12.39	Yes	***	-32.54 to -17.31
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 240 vs IRI 5	-57.12	28.40	Yes	***	-64.74 to -49.51
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20	-25.31	12.58	Yes	***	-32.92 to -17.70
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-67.27	33.45	Yes	***	-74.88 to -59.66
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-0.7226	0.3593	No	ns	-8.334 to 6.888
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 20	-10.27	5.105	Yes	***	-17.88 to -2.657
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 24	-34.71	17.26	Yes	***	-42.32 to -27.10
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 80	-68.40	34.01	Yes	***	-76.01 to -60.79
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs IRI 240	9.811	4.878	Yes	***	2.201 to 17.42
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs IRI 80	3.321	1.651	No	ns	-4.289 to 10.93
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs IRI 20	-22.11	10.99	Yes	***	-29.72 to -14.49
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 80 vs IRI 5	-54.30	27.00	Yes	***	-61.91 to -46.69
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20 vs Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5	-41.96	20.86	Yes	***	-49.58 to -34.35
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	24.59	12.22	Yes	***	16.98 to 32.20
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 20	15.04	7.478	Yes	***	7.430 to 22.65
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 80	-9.401	4.674	Yes	**	-17.01 to -1.790
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 240	-43.09	21.42	Yes	***	-50.70 to -35.48
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20 vs IRI 240	35.12	17.46	Yes	***	27.51 to 42.73
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20 vs IRI 80	28.63	14.23	Yes	***	21.02 to 36.24
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20 vs IRI 20	3.204	1.593	No	ns	-4.407 to 10.81
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 20 vs IRI 5	-28.99	14.42	Yes	***	-36.61 to -21.38
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	66.55	33.09	Yes	***	58.94 to 74.16

Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI8	57.01	28.34	Yes	***	49.39 to 64.62
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	32.56	16.19	Yes	***	24.95 to 40.17
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-1.126	0.5599	No	ns	-8.737 to 6.485
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 240	77.08	38.33	Yes	***	69.47 to 84.70
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 80	70.59	35.10	Yes	***	62.98 to 78.21
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 20	45.17	22.46	Yes	***	37.56 to 52.78
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 5	12.97	6.448	Yes	***	5.359 to 20.58
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-9.546	4.746	Yes	**	-17.16 to -1.935
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 80	-33.99	16.90	Yes	***	-41.60 to -26.38
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 20	-67.68	33.65	Yes	***	-75.29 to -60.07
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs IRI 240	10.53	5.237	Yes	***	2.923 to 18.15
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs IRI 80	4.044	2.011	No	ns	-3.567 to 11.66
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs IRI 20	-21.38	10.63	Yes	***	-28.99 to -13.77
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs IRI 5	-53.58	26.64	Yes	***	-61.19 to -45.97
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-24.44	12.15	Yes	***	-32.05 to -16.83
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 20	-58.13	28.90	Yes	***	-65.74 to -50.52
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs IRI 240	20.08	9.983	Yes	***	12.47 to 27.69
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs IRI 80	13.59	6.757	Yes	***	5.979 to 21.20
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs IRI 20	-11.84	5.885	Yes	***	-19.45 to -4.226
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs IRI 5	-44.04	21.89	Yes	***	-51.65 to -36.42
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-33.69	16.75	Yes	***	-41.30 to -26.08
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs IRI 240	44.52	22.14	Yes	***	36.91 to 52.13
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs IRI 80	38.03	18.91	Yes	***	30.42 to 45.64
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs IRI 20	12.60	6.267	Yes	***	4.994 to 20.22
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs IRI 5	-19.59	9.742	Yes	***	-27.20 to -11.98
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 240	78.21	38.89	Yes	***	70.60 to 85.82
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI8	57.01	28.34	Yes	***	49.39 to 64.62
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24	32.56	16.19	Yes	***	24.95 to 40.17
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-1.126	0.5599	No	ns	-8.737 to 6.485
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 240	77.08	38.33	Yes	***	69.47 to 84.70
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 80	70.59	35.10	Yes	***	62.98 to 78.21
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 20	45.17	22.46	Yes	***	37.56 to 52.78
Ferrita-betaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 5	12.97	6.448	Yes	***	5.359 to 20.58
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-9.546	4.746	Yes	**	-17.16 to -1.935
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 80	-33.99	16.90	Yes	***	-41.60 to -26.38
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 20	-67.68	33.65	Yes	***	-75.29 to -60.07
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs IRI 240	10.53	5.237	Yes	***	2.923 to 18.15
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs IRI 80	4.044	2.011	No	ns	-3.567 to 11.66
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs IRI 20	-21.38	10.63	Yes	***	-28.99 to -13.77
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI24 vs IRI 5	-53.58	26.64	Yes	***	-61.19 to -45.97
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-24.44	12.15	Yes	***	-32.05 to -16.83
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 20	-58.13	28.90	Yes	***	-65.74 to -50.52
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs IRI 240	20.08	9.983	Yes	***	12.47 to 27.69
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs IRI 80	13.59	6.757	Yes	***	5.979 to 21.20
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs IRI 20	-11.84	5.885	Yes	***	-19.45 to -4.226
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI80 vs IRI 5	-44.04	21.89	Yes	***	-51.65 to -36.42
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5	-33.69	16.75	Yes	***	-41.30 to -26.08
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs IRI 240	44.52	22.14	Yes	***	36.91 to 52.13
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs IRI 80	38.03	18.91	Yes	***	30.42 to 45.64
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs IRI 20	12.60	6.267	Yes	***	4.994 to 20.22
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI20 vs IRI 5	-19.59	9.742	Yes	***	-27.20 to -11.98
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 240	78.21	38.89	Yes	***	70.60 to 85.82
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 80	71.72	35.66	Yes	***	64.11 to 79.33
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 20	46.29	23.02	Yes	***	38.68 to 53.91
Ferrita-HPbetaCD-citrato-IRI 5 vs IRI 5	14.10	7.008	Yes	***	6.485 to 21.71
IRI 240 vs IRI 80	-6.490	3.227	No	ns	-14.10 to 1.121
IRI 240 vs IRI 20	-31.92	15.87	Yes	***	-39.53 to -24.31
IRI 240 vs IRI 5	-64.12	31.88	Yes	***	-71.73 to -56.50
IRI 80 vs IRI 20	-25.43	12.64	Yes	***	-33.04 to -17.82
IRI 80 vs IRI 5	-57.63	28.65	Yes	***	-65.24 to -50.01
IRI 20 vs IRI 5	-32.20	16.01	Yes	***	-39.81 to -24.59