

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

ALINNE DAMÁSIA MARTINS GOMES

DESENVOLVIMENTO E ESTUDOS BIOLÓGICOS DE
DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
ANTITUMORAIS UTILIZANDO POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS E
MATERIAIS MAGNÉTICOS

Belo Horizonte

2015

UFMG/ICEx/DQ 1.079^a

T. 488^a

ALINNE DAMÁSIA MARTINS GOMES

DESENVOLVIMENTO E ESTUDOS BIOLÓGICOS DE
DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
ANTITUMORAIS UTILIZANDO POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS E
MATERIAIS MAGNÉTICOS

Tese apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2015

Gomes, Alinne Damásia Martins
Desenvolvimento e estudos biológicos de dispositivos de liberação controlada de antitumorais utilizando polímeros biodegradáveis e materiais magnéticos [manuscrito] / Alinne Damásia Martins Gomes. 2015.

[xxii], 138 f. : il.

Orientador: Rubén Dario Sinisterra Millán.

Coorientadora: Maria Esperanza Cortés.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.

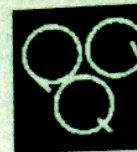
Inclui bibliografia e anexos.

1. Química inorgânica - Teses 2. Preparações de liberação controlada - Teses 3. Agentes antineoplásicos - Teses 4. Ferrita (Materiais magnéticos) - Teses 5. Nanopartículas - Teses I. Sinisterra Millán, Rubén Dario, Orientador II. Cortés, Maria Esperanza, Coorientadora III. 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



**"Desenvolvimento e Estudos Biológicos de Dispositivos de Liberação Controlada
de Antitumorais Utilizando Polímeros Biodegradáveis e Materiais
Magnéticos."**

Alinne Damásia Martins Gomes

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador
UFMG


Profa. Maria Esperanza Cortés - Coorientadora
UFMG


Prof. Fernando Gomes de Souza Junior
UFRJ


Prof. Angelo Márcio Leite Denadai
UFJF


Profa. Rosana Zacarias Domingues
UFMG


Profa. Leticia Regina de Souza Teixeira
UFMG

Belo Horizonte, 24 de março de 2015.

"Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é, que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver".

Amyr Klink, "Mar Sem Fim".

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Rubén Dario
Sinisterra Millán e co-orientação da Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés
Segura.

Dedico este trabalho ao Júnior, amor da minha vida, que me faz acreditar que a
felicidade existe.

A Deus, Força Maior, agradeço por não deixar que eu perdesse a fé e a vontade de vencer essa etapa. Por guiar-me pelos caminhos do bem e sempre manter esses caminhos iluminados, proteger-me sempre e dar-me alegria e persistência para viver esses anos.

Ao Júnior, por todos os momentos vividos, sempre com bom humor, carinho, companheirismo e amor... uma das melhores surpresas da minha vida... todos os dias uma nova conquista, muitas risadas e momentos felizes.

À Mãe Imaculada, guerreira e sempre presente durante toda essa jornada, por mostrar-me o verdadeiro significado de dedicação e amor.

À minha queridíssima vovó Lourdes, uma mulher sempre à frente do seu tempo, agradeço pela sabedoria e por simplesmente ser a minha AVÓ. A maneira como criou seus filhos me inspira a construir minha família.

Ao meu vovô Bitá, Homem de verdade, coração nobre e sereno, agradeço por sempre acreditar em meu potencial, ouvir e respeitar minhas opiniões. Se existe um anjo da guarda terreno, ele é o meu!

Ao Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra pela confiança no meu trabalho, orientação e oportunidades de crescer profissionalmente, e por me ajudar a ver que o mundo é muito maior do que pensamos.

À Capes, pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Maria Esperanza Cortés, mulher de fibra, coragem e um enorme coração, agradeço pela confiança e generosidade. Obrigada por toda paciência a mim dedicada, todos os momentos que me acalmou e tranquilizou.

Ao Prof. Dr. Robson Santos, pelo apoio concedido durante a execução deste trabalho.

Ao meu pai, José, pela simplicidade em lidar comigo e pelas conversas sempre bem-humoradas.

Aos meus tios queridos: Amauri, Braguinha, Maurício, Rita, Selma, Sônia e, em especial, à Tia Iony, pela oportunidade de participar de momentos importantes da família com minhas opiniões, sem influências externas, e ao Tio Taquinho, Homem honesto e idôneo, merecedor de toda minha gratidão.

Aos meus irmãos, Vinicius e Thaís, pelos momentos de convivência, e ao meu sobrinho Augusto, pela alegria de criança.

Aos meus queridos sogros, Sr. Eônio e Dona Célia, por me acolherem com muito carinho e respeito.

Aos cunhados Marcos, Jac, Rê e Vinicius, e a pequenina Alice, que alegra nossas vidas sempre.

À equipe da Mobraudio, César, Carolina e Michelle, pelo apoio durante a escrita e pelos momentos de descontração. Também à família Mobraudio, Renata e Isabela/Henrique (baby!), que trará pureza e inocência para esse mundo.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do LEMB: Ana Paula, Ana Délia, Alfonso, Diego, Eduardo, Gabi, Ivana, Pedro, Ricardo, Sávio, Karina Teixeira, Karina Scheuermann, Kelen, Larissa, Viviane Trajano, Michele, Jéssica e Jessika Consuegra, pelos vários momentos de descontração.

Aos eternos colegas do LEMB que, apesar de não conviverem mais no dia-a-dia, sempre são lembrados, Frederico, Joel e Washington.

À equipe da Profa. Dra. Sílvia Passos, Celso, Profa. Dra. Paula Campos e demais alunos, pela oportunidade e ajuda na execução dos experimentos *in vivo*.

À minha eterna e querida “aluna de iniciação” científica, Aina, pelos momentos de amizade e descontração.

Ao Dr. José Domingos Ardisson e ao Dr. Luis Fernandez-Outon, do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), pela ajuda e paciência na realização dos experimentos de magnetismo e raios X.

Ao Prof. Dr. Rochel Montero Lago e o Prof. Dr. José Domingos Fabris pelo incentivo, carinho e apoio.

À Profa. Maria Irene Yoshida, pela ajuda nos experimentos de análise térmica.

À Dra. Ivana Lula, pela colaboração e convivência.

Às amigas do coração Aninha, Claudinha, Hosane, Josi, Laurinha, Natalia Sanchez, Nathália Gesualdi, Karina Chaves e Roberta Viana, pelas amizades para a vida inteira.

Aos queridos amigos Dani Porto, Thiago Fox, Raí e Fred Soares, pela amizade para a vida inteira.

À Mara, pela grande ajuda nas tarefas domésticas.

À Flávia e ao César, por ajudarem a cuidar da minha saúde.

À Maria Zilda, pelo grande carinho, zelo e pelas orações sempre feitas em minha intenção.

Aos meus colegas do CEM, pelos ótimos passeios, escaladas e momentos de alegria nas reuniões.

Às meninas da secretaria de pós-graduação, Marane, Lílian, Paulete e Alessandra, pela compreensão com os problemas que surgiram nessa jornada e aos funcionários do Departamento de Química, Anderson, Srs. Luís, Carla, Ana Cristina, Rogério, Rúbio, Carlos, Lucas, Paulo e Sr. Romário, por todos os momentos de descontração e por toda a ajuda dada.

Resumo

Neste trabalho, nanopartículas magnéticas com núcleos de óxidos de ferro recobertos por polímero biodegradável PLGA, contendo os antitumorais citrato de ródio(II) ou daunorrubicina foram obtidos, caracterizados e avaliados em linhagens de células cancerosas e/ou modelo murino de implante de esponja para avaliação de inflamação e angiogênese.

Os compostos magnéticos como os óxidos de ferro podem ser uma alternativa ao tratamento convencional do câncer porque são materiais biocompatíveis que podem ser utilizados como carreadores de um dispositivo antitumoral. Um campo magnético externo pode ser aplicado, atraindo essas partículas, e diminuindo a sua circulação sistêmica, o que favorece a acumulação no local do tumor, aumentando a sua eficácia e diminuindo os efeitos secundários sistêmicos. Exemplos são nanopartículas (NPs) produzidas a partir de sais de ferro (íons Fe^{2+} ou Fe^{3+}) ou desses com outros metais de transição, como o níquel e o zinco, chamadas ferritas (FR).

Substâncias com atividade antitumoral podem ser usadas com essas ferritas para que possam ser guiadas até o local de ação através de um campo magnético. Como exemplos, tem-se o citrato de ródio(II), um complexo inorgânico obtido de RhCl_3 , muito eficaz em células cancerosas, e cloridrato de daunorrubicina (DNR), do grupo das antraciclinas, fármaco quimioterápico muito utilizado para tratamento de tumores, mas com efeitos citotóxicos em células normais, curto tempo de meia-vida e não-seletividade para células cancerosas. Neste estudo, foram sintetizadas nanossistemas de citrato de ródio(II) e daunorrubicina com ferrita de óxidos de ferro e/ou ferrita de óxidos de níquel/zinco/ferro e ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA), que foram testados em células cancerosas *in vitro* e/ou em modelo de angiogênese *in vivo*.

Ambos foram caracterizados por técnicas físico-químicas, tais como espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), análise térmica (TG e DTA), microscopias eletrônicas (ME), magnetização de saturação à temperatura ambiente (M_{sat}), entre outras, e as cinéticas de liberação *in vitro* foram avaliadas. A síntese do citrato de ródio(II) foi reproduzida segundo dados da literatura. A partir do citrato de ródio(II) sintetizado, foram preparados nanossistemas com PLGA e ferritas, que apresentaram diâmetros de, aproximadamente, 250,0 a 300,0 nm, potencial zeta de -24,7 mV e comportamento superparamagnético.

Nanossistemas de daunorrubicina foram preparados a partir do fármaco puro, PLGA e ferrita, apresentaram diâmetros de cerca de 160,0 a 200,0 nm, potencial zeta de -32,4 mV e comportamento superparamagnético. Foram traçados os perfis

cinéticos de liberação dos fármacos, utilizando tampão fostato (PBS) como meio e temperatura de 37 °C, condições que mimetizam os fluidos biológicos. O citrato de ródio(II), a partir do nanossistema, mostrou um perfil de liberação controlada sem a presença de efeito explosão e a liberação se manteve por cerca de 70 h. A liberação de daunorrubicina a partir do nanossistema mostrou um efeito explosão nas primeiras 8 h e liberou o fármaco por até 350 h. Ambos os sistemas foram testados com um ímã e visualmente atraídos pelo campo.

O nanossistema de citrato de ródio(II) apresentou toxicidade semelhante à do ródio(II) livre nos ensaios *in vitro* em células tumorais e o de daunorrubicina exibiu citotoxicidade cerca de 50 vezes maior, quando comparado com a daunorrubicina livre. Os estudos *in vivo* demonstraram que o nanossistema contendo daunorrubicina apresentou efeito antiangiogênico em modelo de implante de esponja, mensurado através da dosagem de hemoglobina; bem como as citocinas inflamatórias agudas e crônicas, VEGF e TNF- α foram inibidas sugerindo pouca inflamação. A partir desses resultados, concluiu-se que os nanossistemas de liberação de daunorrubicina e citrato de ródio(II) foram caracterizados como dispositivos magneticamente dirigidos, citotóxicos frente as células tumorais e se mostraram antiantigênicos.

Palavras-chave: Citrato de ródio(II); daunorrubicina; nanopartículas magnéticas; nanossistemas poliméricos antitumorais; liberação de drogas.

“Development and biological studies of drug delivery systems of anticancer drugs using biodegradable polymers and magnetic materials.”

Abstract

In this work, magnetic nanosystems of iron oxide cores coated by the PLGA biodegradable polymer containing the antitumor rhodium(II) citrate or daunorubicin hydrochloride obtained was characterized and evaluated in cancer cell lines and/or murine sponge implant model for assessing inflammation and angiogenesis.

Magnetic iron oxides can offer particularly features as an alternative to conventional cancer treatment because they are biocompatible materials that can be used as the core of an antitumor device. An external magnetic field can be applied, attracting these particles, and decreasing their circulation in the blood, which favors the accumulation in the tumor site, increasing their efficacy and decreasing the systemic side effects. Examples are nanoparticles (NPs) produced from iron salts (Fe^{2+} or Fe^{3+}) or salts of these chlorides with other transition metals such as nickel and zinc, called ferrites (FR). These nanoparticles exhibit biocompatibility and can be used in combination with magnetically carrier polymers for biomaterials.

Substances having antitumor activity can be used with these ferrites in order to be guided to the site of action via a magnetic field. As examples, it has been rhodium(II) citrate, an inorganic compound obtained of RhCl_3 , very effective in cancer cells, daunorubicin hydrochloride (DNR), member of the group of anthracycline, chemotherapeutic drug widely used for the treatment of tumors, but have cytotoxic effects in normal cells, the short half-life and the non-selectivity for cancer cells. In this study, rhodium(II) citrate nanosystem was synthesized and daunorubicin with ferrites and poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA), have been tested in cancer cells and/or *in vivo* angiogenesis model.

These nanosystems were characterized by physicochemical techniques such as absorption spectroscopy in the infrared (FTIR), thermal analysis (TG and DTA), electronic microscopy (EM), saturation magnetization at room temperature (M_{sat}), among others, and the *in vitro* release kinetics was evaluated. The synthesis of rhodium(II) citrate was efficient according with the literature. The complex synthesized nanosystem was prepared with PLGA and ferrites loaded with rhodium(II) had diameters of about 250.0 to 300.0 nm, surface charge (zeta potential) of -24.7 mV and a paramagnetic behavior. Furthermore, the daunorubicin nanosystem was prepared from the free drug, PLGA and ferrites, and had the same

diameters of about 160.0 to 200.0 nm, zeta potential value of -32.4 mV and superparamagnetic behavior.

Kinetics profiles plotted using phosphate buffered saline (PBS) as the middle temperature of 37 °C, conditions that mimic the biological fluids. Rhodium(II) citrate from nanosystem showed a release profile controlled without the presence of burst effect and the release is maintained for about 70 h. The release of daunorubicin from the nanosystem showed a burst effect and acquired a controlled release profile up to 350 h. Both systems were tested with a magnet and visually attracted to the field.

The nanosystem containing rhodium(II) citrate exhibited similar toxicity to free rhodium(II) *in vitro* assays with tumor cell lines and the daunorubicin nanosystem exhibited cytotoxicity *in vitro* in cancer cells about 50 times greater, when compared to free daunorubicin. *In vivo* studies of the daunorubicin nanosystem showed that the system had antiangiogenic effect on sponge model, measured by hemoglobin; in addition acute and chronic inflammatory responses based on levels of cytokines such as VEGF and TNF- α were measured suggesting a nanosystem lower inflammation. From these results, one could concluded that the release systems of daunorubicin and rhodium(II) citrate from the polymer matrix with the magnetic core, were cytotoxic against cancer cells and shown antiangiogenic properties.

Keywords: Rhodium citrate (II); daunorubicin; magnetic nanoparticles; anticancer polymeric systems; drug delivery.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema simplificado ilustrativo de etapas de desenvolvimento tumoral.	25
Figura 2: Esquema de descrição de etapas do processo de angiogênese em que são exemplificadas algumas diferenças observadas na formação de um vaso sanguíneo normal (A) e de um vaso sanguíneo na angiogênese tumoral (B).....	26
Figura 3: Estrutura química geral dos carboxilatos de ródio(II)	30
Figura 4: Estrutura química do citrato de ródio(II).....	30
Figura 5: Estrutura química da daunorrubicina.	31
Figura 6: Esquema de etapas do ciclo celular, destacando o mecanismo de ação das antraciclina[29]. *G0, G1 e G2= <i>gap</i> 0, 1 e 2; S= síntese do DNA; M= fase mitótica; R= regulação.	32
Figura 7: Representação estrutural dos monômeros do PLA, PGA e PLGA, respectivamente..	39
Tabela 1: Temperatura de transição vítrea dos diferentes tipos de copolímeros, considerando diferentes proporções de D, L-PLA, PGA.	40
Figura 8: Representação da reação de hidrólise do PLGA, mostrando os produtos de degradação.	41
Figura 9: Ilustração dos sistemas poliméricos de liberação de fármacos, em forma de microcápsulas (A) e microesferas (B).	41
Figura 10: Curvas de concentração plasmática após ingestão de doses terapêuticas: (A) liberação convencional; (B) liberação controlada.	43
Figura 11: Reação de conversão do íon tetrazólio em formazan.	62
Figura 12: Esquema simplificado do experimento <i>in vivo</i> utilizando o modelo de angiogênese.	66
Figura 13: Difratoograma da ferrita de Ni-Zn.	72
Figura 14: Curvas de magnetização para as ferritas de Ni-Zn utilizando VSM.	74
Figura 15 (esquerda): Micrografia de ferrita de Ni-Zn pelo método de MEV. Aumento de 25.000X; Figura 16 (direita): Micrografia de ferrita de Ni-Zn pelo método de MEV. Aumento de 200.000 X.	75
Figura 17: Difratoograma da ferrita de óxidos de ferro.	76
Figura 18: Micrografia de ferrita de óxidos de ferro utilizando MEV. Aumento de 30.000X.	77
Figura 19: Espectro Mössbauer da amostra na temperatura de 160K.	79
Figura 20: Distribuição de campo referente ao ajuste do espectro Mössbauer da amostra a temperatura de 160K.	80
Figura 21: Espectro de IV do acetato de sódio e acetato de ródio(II).....	84
Figura 22: Espectro de infravermelho do citrato de ródio(II).....	85
Figura 23: Difratoograma para nanossistema de PLGA, ferrita de Ni-Zn ou ferrita de óxido de ferro e citrato de ródio(II).....	87
Figura 24: Hipótese ilustrativa para a organização dos componentes no sistema nanoparticulado.....	89

Figura 25: Micrografias das partículas de PLGA em sua forma natural, antes da preparação das partículas. Aumento de 150X.....	89
Figura 26 (esquerda) e 27 (direita): Micrografias de nanossistema de PLGA, ferrita de Ni-Zn e citrato de ródio(II). Aumento de 10.000X.	90
Figura 28: Micrografias de nanossistema de citrato de ródio(II) em aumento de 33.000 e 30.000X, respectivamente.	90
Figura 29: Valores de magnetização de saturação de nanopartículas magnéticas. 1) NPs contendo 25 % p/p de ferrita Ni-Zn; 3) NPs contendo 10 % p/p de Ni-Zn; 4) NPs contendo 5 % p/p de Ni-Zn; 5) ferrita Ni-Zn pura seca em estufa; 6) ferrita Ni-Zn pura seca em liofilizador; 7) NPs contendo 20 % p/p de Ni-Zn e 8) NPs contendo 15 % p/p de Ni-Zn...92	92
Figura 30: Valores de magnetização de saturação de nanopartículas magnéticas. Amostra 01: ferrita de óxidos de ferro (FR); Amostra 02: nanossistema com 25 % p/p de FR; Amostra 03: nanossistema com 20 % de FR; Amostra 07: nanossistema com 10 % de FR.....	94
Figura 31: Perfil de liberação de citrato de ródio(II) a partir do nanossistema magnético.	96
Figura 32: Resultados de % de viabilidade celular em células de Caco-2.	98
Figura 33: Espectros de absorção na região do infravermelho do PLGA, DNR, FR, os nanossistemas DNR-PLGA e DNR-PLGA-FR, entre 4000-500 cm^{-1}	101
Figura 34: Curvas termogravimétricas (TGA) para amostras de daunorrubicina (DNR) pura, do copolímero PLGA, da ferrita de óxidos de ferro pura (FR) e do nanossistema DNR-PLGA, na faixa de temperatura de 25 a 700 $^{\circ}\text{C}$	103
Figura 35: Curva termogravimétrica (TGA), termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA) para o nanossistema DNR-FR-PLGA, na faixa de temperatura de 25 a 700 $^{\circ}\text{C}$	104
Figura 37: Curvas de análise térmica diferencial (DTA) para as amostras de daunorrubicina pura (DNR), do copolímero PLGA, da ferrita pura (FR) e dos nanossistemas de daunorrubicina-PLGA (DNR-PLGA) e daunorrubicina-ferrita-PLGA (NP).	106
Figura 38: Magnetização de saturação do nanossistema DNR-FR-PLGA a 298 K.....	109
Figura 39: Micrografias de FR pura - (A) e (B) micrografias apresentam nanopartículas com 12 nm de diâmetro, em média. A barra de escala equivale a 10 e 100 nm. As micrografias (C) e (D) se referem ao nanossistema, em escalas de aumento diferentes. As barras equivalem a 20 e 10 nm, respectivamente.	110
Figura 40: Micrografias de força atômica de (A), (B) e (C) micrografias apresentam o nanossistema de daunorrubicina (DNR-FR-PLGA) sintetizadas pelo método de emulsão múltipla, em escalas de aumento diferentes.....	110
Figura 41: Curva de porcentagem cumulativa liberada de daunorrubicina a 37 $^{\circ}\text{C}$. Gráfico menor: ajuste de modelo cinético para as primeiras 8 horas de experimento.....	111
Figura 42: Gráficos de valores de porcentagem de viabilidade em células de Caco-2 após exposição de 48 horas a diferentes concentrações de DNR, livre ou encapsulada em matrizes de PLGA e FR-PLGA, ANOVA, $p < 0,05$	113

-
- Figura 43: Curvas de IC_{50} de daunorrubicina livre e encapsulada em matriz de PLGA e FR-PLGA no tempo de 48 horas de exposição em células de Caco-2 (A), em células A-431 (B) e em fibroblastos (C). 115
- Figura 44: Concentrações de hemoglobina (Hb) nas amostras contendo nanopartículas de FR pura e no nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) com (+M) ou sem (-M) a presença do campo magnético externo (M), após 7 dias de experimento. O grupo controle corresponde aos animais que receberam apenas o implante; * $p < 0,05$ 118
- Figura 45: Concentrações de VEGF para amostras de FR pura, DNR-FR-PLGA (representado por NP) com (+M) ou sem (-M) influência de campo magnético (M); * $p < 0,05$ 120
- Figura 46: Concentrações de TNF- α nos implantes 7 dias após a aplicação do nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) com (+M) ou sem (-M) influência do campo magnético (M) e também de ferrita pura (FR). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ 122
- Figura 47: Concentrações de MPO 7 dias após aplicação de nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) e FR pura com (+M) ou sem (-M) influência de um campo magnético externo (M). Não há diferença estatística significativa entre os grupos, método ANOVA. 123
- Figura 48: Concentrações de NAG 7 dias após aplicação do nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) e FR pura com (+M) ou sem (-M) influência de um campo magnético externo (M). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 125

Lista de Tabelas

Tabela 1: Algumas propriedades físico-químicas dos diferentes tipos de copolímeros, considerando diferentes proporções de D, L-PLA, PGA.	40
Tabela 2: Principais reagentes utilizados.	50
Tabela 3: Medidas dos ângulos de difração (2θ), intensidade relativa (I/I_0) e distâncias interplanares (d) para as ferrita de Ni-Zn.	72
Tabela 4: Medidas dos ângulos de difração (2θ), intensidade relativa (I/I_0) e distâncias interplanares (d) para a ferrita.	77
Tabela 5: Dados dos parâmetros do espectro de Mössbauer a 140K.	80
Tabela 6: Descrição dos eventos térmicos para o acetato de sódio e de ródio(II) em atmosfera de N_2	84
Tabela 7: Valores de potencial zeta para amostras de nanossistemas de PLGA carregando ferrita de Ni-Zn, ferrita e citrato de ródio(II).	89
Tabela 8: Valores de potencial zeta para as amostras de copolímero PLGA puro, ferrita pura (FR), daunorrubicina-PLGA (DNR-PLGA) e daunorrubicina-ferrita-PLGA (DNR-FR-PLGA).	107
Tabela 9: Valores de IC_{50} para a daunorrubicina em células de Caco-2.	121

Lista de abreviaturas

FR	Ferritas
NPs	Nanopartículas
DNR	Cloridrato de Daunorrubicina
PLGA	Poli- ácido láctico-co- ácido glicólico
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
TG	Termogravimetria
DTA	Análise térmica diferencial
ME	Microscopia Eletrônica
M_{sat}	Magnetização de saturação
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier
EPR	Efeito de Permeação e Retenção
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
Rh	Ródio
T_c	Temperatura de Curie
Fe	ferro
Ni	níquel
Zn	zinco
PLA	Poli- ácido láctico
PGA	Poli- ácido glicólico
CO ₂	gás carbônico
NAG	N-Acetil-Glucosaminidase
MPO	Mieloperoxidase
VEGF	Fator de crescimento endotelial de vasos
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
PVA	Álcool polivinílico
PBS	Solução tampão fostato
VSM	Magnetômetro de amostra vibrante
CDTN	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
SDS	<i>Dodecilsulfato de sódio</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais

NdFeB	Neodímio/Ferro/Boro
ELISA	<i>Ensaio de Enzyme-Linked Immunosorbent</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaEDTA	EDTA sódico
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
OD	<i>Densidade óptica</i>
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Na ₃ PO ₄	Fosfato de sódio
DMSO	Dimetilsulfóxido
Na ₂ HPO ₄	Fosfato ácido de sódio

Sumário

Resumo	x
Abstract	xii
Lista de abreviaturas	xviii
1. Introdução.....	24
1.1. Câncer	24
1.2. Fármacos antitumorais e a evolução da quimioterapia do câncer.....	27
1.3. Complexos de ródio e o citrato de ródio(II).....	29
1.4. Daunorrubicina.....	31
1.5. A nanotecnologia e os carreadores magnéticos de fármacos	33
1.6. Polímeros Biodegradáveis	38
1.7. Sistemas de Liberação Controlada	41
2. Objetivos.....	47
2.1. Objetivos gerais	47
2.2. Objetivos específicos	47
3. Materiais e Métodos	50
3.1. Reagentes.....	50
3.2. Equipamentos	51
A) Análise elementar (CHN).....	51
B) Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	51
C) Termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA)	51
E) Difratomia de raios X de pó (DRX).....	52
F) Liofilização	52
G) Sonicador	52
H) Homogeneizador/dispersador	53
I) Ultra-centrífuga	53
J) Água ultrapura por osmose reversa – sistema Milli-Q®	53
K) Manta aquecedora.....	53
L) Microscópio eletrônico de varredura (MEV).....	53
M) Microscópio de força atômica (MFA)	54
N) Microscópio eletrônico de transmissão (MET)	54
O) Espalhamento de luz dinâmico – Tamanho e Potencial zeta.....	55

P) Magnetômetro (VSM)	55
3.3 Métodos	55
3.3.1. Síntese das ferrita de Ni-Zn e ferrita de óxidos de ferro	55
3.3.2. Preparação do citrato de ródio(II).....	56
3.3.3. Preparação de nanossistema de PLGA, citrato de ródio(II) e ferrita de Ni-Zn ou ferrita de óxidos de ferro/ ou nanossistema de daunorrubicina, PLGA e ferrita de óxidos de ferro	58
3.3.4. Medidas de tamanho de partículas e potencial zeta	59
3.3.5. Medidas de magnetização de saturação.....	60
3.3.6. Perfil cinético de liberação do citrato de ródio(II) e daunorrubicina	60
3.3.7. Espectroscopia Mössbauer	61
3.3.8. Testes biológicos <i>in vitro</i>	61
3.3.9. Experimentos <i>in vivo</i>	63
4. Estudo físico-químico das ferritas	71
4.1. Caracterização físico-química das ferritas.....	71
4.1.1. Ferrita de ferro, níquel e zinco	71
4.1.1.1. Difração de raios X em pó	72
4.1.1.2. Medidas magnéticas da ferrita de Ni-Zn	73
4.1.1.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	75
4.1.2. Ferrita de óxidos de ferro	76
4.1.2.1. Difração de raios X de pó.....	76
4.1.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	77
4.1.2.3. Espectroscopia Mössbauer	78
5. Nanossistemas contendo citrato de ródio(II).....	83
5.1. Caracterização do citrato de ródio(II).....	83
5.1.1. Análise Elementar	83
5.1.2. Caracterização do citrato de ródio(II) - FTIR.....	84
5.2. Caracterização de nanossistema de liberação de PLGA, ferrita de Ni-Zn ou ferrita de óxidos de ferro e citrato de ródio(II).....	86
5.2.1. Difração de raios X.....	87
5.2.2. Medidas de potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico.....	88
5.2.3. Microscopia eletrônica de varredura	89
5.2.4. Medidas de magnetização de saturação.....	91
5.2.5. Perfil de Liberação	95

5.3. Testes biológicos <i>in vitro</i>	97
5.3.1. Testes de viabilidade celular pelo método de MTT.....	97
6. Nanossistemas contendo cloridrato de daunorrubicina.....	100
6.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	100
6.2 Análise Térmica: Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise térmica diferencial (DTA).....	103
6.3 Potencial Zeta.....	107
6.4. Medidas de magnetização.....	108
6.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Microscopia de Força Atômica (MFA).....	110
6.6. Perfil de liberação controlada.....	111
6.7 Estudos de viabilidade celular <i>in vitro</i>	113
6.8. Estudos biológicos <i>in vivo</i>	117
6.8.1. Avaliação de neovascularização por quantificação de hemoglobina.....	118
6.8.2. Avaliação dos níveis de citocina VEGF.....	119
6.8.3. Avaliação de níveis de citocina TNF- α	121
6.8.4. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	123
6.8.5. Avaliação da atividade da N-acetil-glucosaminidase (NAG).....	124
7. Conclusões.....	128
8. Perspectivas futuras.....	129
9. Referências Bibliográficas.....	131

Capítulo 1: Introdução

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer é o líder de causa de mortes no mundo e poderá chegar a 14 milhões em 2030, segundo a Organização Mundial de Saúde [1]. Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças, caracterizado pelo crescimento desordenado de vários tipos de células que têm a capacidade de se desenvolver em ambientes com características fisiológicas atípicas, formando aglomerados em vários órgãos e tecidos. Essas células, que têm seu metabolismo alterado, se dividem rapidamente, tornando-se aptas a liberação de substâncias que contribuem para a formação de vasos sanguíneos anormais, em um processo denominado angiogênese, como ilustrado na **Figura 1**. Esses vasos sanguíneos são essenciais para o crescimento tumoral e um indicador de malignidade para as neoplasias [2, 3].

O desenvolvimento de diferentes tumores está associado à ocorrência de mudanças genéticas e/ou ambientais sofridas pelas células. Essas alterações consistem em desregulação das características fisiológicas, como mudança de pH e secreção de substâncias que causam modificações na morfologia e metabolismo celular [4]. Além disso, essas células modificadas apresentam velocidade de multiplicação alterada e capacidade de atingir outros órgãos e tecidos através da corrente sanguínea, processo chamado de metástase. Na metástase, algumas células se desprendem da massa tumoral, são transportadas pela corrente sanguínea, atingindo outros tecidos e órgãos, originando formações tumorais secundárias. Esses tumores secundários formados não têm ligação direta com os tumores primários [5, 6].

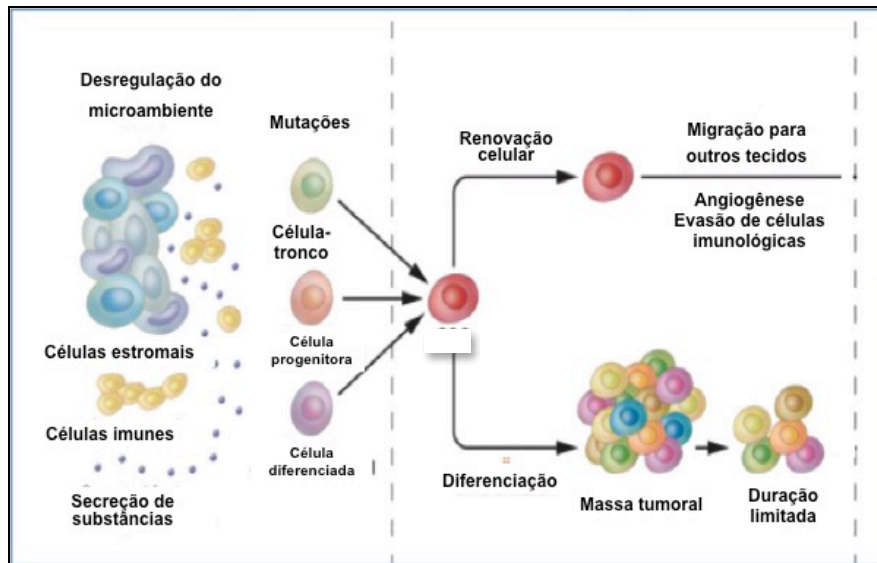


Figura 1: Esquema simplificado ilustrativo de etapas de desenvolvimento tumoral [4].

O crescimento dos tumores depende de nutrientes e oxigênio que são transportados pelo sangue. Como a massa tumoral se desenvolve em locais em que os vasos normais não suprem totalmente a necessidade de nutrientes, novos vasos são formados na angiogênese [7]. Esses vasos se desenvolvem também em condições normais, através de substâncias produzidas pelo organismo e também por sinalização celular. Porém, em microambientes atípicos e condições fisiológicas anormais, a produção desses vasos não acontece normalmente porque a velocidade de crescimento e maturação das células endoteliais não é adequada, ocasionando a formação deficitária de vasos que têm estrutura e funções anormais. Destaca-se como característica dessa má formação a maior distância intercelular durante a extensão do vaso sanguíneo, o que modifica a passagem de estruturas que atingem a região tumoral.

O processo de passagem de estruturas e nutrientes para a região tumoral é chamado de efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention* ou

Efeito de Permeação e Retenção), que é o efeito de permeabilidade e retenção aumentadas dos vasos sanguíneos [8]. Na **Figura 2** está representado o processo de formação desses vasos sanguíneos em condições normais (A) e alteradas (B).

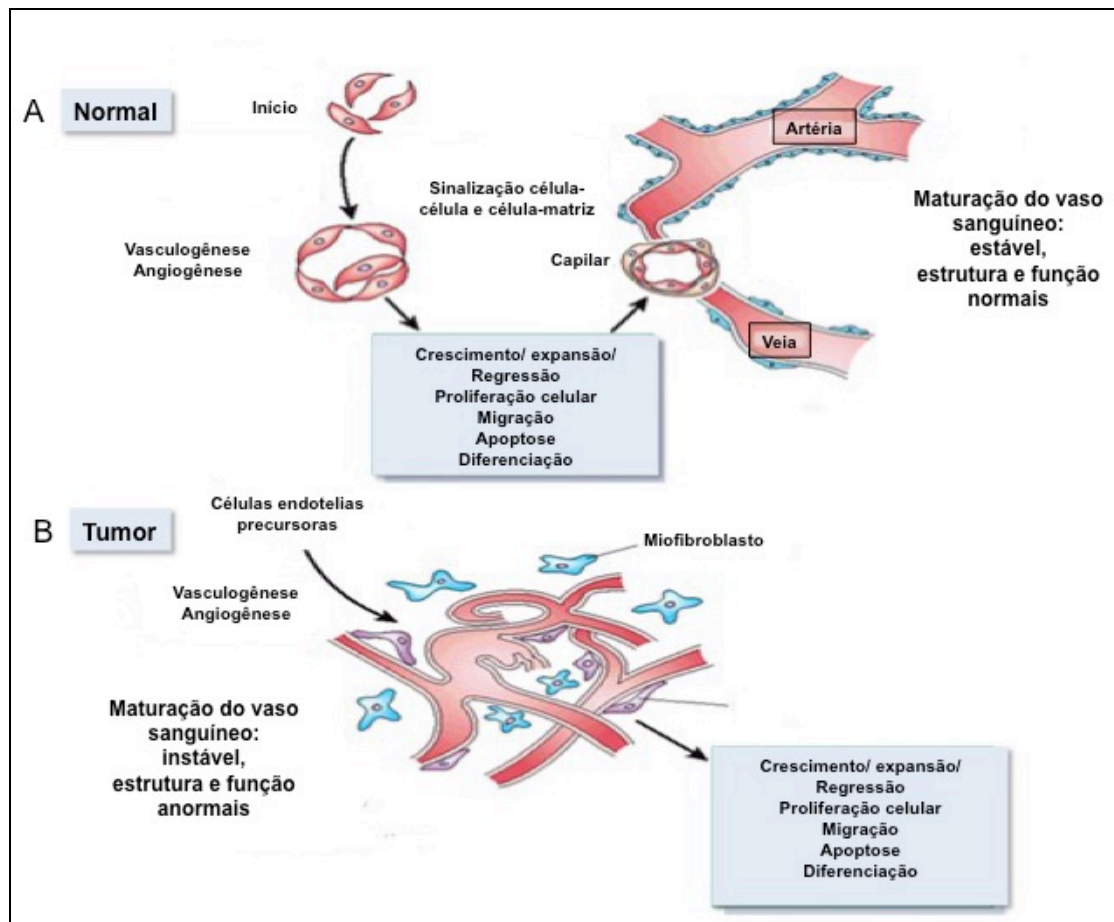


Figura 2: Esquema de descrição de etapas do processo de angiogênese em que são exemplificadas algumas diferenças observadas na formação de um vaso sanguíneo normal (A) e de um vaso sanguíneo na angiogênese tumoral (B) [8].

Analisando o processo desde o desenvolvimento de um tumor até o aparecimento do câncer, conclui-se que é um processo complexo que envolve várias etapas e é influenciado por diferentes estímulos, o que torna o câncer uma doença multifatorial. Dentre estes fatores destacam-se os genéticos, os ambientais, os hábitos alimentares, o tabagismo e o abuso de

álcool [2], colocando o câncer como uma das maiores causas de redução da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos [8, 9].

Verifica-se uma mudança na epidemiologia da doença nas últimas décadas quando era observado um maior número de casos de câncer em países desenvolvidos com altos recursos financeiros, tornando-o um problema de saúde pública mundial [3]. No Brasil, as maiores incidências na população são de câncer de mama, próstata, colo do útero e pulmão. Juntos, são responsáveis por cerca de 200.000 novos casos todos os anos [2]. Atualmente, o país sofre mudanças em seu perfil populacional, devido ao processo de urbanização e mudanças nos perfis e estilo de vida. Assim, observa-se queda na incidência de doenças infectocontagiosas e aumento das patologias crônico-degenerativas [2]. Com o aumento de incidência, tornam-se importantes a inserção de políticas de informação e intervenção por parte dos órgãos governamentais.

Considerando essa importância do câncer no quadro de doenças de importância mundial, há grandes investimentos por parte das indústrias farmacêuticas em pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, bem como a busca por formulações farmacêuticas mais eficazes e seguras, mas na maioria dos casos ainda são tratados com os mesmos fármacos desde a década de 1950 [10, 11].

1.2. Fármacos antitumorais e a evolução da quimioterapia do câncer

Atualmente, os principais tratamentos para o câncer são a remoção cirúrgica, caracterizada pela retirada total ou parcial do órgão acometido, a

radioterapia e a quimioterapia [12], sendo que 90 % deles incluem o uso de terapias combinadas e a quimioterapia é aplicada na maioria dos casos.

Quimioterapia é o uso de medicamentos com o objetivo de eliminar e/ou interromper o crescimento e desenvolvimento de células tumorais e foram utilizadas inicialmente na década de 1940, após a observação do efeito das mostardas nitrogenadas em tumores. Posteriormente, na década de 1960, Rosenberg *et al.* identificaram a cisplatina como agente antitumoral, juntamente com outras substâncias do grupo, como a carboplatina e a oxaliplatina [10]. As observações relativas aos compostos de platina foram um marco na quimioterapia, constituindo um grupo de antitumorais usados até hoje nos tratamentos convencionais de vários tumores [10, 11].

No entanto, os quimioterápicos convencionais têm vários problemas que contribuem para trazer complicações à terapia do câncer, em relação à eficácia e segurança [13]. Esses fármacos apresentam alta toxicidade sistêmica, pois não têm ação seletiva sobre células tumorais, podendo afetar as células normais. Além disso, eles possuem dificuldade de atingir o local do tumor, sendo necessária a administração de altas concentrações e dosagem, o que traz aos pacientes vários efeitos colaterais, diminuindo a adesão ao tratamento [14].

Além disso, a múltipla resistência de tumores aos quimioterápicos é também um grande desafio para a terapia do câncer, pois causa a superexpressão de transportadores de efluxo celular e mudanças na cinética dos fármacos, favorecendo a progressão do tumor e os processos de metástase [4].

Assim, a busca por novos tratamentos, mais eficazes e mais seguros, se torna de extrema importância para avanços no tratamento do câncer [8], seja pelo uso de novas moléculas com potencial terapêutico ou pelo desenvolvimento de sistemas inteligentes com os fármacos já utilizados na terapêutica, como os complexos de ródio(II) e as antraciclinas [15,16, 17].

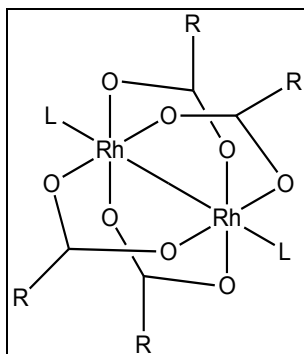
1.3. Complexos de ródio e o citrato de ródio(II)

Desde a descoberta da atividade antineoplásica da cisplatina, ou seja, na década de 1960, vários complexos metálicos passaram a ser testados quanto à atividade antitumoral [18]. Compostos de platina e de outros metais demonstraram ser eficazes contra tumores em humanos e em ratos, como, por exemplo, compostos de rutênio conseguiram interromper o crescimento e combater tumores micrometastáticos [19].

Na busca por substâncias mais eficazes e menos tóxicas para o tratamento do câncer, os complexos de ródio(II), que são compostos químicos com propriedades carcinostáticas, mostraram-se promissores para o tratamento de diversos tumores, devido à suas propriedades químicas e atividade nos sistemas biológicos [20]. Seu mecanismo de ação está relacionado à coordenação com as adeninas presentes no RNA ou DNA polimerase, sendo substâncias que não agem diretamente no DNA como a cisplatina e seus derivados, além de possuírem alta toxicidade [16,18].

Katsaros *et. al* descreveram os efeitos antitumorais de vários complexos de ródio(II) como, por exemplo, acetato, propionato e citrato de ródio(II) e demonstraram atividade contra carcinomas na cavidade oral e

tumores de *Erlich* [21]. A estrutura química geral dos carboxilatos de ródio(II), **Figura 3**, L representa a posição axial.



R= CH₃ (acetato), C₂H₅ (propionato), C₃H₇ (butirato) e C₆H₇O₇ (citrato).

Figura 3: Estrutura química geral dos carboxilatos de ródio(II) [20].

Dentre os complexos de ródio(II) citados, o citrato de ródio(II), é um dos carboxilatos mais promissores para o tratamento de tumores. Porém, sua alta hidrossolubilidade é uma desvantagem para o seu uso, uma vez que torna a biodisponibilidade da molécula muito baixa após sua administração, sendo necessária a utilização de doses elevadas para atingir o efeito terapêutico desejado, **Figura 4** [16].

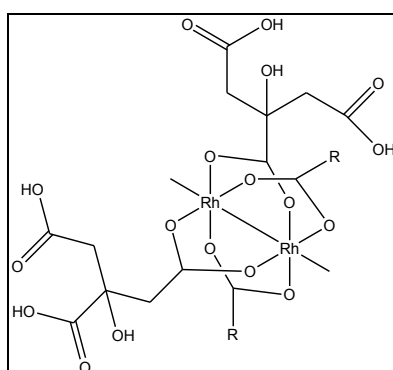


Figura 4: Estrutura química do citrato de ródio(II).

Assim, no estado da arte tem sido propostas alternativas para modificar as propriedades físico-químicas desses compostos com o intuito de melhorar a atividade biológica e diminuir a toxicidade, bem como o uso de nanopartículas de polímeros biodegradáveis [16] ou nanocarreadores magnéticos [22] que sirvam para o carregamento [23], vetorização e liberação [24] desses compostos [16, 23-26].

1.4. Daunorrubicina

A daunorrubicina (DNR), **Figura 5**, é uma molécula solúvel em água utilizada como agente quimioterápico, muito eficaz e utilizada clinicamente para o tratamento de diversos tumores sólidos e hematológicos. No entanto, o uso de daunorrubicina, como monoterapia ou em combinação com outros agentes, resulta em toxicidade cardio- e hematológica nos pacientes [17, 27].

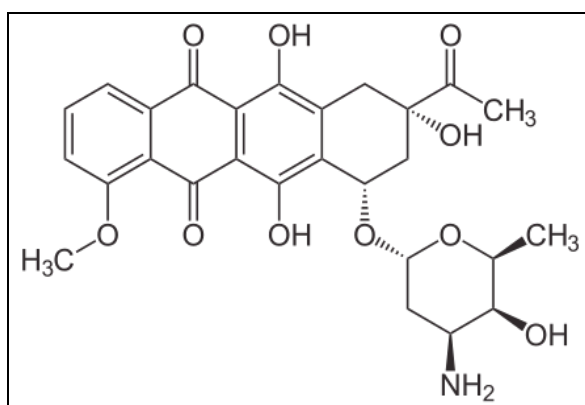


Figura 5: Estrutura química da daunorrubicina.

Sua ação terapêutica está relacionada à intercalação com as bases nitrogenadas no processo de replicação do DNA, correspondente à fase S do ciclo celular, **Figura 6**. Assim, a daunorrubicina não possui especificidade de ação, culminando em efeitos em células normais, o que leva a ocorrência de

efeitos colaterais inespecíficos [28]. Além disso, as antraciclinas têm sido descritas como substratos para a bomba de efluxo de celular, parte do processo responsável pela resistência das células a certos agentes quimioterápicos [27]. A múltipla resistência à fármacos, relacionada aos quimioterápicos, está ligada a cinco fatores principais: 1) à indução dos transportadores desses fármacos, como a glicoproteína-P; 2) aos reparos do DNA, que podem causar mudanças em substâncias metabolizadoras das drogas, como o citocromo P-450, diminuindo o tempo de ação desses fármacos no meio intracelular; 3) às mudanças relacionadas ao metabolismo dessas drogas; 4) à amplificação genética ou à mutações em proteínas alvo-específicas, como a proteína BCRP no câncer de mama e 5) às mudanças nos mecanismos de apoptose. Esses fatores podem agir de forma sinérgica, dificultando a ação do fármaco quimioterápico [4].

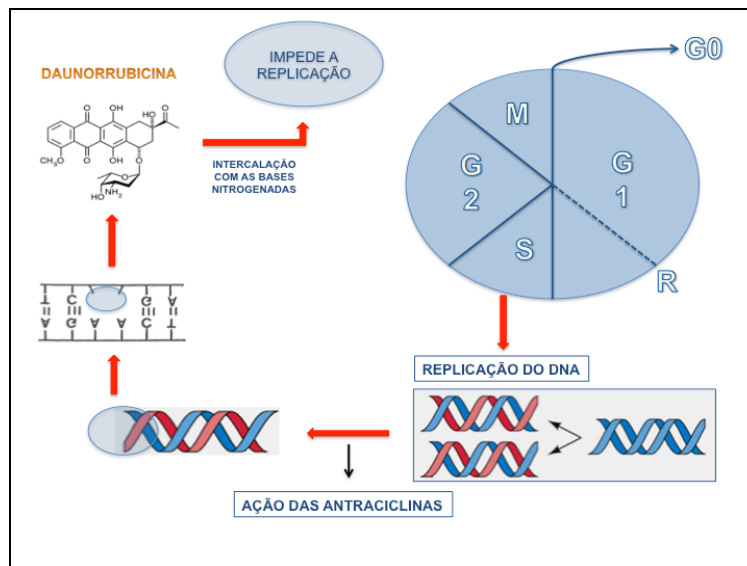


Figura 6: Esquema de etapas do ciclo celular, destacando o mecanismo de ação das antraciclinas[29]. *G0, G1 e G2= gap 0, 1 e 2; S= síntese do DNA; M= fase mitótica; R= regulação.

Algumas alternativas têm sido propostas para contornar os problemas de resistência causados pela daunorrubicina. A primeira estratégia é a síntese de novos derivados que são melhor absorvidos pelas células e, conseqüentemente, têm menos toxicidade sistêmica [30]. Em segundo lugar, o desenvolvimento de nanossistemas loco-específicos representa uma alternativa para aumentar a seletividade desse fármaco aos tumores. Um exemplo desses sistemas é o uso de nanopartículas magnéticas e polímeros biodegradáveis que possam ser guiados por um campo magnético externo localizado próximo à área do tumor sólido [31-33].

1.5. A nanotecnologia e os carreadores magnéticos de fármacos

A nanotecnologia é uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar, uma vez que pode ser usada em diferentes tipos de materiais, tais como: polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos, biomateriais e materiais magnéticos, estruturados em escala nanométrica [34-38].

Os desafios desta área consistem na síntese controlada destas estruturas nanométricas e subsequente arranjo para formar os materiais nanoestruturados para as mais diversas aplicações [34].

A redução de tamanho para dimensões em nanoescala faz com que apareçam novos fenômenos que não aparecem em macroescala. Partículas com dimensões nanométricas (na faixa de 1 a 1000 nm) apresentam propriedades químicas e físicas diferentes das propriedades de volume (macroscópicas) apresentadas pelos materiais de mesma composição. Na

escala manométrica, surgem novos fenômenos intrínsecos relacionados com as forças naturais fundamentais como gravidade, atrito e eletrostática, ganham nova conotação quando a escala é reduzida [34]. Propriedades físicas e químicas que surgem em nanoescala podem ser descritas por dois efeitos principais que surgem pela formação de nanoestruturas: efeitos de tamanho e efeitos relacionados à área superficial, respectivamente [34]. Os efeitos de tamanho são descritos pelos efeitos quânticos que interferem quando a escala é reduzida, a estrutura eletrônica normal é substituída por uma série de níveis eletrônicos discretos. Com relação às propriedades magnéticas, na nanoescala as partículas magnéticas possuem um único domínio magnético, denominados monodomínios. O comportamento magnético apresentado por essas partículas denomina-se superparamagnetismo, que se caracteriza pela ausência de magnetização remanescente quando o campo magnético é retirado e encontra aplicações em diversos campos da ciência e da tecnologia [34].

Na área de fármacos e medicamentos, a nanotecnologia tem contribuído muito para o avanço da farmacologia, levando ao desenvolvimento de sistemas mais eficazes e mais seguros para os pacientes, visando a obtenção de dispositivos capazes de controlar a liberação de substâncias no organismo, modificando a entrega do fármaco para locais específicos e aumentando a eficácia do tratamento [39].

Dentre os materiais utilizados para a obtenção desses dispositivos estão as nanopartículas magnéticas, que têm atraído muita atenção de pesquisadores pela possibilidade de seu uso amplo em áreas como medicina

diagnóstica, ferrofluidos, catálise, liberação de fármacos, tratamento de câncer, hipertermia e pigmentos [40]. Aplicações biomédicas mostram que nanopartículas magnéticas podem atuar simultaneamente como agentes de diagnóstico em imagem molecular e como transportadores de fármacos e também podem ser empregados no tratamento por hipertermia que provoca a morte de células cancerígenas por aquecimento local a partir de um campo magnético alternado [41]. O uso clínico de algumas formulações com nanopartículas já são aprovadas como agentes de contraste em ressonância magnética, como por exemplo, o agente de contraste para fígado Resovist-Ferucarbotran[®], composto por nanopartículas de óxidos de ferro [42].

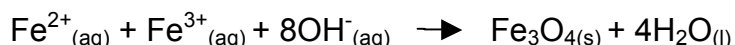
A busca por novas terapias para o câncer tem feito com que evolua o desenvolvimento de biomateriais magneticamente vetorizados, nos quais um campo magnético externo variável é usado para direcionar materiais magnéticos carreadores de fármacos antitumorais para locais onde estão tumores sólidos, com o objetivo de liberar o fármaco localmente [31, 43].

Assim, é importante determinar as propriedades magnéticas dessas nanopartículas para aplicação biológica. Segundo dados da literatura, nanopartículas magnéticas para uso biológico devem apresentar comportamento superparamagnético quando em contato com um campo magnético externo porque não exibem remanescência ou coercividade por causa da presença de monodomínios [44]. Segundo o FDA, nanopartículas magnéticas usadas em meios biológicos devem apresentar esse comportamento magnético na presença de um campo de intensidade magnética de até oito teslas [31, 44].

Os materiais magnéticos podem ser constituídos de diversos tipos de metais, apresentando diferentes tipos de propriedades magnéticas, podendo ser utilizados para diversas aplicações. Porém, materiais magnéticos constituídos de alguns metais, como cromo e cobalto, são altamente tóxicos e não adequados para serem usados em sistemas biológicos [34]. Por outro lado, outros metais, como ferro, níquel e zinco, produzem partículas magnéticas compatíveis com os sistemas biológicos. Óxidos de ferro, como a magnetita e a maghemita, são utilizados em exames de imagem por ressonância magnética, contribuindo, assim, para o diagnóstico de diversas doenças [34].

A magnetita, óxido de ferro de fórmula Fe_3O_4 , é um mineral que apresenta propriedades ferrimagnéticas, possuindo magnetização espontânea à temperatura ambiente. Os materiais ferrimagnéticos exibem domínios saturados magneticamente e exibem saturação magnética e histerese. Essa magnetização espontânea desaparece acima de uma temperatura T_c , chamada de temperatura de Curie e, acima desta temperatura, se tornam materiais paramagnéticos [45]. Os átomos, em sua estrutura, se organizam em forma de espinélio, onde estão presentes átomos de ferro(II) e ferro(III). A maghemita, óxido de fórmula $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, é um produto da oxidação da magnetita. Sua estrutura química é semelhante à da magnetita, mas apresenta somente átomos de ferro com estado de oxidação III, portanto, são os óxidos de ferro mais usados em sistemas biológicos devido à sua baixa toxicidade [31].

A síntese de partículas magnéticas pode ser feita por vários métodos, como, por exemplo, por condensação de vapor químico (método CVC), por decomposição térmica e por co-precipitação, dentre outros. No método de co-precipitação ocorre a precipitação de óxidos de ferro(II) e ferro(III) em solução aquosa, conforme a reação [34]:



Uma das aplicações dos materiais magnéticos na liberação controlada de fármacos é o seu uso como carreadores, na qual a partícula magnética permite a condução, acumulação e liberação de substâncias bioativas em regiões específicas do organismo humano [25].

Porém, para evitar rejeição e processos oxidativos dos materiais magnéticos nos sistemas biológicos, é necessário isolá-los através de recobrimento ou inserção em matrizes biologicamente compatíveis. Exemplos dessas matrizes são os polímeros biodegradáveis, como alguns poliésteres [46-49].

Muitas partículas utilizadas nos sistemas biológicos são feitas de óxidos de ferro, pois esses óxidos permitem a formação de diversos complexos com propriedades magnéticas, e essas propriedades que podem ser controladas de acordo com a aplicação do material obtido [36, 37, 46, 50].

Exemplos de óxidos de ferro que possuem propriedades magnéticas são chamados de ferritas. Como exemplo pode ser citada a ferrita de Ni-Zn, que são materiais cerâmicos, contendo isomorficamente em sua estrutura certa porcentagem de átomos de níquel e zinco, que auxiliam no controle de suas propriedades magnéticas [51]. Sua síntese pode ser feita através dos

óxidos dos metais e sua fórmula geral é representada por $Zn_xNi_{1-x}Fe_2O_4$ [25]. Outro tipo de ferrita é formada por óxidos de ferro(II) e ferro(III), que pode ser utilizada como carreador magnético de fármacos [25].

Assim, como os materiais magnéticos nanoparticulados associados a matrizes biologicamente compatíveis, como polímeros e cerâmicas, oferecem a possibilidade de tratamentos direcionados a locais específicos do corpo, são interessantes alternativas para o tratamento anticâncer, pois permitem maior eficácia e segurança ao paciente [46].

1.6. Polímeros Biodegradáveis

Os polímeros biodegradáveis tem ampla utilização no desenvolvimento de dispositivos terapêuticos inovadores, tais como próteses temporárias, estruturas com poros tridimensionais como andaimes para medicina regenerativa e como veículos para o desenvolvimento de dispositivos de liberação controlada de fármacos em escala nanométrica [52].

Vários tipos de polímeros biodegradáveis têm mostrado ser alternativas para o desenvolvimento desses dispositivos, incluindo os de origem natural e os biopolímeros sintéticos. Os biopolímeros naturais mais abundantes no planeta são os polissacarídeos de origem vegetal, que têm como exemplos o amido e os alginatos [53].

Além dos biopolímeros naturais, existem outros exemplos de polímeros biodegradáveis, que incluem poliamidas, polihidroxicanoatos, polialquilcianoacrilatos, poliuretanos, poliacrilamidas, policaprolactonas, poliortoésteres e alguns poliésteres [54].

Enquanto os usos dos polímeros naturais degradáveis por enzimas, como o colágeno, datam de milhares de anos atrás, as aplicações dos polímeros biodegradáveis sintéticos começaram somente na segunda metade da década de 1960 e, ainda hoje, são extensivamente utilizados em várias áreas [55].

Dentre os sintéticos, podem ser citados os poliésteres, que são polímeros que contêm em seus esqueletos ligações alifáticas do tipo éster que podem ser clivadas por hidrólise [55]. Os poliésteres mais utilizados na área farmacêutica são o ácido poli- ácido lático (PLA), o poli- ácido glicólico (PGA) e os copolímeros de ambos, os poli- ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA) [56], **Figura 7**.

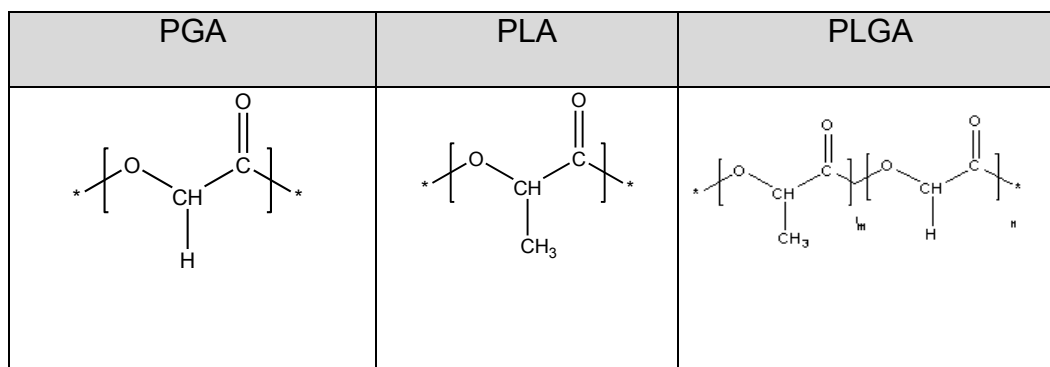


Figura 7: Representação estrutural dos monômeros do PLA, PGA e PLGA, respectivamente [56].

O poli-ácido glicólico pode ser considerado o primeiro polímero biodegradável utilizado na área biomédica. É altamente cristalino, apresenta entre 45 e 55 % de cristalinidade possui baixa solubilidade em solventes orgânicos e transição vítrea entre 35 e 40 °C. Este polímero é muito utilizado na obtenção de moldes e foi o primeiro polímero a ser utilizado em suturas reabsorvíveis [54].

O poli-ácido lático é uma molécula quiral e existe em duas formas opticamente ativas. A polimerização desses monômeros leva à obtenção de uma estrutura polimérica semicristalina, entretanto, a polimerização do (D,L)-lático e mesolático leva à obtenção de polímeros amorfos [57]. Esse possui cristalinidade em torno de 37 %, transição vítrea entre 60 e 65 °C e temperatura de fusão de aproximadamente 175 °C. Muito utilizado para a fabricação de dispositivos ortopédicos e para sistemas de liberação controlada de fármacos [57].

O poli-ácido (lático-co-glicólico) (PLGA) é um copolímero composto de monômeros de poli-ácido-lático e poli-ácido-glicólico, podendo conter diferentes proporções de cada um desses polímeros, de acordo com o tempo de degradação que se deseja. A temperatura de transição vítrea depende da proporção de cada polímero constituinte **Tabela 1** [58].

Tabela 1: Temperatura de transição vítrea dos diferentes tipos de copolímeros, considerando diferentes proporções de D, L-PLA, PGA [57].

Relação entre monômeros PLA/PGA	Temperatura de transição vítrea (°C)
50/50	45-50
75/25	60
85/15	45

A biodegradação desses polímeros ocorre por erosão, através de hidrólise das ligações éster. A taxa de degradação depende de vários parâmetros, incluindo a proporção PLA/PGA, a massa molar média molecular, a forma e a estrutura da matriz polimérica [56]. Os produtos de degradação do PLGA são os ácidos lático e glicólico, que se transformam, posteriormente, no ciclo de Krebs, em CO₂ e água, reação representada na **Figura 8**.

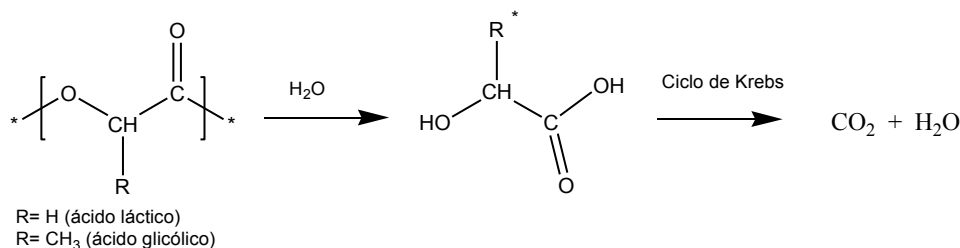


Figura 8: Representação da reação de hidrólise do PLGA, mostrando os produtos de degradação [59].

1.7. Sistemas de Liberação Controlada

Conceitualmente, existem dois tipos gerais de sistemas de liberação, de acordo com a disposição da substância na matriz polimérica, chamados de sistema reservatório e sistema matricial [60], **Figura 9**.

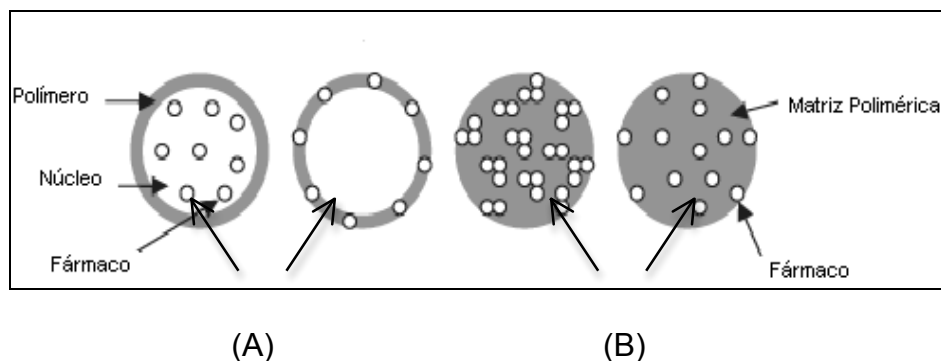


Figura 9: Ilustração dos sistemas poliméricos de liberação de fármacos, em forma de microcápsulas (A) e microesferas (B).

O sistema reservatório, representado por (A), é caracterizado por um envoltório polimérico que cobre o interior onde se encontra o fármaco ou substância que será liberada. Por outro lado, o sistema matricial (B), é caracterizado por uma esfera polimérica maciça na qual se encontra partículas do fármaco distribuídas por toda a sua extensão. À medida que a

matriz polimérica sofre degradação, por meio de erosão e clivagem da cadeia polimérica por hidrólise, a substância ativa será liberada no organismo [61].

A liberação controlada implica na associação, química ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, quando administrados *in vivo*, tenham a capacidade de controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação/entrega do fármaco a partir desse mesmo sistema, e/ou conduzir o fármaco até ao sítio específico em que este deve atuar [60]. A liberação da substância ativa gradualmente no organismo caracteriza o chamado sistema de liberação controlada de fármacos, que se diferencia dos tratamentos terapêuticos convencionais, tornando-se uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novos produtos mais eficazes e com menor número de efeitos colaterais. Além disso, esses sistemas podem reduzir o número de administrações feitas pelo paciente e aumenta a adesão ao tratamento [62].

A **Figura 10** representa duas formas de liberação de fármacos, a liberação convencional e a controlada. A obtenção do efeito terapêutico permanece por um longo período de tempo (B) quando comparado às concentrações obtidas por múltiplas aplicações no tratamento convencional (A) [55].

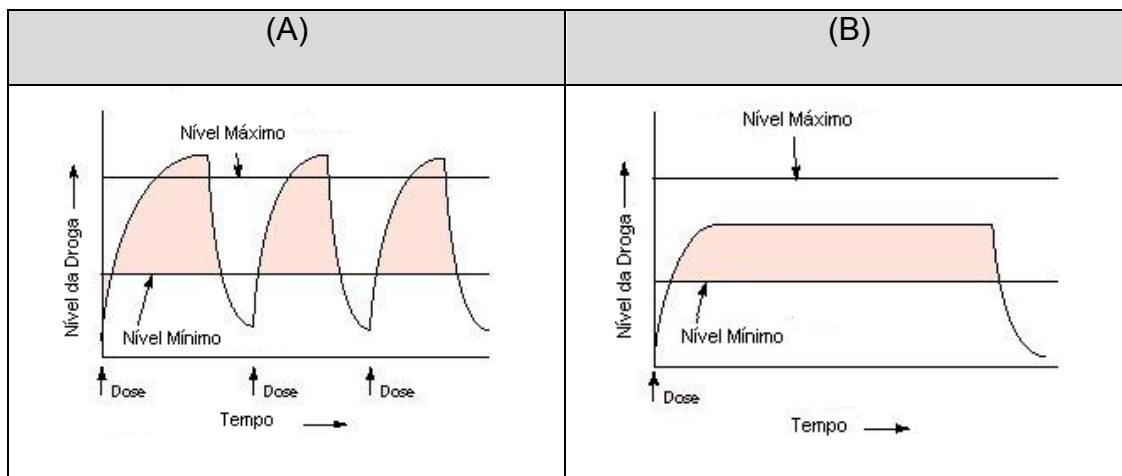


Figura 10: Curvas de concentração plasmática após ingestão de doses terapêuticas: (A) liberação convencional; (B) liberação controlada.

Para o PLGA, vários fatores podem alterar o perfil de liberação dos fármacos contidos na matriz polimérica, como o coeficiente de partição, amorficidade/cristalinidade e a massa molar média do polímero. Além disso, a liberação do fármaco pode ocorrer de dois modos: (a) por difusão do fármaco através da matriz e (b) pela degradação da matriz [63].

Em muitos casos, os dois mecanismos citados ocorrem simultaneamente. No primeiro caso, a hidratação do dispositivo dentro do organismo faz com que o fármaco se difunda ao longo da matriz polimérica e seja liberado. No segundo, a biodegradação da matriz polimérica desfaz as interações existentes entre o polímero e o fármaco e então a droga é liberada no organismo [63].

O presente trabalho propôs o desenvolvimento de nanossistemas de liberação controlada de citrato de ródio(II) e de daunorrubicina através do uso de nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro e do polímero PLGA. Esses nanomateriais foram caracterizados por diversas técnicas físico-químicas, que avaliaram a interação entre os componentes da matriz e o fármaco. Além

disso, foram feitos estudos biológicos para avaliar a eficácia desses sistemas em modelos *in vitro* e em modelo murino *in vivo*, onde foram avaliadas a citotoxicidade e a ação deles no processo de angiogênese inflamatória, pelo método de implante de esponja. Este modelo é muito importante para uma melhor compreensão das etapas iniciais do início do câncer [64].

A estreita ligação entre a inflamação e a angiogênese é reconhecido pelo direcionamento da resposta inflamatória, que tem a interação entre as células malignas e progressão do câncer. Também foram feitos doseamentos de citocinas e fatores de crescimento envolvidos nesses processos de angiogênese [64].

O Capítulo 1 abordou uma introdução geral sobre câncer, fármacos antitumorais, materiais magnéticos, polímeros biodegradáveis e suas aplicações no tratamento do câncer. O Capítulo 2 mostrou a proposta e objetivos deste trabalho e no Capítulo 3 foram descritos os procedimentos experimentais do trabalho.

O Capítulo 4 mostrou os resultados físico-químicos obtidos para as nanopartículas sintetizadas, bem como as propriedades magnéticas das mesmas. No Capítulo 5 foram apresentados e discutidos os resultados obtidos, desde a síntese do citrato de ródio(II) até a obtenção de nanossistema utilizando esse complexo, assim como os testes *in vitro* feitos.

No Capítulo 6 foram mostrados e discutidos detalhadamente os nanossistemas preparados com o cloridrato de daunorrubicina, os testes *in vitro* e *in vivo* feitos para avaliação de angiogênese, citocinas inflamatórias e fatores de desenvolvimento tumorais. O Capítulo 7 mostrou as conclusões

gerais, as próximas etapas do trabalho (item 8) e as referências bibliográficas foram enumeradas no Capítulo 9.

Capítulo 2: Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

- A) Desenvolver nanossistemas para o controle da liberação de citrato de rádio(II) e cloridrato de daunorrubicina, utilizando polímeros biodegradáveis como matrizes e ferritas como carreadores magnéticos.
- B) Estudar os nanossistemas preparados em modelos celulares tumorais *in vitro* e avaliação do efeito antitumoral no processo de angiogênese e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar nanossistemas de liberação controlada de citrato de rádio(II) e cloridrato de daunorrubicina, com base em matrizes poliméricas biodegradáveis (PLGA);
- Preparar ferrita de óxidos de ferro nanoparticuladas por co-precipitação e caracterizá-la por difração de raios X de pó e espectroscopia Mössbauer;
- Preparar nanossistemas de liberação controlada magneticamente dirigidos de citrato de rádio(II) e cloridrato de daunorrubicina utilizando ferrita nanoparticulada como carreadores magnéticos;
- Caracterizar os nanossistemas de liberação controlada contendo citrato de rádio(II) e cloridrato de daunorrubicina, utilizando as técnicas de análise elementar, espalhamento de luz dinâmico, microscopia

eletrônica de varredura, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, análise térmica, medidas magnéticas e levantamento do perfil cinético de liberação;

- Estudar a viabilidade celular in vitro dos nanossistemas contendo citrato de ródio(II) e cloridrato de daunorrubicina pelo método colorimétrico de MTT, utilizando as linhagens celulares de Caco-2, A-431 e fibroblastos;
- Executar estudos biológicos in vivo do nanossistema com cloridrato de daunorrubicina em modelo de angiogênese para avaliação da neovascularização através da dosagem de hemoglobina, dosagem de citocinas inflamatórias, NAG e MPO, fator de crescimento (VEGF) e fator de necrose tumoral (TNF- α);

Capítulo 3: Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Principais reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho, **Tabela**

2. Todos os reagentes foram de grau analítico e usados sem nenhum tratamento posterior.

Tabela 2: Principais reagentes utilizados.

Reagente	Procedência/Lote	Propriedades Físico-Químicas
Cloreto de ferro(II) FeCl ₂ .4H ₂ O	Fabricante: Merck CAS-Nº: 13478-10-9	Sólido esverdeado, tetrahidratado. Massa molar: 198,83 g.mol ⁻¹ Solubilidade em H ₂ O: 685 g.L ⁻¹ Ponto de Fusão: 674 °C
Cloreto de ferro(III) FeCl ₃ . 6H ₂ O	Fabricante: Synth C1048.01.AH/ 79327	Sólido vermelho-púrpura, hexahidratado. Massa molar: 270,30 g.mol ⁻¹ Solubilidade em H ₂ O: 9,20 g.L ⁻¹ Ponto de fusão: 37 °C
Tri-Cloreto de ródio(III) - RhCl ₃ . 3H ₂ O, 38-40 % de Rh	Fabricante: Sigma-Aldrich Lote: 206261	Sólido vermelho-escuro, higroscópico. Massa molar: 209,26 g.mol ⁻¹ Solubilidade em H ₂ O: Insolúvel Ponto de Fusão: 450 °C
Cloridrato de daunorrubicina	Fabricante: Tecoland Lote: 20130708	Sólido vermelho, higroscópico. Massa molar: 563,99 g.mol ⁻¹ Solubilidade em H ₂ O: 39,2 mg.L ⁻¹ Ponto de fusão: 208 °C
Citrato de sódio	Fabricante: Sigma-Aldrich Código/Lote: 26125/ SZBB0110V	Sólido branco Massa molar: 258,06 g.mol ⁻¹ Solubilidade em H ₂ O: 425 g.L ⁻¹ Ponto de fusão: 300 °C
Álcool Polivinílico (PVA)	Fabricante: Sigma-Aldrich Lote: 1141-13MC/ EUA	Sólido branco PF: 200 °C
PLGA	Fabricante: Lactel Lote: D01093/ EUA	Sólido translúcido amarelado; Proporção PLA/PGA: 50/50 Viscosidade: 0,82 dL.g ⁻¹
Diclorometano	Fabricante: Carlo Erba Lote: 463311/ Brasil	Líquido incolor; Volátil.
Acetato de Sódio	Fabricante: Merck Lote: 935767203	Sólido branco, inodoro.
Hidróxido de sódio	Fabricante: Vetec Código/ Lote: 101/ 047313	Sólido branco (pastilhas); higroscópico.

3.2. Equipamentos

A) Análise elementar (CHN)

A análise de CHN foi realizada em equipamento Perkin Elmer[®], modelo CHN 2400 pertencente ao DQ-UFMG.

B) Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na região de 4000-400 cm^{-1} , utilizando brometo de potássio (KBr) como diluente para a confecção das pastilhas e registrados em espectrofotômetro FT-IR Mattson[®], modelo Galaxy 3000 e espectrofotômetro Perkin Elmer[®], modelo 283B, ambos pertencentes ao DQ-UFMG.

C) Termogravimetria (TG), termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA)

As curvas TG/DTG foram obtidas em um aparelho TA Instruments[®], modelo SDT-Q600, equipado com uma termobalança, sob atmosfera dinâmica de N_2 , com vazão de aproximadamente 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando cadinhos de alumina e taxa de aquecimento 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de 25-1000 $^{\circ}\text{C}$. Cerca de 5 mg foram utilizados para a realização de cada análise.

As curvas de DTA também foram obtidas no equipamento TA Instruments[®], modelo SDT-Q600, sob atmosfera dinâmica de N_2 , com vazão de aproximadamente 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando cadinho de alumina, razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa 25-1000 $^{\circ}\text{C}$. Cerca de 5 miligramas

foram utilizados para a realização de cada análise. O equipamento pertence ao LEMB/ DQ-UFMG.

E) Difractometria de raios X em pó (DRX)

Os difratogramas das amostras foram obtidos em um aparelho Rigaku®, modelo Geigerflex 2037, utilizando tubo de cobalto e radiação $\text{CoK}_\alpha=1,79026$, na faixa de $4-60^\circ 2\theta$ e velocidade de varredura $4^\circ 2\theta.\text{min}^{-1}$.

As amostras finamente pulverizadas foram colocadas diretamente sobre uma placa de vidro, sem tratamento prévio. A análise dos difratogramas determinaram a intensidade relativa dos principais picos (I/I_0), bem como as distâncias interplanares (d) - distância entre camadas atômicas em um monocristal (n) - calculadas a partir da lei de Bragg. A equação utilizada foi - $nK_\alpha = 2d\text{sen}\theta$. $K_\alpha = 1,79026 \text{ \AA}$ e θ são os ângulos de incidência dos raios X. O equipamento pertence ao DQ-UFMG.

F) Liofilização

Todas as amostras preparadas para caracterização físico-química no estado sólido e ensaios biológicos foram liofilizadas em um aparelho Thermo Savant®, modelo ModulyOD. O tempo de liofilização dependeu do volume de água contido em cada amostra. O equipamento pertence ao LEMB/DQ/UFMG.

G) Sonicador

As microesferas foram preparadas utilizando ultrassom de ponteira Sonics[®], modelo Vibra-Cell e sonda CV-33. O equipamento pertence ao LEMB/DQ/UFMG.

H) Homogeneizador/dispersador

As amostras foram homogeneizadas durante a preparação dos nanossistemas em um equipamento IKA Labortechnik[®], modelo Dispergierstation T8-10, conectado a um estabilizador de 12 V Netzgerat[®], modelo T810. O equipamento pertence ao LEMB/DQ/UFMG.

I) Ultra-centrífuga

Os nanossistemas foram centrifugadas em equipamento Thermo Scientific[®], modelo Sorvall RC6+. O equipamento pertence ao LEMB/DQ/UFMG.

J) Água ultrapura por osmose reversa – sistema Milli-Q[®]

A água ultrapura utilizada foi coletada de um aparelho Millipore[®], modelo Simplicity 185. O equipamento pertence ao LEMB/ DQ-UFMG.

K) Manta aquecedora

A manta aquecedora utilizada na síntese do citrato de ródio(II) foi Fisatom[®], modelo 52M. O equipamento pertence ao LEMB/DQ/UFMG.

L) Microscópio eletrônico de varredura (MEV).

As micrografias de varredura foram feitas em dois microscópios, o primeiro um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM[®], modelo 6360 LV, usando corrente 4-10 Kv, e o segundo um microscópio FEG[®], modelo Quanta 200 FEI. As amostras diamagnéticas foram impregnadas em fita de carbono e metalizadas com 5 nm de ouro. As amostras magnéticas foram depositadas em placas de silício de 0,6 mm, após dispersão em etanol e ultrassonicação. Os equipamentos pertencem ao Centro de Microscopia da UFMG.

M) Microscópio de força atômica (MFA)

As micrografias utilizando a técnica de força atômica foram feitas em um microscópio Asylum Research[®], modelo MFP-3D-SA, com estilete Olympus[®] AC240TS, constante (k) entre 0,5-4,4 (N.m⁻²), 70 (kHz) de frequência de ressonância e ponteira com raio -9 ± 2 nm in “*tapping mode*”. Uma amostra de nanossistema foi dispersa em água, depositada em um suporte de mica e seca à temperatura ambiente por 24 horas. O equipamento pertence ao Centro de Microscopia da UFMG.

N) Microscópio eletrônico de transmissão (MET)

As micrografias de transmissão foram feitas em um microscópio Tecnai[®], modelo G2-12– Spirit Biotwin FEI-120 kV, usando corrente 60 kV. As amostras foram preparadas usando 3-mm de Forman (0,5 % de pó plástico em acetato) e colocadas em uma grade de cobre de 300 *mesh*. O aparelho pertence ao Centro de Microscopia da UFMG.

O) Espalhamento de luz dinâmico – Tamanho e Potencial zeta

As medidas de tamanho de partículas e potencial zeta das partículas foram obtidas em um equipamento Malvern®, modelo Zetasizer Nanoseries - Nano ZS. O equipamento pertence ao LEMB/DQ/UFMG.

P) Magnetômetro (VSM)

Medidas de magnetização de saturação (M_{sat} /intensidade do campo magnético) foram feitas para as ferrita de Ni-Zn e para as de óxidos de ferro em um magnetômetro *VSM (Vibrating Sample Magnetometer)*, a 25 °C, gentilmente cedido pelo Dr. José Domingos Ardisson, do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), da UFMG.

3.3 Métodos

3.3.1. Síntese da ferrita de Ni-Zn e ferrita de óxidos de ferro

As nanopartículas magnéticas utilizadas neste trabalho consistiram de 2 tipos de ferritas. A primeira ferrita foi preparada a partir de sais de níquel, zinco e ferro e a segunda foi preparada a partir de cloretos de ferro(II) e ferro(III). Ambas foram obtidas pelo método de co-precipitação hidrotérmica, amplamente descrito na literatura [25].

3.3.1.1 Preparo de ferrita de níquel/ zinco

Cerca de 25 mL de solução aquosa formada por $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, em proporções molares de 4:1:1, foram

misturados a 10 mL de solução de hidróxido de amônio 1 mol.L⁻¹, sob agitação contínua, durante 2 horas, numa temperatura entre 80-90 °C.

As nanopartículas de ferrita precipitaram durante o tempo de agitação, apresentando-se, inicialmente, como uma suspensão verde-escura e, após 2 horas, tornou-se marrom, cor característica da formação de óxidos de ferro. Essa suspensão obtida foi separada magneticamente com um super-ímã de neodímio (Nd₂Fe₁₄B) e lavada exaustivamente com água para retirar resíduos de materiais não-magnéticos e excesso de base até pH próximo da neutralidade e o material foi, em parte, seco em estufa a vácuo a 60 °C e o restante foi liofilizado. A fórmula geral dessa ferrita é Ni_(1-x)Zn_xFe₂O₄.

3.3.1.2 Preparo de ferrita de óxidos de ferro

Misturaram-se 50 mL de solução aquosa de FeCl₃.6H₂O e FeCl₂.4H₂O, em proporções molares de 1:1, com 10 mL de solução de hidróxido de amônio 1 mol.L⁻¹, sob agitação contínua, em temperatura de 80-90 °C, durante 2 horas. Ao final da reação foi obtida uma suspensão de cor marrom-escuro com características magnéticas, que foi lavada exaustivamente com água até pH próximo da neutralidade, medido com fita própria, em seguida o material foi liofilizado. A fórmula geral dessa ferrita é Fe_(x-1)O_x.

3.3.2. Preparação do citrato de ródio(II)

A preparação do citrato de ródio(II) foi feita pelo método de síntese por etapas previamente descrito na literatura [20]. A primeira etapa consistiu na obtenção do acetato de ródio(II) a partir do cloreto de ródio(II) e de acetato de sódio. Cerca de 1,00 g (3,8 mmol) de RhCl₃.3H₂O foi dissolvido em 100 mL

de etanol absoluto e 1,25 g (15,2 mmol) de acetato de sódio dissolvidos em ácido acético glacial (10 mL). As duas soluções foram misturadas e mantidas sob refluxo durante 30-60 minutos numa temperatura de 70-75 °C, em atmosfera de N₂. O sólido verde-escuro formado foi filtrado a quente em funil de placa sinterizada. O filtrado foi refluxado em 200 mL de metanol por três horas. Após este refluxo, a solução foi filtrada novamente a quente, em papel de filtro e concentrada em banho-maria até que o volume fosse reduzido pela metade. Resfriou-se à temperatura ambiente e levou-se ao congelador por cerca de 72 horas. Os cristais verde-escuros formados foram filtrados e lavados com duas porções de 10 mL de metanol gelado. O sólido obtido foi secado em dessecador, sob vácuo e cloreto de cálcio anidro. Os cristais verde-escuros foram recolhidos, triturados e, ao final, foi obtido um sólido verde-claro, caracterizado como acetato de ródio(II).

Posteriormente, pesou-se 3,4 g (16 mmol) de ácido cítrico triidratado e 0,44 g (1 mmol) de acetato de ródio(II) anidro. Os sólidos foram triturados até homogeneidade. A mistura foi mantida sob fluxo de nitrogênio em banho-maria de silicone a 150 °C, durante 2 horas. O produto da reação foi obtido na forma de uma pasta de cor verde. Em seguida, a mistura foi resfriada em dessecador contendo cloreto de cálcio anidro. O resíduo foi purificado através de 5 extrações de 15 mL cada usando 2,2 di-metóxiopropano sob refluxo, à 120 °C, durante 30 minutos. Posteriormente o resíduo foi mantido a 120 °C, sob fluxo de nitrogênio por 2 horas, filtrado e recolhido em vidro de relógio, onde foi colocado em dessecador e utilizado posteriormente para análise de

pureza e demais experimentos. Este sólido foi identificado como citrato de ródio(II) [20].

3.3.3. Preparação de nanossistemas de PLGA, citrato de ródio(II) e ferrita de Ni-Zn ou ferrita de óxidos de ferro/ ou nanossistemas de daunorrubicina, PLGA e ferrita de óxidos de ferro

A metodologia de emulsão múltipla foi utilizada para preparar os nanossistemas desse trabalho e as preparações foram realizadas à temperatura ambiente [57, 65, 66]. Por outro lado, muitas variáveis podem influenciar o diâmetro das partículas por esse método, dentre elas a massa molar e viscosidade do polímero, relação entre o volume da fase aquosa interna e fase orgânica, concentração de tensoativo na fase aquosa externa e velocidade de agitação/sonicação durante a obtenção das emulsões [67].

O nanossistema de PLGA, citrato de ródio(II) e nanopartículas magnéticas e os nanossistemas com daunorrubicina foram preparados pelo método de emulsificação com evaporação de solvente, adaptado da literatura [16]. Inicialmente, 100 mg de PLGA foram dissolvidos em 2 mL de diclorometano, 20 mg de citrato de ródio(II) foram dissolvidos em 1 mL de água e 5 mg de ferrita de Ni-Zn ou ferrita de óxidos de ferro dispersados no mesmo volume de água. Os dois sistemas foram misturados e submetidos ao processo de sonicação, em uma sonda de ponteira, a 30 % de amplitude, por 2 minutos. A emulsão formada foi adicionada sobre 50 mL de solução aquosa

de álcool polivinílico (PVA) a 1 % p/v. O sistema formado foi agitado por 5 minutos em um dispersador, mantido sob agitação magnética durante 2 horas a 25 °C, para evaporação do diclorometano. Em seguida, a suspensão foi centrifugada, a 20.000 rpm, por 10 minutos. O nanossistema foi lavado 3 vezes para a retirada do excesso de PVA e liofilizado. Foi determinado o teor de encapsulamento do citrato de ródio(II) a partir do nanossistema preparado por espectroscopia na região UV em 450 nm e o valor encontrado foi de 20 %. Esse mesmo procedimento foi usado para a preparação de nanossistema de PLGA com daunorrubicina e ferrita de óxidos de ferro, sendo que o teor de encapsulamento da daunorrubicina foi calculado por medidas de absorvância na região do UV-Vis, no comprimento de onda de 485 nm e o valor encontrado foi de 40 %.

3.3.4. Medidas de tamanho de partículas e potencial zeta

As medidas de tamanho de partículas dos nanossistemas preparados foram calculadas através das técnicas de microscopia de força atômica, transmissão e varredura, utilizando os equipamentos já citados anteriormente.

As medidas de potencial zeta foram realizadas dispersando 10 mg de amostra em 10 mL de água Milli-Q® e essa suspensão foi colocada sob agitação magnética a 5000 rpm durante 60 minutos. Após agitação, foi retirado 1 mL de suspensão de partículas e colocado diretamente na cubeta de medição de potencial zeta. Então, foram realizadas 11 medidas sequenciais com tempo de 30 segundos por medida, sendo as medidas de

potencial representadas pela média de 7 replicatas. Não foram utilizados agentes surfactantes para a realização dos testes e os experimentos foram feitos de acordo com adaptações de dados da literatura e com o manual do equipamento.

3.3.5. Medidas de magnetização de saturação

Medidas de magnetização de saturação (M_{sat} /intensidade do campo magnético) das amostras de ferrita de Ni-Zn pura, da ferrita de óxidos de ferro e do nanossistema com daunorrubicina foi feita a 25 °C (298 K), sob influência de um campo magnético variável na faixa de -15.000 a +15.000 Oe (-1,5/+1,5 tesla).

3.3.6. Perfil cinético de liberação do citrato de ródio(II) e daunorrubicina

O delineamento dos perfis cinéticos de liberação do citrato de ródio(II) e do cloridrato de daunorrubicina, a partir dos nanossistemas foram feitos usando cerca de 10,0 mg de cada amostra.

As amostras foram acondicionadas em tubos de plástico com tampa de rosca e foram acrescentados 1,5 mL de tampão fosfato pH=7,4 (PBS), transferidas para uma incubadora de bancada a 37 °C e mantidas sob agitação mecânica (40-50 rpm). Em intervalos de 1 hora foram coletadas alíquotas de 0,5 mL, completando o volume para 1,5 mL com PBS a 37 °C.

As alíquotas foram retiradas a cada 15 minutos na 1ª hora do experimento, de hora em hora nas 7 horas subsequentes e a cada 24 horas nas demais coletas até o final do experimento. As alíquotas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante recolhido para a

quantificação dos fármacos por UV-visível, usando os comprimentos de onda 220 nm e 580 nm, para quantificar o citrato de ródio(II) e 485 nm para a quantificação do cloridrato de daunorrubicina. As curvas de liberação (% cumulativa de fármaco liberado/ tempo) foram feitas e foram determinados os modelos cinéticos de cada substância. A análise estatística dos dados foi feita por ANOVA, utilizando $p < 0,05$ como intervalo de confiança.

3.3.7. Espectroscopia Mössbauer

As análises do estado de oxidação do ferro, bem como a estrutura cristalina presente na ferrita de óxidos de ferro, foi feitas em um aparelho equipado com transdutor e gerador de função CMTE[®], modelo MA250, utilizando uma fonte de Co^{57}/Rh , com atividade da ordem de 20 mCi, à temperatura de 25 °C e Fe^0 foi usado como padrão. Os experimentos de Mössbauer foram gentilmente feitos pelo Prof. José Domingos Fabris, responsável pelo equipamento do Departamento de Química da UFMG.

3.3.8. Testes biológicos *in vitro*

Os estudos de citotoxicidade *in vitro* dos materiais preparados foram feitos sob a supervisão da co-orientadora deste trabalho, Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés, do Departamento de Odontologia Restauradora da FO/UFMG, responsável pelo laboratório de cultura celular do LEMB-DQ/UFMG, foram feitos para verificar a efeito citotóxico dos nanossistemas com citrato de ródio(II) e cloridrato de daunorrubicina em modelos de células tumorais Caco-2 e A-431 e linhagem normal de fibroblastos.

3.3.8.1. Teste de citotoxicidade: Método MTT

O teste de MTT é um teste colorimétrico que avalia a atividade mitocondrial indireta através da atividade enzimática das redutases mitocondriais. Durante o teste acontece a reação representada na **Figura 11**.

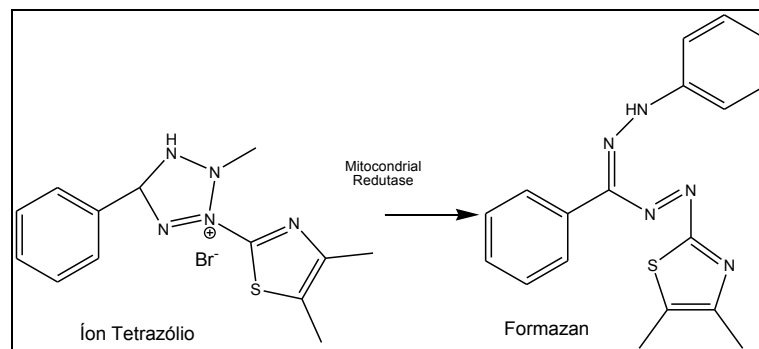


Figura 11: Reação de conversão do íon tetrazólio em formazan.

Os testes foram feitos em linhagens celulares tumorais, uma de carcinoma cólon-retal (Caco-2) (ATCC HTB-37) e outra de carcinoma epidermóide (A-431) (ATCC CRL-1555) e uma linhagem de células normais, os fibroblastos (ATCC CRL-2014). As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² até atingirem a confluência de cerca de 70 %. Após confluentes, as células foram transferidas para placas de 96 poços, numa concentração de 1×10^5 células/poço, seguindo as seguintes etapas:

- 1) Preparação do reagente: foi preparada uma solução estoque de MTT a 12 mM, adicionando 1 mL de solução de PBS estéril em um tubo contendo 5 mg e agitado em até que todo o sólido se solubilizasse. A solução de MTT foi protegida da luz até o momento do uso.

- 2) Preparação da solução detergente: foram adicionados 10 mL de solução de HCl 0,01 mol.L⁻¹ para cada tubo contendo 1 g de dodecilsulfato de sódio (SDS). Agitou-se até completa solubilização. O frasco foi deixado em repouso até que a espuma desaparecesse.
- 3) Incubação dos compostos: os materiais foram testados em concentrações pré-definidas, em sixplicata e colocados em contato com as células durante 48 horas;
- 4) Após a preparação dos reagentes, o meio de cultura das placas foi substituído por um meio de cultura fresco, sem vermelho de fenol e sem soro fetal bovino. Foram adicionados 10 µL de MTT em cada poço contendo as células e as placas foram incubadas a 37 °C durante 4 horas. Após este período, foram adicionados 100 µL de SDS em cada poço e as placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas. Então, seguiu-se para a leitura de absorbância por ultravioleta a 570 nm. Todos os grupos controle necessários foram feitos para o teste.

A análise estatística dos experimentos *in vitro* foram feitas utilizando o método ANOVA, utilizando intervalos de confiança de $p < 0,05$.

3.3.9. Experimentos *in vivo*

Os experimentos *in vivo* foram feitos com a colaboração da Profa. Dra. Sílvia Passos Andrade e Profa. Dra. Paula Peixoto Campos, responsáveis pelo Laboratório de Angiogênese e Laboratório de Apoptose do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB/UFMG). Estes experimentos avaliaram a ação do nanossistema com cloridrato de daunorrubicina nos processos de

angiogênese inflamatória, através dos doseamentos de citocinas produzidas por macrófagos e neutrófilos, NAG (N-acetil-glucosaminidase) e MPO (mieloperoxidase), assim como do fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator de crescimento epidermóide (VEGF), de acordo com metodologias previamente relatadas na literatura [68-70].

Os experimentos foram autorizados pelo Comitê de Experimental Animal Local da UFMG (CETEA-UFMG) sob o número de protocolo 267/2014 (23/10/2014). A cópia do protocolo está na sessão de Anexos.

3.3.9.1. Animais

Camundongos machos *Swiss* de 7-8 semanas (25-30 g de peso corporal) foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram alojados individualmente e equipados com ração granulada e água. O ciclo claro/escuro foi 12:12 h com luzes acesas às 7:00 da manhã e as luzes apagadas às 7:00 pm. Foram feitos esforços para evitar qualquer sofrimento desnecessário aos animais. Habitação, anestesia e cuidados pós-operatórios estiveram de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG).

3.3.9.2. Implantes

Esponjas de poliéter-poliuretano foram utilizadas como implantes, em forma de discos de 4 mm de espessura e 12 mm de diâmetro. Para esterilização, estes implantes foram colocados em álcool 70 % v/v durante 24 horas, seguido por fervura em água destilada durante 15 minutos antes da

cirurgia. Para o processo de implantação das esponjas, os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol, os pelos da região ventral foram raspados e a pele limpa com álcool a 70 %.

Os discos de esponja foram assepticamente colocados numa bolsa subcutânea, feita com fórceps arterial curva através de incisão ventral de 1 cm de comprimento. No pós-operatório, os animais foram monitorados para detectar quaisquer sinais de infecção no local da operação, desconforto ou sofrimento; animais que apresentaram algum destes sinais foram imediatamente sacrificados. Foram feitas adaptações nos experimentos para avaliação das partículas na presença de um campo magnético.

A **Figura 12** apresenta o desenho do experimento adaptado. Um campo magnético externo foi utilizado para avaliar a atração das nanopartículas e nanossistema para o local do implante e o seu efeito no processo de angiogênese. O campo magnético externo foi obtido pela fixação de um disco magnético de NdFeB no dorso de cada animal ($d = 5 \text{ mm}$, $h = 2 \text{ mm}$), utilizando uma fita adesiva, próximo ao local do implante. A adaptação da metodologia foi baseada em protocolos da OZ Biosciences® [71].

Após a implantação da esponja e magneto, a suspensão de nanopartículas, nanossistema ou a droga livre foram administradas aos animais por via intravenosa. A função do campo magnético externo foi atrair as partículas para o local do implante. Os discos de esponja foram removidos no 7º dia pós-implantação para a avaliação da inflamação pelo doseamento das atividades de MPO e NAG, de neovascularização, através do doseamento de

hemoglobina, fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator de crescimento de vasos (VEGF).

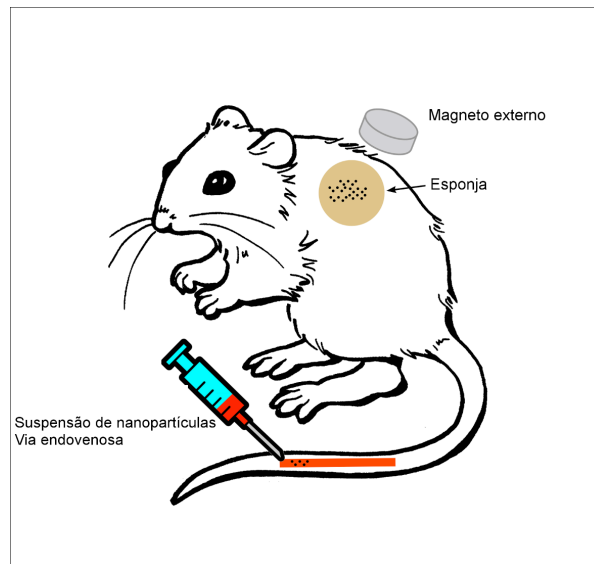


Figura 12: Esquema simplificado do experimento *in vivo* utilizando o modelo de angiogênese.

3.3.9.3. Quantificação da angiogênese pela dosagem de hemoglobina

A quantificação dos vasos formados foi avaliada pela dosagem de hemoglobina (Hb) detectada no tecido, utilizando o método de Drabkin [68, 69]. Em sete dias após a implantação, os animais foram sacrificados e cada esponja cuidadosamente removida e pesada. Cada fragmento foi homogeneizado em 5 mL de reagente de Drabkin e centrifugado a 12.000 g durante 20 min. Os sobrenadantes foram filtrados através de um filtro de 0,22 μm Millipore[®]. A concentração de hemoglobina nas amostras foi determinada por espectrofotometria, medindo a absorbância a 540 nm utilizando um leitor de placas de ELISA e comparada com uma curva padrão de hemoglobina. O teor de hemoglobina no implante foi expressa μg por mg de tecido molhado.

3.3.9.4. Extração de tecidos e determinação da atividade de MPO e NAG.

O número de neutrófilos na esponja foi medida por ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO), como descrito anteriormente [68, 69, 72, 73]. Os implantes foram pesados, homogeneizados em tampão de pH 4,7 (NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M, 0,015 M de NaEDTA), centrifugados a 12.000 g por 10 min. Os pellets foram ressuspensos em tampão Na₃PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) seguido por três ciclos de congelamento-descongelamento, utilizando nitrogênio líquido. A atividade de MPO em amostras de sobrenadante foi testada medindo a absorbância (densidade óptica - OD) em comprimento de onda de 450 nm, utilizando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,3 mM), seguida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ (4 M). Os resultados foram expressos como alteração na OD/ g de tecido úmido.

A infiltração de células mononucleares na esponja foi quantificada através da medição dos níveis da enzima lisossomal N-acetilglucosaminidase (NAG), presente em níveis elevados em macrófagos ativados [68, 69, 72, 73].

Os discos de esponja foram colocados em solução salina (NaCl 0,9 % p/v), contendo 0,1 % v/v de Triton[®] X-100 e centrifugados a 3.000 g por 10 min a 4 °C. Amostras de 100 µL dos sobrenadantes resultantes foram incubadas durante 10 min com 100 µL de *p*-nitro-fenil-N-acetil-beta-D-glucosamida, preparada em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M,

Na_2HPO_4 0,1 M; pH 4,5), de concentração final igual a 2,24 mM. Em seguida, foram adicionados 100 μL de tampão de glicina 0,2 M (pH 10,6). A hidrólise do substrato foi determinada por medição da absorbância a 400 nm. Os resultados foram expressos em nmol por mg de tecido molhado.

3.3.9.5. Dosagens de VEGF e TNF- α

Fragmentos de esponjas foram pesados e homogeneizados em PBS (1 mL por 100 mg de tecido) a pH 7,4 contendo 0,05 % de Tween[®] e centrifugado a 10.000 g durante 30 min. As citocinas VEGF e TNF- α , no sobrenadante, foram medidas em 50 μL , utilizando kits de imunoenensaio e seguindo os protocolos da R&D Systems, EUA. Resumidamente, diluições de sobrenadantes livres de células foram adicionadas em duplicata a placas de ELISA revestidas com um anticorpo monoclonal murino específico contra a citocina, seguido pela adição de um segundo anticorpo policlonal conjugado a peroxidase contra a citocina. Após lavagem para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, uma solução de substrato (50 μL de uma solução a 1:1 de peróxido de hidrogênio e 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ tetrametilbenzidina em DMSO) foi adicionada aos poços. Após 20 minutos de incubação foram adicionados 50 μL de ácido sulfúrico 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e a intensidade da cor foi avaliada por medidas de absorbância a 450 nm em um espectrofotômetro. Os padrões de avaliação utilizados foram de $0,5\cdot\log_{10}$ diluições de citocinas recombinantes de murinos, valores entre 7,5 e 1000 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos como pg de citocinas por mg de tecido úmido.

3.3.9.6. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. As comparações entre os grupos foram feitas utilizando-se análise de variância ANOVA, seguido de fator de correção Newman-Keuls para comparações múltiplas como um pós-teste e $p < 0,05$.

*Capítulo 4: Resultados e
discussão*

Estudo físico-químico das ferritas

4. Estudo físico-químico das ferritas

Dois tipos de ferritas foram preparados neste trabalho, ferrita de níquel e zinco e ferrita de óxidos de ferro . As nanopartículas magnéticas foram caracterizadas por técnicas físico-químicas de difração de raios X magnetização de saturação e espectroscopia Mössbauer e a ferrita que apresentou maior medida de magnetização foi escolhida como opção para prosseguir com os demais estudos.

4.1. Caracterização físico-química das ferritas

4.1.1. Ferrita de ferro, níquel e zinco

A ferrita de níquel/ zinco, utilizada na preparação do nanossistema com citrato de ródio(II), foi caracterizada por difração de raios X, medidas de magnetização e microscopia eletrônica de varredura.

Essas partículas foram preparadas usando o método descrito na literatura por Bocanegra-Diaz *et al* e a fórmula mínima dessa ferrita de Ni-Zn foi $\text{Fe}_2\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{O}_4$ [25]. Evidências experimentais sobre a composição das ferritas foram obtidas usando a técnica de difração de raios X.

4.1.1.1. Difração de raios X em pó

O difratograma da ferrita de Ni-Zn está representado pela **Figura 13**.

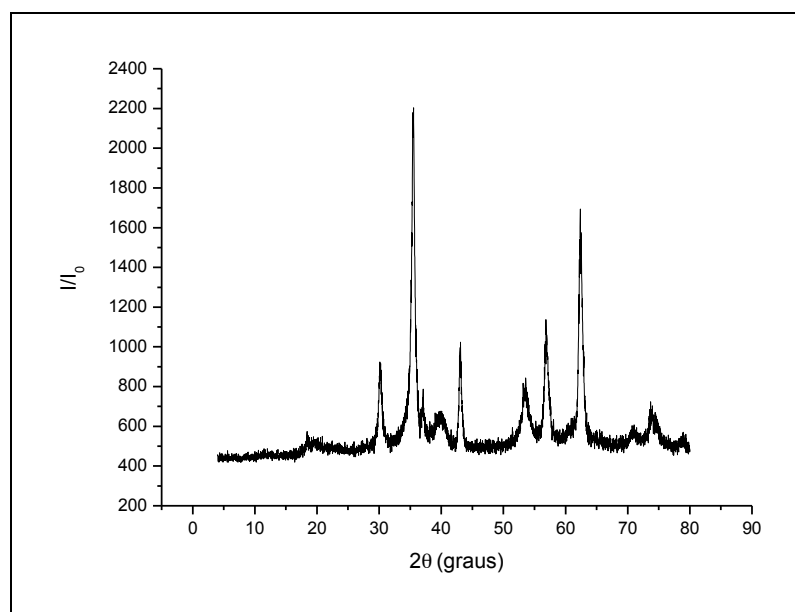


Figura 13: Difratograma da ferrita de Ni-Zn.

Os ângulos 2θ e os cálculos das intensidades relativas e distâncias interplanares da ferrita de Ni-Zn estão representados na **Tabela 3**. A seguir, serão discutidos o perfil de difração.

Tabela 3: Medidas dos ângulos de difração (2θ), intensidade relativa (I/I_0) e distâncias interplanares (d) para a ferrita de Ni-Zn.

2θ (°)	Intensidade Relativa (I/I_0)	d (Å)
30,14	40,91	2,96
35,00	100	2,56
43,08	45,45	2,10
53,18	36,36	1,72
57,04	50,00	1,61
62,90	77,27	1,48
75,00	31,82	1,10

A análise do difratograma e dos dados da Tabela 3 mostra que a ferrita de níquel e zinco apresentou um perfil cristalográfico policristalino, com

um pequeno halo de amorficidade entre 10 e $25^{\circ} 2\theta$. A intensidade dos principais picos foi calculada, encontrando-se os valores de $30,14^{\circ} 2\theta$ (40,91 %); $35,00^{\circ} 2\theta$ (100 %); $43,08^{\circ} 2\theta$ (45,45 %); $53,18^{\circ} 2\theta$ (36,36 %); $57,04^{\circ} 2\theta$ (50,00 %); $62,90^{\circ} 2\theta$ (77,27 %); $75,00^{\circ} 2\theta$ (31,82 %), concluindo que o perfil de difração encontrado é semelhante ao já relatado na literatura por Bocanegra-Diaz [22, 25].

De acordo com Debye-Scherrer, o difratograma de raios X é uma ferramenta para a determinação do tamanho de cristalito como forma de encontrar o tamanho médio das nanopartículas. A fórmula matemática de determinação do diâmetro médio das partículas é a seguinte:

$$D = K \cdot \lambda / \beta (\cos\theta)$$

Onde:

D = diâmetro médio das partículas

K = constante que depende da forma das partículas – esfera (0,94)

λ = comprimento de onda da radiação eletromagnética

θ = ângulo de difração (em radianos)

$\beta (2\theta)$ = largura à meia altura do pico de difração

Os valores foram substituídos na fórmula matemática e o tamanho de cristalito encontrado foi de, aproximadamente, 14,0 nm.

4.1.1.2. Medidas magnéticas da ferrita de Ni-Zn

Medidas de magnetização de saturação, a 298 K, em função da intensidade de um campo magnético que variou de -15.000 a +15.000 Oe, foram feitas utilizando cerca de 0,05 g de cada amostra. A **Figura 14**

apresenta as curvas de magnetização para as amostras de ferrita de Ni-Zn obtidas, as quais foram secas utilizando os métodos de secagem por liofilização e estufa.

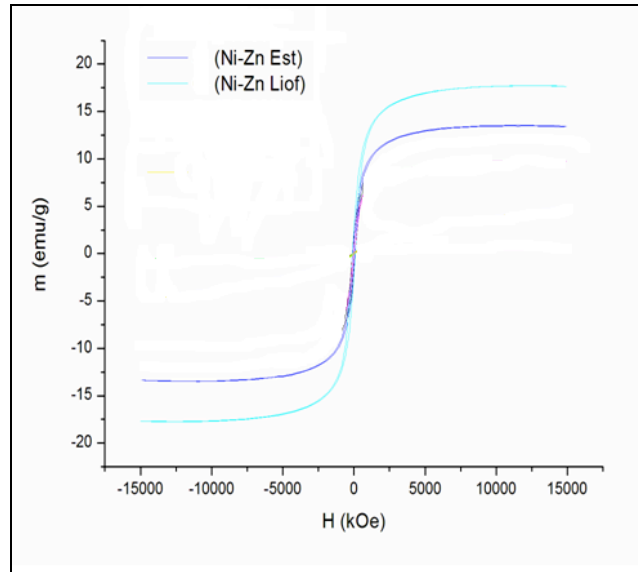


Figura 14: Curvas de magnetização para a ferrita de Ni-Zn seca em estufa e liofilizador utilizando VSM.

Analisando as curvas acima, nota-se que a ferrita de Ni-Zn exibe uma magnetização de saturação de 20 e 13 emu/g, respectivamente, para as amostras secas em liofilizador e estufa. O valor de magnetização menor para a amostra seca em estufa está relacionado à maior agregação dessas nanopartículas quando se utiliza o método de secagem por estufa, onde há evaporação da água presente, quando comparado à liofilização, onde acontece a sublimação rápida desse veículo [74].

Esses valores são pequenos quando comparados com a magnetização de saturação de 78 emu/g obtido por Kumar e colaboradores para nanobastões de 48 nm de comprimento [35, 75]. Por outro lado, podemos perceber a desmagnetização acentuada próximo do campo zero, sem a presença de histerese, sugerindo a presença de associações de partículas de comportamento superparamagnético no material [44, 74].

4.1.1.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu definir a morfologia e o tamanho dessas partículas. As **Figuras 15 e 16** mostram imagens de MEV para a ferrita de Ni-Zn.

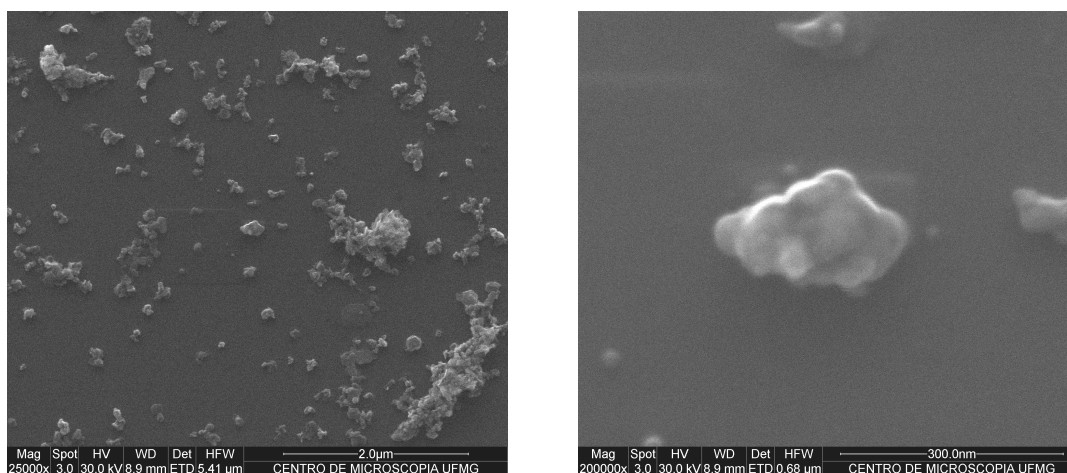


Figura 15 (esquerda): Micrografia de ferrita de Ni-Zn pelo método de MEV. Aumento de 25.000X; **Figura 16 (direita):** Micrografia de ferrita de Ni-Zn pelo método de MEV. Aumento de 200.000 X.

Analisando as micrografias acima, podemos observar limites bem definidos para a superfície das partículas e presença de agregados. Para diminuir essa agregação poderiam ser utilizadas substâncias antiagregantes

como o citrato de sódio [44]. O tamanho médio de partículas foi de 80-100 nm, calculado com o auxílio do software *Image J*.

4.1.2. Ferrita de óxidos de ferro

A ferrita de óxidos de ferro também foi caracterizada por difração de raios X em pó, espectroscopia Mössbauer, microscopia eletrônica de varredura e magnetização de saturação.

4.1.2.1. Difração de raios X de pó

A **Figura 17** mostra o perfil de difração de raios X de pó para a ferrita de óxidos de ferro e a **Tabela 4** lista os ângulos de difração (2θ) e os cálculos das intensidades relativas (I/I_0) e distâncias interplanares para os principais picos de difração.

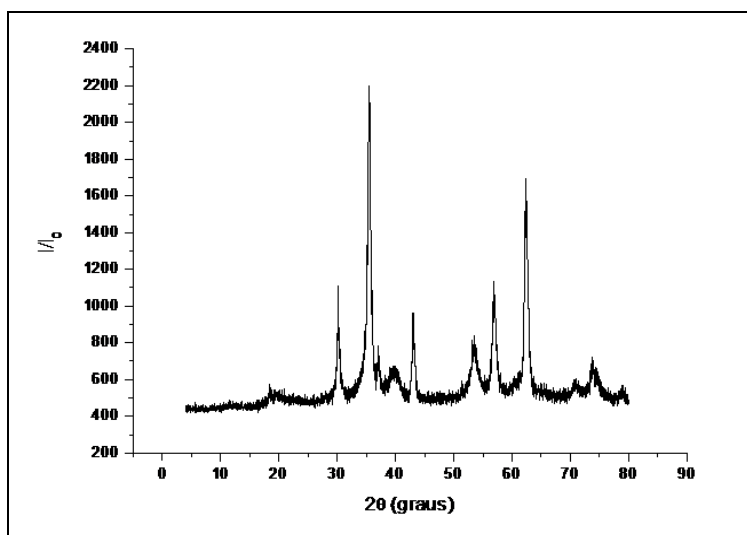


Figura 17: Difratograma da ferrita obtida a partir de cloretos de ferro.

Tabela 4: Medidas dos ângulos de difração (2θ), intensidade relativa (I/I_0) e distâncias interplanares (d) para a ferrita.

2θ (°)	Intensidade Relativa (I/I_0)	d (Å)
30,2	48,8	2,95
35,6	100	2,52
43,2	42,2	2,09
53,6	35,5	1,71
57,2	51,1	1,61
62,80	75,50	1,48

Analisando o difratograma da ferrita verifica-se a presença dos picos em $30,2^\circ 2\theta$ (48,8 %); $35,6^\circ 2\theta$ (100 %); $43,2^\circ 2\theta$ (42,2 %); $53,6^\circ 2\theta$ (35,5 %); $57,2^\circ 2\theta$ (51,1 %); $62,8^\circ 2\theta$ (75,5 %). O perfil de difração de raios X é semelhante ao já relatado na literatura por Bocanegra-Diaz[22]. O tamanho de cristalito foi calculado pela equação de Debye-Scherrer e o valor encontrado foi cerca de 10 nm.

4.1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A **Figura 18** mostra micrografia de MEV para a ferrita de óxidos de ferro.

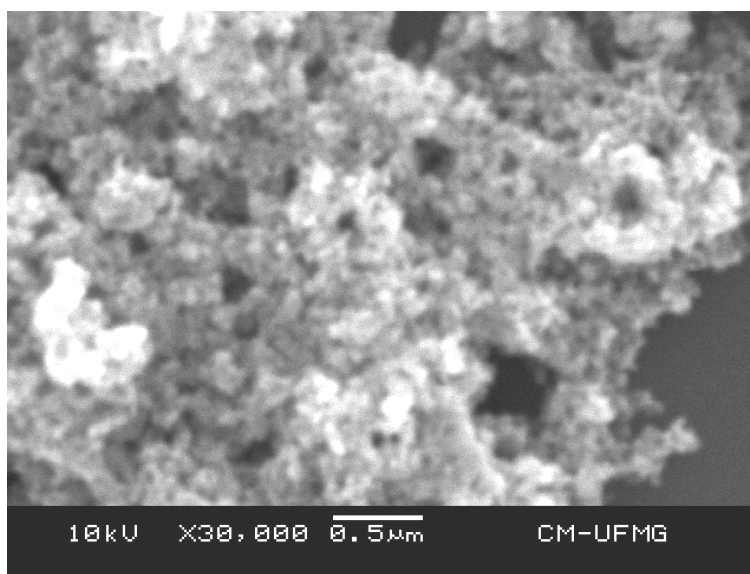


Figura 18: Micrografia de ferrita obtida a partir de cloretos de ferro utilizando MEV. Aumento de 30.000X.

Analisando a micrografia acima, observa-se que as nanopartículas se apresentaram como agregados com tamanho médio de 50-70 nm. A micrografia eletrônica de transmissão dessas nanopartículas foi representada no capítulo de resultados dos nanossistemas com daunorrubicina, apresentando tamanho médio de 12 nm. Este resultado está de acordo com o encontrado na literatura [76].

4.1.2.3. Espectroscopia Mössbauer

A espectroscopia Mössbauer foi empregada na caracterização da ferrita de óxidos de ferro. Segundo a literatura, a técnica pode ser utilizada para identificação de compostos ferruginosos, baseando-se no comportamento magnético do ferro na estrutura cristalina do material, bem como para determinar valores de carga e coordenação de compostos e pode fornecer dados acerca do tamanho e substituições isomórficas dos materiais contendo ferro [77].

A **Figura 19** mostra o espectro da amostra da ferrita de óxidos de ferro à temperatura de 160K. Verifica-se um sexteto característico de compostos do tipo maghemita, e são observados picos largos condizentes com o tamanho nanométrico das partículas. Inicialmente foi atribuído um sítio cristalino referente à maghemita (linha verde) com ponto isomérico igual a $0,38 \text{ mm s}^{-1}$ e B_{hf} em torno de 50 T (**Tabela 5**).

Apesar do objetivo de síntese ser a produção nanopartículas de magnetita, a análise do espectro indicou ausência desse mineral, pois não foi observado valor de ponto isomérico correspondente ao Fe^{2+} (ISO $\sim 0,67$)

contido no sítio octaédrico da magnetita, o que sugere que a amostra de magnetita enviada para esta análise foi oxidada à maghemita, principalmente na superfície do material, pelo fato da reação de obtenção não ter sido conduzida em atmosfera inerte. Além disso, a presença de maghemita justificou a medida de magnetização obtida para a amostra [78].

Como a amostra foi sintetizada em meio aquoso, a goethita também pode existir no material. As inclinações observadas na parte interior dos picos 1 e 6 do espectro reforçam essa suposição. Foi feita uma distribuição de campo, fixando o valor de quadrupolo em $-0,28 \text{ mm s}^{-1}$, correspondente a esse mineral. Na distribuição foi observado um máximo de probabilidade em torno de 48 T, a existência dos demais picos pode ser interpretada como resultado da falta de homogeneidade no tamanho das partículas do material (**Figura 20**).

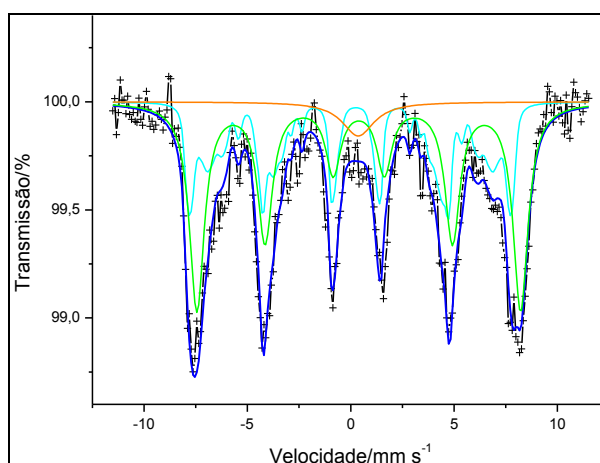


Figura 19: Espectro Mössbauer da amostra na temperatura de 160K.

Além disso, para um melhor ajuste foi adicionado um largo duplete (linha alaranjada) representando algumas nanopartículas com caráter superparamagnético que ainda não atingiram sua temperatura de bloqueio.

Tabela 5: Dados dos parâmetros do espectro de Mössbauer a 160K.

Parâmetros	Dupleto	Sexteto	Distribuição
Área	0,004(1)	0,527(3)	-
Largura	1,8(9)	0,87(4)	-
Quadrupolo	0	0	-0,28
Isomérico	0,3(1)	0,38(1)	0,11(1)
Bhf	-	48,58(8)	20
DTB	-	-	0,3
DTI	-	-	0

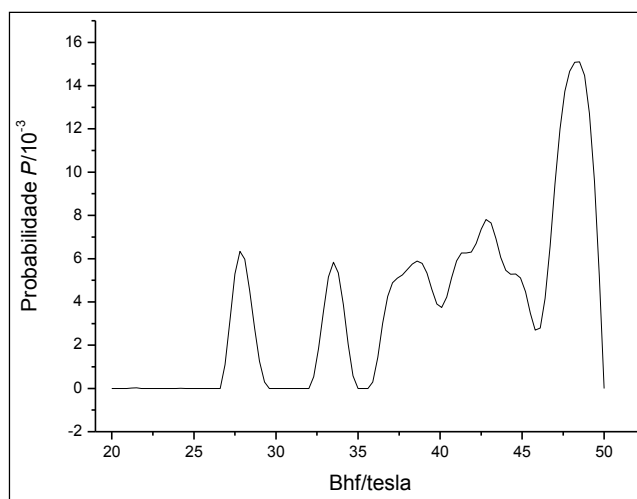


Figura 20: Distribuição de campo referente ao ajuste do espectro Mössbauer da amostra a temperatura de 160K.

É importante ressaltar que tempos maiores de análise e/ou maior quantidade de amostra podem oferecer resultados mais precisos. De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que os dois tipos de ferritas preparados possuem perfis de difração de raios X semelhantes, o que permitiu usá-las para a obtenção dos nanossistemas com os antitumorais e os resultados foram apresentados nos capítulos posteriores.

Capítulo 5: Resultados e

Discussão

Nanossistema contendo citrato de

ródio(II)

5. Nanossistema contendo citrato de ródio(II)

5.1. Caracterização do citrato de ródio(II)

A primeira evidência macroscópica da formação do citrato de ródio(II) é a cor verde do sólido formado, produto da redução do Rh^{3+} do reagente $RhCl_3$, de cor vermelha, para Rh^{2+} . Como o acetato de ródio(II) foi o precursor na obtenção do citrato de ródio(II), os resultados obtidos a seguir para o citrato de ródio(II) foram comparados com os do acetato de ródio(II).

Os dois complexos foram caracterizados por análise elementar (CHN) e espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).

5.1.1. Análise Elementar

A composição química do acetato e citrato de ródio(II) foram determinadas por análise elementar (CHN), **Tabela 6**. A análise desses resultados sugere fórmulas mínimas correspondentes a $Rh_2C_8H_{16}O_{10}$ e $Rh_2C_{24}H_{32}O_{30}$ para os compostos acetato e citrato, respectivamente.

Tabela 6: Teores (%) de carbono e hidrogênio para o acetato e citrato de ródio(II).

Complexo/ Elemento químico		Teor (%)	
		Calculado	Experimental
Acetato	C	25,10	25,20
	H	3,30	2,21
Citrato	C	28,65	27,60
	H	3,20	3,40

5.1.2. Caracterização do citrato de ródio(II) - FTIR

A **Figura 21** apresenta o espectro de absorção na região do infravermelho para as amostras de acetato de sódio e ródio(II). Estes espectros foram feitos para acompanhar a formação do acetato de ródio(II) na primeira etapa da síntese.

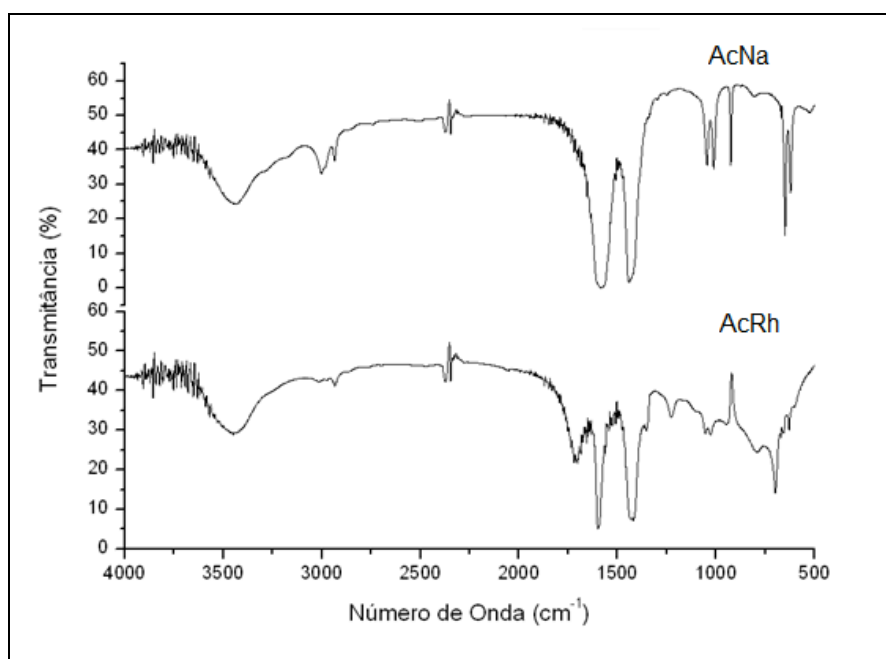


Figura 21: Espectro de IV do acetato de sódio e acetato de ródio(II).

Analisando os espectros obtidos, o do acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) e ródio(II) ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Rh}$), verificam-se mudanças significativas entre eles. O espectro do acetato de ródio(II) apresenta uma banda larga em torno de 3420 cm^{-1} , correspondente à vibrações de estiramento (ν_{OH}) de grupos OH, outras duas bandas em 2900 cm^{-1} e 2830 cm^{-1} , que correspondem à vibrações de estiramento de grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ (ν_{CH_3} e ν_{CH_2}), respectivamente.

Além disso, observam-se também duas bandas intensas em torno de 1590 e 1410 cm^{-1} , correspondentes a estiramentos simétricos e assimétricos de grupos $-\text{COO}^-$ de ácidos carboxílicos, ν_{assCOO^-} e ν_{sCOO^-} . Observa-se uma diferença de 180 cm^{-1} entre as vibrações assimétricas e simétricas. Essa diferença descarta a possibilidade de uma ligação monodentada do íon COO^- ao centro metálico do ródio(II)[79, 80]. A banda referente à ligação Rh-O não pôde ser observada no espectro, uma vez que a frequência da mesma é abaixo de 400 cm^{-1} [20]. O espectro do citrato de ródio(II) está ilustrado na **Figura 22**.

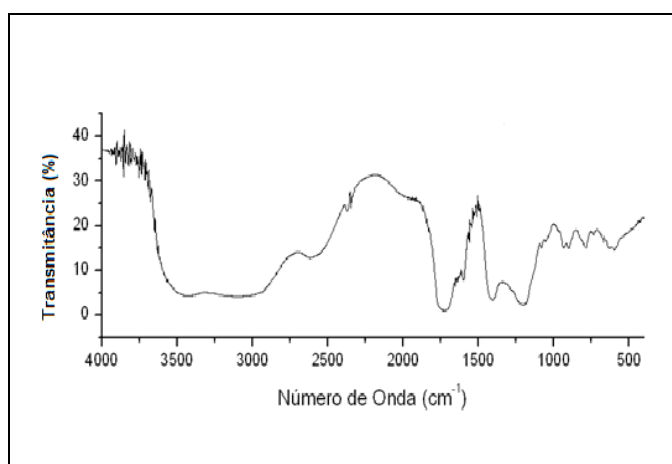


Figura 22: Espectro de infravermelho do citrato de ródio(II).

No espectro do citrato de ródio(II) foi observada uma banda larga em torno de 3500 cm^{-1} , característica de estiramento de grupos OH (ν_{OH}), uma banda em 1725 cm^{-1} , atribuída ao estiramento de grupos carbonila C=O ($\nu_{\text{C=O}}$) do grupo ácido carboxílico que não está ligado ao centro metálico. Observa-se também uma banda em 2975 cm^{-1} característica do estiramento de grupos CH_2 ($\nu_{\text{-CH}_2}$). São também observadas bandas em 1600 cm^{-1} e 1412

cm^{-1} características das vibrações de estiramento simétricas e assimétricas, respectivamente, de grupos carboxílicos (ν_{COO^-}). Verifica-se um Δ ($\nu_{\text{asCOO}^-} - \nu_{\text{sCOO}^-}$) de 188 cm^{-1} , descartando, assim, uma coordenação monodentada do íon RCOO^- ligado ao centro metálico e confirmando a coordenação em ponte dos sítios metálicos[79, 80]. Observa-se também banda em 1225 cm^{-1} , característica do estiramento (ν_{OH}) do álcool. Estes modos vibracionais estão descritos na literatura [20].

Os modos vibracionais referentes ao estiramento das ligações Rh-Rh não foram observadas, pois são modos inativos nos espectros de IV, devido à presença de um centro de inversão nos carboxilatos de ródio(II), o que confere uma micro-simetria em torno do íon central, caracterizando esses complexos nos grupos pontuais D_{4h} ou D_{2h} [20]. O composto foi sintetizado conforme trabalhos da literatura e foi utilizado para a preparação do nanossistema polimérico-magnético caracterizado a seguir [20].

5.2. Caracterização de nanossistemas de liberação de PLGA, ferrita de Ni-Zn ou ferrita de óxidos de ferro e citrato de ródio(II)

Os resultados da caracterização dos nanossistemas com citrato de ródio(II) são apresentados a seguir.

5.2.1. Difração de raios X

Na **Figura 23** estão apresentados os difratogramas dos nanossistemas de ferrita de Ni-Zn/PLGA, ferrita de óxidos de ferro/PLGA e ferrita de óxidos de ferro/PLGA/ citrato de ródio(II).

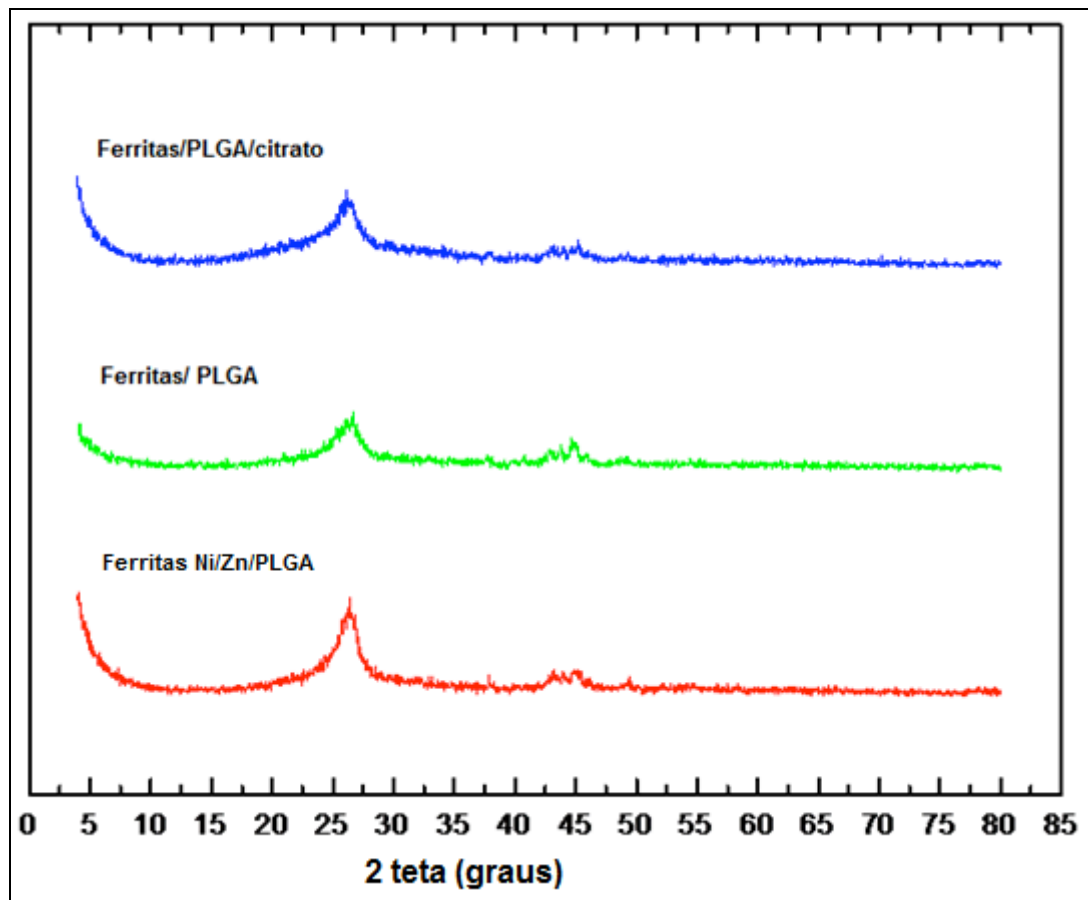


Figura 23: Difratograma para nanossistemas de PLGA, ferrita de Ni-Zn ou ferrita de óxido de ferro e citrato de ródio(II).

As amostras nanoparticuladas apresentam um pico de difração em torno de $27^\circ 2\theta$, característico da matriz polimérica. É verificado ainda o alargamento desse pico em todas as amostras, por outro lado, não se observa pico referente à ferrita pura uma vez que a quantidade presente

nessas amostras é muito pequena. Além disso, não se observa diferença entre os difratogramas da ferrita de Ni-Zn e da ferrita de óxidos de ferro.

5.2.2. Medidas de potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico

A **Tabela 7** apresenta os valores de potencial zeta para amostras de ferritas e dos nanossistemas magnéticos.

Tabela 7: Valores de potencial zeta para amostras de nanopartículas ferritas puras e para os nanossistemas com citrato de ródio(II).

Material	Valor de potencial zeta (mV)
Ferrita de Ni-Zn	+ 15,9 ± 2,4
Ferrita de óxidos de ferro	+ 16,3 ± 1,9
Nanossistema PLGA, Ni-Zn e citrato de ródio(II)	- 24,3 ± 4,2
Nanossistema PLGA, óxidos de ferro e citrato de ródio(II)	- 24,7 ± 3,4

Os valores encontrados mostram uma inversão no valor de zeta potencial após o encapsulamento das ferritas e do citrato de ródio(II) no polímero de PLGA. Esse resultado sugere que parte da molécula do citrato de ródio(II) ficou no interior da partícula e os grupos carboxila do lado de fora.

A **Figura 24** mostra uma hipótese ilustrativa da organização dos componentes no dispositivo preparado (desenho com apenas uma molécula de citrato por nanossistema, para exemplificação). Vale a pena salientar aqui a importância de ter nanossistemas com cargas negativas para que a suspensão seja estável, essa estabilidade pode ser justificada pela presença de repulsão entre as cargas negativas apresentadas por esses nanossistemas [81, 82].

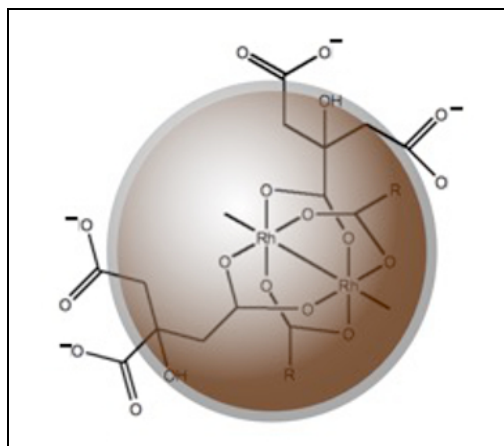


Figura 24: Hipótese ilustrativa para a organização dos componentes no sistema nanoparticulado.

5.2.3. Microscopia eletrônica de varredura das NP

Sistemas nanoparticulados foram avaliados quanto à morfologia e reprodutibilidade de distribuição de tamanho [83]. A **Figura 25** mostra a micrografia para o PLGA, material de partida dos nanossistemas.

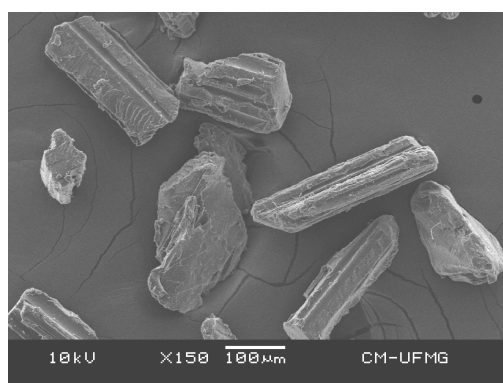


Figura 25: Micrografias das partículas de PLGA em sua forma natural, antes da preparação dos nanossistemas. Aumento de 150X.

As **Figuras 26, 27 e 28** mostram as micrografias para o nanossistema PLGA, ferrita Ni-Zn e citrato de ródio(II), em diferentes aumentos.

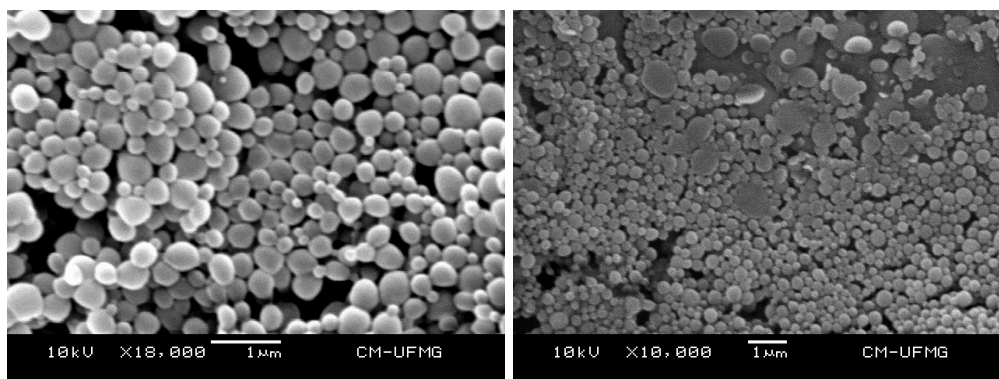


Figura 26 (esquerda) e 27 (direita): Micrografias de nanossistema de PLGA, ferrita de Ni-Zn e citrato de ródio(II). Aumento de 10.000X.

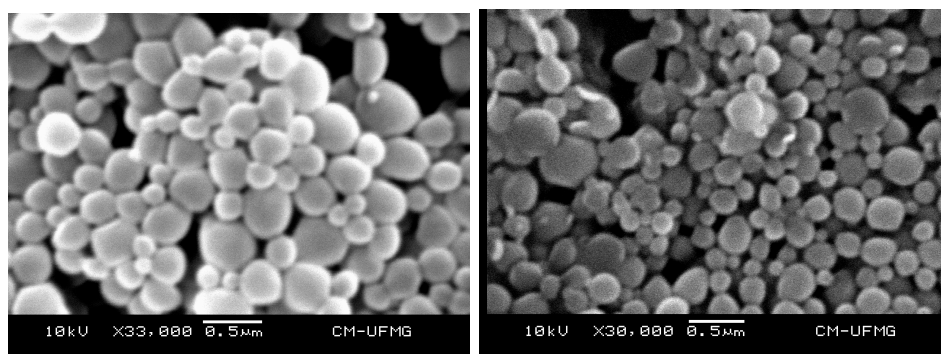


Figura 28: Micrografias de nanossistema de citrato de ródio(II), ferrita de Ni-Zn e PLGA em aumento de 33.000 e 30.000X, respectivamente.

Analisando as imagens acima, pode-se inferir que o processo de emulsão múltipla é um método eficaz para a preparação de nanossistemas poliméricos, com morfologia esférica, visto que os materiais de partida não apresentam essa morfologia. A partir do cálculo feito para o tamanho de partícula feito com o auxílio do software Image J, os nanossistemas preparados possuem diâmetro médio na faixa de 250 a 300 nm.

5.2.4. Medidas de magnetização de saturação

A magnetização de saturação à temperatura ambiente das amostras de nanossistemas foram medidas utilizando-se um magnetômetro do tipo VSM.

As medidas para ferrita de Ni-Zn pura, seca em liofilizador e estufa, e do nanossistema com citrato de ródio(II), PLGA e diferentes porcentagens de ferrita (5, 10, 15, 20 e 25 % p/p) foram feitas à temperatura de 25 °C e a intensidade do campo magnético variou entre -15.000 e +15.000 kOe.

Deve-se destacar que tais medidas podem fornecer informações acerca das propriedades estruturais das amostras estudadas. Devido ao efeito do tamanho nanométrico das partículas, elas se comportam como monodomínios magnéticos e apresentam a propriedade de superparamagnetismo, ou seja, não apresentam magnetização remanescente após a retirada do campo [74]. A magnetização de cada amostra foi medida e curvas de magnetização foram construídas de acordo com a **Figura 29**.

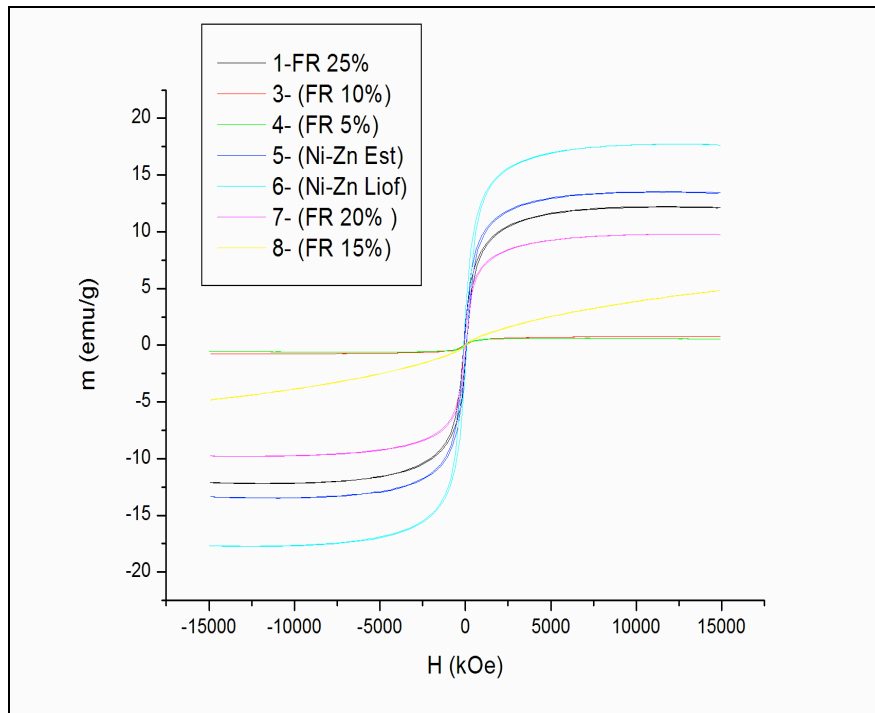


Figura 29: Valores de magnetização de saturação de nanopartículas magnéticas. 1) NPs contendo 25 % p/p de ferrita Ni-Zn; 3) NPs contendo 10 % p/p de Ni-Zn; 4) NPs contendo 5 % p/p de Ni-Zn; 5) ferrita Ni-Zn pura seca em estufa; 6) ferrita Ni-Zn pura seca em liofilizador; 7) NPs contendo 20 % p/p de Ni-Zn e 8) NPs contendo 15 % p/p de Ni-Zn.

A análise das curvas permite observar que a ferrita de níquel e zinco, quando seca em liofilizador e estufa, apresenta valores de magnetização de saturação igual a 20 e 13 emu/g, respectivamente, concluindo que o método utilizado interfere no valor da magnetização. Segundo dados da literatura, as propriedades magnéticas são influenciadas pelo tamanho de partícula, pela distribuição dessas partículas e pelas interações interpartículas [31]. Além disso, partículas maiores, como as supostamente formadas por secagem em estufa, assim como agregados, exibem uma maior declividade nas curvas de magnetização porque saturam mais rapidamente, quando expostas a um dado campo magnético [84].

À medida que se formula os sistemas com quantidade crescente de ferrita, a magnetização aumenta. Os maiores valores de magnetização podem ser encontrados nas amostras contendo 20 e 25 % p/p de ferrita, encontrando-se valores de 10 e 8 emu/g. Os valores de magnetização encontrados são menores do que os encontrados na literatura para os óxidos de ferro, em geral [44].

Por outro lado, foi preparado também nanossistema contendo ferrita de óxidos de ferro. Também foram feitas as medidas magnéticas para tais amostras, à temperatura ambiente, com variação de intensidade de campo magnético de -15.000 a +15.000 Oe, e as curvas são mostradas na **Figura 30**.

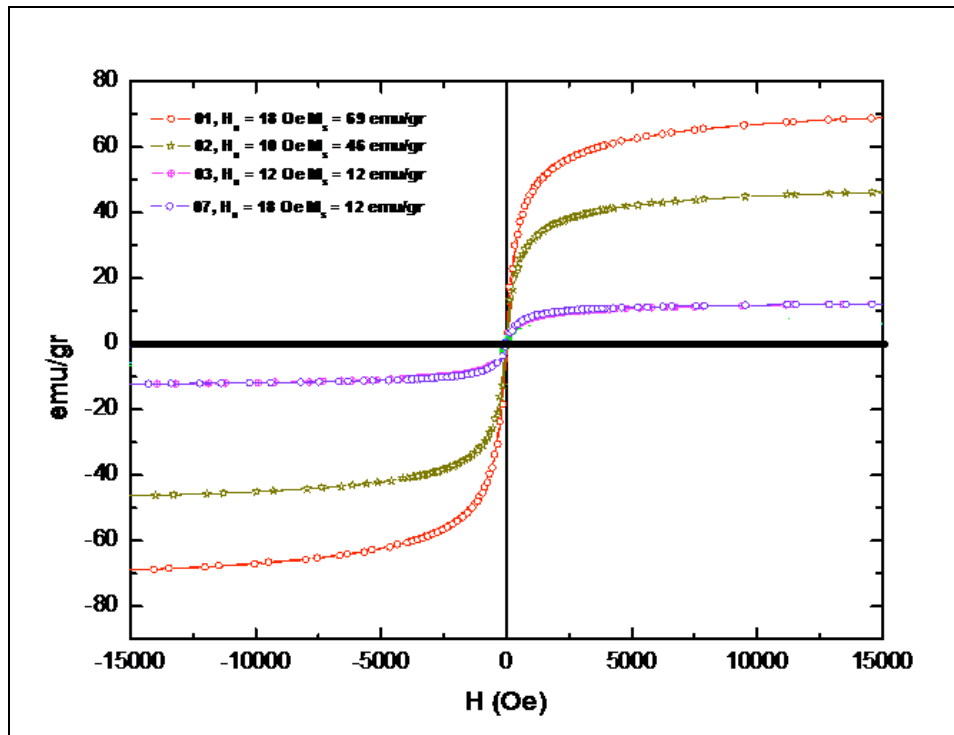


Figura 30: Valores de magnetização de saturação de nanopartículas magnéticas. Amostra 01: ferrita de óxidos de ferro (FR); Amostra 02: nanossistema com 25 % p/p de FR; Amostra 03: nanossistema com 20 % de FR; Amostra 07: nanossistema com 10 % de FR.

Comparando as curvas acima, podemos observar que a ferrita de óxidos de ferro e o nanossistema preparado com essa ferrita possuem valores de magnetização maiores do que o mesmo preparado com ferrita de Ni-Zn. Os valores encontrados são 69 emu/g para a ferrita pura, 46 emu/g para o nanossistema com 25 % de ferrita e 12 emu/g para os nanossistemas preparados com 20 e 10 % de ferrita. Segundo dados da literatura, ferrita de óxidos de ferro possuem magnetização maior do que a ferrita de níquel e zinco, pela diferença na organização dos domínios na estrutura do material [44] e também pelo tamanho de partícula. Foram encontrados os valores de cerca de 10-20 nm para a ferrita de Ni-Zn [51] e 10-15 nm para a ferrita de

óxidos de ferro [44, 82] por micrografias de varredura e transmissão e pelo cálculo utilizando a equação de Debye-Scherrer. Além disso, quando se encapsula a partícula magnética no polímero, a magnetização também diminui devido à maior dificuldade de organização desses domínios. Essa menor força magnética torna o dispositivo um promissor candidato para a liberação de fármacos [85, 86].

Concluiu-se, com os dados acima, que a ferrita de óxidos de ferro, compostas por uma mistura de magnetita e maghemita, tem um maior valor de magnetização de saturação quando comparada à de níquel e zinco. Como para preparação de dispositivos magneticamente dirigíveis, seria necessário a aplicação de um campo magnético mais intenso para o uso de ferrita níquel e zinco, escolheu-se a ferrita de óxidos de ferro para ser usada na preparação dos demais sistemas deste trabalho.

5.2.5. Perfil de Liberação

O estudo do perfil de liberação do citrato de ródio(II) a partir do nanossistema com ferrita de óxidos de ferro, foi feito segundo a metodologia descrita anteriormente, **Figura 31**. O citrato de ródio(II) foi quantificado usando uma curva de calibração. A porcentagem de encapsulamento do citrato de ródio(II) foi determinada também por UV/Visível e o resultado encontrado foi cerca de 20 %, baseado na massa adicionada no início da preparação (proporção molar de 1:5 de citrato de ródio em relação ao polímero). A quantificação do citrato de ródio(II) foi feita monitorando a intensidade da banda de 450 nm por possuir maior absorvidade [87].

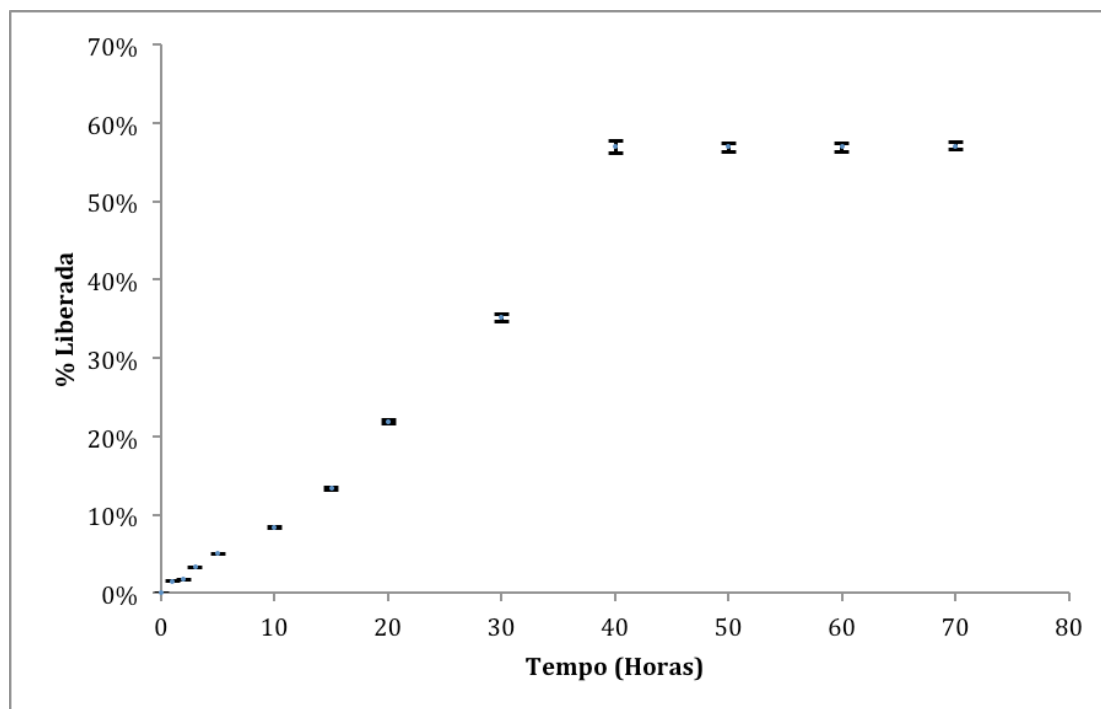


Figura 31: Perfil de liberação de citrato de ródio(II) a partir do nanossistema magnético, cada ponto foi calculado pela média de três medidas.

Analisando a curva acima, podemos concluir que o citrato de ródio(II), quando usado juntamente com a ferrita de óxidos de ferro e apresenta um perfil liberação controlada até cerca de 70 horas, sem a presença de “*burst effect*” (efeito explosão), uma vez que menos de 10 % da concentração inicial é liberada nas 10 primeiras horas de experimento. Esse resultado reforça a hipótese de que o citrato de ródio(II) está interagindo com a matriz através de interações não-covalentes, de forma que sua liberação seja lenta. Observa-se também que a maior quantidade do fármaco (cerca de 60 %) é liberada até 40 horas do experimento.

Após esse tempo, uma menor quantidade do citrato de ródio(II) é encontrada e não se observa a liberação 100 % do complexo encapsulado na

matriz. Relatos da literatura mostram que o efeito explosão pode ser suprimido quando se utiliza algum tipo de material além do polímero que, no caso desse trabalho, foi a ferrita de óxidos de ferro [66].

O modelo cinético de liberação foi calculado a partir da curva de concentração cumulativa em mg.mL^{-1} X raiz quadrada do tempo e a cinética de ordem zero foi encontrada para explicar a liberação dessa substância, concluindo que a liberação é independente da concentração.

5.3. Testes biológicos *in vitro*

5.3.1. Testes de viabilidade celular pelo método de MTT

Os testes biológicos de citotoxicidade *in vitro* [88] foram realizados para o nanossistema com citrato de ródio(II), utilizando culturas de células de Caco-2. As células foram cultivadas e, após atingirem confluência, foram transferidas para placas de 96 poços para a realização do teste. As concentrações testadas foram retiradas do trabalho de Souza e colaboradores [18]. As concentrações do citrato testadas foram 1000 (1), 800 (2), 600 (3), 400 (4), 300 (5), 200 (6) e 100 μM (7), calculadas a partir da pesagem das partículas. As matrizes, PLGA e ferrita de óxidos de ferro, também foram testadas, **Figura 32**.

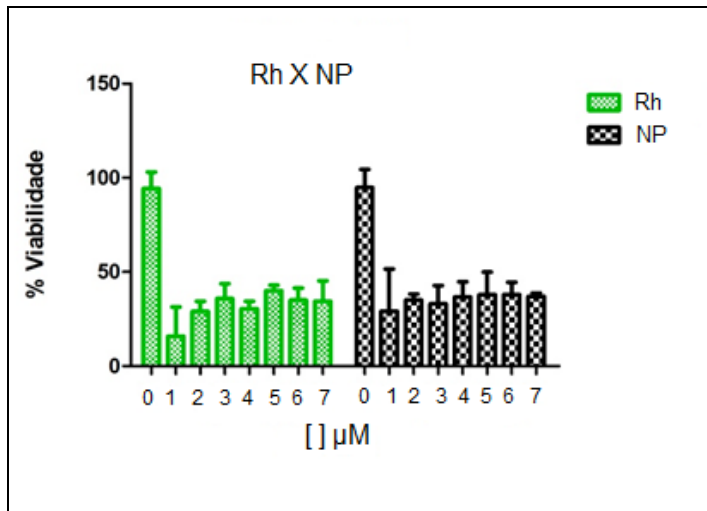


Figura 32: Resultados de % de viabilidade celular em células de Caco-2.

Nota-se que, em todas as concentrações testadas, o citrato de ródio(II) do nanossistema polimérico-magnético possui citotoxicidade semelhante ao citrato de ródio(II), concluindo que as matrizes utilizadas no preparo do nanossistema libera o fármaco para exercer o efeito citotóxico.

Os grupos compostos de nanopartículas de ferrita de níquel-zinco e óxidos de ferro, nanossistema ferrita/PLGA e PLGA foram testados e não apresentaram níveis consideráveis de citotoxicidade quando expostas às células.

Os resultados obtidos a partir da caracterização físico-química e avaliação *in vitro* dos sistemas nanoparticulados contendo citrato de ródio(II) possibilitaram concluir que o seu encapsulamento em matriz polimérica na forma de nanopartículas permite que o efeito antitumoral do composto seja mantido.

*Capítulo 6: Resultados e
discussão*

*Nanossistemas contendo
cloridrato de daunorrubicina*

6. Nanossistemas contendo cloridrato de daunorrubicina

Os resultados físico-químicos e biológicos obtidos neste trabalho para os nanossistemas com cloridrato de daunorrubicina são apresentados e discutidos, de forma a enfatizar o seu conteúdo inédito. Algumas técnicas físico-químicas foram utilizadas para mostrar a interação entre os componentes desses sistemas.

6.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A **Figura 33** apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho para o PLGA, a DNR, as nanopartículas de ferrita de óxidos de ferro (FR), e para os nanossistemas DNR-PLGA e DNR-FR-PLGA na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} .

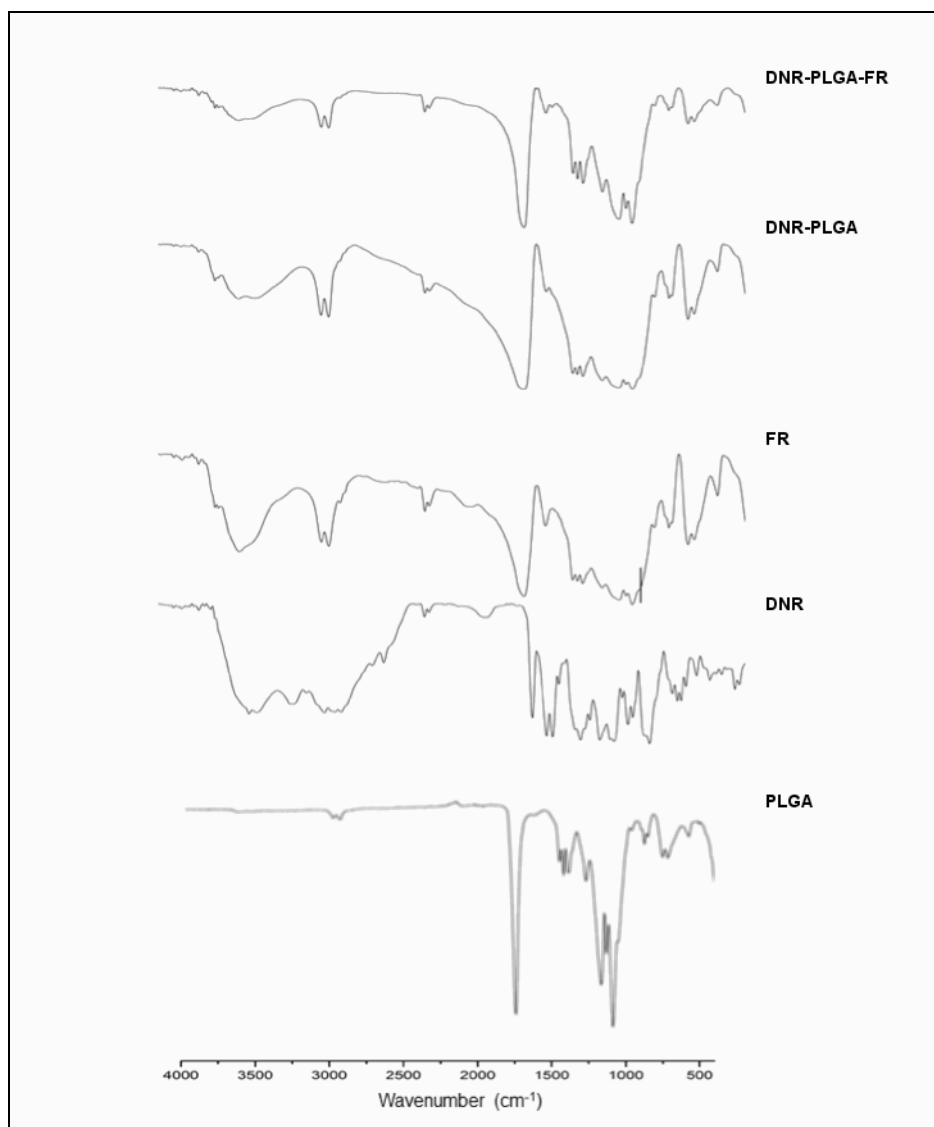


Figura 33: Espectros de absorção na região do infravermelho para o PLGA, DNR, FR-citrato, para os nanossistemas DNR-PLGA e DNR-PLGA-FR, na faixa de absorção entre 4000-500 cm^{-1} .

A técnica de IV foi usada para determinar as interações existentes entre os componentes da matriz e o fármaco [88]. De acordo com Xu e colaboradores, o espectro da DNR exibe duas bandas fortes em 1617 e 1580 cm^{-1} , que correspondem, respectivamente, a vibrações de estiramento de grupos C=O ($\nu_{\text{C=O}}$) de grupos carbonílicos das quinonas e a vibrações de estiramento de grupos C=C ($\nu_{\text{C=C}}$) do anel aromático [89]. Haider e

colaboradores descreveram as principais bandas presentes no espectro do PLGA, destacando a banda presente na faixa de 1700-1850 cm^{-1} , correspondente a vibrações de estiramento de ligações C=O ($\nu_{\text{C=O}}$) e também um conjunto de bandas na faixa de 1050-1250 cm^{-1} que corresponde a vibrações de estiramento de ligações C-O-C ($\nu_{\text{C-O-C}}$) [90]. No espectro da ferrita recoberta com citrato de sódio três bandas podem ser citadas, a primeira na região de 3500 cm^{-1} , correspondente a vibrações de estiramento de ligações O-H ($\nu_{\text{O-H}}$) presentes nos óxidos de ferro, a segunda em 1710 cm^{-1} , que corresponde a vibrações de estiramento assimétricas de ligações C=O, ($\nu_{\text{C=O}}$), presentes nos grupos COOH das moléculas de citrato que envolvem as nanopartículas de ferrita e a última em 575 cm^{-1} , correspondente a vibrações de estiramento de ligações Fe-O ($\nu_{\text{Fe-O}}$), segundo estudos propostos por Nigam e colaboradores [91].

No espectro do nanossistema DNR-FR-PLGA, observa-se o alargamento e aumento da intensidade da banda presente na faixa de 1700 cm^{-1} , a presença de duas bandas pouco intensas na região de 1610 cm^{-1} , que corresponde a vibrações de estiramento de ligações C=O de quinonas ($\nu_{\text{C=O}}$), a presença da banda de estiramento O-H na região de 3500 cm^{-1} , além da presença da banda em 575 cm^{-1} , menos intensa que na ferrita pura, correspondente a vibrações Fe-O.

Essas evidências observadas confirmam a interação entre o fármaco e os componentes da matriz através de interações não-covalentes, como ligações de hidrogênio e forças dispersivas de London.

6.2 Análise Térmica: Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise térmica diferencial (DTA)

A análise TGA dos componentes do nanossistema com daunorrubicina está representada na **Figura 34**.

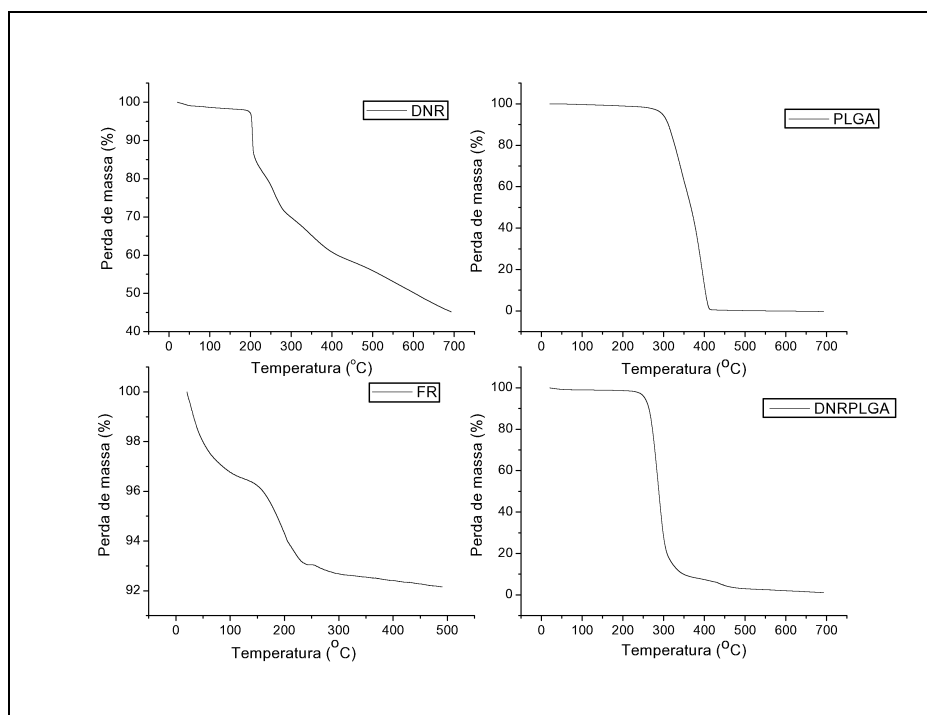


Figura 34: Curvas termogravimétricas (TGA) para amostras de daunorrubicina (DNR) pura, do copolímero PLGA, da ferrita de óxidos de ferro pura (FR) e do nanossistema DNR-PLGA, na faixa de temperatura de 25 a 700 °C.

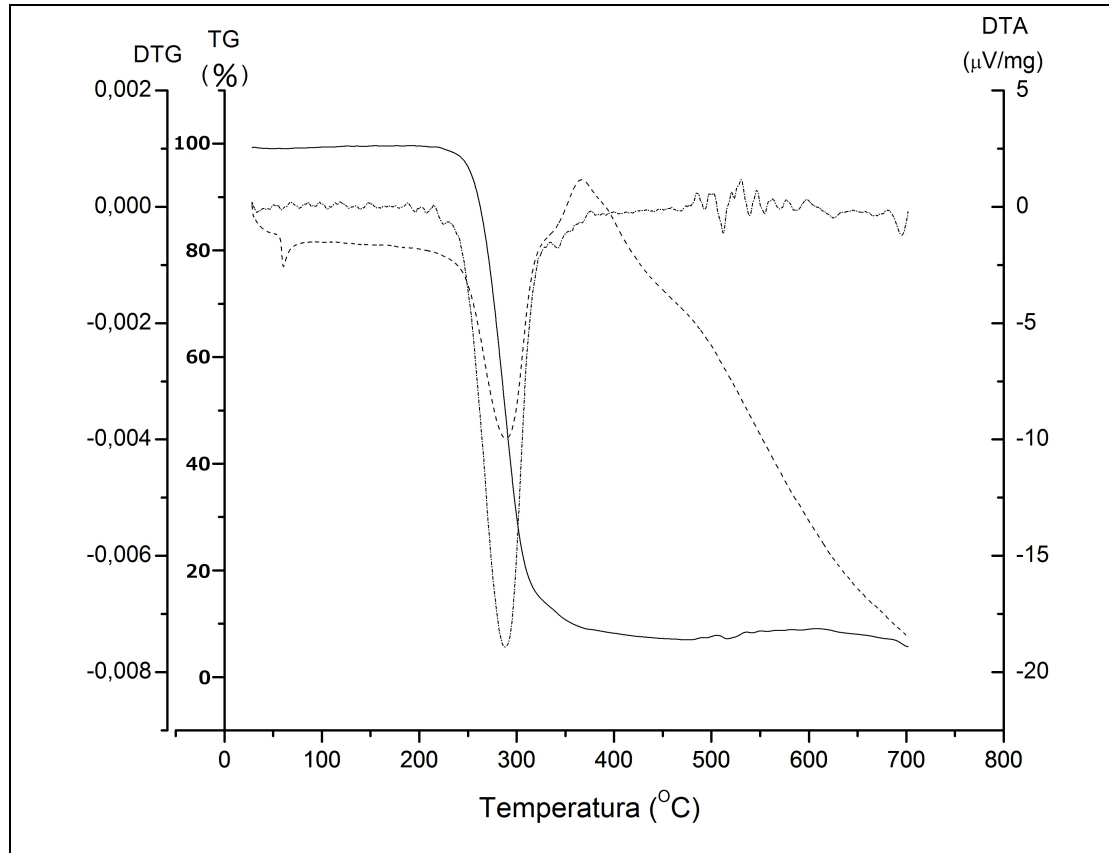


Figura 35: Curva termogravimétrica (TGA), termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA) para o nanossistema DNR-FR-PLGA, na faixa de temperatura de 25 a 700 °C.

A curva TG da DNR pura mostra um evento de perda de massa em torno de 3 % até 100 °C, atribuído a perda de moléculas de água de umidade da matéria-prima, e perdas sucessivas de massa a partir de 200 °C, seguida por decomposição da matéria-prima e, a 700 °C, observa-se a geração de um resíduo de cerca de 45 % da massa inicial [92]. O perfil térmico do PLGA mostra que o polímero sofre uma única perda de massa em cerca de 350 °C, que corresponde à decomposição completa do material, sem geração de resíduos a 700 °C, devido à sua natureza orgânica [93].

A curva TG das FR puras mostra uma grande estabilidade térmica do material quando aquecido até 700 °C. Observa-se uma perda de cerca de 4 % de massa até 100 °C, atribuída à remoção de moléculas de água da estrutura das nanopartículas. Na faixa de 100-500 °C ocorre perdas de cerca de 3 % de massa, que são atribuídas às moléculas de ácido cítrico presentes na superfície das nanopartículas e transição de fase de Fe₃O₄ para Fe₂O₃ por volta de 400 °C [94]. Os perfis térmicos do nanossistema DNR-PLGA e DNR-FR-PLGA diferem entre si e dos materiais de partida discutidos acima. O nanossistema DNR-PLGA possui estabilidade térmica até aproximadamente 300 °C, onde ocorre uma única perda de massa, correspondente à fusão, seguida de decomposição completa, destacando que a 700 °C não se observa geração de resíduo devido à natureza orgânica do material. O perfil dessa curva se difere do PLGA e DNR puros, confirmando a interação entre o polímero e o fármaco e a desorganização da rede cristalina e amorfização da daunorubicina após a fabricação dos nanossistemas [65].

Na **Figura 36**, a curva TGA para o nanossistema DNR-FR-PLGA mostra que há duas perdas de massa, a primeira em torno de 250 °C, correspondendo a 64 % da massa inicial, que pode ser atribuída à decomposição da matriz polimérica e de todo o material orgânico presente, a segunda perda em torno de 650 °C compreende cerca de 2,5 % da massa inicial, e está relacionada aos óxidos de ferro presentes nos nanossistemas. O resíduo final de cerca de 33,5 % da massa inicial é composto principalmente de material inorgânico.

A **Figura 37** mostra as curvas de análise térmica diferencial (DTA) para as amostras de DNR pura, PLGA, FR e para os nanossistemas DNR-PLGA e DNR-FR-PLGA.

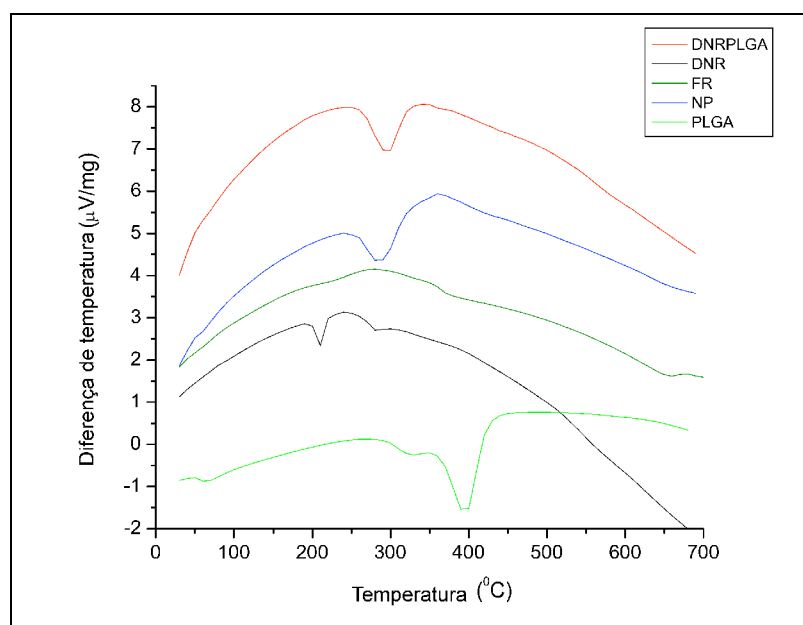


Figura 37: Curvas de análise térmica diferencial (DTA) para as amostras de daunorrubicina pura (DNR), do copolímero PLGA, da ferrita pura (FR) e dos nanossistemas de daunorrubicina-PLGA (DNR-PLGA) e daunorrubicina-ferrita-PLGA (NP).

As curvas DTA dos materiais de partida, DNR, PLGA e FR apresentam perfis característicos, segundo dados reportados na literatura. A DNR pura apresenta um evento endotérmico em torno de 208 °C, o que corresponde ao ponto de fusão do fármaco [92]. Para a ferrita (FR), não foi possível observar nenhum evento significativo nessa faixa de temperatura para a curva DTA. Na curva DTA do PLGA, observa-se em torno de 50-60 °C um evento correspondente à transição vítrea do polímero [95]. Outro evento observado em torno de 400 °C que corresponde à sua decomposição.

Observa-se que os perfis das curvas DTA dos nanossistemas são similares entre si, mas diferentes dos materiais de partida. Em ambas, é observado um evento comum em torno de 300 °C, que pode ser atribuído à fusão seguida de decomposição das amostras. Como a diferença entre as duas é a presença da ferrita no nanossistema e não se pôde observar evento relativo às FR, a similaridade é compatível com a presença de PLGA e DNR. Além disso, não é observado o ponto de fusão da DNR nessas duas curvas, o que é uma importante evidência de que o fármaco se encontra distribuído na matriz polimérica e que ocorreu um processo de amorfização deste, como reportado em outros trabalhos da literatura [65].

6.3 Potencial Zeta

A determinação do potencial zeta de sistemas nanoparticulados é um importante parâmetro de avaliação que determina a estabilidade e a agregação, bem como o comportamento desses em sistemas biológicos [96].

Vale ressaltar que, como o potencial zeta é uma carga superficial, seus valores dependem do pH do meio usado [97]. Neste trabalho, todas as medidas foram feitas em pH do sangue, relativamente básico, próximo a 7,4.

Os valores de potencial zeta são visualizados na **Tabela 8**.

Tabela 8: Valores de potencial zeta para as amostras de copolímero PLGA puro, ferrita pura (FR), daunorrubicina-PLGA (DNR-PLGA) e daunorrubicina-ferrita-PLGA (DNR-FR-PLGA).

Amostra	Potencial Zeta (mV)
PLGA puro	-30,8 ± 2,0
FR pura	-26,1 ± 4,1
DNR-PLGA	-31,5 ± 1,5
DNR-FR-PLGA	-32,4 ± 2,7

A carga negativa apresentada pelas nanopartículas de FR pura é condizente com o descrito na literatura [31] e pode ser explicado pela presença de grupos OH^- e de grupos citrato presentes na superfície em meio aquoso. O valor de potencial zeta para o PLGA também é consistente com o encontrado na literatura para este polímero, que é devido aos grupos COOH presentes na estrutura polimérica [31]. Em relação aos nanossistemas DNR-PLGA e DNR-FR-PLGA, observa-se que os valores de potencial zeta são maiores em módulo do que aqueles encontrados para os materiais de partida. Tais valores podem ser explicados pela tendência de agregação das nanopartículas quando presentes em um meio com eletrólitos presentes, e a alta probabilidade de interação através de ligações não-covalentes [91].

Nos meios biológicos, essas tendências à agregação podem ser compensadas pelas repulsões eletrostáticas entre as cargas superficiais, pelas interações hidrofílicas entre as partículas, e pela natureza das cargas superficiais que podem funcionar como barreiras [32]. Assim, valores de potencial zeta negativos favorecem a interação das partículas com as membranas celulares, que têm natureza positiva permitindo que a daunorrubicina seja liberada.

6.4. Medidas de magnetização

Foi feita a medida de magnetização de saturação do nanossistema DNR-FR-PLGA e a curva está representada na **Figura 38**.

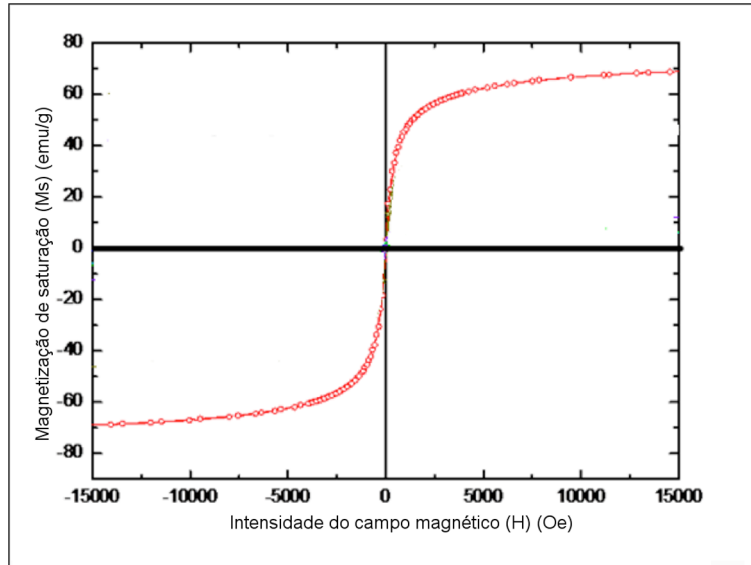


Figura 38: Medida de magnetização de saturação do nanossistema DNR-FR-PLGA a 298 K.

Segundo dados da **Figura 38**, a magnetização de saturação do nanossistema DNR-FR-PLGA é de 63 emu/g, quando a intensidade do campo magnético varia entre -1,5 e 1,5 Tesla (-15.000/+15.000 Oe). Esse valor é menor do que o valor de magnetização encontrado para as nanopartículas de óxidos de ferro puras, que é de 95 emu/g [44], o que sugere a presença dos componentes DNR e PLGA, que são materiais diamagnéticos e contribuem para a diminuição dessa magnetização.

A intensidade do campo magnético utilizada está dentro da faixa permitida pelo FDA para uso em sistemas biológicos [31], confirmando o potencial do material preparado neste trabalho.

6.5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Microscopia de Força Atômica (MFA)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de força atômica (MFA) foram utilizadas neste trabalho para avaliar a morfologia e distribuição dos componentes no nanossistema. A **Figura 39** e **Figura 40** mostram a distribuição de tamanho de partículas da ferrita de óxidos de ferro e do nanossistema DNR-FR-PLGA.

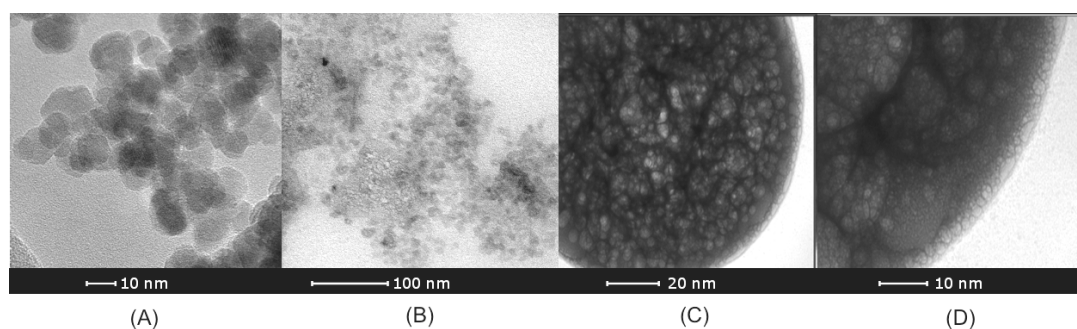


Figura 39: Micrografias de FR pura - (A) e (B) micrografias apresentam nanopartículas com 12 nm de diâmetro, em média. A barra de escala equivale a 10 e 100 nm. As micrografias (C) e (D) se referem ao nanossistema, em escalas de aumento diferentes. As barras equivalem a 20 e 10 nm, respectivamente.

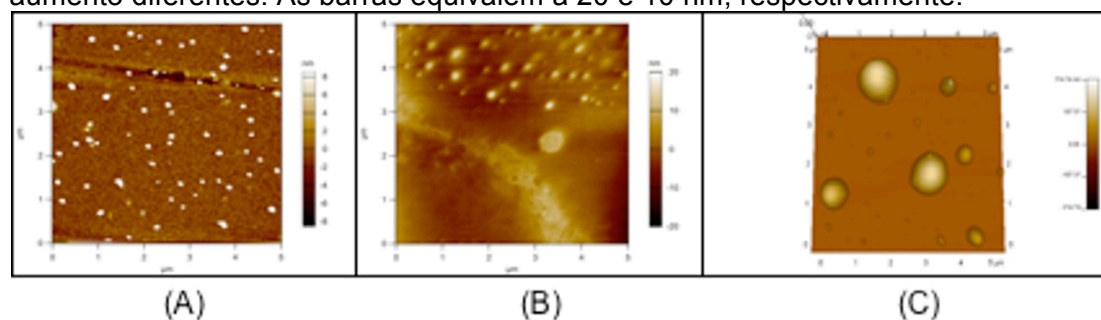


Figura 40: Micrografias de força atômica de (A), (B) e (C) micrografias apresentam o nanossistema com daunorrubicina (DNR-FR-PLGA) sintetizadas pelo método de emulsão múltipla, em escalas de aumento diferentes.

A partir das micrografias, observa-se que as nanopartículas de ferrita de óxidos de ferro tem um tamanho médio de cerca de 12 nm, e são notadas

áreas de agregação do material. Ao preparar o nanossistema com o polímero e a daunorrubicina, a partícula se torna esférica, com uma superfície esférica e lisa e que o tamanho aumenta para cerca de 160-200 nm.

6.6. Perfil de liberação controlada

O experimento de liberação controlada do nanossistema foi feito de acordo com o descrito por Sinisterra e colaboradores, **Figura 41**.

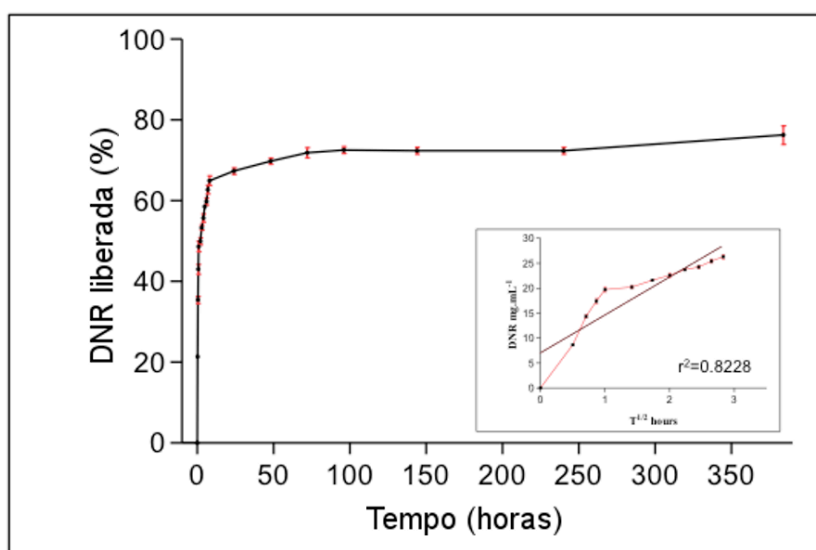


Figura 41: Curva de porcentagem cumulativa liberada de daunorrubicina a 37 °C. Gráfico menor: ajuste de modelo cinético para as primeiras 8 horas de experimento.

Analisando a **Figura 41**, podemos observar a liberação de cerca de 60 % da quantidade de DNR contida no nanossistema nas primeiras 24 horas de

experimentos, o que confirma a presença de efeito explosão para o sistema preparado. Após o período de 24 horas, o sistema apresenta um perfil de liberação controlada de daunorrubicina que libera após 350 horas cerca de 80 % do fármaco contido na matriz de PLGA.

O coeficiente de regressão da curva de liberação até as primeiras 48 horas foi calculado utilizando o modelo de Higuchi (curva de concentração cumulativa em mg.mL^{-1} X raiz quadrada do tempo) [98] a partir da curva representada também na **Figura 41** (ampliação do gráfico) e o valor deste coeficiente foi igual a 0,8228, embora esse valor seja baixo foi a melhor regressão linear obtida para essa faixa de liberação. Esse resultado pode ser explicado pela mistura de mecanismos de liberação de ordem zero e ordem um. Esta liberação inicial está relacionada à difusão do fármaco que está próximo à superfície do nanossistema.

Após 48 horas, a cinética de liberação proposta está de acordo com o modelo de Hixson-Crowell (concentração cumulativa em mg.mL^{-1} X raiz cúbica do tempo) [98] e o coeficiente de regressão é igual a 0,69. Este segundo modelo de cinética está relacionado à degradação por erosão da matriz polimérica. Durante o tempo do experimento não foi observada a total degradação da matriz e a quantidade total de daunorrubicina liberada foi igual a 80 %.

6.7 Estudos de viabilidade celular *in vitro*

A citotoxicidade da DNR, e nanossistemas DNR-PLGA e DNR-FR-PLGA, nas concentrações de 0,1, 0,05, 0,025 e 0,0125 μM foram testadas. A concentração de DNR foi calculada com base no teor de encapsulamento encontrado e a quantidade de amostra foi pesada de acordo com a concentração de daunorrubicina desejada. A **Figura 42** apresenta os resultados obtidos.

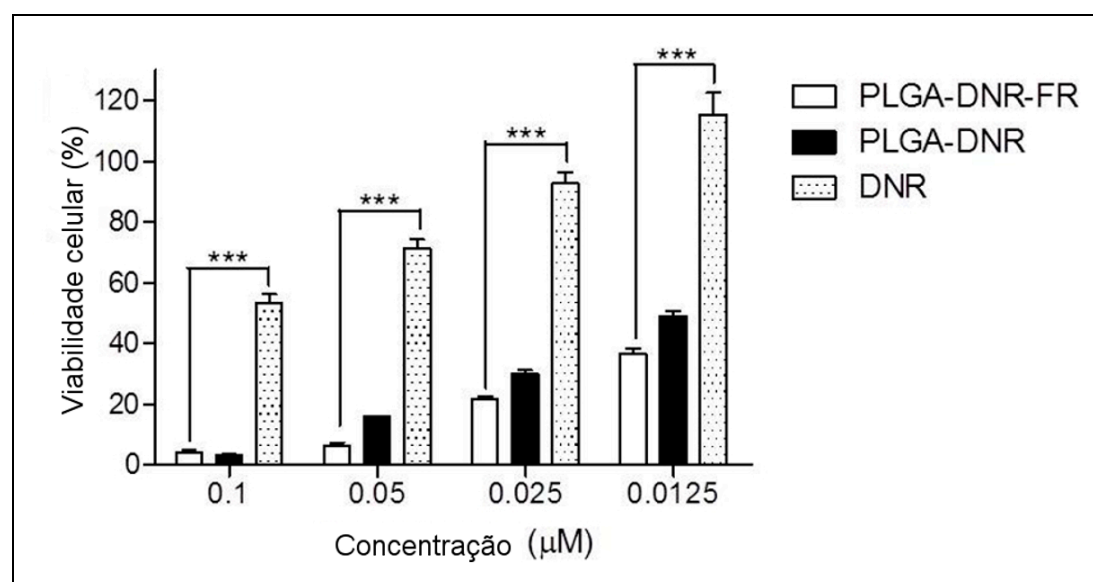
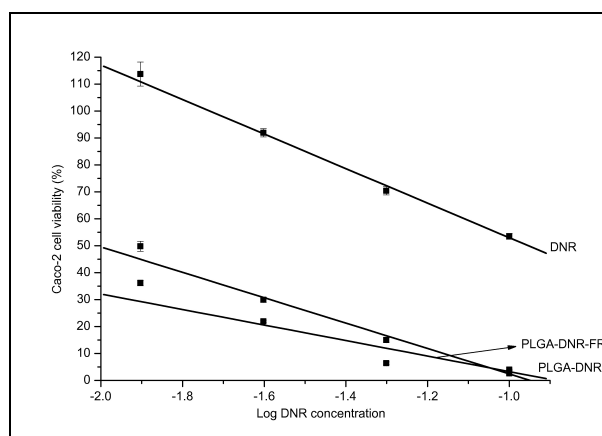


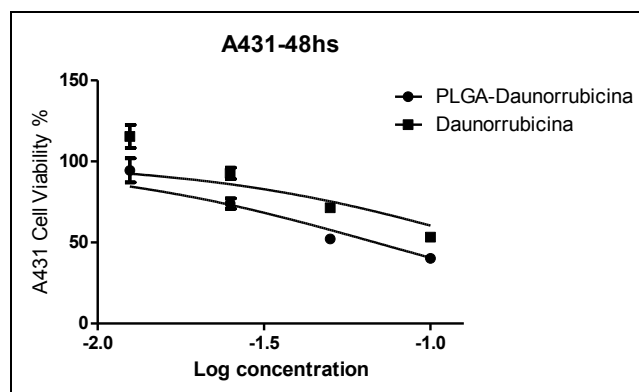
Figura 42: Gráficos de valores de porcentagem de viabilidade em células de Caco-2 após exposição de 48 horas a diferentes concentrações de DNR, livre ou encapsulada em matrizes de PLGA e FR-PLGA, ANOVA, $p < 0,05$.

Como observado na **Figura 42**, após 48 horas de experimento, o efeito da DNR livre foi significativamente menos citotóxica em todas as concentrações testadas quando comparada com a DNR encapsulada. Pode-se inferir que a matriz polimérica de PLGA com ou sem o núcleo magnético controla a liberação de daunorrubicina e aumenta o tempo de ação da droga

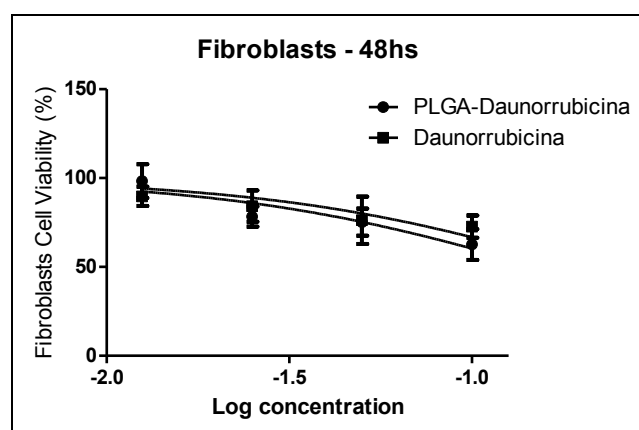
em todas as concentrações testadas, além do efeito do tamanho nanoparticulado dos nanossistemas de fármaco fazendo com que o nanossistema preparado seja mais eficaz no tempo testado do que o fármaco livre [30, 99, 100]. Este experimento também foi realizado em mais duas linhagens celulares, as células A-431, linhagem de carcinoma epidermóide humano, e em fibroblastos, linhagem de células normais. A resposta obtida para ambas foi diferente à das células Caco-2, e foram avaliadas pelo cálculo do IC₅₀. Para confirmar essa ação da daunorrubicina nos sistemas preparados, foram feitos os cálculos de IC₅₀ (concentração letal para 50 % das células) e as curvas estão na **Figura 43 A, B e C** e na **Tabela 9**.



(A)



(B)



(C)

Figura 43: Curvas de IC_{50} de daunorrubicina livre e encapsulada em matriz de PLGA e FR-PLGA no tempo de 48 horas de exposição em células de Caco-2 (A), em células A-431 (B) e em fibroblastos (C).

Tabela 9: Valores de IC_{50} para a daunorrubicina em células de Caco-2.

Caco-2 48 h	DNR	PLGA-DNR	PLGA-DNR-FR
IC_{50} (μM)	0,1110	0,0098	0,0023
r^2	0,9980	0,9959	0,9369
A-431 48 h			
IC_{50} (μM)	0,1028	-	0,069
r^2	0,8946	-	0,6825
Fibroblastos			
IC_{50} (μM)	0,1525	-	0,2007
r^2	0,6429	-	0,1943

Um valor de IC_{50} de 0,0023 μM para a daunorrubicina no nanossistema DNR-FR-PLGA foi observado com as células Caco-2, o que foi

uma diminuição de 48 vezes em relação ao valor correspondente de 0,111 uM para DNR livre. Esses resultados foram atribuídos à degradação da matriz de PLGA durante os experimentos, o que produziu resíduos ácidos que, combinadas com a DNR, aumentam a citotoxicidade desse nanossistema.

Entre os grupos DNR-PLGA e DNR-FR-PLGA não foi observada diferença estatística para as células de Caco-2, mas a diferença de atividade pode indicar a influência de núcleo magnético na liberação da DNR, internalizado nas células durante o tempo do experimento. O PLGA é responsável pela liberação da DNR, que é modulado devido à interação com a parte hidrófila do polímero e, conseqüentemente, a solubilidade em água, tornando-se menos solúveis em solução aquosa de PBS. Os grupos OH das FR podem interagir através de ligações de hidrogênio com a droga e melhorando esta ação [91]. Os materiais de partida foram testados e todos apresentam biocompatibilidade (dados não mostrados). O comportamento das amostras em A-431 e fibroblastos foi diferente ao encontrado em células Caco-2. Observam-se que os nanossistemas contendo as nanopartículas magnéticas são mais citotóxicos do que a droga livre nas três linhagens estudadas.

Tem sido bem estabelecido que drogas quimioterápicas, tais como DNR, concentram em compartimentos mais ácidos, aumentando assim sua citotoxicidade [30, 101]. Estes resultados indicaram que o nanossistema DNR-FR-PLGA é mais eficiente contra as células cancerosas Caco-2, A-431

e fibroblastos do que a DNR livre. A partir dos dados mostrados nas curvas, podemos concluir que, quando a DNR está encapsulada na matriz de PLGA, na presença ou ausência das nanopartículas magnéticas, a citotoxicidade em células de Caco-2, A-431 e fibroblastos é maior em todas as concentrações testadas e apresenta perfis citotóxicos dose-dependente.

Assim, estes sistemas que utilizam FR e PLGA para a liberação de DNR apresentam potencial para matrizes de liberação controlada e podem servir para diminuir as concentrações terapêuticas de DNR, diminuindo assim os possíveis efeitos adversos em tumores sólidos [7].

6.8. Estudos biológicos *in vivo*

Estudos biológicos em camundongos foram feitos para avaliar o efeito da DNR nas amostras preparadas. O modelo de esponja foi utilizado para avaliar parâmetros relacionados com o processo de angiogênese e a ação da daunorrubicina no nanossistema preparado. As quantificações de hemoglobina (Hb), o fator de necrose tumoral (TNF- α) e o fator de crescimento epidermal (VEGF) foram feitas para avaliar a extensão de neovascularização no implante, e as citocinas inflamatórias, a N-acetilglucosaminidase (NAG) e a mieloperoxidase (MPO) para avaliar migração de células imunológicas, neutrófilos e macrófagos para o local do implante. Este modelo é bem estabelecido para estudos de angiogênese inflamatória e para estudos de fatores de crescimento de vasos, importantes parâmetros a serem avaliados em tumores e que estão diretamente ligados com a agressividade dos tumores [68, 69].

6.8.1. Avaliação de neovascularização por quantificação de hemoglobina

A **Figura 44** mostra os níveis de Hb encontrados no local da esponja, após experimento feito como descrito na seção de Materiais e Métodos.

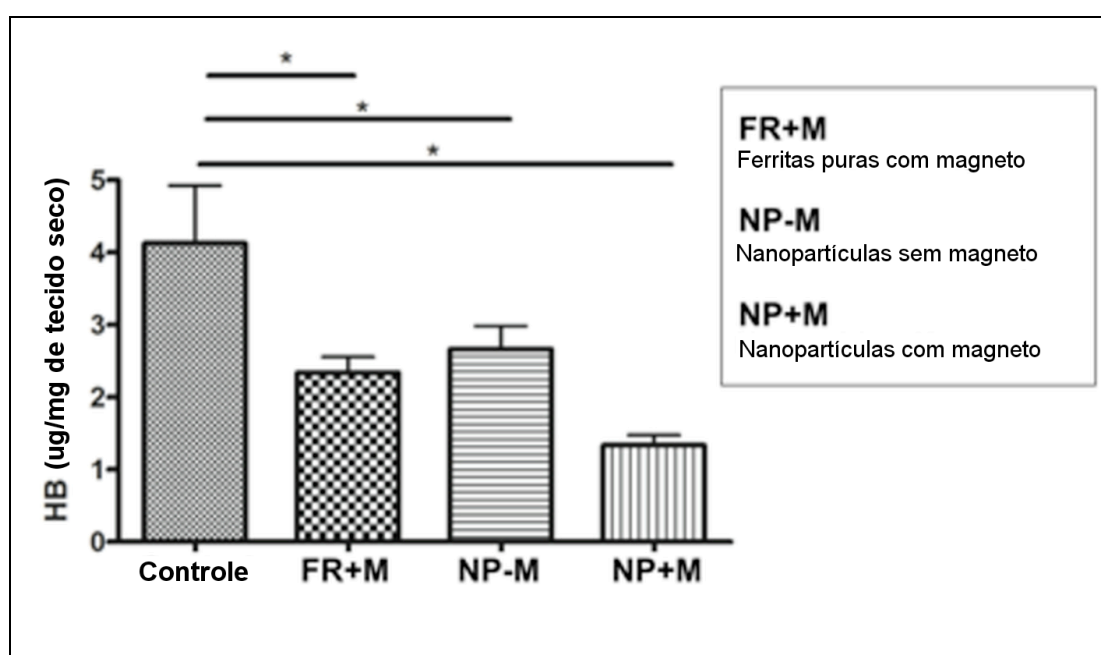


Figura 44: Concentrações de hemoglobina (Hb) nas amostras contendo nanopartículas de FR puras e no nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) com (+M) ou sem (-M) a presença do campo magnético externo (M), após 7 dias de experimento. O grupo controle corresponde aos animais que receberam apenas o implante; * $p < 0,05$.

De acordo com os dados encontrados, pode-se observar que a quantidade de vasos sanguíneos encontrados no implante é menor no grupo de animais no qual foi administrado o nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) na presença do campo magnético externo (+M),

confirmando sua influência na formação dos vasos e, conseqüentemente, na ação da daunorrubicina.

Os animais que receberam o nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) sem a presença do campo (-M) e os que receberam as FR puras na presença do campo (+M) também apresentaram menor doseamento de hemoglobina e formação de vasos, as FR por influência física no local do implante e as DNR-FR-PLGA por permitir que a daunorrubicina circule além do local do implante. Porém, estes dois grupos não apresentam diferença estatística se comparados ao controle. Os resultados do grupo de animais que recebeu somente as FR puras na ausência do campo (-M) não foram mostrados, porque na região estudada não foi observada presença de partículas.

6.8.2. Avaliação dos níveis de citocina VEGF

A **Figura 45** mostra os níveis de fator de crescimento epidermóide (VEGF) para as amostras contendo daunorrubicina.

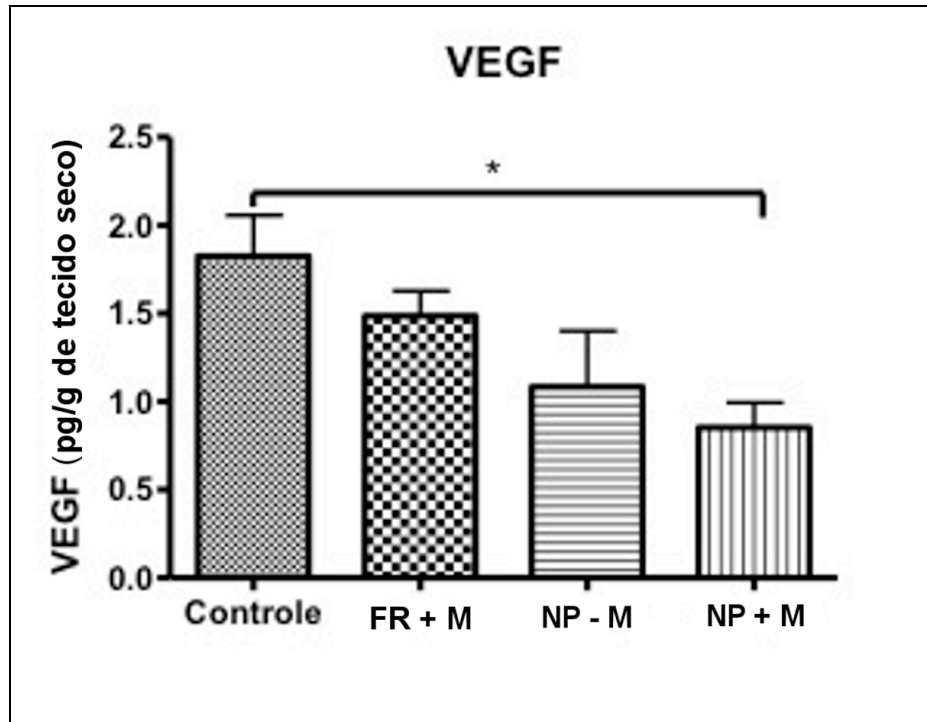


Figura 45: Concentrações de VEGF para amostras de FR puras, DNR-FR-PLGA (representado por NP) com (+M) ou sem (-M) influência de campo magnético (M); * $p < 0,05$.

Segundo dados da literatura, o fator de crescimento epidermal é um indicativo de desenvolvimento de vasos sanguíneos. De acordo com a **Figura 50**, os níveis da citocina pró-angiogênica VEGF são menores para o nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP), indicando menor formação de novos vasos sanguíneos na presença desse material e do ímã (+M), quando comparado com os outros grupos e com o controle, o que sugere propriedade anti-angiogênica maior para DNR-FR-PLGA (representado por NP) do que os outros.

Esses resultados podem ser explicados pela capacidade do campo magnético externo de manter as nanopartículas no local em que a esponja foi

implantada e também pela influência da DNR na formação de novos vasos. As antraciclina, tais como a DNR, inibem o fator de indução de hipóxia (HIF-1), controlando a expressão de genes codificadores de proteínas que desempenham papéis-chave em etapas do desenvolvimento do câncer, incluindo a imortalização e a angiogênese [28]. O nanossistema DNR-PLGA foi testado (dados não mostrados), mas este grupo não apresenta nenhum efeito sob influência do campo magnético.

6.8.3. Avaliação de níveis de citocina TNF- α

Os níveis de citocina TNF- α no grupo controle, no nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP), com e sem influência do campo magnético externo, e FR puras com o campo magnético foram medidos após 7 dias de implantação da esponja e os resultados estão apresentados na **Figura 46**.

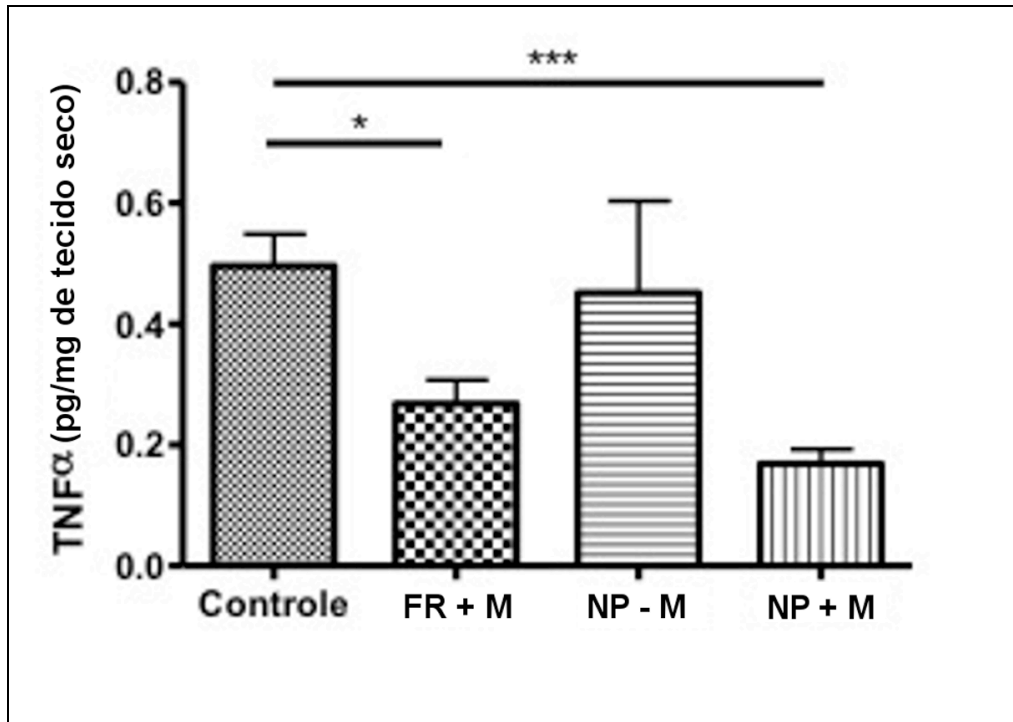


Figura 46: Concentrações de TNF- α nos implantes 7 dias após a aplicação do nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) com (+M) ou sem (-M) influência do campo magnético (M) e também de ferrita pura (FR). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

De acordo com dados da **Figura 46**, observou-se uma produção significativamente maior de TNF- α no grupo que recebeu o nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) na ausência de campo magnético, quando comparado com todos os outros grupos. Entre os demais grupos, observa-se que o grupo em que foi administrado o nanossistema na presença do campo magnético tem a menor produção de TNF- α , quando comparado com o controle. Esse resultado sugere a liberação do fármaco antitumoral e a influência do campo diminua a produção dessa citocina [28]. No entanto, a ferrita também induz a diminuição do TNF- α , fato explicado pela concentração das nanopartículas no local, permitida pela presença do campo

magnético. A produção de TNF- α poderia contribuir para o desenvolvimento e remodelação de tecidos necessária para o crescimento tumoral [102].

6.8.4. Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima associada com processos agudos de inflamação, onde estão envolvidas migrações de células imunológicas, na maioria das vezes, os neutrófilos. As células produzem citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, e o seu papel na resposta inflamatória é relacionado ao recrutamento de neutrófilos presentes na circulação sanguínea. Experimentos de doseamento de MPO foram realizados e os resultados estão ilustrados na **Figura 47**.

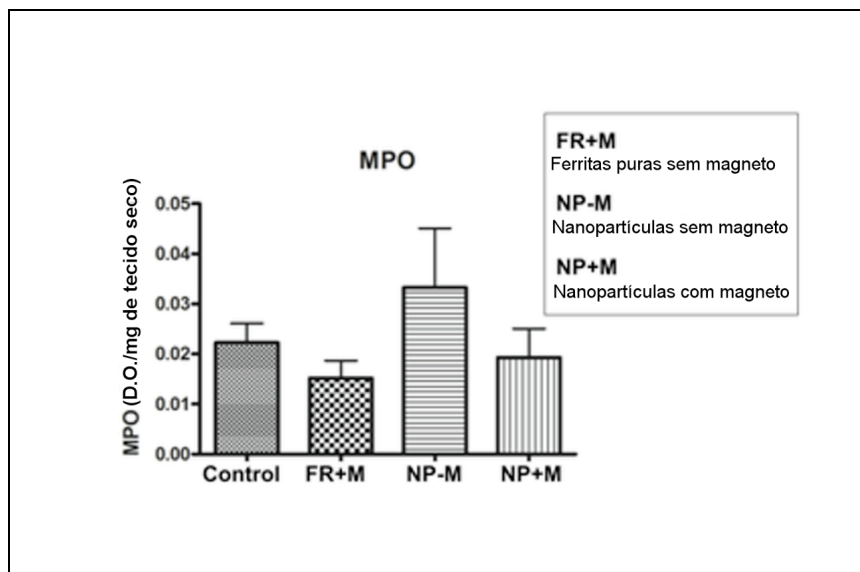


Figura 47: Concentrações de MPO 7 dias após aplicação de nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) e FR puras com (+M) ou sem (-M) influência de um campo magnético externo (M). Não há diferença estatística significativa entre os grupos, método ANOVA.

Analisando os dados obtidos, observou-se que a concentração de DNR no nanossistema, na presença de um campo magnético externo, não influencia a migração dessas células para o local do implante, sugerindo que

estas amostras não induzem resposta inflamatória aguda. Houve aumento dos níveis de MPO nas amostras na ausência de um campo magnético, resultado que poderia explicar a influência dessas células quando o nanossistema não está somente no local do implante.

A aplicação desses nanossistemas não está relacionada à indução de inflamação aguda com, o que poderia ser explicado pela biocompatibilidade do material e também pelo tempo que necessita para ser internalizado pelas células [44, 103]. Esse tempo é necessário para que se iniciem os mecanismos celulares de reconhecimento da natureza desse biomaterial e recrutem as células do sistema imunológico, no entanto não há diferença estatisticamente significativa dos grupos em relação ao controle [104, 105].

6.8.5. Avaliação da atividade da N-acetil-glucosaminidase (NAG)

O marcador de inflamação de n-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) é correlacionada com a avaliação do recrutamento de macrófagos na resposta inflamatória crônica, segundo a literatura [68]. Foram medidas os níveis de NAG nos implantes e os resultados estão apresentados na **Figura 48**.

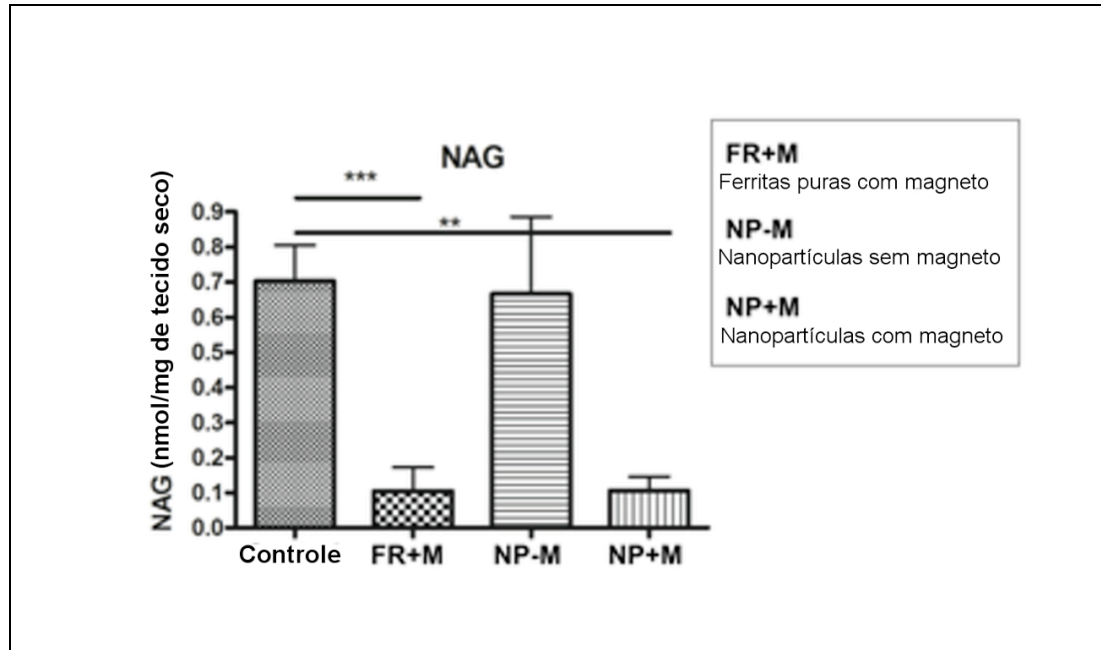


Figura 48: Concentrações de NAG 7 dias após aplicação do nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) e FR puras com (+M) ou sem (-M) influência de um campo magnético externo (M). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A resposta inflamatória do grupo controle revelou maior invasão de macrófagos 7 dias após o implante. Nos grupos que receberam o nanossistema DNR-FR-PLGA (representado por NP) na presença ou não de um campo magnético externo, observam-se menor migração de células imunológicas para o local do implante. Então, pode-se concluir que a contribuição desse nanossistema, na presença do campo magnético, foi menor para o processo inflamatório crônico, relacionado à migração de macrófagos, em relação ao grupo controle, e que o grupo que recebeu o nanossistema sem a presença do campo também apresentou menor migração das células inflamatórias em relação ao controle [5, 102, 106].

Esse resultado mostra a influência das nanopartículas magnéticas presentes no nanossistema e a ação do fármaco no processo inflamatório envolvendo macrófagos.

Os diversos mecanismos celulares promovem a resistência aos quimioterápicos, provocando sua expulsão e limitando sua ação [4, 107]. A diminuição do tamanho das partículas e o aumento de permanência do fármaco no local tem aumentado sua atividade. Sun e colaboradores mostraram que nanossistemas de PLGA com nanopartículas superparamagnéticas em um módulo de terapia para o câncer tiveram alta eficiência para a terapia não-invasiva com recursos da nanotecnologia [26]. Os desafios envolvendo a nanotecnologia e as perspectivas para outras avaliações biológicas foram colocadas como perspectivas futuras.

*Capítulo 7: Conclusões e
Perspectivas futuras*

7. Conclusões

1. As nanopartículas magnéticas sintetizadas a partir de sais de níquel, zinco e ferro foram caracterizadas por difração de raios X, apresentando perfil policristalino e tamanho de partícula entre 10-100 nm. As microscopias eletrônicas de transmissão confirmam o tamanho manométrico e mostram a presença de aglomerados. Essas nanopartículas possuem comportamento superparamagnético, sendo que a ferrita de óxidos de ferro apresentaram magnetização de saturação superior às que se adicionaram níquel e zinco.

2. A caracterização físico-química feita para os nanossistemas contendo citrato de ródio(II) e daunorrubicina, encapsulados em matriz polimérica de PLGA, foi feita por IV e mostraram a presença de bandas características de todos os componentes, a análise de tamanho confirmou valores em torno de 150-300 nm, potencial zeta negativo de -24,7 e -32,4 mV para o nanossistema com citrato de ródio(II) e daunorrubicina, respectivamente, comportamento superparamagnético, concluindo que o complexo inorgânico e o quimioterápico interagiram com a matriz polimérica e se mostraram estáveis devido à repulsão de cargas negativas, como mostrado no potencial zeta, formando sistemas de liberação controlada.

3. Os nanossistemas preparados apresentaram maior atividade citotóxica quando testadas em linhagens de células cancerosas do tipo Caco-2 e A-431 do que os fármacos livres. Porém, apresentaram atividade citotóxica também para linhagem de células fibroblásticas.

4. O nanossistema polimérico-magnético com daunorrubicina apresentou ação mais eficaz e duradoura sobre a neovascularização e produção de citocinas inflamatórias do que o fármaco livre em modelo *in vivo* de angiogênese e há influência do campo magnético externo em sua ação.

5. Os sistemas de liberação controlada preparados neste trabalho têm potencial para serem usados como agentes antitumorais loco-específicos.

8. Perspectivas futuras

O trabalho desenvolvido traz uma série de questões que devem ser exploradas e abre caminho para outras abordagens químicas e biológicas, com o objetivo de entender melhor a estabilidade desses nanossistemas, sua influência no aumento temperatura no local e a eficiência e os mecanismos celulares envolvidos em modelos tumorais induzidos. Como ações futuras, são propostas as atividades seguintes:

- A) Avaliar o comportamento desses nanossistemas em equipamento de hipertermia para conhecer o seu potencial para essa aplicação;
- B) Avaliar o comportamento magnético dos nanossistemas em situações de abaixamento e elevação em relação à temperatura ambiente;
- C) Executar experimentos de *uptake* celular e avaliar as células por microscopias para avaliar as nanopartículas internalizadas;
- D) Realizar os experimentos de avaliação desses nanossistemas em tumores induzidos *in vivo*;

E) Dosagem de citocinas e marcadores celulares em diferentes tipos de tumores, após a aplicação desses nanossistemas.

9. Referências Bibliográficas

- [1] WHO, **World Health Organization**. Health Topics - Cancer. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em 04 de dezembro de 2014.
- [2] INCA, **Instituto Nacional do Câncer**. Disponível em www.inca.gov.br. Acesso em 07 de dezembro de 2014.
- [3] Bissel MJ, Radisky, D. Putting tumours in context. **Nature Reviews Cancer**. 2001; 1:46-54.
- [4] Iyer AK, Singh A, Ganta S, Amiji MM. Role of integrated cancer nanomedicine in overcoming drug resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2013;65:1784-802.
- [5] Castellanos A, Vicente-Dueñas C, Campos-Sánchez E, Cruz JJ, García-Criado FJ, García-Cenador MB, et al. Cancer as a reprogramming-like disease: implications in tumor development and treatment. **Semin Cancer Biol**. 2010;20:93-7.
- [6] Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. **Nature Reviews Cancer**. 2012;12:39-50.
- [7] Oliveira LB. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. **Vitalle**. 2010; 22:11-22.
- [8] Oliveira M, Guimarães PG, Gomes AM, Suárez D, Sinisterra R. Strategies to target tumors using nanodelivery systems based on biodegradable polymers, aspects of intellectual property, and market. **Journal of Chemical Biology**. 2013;6:7-23.
- [9] Møller T. At cancer diagnosis: a 'window of opportunity' for behavioural change towards physical activity. A randomised feasibility study in patients with colon and breast cancer. **BMJ Open**. 2013;3:1-12.
- [10] Barnes KR, Lippard SJ. Cisplatin and related anticancer drugs: Recent advances and insights. **Metal Ions in Biological Systems, Vol 42: Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents**. 2004;42:143-77.
- [11] Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2005;4:307-20.
- [12] Mobahat M, Narendran A, Riabowol K. Survivin as a Preferential Target for Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. 2014;15:2494-516.
- [13] Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**. 2013;13:511-8.
- [14] Vergaro V, Scarlino F, Bellomo C, Rinaldi R, Vergara D, Maffia M, et al. Drug-loaded polyelectrolyte microcapsules for sustained targeting of cancer cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2011;63:847-63.
- [15] Graf N, Lippard SJ. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2012;64:993-1004.
- [16] Sinisterra RD, Shastri VP, Najjar R, Langer R. Encapsulation and release of rhodium(II) citrate and its association complex with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin from biodegradable polymer microspheres. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 1999;88:574-6.

- [17] Sheppard RJ, JB, Sebag IA. Cardiotoxicity of cancer therapeutics: current issues in screening, prevention, and therapy. **Frontiers in Pharmacology**. 2013;4:1-10.
- [18] Souza AR, Najjar R, Glikmanas S, Zyngier SB. Water-soluble rhodium(II) carboxylate adducts: Cytotoxicity of the new compounds. **Journal of Inorganic Biochemistry**. 1996;64:1-5.
- [19] Zhang C, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. **Current Opinion Chemical Biology**. 2003;7:481-9.
- [20] Burgos AE, Belchior JC, Sinisterra RD. Controlled release of rhodium(II) carboxylates and their association complexes with cyclodextrins from hydroxyapatite matrix. **Biomaterials**. 2002;23:2519-26.
- [21] Katsaros N, Anagnostopoulou A. Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2002;42:297-308.
- [22] Bocanegra-Diaz A, Mohallem NDS, Novak MA, Sinisterra RD. Preparation of ferrofluid from cyclodextrin and magnetite. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2004;272:2395-7.
- [23] Liu X, Kaminski MD, Riffle JS, Chen H, Torno M, Finck MR, et al. Preparation and characterization of biodegradable magnetic carriers by single emulsion-solvent evaporation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2007;311:84-7.
- [24] Rana S, Gallo A, Srivastava RS, Misra RDK. On the suitability of nanocrystalline ferrites as a magnetic carrier for drug delivery: Functionalization, conjugation and drug release kinetics. **Acta Biomaterialia**. 2007;3:233-42.
- [25] Bocanegra A, Mohallem NDS, Sinisterra RD. Complex material using beta-cyclodextrins and nickel-zinc ferrite to obtain a magnetically targetable drug carrier. **Symposia on Physical Characterization of Biological Materials and Systems/Polymeric Biomaterials for Tissue Engineering/BioInspired Materials-Moving Toward Complexity**. Boston, MA; 2002, p. 289-94.
- [26] Sun C, Lee JSH, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2008;60:1252-65.
- [27] Ma P, Mumper RJ. Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review. **Nano Today**. 2013;8:313-31.
- [28] Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2009;106:2353-8.
- [29] Yang XL, Wang AHJ. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. **Pharmacology & Therapeutics**. 1999;83:181-215.
- [30] Wang J, Chen B, Chen J, Cai X, Xia G, Liu R, et al. Synthesis and antitumor efficacy of daunorubicin-loaded magnetic nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**. 2011;6:203-11.
- [31] Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. **Chemical Reviews**. 2012;112:5818-78.
- [32] Faraji AH, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 2009;17:2950-62.

-
- [33] Huang RB, Mocherla S, Heslinga MJ, Charoenphol P, Eniola-Adefeso O. Dynamic and cellular interactions of nanoparticles in vascular-targeted drug delivery (review). **Molecular Membrane Biology**. 2010;27:312-27.
- [34] Durán N, Mattoso LHC, Morais PC. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1^o edição. Editora Artliber. 2006; 208 pp.
- [35] Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. **Nanomedicine**. 2007;2:23-39.
- [36] Xu C, Sun S. Monodisperse magnetic nanoparticles for biomedical applications. **Polymer International**. 2007;56:821-6.
- [37] Vekas L, Bica D, Avdeev MV. Magnetic nanoparticles and concentrated magnetic nanofluids: Synthesis, properties and some applications. **China Particuology**. 2007;5:43-9.
- [38] Zhao Z, Bian Z, Chen L, He X, Wang Y. Synthesis and surface-modifications of iron oxide magnetic nanoparticles and applications on separation and analysis. **Progress in Chemistry**. 2006;18:1288-97.
- [39] Davis ME. Clinical Developments in Nanotechnology for Cancer Therapy. **Pharmaceutical Research**. 2011;28:187-99.
- [40] Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R. Magnetic nanoparticles for MR imaging: agents, techniques and cardiovascular applications. **Basic Research in Cardiology**. 2008;103:122-30.
- [41] Rivas J, Bañobre-López M, Piñeiro-Redondo Y, Rivas B, López-Quintela MA. Magnetic nanoparticles for application in cancer therapy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2012;324:3499-502.
- [42] Higashihara H, Murakami T, Kim T, Hori M, Onishi H, Nakata S, et al. Differential diagnosis between metastatic tumors and nonsolid benign lesions of the liver using ferucarbotran-enhanced MR imaging. **European Journal of Radiology**. 2010;73:125-30.
- [43] Gautier J, Allard-Vannier E, Munnier E, Souce M, Chourpa I. Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. 2013;169:48-61.
- [44] Lu AH, Salabas EL, Schuth F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie-International Edition**. 2007;46:1222-44.
- [45] Cullity BD, Graham CD. **Introduction to Magnetic Materials**. 2nd edition. Wiley editor. 2011; 568 pp.
- [46] Yang J, Park SB, Yoon H-G, Huh YM, Haam S. Preparation of poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. **International Journal of Pharmaceutics**. 2006;324:185-90.
- [47] Nagano H, Machida Y, Iwata M, Imada T, Noguchi Y, Matsumoto A, et al. Preparation of magnetic granules containing bleomycin and its evaluation using

model esophageal cancer. **International Journal of Pharmaceutics**. 1997;147:119-25.

[48] Gaihre B, Khil MS, Lee DR, Kim HY. Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: Drug loading and in vitro drug release study. **International Journal of Pharmaceutics**. 2009;365:180-9.

[49] Kayal S, Ramanujan RV. Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery. **Materials Science and Engineering: C**. 2010;30:484-90.

[50] Zhu HY, Jiang R, Xiao L, Zeng GM. Preparation, characterization, adsorption kinetics and thermodynamics of novel magnetic chitosan enwrapping nanosized γ - Fe_2O_3 and multi-walled carbon nanotubes with enhanced adsorption properties for methyl orange. **Bioresource Technology**. 2010;101:5063-9.

[51] Denadai AML, De Sousa FB, Passos JJ, Guatimosim FC, Barbosa KD, Burgos AE, et al. Self-assembled organic-inorganic magnetic hybrid adsorbent ferrite based on cyclodextrin nanoparticles. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**. 2012;8:1867-76.

[52] Ying Zhang HFC, Kam W. Leong. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2013;65:104-20.

[53] Desai PP, Date AA, Patravale VB. Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations – opportunities and limitations. **Drug Discovery Today: Technologies**. 2012;9:e87-e95.

[54] Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. **Journal of Controlled Release**. 2013;166:182-94.

[55] Guo B, Ma PX. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. **Science China-Chemistry**. 2014;57:490-500.

[56] Brannon-Peppas L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. 1995;116:1-9.

[57] Hsu S-h, Huang S, Wang Y-C, Kuo Y-C. Novel nanostructured biodegradable polymer matrices fabricated by phase separation techniques for tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**. 2013; 9(6):6915-6927.

[58] Li Y, Jiang HL, Zhu KJ, Liu JH, Hao YL. Preparation, characterization and nasal delivery of α -cobrotoxin-loaded poly(lactide-co-glycolide)/polyanhydride microspheres. **Journal of Controlled Release**. 2005;108:10-20.

[59] Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications. **International Journal of Pharmaceutics**. 2013; 445(1-2):181-195.

[60] Kreuter J. Nanoparticles: a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**. 2007;331:1-10.

[61] Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 1997;28:5-24.

- [62] Dimitrios Bikiaris VK, Evangelos Karavas. Novel Biodegradable Polyesters. Synthesis and Application as Drug Carriers for the Preparation of Raloxifene HCl Loaded Nanoparticles. **Molecules**. 2009;14:2410-30.
- [63] Arshady R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. **Journal of Controlled Release**. 1991;17:1-21.
- [64] Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Science**. 2008;99:1501-6.
- [65] Jie Liu ZQ, Shenqi Wang, Lei Zhou and Shengmin Zhang. A modified double-emulsion method for the preparation of daunorubicin-loaded polymeric nanoparticle with enhanced *in vitro* anti-tumor activity. **Biomedical Materials**. 2010;5:10 pp.
- [66] Wang C, Ye W, Zheng Y, Liu X, Tong Z. Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly. **International Journal of Pharmaceutics**. 2007;338:165-73.
- [67] Xiao K, Luo J, Fowler WL, Li Y, Lee JS, Xing L, et al. A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer. **Biomaterials**. 2009;30:6006-16.
- [68] Castro PR, Marques SM, Campos PP, Cardoso CC, Sampaio FP, Ferreira MAND, et al. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. **Microvascular Research**. 2012;84:9-15.
- [69] Marques SM, Campos PP, Castro PR, Cardoso CC, Ferreira MAND, Andrade SP. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. **Microvascular Research**. 2011;82:246-52.
- [70] Utrera-Barillas D, Castro-Manreza M, Castellanos E, Gutierrez-Rodriguez M, Arciniega-Ruiz de Esparza O, Garcia-Cebada J, et al. The role of macrophages and mast cells in lymphangiogenesis and angiogenesis in cervical carcinogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**. 2010;89:190-6.
- [71] *In vivo* Magnetoinfection short protocol. Disponível em [www.ozbiosciences.com/ Technologies & Applications/In vivo magnetofection](http://www.ozbiosciences.com/Technologies%20&%20Applications/In%20vivo%20magnetofection). Acesso em 25 de abril de 2014.
- [72] Mendes JB, Rocha MA, Araujo FA, Moura SAL, Ferreira MAND, Andrade SP. Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. **Microvascular Research**. 2009;78:265-71.
- [73] Teixeira AS, Araujo FA, Ferreira M, Barcelos LS, Teixeira MM, Andrade SP. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. **Life Sciences**. 2006;78:1637-45.
- [74] Li, SZ Tonglai, T, Runze, Q, Hao, W, Caiqin, Z *et al.* Solvothermal synthesis and characterization of monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2015; 379:226-231.
- [75] Hashim M, Alimuddin, Kumar S, Shirsath SE, Kotnala RK, Chung H, et al. Structural properties and magnetic interactions in Ni_{0.5}Mg_{0.5}Fe₂Cr_xO₄ ferrite nanoparticles. **Powder Technology**. 2012;229:37-44.

- [76] Cheng F-Y, Su C-H, Yang Y-S, Yeh C-S, Tsai C-Y, Wu C-L, et al. Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. **Biomaterials**. 2005;26:729-38.
- [77] Long GJ, Grandjean, F. **Mössbauer Spectroscopy Applied to Magnetism and Materials Science - Modern Inorganic Chemistry Series**. 1st edition. Springer US editor. 1993; 239 pp.
- [78] Gorski CA, Scherer MM. Determination of nanoparticulate magnetite stoichiometry by Mossbauer spectroscopy, acidic dissolution, and powder X-ray diffraction: A critical review. **American Mineralogist**. 2010;95:1017-26.
- [79] Deacon GB, Philips, R.J. **Coordination Chemistry Review**. 1980;33:227-50.
- [80] Deacon GB, Huber, F., Philips, R.J. Diagnosis of the nature of carboxylate coordination from the direction of shifts of carbon–oxygen stretching frequencies. **Inorganica Chimica Acta**. 1985:41-5.
- [81] Layre A, Couvreur P, Chacun H, Richard J, Passirani C, Requier D, et al. Novel composite core-shell nanoparticles as busulfan carriers. **Journal of Controlled Release**. 2006;111:271-80.
- [82] Davis ME. Fighting cancer with nanoparticle medicine - The Nanoscale Matters. **MRS - Materials Research Society**. Boston, MA; 2012. p. 8.
- [83] Fernández-Carballido A, Pastoriza P, Barcia E, Montejo C, Negro S. PLGA/PEG-derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: Characterization and cell viability studies. **International Journal of Pharmaceutics**. 2008;352:50-7.
- [84] Wen TK, Kannan M. Cobalt-based magnetic nanocomposites: fabrication, fundamentals and applications. **Journal Physics D: Applied Physics**. 2011; 44(39): 393001.
- [85] Lu, AH; Salabas, EL; Schuth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angewandte Chemie International Edition**. 2007; 46:1222–1244.
- [86] Arias JL, López-Viota M, Ruiz MA, López-Viota J, Delgado AV. Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/shell nanoparticles for biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**. 2007;339:237-45.
- [87] Trynda L, Pruchnik F. Interaction of tetra- μ -acetatodirhodium(II) with human serum-albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**. 1995; 58:69-77.
- [88] Fernandez-Carballido A, Pastoriza P, Barcia E, Montejo C, Negro S. PLGA/PEG-derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: Characterization and cell viability studies. **International Journal of Pharmaceutics**. 2008;352:50-7.
- [89] Xu D, Wang X, Ding L. Spectroscopic studies on the interaction of gamma-cyclodextrin daunorubicin inclusion complex with herring sperm DNA. **Carbohydrate Polymers**. 2011;83:1257-62.
- [90] Haider A, Gupta KC, Kang I-K. PLGA/nHA hybrid nanofiber scaffold as a nanocargo carrier of insulin for accelerating bone tissue regeneration. **Nanoscale Research Letters**. 2014;9.

- [91] Nigam S, Barick KC, Bahadur D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2011;323:237-43.
- [92] O'Neil MJ. **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 14th edition. Merck and Co. editor. New Jersey.2006.
- [93] Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 1997;28:5-24.
- [94] Nigam S, Barick KC, Bahadur D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2011;323:237-43.
- [95] Marquette S, Peerboom C, Yates A, Denis L, Langer I, Amighi K, et al. Stability study of full-length antibody (anti-TNF- α) loaded PLGA microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**. 2014;470:41-50.
- [96] Gülistan Tansık AY, Ufuk Gündüz. Tailoring magnetic PLGA nanoparticles suitable for doxorubicin delivery. **Journal Nanoparticle Research**. 2014;16:1-13.
- [97] Hwa Seung Han JL, Hyun Ryoung Kim et al. Robust PEGylated hyaluronic acid nanoparticles as the carrier of doxorubicin: Mineralization and its effect on tumor targetability *in vivo*. **Journal of Controlled Release**. 2013;168:105-14.
- [98] Suvakanta Dash Pnm, Lilakanta Nath, Prasanta Chowdhury. Kinetic Modeling On Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems. **Acta Poloniae Pharmaceutica/ Drug Research**. 2010;67:217-23.
- [99] Lu T, Jing X, Song X, Wang X. Doxorubicin-Loaded Ultrafine PEG-PLA Fiber Mats Against Hepatocarcinoma. **Journal of Applied Polymer Science**. 2012;123:209-17.
- [100] X. Wang RZ, C. Wu, Y. Dai, M. Song, S. Gutmann, F. Gao, G. Lv, J. Li, X. Li, Z. Guan, D. Fu, B. Chen, J. The application of Fe₃O₄ nanoparticles in cancer research: A new strategy to inhibit drug resistance. **Biomedical Materials Research A**. 2007;80:852-60.
- [101] Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents *in vitro*. **Biochemical Pharmacology**. 2003;66:1207-18.
- [102] Viana CTR, Campos PP, Carvalho LA, Cenedezi JM, Lavall L, Lopes MTP, et al. Distinct types of tumors exhibit differential grade of inflammation and angiogenesis in mice. **Microvascular Research**. 2013;86:44-51.
- [103] Jia Y, Yuan M, Yuan H, Huang X, Sui X, Cui X, et al. Co-encapsulation of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**. 2012;7:1697-708.
- [104] Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**. 2008;5:505-15.
- [105] Alexis F, Rhee JW, Richie JP, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. **Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations**. 2008;26:74-85.

[106] Ferreira M, Barcelos LS, Campos PP, Vasconcelos AC, Teixeira MM, Andrade SP. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). **British Journal of Pharmacology**. 2004;141:1185-92.

[107] Jain S, Doshi AS, Iyer AK, Amiji MM. Multifunctional nanoparticles for targeting cancer and inflammatory diseases. **Journal of Drug Targeting**. 2013;21:888-903.
