

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Ana Paula de Figueiredo Monteiro

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS
MAGNÉTICAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
FÁRMACOS E HIPERTERMIA**

Belo Horizonte

2018

UFMG/ICEx/DQ. 1275^a
T. 575^a

Ana Paula de Figueiredo Monteiro

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS
MAGNÉTICAS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE
FÁRMACOS E HIPERTERMIA**

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

Belo Horizonte

2018

M775p
2018
T

Monteiro, Ana Paula de Figueiredo
Preparação e caracterização de nanofibras
magnéticas para liberação controlada de fármacos e
hipertemia [manuscrito] / Ana Paula de Figueiredo
Monteiro. 2018.

[x], 118 f.: il.

Orientador: Rubén Dario Sinisterra Millán.

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

Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica - Teses 2. Preparações de
liberação controlada - Teses 3. Nanopartículas - Teses
4. Hidroxiapatita - Teses 5. Mitomicina C - Teses 6.
Sulfametoxazol - Teses 7. Fármacos - Teses 8. Agentes
antineoplásicos - Teses I. Sinisterra Millán, Rubén
Dario, Orientador II. Título.

CDU 043



"Preparação e Caracterização de Nanofibras Magnéticas para Liberação Controlada de Fármacos e Hipertemia"

Ana Paula de Figueiredo Monteiro

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador
UFMG

Profa. Eliana Martins Lima
UFG

Prof. Luiz Henrique Catalani
USP

Profa. Nelcy Della Santina Mohallem
UFMG

Prof. Fabiano Vargas Pereira
UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2018.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do
Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra Millán

*A minha mãe
Ao Cayo, com todo amor e carinho*

“Se vi mais longe foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas oportunidades e conquistas.

Ao Cayo, por todo companheirismo, paciência e ajuda. Com você tudo se torna mais bonito, colorido, leve e alegre.

À minha família, minha base e exemplo. Vó Preta pelas orações e ensinamentos; minhas tias e tios pelo incentivo e apoio de sempre; meus irmãos Paulo e Alessandro pelos conselhos, confiança e apoio. Em especial minha querida mãe, minha maior gratidão e orgulho, eternamente presente em meu coração.

Aos meus amigos, por tornarem essa jornada mais descontraída e alegre.

À minha segunda família, Luiza, Wilson e Igor, por todo apoio e carinho.

Ao Emilio, pela ajuda imensurável, apoio e carinho.

Ao Professor Rubén pela orientação, oportunidade, inspiração e, sobretudo confiança. Sem dúvida suas contribuições foram essenciais para meu crescimento profissional e pessoal.

À Professora Maria Esperanza, pela ajuda, conselhos e prontidão. Sua colaboração e ensinamentos foram extremamente importantes para conclusão desse trabalho.

À minha querida amiga Ana Pinzón, pela parceria, amizade e apoio. Obrigada pelos momentos de descontração e indispensáveis ajudas durante essa caminhada.

Aos membros e ex-membros do LEMB, pelas contribuições, boas conversas e sugestões. Foi uma honra conhecer, conviver e aprender com todos vocês. Em especial as alunas de iniciação científica Jéssica e Amanda, pela confiança e aprendizados compartilhados. A Millena e a Karina Scheuermann pelo suporte e prontidão de sempre.

Ao Professor Ricardo Orlando, pelos ensinamentos e ajuda nas análises por UPLC-MS.

Aos Professores Humberto Stumpf e Luciano Lara do Departamento de Química da UFMG pela colaboração e auxílio nas análises de magnetização.

À Professora Rosana Zacarias e ao aluno Davyston do Departamento de Química da UFMG pela colaboração e auxílio nas análises de hipertermia magnética.

À Professora Maria Irene Yoshida do Departamento de Química da UFMG pelas análises térmicas dos materiais.

Ao Professor José Domingos Ardisson do CDTN, pela prontidão e análises por espectroscopia Mössbauer.

Ao Professor Luiz Carlos Oliveira do Departamento de Química da UFMG pelas análises de adsorção/dessorção de N₂ dos materiais.

Ao Laboratório de Espectroscopia Raman do Departamento de Física da UFMG, em especial o aluno Eliel pelo auxílio nas análises por espectroscopia Raman.

Ao Professor Frederico Barros da UNIFEI pela prontidão, sugestões e análises de ângulo de contato.

À Professora Adriana Abalen do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela doação das células de osteosarcoma e pelo apoio inestimável nos testes *in vitro* com células.

As Professoras Paula Peixoto, Sílvia Passos e Lucíola Barcelos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em especial aos alunos Celso e Mariane pela colaboração nos testes *in vivo*.

Ao Professor Luis Eduardo Soares Netto do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da USP pela doação das células de pré-osteoblastos.

Aos Professores Nelcy Mohallem, Luciano Montoro, Fabiano Vargas, Eduardo Gensen, Eliana Martins e Luiz Catalani pelas sugestões e contribuições nesse trabalho.

Aos Professores Eduardo Nicolau, Vinicius Caliman, Ana Luiza Quadros, Ângelo de Fátima e Gilson Freitas pelos conhecimentos adquiridos nas disciplinas.

Ao Departamento de Química e a Pós Graduação pelo suporte na realização desse trabalho.

À agência de fomento CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1:	
1.1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....	1
1.2 ESTADO DA ARTE.....	3
1.2.1 Liberação controlada de fármacos	3
1.2.1.1 Sistemas poliméricos nanoparticulados.....	4
1.2.1.2 Nanopartículas Magnéticas e suas aplicações	7
1.2.1.3 Eletrofiação e Nanofibras Poliméricas	8
1.2.2 Hidroxiapatita e medicina regenerativa	11
1.2.3 Mitomicina C e seu potencial citotóxico.....	14
1.3 PROPOSTA DO TRABALHO	16
1.4 OBJETIVOS.....	16
1.4.1 Objetivos gerais.....	16
1.4.2 Objetivos específicos	16
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS:	
2.1 Reagentes utilizados	19

2.1.1	Polímero (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)-PLGA 50:50	19
2.1.2	Fosfato de sódio	19
2.1.3	Nitrato de cálcio tetrahidratado	20
2.1.4	Cloreto de ferro II tetrahidratado.....	20
2.1.5	Sulfametoxazol	20
2.1.6	Mitomicina C	21
2.1.7	N,N - dicitcloexilcarbodiimida.....	22
2.1.8	N-hidroxissuccinimida.....	22
2.1.9	Outros reagentes.....	23
2.2	Equipamentos	23
2.2.1	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho	23
2.2.2	Análise Térmica.....	23
2.2.3	Espectroscopia Raman.....	23
2.2.4	Espectroscopia Mössbauer	23
2.2.5	Liofilização	24
2.2.6	Espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES) ..	24
2.2.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	24
2.2.8	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	24
2.2.9	Difratometria de Raios X.....	25
2.2.10	Espectroscopia de Absorção UV-Visível	25
2.2.11	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS)	25

2.2.12	Medidas de magnetização	26
2.2.13	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	26
2.2.14	Equipamento de Eletrofição.....	26
2.2.15	Isoterma de adsorção e área superficial.....	26
2.2.16	Ângulo de contato.....	26
2.2.17	Medidas de hipertermia magnética.....	27
2.3	Preparações dos sistemas de liberação controlada.....	27
2.3.1	Preparação da nanohidroxiapatita magnéticas (n-HAm)	27
2.3.2	Funcionalização do PLGA com sulfametoxazol (PLGA-S)	28
2.3.3	Preparação das nanofibras.....	28
2.4	Perfil de liberação do fármaco.....	29
2.5	Análises Biológicas	30
2.5.1	Testes em cultura celular.....	30
2.5.2	Testes microbiológicos	31
2.5.3	Testes in vivo.....	32
2.5.4	Análise estatística.....	34

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1	Preparação e caracterização das nanohidroxiapatita magnéticas (n-HAm).....	36
3.1.1	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma (ICP-OES) .	36
3.1.2	Isoterma de adsorção e área superficial.....	38
3.1.3	Difração de Raios-X.....	39

3.1.4 Espectroscopia Raman.....	40
3.1.5 Espectroscopia de Adsorção na Região do Infravermelho (FTIR).....	41
3.1.6 Espectroscopia de Mössbauer.....	43
3.1.7 Medidas de Magnetização	47
3.1.8 Morfologia e Tamanho	51
3.2 Preparação e caracterização do PLGA funcionalizado com sulfametoxazol (PLGA-S)	52
3.2.1 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)	53
3.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN) e Quantificação de SMZ na PLGA-S.....	55
3.3 Preparação e Caracterização das Nanofibras Magnéticas	64
3.3.1 Morfologia e Composição	64
3.3.2 Medidas de Ângulo de contato	68
3.3.3 Difração de Raios-x	70
3.3.4 Espectroscopia na região do Infravermelho por transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR).....	72
3.3.5 Análise Térmica	74
3.3.6 Medidas de magnetização.....	79
3.3.7 Medidas de hipertermia magnética.....	81
3.4 Perfil de liberação.....	83
3.4.1 Liberação in vitro da MCC	83

3.4.2 Liberação in vitro da SMZ.....	86
3.5 Testes Biológicos	87
3.5.1 Testes <i>in vitro</i>	87
3.5.2 Teste <i>in vivo</i>	95
3.5.3 Testes microbiológicos	97
CAPÍTULO 4:	
4.1 Conclusões	102
4.2 Perspectivas futuras	104
Referências Bibliográficas	105
ANEXO 1	119

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Figura 1.1 – Taxa bruta de incidência de câncer no Brasil por 100 mil habitantes de cada gênero (todas as neoplasias malignas/INCA-2014) ¹ 1

Figura 1.2 – (a) Esquema de fabricação de nanofibras alinhadas e não alinhadas (b) Diferentes tipos de nanofibras que podem ser produzidas por eletrospinação ⁶⁶ 9

Figura 1.3 - Imagens de TEM (a-b) e MEV (c-d) das nanofibras: (a) antes e (b-d) após adição de nanopartículas de Fe₃O₄. * Uma fotografia da nanofibra foi colocada à esquerda da imagem de MEV (c) ⁷⁵ 11

CAPÍTULO 2 - MATERIAS E MÉTODOS

Figura 2.1 – Tratamento de hipertermia magnética do teste premilinar *in vivo* 33

CAPÍTULO 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 3.1 – Isotermas de adsorção e medidas de área superficial das n-HAm por BET. Parâmetros do BET: C1 = 61,875; C2 = 47,618; C3 = 76,189. R > 0,999. 38

Figura 3.2 – Difractogramas de raios-X da n-HA e n-HAm sintetizadas. As setas indicam a presença dos picos correspondentes a magnetita. 39

Figura 3.3 – Espectro Raman da n-HA e n-HAm sintetizadas. Laser de 647 nm. 40

Figura 3.4 – Espectros de FTIR das n-HA e n-HAm sintetizadas. 42

Figura 3.5 – Espectros Mössbauer de ⁵⁷Fe obtidos a 300 K e 80 K da amostra de n-HAm. 44

Figura 3.6 – Curva de histerese da n-HAm obtida por SQUID à 300K. 47

Figura 3.7 – Magnetização dependente da temperatura das n-HAm. Curvas de FCM e ZFCM com aplicação de campo de 20 Oe.	49
Figura 3.8 - Curva de histerese das n-HAm obtida por SQUID à 4K. ...	50
Figura 3.9 – (A)(C) Micrografias de TEM das n-HAm. Histogramas do (B) diâmetro e (D) largura das n-HAm. *Setas em branco na micrografia (a) indicam domínios de óxido de ferro sobre os bastonetes de n-HA.	51
Figura 3.10 – Esquema da reação de funcionalização do PLGA com SMZ através dos reagentes DCC/NHS. ³¹	52
Figura 3.11 - Espectros de FTIR do PLGA-S (linha preta), PLGA (linha azul) e SMZ (linha vermelha). A seta indica a formação da ligação amídica e o quadrado pontilhado mostra bandas referentes a SMZ.	53
Figura 3.12 – Espectro de RMN ¹ H da SMZ em DMSO, 400 MHz.	55
Figura 3.13 – Espectro de RMN ¹³ C da SMZ em DMSO, 400 MHz.	56
Figura 3.14 – Espectro de RMN ¹ H do PLGA em DMSO, 400 MHz.	57
Figura 3.15 – Espectro de RMN ¹³ C do PLGA em DMSO, 400 MHz. ...	58
Figura 3.16 – Espectro de RMN ¹ H do PLGA-S em DMSO, 400 MHz..	59
Figura 3.17 – Espectro de RMN ¹³ C com DEPT do PLGA-S em DMSO, 400 MHz.	60
Figura 3.18 – Espectro de RMN ¹ H do PLGA-S com integração em DMSO, 400 MHz.	63
Figura 3.19 – Micrografias SEM das nanofibras de PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC e seus respectivos espectros de EDX e histogramas de diâmetro.	65
Figura 3.20 – Micrografias SEM das nanofibras de PLGA-S preparadas e seus respectivos espectros de EDX e histogramas de diâmetro.	66
Figura 3.21 – Micrografias TEM das nanofibras contendo n-HAm e MCC.	67
Figura 3.22 – Ilustração dos ângulos de contato em superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas.	68

Figura 3.23 – Medidas do ângulo de contato de PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm15, PLGA/HAm, PLGA-S, PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC. Análise estatística com *p < 0,05; *** p < 0,001 e ns = diferença não significativa. Obs. PLGAHAm15 contém 15 % de n-HAm, as demais possuem 30%..... 69

Figura 3.24 – Difractogramas de raios-x das nanofibras com matrizes de PLGA. (a) PLGA/HAm/MCC, (b) PLGA/HAm, (c) PLGA/HAm 15, (d) PLGA/MCC e (e) PLGA. Obs. A nanofibra de PLGA/HAm15 contém 15% de n-HAm as demais nanofibras contém 30% de n-HAm. 70

Figura 3.25 – Difractogramas de raios-x das nanofibras com matrizes de PLGA-S. (a) PLGA-S/HAm/MCC, (b) PLGA-S/HAm, (c) PLGA-S/MCC e (d) PLGA-S. Em destaque picos atribuídos às n-HAm e setas mostrando o surgimento de novos picos após funcionalização do PLGA..... 71

Figura 3.26 – Espectros de ATR-FTIR das nanofibras com matrizes de PLGA: (a) PLGA; (b) PLGA/MCC; (c) PLGA/HAm e (d) PLGA/HAm/MCC. As setas indicam a presença da banda referente ao estiramento P-O da n-HAm. 72

Figura 3.27 – Espectros de ATR-FTIR das nanofibras com matrizes de PLGA-S: (a) PLGA-S; (b) PLGA-S/MCC; (c) PLGA-S/HAm e (d) PLGA-S/HAm/MCC. As setas indicam a presença da banda referente ao estiramento P-O da n-HAm e os quadrados pontilhados mostram a presença de bandas características do ligante SMZ. 73

Figura 3.28 - Curvas TG das nanofibras: (a) PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm, PLGA/HAm/MCC e MCC, (b) PLGA-S, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm, PLGA-S/HAm/MCC, n-HAm e SMZ..... 75

Figura 3.29 - Curvas DTA das nanofibras: (a) PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm, PLGA/HAm/MCC e MCC, (b) PLGA-S, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm, PLGA-S/HAm/MCC, n-HAm e SMZ. 77

Figura 3.30 - Curvas de histerese magnética das nanofibras PLGA/HAm, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC..... 80

Figura 3.31 – Curvas de hipertermia das n-HAm e das nanofibras de PLGA/HAm15, PLGA/HAm, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/HAm, PLGA-

S/HAm/MCC com medições até o alcance da temperatura de 45 C° sob aplicação de um campo magnético alternado de 323 kHz e 362 A (0,0488 T). 81

Figura 3.32 – Perfil de liberação de MCC a partir das nanofibras de PLGA/MCC, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/MCC, e PLGA-S/HAm/MCC..... 83

Figura 3.33 – Cinética de liberação de MCC a partir das nanofibras de PLGA/MCC, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/MCC, e PLGA-S/HAm/MCC pelo modelo de Higuchi..... 85

Figura 3.34 – Perfil de liberação de SMZ a partir das nanofibras de PLGA-S, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm, e PLGA-S/HAm/MCC..... 86

Figura 3.35 – Ensaio de MTT com concentrações de MCC livre (50 a 0,0001 µg/mL) em células tumorais de mama 4T1 e osteosarcoma Saos-2 e células normais de osteoblastos MC3T3 e fibroblastos 3T3L1. 88

Figura 3.36 – Ensaio de MTT com concentrações de n-HAm livre (40 a 0,001 mg/mL) em células tumorais de mama 4T1 e osteosarcoma Saos-2 e células normais de osteoblastos MC3T3 e fibroblastos 3T3L1. 89

Figura 3.37 – Ensaio de MTT com concentrações de SMZ livre (800 a 1 µg/mL) em células tumorais de mama 4T1 e osteosarcoma Saos-2 e células normais de osteoblastos MC3T3 e fibroblastos 3T3L1. 90

Figura 3.38 – Ensaio de MTT com nanofibras de 5 mm (contato direto) em células tumorais de mama 4T1 e osteosarcoma Saos-2 e células normais de osteoblastos MC3T3 e fibroblastos 3T3L1. 92

Figura 3.39 – Micrografias SEM da adesão de células MC3T3-E1 nas nanofibras de PLGA e PLGA/HAm..... 94

Figura 3.40 – Avaliação da massa remanescente do tumor após 7 dias de implante das nanofibras de PLGA/HAm/MCC com e sem tratamento com hipertermia magnética. * Diferença estatística com $p < 0,05$ 95

Figura 3.41 – Avaliação dos marcadores de inflamação MPO e NAG após 7 dias de implante das nanofibras de PLGA/HAm/MCC com e sem tratamento com hipertermia magnética. ns = diferença estatística não significativa, * Diferença estatística com $p < 0,05$ 96

Figura 3.42 – Atividade Antimicrobiana da SMZ (100 a 6400 µg/mL) nas bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	98
Figura 3.43 – Atividade antimicrobiana em função do tempo da SMZ (2 mg/mL), n-HAm (9 mg/mL) e das nanofibras PLGA-S e PLGA-S/HAm (10 mg) frente as bactérias <i>E. coli</i>	99
Figura 3.44 – Atividade antimicrobiana em função do tempo da SMZ (2 mg/mL), n-HAm (9 mg/mL) e das nanofibras PLGA-S e PLGA-S/HAm (10 mg) frente as bactérias <i>S. aureus</i>	99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Tabela 1.1 – Parâmetros físico-químicos do copolímero PLGA em diferentes razões dos monômeros ²²	5
--	---

CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 3.1 – Análise elementar das nanopartículas de n-HA e n-HAm por ICP-OES.	37
--	----

Tabela 3.2 – Parâmetros hiperfinos dos espectros Mössbauer à temperatura de 80K das nanopartículas n-HAm (δ deslocamento isomérico, ϵ quadrupolo, B_{HF} campo hiperfino).	46
---	----

Tabela 3.3 – Valores do deslocamento químico de ^{13}C do PLGA, SMZ e PLGA-S.	62
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATR-FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada
- DCC – N,N-dicicloexilcarbodiimida
- DCU – Diciclohexilureia
- DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
- FDA – Food and Drug Administration
- FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier
- HA - Hidroxiapatita
- ICP-OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma
- JCPDS – Comitê de Padrões de Difração em pó
- LEMB – Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais
- MCC – Mitomicina C
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- MNPs – Nanopartículas Magnéticas
- MPO - Mieloperoxidase
- MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- NAG - N-acetilglucosaminidase
- n-HA - Nanopartículas de hidroxiapatita
- n-HAm - Nanopartículas de hidroxiapatita magnética
- NHS - N-hidroxissuccinimida
- PBS - Solução tampão de fosfato
- PGA – Polímero-L-ácido glicólico
- PLA – Polímero-L-ácido láctico
- PLGA - Polímero (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) 50:50
- PLGA-S – PLGA funcionalizado com sulfametoxazol

RMN ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1

SMZ – Sulfametoxazol

SQUID – Magnetômetro Supercondutor

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão

UFC – Unidades formadoras de colônias

UPLC-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à
Espectrometria de Massas

UV-vis – Espectroscopia de Absorção na região do Ultravioleta e Visível

RESUMO

No presente trabalho foram obtidos nanofibras poliméricas magnéticas contendo nanohidroxiapatita magnética (n-HAm) para liberação do agente antineoplásico mitomicina C (MCC), utilizando o PLGA e o PLGA modificado com sulfametoxazol (PLGA-S) como matriz polimérica. Esse trabalho foi dividido em três etapas: síntese das n-HAm, funcionalização do PLGA com sulfametoxazol (SMZ) e preparação das nanofibras pelo método de eletrofiação. Foram feitas caracterizações físico-químicas e testes de citotoxicidade para todos os materiais em células normais de osteoblastos e fibroblastos e células tumorais de osteosarcoma e carcinoma mamário.

As n-HAm foram sintetizadas pelo método de co-precipitação e os resultados físico-químicos e morfológicos mostraram que as n-HAm têm forma de haste, com tamanho médio de 94x14 nm, alta magnetização de saturação, comportamento superparamagnético e composta por mistura de magnetita, maghemite, óxido-hidróxido de ferro e fosfato de ferro. A funcionalização do PLGA com sulfametoxazol (SMZ) foi efetivamente realizada e caracterizada por FTIR e RMN, obtendo 3 % de funcionalização. As nanofibras foram preparadas com 30 % de n-HAm incorporadas dentro da matriz polimérica, sendo capazes de promover aquecimento rápido através de aplicação de campo magnético alternando e liberar a MCC por até 30 dias.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram que as nanofibras de PLGA/MMC e PLGA/HAm/MCC diminuíram proeminentemente a viabilidade de células tumorais. As nanofibras com PLGA modificado com SMZ, PLGA-S/MCC e PLGA-S/HAm, também mostraram notável citotoxicidade frente a células tumorais. Além disso, o teste preliminar em camundongos com implante da nanofibra de PLGA/HAm/MCC mostrou significativa supressão do tumor em relação ao grupo sem tratamento por hipertermia, indicando que o tratamento hipotérmico pode potencializar o efeito citotóxico desse material.

Palavras chave: Nanopartícula magnética, hidroxiapatita, câncer, nanofibras, eletrofiação, hipertermia, mitomicina C, sulfametoxazol, PLGA, liberação de fármacos

ABSTRACT

In the present work, magnetic nanofibers containing nanohydroxyapatite (n-HAm) were obtained for the release of antineoplastic agent mitomycin C (MCC) using PLGA and PLGA modified with sulfamethoxazole (PLGA-S) as polymer matrix. This work deals the synthesis of n-HAm and the functionalization of PLGA with sulfamethoxazole (SMZ) and the preparation of nanofibers by the electrospun technique. Physical-chemical characterization and cytotoxicity tests were made for all materials in normal cells (osteoblast and fibroblast) and tumor cells (osteosarcoma and mammary carcinoma).

The n-HAm were synthesized by co-precipitation method. The physical-chemical and morphological results showed that n-HAm exhibited a rod shape, size of 94x14 nm, high magnetization of saturation, superparamagnetic behavior and composed by a mixture of magnetite, maghemite, iron oxide-hydroxide and iron phosphate. The functionalization of PLGA with SMZ was effectively performed and characterized by FTIR and NMR, obtaining 3 % of functionalization. The nanofibers were prepared with 30 % of n-HAm incorporated within the polymeric matrix, promoting a fast heating through the application of an alternating magnetic field and releasing the MCC up to 30 days.

Cytotoxicity assays showed that PLGA/MMC and PLGA/HAm/MCC nanofibers display high cytotoxicity on tumor cells. The PLGA modified with SMZ nanofibers, PLGA-S/MCC and PLGA-S/HAm, also showed remarkable cytotoxicity against tumor cells. In addition, preliminary tests in mice with subcutaneous implant of PLGA/HAm/MCC nanofibers showed significant tumor suppression in comparison to the untreated group by hyperthermia, suggesting that hyperthermic treatment may increase the cytotoxic effect of this material.

Keywords: Magnetic nanoparticle, hydroxyapatite, cancer, nanofibers, electrospun, hyperthermia, mitomycin C, sulfamethoxazole, PLGA, drug delivery

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

O crescimento da prevalência das doenças crônico-degenerativas tem sido uma das principais preocupações do Ministério da Saúde do Brasil. Dentre elas o câncer é o maior vilão sendo responsável por números elevados de mortes.

O câncer é caracterizado por ser uma doença multifatorial e originada pelo crescimento desordenado de células anormais com grande potencial invasivo. Existe mais de 100 tipos diferentes de neoplasia e em determinados casos a eliminação de fatores de risco pode ser crucial para evitá-la. As medidas de prevenção que o sistema de Saúde do Brasil tem buscado são: controle do tabagismo, vacinação contra vírus relacionado (Papiloma vírus), e incentivo à atividade física. Contudo, essas iniciativas tem se mostrado insuficientes na resolução dos problemas relacionados a essa doença ¹.

A Organização Mundial de Saúde enfatiza que no ano de 2016 houve 8,8 milhões de mortes causadas por câncer, sendo responsável por uma a cada seis mortes no mundo, e podendo atingir 21,4 milhões de novos casos no ano de 2030². Para reforçar a magnitude desse problema, no Brasil estimou-se o aumento de 31 % no número de mortes por câncer entre o ano de 2000 a 2015¹, tendo maior incidência na região sul e sudeste do país. A Figura 1.1 mostra comparativamente a estatística da incidência por região e gênero.

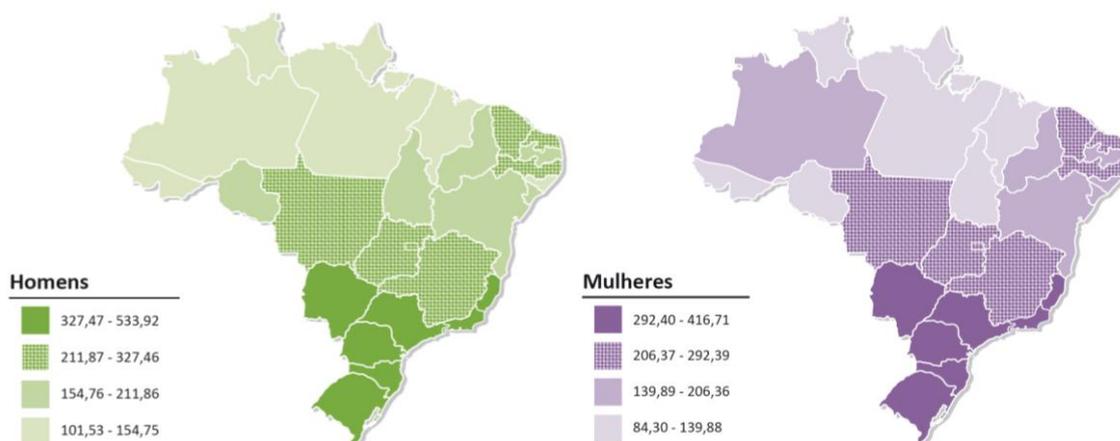


Figura 1.1 – Taxa bruta de incidência de câncer no Brasil por 100 mil habitantes de cada gênero (todas as neoplasias malignas/INCA-2014) ¹.

Outra premissa em relação ao câncer é o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes. Atualmente a quimioterapia, radioterapia e remoção cirúrgica, em combinação ou isoladamente, são os métodos utilizados para tratar essa doença. Entretanto, esses procedimentos convencionais ainda não são capazes de contornar problemas em relação à sua recorrência, metástase e efeitos colaterais, tornando sua cura remota na maioria dos casos. Os quimioterápicos, em especial, possuem elevada toxicidade e baixa seletividade entre células normais e tumorais, caracterizando um quadro de baixa qualidade e expectativa de vida dos pacientes.

Nesse sentido, a busca por estratégias que possam reverter esse cenário tem ganhado prioridade e urgência nos recursos públicos em todo o mundo. Dentre as alternativas investigadas a nanotecnologia vem sendo apresentada como uma estratégia emergente e promissora através da promoção de sistemas de tratamento multifuncionais (atuando tanto no diagnóstico quanto no tratamento) e alvo-específicos (promovendo seletividade para células tumorais), garantindo maior eficiência do tratamento e uma diminuição dos efeitos colaterais³⁻⁵.

Portanto, pesquisas com estratégias destinadas ao desenvolvimento de formulações mais eficientes no combate contra o câncer são de extrema relevância, sendo este o tema principal do presente trabalho.

1.2 ESTADO DA ARTE

1.2.1 Liberação controlada de fármacos

Os sistemas liberação controlada tem como principal objetivo alcançar níveis ótimos e estáveis de concentração do fármaco dentro do organismo por um tempo prolongado, permitindo um tratamento mais efetivo e seguro. Em contraste com as inúmeras descobertas de candidatos à fármacos, é discutido que a maioria deles (>95%) apresenta farmacocinética* pobre ou ineficiente⁶, necessitando de sistemas mais eficazes para sua administração.

Quando um sistema garante o controle da liberação de determinado fármaco, o número de doses administradas pode ser reduzido, implicando em na maior adesão ao tratamento pelos pacientes^{6,7}. Esse fato é de grande relevância em casos, por exemplo, de doenças cardíacas no qual o uso desregulado do medicamento pode causar aumento abrupto da pressão sanguínea, e até mesmo óbito. Além disso, o investimento em sistemas de liberação promove benefícios econômicos, podendo ser 10 vezes mais baratos do que o desenvolvimento de novos fármacos⁶.

Os sistemas de liberação controlada são constituídos principalmente por micro/nanopartículas, implantes, adesivos transdérmicos, inaladores e conjugados de anticorpos/fármaco e têm sido alvo de grande investimento nas últimas décadas⁸. Contudo, o desenvolvimento de sistemas que garantem o transporte de substâncias farmacologicamente ativas para sítios específicos no organismo, com controle da sua velocidade de liberação, ainda é um grande desafio⁹. A abordagem integrada na composição, tamanho, forma e modificações de superfície são estratégias atualmente usadas a fim de minimizar o potencial tóxico e melhorar a distribuição desses sistemas no organismo, assegurando um veículo de entrega seguro e eficaz¹⁰⁻¹².

*A farmacocinética estuda a **atividade do fármaco no interior do organismo** a partir dos parâmetros de velocidade de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco e de seus metabólitos. Com os conhecimentos de farmacocinética e das características do fármaco, é possível adequar posologia, via de administração e intervalo entre cada dose, visando melhorar o resultado terapêutico e, ao mesmo tempo, reduzir a probabilidade de desenvolver efeitos tóxicos potenciais¹³.

1.2.1.1 Sistemas poliméricos nanoparticulados

Os sistemas de liberação controlada de fármacos com base em nanopartículas poliméricas têm se tornado intensamente explorado¹⁴. Esses sistemas apresentam diversas vantagens em relação aos tratamentos convencionais, destacando-se: carreamento o agente ativo até o alvo específico dentro do organismo, proteção contra degradação, aumento do seu tempo de circulação, redução de sua imunogenicidade e toxicidade, tornando-os mais específicos e seletivos, dentre outras¹⁵⁻¹⁷.

Por outro lado, os polímeros biodegradáveis possuem ampla aplicação. Eles podem ser definidos como sendo passíveis a hidrólise, o que significa que a degradação é mediada através da quebra de ligações hidrolisáveis. Os biopolímeros naturais como: polissacárideos, proteínas (gelatina e colágeno) e poli- β -hidroxi-ácidos, são degradados por reações de hidrólise enzimática. Já os biopolímeros sintéticos como poliaminas, poliésteres e polianidridos são degradados por hidrólise passiva¹⁸. A primeira aprovação de formulações contendo polímero biodegradável foi concedida em 1990 com conjugados de polietilenoglicol (PEG/adenosina desaminase, PEG/asparaginase/anidrido estireno maléico (SMANCS)¹⁹.

Dentre os polímeros mais utilizados nesses sistemas, o PLGA é um copolímero que apresenta grande destaque devido sua boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e resistência mecânica^{15,20-23}. Ele é composto pela mistura randômica entre os monômeros de ácido lático e glicólico e, o tempo de degradação, bem como algumas propriedades físico-químicas, são dependentes da razão entre esses dois monômeros, como pode ser observado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Parâmetros físico-químicos do copolímero PLGA em diferentes razões dos monômeros ²⁴.

Razão de PLA/PGA	Temperatura de transição vítrea (°C)	Tempo de degradação* (meses)
50/50	45-50	1-2
65/35	45-50	3-4
75/25	60	4-5
85/15	45	5-6

* Tempo pode ser dependente da geometria.

A fim de aumentar a especificidade, afinidade e a absorção no local de ação, modificações de superfície das nanopartículas poliméricas, através de determinados ligantes, vêm sendo avaliadas em vários trabalhos. ²⁵⁻²⁷. Por exemplo, ligantes que podem ser ligados à receptores específicos de células tumorais podem ser capazes de aumentar a especificidade desses sistemas de liberação de agentes antineoplásicos ^{28,29}. A literatura reporta vários exemplos, como no trabalho desenvolvido por Sahoo e Labhassetwar onde nanopartículas de PLGA, contendo o antitumoral Paclitaxel, foram funcionalizadas com transferrina via ligação epóxi a fim de aumentar a especificidade do sistema de liberação ³⁰. A conjugação com transferrina demonstrou ser responsável por melhorar a captação por células tumorais, a maior supressão do tumor e a atividade mais sustentada do fármaco. A transferrina é uma glicoproteína de 80 kDa que vem sendo utilizada como vetor para terapia do câncer, uma vez que várias células cancerígenas apresentam uma superexpressão de seus receptores ²⁵. Outro ligante bastante utilizado na vetorização de nanopartículas é o ácido fólico. O ácido fólico é uma vitamina essencial para as células eucariotas e vários trabalhos reportam a presença de altos níveis de seus receptores em tumores epiteliais ^{31,32}. Zhao e colaboradores avaliaram a capacidade de micelas (~100 nm) de PLGA-PEG, com conjugações do íon folato, na entrega e liberação do antineoplásico Doxirrubicina ³³. Os resultados mostraram que as micelas contendo folato foram mais citotóxicas e apresentaram maior apoptose celular para três tipos de células tumorais, em comparação a células normais de fibroblastos. A vetorização com folato levou a um valor de IC₅₀ duas vezes menor que o fármaco livre e aumentou cinco

vezes a captação celular das micelas de PLGA-PEG nos estudos *in vitro* com células KB.

Em pesquisa desenvolvida por nosso grupo, nanopartículas de PLGA com o antitumoral 5-Fluorouracil e funcionalizadas com o antibiótico Sulfadiazina apresentaram seletividade para duas linhagens de células tumorais, apresentando maior citotoxicidade em comparação à células normais de osteoblastos e fibroblastos³⁴. A interação entre algumas sulfas e células tumorais também foi relatada por outros trabalhos, podendo interferir na internalização do quimioterápico nessas células e aumentar a especificidade, afinidade e a absorção no local de ação³⁵⁻³⁹. Um maior conhecimento dessa interação ainda está sendo investigado, ademais estudos envolvendo esse tipo de vetorização têm sido escassas.

Por outro lado, tem sido observado que características físicas podem interferir diretamente na eficiência dessas nanopartículas, sendo o tamanho uma das mais discutidas⁴⁰⁻⁴². A literatura reporta que tamanhos entre 30 e 100 nm são ideais para administrações sistêmicas, possibilitando maior tempo de circulação dentro do organismo^{43,44}. Recentemente, outras propriedades físicas como elasticidade e morfologia vêm sendo avaliadas, e os resultados mostram que partículas menos rígidas e não esféricas apresentam, por exemplo, maior tempo de circulação e melhor internalização e penetração celular⁴⁵⁻⁵¹.

Kolhar e colaboradores⁵² mostraram que nanopartículas de poliestireno em forma de bastonetes, recobertas com anticorpo monoclonal *Intercellular Adhesion Molecule1* (anti-ICAM) ou receptores de transferrina foram mais seletivas do que nanopartículas esféricas congêneres em estudo com camundongos, tendo como alvo o pulmão e o cérebro, respectivamente. Outros trabalhos apresentaram que nanopartículas discoidais tiveram acúmulo cinco vezes maior em carcinoma mamário que nanopartículas esféricas do mesmo tamanho⁵³. Assim, essa especificidade exibida pelo formato das nanopartículas oferece grandes vantagens, principalmente no desenvolvimento de sistemas de vetorização de quimioterápicos que são em geral fármacos que apresentam severos efeitos colaterais⁵⁴. Contudo, investigações sobre a eficiência de

formulações com nanopartículas não esféricas que envolvam a capacidade de inibição ou redução do tumor têm sido ainda pouco exploradas.

1.2.1.2 Nanopartículas Magnéticas e suas aplicações

Nanopartículas magnéticas vêm se mostrando bastantes promissoras no tratamento e diagnóstico do câncer ⁵⁵⁻⁵⁷. O caráter multifuncional dessas nanopartículas permite sua atuação como agente de contraste em Ressonância Magnética de Imagem (RMI), como veículo na liberação de fármacos guiado por campo magnético externo e também no tratamento por hipertermia, causando a morte de células tumorais a partir do aquecimento provocado por um campo magnético externo alternado. Algumas formulações com nanopartículas de óxido de ferro, por exemplo, já são comercializadas como agente de contraste desde 1994. E, recentemente, seu emprego em hipertermia magnética foi aprovado em 2010 nos EUA pelo FDA no tratamento de glioblastoma ⁵⁸.

Em geral, essas nanopartículas magnéticas são formadas por óxidos de ferro magnéticos (magnetita / Fe_3O_4 e maghemita / $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$) e apresentam particularidade em seu comportamento magnético conhecido como superparamagnetismo. Isso significa que elas apresentam magnetização nula na ausência de campo magnético, característica essencial para diminuição de sua agregação ⁵⁹. O recobrimento dessas nanopartículas por polímeros biodegradáveis têm sido intensamente utilizado nas pesquisas com esse material a fim estabilizar e diminuir sua agregação *in vivo* ⁶⁰.

A toxicidade das nanopartículas magnéticas ainda é um tema controverso na literatura, sendo esta dependente principalmente do recobrimento utilizado ⁶¹. Estudos pré-clínicos em ratos e coelhos, mostraram um longo acúmulo de ferro, alterações no comportamento neurológico e até mesmo teratogenicidade quando altas doses dessas nanopartículas são administradas ⁶². Contudo, alguns autores notaram ausência de efeitos tóxicos agudo na administração de 3000 μmol de Fe/kg em ratos e cães, sendo essa dose 150 vezes maior que a administrada em humanos ⁶³. O artigo de revisão desenvolvido pelo grupo de Reddy discute que a toxicidade de partículas magnéticas pode depender de inúmeros fatores incluindo a dose, composição

química, dimensão, estrutura, solubilidade, química de superfície, a via de administração, biodegradabilidade, farmacocinética e biodistribuição. E, que a segurança das MNPs deve ser avaliada caso a caso com base na aplicação médica e farmacêutica destinada ⁵⁵. Enfim, verifica-se que a toxicidade das MNPs é uma medida complexa e multifatorial onde potenciais estudos ainda são deficientes, havendo necessidade de análise aprofundada e individualizada de cada sistema para conclusões plausíveis.

1.2.1.3 Eletrofiação e Nanofibras Poliméricas

A eletrofiação é uma técnica capaz de processar uma rica variedade de polímeros, cerâmicas e compósitos em fibras ultrafinas. Um bom controle de seus parâmetros permite a produção de fibras com diferentes diâmetros, morfologias, arranjos espaciais e composições ^{64,65}. Essa tecnologia vem sendo investigada como método de preparação para sistemas de liberação controlada de fármacos e outras aplicações biomédicas tais como: membranas para regeneração de tecidos e imobilização de enzimas, bem como para recuperação de feridas ^{66,67}.

A primeira patente descrevendo a utilização da eletrofiação é datada em 1900 nos USA por J.F. Cooley. Porém essa técnica só ganhou maior popularidade após a década de 90 principalmente com os trabalhos de Reneker e Rutledge que demonstraram a formação de nanofibras por eletrofiação com diferentes polímeros orgânicos ^{65,68}. A partir de então, o emprego dessa técnica tem crescido exponencialmente especialmente em aplicações biomédicas. Concomitantemente, o mercado mundial de nanofibras duplicou entre 2006 e 2010 (43 milhões para 101 milhões de dólares), sendo previsto para chegar a 2,2 bilhões de dólares em 2020 ⁶⁹.

A Figura 1.2 ilustra o processo de fabricação das nanofibras por eletrofiação e os possíveis tipos de nanofibras que podem ser obtidas por esse processo.

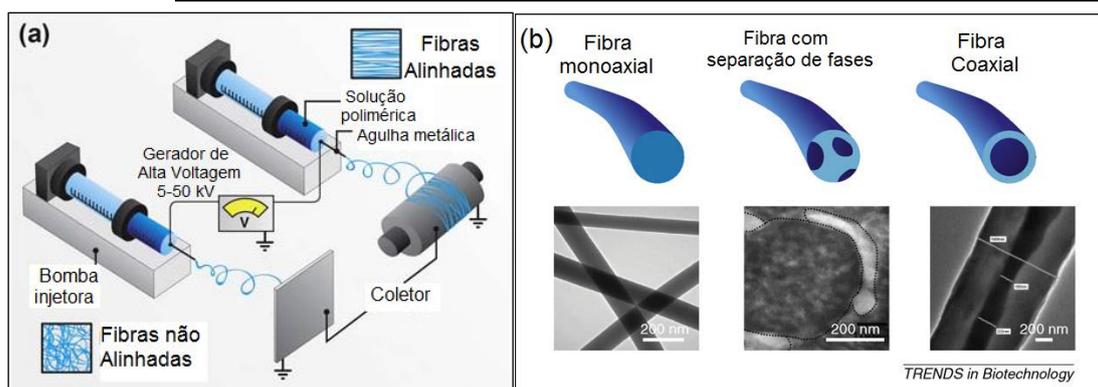


Figura 1.2 – (a) Esquema de fabricação de nanofibras alinhadas e não alinhadas (b) Diferentes tipos de nanofibras que podem ser produzidas por eletrofiação⁷⁰.

No processo de eletrofiação uma solução viscosa polimérica é bombeada através de uma agulha fina ou bico injetor, como pode ser observado na Figura 1.2^a. O bico injetor é de metal e, portanto, funciona como eletrodo ao aplicar a corrente elétrica. O segundo eletrodo é posicionado a uma distância entre 10 a 25 cm abaixo do bico injetor, possuindo polaridade contrária a esse. O segundo eletrodo é composto por um coletor metálico que pode ter diferentes formatos e onde a nanofibra é depositada após aplicação do campo elétrico que geralmente varia entre 5-50 kV⁷¹. Durante esse processo, a solução polimérica é carregada eletricamente na ponta do bico injetor criando uma repulsão eletrostática de modo que impedir seu fluxo contínuo natural, formando uma gotícula em forma de cone conhecida como “Cone de Taylor”. Um filamento contínuo e extremamente fino é ejetado quando essa repulsão excede a tensão superficial dessa solução, dando origem às nanofibras⁷².

O processo de fabricação dessas nanofibras permite ampla combinação de parâmetros que influenciam diretamente em suas propriedades mecânicas, bioquímicas e estruturais. Nesse sentido, como observado na Figura 1.2b, existe a flexibilidade para preparação de fibras monoaxiais, caracterizadas por apresentarem uma única fase; fibras com separação de fase, em geral quando há uma mistura de polímeros não miscíveis; e fibras coaxiais, quando se utiliza um bico injetor coaxial no qual diferentes soluções poliméricas são conduzidas na camada interna e externa.

Em aplicações como sistema de liberação de fármacos o uso de nanofibras também apresenta grande impacto. Sua versatilidade na modificação da porosidade, área superficial, flexibilidade e rigidez, permite otimizar a liberação de diversos fármacos de acordo com o alvo em questão⁷³. Xie e Wang demonstraram o comportamento de micro (10 μm) e nanofibras (30 nm) de PLGA na liberação do antitumoral Paclitaxel⁷⁴. Os resultados mostraram uma liberação mais rápida do fármaco a partir das nanofibras do que a partir das microfibras preparadas, sendo liberado respectivamente, cerca de 20% e 13% do fármaco em 24 horas. Contudo ambas as fibras preparadas obtiveram liberação controlada durante mais de dois meses, sendo liberado até esse período 80% de Paclitaxel pela nanofibra de PLGA e 60 % pela microfibra de PLGA.

Outros trabalhos também descrevem o uso de nanopartículas magnéticas em nanofibras visando aplicações principalmente em tratamentos de tumores sólidos⁷⁵⁻⁷⁹. O emprego de nanofibras magnéticas pode garantir um tratamento local do tumor, permitindo maior superfície de contato e causando morte celular diretamente no alvo. Esse sistema se torna ainda mais eficiente devido à maior sensibilidade de células tumorais à elevação da temperatura⁸⁰. No trabalho apresentado por Amarjargal e colaboradores, nanofibras de poliuretano foram tratadas com solução de poliol contendo suspensão de 1 mg/mL de nanopartículas de Fe_3O_4 , suas micrografias podem ser visualizadas na Figura 1.3. Testes de hipertermia dessas nanofibras magnéticas mostraram rápido aquecimento, em torno de 41° C por minuto, e magnetização de saturação de 33 emu/g indicando potencial uso no tratamento por hipertermia⁸¹.

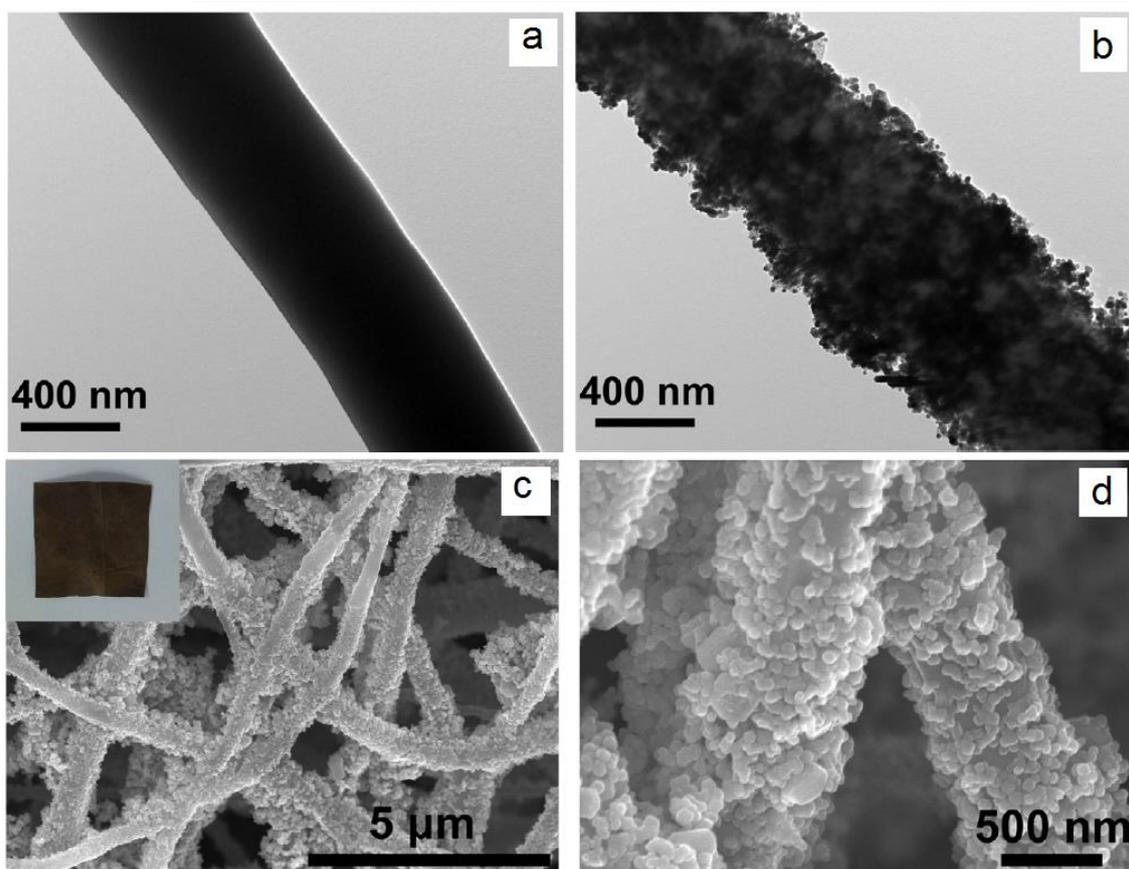


Figura 1.3 - Imagens de TEM (a-b) e MEV (c-d) das nanofibras: (a) antes e (b-d) após adição de nanopartículas de Fe_3O_4 . * Uma fotografia da nanofibra foi colocada à esquerda da imagem de MEV (c) ⁸¹.

1.2.2 Hidroxiapatita e medicina regenerativa

A hidroxiapatita é uma biocerâmica que tem sido utilizada como objeto de estudo em diferentes aplicações biomédicas, sobretudo no campo de engenharia de tecidos. Por ser a principal constituinte de ossos e dentes, há anos ela é utilizada como substituto em implantes e próteses, apresentando excelente biocompatibilidade e osteointegração. Adicionalmente, seu carácter osteoindutor tem gerado inúmeros trabalhos em reconstituição e regeneração óssea ⁸²⁻⁸⁴.

Esse mineral pertence ao grupo das apatitas com fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e razão definida Ca/P de 1,67. Em geral, os cátions e ânions desse grupo são facilmente substituídos por outros íons. Por exemplo, na hidroxiapatita carbonatada alguns íons carbonatos (CO_3^{2-}) substituem as hidroxilas (OH^-) ou os íons fosfato (PO_4^{3-}), sendo chamadas de carbonato

apatitas tipo A e tipo B, respectivamente ⁸⁵. Na substituição do fosfato ocorre a perda de íons Ca^{+2} , dando origem ao nome de hidroxiapatitas deficientes de cálcio, sendo essas também as constituintes do sistema biológico ⁸⁶. A hidroxiapatita presente no osso é composta por substituintes carbonatos do tipo A e B na proporção de aproximadamente 1:10. Essa razão é modificada de acordo com a idade, em idosos é mais evidente a presença da hidroxiapatita tipo A que também está relacionado à menor afinidade por células osteoblásticas responsáveis pela reconstituição óssea ⁸⁷.

Nos últimos anos, pesquisas com n-HA vêm sendo impulsionadas por estudos que mostram uma melhor adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas por hidroxiapatitas nanoestruturas do que microestruturadas ⁸⁸⁻⁹⁰. Aplicações de n-HA como estratégia em liberação de fármacos e genes também vêm sendo avaliadas, devido a sua ótima adsorção e afinidade com algumas moléculas ⁹¹. Além disso, alguns estudos também reportam uma atividade antitumoral proeminente de n-HA em algumas linhagens de células tumorais ⁹²⁻⁹⁴.

Ademais, trabalhos recentes com n-HA magnética (n-HAM) têm sido investigados no tratamento do câncer associado à hipertermia, combinado ou não a quimioterápicos ⁹⁵⁻⁹⁸, assim como em estudos voltados para reconstituição e regeneração óssea ⁹⁹⁻¹⁰², liberação controlada de fármacos ¹⁰³⁻¹⁰⁷ e diagnóstico como agente de contraste ^{104,108,109}. Estudos do grupo de Jin *et al* mostraram inclusive um aumento de citotoxicidade de n-HAM em células de carcinoma mamário quando comparadas a n-HA ¹¹⁰.

Geralmente, a preparação dessas nanopartículas é feita através do método de co-precipitação, no qual sais de Ca^{+2} e PO_4^{-3} com razão Ca/P de 1,67 são misturados a um meio básico e uma solução contendo Fe^{+2} é adicionada antes ou após essa mistura. Nessa reação, domínios de Fe_3O_4 são inseridos na estrutura da hidroxiapatita, apresentando substituições do cálcio por ferro. Observa-se que o valor do pH, a temperatura e o tempo reacional interferem diretamente na morfologia, porosidade e tamanho das nanopartículas formadas.

O grupo de Huang avaliou n-HAM na entrega e liberação da cisplatina em dual tratamento com hipertermia ⁹⁶. Caracterizações físico-químicas

mostraram nanopartículas com tamanhos entre 50-80 nm, comportamento superparamagnético, magnetização de saturação de 7,87 emu/g e promoção de aquecimento 2 °C/min após aplicação de campo magnético alternado. Estudo *in vitro* e *in vivo* mostraram sinergismo entre o antitumoral e o tratamento de hipertermia, inibindo a proliferação e crescimento do tumor de células de pulmão A549. Em outro estudo realizado pelo grupo de Hou, n-HAm similares com tamanho entre 20-50 nm e magnetização de saturação de 20,92 emu/g promoveram um aumento de 38° C para ~46° C com 10 minutos de aplicação de campo magnético alternado em tumores de camundongos ⁹⁵. O tratamento hipertérmico com essas nanopartículas foram capazes de reduzir completamente o tumor induzido com células de câncer colorctal CT-26 em 11 dias de tratamento.

Panseri e colaboradores desenvolveram biocerâmica porosa de magnetita incorporada em hidroxiapatita em diferentes proporções e observaram que na presença de um campo magnético estático, o material com razão 90:10 de hidroxiapatita/magnetita obteve boa biocompatibilidade e melhor proliferação de osteoblastos comparada a um compósito de hidroxiapatita comercial ^{101,102}. Resultados *in vivo* com lesões provocadas em coelhos mostraram resultados alentadores de histocompatibilidade, não apresentando hematoma, edemas, infecções ou necroses após 4 semanas de implantação do material. Outros trabalhos dos grupos de Gloria ¹⁰⁰ e Hou ⁹⁹ estudaram o comportamento de n-HAm em matrizes poliméricas avaliando também o perfil de proliferação e diferenciação de osteoblastos. Gloria e colaboradores utilizaram filmes de PCL contendo n-HAm preparados a partir de moldes, onde resultados *in vitro* em osteoblastos mostraram adesão, proliferação e diferenciação de osteogênica. Observou-se também curvas de hipertermia com aumento de quase 8° C em 300 s no material com 30 % de n-HAm. Já no trabalho do grupo de Hou, hidrogéis de PVA com nanopartículas similares apresentaram adesão preferencial de osteoblastos quando comparada a hidrogéis com somente nanopartículas magnéticas sem hidroxiapatita, o aumento da percentagem de n-HAm também promoveu maior adesão e proliferação, especialmente na proporção de 50%.

Aplicações envolvendo o uso de n-HAm têm ganhado intenso interesse por pesquisas tanto na área de tratamento de câncer como para reconstituição óssea. Meng *et al.* fabricaram um filme de PLA paramagnético nano-estruturado composto por uma mistura de n-HA comercial e nanopartículas maghemita que estimulam a proliferação e diferenciação de osteoblastos¹¹¹. Adicionalmente, a promoção de aquecimento por hipertermia magnética podem ainda potencializar o processo de osteogênese, uma vez que estudos reportam que a mineralização óssea é estimulada por aquecimento¹¹².

Contudo, nanofibras contendo n-HAm com alta magnetização e capacidade hipertérmica para tratamento de câncer ainda não foram reportadas na literatura. Essa estratégia se torna inovadora e promissora, uma vez que as nanofibras apresentam uma maior semelhança com a matriz extracelular, permitindo um melhor suporte para interação das n-HAm com o tumor.

1.2.3 Mitomicina C e seu potencial citotóxico

As mitomicinas pertencem a uma classe de produtos naturais que possuem efeitos antibióticos e antitumorais. Dentro desse grupo, a MMC é o agente mais utilizado na clínica e foi isolada pela primeira vez em 1958 pelo grupo de Wakaki através *Streptomyces caespitosus*¹¹³.

Todas as mitomicinas apresentam atividade frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, mas a MMC é a única que possui boa e ampla atividade antitumoral sendo utilizada para esse fim há mais de 25 anos¹¹³⁻¹¹⁵. Além disso, sua preferencial atividade por células hipóxicas chamou ainda mais atenção nos últimos anos, sendo testada em combinação com radioterapia em tumores resistentes. Estudos também mostram seu efeito citotóxico em linhagens de células de carcinoma escamoso e osteossarcoma, como a SCC-25 e SaOS-2^{116,117}. Seu uso em combinação com outros agentes antineoplásicos também foi investigado em sarcoma osteogênico pelo grupo de D. N. Jaffe¹¹⁸.

Porém, apesar da eficiência quimioterápica, a terapia com a MMC apresenta severos efeitos colaterais como mielossupressão e complicações gastrointestinais¹¹³, tornando relevante a procura por formulações mais

eficientes. A literatura reporta o uso de diferentes sistemas estratégicos envolvendo esse fármaco ¹¹⁹⁻¹²³. Por exemplo, filmes de PLA/PLGA obtiveram uma liberação sustentada de MMC, o peso molecular do polímero/ viscosidade e a espessura do filme foram citados como as principais propriedades moduladoras da liberação ¹²⁴. Contudo, a busca por sistemas eficientes, capazes de suprir as deficiências do tratamento atual do câncer ainda é um grande desafio. Ademais, estudos que envolvam esse antitumoral no tratamento de osteosarcoma ainda são muito poucos discutidos apesar de sua eficiência frente a esse tipo de câncer já ser relatada de longa data.

1.3 PROPOSTA DO TRABALHO

A presente proposta buscou avaliar sistemas baseados em nanofibras poliméricas magnéticas para liberação do agente antineoplásico mitomicina C (MCC), empregando como matriz polimérica o PLGA e/ou o PLGA modificado com sulfametoxazol (SMZ).

Assim, esse trabalho propõe a preparação de nanofibras pelo método de eletrofiação, sendo esta composta por PLGA ou PLGA funcionalizado com sulfametoxazol e nanohidroxiapatita magnética (PLGA/HAm/MCC e PLGA-S/HAm/MCC). Nesse estudo pretende-se avaliar o efeito sinérgico/aditivo entre hipertermia e ação antineoplásica da MCC no tratamento de osteosarcoma e de tumores sólidos. A hipótese é que esse sistema provocaria a morte do tumor de forma localizada pela presença de MCC suportada na matriz polimérica de PLGA tendo seu efeito citotóxico potencializado através do fármaco SMZ e do tratamento por hipertermia magnética promovido através das n-HAm. É importante salientar que essa estratégia é inédita no estado da arte.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivos gerais

Preparação, caracterização, avaliação biológica de nanofibras magnéticas de PLGA e PLGA modificado com SMZ contendo n-HAm para tratamento de osteosarcomas ou tumores sólidos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar as n-HAm;
- Funcionalizar e caracterizar o PLGA com SMZ;
- Preparar e caracterizar as nanofibras de PLGA e PLGA modificado com SMZ pelo método de eletrofiação;
- Avaliar o perfil cinético de liberação da MMC e SMZ *in vitro*;

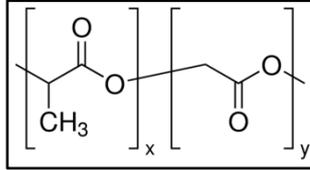
- Avaliar a biocompatibilidade e citotoxicidade dos materiais preparados *in vitro*, em células normais de fibroblastos e osteoblastos, e em células tumorais de osteosarcoma e carcinoma mamário.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos materiais em bactérias Gram positivas e Gram negativas (*E. coli* e *S. aureus*);
- Avaliar a atividade dos materiais *in vivo* através de implante subcutâneo das nanofibras preparadas associado ao aquecimento local por hipertermia magnética.

CAPÍTULO 2

Materiais e Métodos

2.1 Reagentes utilizados

2.1.1 Polímero (*L*-ácido láctico-co-ácido glicólico)-PLGA 50:50



Nomenclatura IUPAC: poli (ácido 2-(2-hidroxiacetil)-oxipropanóico

Massa molar média: 43,900 g mol⁻¹

Solubilidade em água: insolúvel

Ponto de fusão: 105 °C

Aspecto: sólido branco

Fabricante: LACTEL

Lote: B6013-1-1G / A12-085

2.1.2 Fosfato de sódio



Nomenclatura IUPAC: hidrogenofosfato de sódio

Massa molar: 146,96 g mol⁻¹

Solubilidade em água: solúvel

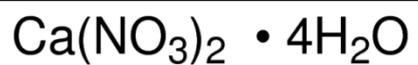
Ponto de fusão: 105 °C

Aspecto: sólido branco

Fabricante: Vetec

Lote: DCBC1510

2.1.3 Nitrato de cálcio tetrahidratado



Nomenclatura IUPAC: Nitrato de cálcio tetrahidratado

Massa molar: 236,15 g.mol⁻¹

Solubilidade em água: 200 mg mL⁻¹(10°C)

Ponto de fusão: ~560°C

Aspecto: sólido branco

Fabricante: Synth

Lote: 171538

2.1.4 Cloreto de ferro II tetrahidratado



Nomenclatura IUPAC: Cloreto de ferro (II) tetrahidratado

Massa molar: 198,8 g mol⁻¹

Solubilidade em água: 1600 g mL⁻¹(10 °C)

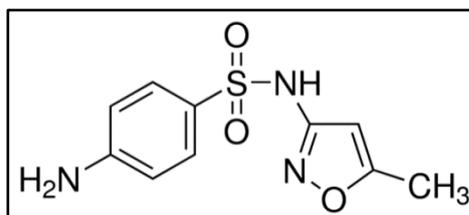
Ponto de fusão: 105 °C

Aspecto: sólido verde claro

Fabricante: Sigma-Aldrich

Lote: BCBN6175V

2.1.5 Sulfametoxazol



Nomenclatura IUPAC: 4-amino-N-(5-metilisoxazol-3-il)-
benzenosulfonamida

Fórmula molar: $C_{10}H_{11}N_3O_3S$

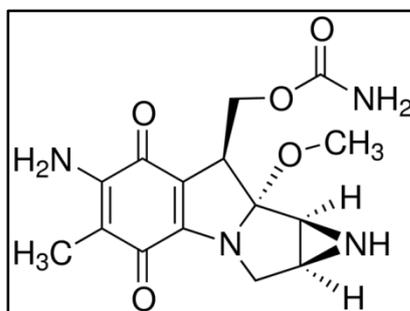
Massa molar: $253,8 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade em água: Pouco solúvel ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$)

Ponto de fusão: $166-169^{\circ}\text{C}$

Aspecto: sólido branco

2.1.6 Mitomicina C



Nomenclatura IUPAC: [6-amino-8a-metoxi-5-metil-4,7-dioxo-
1,1a,2,4,7,8,8a,8b-octahidroazireno[2',3':3,4]pirrolo[1,2-a]indol-8-il]metil
carbamato

Fórmula molar: $C_{15}H_{18}N_4O_5$

Massa molar: $334,33 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade em água: $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$

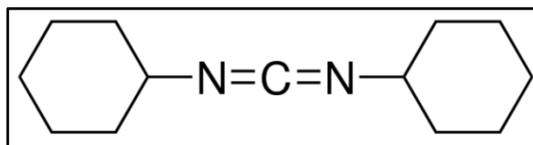
Ponto de fusão: 534°C

Aspecto: sólido azul escuro

Fabricante: Merck

Lote: F1653461

2.1.7 *N,N* - dícicloexilcarbodiimida



Nomenclatura IUPAC: N,N'-díciclohexilcarbodiimida

Fórmula molar: $C_{13}H_{22}N_2$

Massa molar: $206,33 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade em água: insolúvel

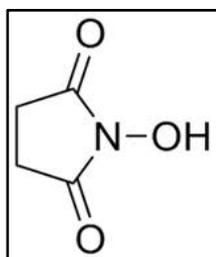
Ponto de fusão: $34 \text{ }^\circ\text{C}$

Aspecto: sólido branco

Fabricante: Sigma-Aldrich

Lote: STBB4165

2.1.8 *N*-hidroxissuccinimida



Nomenclatura IUPAC: 1-Hidroxi-2,5-pirrolidinediona

Fórmula molar: $C_4H_5NO_3$

Massa molar: $115,1 \text{ g mol}^{-1}$

Solubilidade em água: solúvel

Ponto de fusão: $94 - 99 \text{ }^\circ\text{C}$

Aspecto: sólido branco

Fabricante: Sigma-Aldrich

Lote: BCBF1078V

2.1.9 Outros reagentes

Hidróxido de amônio (Synth)

Água Milli Q

2.2 Equipamentos

2.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos pelo aparelho *Perkin Elmer Spectrum GX* do Departamento de Química/UFMG. As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr e analisadas na região entre 4.000 - 400 cm^{-1} . Os dados foram tratados pelo programa ACD/SpecManager 6.0, ACDLabs. Para análise das nanofibras foi utilizado o equipamento de ATR-FTIR da Perkin Elmer Spectrum 100 IR equipado com acessório universal ATR. Os espectros foram obtidos na região entre 4000 e 650 cm^{-1} .

2.2.2 Análise Térmica

As curvas de TG/DTA foram obtidas através do equipamento DTG60 (Shimadzu, Japão) do Departamento de Química/UFMG. As amostras foram aquecidas a uma razão de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 500 $^{\circ}\text{C}$ sob fluxo de 50 mL/min de N_2 .

2.2.3 Espectroscopia Raman

Os espectros de espalhamento Raman foram obtidos através do equipamento Horiba T64000 micro-Raman do Departamento de Física/UFMG. As análises foram realizadas com laser de Ar/Kr 647 nm a potência de 1 mW na região entre 300-1100 cm^{-1} com resolução espectral de 2 cm^{-1} .

2.2.4 Espectroscopia Mössbauer

Os espectros Mössbauer foram realizados em um espectrofotômetro Mössbauer convencional CMTE modelo MA250 pertencente ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). As análises foram conduzidas a temperatura ambiente e a 80 K, utilizando fonte de ^{57}Co em

matriz de Rh e α -Fe como referência. Os espectros foram ajustados com o software Win-Normos-for-IGOR.

2.2.5 Liofilização

Para secagem dos materiais sintetizados foi utilizado o Liofilizador Savant Modulyo D – Freeze Dryer, Thermo Electron Corp. pertencente ao laboratório LEMB do Departamento de Química/UFMG.

2.2.6 Espectrometria de emissão óptica com plasma (ICP-OES)

As análises elementares de ferro, fósforo e cálcio foram realizadas através do aparelho ICP-OES Perkin Elmer modelo Optima 7300 DV, pertencente ao Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais/UFMG.

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

2.2.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

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

Para as análises, as amostras inicialmente foram dispersas em água e submetidas ao ultrassom por aproximadamente 2 minutos. Em seguida, as suspensões foram depositadas em grades de cobre com filme de carbono. Os histogramas com as medidas de comprimento/diâmetro médio foram realizados mediante o software ImageJ.

2.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens por varredura foram obtidas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura FEG-Quanta 200 FEI do Centro de Microscopia da UFMG. Para as

análises, as amostras foram metalizadas com 3 nm de ouro. Os histogramas com as medidas de diâmetro médio foram realizados mediante o software ImageJ.

2.2.9 Difractometria de Raios X

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

2.2.10 Espectroscopia de Absorção UV-Visível

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

2.2.11 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS)

As análises de quantificação foram realizadas através do equipamento da Waters UPLC® Aquity H-Class e detecção do tipo triplo quadrupolo com ionização por eletronebulização Xevo TQD MASS pertencente ao laboratório LEMB do Departamento de Química/UFMG. Os dados foram adquiridos pelo software MassLynx. A separação das amostras foi realizada com coluna Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm, tamanho de partícula de 1,7 μm) sob fluxo de 0,35 mL/min. A fase móvel consistiu em uma fase aquosa (água, 1 % ácido fórmico) e fase orgânica (metanol, 0,1 % ácido fórmico) com uma rampa de gradiente: 90:10 (2 min), 40:60 (1 min), 5:95 (1 min) e 90:10 (1 min) de água/metanol. A temperatura da coluna foi de 45 °C e das amostras 20 °C e volume de injeção de 5,0 μL . A fonte de ionização empregada foi a de eletronebulização no modo positivo com temperatura de dessolvatação de 350 °C e vazão de 650 L min^{-1} . Outros parâmetros: Cone: 10L/h, Energia de colisão: 12 V, Voltagem do capilar: 3,70 kV e Voltagem do cone: 20 V.

2.2.12 Medidas de magnetização

As medidas de magnetização das amostras foram feitas no aparelho SQUID (Superconducting quantum interference device) S700X Magnetometer - Criogenic[®], equipamento pertencente ao Departamento de Química/UFMG. O estudo foi realizado mediante a variação do campo magnético externo (0 a 3 T) em temperaturas de 300 K a 4 K.

2.2.13 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro Bruker DPX-400 Avance (400 MHz) pertencente ao Departamento de Química/UFMG. As amostras foram preparadas em tubos de RMN de 8,00 polegadas de comprimento e 5 mm de diâmetro externo em DMSO deuterado.

2.2.14 Equipamento de Eletrofiação

O equipamento de eletrofiação pertencente ao laboratório LEMB do Departamento de Química/UFMG foi utilizado para obter as nanofibras poliméricas. O equipamento consiste em uma fonte de alta tensão proveniente da Gamma alta voltagem com ajuste de 0-30 kV e bomba de efusão da Harvard Apparatus PHD 2000. Uma placa de aço inox 20x20 cm foi empregada para coleta da nanofibra e uma agulha de 0,8 mm para efusão da solução polimérica.

2.2.15 Isoterma de adsorção e área superficial

O equipamento Autosorb 1- Quantachrome System do Departamento de Química/UFMG foi utilizado para determinação de área superficial específica e distribuição empregando o método BET. As amostras foram previamente aquecidas a 100 °C por 12 h para desgaseificação.

2.2.16 Ângulo de contato

Para determinação do caráter hidrofóbico/hidrofílico das nanofibras foi utilizado o instrumento KRUSS GmbH EasyDrop baseado no método de gota

séssil com monitorização por vídeo, pertencente ao Instituto de Física e Química da UNIFEI. Esse equipamento gera imagens do contato de gotas de água com as amostras de nanofibras possibilitando a determinação do ângulo de contato. As análises foram feitas gotejando 10 μL de água diretamente sobre a superfície das nanofibras (5 x 2 cm), sendo realizadas 10 medidas por amostra.

2.2.17 Medidas de hipertermia magnética

As medidas de hipertermia magnética foram realizadas usando o aparelho EasyHeat Ambrell equipado com uma bobina geradora de campo magnético alternado acoplada a um controlador de temperatura. O equipamento pertence ao laboratório LAMPAC do Departamento de Química/UFMG, sob coordenação da Professora Rosana Zacarias. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente sob ajuste de 323 kHz e 362 A (0,0488 T) com limite de temperatura de 45 °C controlada através de um termostato.

2.3 Preparações dos sistemas de liberação controlada

2.3.1 Preparação da nanohidroxiapatita magnética (n-HAm)

A nanohidroxiapatita magnética foi preparada dissolvendo $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e adicionando gota a gota uma solução de Na_2HPO_4 com pH 10 ajustado com amônia (28%), com proporção 1,67 de Ca/P. Então, a mistura foi deixada sob refluxo, em banho de silicone à 90° C por 24 h, com agitação constante. Após esse tempo foi adicionado uma solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ com proporção 1:1 Fe/Ca, deixando o sistema sob agitação novamente por 24 h, semelhante ao método utilizado por Wu *et al.*¹²⁵. Em seguida, a suspensão de partículas foi lavada com água várias vezes até meio neutro por decantação magnética. Por fim, o material foi congelado com nitrogênio líquido e submetido ao processo de liofilização para remoção de água.

2.3.2 Funcionalização do PLGA com sulfametoxazol (PLGA-S)

A funcionalização do PLGA foi realizada em duas etapas: ativação do PLGA e a funcionalização com SMZ, como descrito por Oliveira *et al.*¹⁶

Na primeira etapa foram preparadas duas soluções com quantidades equimolares de cada reagente (0,44 mol): PLGA em 30 mL de acetona e N-hidroxisuccinimida (NHS) em 1 mL de acetona. Em seguida, N,N - dicicloexilcarbodiimida (DDC) foram adicionados na solução de PLGA juntamente com a solução de NHS. Então, o sistema foi mantido sob agitação e à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período foi observado a formação de um precipitado branco, que foi removido via centrifugação à 18.000 rpm à 5° C . Na segunda etapa, uma solução de sulfametoxazol (0,3 mmol) em acetona foi adicionado a solução polimérica e o produto obtido foi submetido ao processo de diálise por 7 dias em membrana semipermeável (MWCO 10000) para remoção do excesso dos reagentes. Por fim, o produto final foi submetido ao processo de secagem por liofilização e posterior caracterização físico-química.

2.3.3 Preparação das nanofibras

Todas as nanofibras foram preparadas pelo método de eletrofiação⁷¹.

-Nanofibras magnéticas de PLGA/HAm e PLGA-S/HAm

Uma solução de PLGA ou PLGA-S 20% foi preparada pela mistura de clorofórmio e dimetilformamida (CLO/DMF 80:20) contendo HAm em suspensão. A quantidade HAm adicionada foi 15 ou 30 % (m/m). As condições da eletrofiação para formação das nanofibras foram: fluxo de injeção da solução de 2,5-3,5 mL/h, volume da suspensão 6 mL, tensão de 20 kV e distância entre agulha e coletor de 20 cm.

-Nanofibras magnéticas de PLGA/HAm/MMC e PLGA-S/HAm/MMC

Semelhante ao item anterior, uma solução de PLGA 20% foi preparada em CLO/DMF 80:20. Em seguida, 10 mg de MCC adsorvida em HAm foram adicionados, mantendo a proporção de 30 % (m/m) de HAm. As condições da eletrofiação para formação das nanofibras foram: fluxo de injeção da solução

de 1,5-2,5 mL/h, volume da suspensão 6 mL, tensão de 20 kV e distância entre agulha e coletor de 20 cm.

-Nanofibras de PLGA/MCC e PLGA-S/MCC

Novamente, uma solução de PLGA ou PLGA-S 20% foi preparada em CLO/DMF 80:20. Em seguida, 10 mg de MCC foram adicionados. As condições da eletrofiação para formação das nanofibras foram: Fluxo de injeção da solução de 2,5-3,5 mL/h, volume da solução 6 mL, tensão de 20 kV e distância entre agulha e coletor de 20 cm.

-Nanofibras de PLGA e PLGA-S

Para a formação das nanofibras PLGA ou PLGA-S, a concentração foi mantida a 20% na mistura CLO/DMF 80:20. As condições da eletrofiação para formação das nanofibras foram: Fluxo de injeção da solução de 5,5-5,0 mL/h, volume da solução 6 mL, tensão de 20 kV e distância entre agulha e coletor de 20 cm.

2.4 Perfil de liberação do fármaco

Os estudos de liberação *in vitro* da MCC e da SMZ foram realizados utilizando cerca de 3 mg de discos das nanofibras que continham o fármaco (PLGA/MCC, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm/MCC). A liberação foi conduzida em tubos eppendorfs de 2 mL com temperatura constante de 37 °C sob agitação contínua, utilizando como meio 1 mL de solução tampão salina de fosfato (PBS) com pH 7,4.

Para quantificação, alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos: 1, 2, 4,8 horas e 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 30 dias. A cada coleta todo o sobrenadante era removido para análise (1 mL) e repunha-se 1 mL de PBS por amostra. A quantificação foi realizada por UPLC-MS através de curva de calibração em PBS com $R^2 = 0,9998$ para SMZ e $R^2 = 0,9999$ para MCC. As condições de análise estão descritas no item 2.2.11. O teste foi feito em triplicata.

2.5 Análises Biológicas

2.5.1 Testes em cultura celular

Os testes *in vitro* utilizaram modelos de células de osteosarcoma humano Saos-2 (ATCC®HTB-85™), carcinoma de mama murino 4T1 (ATCC®CRL-2539™), pré-osteoblastos murino MC3T3-E1 (ATCC®CRL-2594™) e fibroblastos murino 3T3-L1 (ATCC®CL-173™).

O cultivo das células Saos-2, 4T1, MC3T3 e 3T3-L1 foram realizados em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) e RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 50:50 suplementado com 10 % SFB (Soro Fetal Bovino), RPMI com 10 % de SFB, α -MEM (Alpha minimum essential Eagle's médium) com 20 % FBS e DMEM com 10 % de SFB, respectivamente. Em todos os meios foram adicionados 1 % antibiótico (0,1 mg mL⁻¹ streptomicina e 100 U mL⁻¹ penicilina). Após atingir confluência, as células foram transferidas para placas de 96 poços com concentração em torno de 1x10⁵ células/poço para fazer os testes. As culturas foram mantidas em estufa à 37 °C em atmosfera de 95 % de ar e 5 % de CO₂.

-Ensaio de MTT

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular indiretamente através da atividade enzimática das enzimas mitocondriais redutases. Esse teste se baseia na formação de cristais azuis de formazam produzidos através do processo de oxidação do reagente de MTT (ion tetrazólio) por essas enzimas. Assim, a viabilidade celular pode ser identificada e quantificada pela formação e concentração dos cristais azuis, que indicam atividade mitocondrial ou presença de células vivas.

Os testes foram realizados após 70 % de confluência das células em placas de 96 poços, na qual foram adicionados em cada poço discos das nanofibras (0,5 cm) em seis replicatas, soluções de MCC (50 a 0,0001 μ g/mL) e SMZ (800 a 0,001 μ g/mL) e dispersões de n-HAm (40 a 0,001 mg/mL). O tempo de contato (incubação) foi de 24 e 48 horas à temperatura de 37°C e atmosfera com 5 % de CO₂.

Após incubação e lavagem com solução de PBS estéril, o reagente de MTT foi adicionado nas placas, sendo essas protegidas da luz devido à fotossensibilidade desse reagente. Depois de 4 horas de incubação à 37°C para formação dos cristais azuis de formazam, foi adicionado solução detergente de dodecilsulfato de sódio (SDS). Então ao completar 18 horas, foram realizadas as leituras em Espectrofotômetro de UV-Visível no comprimento de onda de 570 nm. Os respectivos controles negativos (contendo somente células sem tratamento) e brancos (sem células e sem tratamento, contendo todas as soluções envolvidas no teste) foram analisados em todas as placas.

-Ensaio de Adesão celular

Para avaliar a capacidade de adesão dos osteoblastos nas nanofibras foi realizado um ensaio *in vitro* no qual as células foram mantidas em contato direto com as nanofibras por 3 dias. Nesse teste somente as nanofibras que não continham o fármaco foram testadas: PLGA e PLGA/HAm.

O ensaio foi realizado em placas de 24 poços onde inicialmente 3 mg de cada nanofibra previamente esterilizadas com luz UV por 2 horas foram colocadas em cada poço. Em seguida, foram adicionados 300 µL de meio de cultura suplementado e, após 2 horas, foram adicionados 200 µL de solução contendo em torno de $3 \cdot 10^4$ células. E, para avaliação do teste, após o período pré-estabelecido de 3 dias, as amostras foram tratadas com solução fixadora de glutaldeído por 2 horas e analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura.

2.5.2 Testes microbiológicos

A atividade antimicrobiana dos materiais foi testada em inóculos das bactérias Gram positivas *Escherichia coli* (*E. coli*) e Gram negativas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). A bactéria *E. coli* foi cultivada em meio Triptona de Soja (TSA) e a bactéria *S. aureus* em meio Brain Heart Infusion broth (BHI) por 24 h à 37°C.

- Determinação do MIC (Concentração Mínima Inibitória)

Para determinação do MIC suspensões de bactérias de em meio BHI foram colocadas em contato com diferentes concentrações de SMZ (6400 – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 24 h a 37°C. O método de diluição seriada em placa de 96 poços foi empregado de acordo com protocolo previamente estabelecido¹²⁶. A quantificação foi realiza através do espectrômetro de UV-vis em $\lambda = 600 \text{ nm}$.

- Cinética Antimicrobiana

A avaliação da cinética antimicrobiana das nanofibras de PLGA-S e PLGA-S/HAm foi realizada nos tempos de 2, 4, 6 e 24 h. Inicialmente, 50 μL de suspensões bacterianas com concentração de $1 \times 10^6 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram colocadas em contato com 10 mg de nanofibras e concentração de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SMZ e 9 mg/mL de n-HAm (volume final de 100 μL). Em seguida, nos tempos estabelecidos foram retiradas alíquotas de 10 μL que foram semeadas em placas de ágar Mueller Hinton (MH). Após 24 h foram contadas o número de unidades formadoras de colônia (UFC).

2.5.3 Testes in vivo

O estudo preliminar *in vivo* das nanofibras preparadas foram realizados em camundongos Balb/c, em colaboração com a Profa. Dra. Sílvia Passos Andrade, no laboratório de Angiogêneses do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (UFMG); e com a professora Paula Peixoto Campos, do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (UFMG), de acordo com normas de bioética e seguindo protocolos experimentais internacionais. Os testes foram aprovados pelo Comitê de Experimental Animal Local da UFMG (CETEA-UFMG) sob o número de protocolo 338/2014.

- Tratamento

O tratamento *in vivo* foi realizado a partir da indução de tumor nos camundongos e posterior implante das nanofibras, seguido de hipertermia magnética. Para o tratamento por hipertermia os animais foram colocados no interior de uma bobina geradora de campo magnético alternado (Aparelho

EasyHeat Ambrell) com temperatura controlada não excedente á 45° C e sob ajuste de 323 kHz e 362 A (0,0488 T) . O tratamento por hipertermia teve a duração de 15 minutos, sendo realizado nos dias 1, 2, 3, 5, e 7 após implante das nanofibras (círculos de 2 cm, 3 mg), similar ao trabalho de Hou e colaboradores ⁹⁵. Após esse período os animais foram sacrificados e foram feitas medidas de massa do tumor e avaliação da inflamação pelo doseamento de MPO e NAG, descritos a seguir.

Somente foi realizado um teste preliminar com as nanofibras PLGA/HAm/MCC sendo testado dois grupos: o primeiro com tratamento de hipertermia e o segundo sem tratamento de hipertermia contendo 10 animais por grupo. A Figura 2.1 mostra imagens retiradas durante o tratamento de hipertermia, o termopar para controle da temperatura foi colocado em contato com o tumor. Tanto para implante da nanofibra quanto para o tratamento por hipertermia os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina 2:1,5.



Figura 2.1 – Tratamento de hipertermia magnética do teste preliminar *in vivo*.

-Determinação da atividade de MPO e NAG

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) tem sido utilizada para determinação do número de neutrófilos, presentes no processo inflamatório. Para essa análise um pedaço do tumor removido após tratamento foi pesado, triturado e ressuspensão em solução tampão pH 4,7 (NaCl 0,1 mol.L⁻¹; Na₃PO₄ 0,02 mol.L⁻¹; 0,015 mol.L⁻¹ de Na₂EDTA). Os pellets foram obtidos após centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos e ressuspensos em solução tampão pH 5,4 (Na₃PO₄ 0,05 mol.L⁻¹ com 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)). Após três ciclos de congelamento/descongelamento com nitrogênio líquido, o doseamento foi realizado através da absorbância em 450 nm mediante adição de tetrametilbenzidina (1,6 mmolL⁻¹), H₂O₂ (0,3 mmolL⁻¹) e 50 µl de H₂SO₄ (4 molL⁻¹).

A avaliação da enzima N-acetilglucosaminidase (NAG) foi realizada para inferir sobre o nível de macrófagos presentes, já que há uma elevada quantidade dessa enzima em macrófagos ativados. Inicialmente, uma massa conhecida do tumor foi colocada em solução salina (NaCl 0,9% p/v; 0,1% v/v de Triton® X-100) e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram adicionados em 100 µL de solução de *p*-nitro-fenil-N-acetil-beta-D-glucosamida 2,24 mmol.L⁻¹, preparada em tampão citrato/fosfato pH 4,5 (ácido cítrico 0,1 mol.L⁻¹; Na₂HPO₄ 0,1 mol.L⁻¹). Após adição de 100 µL de solução tampão de glicina 0,2 mol.L⁻¹ (10,6) foram realizadas medidas de absorbância em 400 nm.

2.5.4 Análise estatística

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

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão

3.1 Preparação e caracterização das nanohidroxiapatita magnéticas (n-HAm)

A literatura relata diferentes métodos de obtenção de n-HAm. Alguns autores mostram sua formação através da adição de MNPs sobre n-HA previamente preparada¹²⁷, já outros grupos propõe a formação da fase de HA a partir da adição de PO_4 sobre uma suspensão contendo íons Ca^{2+} e MNPs previamente preparadas^{99,107} ou sobre uma mistura de íons Fe^{+2} , Fe^{3+} e Ca^{2+} ¹²⁸. O método empregado nesse trabalho foi o de co-precipitação, similar ao descrito por Wu e colaboradores¹²⁹, no qual a n-HA é inicialmente formada e em seguida nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_2O_3) são depositadas nas n-HA a partir da adição de Fe^{+2} em meio básico. Esse mecanismo é chamado de crescimento hetero-epitaxial em que um material cristalino é depositado sobre um substrato cristalino¹²⁵. Esse método foi escolhido por obter n-HAm com maior magnetização que os demais reportados na literatura e pela sua simplicidade.

3.1.1 Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma (ICP-OES)

A Tabela 3.1 apresenta os resultados de análise elementar por ICP-OES das nanopartículas de n-HA e n-HAm sintetizadas a partir de três sínteses que seguiram os mesmos parâmetros, a fim de avaliar a reprodutividade do método empregado. As n-HA foram preparadas utilizando as mesmas condições de preparação das n-HAm, porém sem adição de Fe^{2+} .

Tabela 3.1 – Análise elementar das nanopartículas de n-HA e n-HAm por ICP-OES.

Amostra	Concentração (%)			Proporção molar
	Fósforo	Cálcio	Ferro	Ca/P
n-HA	18,50	31,6	0,0	1,36
n-HAm 1	12,20	21,9	26,7	1,39
n-HAm 2	7,19	10,5	25,7	1,13
n-HAm 3	8,77	17,8	33,0	1,57
Média	9,39 ± 2,5	16,7 ± 6	28,5 ± 4	1,38

Os resultados apresentados na Tabela 3.1 para a amostra de n-HA mostram a formação da hidroxiapatita deficiente de cálcio que é caracterizada pela proporção de Ca/P < 1,67, como discutido anteriormente. Na hidroxiapatita deficiente de cálcio alguns grupos hidroxilas e/ou fosfatos são substituídos por carbonatos, caracterizada por ser a hidroxiapatita presente no sistema biológico e mais biocompatível. Nas amostras de n-HAm verifica-se uma mudança na proporção Ca/P como também no percentual de fósforo, cálcio e ferro. Porém, considerando a média das três amostras de n-HAm observa-se que a proporção Ca/P é próxima do valor obtido pela n-HA.

Estudos e discussões envolvendo reprodutividade na síntese de n-HAm não foram encontrados na literatura, mas é reportado a possibilidade de substituição do cálcio pelo ferro em casos que a proporção de Ca/P entre a n-HA e n-HAm é alterada^{125,127,130,131}. No presente trabalho não foi observada mudança significativa na proporção Ca/P entre o valor médio das amostras de n-HAm e o valor da n-HA sintetizadas, permitindo assim concluir que não houve substituição do ferro na estrutura da hidroxiapatita. Esse resultado também foi observado pelos grupos de Zeng¹³² e Wu¹²⁵.

3.1.2 Isoterma de adsorção e área superficial

As análises de área superficial específica das amostras de n-HAm foram feitas através de isotermas de adsorção pelo método de BET que estão apresentadas na Figura 3.1.

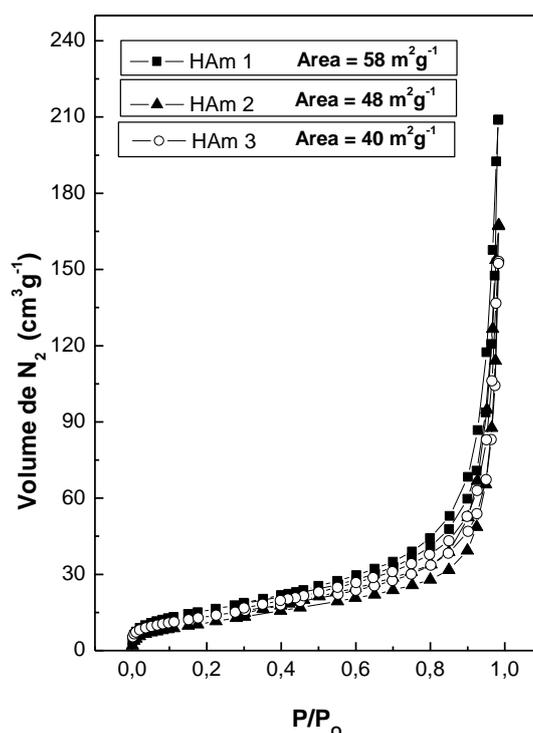


Figura 3.1 – Isotermas de adsorção e medidas de área superficial das n-HAm por BET. Parâmetros do BET: $C_1 = 61,875$; $C_2 = 47,618$; $C_3 = 76,189$. $R > 0,999$.

A Figura 3.1 apresenta os resultados das três sínteses de n-HAm que seguiram os mesmos parâmetros. Observa-se que as amostras obtiveram valores próximos de área superficial com média igual $48,6 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. De acordo com a literatura esse material pode ser classificado como macroporoso ou não poroso, exibindo isoterma do tipo II onde a adsorção ocorre via multicamadas e perfil de histerese do tipo H3 característica de formação de agregados de partículas e/ou macroporos semi-preenchidos¹³³.

O resultado se assemelha ao resultado encontrado na n-HA descrita por Agudelo⁹⁴ pelo mesmo processo de síntese, porém sem adição de Fe^{2+} , já o valor de área superficial encontrado no presente trabalho é inferior ao

mencionado pelo mesmo autor, que mostra uma área de $67 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Essa redução da área superficial pode ser atribuída à deposição da fase magnética após adição de Fe^{2+} na n-HA.

Com o intuito de minimizar a variabilidade dos parâmetros, a amostra n-HAm 1 foi utilizada para as demais análises físico-químicas e na preparação das nanofibras magnéticas, uma vez que exibiu maior área superficial. .

3.1.3 Difração de Raios-X

Na Figura 3.2 são apresentados os difratogramas pelo método de pó da n-HA e da n-HAm, a fim de avaliar a mudança na fase cristalina e a cristalinidade desses materiais.

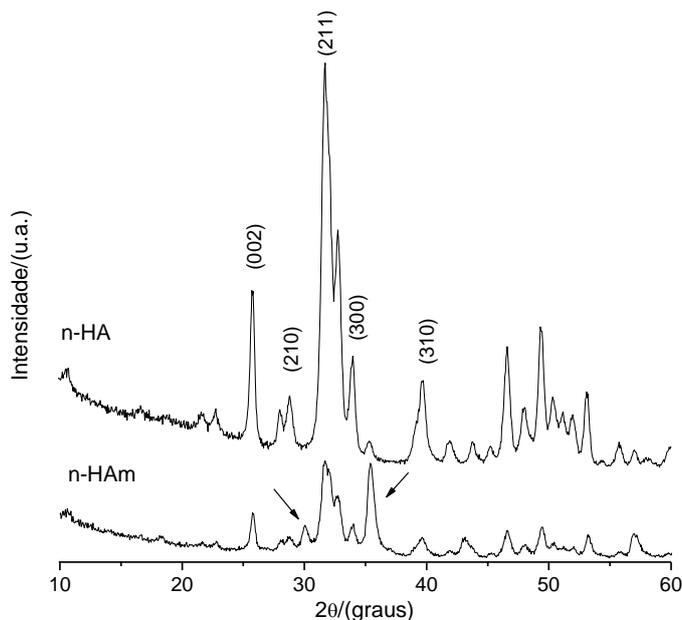


Figura 3.2 – Difratogramas de raios-X da n-HA e n-HAm sintetizadas. As setas indicam a presença dos picos correspondentes a magnetita.

Analisando o difratograma das n-HA verifica-se que a mesma está de acordo com os dados do Comitê de Padrões de Difração em pó (JCPDS 9-0432), apresentando picos intensos nos planos (002), (210), (211), (222), (300) e (310) como mostrado na Figura 3.2. No difratograma da n-HAm observa-se o surgimento de dois picos além dos picos correspondentes a n-HA, esses picos em valores de 2θ de $30,1^\circ$ e $35,4^\circ$ são correspondentes a estrutura cristalina da magnetita de acordo com os dados da JCPDS (19-0629). Isso indica a

deposição da fase cristalina composta por magnetita sobre n-HA. Resultados semelhantes foram reportados por Wu¹²⁵, Petchsang¹³⁰ e Silva¹²⁷ em materiais de n-HAm.

Foi observado ainda, a redução de intensidade e o alargamento dos picos no difratograma da n-HAm quando comparado ao difratograma da n-HA. Esse resultado sugere um aumento do grau de amorficidade da n-HA após a formação da fase magnética e/ou uma desordem estrutural provocada pela adição de Fe²⁺. Alterações na intensidade dos picos também foram observadas por trabalhos desenvolvidos pelo grupo de Wu¹²⁵ e Tseng¹³⁴ envolvendo a síntese de n-HAm.

3.1.4 Espectroscopia Raman

A Figura 3.3 mostra os espectros Raman das nanopartículas de n-HAm comparativamente ao espectro das n-HA.

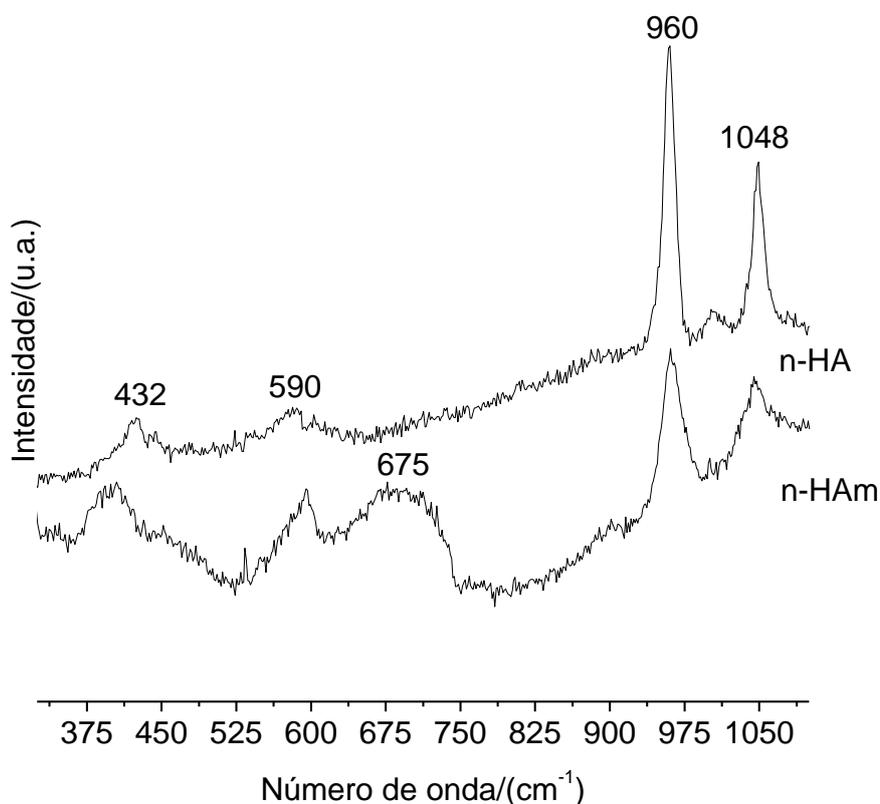


Figura 3.3 – Espectro Raman da n-HA e n-HAm sintetizadas. Laser de 647 nm.

Nos espectros Raman das n-HA e n-HAm mostrados na Figura 3.3 observam-se modos de estiramento em 432, 590, 960 e 1048 cm^{-1} que podem ser atribuídos ao grupo fosfato da hidroxiapatita ¹³⁵. Já o espectro de n-HAm mostrou picos de n-HA análogos e o surgimento de um pico amplo em torno de 675 cm^{-1} que poderia estar associado ao nível de energia A_{1g} do ferro-oxigênio da magnetita ¹³⁶. Esses resultados sugerem a presença de uma fração de magnetita na estrutura da n-HA, não alterando sua rede cristalina. Esses resultados estão em concordância com os resultados observados nos difratogramas de DRX desses materiais. Adicionalmente, esses dados apresentados estão de acordo com os observados para HA por Gopi *et al.* que obtiveram estiramentos em 433, 590, 960, 1041 cm^{-1} nos espectros Raman de n-HA ¹³⁷. Contudo, o pico em 675 cm^{-1} não foi observado pelos autores no espectro Raman da n-HAm que sugerem um deslocamento do sinal correspondente à magnetita para 714 cm^{-1} devido a funcionalização com n-HA.

3.1.5 Espectroscopia de Adsorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR da n-HA e da n-HAm são apresentados na Figura 3.4.

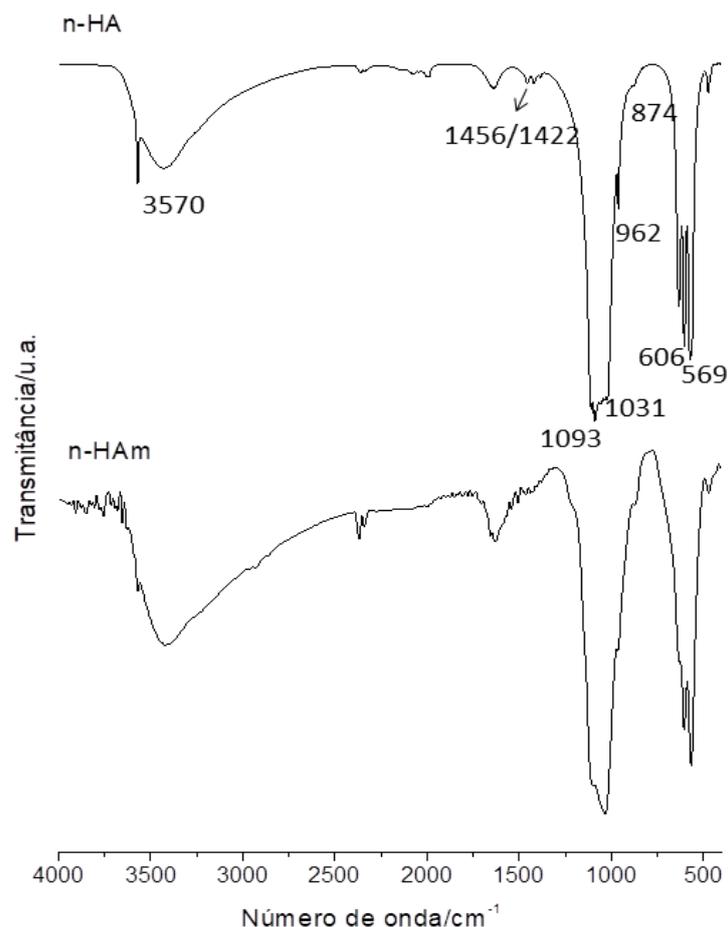


Figura 3.4 – Espectros de FTIR das n-HA e n-HAm sintetizadas.

No espectro da n-HA mostrado na Figura 3.4 observa-se bandas intensas em 569 e 606 cm^{-1} referentes às deformações das ligações (O-P-O) do grupo $(\text{PO}_4)^{-3}$; um ombro em 962 cm^{-1} e bandas intensas em 1031 e 1093 cm^{-1} correspondentes aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações (P-O) do grupo $(\text{PO}_4)^{-3}$; e uma banda em 3570 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação (O-H). A banda larga entre 3000 e 3700 cm^{-1} e a banda em 1634 cm^{-1} são relacionadas aos modos vibracionais da água absorvida no material^{129,138}. No espectro da n-HAm verifica-se as mesmas bandas observadas no espectro da n-HA, porém com menor intensidade. A banda característica da magnetita em 580 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação (Fe-O-) fica sobreposta às bandas de deformações das ligações (O-P-O) da hidroxiapatita majoritária na amostra. Esse perfil no espectro de FTIR da n-HAm também foi observado por outros trabalhos^{129,134}.

A presença das bandas em 1456/1422 cm^{-1} e a banda em 874 cm^{-1} indicam a substituição por grupos CO_3^{2-} , caracterizando a formação de HA tipo B e corroborando com os resultados de análise elementar. Nesse tipo de estrutura os grupos carbonatos substituem parcialmente os grupos PO_4^{-3} , sendo similar a HA presente no organismo e inclusive citadas como as que possuem maior afinidade por células osteoblásticas⁸⁵⁻⁸⁷.

3.1.6 Espectroscopia de Mössbauer

As n-HAm foram submetidas a duas análises por espectroscopia Mössbauer, a primeira à temperatura ambiente (300K) e a segunda à baixa temperatura (80K). Os respectivos espectros estão apresentados na Figura 3.5.

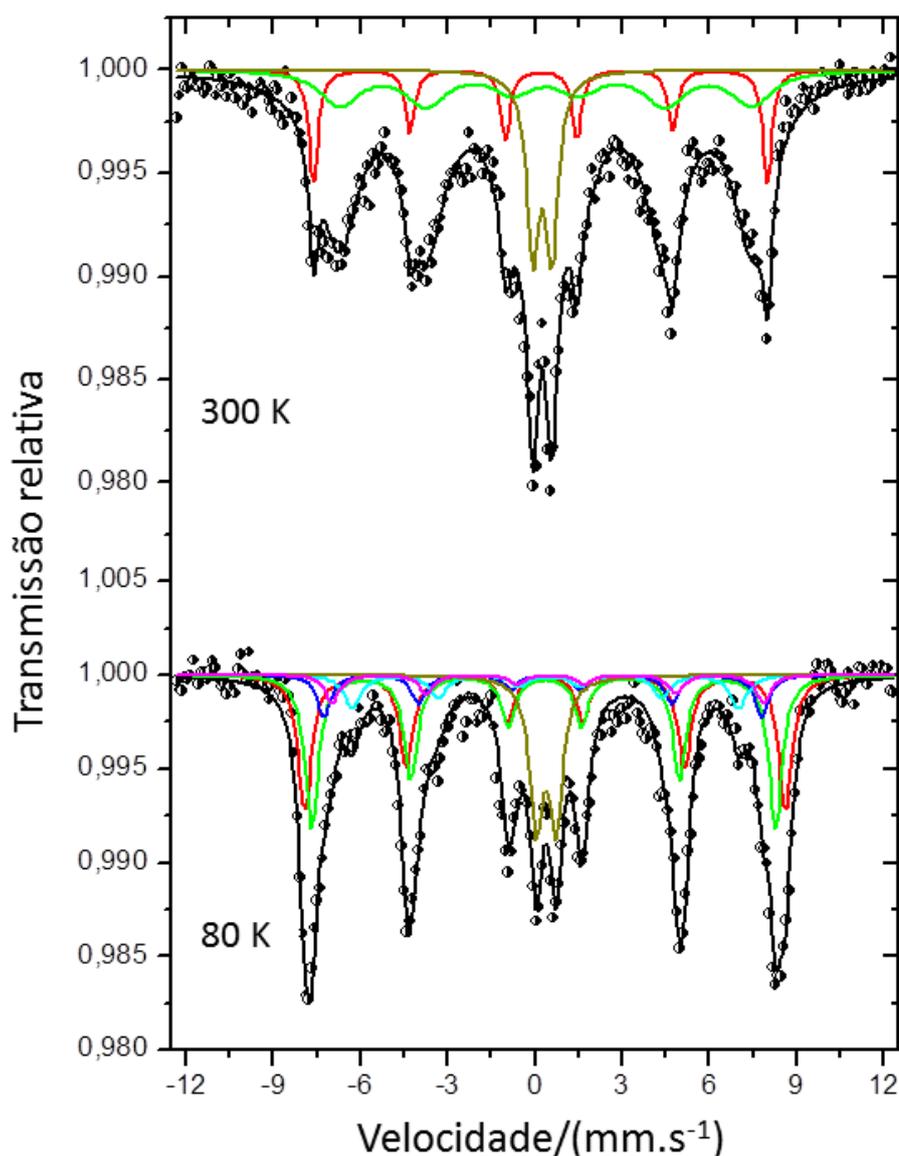


Figura 3.5 – Espectros Mössbauer de ^{57}Fe obtidos a 300 K e 80 K da amostra de n-HAm.

Analisando o espectro realizado à temperatura ambiente na Figura 3.5 observa-se a formação de pelo menos dois sextetos indicando a presença de espécies de ferro com interação hiperfina magnética. Esse espectro sugere também um carácter superparamagnético das n-HAm caracterizado pela deformidade da linha de base e representado pelo duplete no espectro. Isso ocorre porque nas nanopartículas magnéticas com diâmetro abaixo de 10 nm o momento magnético oscila rapidamente tornando nula a média temporal da magnetização durante a medida. Esse fator implica na inviabilidade da

interação hiperfina magnética dessa material e surgimento do duplete no espectro. Assim, o sexteto visualizado no espectro está relacionado à presença de partículas acima de 10 nm na amostra, indicando uma distribuição de tamanho de partículas nas n-HAm. A Tabela 3.2 mostra os valores dos parâmetros hiperfinos obtidos através dos ajustes do espectro de Mössbauer da amostra de n-HAm. Os dois componentes de campo hiperfino em 48,4 e 44,0 T corresponderam inicialmente ao Fe^{3+} do sítio tetraédrico e os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} do sítio octaédrico da magnetita, respectivamente, com quadrupolo aproximadamente nulo. Contudo, a discrepância na proporção das áreas entre as fases juntamente com a ausência do ponto isomérico correspondente ao Fe^{2+} (ISO ~ 0,67) contido no sítio octaédrico da magnetita sugerem a oxidação do material a maghemita.

A fim de obter interpretação mais detalhada da amostra de n-HAm também foi realizado um espectro desse material a 80K, como mostrado na Figura 3.5. Ao reduzir a temperatura, o efeito de relaxação progressivamente tende a ser bloqueado promovendo o ordenamento magnético do material¹³⁹. Assim, no espectro a 80 K observa-se melhor definição do sexteto devido ao alcance da temperatura de bloqueio das nanopartículas. Porém, a área referente ao duplete corresponde a somente 1 % a menos do que a área obtida no duplete do espectro a 300 K. Esse resultado sugere a presença de espécie de ferro paramagnético na amostra e juntamente com os valores de parâmetros hiperfinos indicam a formação de fosfato de ferro, como mostrado por Mayer *et al*¹⁴⁰. Por outro lado, a estrutura hiperfina do material foi ajustada com 5 sextetos, onde os valores dos parâmetros hiperfinos podem ser visualizados na Tabela 3.2. A interpretação dos espectros de nanopartículas de magnetita se torna muito difícil devido à transição de Verwey que ocorre abaixo de ~120, onde a estrutura cúbica da magnetita muda para triclinica rearranjando a estrutura do material e modificando sua interação hiperfina¹⁴¹. Assim, apesar de melhorar o ajuste, o decréscimo da temperatura na análise torna a caracterização desse material mais complexa. Nesse sentido, o ajuste do espectro a 80 K com 6 sextetos baseia-se na hipótese de formação de 5 sítios atribuídos a Fe^{3+} localizado no sítio tetraédrico, Fe^{3+} em sítios octaédricos, Fe com estados de valência intermediário, Fe^{2+} em sítios octaédricos e Fe^{3+}

associado a espécie Fe na forma de FeOOH relatada pelo grupo de Mayer em sínteses de apatitas na presença de ferro¹⁴⁰. Em estudos envolvendo nanopartículas de magnetita, Goya *et al.* relata que não existe uma concordância sobre o tipo de ajuste que melhor representa as propriedades da magnetita abaixo da temperatura de Verwey, sendo proposto de 2 ou até maior que 5 componentes magnéticos no ajuste do espectro desse material¹⁴¹.

Através do ajuste proposto, observa-se que 69 % das espécies de Fe se encontram em mistura de magnetita e maghemita, 16 % na forma de β -FeOOH e 15 % na forma de Fe paramagnético de FePO₄. A oxidação à hematita na amostra não foi sugerida devido à ausência de valores de quadrupolo correspondente a esse material (0,33), ao contrário do que foi observado pelo trabalho de Boda *et al.*¹⁴².

Tabela 3.2 - Parâmetros hiperfinos dos espectros Mössbauer à 80K das n-HAm (δ deslocamento isomérico, ϵ quadrupolo, B_{HF} campo hiperfino).

n-HAm	Fase/sítio	δ (mm/s) $\pm(0,05 \text{ mm/s})$	ϵ (mm/s) $\pm(0,05 \text{ mm/s})$	B _{HF} (T) $\pm(0,5 \text{ T})$	Área relativa $\pm(1 \%)$
300 K	Mistura (γ -Fe ₂ O ₃ , Fe ₃ O ₄ e β -FeOOH)	0,30	-0,03	48,4	10
		0,46	0,01	44,0	74
	Fe ³⁺	0,35	0,64		16
80 K	γ -Fe ₂ O ₃	0,42	-0,04	44,2	32
	Fe ₃ O ₄ e γ -Fe ₂ O ₃	0,45	-0,01	51,2	28
		0,41	-0,07	46,9	9
	β -FeOOH	0,53	-0,07	41,3	10
		0,59	-0,1	46,0	6
	FePO ₄	0,48	0,67		15

3.1.7 Medidas de Magnetização

A Figura 3.6 apresenta a curva de histerese magnética obtida para a amostra de n-HAm adquirida por SQUID a 300K.

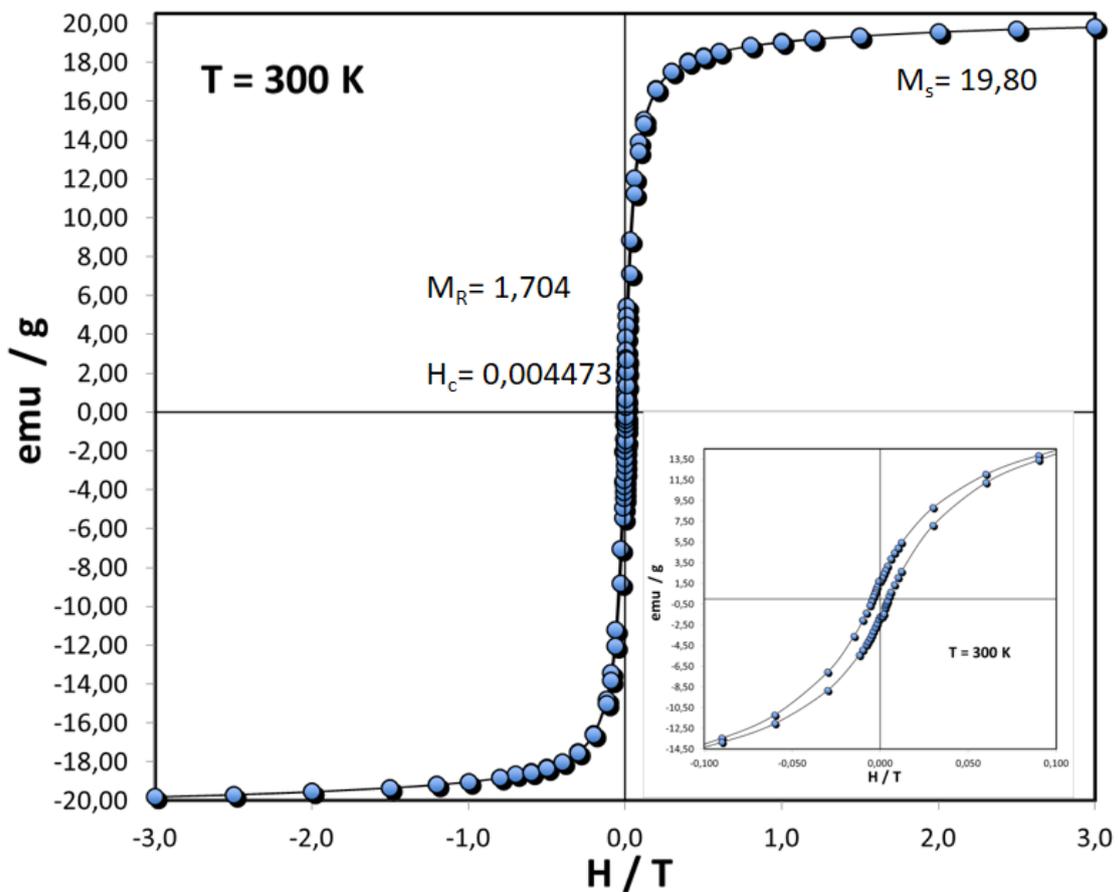


Figura 3.6 – Curva de histerese da n-HAm obtida por SQUID à 300K.

Analisando a Figura 3.6 é possível encontrar os valores de magnetização de saturação (M_S), magnetização remanescente (M_R), e coercividade de campo (H_c) iguais a 19,80 emu/g, 1,704 emu/g e 0,004473 T, respectivamente. O valor de M_S obtido é superior a alguns trabalhos relatados na literatura, nos quais mostram valores de M_S iguais a 11,05⁹⁶; 7,4¹³⁷ e 4,2¹⁰² emu/g. Apesar dos valores de H_c e M_R não serem nulos, eles são bem próximos de zero indicando um caráter superparamagnético dessas nanopartículas. Assim, mesmo com a presença de material paramagnético indicada pela análise por Mössbauer, o caráter ferrimagnético da amostra se

sobrepôs. É importante ressaltar que a maioria dos trabalhos reportados na literatura não mostram aproximação na curva de histerese ou a baixo campo magnético, não apresentando uma discussão detalhada dos valores de H_c e M_R . Adicionalmente, no trabalho desenvolvido por Gopi e colaboradores¹³⁷ esse tópico foi discutido, sendo considerado um comportamento superparamagnético para nanopartículas que apresentavam valores de H_c e M_R não nulos ou próximos de zero.

Em aplicações biológicas o caráter superparamagnético é importante, uma vez que ao remover o campo magnético externo a magnetização remanescente é nula. Essa propriedade pode evitar a aglomeração e a possível embolização dos vasos capilares com o uso de MNPs. Contudo, estudos de H_c e M_R envolvendo uma estimativa de valores seguros para aplicações biológicas não foram encontrados na literatura.

A fim de estudar o comportamento magnético dessa amostra foi realizado um procedimento padrão onde se realiza duas medidas de magnetização: FCM (Field Cooled Magnetization) e ZFCM (Zero Field Cooled Magnetization). Na primeira medida a amostra, inicialmente à baixa temperatura, é aquecida sob aplicação de um determinado campo magnético, e, a segunda medida é feita na sequência, onde o campo magnético é removido e a amostra é então resfriada. A intercessão dessas duas medidas mostra a temperatura de bloqueio das nanopartículas, ou seja, a temperatura na qual elas passam a se comportarem como materiais superparamagnéticos. A Figura 3.7 mostra as curvas de ZFCM e FCM para a amostra de n-HAm.

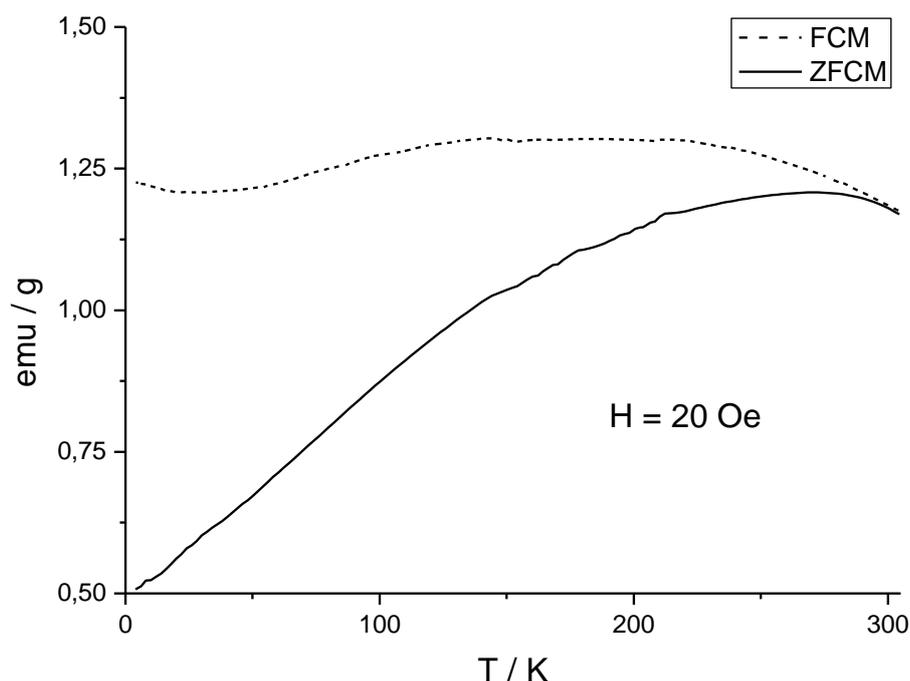


Figura 3.7 – Magnetização dependente da temperatura das n-HAm. Curvas de FCM e ZFCM com aplicação de campo de 20 Oe.

Analisando a Figura 3.7 observa-se que não foi possível obter a intercessão das curvas nas medidas de FCM e ZFCM apresentados. Dessa forma, a temperatura de bloqueio (T_B) não pode ser determinada de forma precisa. Para o teste requerido seria necessário um equipamento com medições acima da temperatura de 300 K, porém pode-se observar que a temperatura de bloqueio está próxima a temperatura de 300 K já que há uma grande aproximação das curvas à essa temperatura. Um gráfico similar à Figura 3.7 foi obtido pelo grupo de Gloria em substrato de poli-(ϵ -caprolactona) com n-HAm, onde T_B também apresentou um valor próximo de 300 K, porém não pode ser determinado com precisão¹⁰⁰.

No estudo desenvolvido por Goya *et. al.*¹⁴¹ com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram obtidas valores crescentes de T_B a medida que o diâmetro das nanopartículas aumentavam. Nesse sentido, nanopartículas com tamanhos de 5, 10, 50 e 150 nm obtiveram valores de T_B iguais a 45, 107, ~300 e ~400 K, respectivamente. Esses dados revelam a dependência da T_B em relação ao diâmetro das nanopartículas, interferindo

diretamente em seu caráter superparamagnético. Nesse sentido, observa-se que os resultados da n-HAM estão de acordo com os estudos desenvolvidos por esse grupo, uma vez que a relação entre o valor de T_B das n-HAM com seu tamanho médio (~ 100 nm) são similares aos dados apresentados por eles.

Ademais, apesar do valor de T_B não ser determinado de forma precisa pela curva de ZFCM/FCM mostradas na Figura 3.7, seu valor próximo de 300 K indica que à temperatura de 37° C ou 310 K as nanopartículas estão acima da sua temperatura de bloqueio e, conseqüentemente podem ser consideradas superparamagnéticas.

A Figura 3.8 mostra a curva de histerese da n-HAM à temperatura de 4 K, permitindo avaliar o seu comportamento à baixa temperatura.

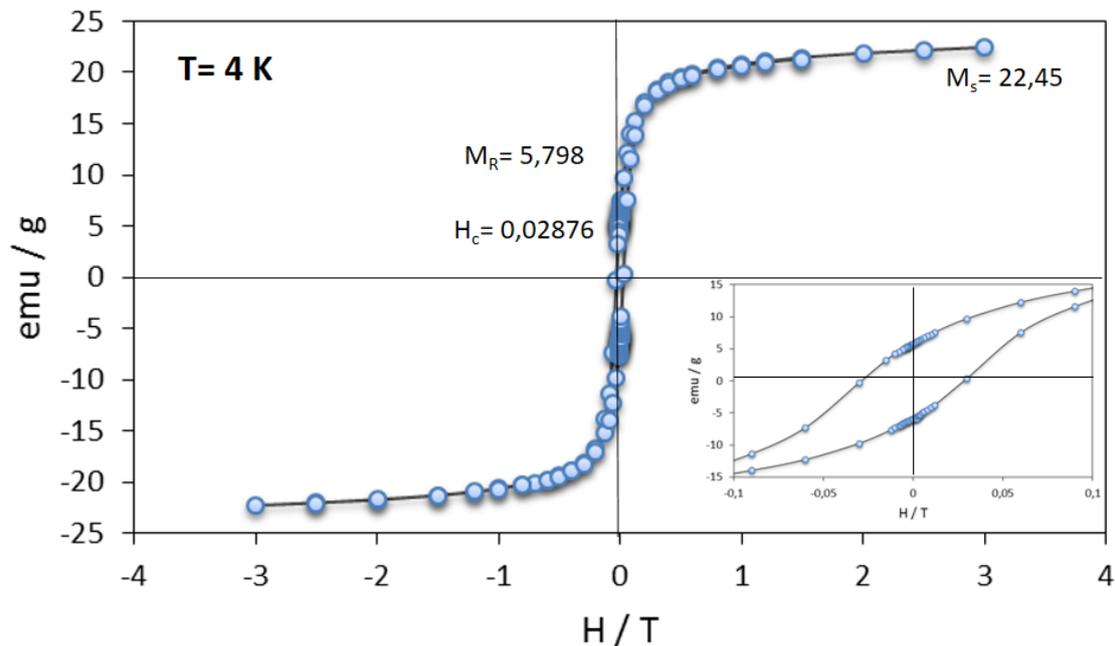


Figura 3.8 - Curva de histerese das n-HAM obtida por SQUID à 4K.

A partir da Figura 3.8 verifica-se um aumento dos valores de M_S , M_R e H_c em relação aos obtidos à 300 K, sendo iguais a 22,45 emu/g, 5,798 emu/g e 0,02876 T, respectivamente. Esse comportamento é similar ao de MNPs de óxido de ferro, no qual se observa que ao abaixar a temperatura as nanopartículas tendem a ficar mais bloqueadas, gerando valores maiores de H_c e M_S .

3.1.8 Morfologia e Tamanho

Na Figura 3.9 estão apresentadas as micrografias das n-HAm e sua respectiva largura e comprimento médio.

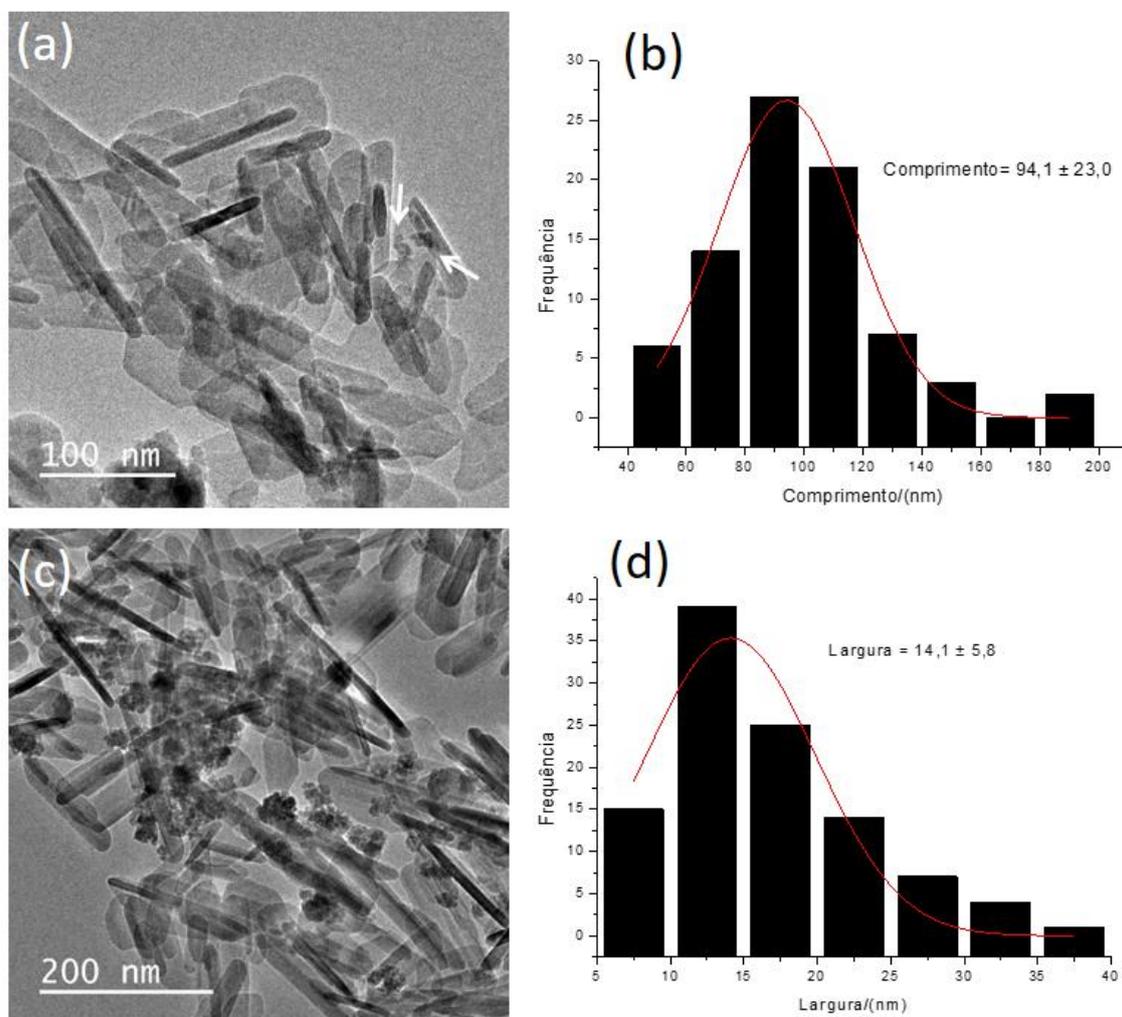


Figura 3.9 – (A)(C) Micrografias de TEM das n-HAm. Histogramas do (B) diâmetro e (D) largura das n-HAm. *Setas em branco na micrografia (a) indicam domínios de óxido de ferro sobre os bastonetes de n-HA.

As micrografias de TEM juntamente com os histogramas mostrados na Figura 3.9 permitem determinar o tamanho médio e a morfologia das n-HAm. Observa-se que as n-HAm têm morfologia de bastonetes com comprimento em torno de 94 nm e diâmetro média de 14 nm. Na micrografia da Figura 3.9 é nítida a formação de agregados de MNPs na superfície e entre os bastonetes de n-HA. Na micrografia da Figura 3.9c verifica-se que a deposição de MNPs é

feita randomicamente sobre os bastonetes. Esses resultados são semelhantes aos obtidos pelo grupo de Gopi ¹³⁷, que relatou a formação de bastonetes de n-HAm com aproximadamente 90 nm de diâmetro. Contudo, Gopi utilizou o método por ultrassom na preparação de suas nanopartículas o que leva à um maior custo ao seu produto final. Além disso, as n-HAm do presente estudo apresentaram um menor diâmetro que as produzidas por Wu e colaboradores ¹²⁵, que relataram partículas de 300 nm empregando o mesmo método. Esse último fato pode ter sido causado pela diferença entre os sais precursores, no qual Wu utiliza ácido ortofosfórico e hidróxido de cálcio como reagentes iniciais.

Ademais, a dimensão obtida das n-HAm pode ser descrita como segura para aplicação em sistemas biológicos, sendo discutido que partículas entre 30-100 nm apresentam diversas vantagens em relação ao tempo de circulação no organismo, internalização celular, extravasamento em tecidos tumorais, e ativação do sistema imune ⁴¹.

3.2 Preparação e caracterização do PLGA funcionalizado com sulfametoxazol (PLGA-S)

A funcionalização do PLGA foi baseada na formação de ligação amídica entre o grupo carboxilato terminal desse polímero e o grupo amina da SMZ com auxílio dos reagentes DCC e NHS, como mostrado na Figura 3.10.

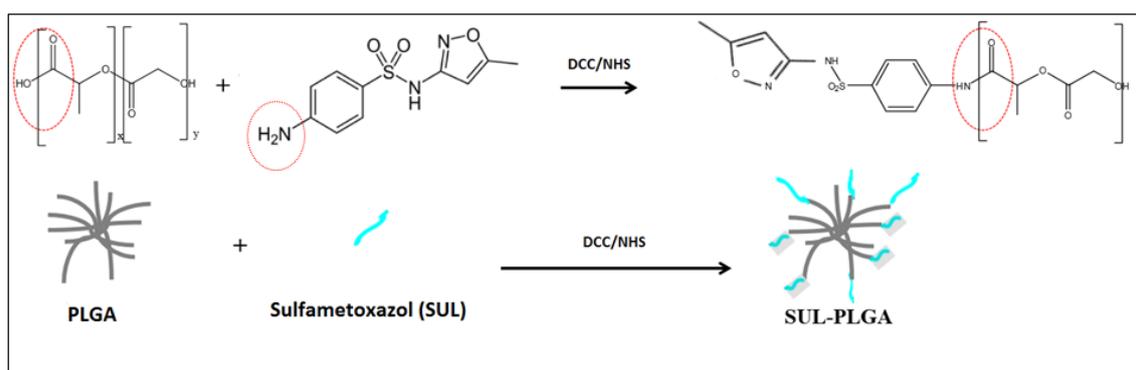


Figura 3.10 – Esquema da reação de funcionalização do PLGA com SMZ através dos reagentes DCC/NHS. ³⁴

Na primeira etapa o grupo carboxila terminal reage com os reagentes DCC/NHS formando um éster succinimida. Na etapa subsequente ocorre um

ataque nucleofílico dos pares de elétrons do nitrogênio do grupo amina da SMZ sobre o carbonila, dando origem à ligação amídica e, conseqüentemente ao polímero funcionalizado¹⁴³.

3.2.1 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR podem informar a respeito dos grupos funcionais presentes nas amostras, indicando nesse caso específico a formação da ligação amídica e, conseqüentemente, a funcionalização efetiva do PLGA com a SMZ.

A Figura 3.11 mostra os espectros de FTIR do PLGA-S e de seus precursores PLGA e SMZ.

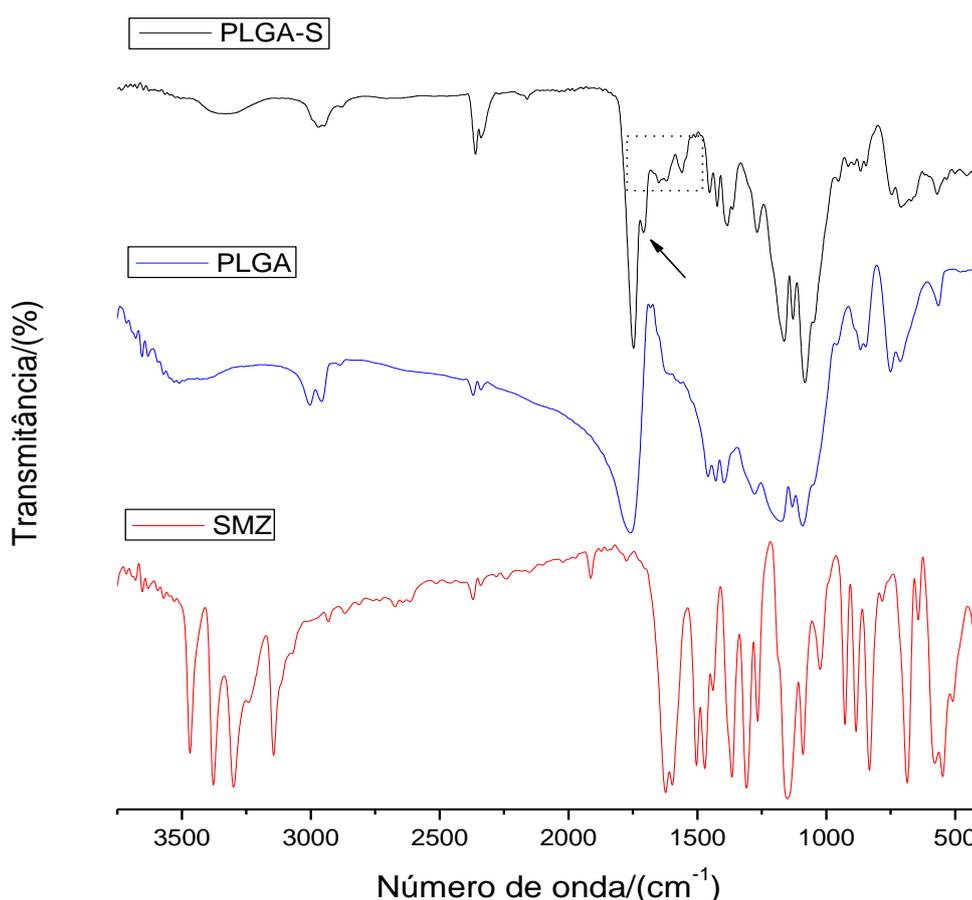


Figura 3.11 - Espectros de FTIR do PLGA-S (linha preta), PLGA (linha azul) e SMZ (linha vermelha). A seta indica a formação da ligação amídica e o quadrado pontilhado mostra bandas referentes a SMZ.

O espectro de FTIR do PLGA apresentou bandas em 1090 e 1173 cm^{-1} correspondentes ao estiramento da ligação (C-O-C) e (C-O-O) do éster, banda em 1273 cm^{-1} característica do estiramento da ligação (C-O) do ácido carboxílico; banda em 1386 cm^{-1} correspondente ao estiramento simétrico e assimétrico das ligações do grupo metila; bandas em 1393 e 1458 cm^{-1} associadas à deformação da ligação (C-H) do grupo CH_3 ; banda em 1429 cm^{-1} relacionadas à deformação da ligação (OC-H) do ácido glicólico; banda intensa em 1760 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação (C=O) do éster e ácido carboxílico do polímero; bandas de baixa intensidade em 2999 e 2956 cm^{-1} relacionadas aos estiramentos assimétricos das ligações dos grupos (CH_3 e CH_2); e uma banda larga na região de 3500 à 3250 cm^{-1} conferida ao estiramento da ligação (OH) do ácido carboxílico terminal do PLGA^{144,145}.

Considerando o espectro de FTIR da SMZ observaram-se uma banda em 928 cm^{-1} característica do estiramento da ligação (SN); bandas em 1088, 1148 e 1307 cm^{-1} referente aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação (SO_2); uma banda em 1260 cm^{-1} característica da deformação da ligação (C-H) pirimidínica e do estiramento da ligação (C-N) da anilina; as bandas em 1503 e 1596 cm^{-1} atribuídas ao estiramento da ligação C=C do anel pirimidínico; uma banda intensa em 1622 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação (C-N) e deformação da ligação (NH_2) do anel isoxazol; banda em 3300 relacionada ao estiramento da ligação (N-H) da sulfonamida e bandas em 3378 e 3467 cm^{-1} associadas aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação (N-H) da anilina¹⁴⁶.

Na análise do espectro de FTIR do polímero funcionalizado (PLGA-S) verificou-se o surgimento da banda em 1709 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação (C=O) de amida, sugerindo a formação efetiva da ligação amídica entre o PLGA e a SMZ. Além disso, a presença das bandas em 1650 e 1620 cm^{-1} atribuída aos estiramentos das ligações (C-NH) e (N-H) de amida sugerem também a formação da ligação.

3.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN) e Quantificação de SMZ na PLGA-S

Para verificar a eficiência da funcionalização foram realizadas análises de RMN de ^{13}C e ^1H do PLGA modificado com SMZ e dos precursores PLGA e SMZ. O grau de funcionalização de SMZ presente no PLGA-S foi determinado através da integração dos sinais de RMN ^1H .

-RMN da SMZ

As Figuras 3.12 e 3.13 apresentam os espectros de ^{13}C e ^1H da SMZ obtidos pela técnica de RMN em solvente de DMSO deuterado, respectivamente.

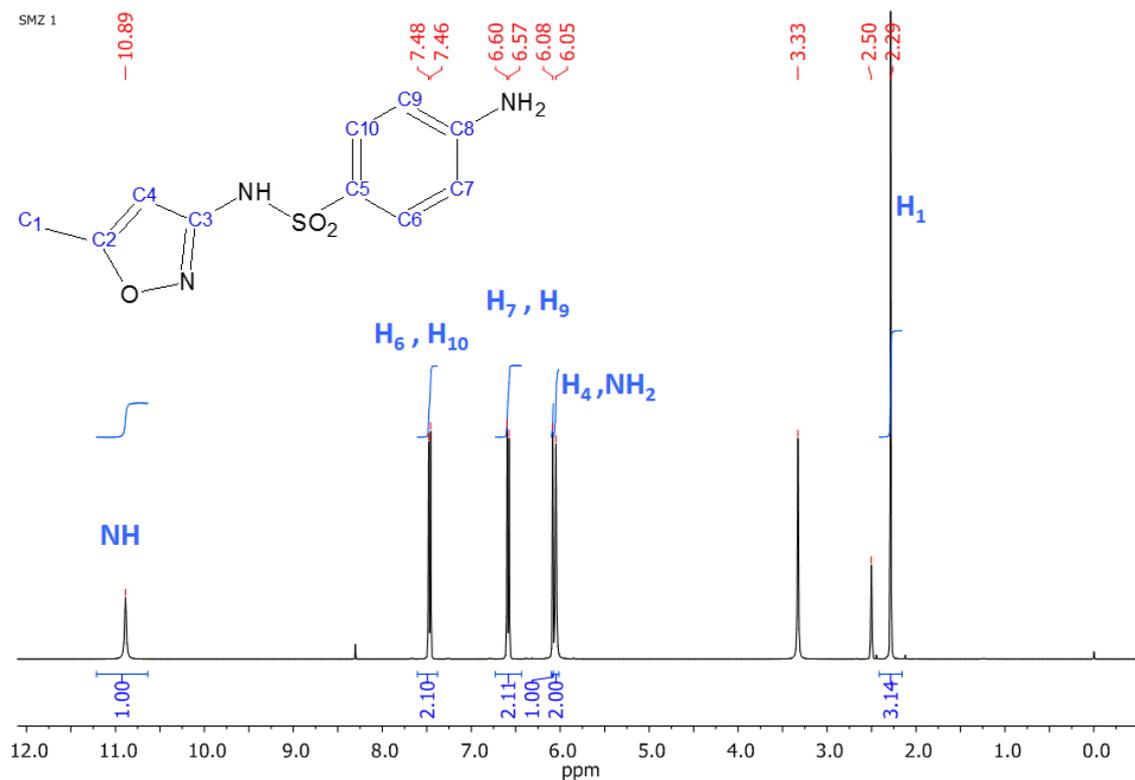


Figura 3.12 – Espectro de RMN ^1H da SMZ em DMSO, 400 MHz.

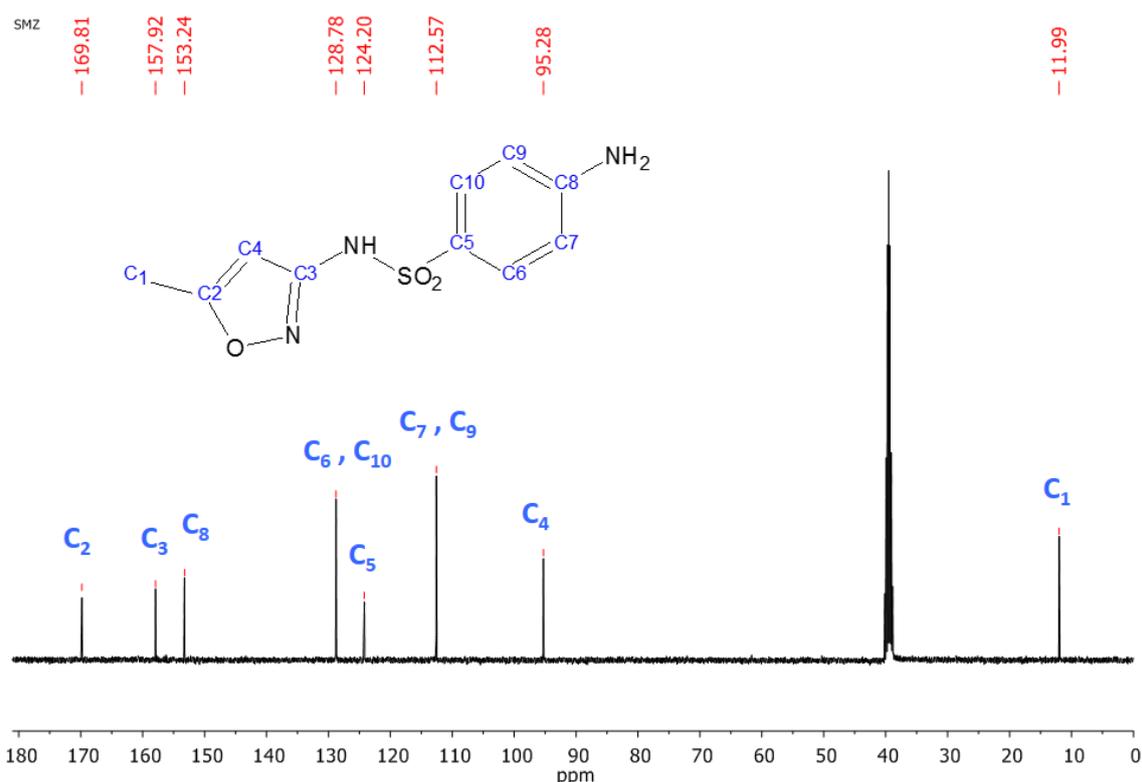


Figura 3.13 – Espectro de RMN ^{13}C da SMZ em DMSO, 400 MHz.

De acordo com as Figura 3.12 e 3.13 os espectros obtidos pela técnica de RMN estão de acordo com a estrutura do fármaco SMZ. Os sinais de ^1H e suas integrações correspondentes à CH_3 (δ 2,29), NH_2 (δ 6,05), CH (δ 6,08), CH do anel (δ 6,57/6,60 e 7,46/7,48) e NH (δ 10,89) estão em concordância com os relatados por Bouchoucha *et al.*¹⁴⁷. E, as atribuições dos sinais de ^{13}C em δ 11,99 (C_1), δ 95,28 (C_4), δ 112,57 (C_9 , C_7), δ 124,20 (C_5) δ 128,78 (C_6 , C_{10}), δ 153,24 (C_8), δ 157,92 (C_3), δ 169,81 (C_2) estão de acordo com Kartashov *et al.*¹⁴⁸. É importante mencionar que os sinais de ^1H em δ 2,50 e δ 3,33 são referentes a hidrogênios de H_2O e do DMSO, respectivamente.

-RMN da PLGA

As Figuras 3.14 e 3.15 apresentam os espectros de ^{13}C e ^1H da PLGA obtidos pela técnica de RMN em solvente de DMSO deuterado, respectivamente.

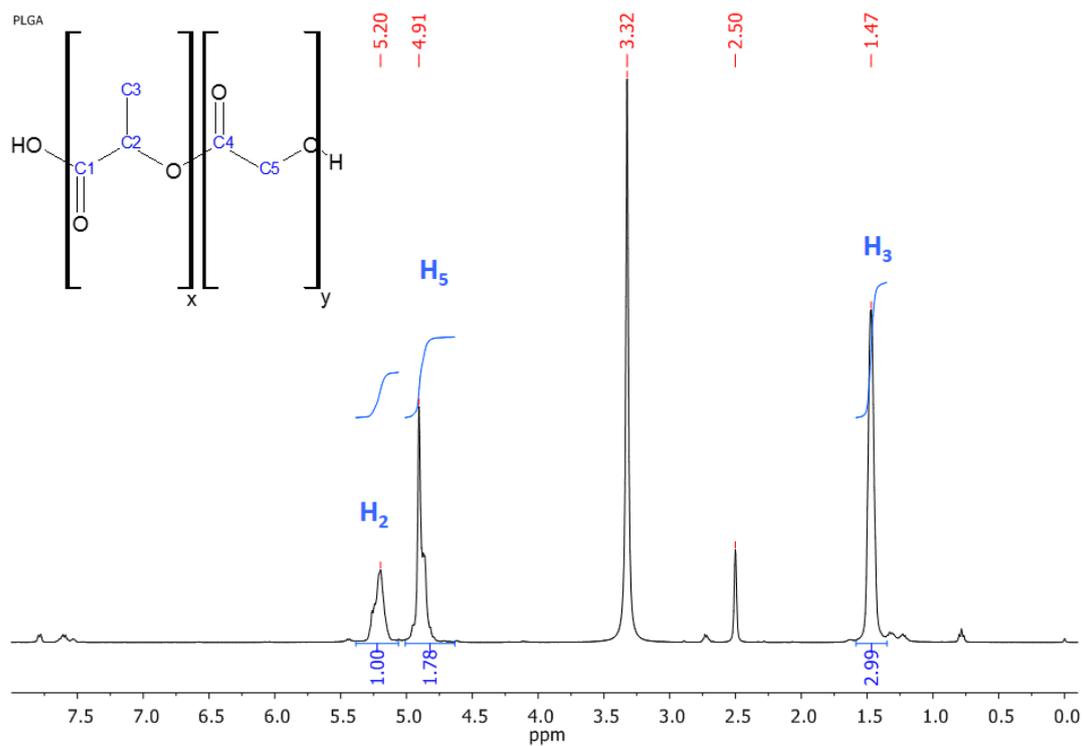


Figura 3.14 – Espectro de RMN ^1H do PLGA em DMSO, 400 MHz.

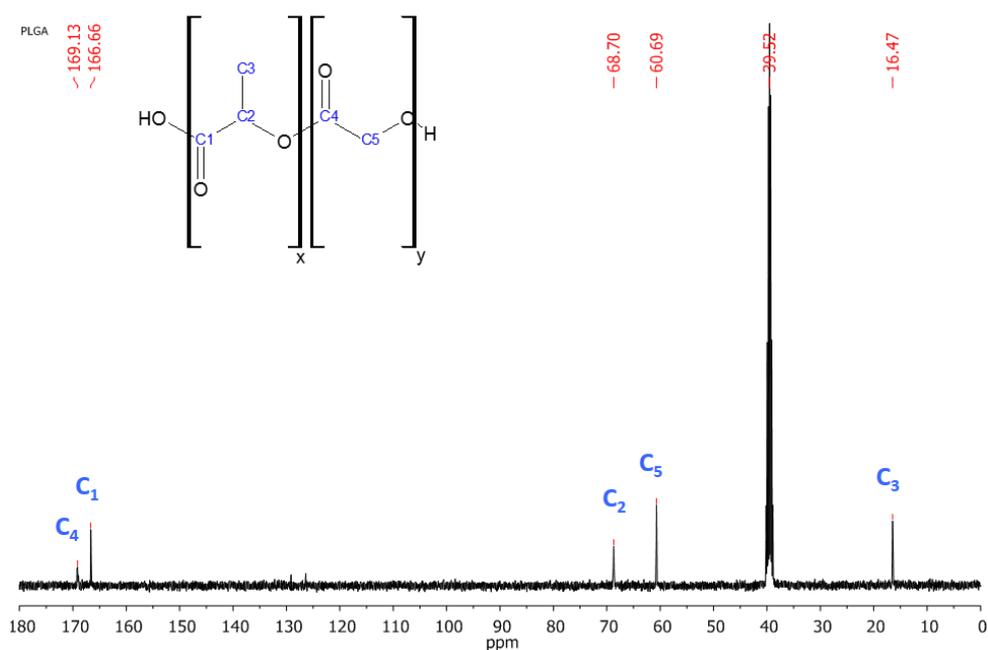


Figura 3.15 – Espectro de RMN ¹³C do PLGA em DMSO, 400 MHz.

Nas Figuras 3.14 e 3.15 os sinais obtidos por RMN estão de acordo com a estrutura do polímero PLGA. Na Figura 3.14 foi possível identificar sinais intensos de hidrogênio característicos do PLGA, sendo o sinal em δ 4,91 relativo ao ¹H do CH₂ do monômero PGA e os sinais em δ 5,20 e 1,47 correspondentes aos hidrogênios CH e CH₃ do monômero PLA. Os sinais de ¹³C do PLGA podem ser observados na Figura 3.15 em δ 16,47 (C₃), δ 60,69 (C₅), δ 68,70 (C₂), δ 166,66 (C₁) e δ 169,13 (C₄)¹⁴⁹.

-RMN da PLGA modificado com SMZ (PLGA-S)

As Figuras 3.16 e 3.17 mostram os espectros de RMN de ¹H e ¹³C com DEPT do PLGA-S, respectivamente.

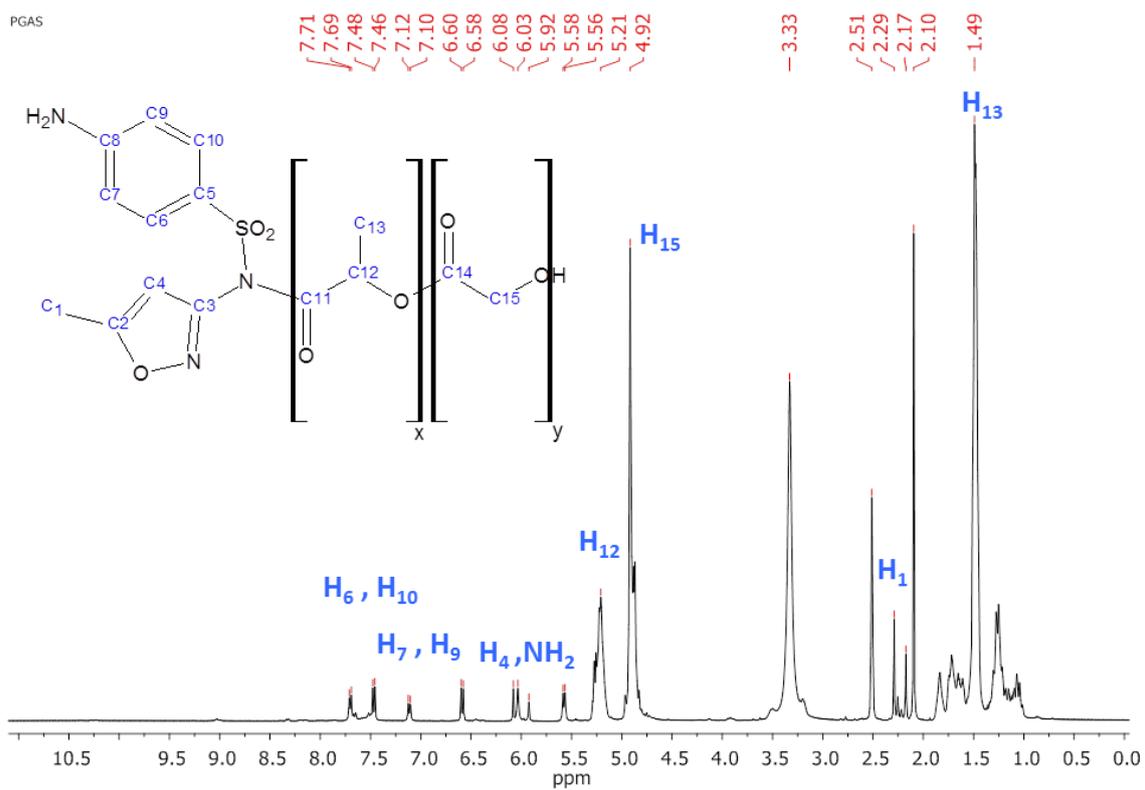


Figura 3.16 – Espectro de RMN ¹H do PLGA-S em DMSO, 400 MHz.

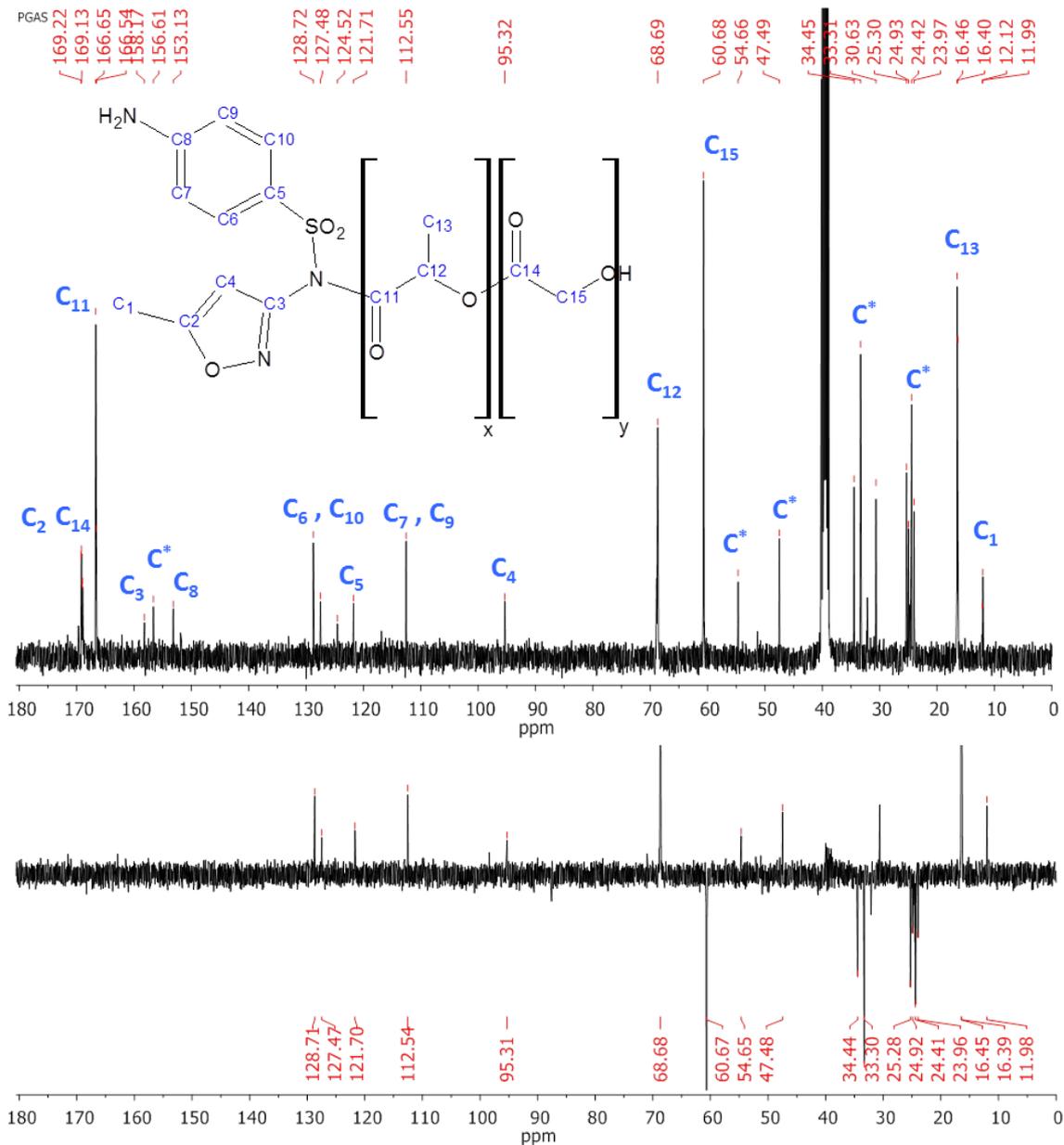


Figura 3.17 – Espectro de RMN ^{13}C com DEPT do PLGA-S em DMSO, 400 MHz.

Na Figura 3.16 observam-se sinais intensos de ^1H correspondentes ao PLGA em δ 1,49 (CH_3), δ 4,92 (CH_2) e δ 5,21 (CH) e sinais de menor intensidade referentes ao fármaco SMZ em δ 2,29 (CH_3), δ 6,03 (NH_2), δ 6,08 (CH), δ 6,58/6,60 (CH_2) e δ 7,46/7,48 (CH_3). O sinal referente ao NH não foi visualizado nesse espectro, sugerindo a funcionalização do polímero a partir do NH alifático. Outros sinais também foram observados na região de carbono

secundário e terciário (δ 5,6 a δ 7,7) indicando presença de outras espécies, possivelmente de subprodutos da reação.

No espectro de RMN ^{13}C do PLGA-S mostrado na Figura 3.17, os sinais do PLGA e da SMZ também foram identificados. Os sinais dos carbonos do PLGA podem ser observados em δ 16,46 (C_{13}), δ 60,68 (C_{15}), δ 68,69 (C_{12}), δ 166,65 (C_{11}) e δ 169,13 (C_{14}). Já os sinais de ^{13}C atribuídos ao ligante SMZ podem ser visualizados em δ 11,99 (C_1), δ 95,32 (C_4), δ 112,55 (C_9 , C_7), δ 124,52 (C_5) δ 128,72 (C_6 , C_{10}), δ 153,13 (C_8), δ 158,17 (C_3) e δ 169,22 (C_2).

Para uma melhor caracterização também foi realizado o DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) que permite determinar a multiplicidade de substituição do átomo de carbono com os hidrogênios. No DEPT os carbonos secundários apresentam sinal invertido no espectro, ao contrário de carbonos terciários e primários. Carbonos quaternários não apresentam sinal no DEPT. Nesse sentido, é esperado que no composto PLGA-S somente o sinal referente ao CH_2 do PLGA apresentaria sinal invertido no espectro. Contudo, os sinais em torno de δ 32 e 24 relacionados a subprodutos da reação também apresentaram sinais invertidos no DEPT. Assim, os sinais em δ 24,42 (CH_2), δ 25,30 (CH_2), δ 33,31 (CH_2), δ 47,49 (CH) e δ 156,61 ($\text{C}=\text{O}$) podem ser correspondentes aos carbonos do subproduto da reação de funcionalização o DCU ¹⁵⁰.

A Tabela 3.3 mostra os valores de deslocamento químico obtido tanto do PLGA-S quanto do PLGA e SMZ, onde se observam deslocamentos dos valores dos sinais do polímero modificado em relação aos sinais dos precursores PLGA e SMZ. Essa variação indica que os carbonos da PLGA-S estão em um ambiente químico diferente do polímero não modificado, sugerindo que a funcionalização com SMZ foi eficiente. É importante ressaltar ainda que os carbonos mais próximos da região de funcionalização da SMZ com o polímero apresentam uma maior variação de deslocamento químico, corroborando com a estrutura proposta de funcionalização.

Tabela 3.3 – Valores do deslocamento químico de ^{13}C do PLGA, SMZ e PLGA-S.

Composto	Carbono	δ (ppm)			$\Delta\delta$ (ppm)
		PLGA	PLGA-S	SMZ	
PLGA	CH_3	16,47	16,46	-	- 0,01
	CH_2	60,69	60,68	-	- 0,01
	CH	68,70	68,69	-	- 0,01
	$\text{HOC}=\text{O}$	166,66	166,65	-	- 0,01
	$\text{RC}=\text{O}$	169,13	169,13	-	0,00
SMZ	CH_3	-	11,99	11,99	0,00
	CH	-	95,28	95,32	- 0,04
	CH aromático	-	112,57	112,55	+ 0,02
	$\text{C}-\text{SO}_2$	-	124,20	124,52	- 0,32
	CH aromático	-	128,78	128,72	+ 0,06
	CNH_2	-	153,24	153,13	+ 0,11
	NCN	-	157,92	158,17	- 0,25
	CON	-	169,81	169,22	+ 0,59

-Grau de funcionalização por SMZ

A Figura 3.18 mostra o espectro de RMN ^1H do PLGA-S com integração dos sinais. O sinal de hidrogênio do CH da cadeia polimérica do PLGA em δ 5,31 foi utilizado como referência de integração representando a porção polimérica e o hidrogênio do CH do fármaco SMZ em δ 6,08 foi utilizado como referência representando a porção do ligante.

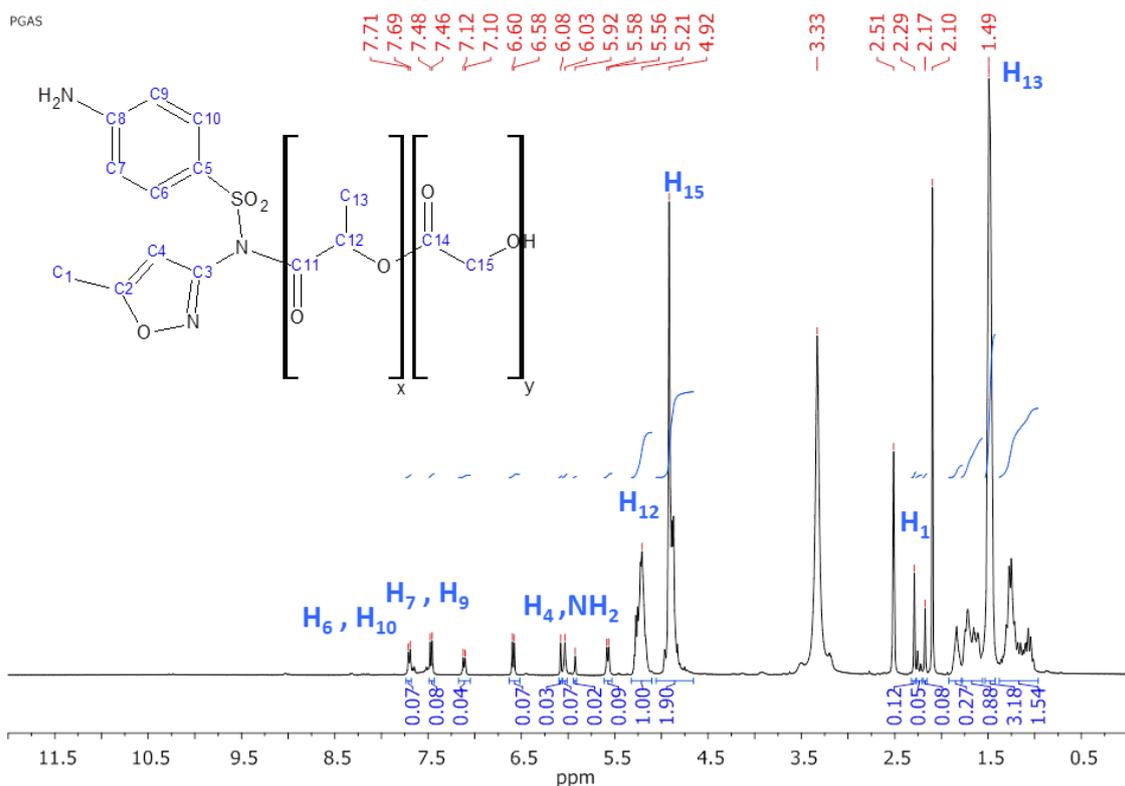


Figura 3.18 – Espectro de RMN ^1H do PLGA-S com integração em DMSO, 400 MHz.

Analisando a Figura 3.18 observa-se que o sinal referente ao ligante em δ 6,08 possui integração de 0,03 que corresponde a 3 % do sinal referente ao polímero δ 5,21 com integração de 1,00. Para uma funcionalização de 100 % do PLGA com SMZ, esperava-se que o sinal referente ao ligante fosse de 0,3 % do sinal referente ao polímero:

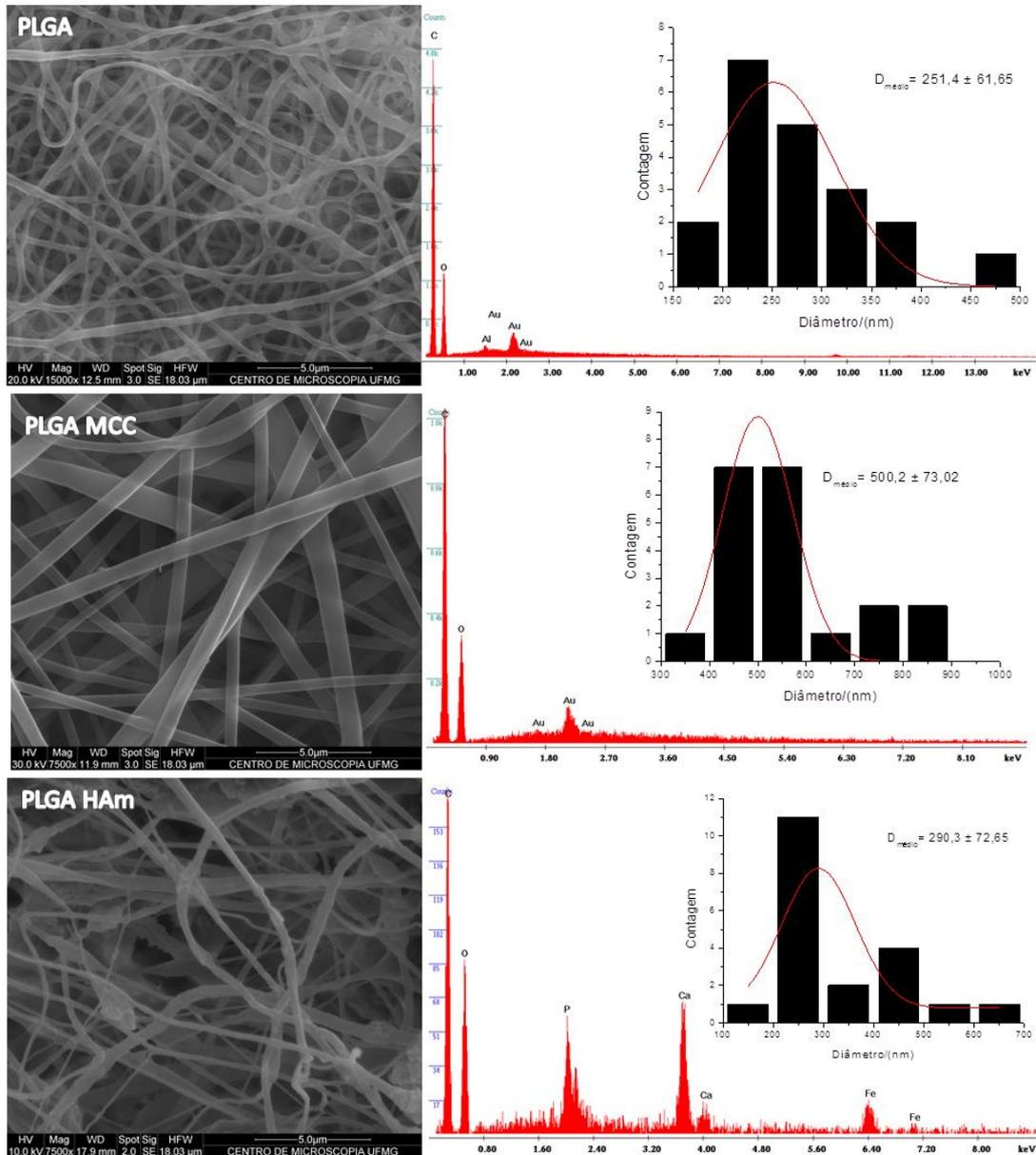
$$^1\text{H}_{\text{SMZ}}/^1\text{H}_{\text{PLGA}} = 1/(\text{MM}_{\text{PLGA}}/\text{MM}_{\text{monômero}}) = 1/(43.900/130) = 0,003$$

Assim, como o valor obtido através da técnica de integração por RMN foi superior ao esperado, não foi possível avaliar o percentual de SMZ ligada efetivamente ao PLGA. Esses resultados sugerem que uma grande porcentagem de SMZ foi incorporada na matriz polimérica não covalentemente.

3.3 Preparação e Caracterização das Nanofibras Magnéticas

3.3.1 Morfologia e Composição

As Figuras 3.19 e 3.20 apresentam as micrografias, os espectros de EDX e os respectivos histogramas de diâmetro das nanofibras com as matrizes de PLGA e de PLGA-S, respectivamente.



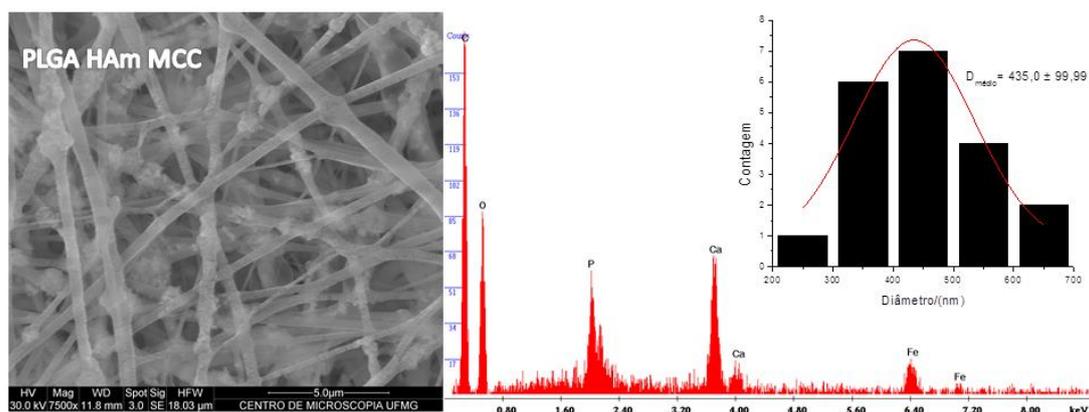


Figura 3.19 – Micrografias SEM das nanofibras de PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC e seus respectivos espectros de EDX e histogramas de diâmetro.

Analisando as micrografias da Figura 3.19, observa-se que todas as nanofibras apresentaram uma deposição randômica de fios. A nanofibra de PLGA obteve um diâmetro médio de 257 nm, inferior ao observado na nanofibra de PLGA/MCC com diâmetro médio de 500 nm. As nanofibras contendo n-HAm apresentaram uma morfologia diferenciada, com uma heterogeneidade na sua superfície e formação de agregados distribuídos aleatoriamente. A nanofibra de PLGA/HAm também obteve um diâmetro inferior em comparação com a nanofibra de PLGA/HAm/MCC, sendo esses iguais a 290 e 435 nm, respectivamente.

A Figura 3.19 mostra também os espectros de EDX relativos a cada amostra, onde pode ser identificado a sua composição elementar. É importante ressaltar que o elemento ouro (Au) está presente em todos os espectros devido ao processo de recobrimento na preparação das amostras. Outro fato que deve ser salientado é que o nitrogênio não pode ser identificado nas amostras contendo MCC ou SMZ por estar abaixo do limite de detecção do aparelho. Contudo, pode ser verificada a presença de cálcio (Ca), fósforo (P) e ferro (Fe) nas amostras contendo n-HAm, e carbono e oxigênio em todas as amostras devido principalmente ao polímero PLGA em maior proporção.

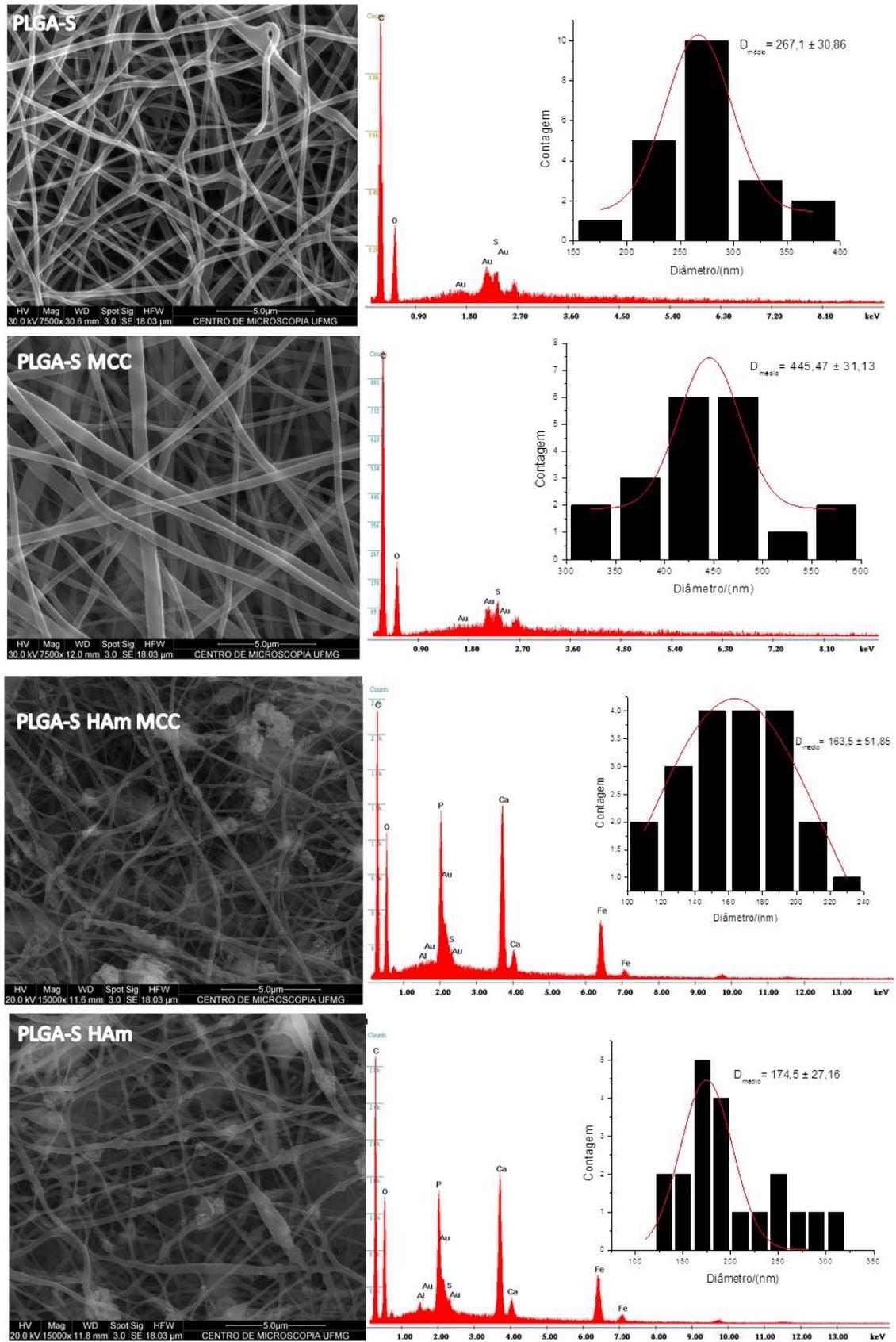


Figura 3.20 – Micrografias SEM das nanofibras de PLGA-S preparadas e seus respectivos espectros de EDX e histogramas de diâmetro.

Na Figura 3.20 observa-se de forma geral que as nanofibras com PLGA-S obtiveram um diâmetro menor comparado à nanofibra do polímero não modificado. Por exemplo, as nanofibras de PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC obtiveram um diâmetro de 290 e 435 nm em contrapartida as nanofibras de PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC tiveram um diâmetro de 175 e 164 nm, respectivamente. Foi observado também aumento de diâmetro nas nanofibras de PLGA-S após adição de MCC, bem como distorções promovidas pela presença de n-HAm nas nanofibras de PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC. Finalmente, nos espectros de EDX das nanofibras de PLGA-S pode-se identificar o pico correspondente ao enxofre (S) em todas as amostras, referente à presença de SMZ.

A fim de analisar a distribuição das n-HAm nas nanofibras foram realizadas micrografias por TEM que estão mostradas na Figura 3.21.

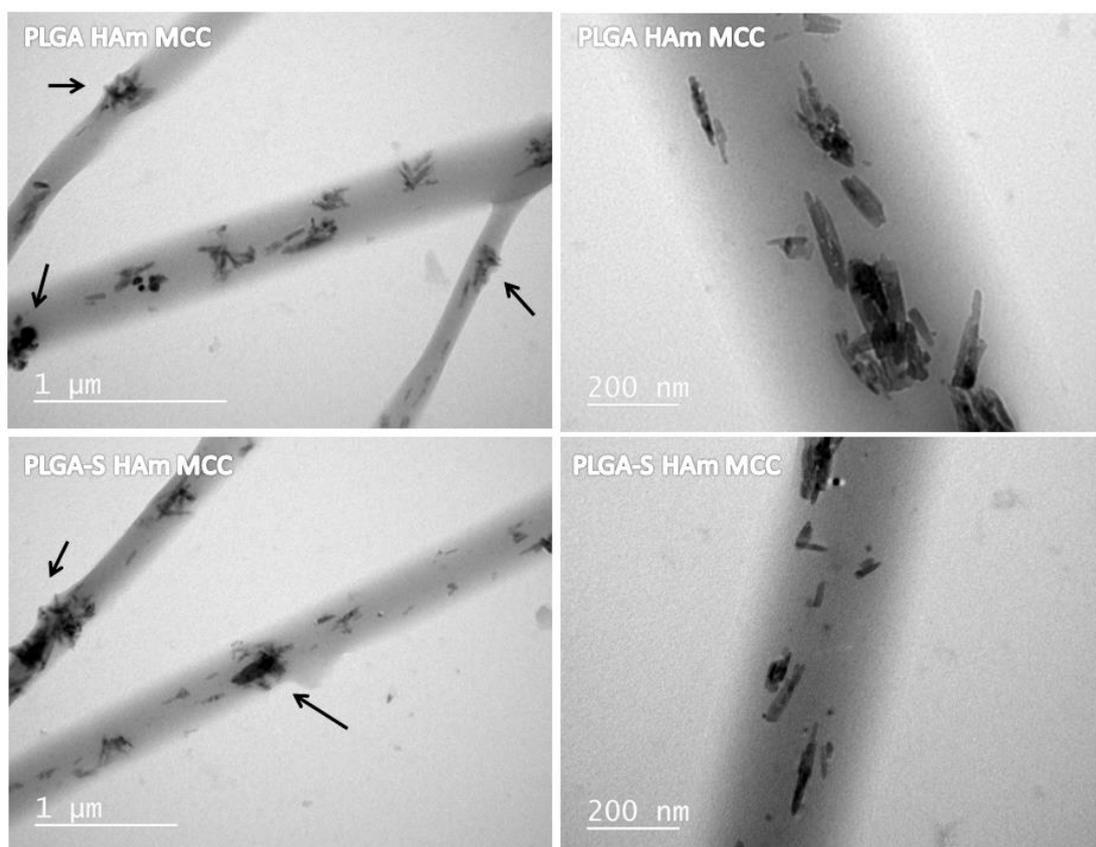


Figura 3.21 – Micrografias TEM das nanofibras contendo n-HAm e MCC.

Analisando a Figura 3.21, pode-se observar a presença das n-HAm majoritariamente dentro das nanofibras poliméricas, formando pequenos

agregados com distribuição randômica. As setas na Figura 3.21 mostram algumas deformações na superfície da nanofibra causadas pela presença de agregados de n-HAm que podem ser os responsáveis pelas sinuosidades observadas nas nanofibras pelas imagens por MEV.

3.3.2 Medidas de Ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato pela técnica de gotejamento tem sido considerada um método conveniente e viável para determinação da hidrofília superficial relativa de materiais como as nanofibras poliméricas¹⁵¹⁻¹⁵³.

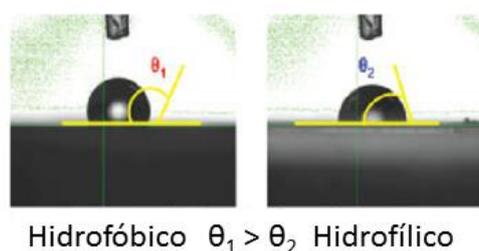


Figura 3.22 – Ilustração dos ângulos de contato em superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas.

Em geral, superfícies com carácter mais hidrofílico permitem que a gota de água se difunda mais do que os materiais de natureza hidrofóbica devido a sua menor tensão superficial. Assim, como ilustrado na Figura 3.22, o ângulo de contato de superfícies hidrofóbicas (θ_1) tem um maior valor que de superfícies hidrofílicas (θ_2)¹⁵¹. Portanto, a fim de avaliar a hidrofília das nanofibras de PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm15, PLGA/HAm, PLGA-S, PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC foram realizadas medidas de ângulo de contato, que estão apresentadas na Figura 3.23. A medida do ângulo de contato da PLGA/HAm15 (contendo 15 % de n-HAm) também foi realizado a fim de avaliar a influência das n-HAm na hidrofília das nanofibras de PLGA.

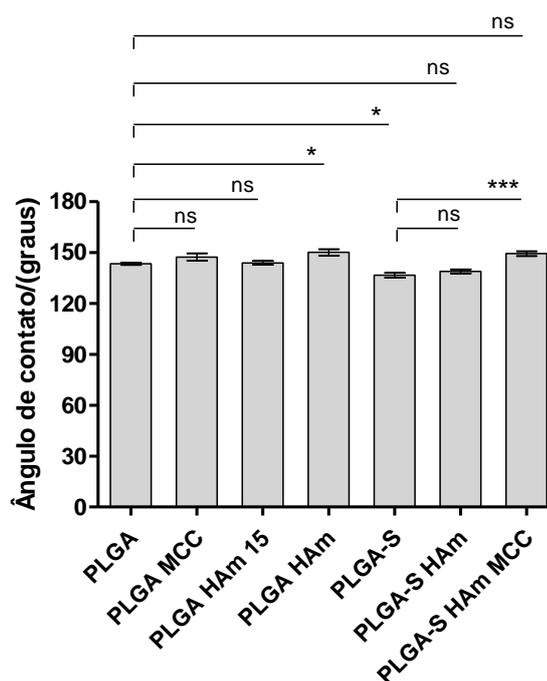


Figura 3.23 – Medidas do ângulo de contato de PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm15, PLGA/HAm, PLGA-S, PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC. Análise estatística com * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ e ns = diferença não significativa. Obs. PLGAHAm15 contém 15 % de n-HAm, as demais possuem 30%.

A Figura 3.23 mostra que todas as nanofibras obtiveram um ângulo de contato em torno de 140° , similar ao obtido por Vasita *et al.*¹⁵⁴ Comparando os resultados das demais nanofibras com a nanofibra de PLGA pode-se verificar uma diferença estatística somente na nanofibra contendo 30 % de n-HAm (PLGA/HAm) e na nanofibra de PLGA modificado com SMZ (PLGA-S), indicando que a presença de n-HAm e a funcionalização do polímero podem aumentar e diminuir o caráter hidrofóbico da nanofibra de PLGA, respectivamente. Por outro lado, uma comparação entre as nanofibras contendo PLGA-S mostrou que a adição de n-HAm (PLGA-S/HAm) não alterou significativamente o ângulo de contato ao contrário da nanofibra de PLGA-S/HAm/MCC, que obteve um maior valor em relação à nanofibra de PLGA-S e, conseqüentemente possuindo uma maior hidrofobicidade.

3.3.3 Difração de Raios-x

Os difratogramas das nanofibras de PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm15, PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC estão apresentados na Figura 3.24.

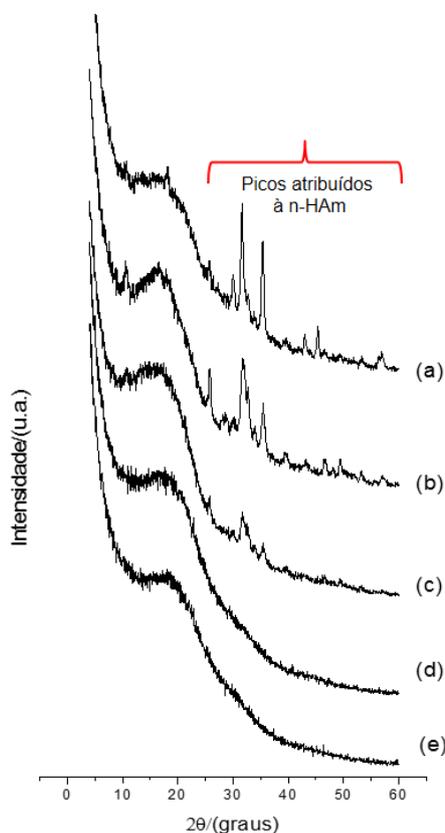


Figura 3.24 – Difratogramas de raios-x das nanofibras com matrizes de PLGA. (a) PLGA/HAm/MCC, (b) PLGA/HAm, (c) PLGA/HAm 15, (d) PLGA/MCC e (e) PLGA. Obs. A nanofibra de PLGA/HAm15 contém 15% de n-HAm as demais nanofibras contém 30% de n-HAm.

No difratograma da nanofibra de PLGA apresentado pela Figura 3.24 pode-se identificar um pico largo entre 10 e 25° de 2θ , conferido a estrutura amorfa sem picos cristalinos desse polímero. O difratograma da nanofibra de PLGA/MCC mostrou um perfil semelhante ao da nanofibra de PLGA, não exibindo os picos cristalinos correspondentes a MCC¹⁵⁵. Nos difratogramas das nanofibras de PLGA/HAm e PLGA/HAm15 observa-se picos correspondentes às fases cristalinas da n-HAm entre 25 a 60 ° de 2θ ^{125,127}, sendo estes mais evidentes nos difratogramas da PLGA/HAm com maior proporção de n-HAm. O difratograma da nanofibra PLGA/HAm/MCC

apresentou picos associados à fase cristalina da n-HAm e o pico amorfo atribuído ao PLGA, porém também não foi observado picos cristalinos da MCC. A ausência de picos correspondentes aos fármacos é relatada por outros autores¹⁵⁶ e pode estar relacionada à sua baixa concentração dentro das amostras (~1 %).

Os difratogramas das nanofibras PLGA-S, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC estão mostrados na Figura 3.25.

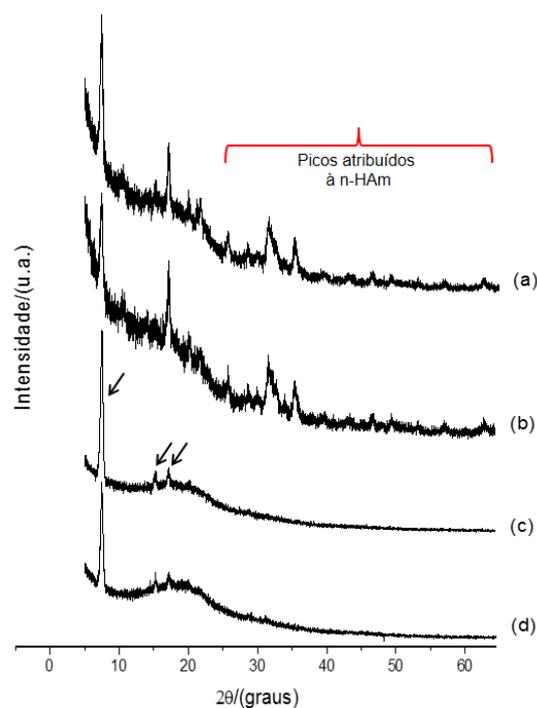


Figura 3.25 – Difratogramas de raios-x das nanofibras com matrizes de PLGA-S. (a) PLGA-S/HAm/MCC, (b) PLGA-S/HAm, (c) PLGA-S/MCC e (d) PLGA-S. Em destaque picos atribuídos às n-HAm e setas mostrando o surgimento de novos picos após funcionalização do PLGA.

Analisando os difratogramas mostrados na Figura 3.25, observa-se um perfil de difração semelhante aos discutidos na Figura 3.24, exceto pela presença dos picos assinalados em 7, 15 e 17°, indicados pelas setas na Figura 3.25. O surgimento desses novos picos nos difratogramas das nanofibras com PLGA-S podem estar relacionados à mudança estrutural após a modificação sintética do polímero e/ou presença de subproduto pós sínteses,

sendo necessário um estudo de outras técnicas físico-químicas para uma melhor avaliação dessa alteração.

3.3.4 Espectroscopia na região do Infravermelho por transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR)

A Figura 3.26 mostra os espectros de ATR-FTIR das nanofibras de PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC.

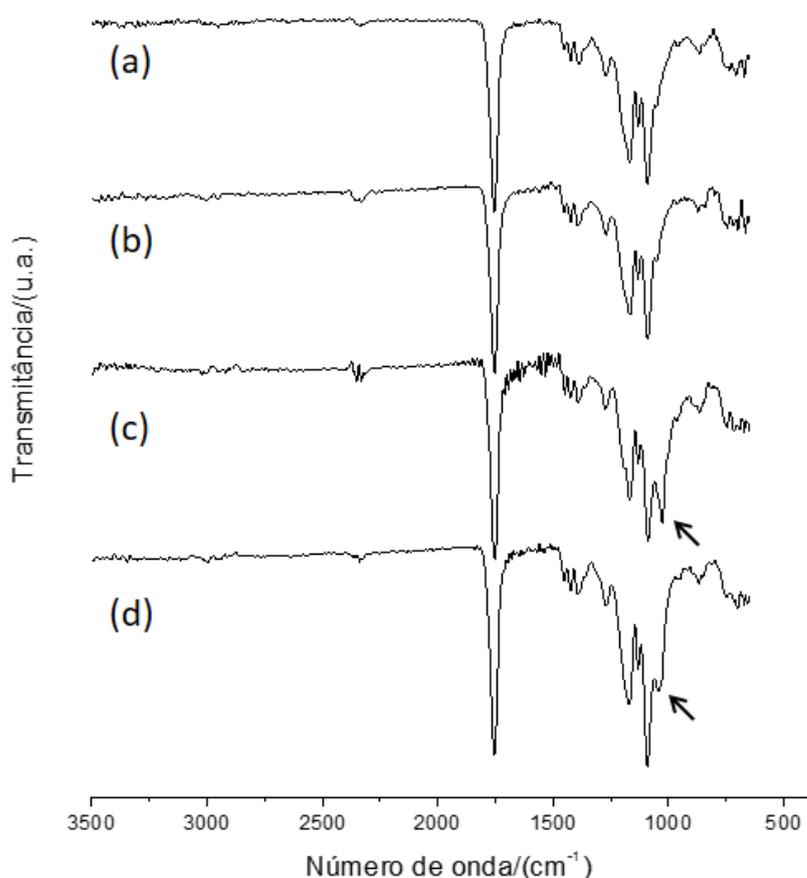


Figura 3.26 – Espectros de ATR-FTIR das nanofibras com matrizes de PLGA: (a) PLGA; (b) PLGA/MCC; (c) PLGA/HAm e (d) PLGA/HAm/MCC. As setas indicam a presença da banda referente ao estiramento P-O da n-HAm.

Analisando a Figura 3.26 observa-se bandas características do PLGA em todas as amostras, sendo essas já atribuídas na seção 3.2.1. As bandas relacionadas à MCC nas amostras (b) e (d) não foram identificadas, sendo essa ausência de bandas referentes ao fármaco também foi observada em

espectros de FTIR de outros sistemas de nanofibras relatados na literatura^{76,157}. Por outro lado, a banda associada ao estiramento da ligação (P-O) do grupo $(\text{PO}_4)^{-3}$ da HA pode ser observada em 1031 cm^{-1} nos espectros (c) e (d), como indicado pelas setas na Figura 3.26.

A Figura 3.27 mostra os espectros de ATR-FTIR das nanofibras de PLGA-S, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC.

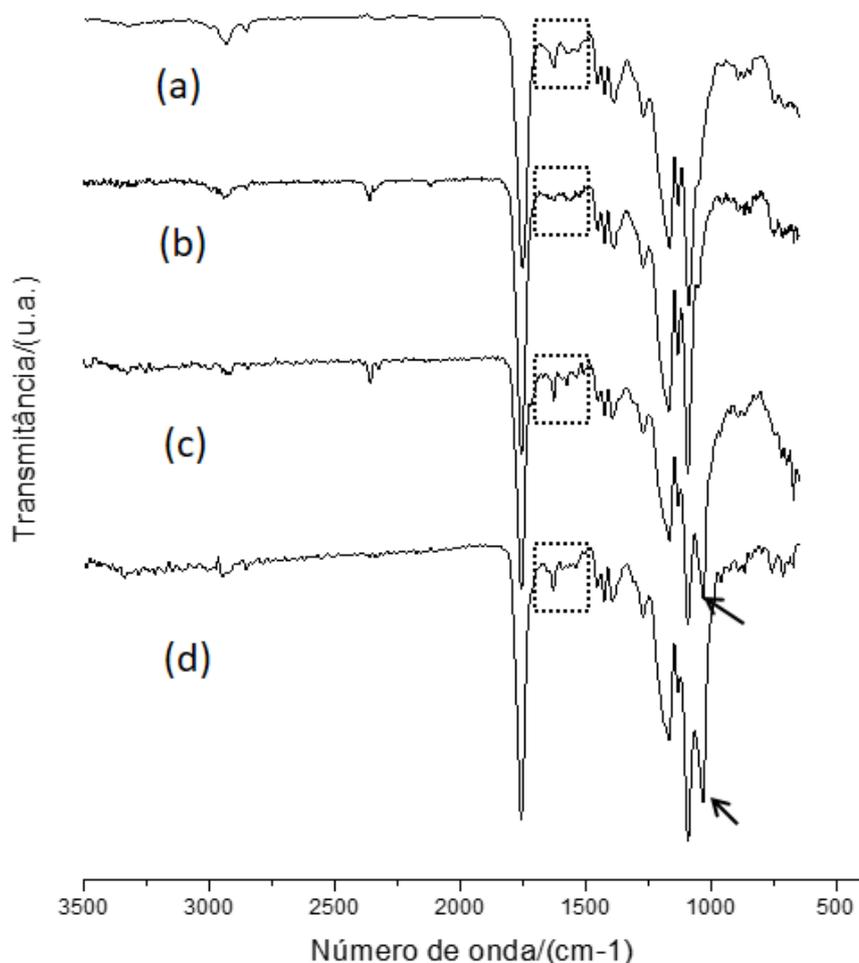


Figura 3.27 – Espectros de ATR-FTIR das nanofibras com matrizes de PLGA-S: (a) PLGA-S; (b) PLGA-S/MCC; (c) PLGA-S/HAm e (d) PLGA-S/HAm/MCC. As setas indicam a presença da banda referente ao estiramento P-O da n-HAm e os quadrados pontilhados mostram a presença de bandas características do ligante SMZ.

A partir da Figura 3.27 observa-se que os espectros das nanofibras com PLGA-S apresentaram um perfil similar aos espectros das nanofibras da Figura 3.27, na qual podem ser identificadas bandas referentes ao PLGA e a n-HAm

(apontadas pelas setas). Além disso, as bandas em 1650 e 1620 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos das ligações (C-NH) e (N-H) da SMZ ¹⁴⁶ também foram identificadas, sendo essa região destacada pelo retângulo tracejado na Figura 3.27. A banda em 1709 cm^{-1} relacionada à funcionalização do polímero em 1709 cm^{-1} não foi observada nos espectros. Esse último fato pode estar relacionada à menor precisão do aparelho quando equiparado ao de FTIR, no qual foram realizadas as análises das amostras de PLGA-S antes da eletrofiação.

3.3.5 Análise Térmica

A estabilidade térmica dos materiais foi avaliada pela análise das curvas TG/DTA. A Figura 3.28 mostra as curvas TG das n-HAm e das nanofibras com PLGA e PLGA modificado (PLGA-S), juntamente com as curvas dos fármacos MCC e SMZ livres.

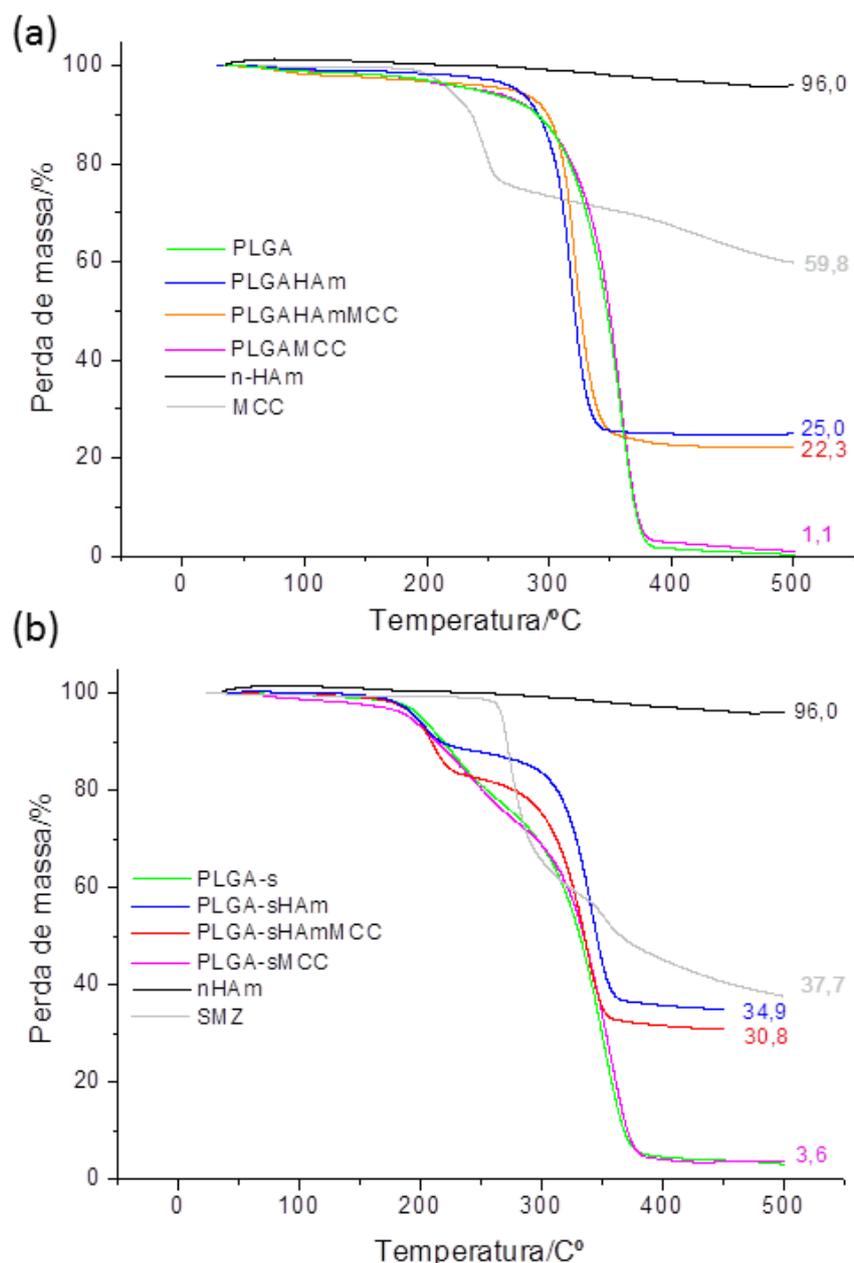


Figura 3.28 - Curvas TG das nanofibras: (a) PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm, PLGA/HAm/MCC e MCC, (b) PLGA-S, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm, PLGA-S/HAm/MCC, n-HAm e SMZ.

A curva TG das n-HAm mostrou que esse material é termicamente estável apresentando apenas 4 % de redução em sua massa devido à perda água. O antitumoral MCC puro apresentou estabilidade até aproximadamente 180 °C seguido de uma etapa de decomposição térmica com um resíduo final de 59,8 % ao atingir 500 °C. Já as curvas TG das nanofibras de PLGA não modificado apresentaram uma única etapa de decomposição térmica a partir de

aproximadamente 250 °C correspondente principalmente à fração polimérica que exibiu uma decomposição completa até 500 °C (Figura 28a). Além disso, observou-se uma massa residual de 25,0 e 22,3 % para nanofibras PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC, respectivamente. Esta massa residual está associada ao n-HAm presente nas nanofibras corroborando com a porcentagem inicial de n-HAm (30 % em peso) e sugerindo uma distribuição homogênea das nanopartículas magnéticas ao longo das nanofibras.

Por outro lado, as nanofibras com PLGA modificado com SMZ apresentaram uma estabilidade térmica menor comparada as nanofibras do PLGA sem modificação. As nanofibras PLGA-S, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC apresentaram duas etapas de decomposição térmica a primeira a partir de 180 °C e a segunda iniciando em aproximadamente 235 °C. A curva TG da SMZ também apresenta duas etapas de perda de massa, porém observa-se que a SMZ livre exibe uma maior estabilidade iniciando sua primeira etapa de decomposição a partir de 250° C. O surgimento de mais uma etapa de decomposição térmica e a diminuição da estabilidade das nanofibras de PLGA-S podem ser atribuídos à modificação pela SMZ na estrutura do PLGA.

As curvas DTA das nanofibras bem como da n-HAm, MCC e SMZ podem ser observadas na Figura 3.29.

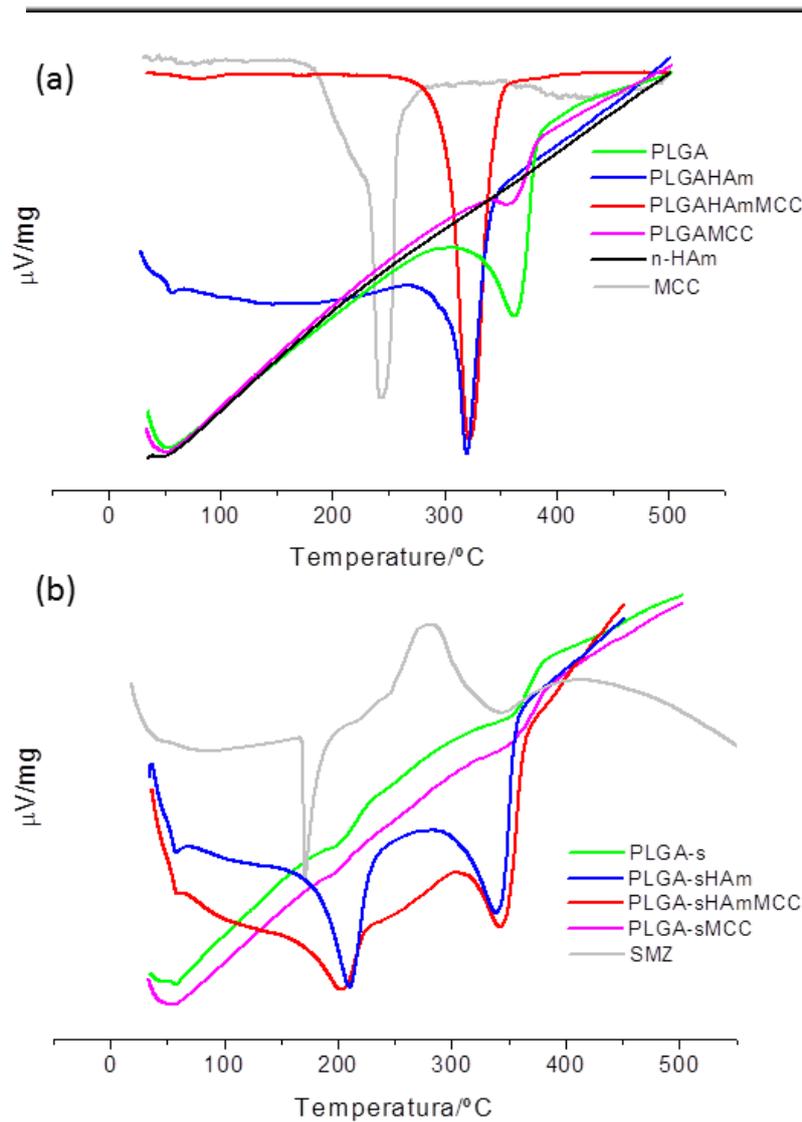


Figura 3.29 - Curvas DTA das nanofibras: (a) PLGA, PLGA/MCC, PLGA/HAm, PLGA/HAm/MCC e MCC, (b) PLGA-S, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm, PLGA-S/HAm/MCC, n-HAm e SMZ.

Analisando a Figura 3.29a observou-se que a curva DTA da n-HAm não mostrou nenhum sinal aparente relacionado à transição de fase da magnetita ou a formação de apatita. Na curva DTA da MCC observou-se um sinal em 242 $^{\circ}\text{C}$ correspondente à temperatura de decomposição da molécula^{155,158}. Nas curvas DTA das nanofibras com PLGA não modificadas observou-se dois picos, o primeiro correspondente a transição vítrea do polímero em aproximadamente 56 $^{\circ}\text{C}$ e o segundo correspondente a decomposição térmica do PLGA em torno de 320 $^{\circ}\text{C}$ para as nanofibras de PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC e em 360 $^{\circ}\text{C}$ para as nanofibras de PLGA e PLGA/MCC. A temperatura de decomposição

térmica observada em 360 °C para nanofibras de PLGA estão de acordo com as relatadas por Fouad ¹⁵⁹. Como um decréscimo na temperatura de termodecomposição do PLGA foi observado tanto para nanofibra de PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC, pode-se inferir que a presença de n-HAm nas nanofibras leva a uma diminuição na estabilidade térmica das mesmas, possivelmente devido a quebras de interações entre as cadeias poliméricas. Esse comportamento também foi notado nas curvas DTG de nanofibras de PLGA contendo nanopartículas magnéticas de magnetita preparadas por Amna e colaboradores⁷⁶. Lafisco *et. al* também relataram que micro esferas compostas pelo polímero poli(L-lático) e com 30 % de nanopartículas de n-HAm apresentaram menor estabilidade térmica devido à ruptura na estrutura das cadeias poliméricas causada pela presença de n-HAm ¹⁶⁰. Além disso, é importante salientar a ausência do pico relacionado à MCC, indicando que essa se encontra distribuída em sua forma amorfa nas nanofibras. Resultados similares também foram observados para nanofibras de PLGA com o fármaco daunorrubicina¹⁵⁶ e paclitaxel¹⁶¹ onde os picos referentes aos fármacos não foram visualizados nas curvas de DTA/DSC.

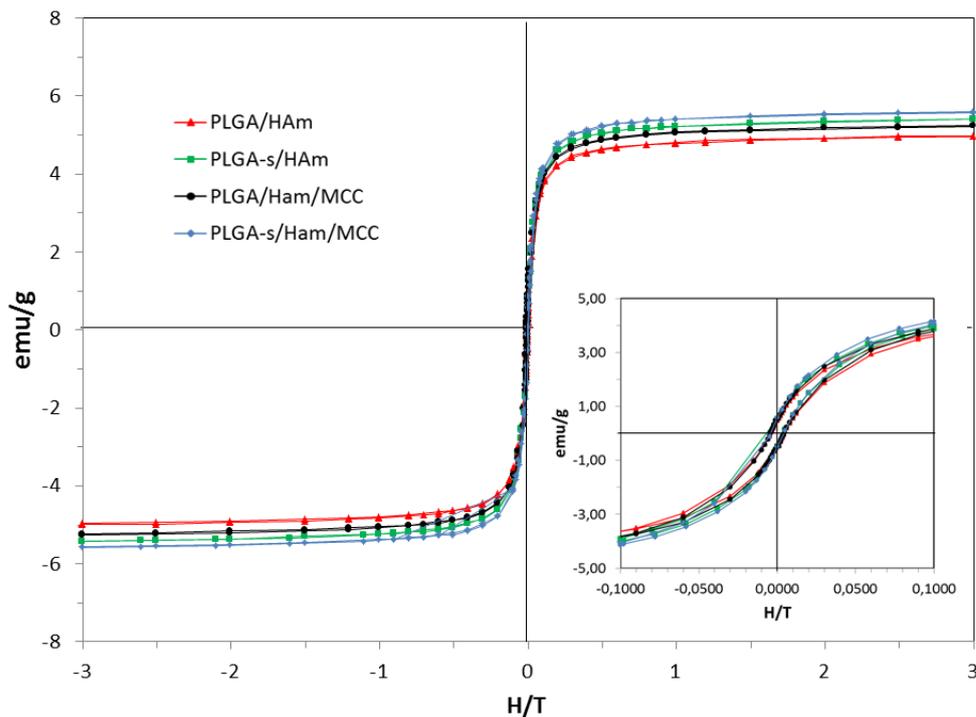
Na curva DTA da SMZ mostrada na Figura 3.29b observou-se dois picos, o primeiro pico endotérmico em 171 °C referente à temperatura de fusão do fármaco e o segundo pico exotérmico em torno de 280 °C relacionado ao processo de pirólise da molécula ¹⁶². As curvas DTA das nanofibras mostraram três picos endotérmicos, o primeiro correspondente a transição vítrea do PLGA, o segundo atribuído à decomposição térmica da SMZ e o terceiro associado à decomposição térmica do PLGA. Analisando esses picos, observou-se uma temperatura de transição vítrea do PLGA modificado em 57 °C, ligeiramente maior ao observado pelo PLGA não modificado. Por outro lado, o segundo e o terceiro picos apresentaram valores e perfis diferentes para cada nanofibra. As nanofibras de PLGA-S e PLGA-S/MCC apresentaram picos mais largos de menor intensidade, o segundo em torno de 200 °C referente à decomposição da SMZ e o terceiro em 360 °C referente à decomposição polimérica. Esse comportamento indica um carácter mais amorfo dessas nanofibras em relação às demais. Já as nanofibras de PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC exibiram picos mais intensos, o segundo pico em 210 e 204 °C e o terceiro em 339 e

343 °C, respectivamente. A mudança nos perfis dos sinais das nanofibras com PLGA modificado com SMZ devido à presença de n-HAm sugerem modificação na estrutura polimérica do PLGA que pode ser relacionada à formação do complexo de SMZ com Fe.

É importante ressaltar que os picos referentes à decomposição térmica polimérica nas nanofibras de PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC apresentaram um aumento na temperatura quando comparados aos picos do PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC, ou seja, as nanofibras com o PLGA modificado com SMZ na presença de n-HAm apresentam uma maior estabilidade térmica comparada a do polímero não modificado.

3.3.6 Medidas de magnetização

A Figura 3.30 apresenta a curva de histerese das nanofibras magnéticas com o polímero não modificado PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC e do polímero modificado com SMZ PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC realizadas pelo SQUID a temperatura de 300 K com aplicação de campo magnético variável de 0 a 3 T.



Figura

3.30 - Curvas de histerese magnética das nanofibras PLGA/HAm, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC.

As medidas de magnetização por SQUID mostraram que as nanofibras também exibiram uma curva de histerese consistente com materiais ferrimagnéticos. Os valores para magnetização de saturação (M_S), coercividade de campo (H_c) e magnetização residual (M_R) foram iguais a 4,98 emu/g, 0,005 T e 0,48 emu/g para PLGA/HAm, 5,24 emu/g, 0,005 T e 0,50 emu/g para PLGA/HAm/MCC, 5,42 emu/g, 0,005 T e 0,53 emu/g para PLGA-S/HAm e 5,60 emu/g, 0,005 T e 0,58 emu/g para PLGA-S/HAm/MCC, respectivamente. Analisando esses valores observou-se uma tendência de aumento nos valores magnetização nas nanofibras com PLGA modificado com SMZ em relação às nanofibras com PLGA não modificado. Um aumento na magnetização também foi observado para as nanofibras contendo o fármaco MCC comparada as nanofibras sem esse fármaco. Contudo, a diferença entre esses valores pode estar associado à pequenas mudanças na distribuição das n-HAm na matriz polimérica e não devido à presença dos fármacos. Além disso, comparando esses resultados com os valores de n-HAm pura obtidos a partir da Figura 3.6 ($M_S = 19,80$ emu/g, $M_R = 1,704$ emu/g e $H_c = 0,004473$ T) observou-se que os

valores obtidos para M_S e M_R nas nanofibras magnéticas correspondem a aproximadamente 30 % do valor obtido para as nanopartículas puras, em concordância com a proporção de n-HAm presente nas nanofibras. Esses resultados sugerem que os valores de M_S e M_R são diretamente proporcionais à proporção de n-HAm presente no sistema. Por outro lado, os valores de H_c das nanofibras magnéticas se mantiveram iguais ao da n-HAm pura, mostrando que essa propriedade não é alterada pela estrutura polimérica.

3.3.7 Medidas de hipertermia magnética

O tratamento por hipertermia tem sido uma promissora alternativa para redução e inibição de tumores sólidos, sendo já relatada a maior sensibilidade de células tumorais ao aumento da temperatura ⁸⁰. Nesse sentido, foram realizadas medidas da variação de temperatura por tempo nas nanofibras com aplicação de um campo magnético alternado através de uma bobina (0,0488 T) e temperatura inicial de 25 °C, atingindo uma temperatura máxima de 45 °C. Esse limite de temperatura foi ajustado por ser a temperatura na qual a literatura reporta como sendo inicial para causar a efetiva morte do tumor. Os resultados estão apresentados na Figura 3.31.

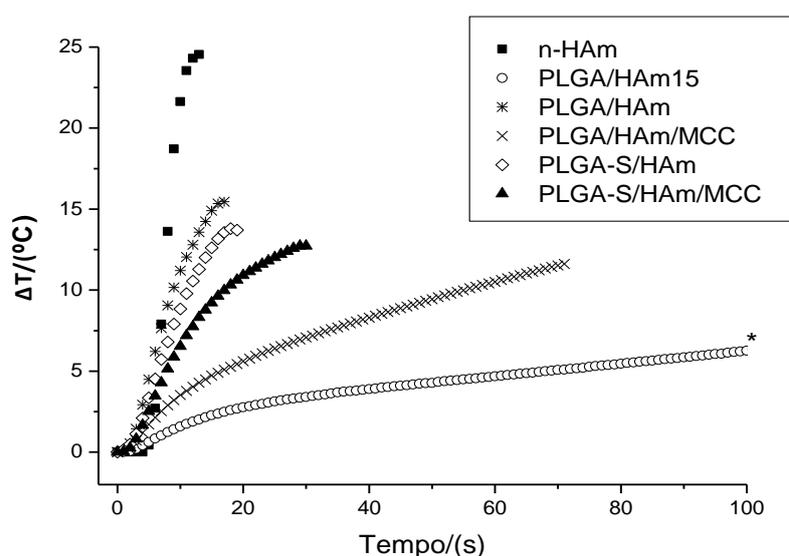


Figura 3.31 – Curvas de hipertermia das n-HAm e das nanofibras de PLGA/HAm15, PLGA/HAm, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/HAm, PLGA-S/HAm/MCC com medições até o alcance da temperatura de 45 $^\circ\text{C}$ sob aplicação de um campo magnético alternado de 323 kHz e 362 A (0,0488 T).

Analisando a Figura 3.31 verifica-se que as nanopartículas de n-HAm atingem a temperatura de 45 °C em 13 s a uma taxa de quase 2 °C/s. Por outro lado, a nanofibra de PLGA/HAm15 não conseguiu alcançar a temperatura de 45 °C mesmo após aplicação do campo por até 6 minutos. Já as nanofibras de PLGA/HAm e PLGA-S/HAm, ambas contendo 30 % de n-HAm, chegaram à temperatura de 45 °C em 17 e 21 s, respectivamente. As nanofibras com o fármaco MMC (PLGA/HAm/MCC e PLGA-S/HAm/MCC) exibiram tempo de 71 e 30 s, sendo esse tempo um pouco maior em comparação as nanofibras sem MCC (PLGA/HAm e PLGA-S/HAm).

As taxas de aquecimento obtidas pelas nanofibras com 30 % de n-HAm apresentaram resultados satisfatórios, atingindo a temperatura de 45 °C em no máximo 1,1 minutos. Assim, esses dados demonstram que as nanofibras preparadas são matrizes capazes de elevar a temperatura, podendo ser promissoras para uso em hipertermia magnética.

As diferenças na taxa de aquecimento apresentadas entre as nanofibras contendo 30 % de n-HAm podem ter sido causadas por diversos parâmetros físicos e estruturais de cada amostra, bem como a distribuição e aglomeração das n-HAm ao longo das nanofibras. O aquecimento de sólidos superparamagnéticos através de um campo magnético alternado é fundamentalmente governado por dois diferentes fenômenos: a relaxação de Néel e a perda de histerese¹⁶³. A relaxação de Néel leva a mudanças na direção do momento magnético relativo da rede cristalina que geram perdas térmicas devido ao atraso de fase entre o campo magnético aplicado e a direção dos momentos magnéticos. Esse tipo de relaxação do momento magnético pode ser afetado por diversos parâmetros como tamanho e distribuição das partículas, magnetização de saturação, anisotropia magnética e interação magnética dipolar inter-partículas. Nesse cenário, o comportamento hipertérmico dos materiais é regido por parâmetros multifatoriais que afetam diretamente em seus perfis de aquecimento.

Ademais, a primeira aplicação de MNPs em humanos para tratamento de hipertermia é datado em 2005. Esse ensaio clínico foi desenvolvido pelo grupo de Johannsen¹⁶⁴ em pacientes com recorrência de câncer de próstata. O

tratamento foi conduzido com aplicação de campo oscilante de 0,226 T por 60 minutos, alcançando uma temperatura máxima de 48 °C e não sendo necessário administração de anestésicos. Nesse trabalho as nanofibras de PLGA com 30 % de n-HAm foram capazes de atingir a temperatura para tratamento de hipertermia com aplicações de campo 4 vezes menor ao relatado por Johannsen *et al.*, sugerindo um potencial efeito hipertérmico desses materiais.

3.4 Perfil de liberação

3.4.1 Liberação *in vitro* da MCC

As nanofibras contendo n-HAm são uma estratégia inovadora e promissora, uma vez que a matriz polimérica, juntamente com as nanopartículas, podem modular a liberação do fármaco de forma localizada com elevada área superficial e concentrar a terapia na região do tumor diminuindo a dose administrada.

O perfil de liberação da MCC foi avaliado das nanofibras de PLGA, PLGA/HAm, PLGA-S e PLGA-S/HAm segundo a metodologia apresentada na seção 2.4. A Figura 3.32 apresenta as curvas de porcentagem acumulativa de liberação de MCC dessas matrizes poliméricas.

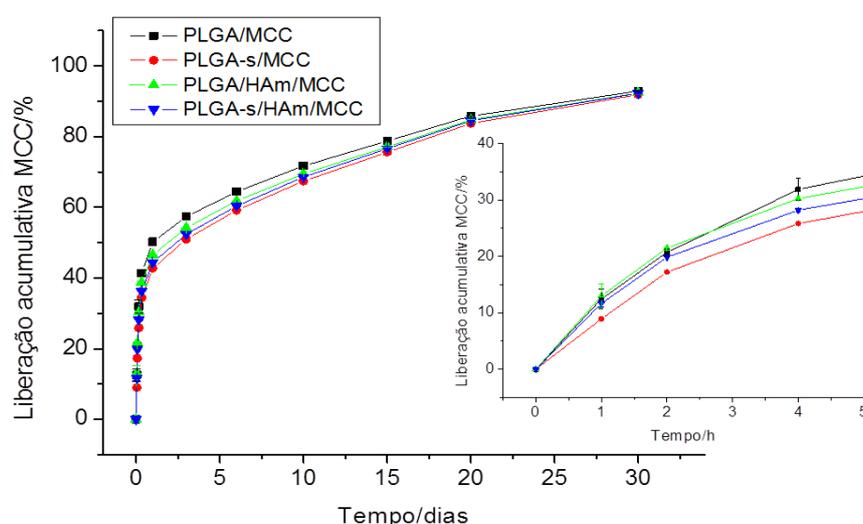


Figura 3.32 – Perfil de liberação de MCC a partir das nanofibras de PLGA/MCC, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/MCC, e PLGA-S/HAm/MCC.

Analisando a Figura 3.32, observa-se que houve uma liberação controlada da MCC durante 30 dias a partir de todas as matrizes poliméricas. Nas primeiras 24 h aproximadamente 50 % de MCC foi liberada das nanofibras, esse efeito se deve a rápida difusão do fármaco presente na superfície da nanofibra característico dos sistemas de nanofibras uniaxiais por eletrofiação. Verifica-se uma inclinação ligeiramente menor nas curvas de liberação das nanofibras de PLGA-S/MCC e PLGA-S/HAm/MCC, sugerindo que a presença de SMZ teve uma pequena influência na liberação da MCC. De forma geral, uma porcentagem similar de MCC foi liberada dos sistemas PLGA/MCC, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/HAm/MCC e PLGA-S/MCC ao longo do 30 dias.

Para uma melhor avaliação e compreensão da cinética de liberação de fármacos, a literatura dispõe diferentes modelos matemáticos que buscam modelar os mecanismos envolvidos nesse processo. Esses modelos fornecem informações gerais e fundamentais dos mecanismos dominantes que influenciam na liberação, onde se podem prever sobre seus processos físico-químicos. Fredenberg *et al.* discute que os sistemas poliméricos com PLGA podem ser governados por 4 mecanismos de liberação: (i) difusão através do poros preenchido com água, (ii) difusão através da matriz polimérica, (iii) osmose e (iv) erosão do polímero¹⁶⁵.

Dentre os modelos matemáticos relatados pela literatura, encontra-se o modelo de Higuchi que é baseado no mecanismo de difusão de Fickian¹⁶⁶. Esse modelo tem apresentado uma maior aproximação dos sistemas de nanofibras poliméricas, sendo empregado na descrição de vários trabalhos^{167,168}. Nesse modelo é utilizado em processos de liberação de matrizes sólidas e semi-sólidas onde ocorrem a dissolução e difusão do fármaco a partir da entrada do líquido¹⁶⁹.

A Figura 3.33 mostra os dois estágios ajustados segundo a equação do modelo de Higuchi. O primeiro estágio consiste nas primeiras 8 h de liberação da MCC onde se observa uma inclinação mais acentuada para a nanofibra de PLGA/MCC seguida por PLGA/HAm, PLGA-S e PLGA-S/HAm. Apesar dos valores serem muito próximos, esses resultados sugere uma tendência da

cinética de difusão ser retardada pela presença de n-HAm e SMZ. O segundo estágio consiste no período residual, ou seja, até os 30 dias de liberação, na qual se observa uma liberação mais lenta da MCC em comparação ao primeiro domínio para todos os sistemas. Nesse estágio a tendência observada no primeiro domínio foi invertida e o sistema PLGA/MCC fornece uma liberação ligeiramente mais lenta que os demais sistemas. Apesar da similaridade dos perfis de liberação, podem ser observadas particularidades no processo de difusão dos sistemas analisados.

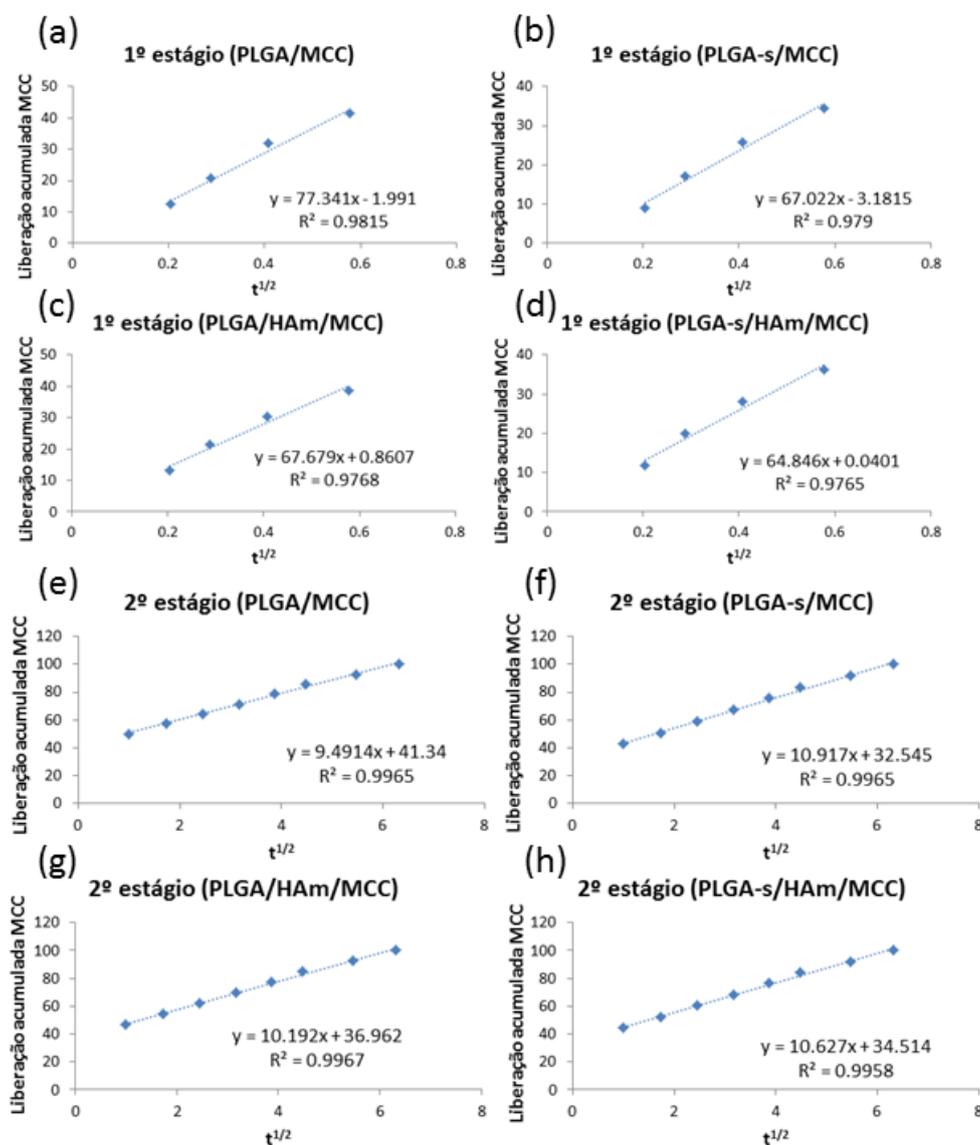


Figura 3.33 – Cinética de liberação de MCC a partir das nanofibras de PLGA/MCC, PLGA/HAm/MCC, PLGA-S/MCC, e PLGA-S/HAm/MCC pelo modelo de Higuchi.

3.4.2 Liberação *in vitro* da SMZ

O perfil de liberação da SMZ também foi avaliado onde a quantificação do fármaco foi analisada segundo a metodologia apresentada na seção 2.4. Os resultados obtidos das nanofibras de PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm/MCC, PLGA-S/HAm e PLGA-S podem ser visualizados na Figura 3.34.

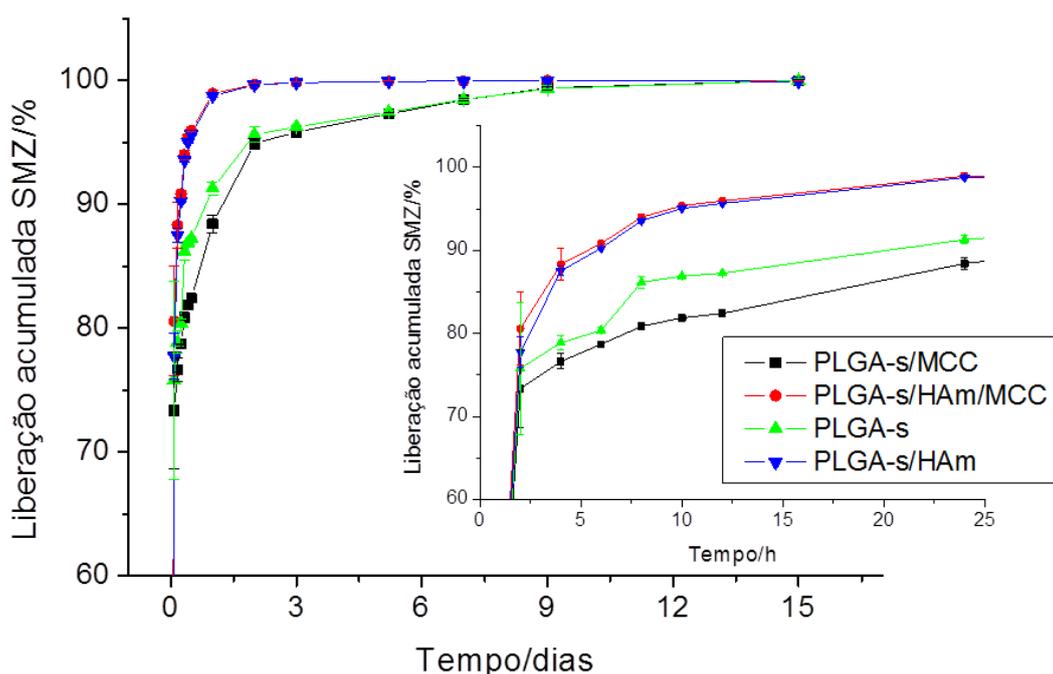


Figura 3.34 – Perfil de liberação de SMZ a partir das nanofibras de PLGA-S, PLGA-S/MCC, PLGA-S/HAm, e PLGA-S/HAm/MCC.

Analisando a Figura 3.34, nota-se um efeito explosão nas primeiras horas de liberação onde uma elevada porcentagem de SMZ é liberada, devido a presença de SMZ incorporada de forma não covalente na matriz polimérica. Nas primeiras 2 h observa-se que cerca de 80, 77, 75 e 73 % de SMZ são liberadas das matrizes de PLGA-S/HAm/MCC, PLGA-S/HAm, PLGA-S e PLGA-S/MCC, respectivamente. Em 24h horas de liberação há maior diferença nos perfis de liberação das matrizes na qual as nanofibras contendo n-HAm (PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC) apresentaram liberação mais rápida em relação às outras (PLGA-S e PLGA-S/MCC). Assim, no primeiro dia, cerca de 88 e 91 % de SMZ foi liberada das nanofibras de PLGA-S/MCC e PLGA-S e

ambas nanofibras de PLGA-S/HAm e PLGA-S/HAm/MCC tiveram 98 % de liberação de SMZ. Nos próximos 9 dias subsequentes observou-se liberação sustentada de SMZ nas nanofibras de PLGA-S e PLGA-S/MCC, que pode estar associada a SMZ ligada covalentemente a matriz polimérica.

A liberação mais rápida da SMZ das nanofibras contendo n-HAm pode estar relacionada à formação de complexos de SMZ e Fe durante o processo de homogeneização da solução polimérica com n-HAm preliminar ao procedimento de eletrofiação, essas espécies complexadas podem facilitar a liberação da SMZ para o meio. Complexos de SMZ com metais já são relatados pela literatura inclusive com o ferro ^{147,170}, porém os autores não discutem a respeito do aumento da solubilidade desses compostos em relação ao ligante livre.

3.5 Testes Biológicos

3.5.1 Testes *in vitro*

- *Ensaio de MTT*

A citotoxicidade das nanofibras foi avaliada *in vitro* em células cancerígenas de carcinoma mamário (4T1) e osteosarcoma (Saos-2) e comparadas com células normais tais como fibroblastos (3T3-L1) e pré-osteoblastos (MC3T3). Adicionalmente, a citotoxicidade da MCC livre nas concentrações de 50 a 0,0001 µg/mL, da SMZ livre nas concentrações de 1 a 800 µg/mL e n-HAm livre nas concentrações de 40 a 0,001 mg/mL também foram investigadas.

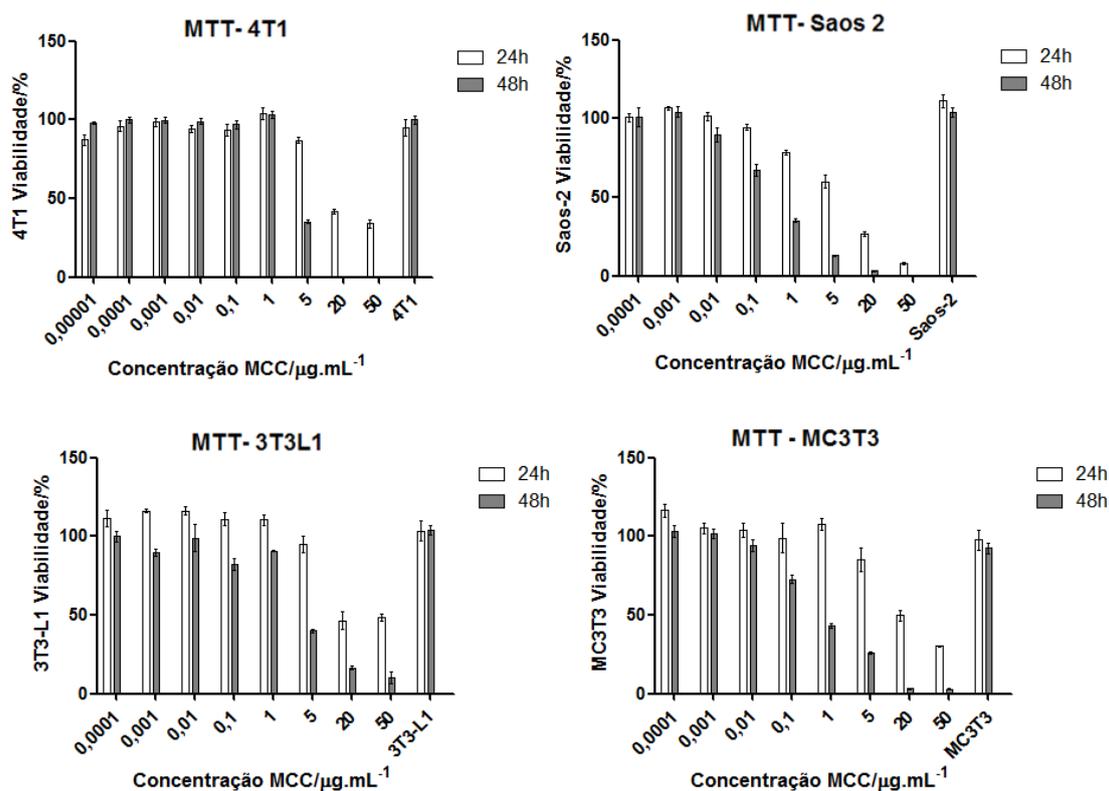


Figura 3.35 – Ensaio de MTT com concentrações de MCC livre (50 a 0,0001 μg/mL) em células tumorais de mama 4T1 e osteosarcoma Saos-2 e células normais de osteoblastos MC3T3 e fibroblastos 3T3L1.

A Figura 3.35 mostra os resultados de citotoxicidade obtidos para a MCC livre. Observa-se que a MCC apresenta efeito citotóxico tanto para células tumorais (Saos-2 e 4T1) quanto para células normais (MC3T3 e 3T3L1). Os valores de IC₅₀ de 24 h para esse fármaco foram iguais 16,3 e 7,1 μg/mL para células 4T1 e Saos-2, e 25,4 e 19,9 μg/mL para células 3T3L1 e MC3T3, respectivamente. Apesar da ligeira seletividade da MCC frente a células tumorais no teste de 24 h, uma aproximação do IC₅₀ é observada após 48 h onde os valores obtidos foram iguais a 3,7 e 0,63 μg/mL para as células 4T1 e Saos-2, e, 4,18 e 0,77 μg/mL para células normais 3T3L1 e MC3T3, respectivamente. Esses resultados mostram que a MCC não apresenta seletividade significativa após 48 h frente às células analisadas.

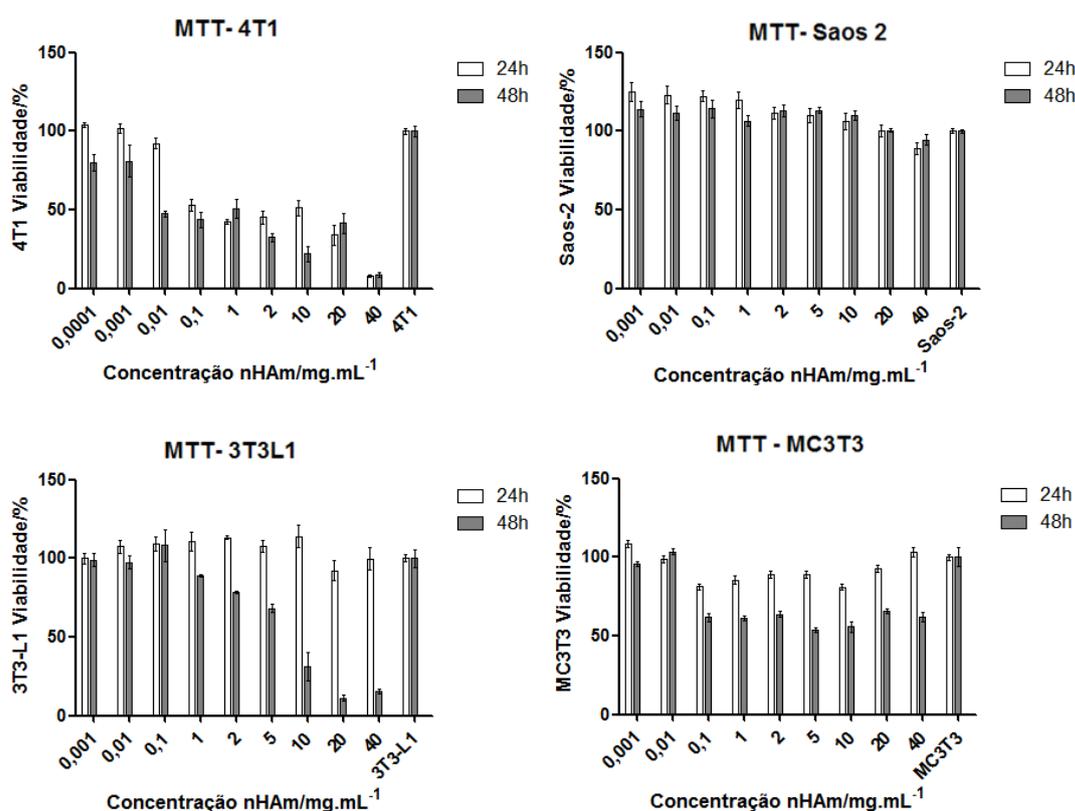


Figura 3.36 – Ensaio de MTT com concentrações de n-HAm livre (40 a 0,001 mg/mL) em células tumorais de mama 4T1 e osteosarcoma Saos-2 e células normais de osteoblastos MC3T3 e fibroblastos 3T3L1.

Por outro lado, as n-HAm livre exibiram diferentes graus de citotoxicidade contra as linhagens de células tumorais Saos-2 e 4T1, e células normais MC3T3 e 3T3L1 (Figura 3.36). As n-HAm não apresentaram citotoxicidade aparente nas células de osteosarcoma Saos-2 e tiveram moderada a baixa citotoxicidade nas células de pré-osteoblastos MC3T3. Já as células de fibroblastos 3T3-L1 foram fortemente afetadas na presença de altas concentrações de n-HAm (10-40 mg/mL), mas apresentaram baixa ou ausência de citotoxicidade nas demais concentrações (0,001 a 5 mg/mL). Interessantemente, as células de carcinoma mamário 4T1 mostraram citotoxicidade oscilante com as concentrações de n-HAm analisadas, exibindo baixa viabilidade mesmo em concentrações muito baixas de n-HAm (0,01 mg/mL). Uma citotoxicidade moderada das nanopartículas de hidroxiapatita (n-HA) frente a células tumorais já tem sido relatada na literatura. Recentemente,

nosso grupo reportou uma redução de 50 % de viabilidade celular de células de carcinoma Caco-2 em baixa concentração de n-HA (0,020 mg/mL) e uma suscetibilidade abaixo de 75 % em células 4T1 com concentrações de n-HA de 0,3 mg/mL ⁹⁴. A citotoxicidade das n-HA tem sido atribuída ao processo de apoptose causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), que leva ao estresse oxidativo intracelular ¹⁷¹. Além disso, Wan *et al.* mostrou que nanopartículas de hidroxiapatita magnética (n-HAm) exibem uma maior citotoxicidade e possui melhores habilidades para impedir a migração e adesão de células de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 quando comparada com n-HA ¹¹⁰. Eles atribuíram esse comportamento ao comprometimento da adesão celular causada pela presença de nanopartículas de óxido de ferro. Essas descobertas demonstram que as n-HAm podem inibir as células cancerosas de mama de maneira mais seletiva.

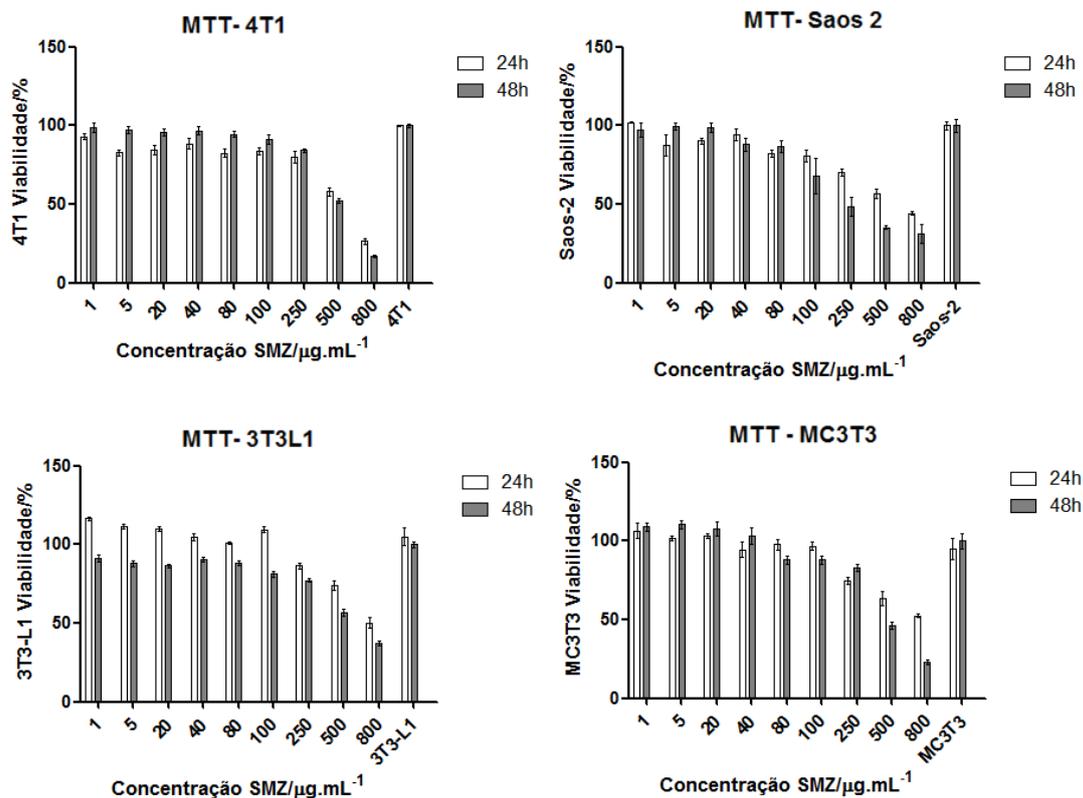


Figura 3.37 – Ensaio de MTT com concentrações de SMZ livre (800 a 1 μg/mL) em células tumorais de mama 4T1 e osteosarcoma Saos-2 e células normais de osteoblastos MC3T3 e fibroblastos 3T3L1.

A Figura 3.37 mostra os resultados de citotoxicidade da SMZ livre. Uma citotoxicidade em torno de 50 % foi observada tanto para células tumorais 4T1 quanto para células normais 3T3L1 e MC3T3 a partir da concentração de 500 µg/mL de SMZ. Já as células de osteosarcoma Saos-2 apresentaram uma suscetibilidade maior, exibindo cerca de 50 % de viabilidade em concentrações de 250 µg/mL de SMZ. Os valores de IC₅₀ de 48 h para esse fármaco foram iguais 515 e 235 µg/mL para células 4T1 e Saos-2, e 618 e 519 µg/mL para células 3T3L1 e MC3T3, respectivamente. Esses resultados sugerem uma seletividade da SMZ para células de osteosarcoma Saos-2 em relação às demais células testadas. A citotoxicidade da SMZ e de seus metabólitos já vem sendo avaliada e observada por alguns autores que relatam uma indução à morte celular por mecanismos ainda não elucidados^{172,173}. Entretanto, estudos envolvendo o uso de SMZ como agente citotóxico frente células tumorais ainda não foram abordados pela literatura. Assim, a ação antitumoral e seletiva da SMZ observada nesse estudo estimula a novas investigações desse fármaco como potencial agente no tratamento de osteosarcoma.

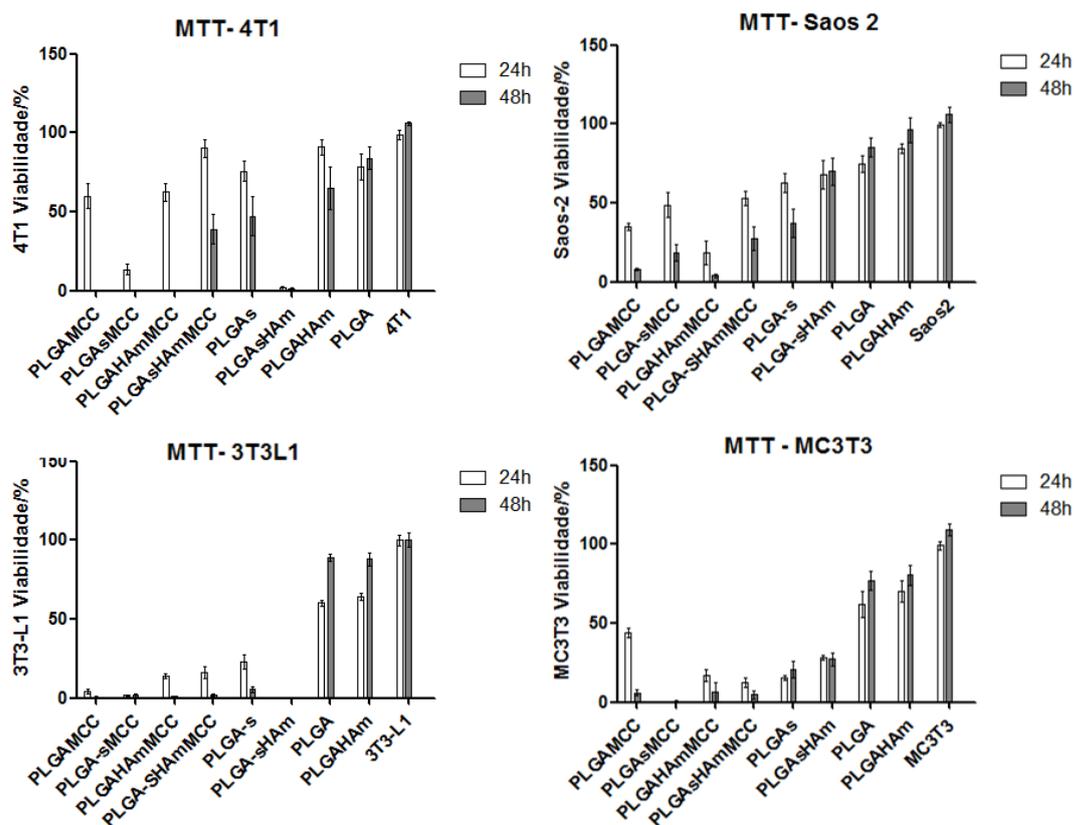


Figura 3.38 – Ensaio de MTT com nanofibras de 5 mm (contato direto) em células tumorais de mama 4T1 e osteosarcoma Saos-2 e células normais de osteoblastos MC3T3 e fibroblastos 3T3L1.

A citotoxicidade das nanofibras em células tumorais (Saos-2 e 4T1) e células normais (MC3T3 e 3T3L1) podem ser observadas na Figura 3.38. Nessa Figura foi observado que os sistemas PLGA/MCC e PLGA/HA/MCC apresentaram elevada citotoxicidade sem exibir diferença significativa entre eles após 48 h. Uma ligeira citotoxicidade também foi observada para os sistemas PLGA e PLGA/HA sem MCC provavelmente devido ao contato direto das nanofibras nas células, mas o crescimento normal das células foi recuperado após 48h. Já as nanofibras com o polímero modificado PLGA-S/MCC e PLGA-S/HA/MCC exibiram citotoxicidade diferentes dependendo da linhagem celular analisada. Nas células normais 3T3-L1 e MC3T3, uma elevada citotoxicidade foi observada sem diferença significativa entre os dois sistemas. Além disso, as nanofibras com polímero modificado sem o fármaco MCC como PLGA-S e PLGA-S/HA também apresentaram uma alta

citotoxicidade frente essas células. Ao contrário das células normais, as nanofibras de polímero modificado com SMZ diminuíram seu potencial citotóxico frente às células de osteosarcoma Saos-2 quando comparados as nanofibras de PLGA não modificado. Esse resultado também foi observado para a nanofibra de PLGA-S/HAm/MCC nas células de carcinoma mamário 4T1, onde se observou um aumento de quase 50 % na viabilidade celular. Esses dados sugerem que não há um efeito sinérgico ou aditivo de citotoxicidade entre a MCC, SMZ e n-HAm frente a células de osteosarcoma Saos-2 e carcinoma mamário 4T1. Contudo, é importante salientar que os sistemas PLGA-S/HAm e PLGA-S/MCC mostraram uma elevada citotoxicidade frente às células de 4T1, indicando que esses pares apresentam notáveis e mais seletivos efeitos citotóxicos.

De forma geral, notou-se que todas as nanofibras contendo MCC apresentaram uma elevada citotoxicidade frente às células tumorais, exceto o sistema PLGA-S/HAm/MCC. Apesar, dos resultados não mostrarem efeito sinérgico ou aditivo entre MCC e n-HAm, é importante enfatizar que o sistema contendo n-HAm pode ter sua citotoxicidade potencializada através da hipertermia magnética.

A hipertermia é relatada como uma terapia adjuvante ou de combinação no tratamento de diferentes tipos de câncer ¹⁷⁴. Estudos promissores mostram o benefício notável com o uso de hipertermia no tratamento de osteosarcoma, bem como no tratamento de câncer de mama. Takagishi *et al.* indicaram que a hipertermia pode reduzir a mobilidade das células do osteosarcoma humano, desempenhando um papel importante contra o desenvolvimento de metástases ¹⁷⁵. Além disso, Jones *et al.* relataram que a hipertermia pode aumentar a oxigenação do tumor tornando-o mais suscetível à quimioterapia, melhorando a sobrevida global de pacientes após a ressecção cirúrgica de câncer de mama ¹⁷⁶.

Assim, as propriedades notáveis das n-HAm na inibição de células de câncer de mama e seu uso efetivo em hipertermia magnética acoplada à atividade antineoplásica da MCC sugerem que o sistema PLGA/HAm/MCC

representa um potencial andaime para a terapia do câncer com a combinação de diferentes mecanismos antitumorais.

- Ensaio de Adesão celular

A Figura 3.39 apresenta as imagens obtidas por SEM após o experimento de adesão das células MC3T3-E1 sobre as nanofibras de PLGA e PLGA/HAm.

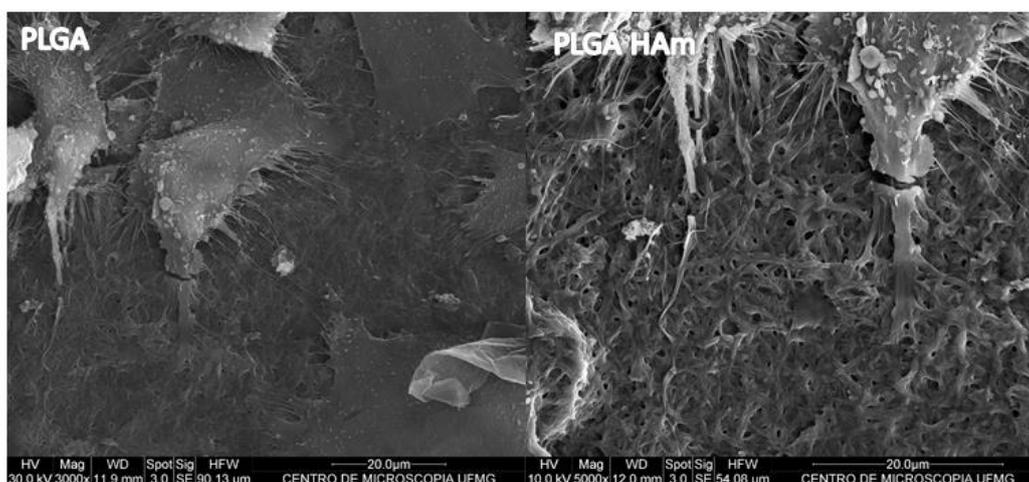


Figura 3.39 – Micrografias SEM da adesão de células MC3T3-E1 nas nanofibras de PLGA e PLGA/HAm.

Analisando a Figura 3.39 verifica-se a adesão das células nas nanofibras de PLGA e PLGA/HAm indicando uma boa biocompatibilidade dessas nanofibras frente às células de MC3T3-E1.

A adesão celular vem sendo citada como um parâmetro importante para avaliação da biocompatibilidade e da capacidade de promover a proliferação e diferenciação celular de alguns materiais⁹⁹⁻¹⁰¹. O trabalho desenvolvido pelo grupo de Zeng¹³² demonstrou que o compósito de HA e MNPs sob aplicação de campo magnético externo foi mais biocompatível e promoveu uma maior adesão de células do que o compósito constituído somente com HA, em estudos com osteoblastos MC3T3-E1. Nesse trabalho foi discutido que o compósito de HA/MNPs pode responder ao campo magnético exterior e gerar um estímulo para a proliferação e diferenciação das células.

Dessa forma, a adesão de células MC3T3 nas nanofibras de PLGA e PLGA/HAm observadas nas imagens de SEM da Figura 3.39, sugerem uma boa biocompatibilidade e promissora matriz de crescimento celular dessas nanofibras. Futuros estudos podem ser realizados para uma melhor avaliação dessas matrizes como suporte para regeneração óssea.

3.5.2 Teste *in vivo*

- Tratamento por hipertermia magnética

Para avaliar o efeito *in vivo* das nanofibras em tumores, foi realizado um teste preliminar com tratamento por hipertermia magnética durante sete dias em camundongos com tumor induzido. Após esse período, os animais foram sacrificados e a avaliação da eficiência do tratamento foi realizada a partir da massa do tumor remanescente, como descrito na seção 2.5.3. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.40.

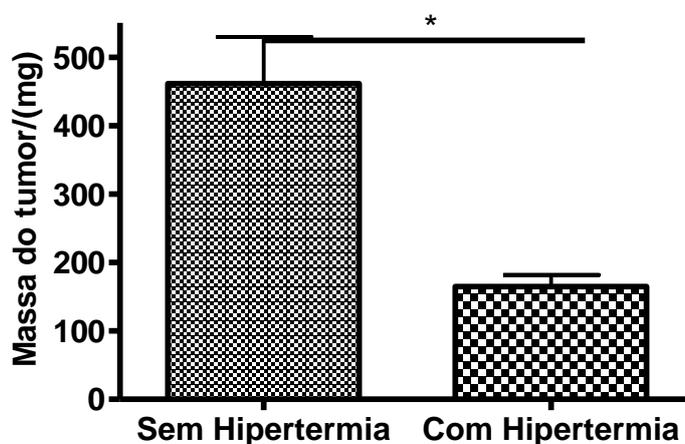


Figura 3.40 – Avaliação da massa remanescente do tumor após 7 dias de implante das nanofibras de PLGA/HAm/MCC com e sem tratamento com hipertermia magnética. * Diferença estatística com $p < 0,05$.

Os resultados mostraram uma redução significativa do tumor dos animais tratados com hipertermia, sugerindo uma boa eficiência do tratamento. Contudo, houve uma mortalidade de 55 % dos animais durante o tratamento com hipertermia. Esse fato pode ser atribuído ao calor transferido da bobina para os animais ou ao excesso de anestésico administrado. Ambas as

hipóteses ainda devem ser avaliadas em testes futuros. Apesar disso, o efeito do tratamento com as nanofibras de PLGA/HAm/MCC obteve resultados promissores em relação à supressão do tumor, mostrado que o tratamento hipertérmico pode potencializar o efeito citotóxico desse material.

- Determinação da atividade de MPO e NAG

As enzimas MPO e NAG estão relacionadas a processos inflamatórios agudos e crônicos, respectivamente. A resposta inflamatória está associada ao recrutamento de células do sistema imunológico até a região afetada sendo o MPO correlacionado a migração de principalmente neutrófilos e o NAG a de macrófagos¹⁷⁷⁻¹⁸⁰. A Figura 3.41 apresenta os resultados obtidos na avaliação desses dois marcadores.

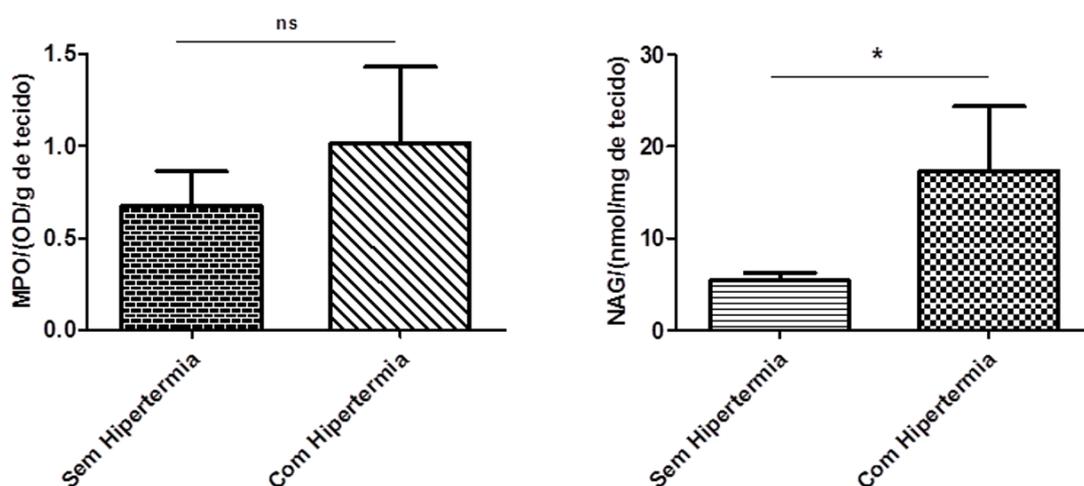


Figura 3.41 – Avaliação dos marcadores de inflamação MPO e NAG após 7 dias de implante das nanofibras de PLGA/HAm/MCC com e sem tratamento com hipertermia magnética. ns = diferença estatística não significativa, * Diferença estatística com $p < 0,05$.

De acordo com os resultados mostrados na Figura 3.41, os grupos não apresentaram diferença estatística na atividade da enzima MPO, indicando que não houve uma invasão de neutrófilos devido ao tratamento de hipertermia. Porém, os dados obtidos na avaliação do NAG apresentaram diferença estatística entre os grupos, sendo que o grupo com tratamento de hipertermia apresentou uma maior quantidade dessa enzima. Esse resultado indica que houve uma maior invasão de macrófagos após 7 dias de tratamento com

hipertermia. Novos dados ainda devem ser avaliados para melhor entendimento sobre os fenômenos inflamatórios dos sistemas preparados.

3.5.3 Testes microbiológicos

A SMZ é um antibiótico de amplo espectro extremamente utilizado na clínica médica, apesar de relatos envolvendo resistência bacteriana¹⁸¹. Sua aplicação tem sido indicada inclusive no combate de *S. aureus* resistentes em infecções cutâneas¹⁸². Esse antibiótico atua como agentes inibidores do ácido para-aminobenzóico (pABA) que são essenciais para a síntese de ácido fólico em bactérias. Ao contrário das bactérias, as células eucarióticas não dependem do pABA para a síntese de ácido fólico, tornando mais específica a ação da SMZ. Apesar do efeito bacteriostático da SMZ, sua combinação principalmente com o antibiótico trimetoprim é amplamente utilizado devido ao sinergismo entre eles que leva a um efeito bactericida¹⁸³. Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que as sulfas podem apresentar mais de uma atividade inibitória, tornando essa classe de fármaco um importante alvo de estudo¹⁸⁴.

Dessa forma, além da investigação da atividade antitumoral das nanofibras com SMZ também foi avaliada sua atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas *Escherichia coli* (*E. coli*) e Gram negativas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

-Determinação do MIC da SMZ

Para determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) do fármaco livre, foram realizados os testes por microdiluição da SMZ nas concentrações de 0,10 a 6,4 mg/mL em suspensões de 1×10^6 ufc·mL⁻¹ de bactéria *E. coli* e *S. aureus*. A Figura 3.42 mostra os resultados obtidos a partir desse teste.

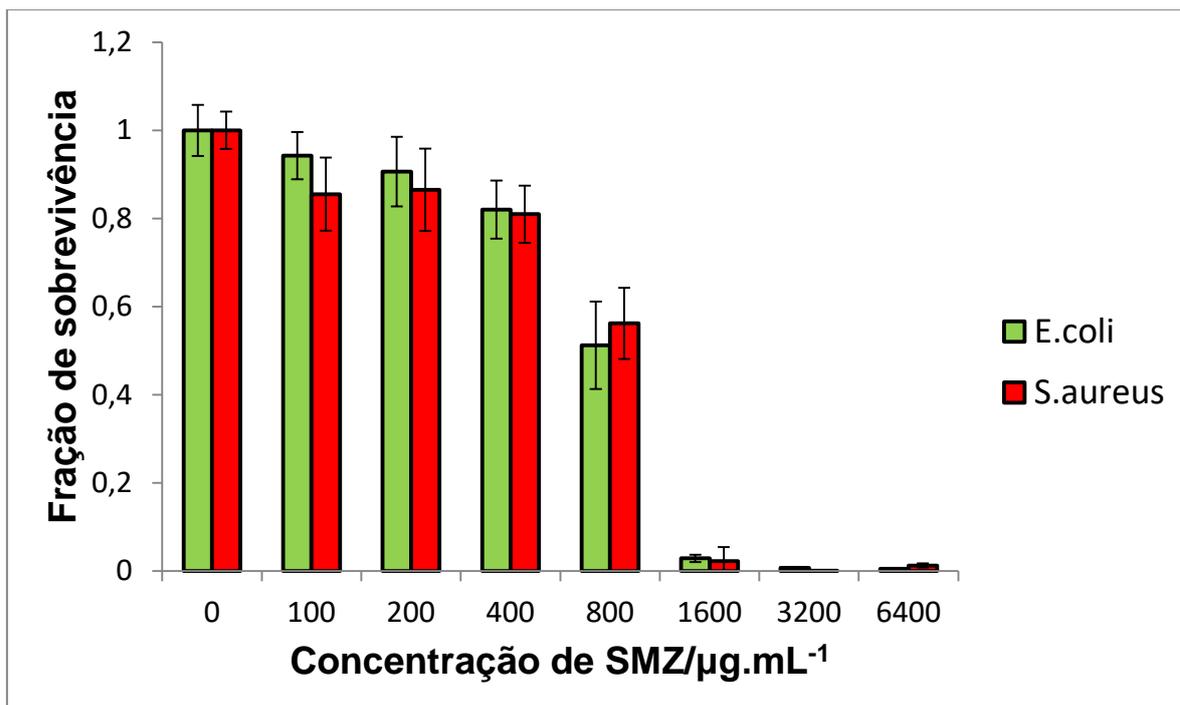


Figura 3.42 – Atividade Antimicrobiana da SMZ (100 a 6400 µg/mL) nas bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Analisando a Figura 3.42, observa-se uma inibição expressiva das bactérias *E. coli* e *S. aureus* a partir da concentração de 800 µg/mL de SMZ. Os valores de MIC obtidos foram iguais a 417 e 467 µg/mL para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Esses resultados são próximos aos citados por Rocha *et. al* que mostram valores de MIC de 512 µg/mL¹⁸⁵.

-Cinética Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana em função do tempo das nanofibras de PLGA-S e PLGA-S/HAm bem como das n-HAm e SMZ foi investigada frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, como mostra as Figuras 3.43 e 3.44.

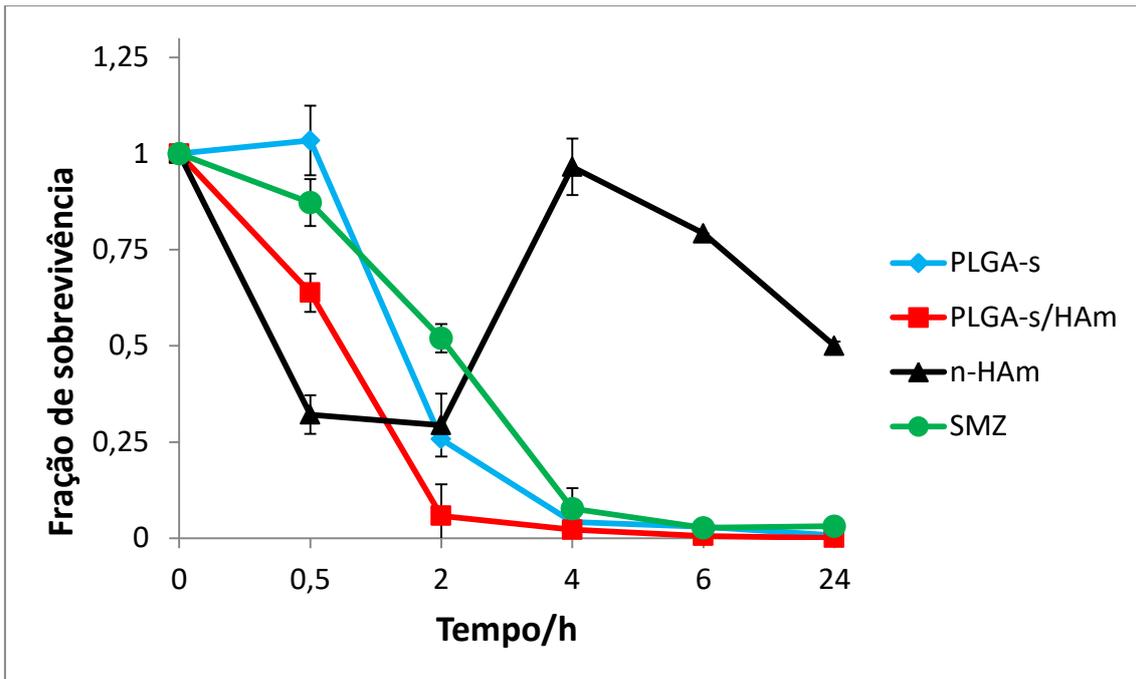


Figura 3.43 – Cinética antimicrobiana em função do tempo da SMZ (2 mg/mL), n-HAm (9 mg/mL) e das nanofibras PLGA-S e PLGA-S/HAm (10 mg) frente as bactérias *E. coli*.

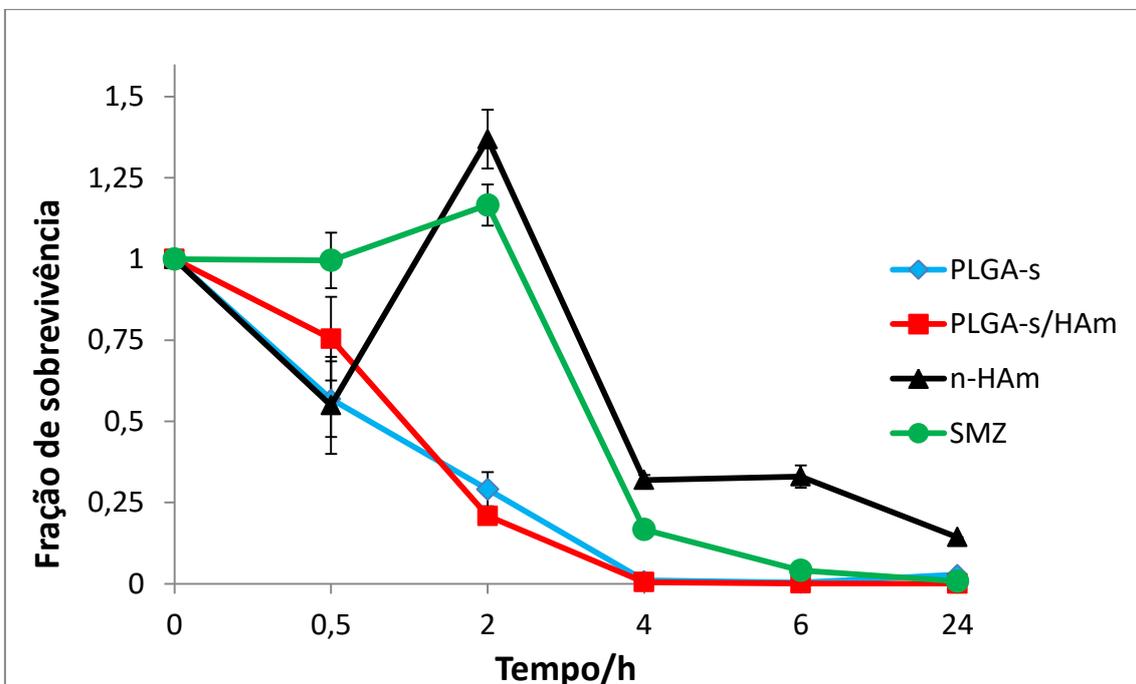


Figura 3.44 – Cinética antimicrobiana em função do tempo da SMZ (2 mg/mL), n-HAm (9 mg/mL) e das nanofibras PLGA-S e PLGA-S/HAm (10 mg) frente as bactérias *S. aureus*.

Analisando as Figuras 3.43 e 3.44, pode-se observar uma inibição bacteriana da SMZ, n-HAm livre e das nanofibras de PLGA-S e PLGA-S/HAm. A SMZ livre apresentou uma cinética de inibição mais rápida frente à bactéria *E. coli* em comparação a bactéria *S. aureus*, porém em ambas o fármaco atingiu uma ação bacteriostática em 6 h de contato. Já a nanofibra de PLGA-S exibiu um perfil de inibição similar a SMZ livre frente à bactéria *E. coli*, obtendo uma cinética de inibição mais acelerada do que a SMZ livre frente a bactéria *S. aureus* com uma ação bacteriostática em 4h de contato.

Curiosamente, as n-HAm exibiram uma inibição oscilante contra ambos os tipos de bactéria. Na bactéria *E. coli* observou-se uma inibição expressiva de 75 % em 2 h, seguida de um pico de proliferação em 4 h e voltando a uma inibição de 50 % com 24 h de contato. Na bactéria *S. aureus* observou-se uma inibição inicial um pouco menos expressiva das n-HAm (~50 %) quando comparada a bactéria *E. coli*. Porém, após o pico proliferativo em 2 h de contato, uma proeminente inibição de ~90 % é observada ao final das 24 h do teste. A atividade antibacteriana de n-HAm ainda é pouco explorada na literatura, porém estudos do grupo de Gambardella indicaram uma redução da adesão de *Escherichia coli* em filmes contendo hidroxiapatita magnética comparado a filmes com somente hidroxiapatita¹⁸⁶.

Em relação à nanofibra de PLGA-S/HAm observa-se uma cinética rápida de inibição tanto para bactéria *E. coli* quanto para *S. aureus*, indicando uma alta suscetibilidade dessas bactérias no tempo de 4 h de contato. É importante ressaltar que os perfis de inibição das nanofibras de PLGA-S e PLGA-S/HAm foram similares frente a bactéria *S. aureus*, contudo a nanofibra PLGA-S/HAm apresentou uma curva cinética mais acentuada frente a bactéria *E. coli* do que a nanofibra PLGA-S.

Esses resultados demonstram que as nanofibras de PLGA-S e PLGA-S/HAm apresentam uma maior inibição de bactérias em relação a SMZ livre se mostrando como uma boa alternativa no tratamento antibacteriano de uso tópico. Adicionalmente, outros estudos ainda devem ser apurados a fim de avaliar o efeito sinérgico da SMZ e n-HAm em bactérias.

CAPÍTULO 4

4.1 Conclusões

- No presente trabalho foram sintetizadas pelo método simples de co-precipitação nanopartículas magnéticas de hidroxiapatita (n-HAm) de comprimento e largura iguais a 94 e 14 nm, respectivamente. As n-HAm apresentaram morfologia em forma de bastonetes com domínios de óxido de ferro distribuídos de forma aleatória e com área superficial média de $48,6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. As medidas de magnetização mostraram uma magnetização de saturação de 19,8 emu/g e magnetização remanescente de 1,7 emu/g, obtendo uma coercividade de campo quase nula ($< 0,005$). Além disso, os métodos utilizados para caracterização como FTIR e ICP-OES mostraram a formação da HA carbonatada, indicada como sendo mais biocompatível dentre as demais HA. A espectroscopia Mössbauer indicaram presença de uma mistura de magnetita, maghemita, óxido-hidróxido de ferro e fosfato de ferro na amostra de n-HAm.

- A funcionalização do PLGA com SMZ foi efetivamente realizada segundo as caracterizações por FTIR e RMN, obtendo 3 % de funcionalização.

- Foram obtidas nanofibras pelo método de eletrofiação com as n-HAm incorporadas dentro da matriz polimérica com sucesso. As curvas de hipertermia indicaram que as nanofibras com 30 % de n-HAm foram capazes de atingir a temperatura de 45 °C em poucos segundos, sugerindo um grande potencial para tratamento de hipertermia magnética. Os sistemas também apresentaram uma liberação controlada da MCC por até 30 dias.

- Os ensaios de MTT mostraram que as n-HAm apresentam uma seletividade a células de tumor de mama 4T1 á concentrações abaixo de 0,1 mg/mL. Uma citotoxicidade mais seletiva a células de osteosarcoma Saos-2 também foi observada pela SMZ em concentrações de 250 µg/mL. Ao contrário da SMZ e das n-HAm não foi observado seletividade da MCC frente a nenhuma das linhagens avaliadas após 48 h de teste. As nanofibras de PLGA/MMC e PLGA/HAm/MCC exibiram elevada citotoxicidade em todas as células avaliadas não mostrando diferença entre os dois sistemas. Já as nanofibras de PLGA e PLGA/HAm mostraram baixa ou ausente citotoxicidade frente a células avaliadas, sendo que a nanofibra PLGA/HAm exibiu uma citotoxicidade moderada nas células 4T1. As nanofibras com PLGA modificado,

PLGA-S/HAm/MCC, não apresentaram o efeito sinérgico/aditivo esperado frente a células tumorais 4T1 e Saos-2. Contudo, os pares PLGA-S/MCC e PLGA-S/HAm mostraram notável citotoxicidade frente a células tumorais, sendo mais seletiva a células de carcinoma mamário 4T1 comparado a células de osteosarcoma Saos-2.

- As imagens de SEM com células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) mostraram uma boa biocompatibilidade e capacidade de adesão celular das nanofibras de PLGA e PLGA/HAm.

- Os resultados do teste preliminar em camundongos mostraram eficiência no tratamento por hipertermia após implante da nanofibra de PLGA/HAm/MCC, com significativa supressão do tumor em relação ao grupo sem tratamento por hipertermia.

- Os ensaios microbiológicos mostraram atividade antimicrobiana moderada das n-HAm e proeminente das nanofibras de PLGA-S e PLGA-S/HAm para bactérias Gram positivas (*S. aureus*) e Gram negativas (*E. coli*).

4.2 Perspectivas futuras

- Avaliação da citotoxicidade e/ou seletividade das n-HAm e SMZ livre em outras linhagens de células tumorais, bem como o efeito aditivo ou sinérgico entre eles;
- Avaliação do efeito sinérgico/aditivo da SMZ e n-HAm em bactérias, e do tratamento antibacteriano de uso tópico das nanofibras de PLGA-S e PLGA-S/HAm;
- Otimização do processo de tratamento por hipertermia magnética *in vivo*, através de ajustes no equipamento empregado e adequação das doses anestésicas administradas;
- Avaliação da eficiência *in vivo* das nanofibras de PLGA/MCC, PLGA/HAm e PLGA/HAm/MCC através da indução de tumor em camundongos com posterior tratamento (implante subcutâneo) das nanofibras associado ao aquecimento local por hipertermia magnética. As avaliações incluem histologia, imunohistoquímica, quantificação de citocinas e quimiocinas, além de avaliação de inflamação (MPO e NAG) e angiogêneses;
- Avaliação das nanofibras de PLGA/HAm como matriz de crescimento celular e suporte para regeneração óssea.

Referências Bibliográficas

- (1) *Estimativa de incidência do Câncer no Brasil*: Rio de Janeiro, INCA, 2014.
- (2) Farley, J.; et al: Cancer incidence and mortality worldwide. GLOBOCAN 2012 - Disponível em: www.globocan.iarc.fr - Acesso em: 10 dez. 2017 .
- (3) Bar-Zeev, M.; Livney, Y. D.; Assaraf, Y. G. Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: Towards precision medicine overcoming drug resistance. *Drug Resistance Updates* **2017**, *31*, 15-30.
- (4) Chen, H. M.; Zhang, W. Z.; Zhu, G. Z.; Xie, J.; Chen, X. Y. Rethinking cancer nanotheranostics. *Nature Reviews Materials* **2017**, *2*.
- (5) Mosayebi, J.; Kiyasatfar, M.; Laurent, S. Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. *Advanced Healthcare Materials* **2017**, *6*.
- (6) Brayden, D. J. Controlled release technologies for drug delivery. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 976-978.
- (7) Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2005**, *1*, 193 - 212.
- (8) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. An overview of clinical and commercial impact of drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2014**, *190*, 15-28.
- (9) Anchordoquy, T. J.; Barenholz, Y.; Boraschi, D.; Chorny, M.; Decuzzi, P.; Dobrovolskaia, M. A.; Farhangrazi, Z. S.; Farrell, D.; Gabizon, A.; Ghandehari, H.; Godin, B.; La-Beck, N. M.; Ljubimova, J.; Moghimi, S. M.; Pagliaro, L.; Park, J. H.; Peer, D.; Ruoslahti, E.; Serkova, N. J.; Simberg, D. Mechanisms and Barriers in Cancer Nanomedicine: Addressing Challenges, Looking for Solutions. *Acs Nano* **2017**, *11*, 12-18.
- (10) Byrne, J. D.; Betancourt, T.; Brannon-Peppas, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*.
- (11) Torchilin, V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *71*.
- (12) Sutton, D.; Nasongkla, N.; Blanco, E.; Gao, J. Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. *Pharmaceutical Research* **2007**, *24*.
- (13) http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo3/farmacocinetica.htm (Acesso 29/02/2017).
- (14) Jaimes-Aguirre, L.; Gibbens-Bandala, B. V.; Morales-Avila, E.; Ocampo-Garcia, B. E.; Seyedeh-Fatemeh, M.; Amirhosein, A. Polymer-Based Drug Delivery Systems, Development and Pre-Clinical Status. *Current Pharmaceutical Design* **2016**, *22*, 2886-2903.
- (15) Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2010**, *75*, 1-18.

- (16) Oliveira, M.; Guimarães, P. G.; Gomes, A. M.; 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.
- (17) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; FaroKhazad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology* **2007**, *2*, 751-760.
- (18) Gopferich, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* **1996**, *17*, 103-114.
- (19) Fuertges, F.; Abuchowski, A. The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins. *Journal of Controlled Release* **1990**, *11*, 139-148.
- (20) Kang, B. K.; Chon, S. K.; Kim, S. H.; Jeong, S. Y.; Kim, M. S.; Cho, S. H.; Lee, H. B.; Khang, G. Controlled release of paclitaxel from microemulsion containing PLGA and evaluation of anti-tumor activity in vitro and in vivo. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *286*, 147-156.
- (21) Birnbaum, D. T.; Brannon-Peppas, L. Molecular weight distribution changes during degradation and release of PLGA nanoparticles containing epirubicin HCl. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2003**, *14*, 87-102.
- (22) Panyam, J.; Williams, D.; Dash, A.; Leslie-Pelecky, D.; Labhasetwar, V. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2004**, *93*, 1804-1814.
- (23) Jain, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2475-2490.
- (24) Liang, D.; Hsiao, B. S.; Chu, B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 1392-1412.
- (25) Park, J. H.; Lee, S.; Kim, J.-H.; Park, K.; Kim, K.; Kwon, I. C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Progress in Polymer Science* **2008**, *33*, 113-137.
- (26) Allen, T. M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2*, 750-763.
- (27) Perez-Herrero, E.; Fernandez-Medarde, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, *93*, 52-79.
- (28) Lammers, T.; Kiessling, F.; Hennink, W. E.; Storm, G. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161*.
- (29) Oliveira, M. F.; Guimarães, P. P. G.; Gomes, A. D. M.; Suárez, D.; Sinisterra, R. D. Strategies to target tumors using nanodelivery systems based on biodegradable polymers, aspects of intellectual property, and market. *Journal of Chemical Biology* **2013**.
- (30) Sahoo, S. K.; Labhasetwar, V. Enhanced anti proliferative activity of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles is mediated via sustained intracellular drug retention. *Molecular Pharmaceutics* **2005**, *2*, 373-383.

- (31) Hilgenbrink, A. R.; Low, P. S. Folate receptor-mediated drug targeting: From therapeutics to diagnostics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, *94*, 2135-2146.
- (32) Zhou, Q.; Guo, X.; Chen, T.; Zhang, Z.; Shao, S.; Luo, C.; Li, J.; Zhou, S. Target-Specific Cellular Uptake of Folate-Decorated Biodegradable Polymer Micelles. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 12662-12670.
- (33) Zhao, H.; Yung, L.-Y. L. Selectivity of folate conjugated polymer micelles against different tumor cells. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *349*, 256-268.
- (34) Goulart Guimaraes, P. P.; Oliveira, S. R.; Rodrigues, G. d. C.; Lacerda Gontijo, S. M.; Lula, I. S.; Cortes, M. E.; Leite Denadai, A. M.; Sinisterra, R. D. Development of Sulfadiazine-Decorated PLGA Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil and Cell Viability. *Molecules* **2015**, *20*, 879-899.
- (35) Jian Chao Yuana, X. L. X., Xian Wu Zengb, Hong Yun Guob, Cheng Ping Miaoa. Tumor targeting of HPMA copolymer conjugates containing sulfadiazine groups. *Chinese Chemical Letters* **2012**, *23*.
- (36) Guo-Ping Yan, C.-Y. Z., Wei Cao, Wei Li, M.S., Li-Yun Li, Mai-Li Liu, Yong-Xue Zhang, Ren-Xi Zhuo. Synthesis and preliminary evaluation of gadolinium complexes containing sulfonamide groups as potential MRI contrast agents. *Radiography* **2003**, *9*, 35-41.
- (37) G.P. Yan, M. L. L., L.Y. Li. Polyaspartamide gadolinium complexes containing sulfadiazine groups as potential macromolecular MRI contrast agents. *Bioconjugate Chemistry* **2005**, *16*, 967-971.
- (38) Zhaohua H., G. Y., Zhaoliang L., Junlian H.. 2-[N1-2-Pyrimidyl-aminobenzenesulfonamido] ethyl 4-bis(2-chloroethyl) aminophenyl butyrate: A potent antitumor agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 1099-1103.
- (39) Sinisterra, R. D.; Najjar, R. Synthesis And Spectroscopic Studies On Dirhodium(Ii) Carboxylate Adducts With Sulfadiazine. *Spectroscopy Letter* **1993**, *v. 26*, 245-259
- (40) Yoo, J.-W.; Irvine, D. J.; Discher, D. E.; Mitragotri, S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nature Reviews Drug Discovery* **2011**, *10*, 521-535.
- (41) Mitragotri, S.; Lahann, J. Physical approaches to biomaterial design. *Nature Materials* **2009**, *8*, 15-23.
- (42) Pataro, A. L.; Oliveira, M. F.; Teixeira, K. I. R.; Turchetti-Maia, R. M. M.; Lopes, M. T. P.; Wykrota, F. H. L.; Sinisterra, R. D.; Cortes, M. E. Polymer: Bioceramic composites optimization by tetracycline addition. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *336*, 75-81.
- (43) Barua, S.; Mitragotri, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today* **2014**, *9*, 223-243.
- (44) Yoo, J.-W.; Chambers, E.; Mitragotri, S. Factors that Control the Circulation Time of Nanoparticles in Blood: Challenges, Solutions and Future Prospects. *Current Pharmaceutical Design* **2010**, *16*, 2298-2307.
- (45) Anselmo, A. C.; Zhang, M.; Kumar, S.; Vogus, D. R.; Menegatti, S.; Helgeson, M. E.; Mitragotri, S. Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting. *Acs Nano* **2015**, *9*, 3169-3177.

- (46) Champion, J. A.; Mitragotri, S. Role of target geometry in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 4930-4934.
- (47) Sharma, G.; Valenta, D. T.; Altman, Y.; Harvey, S.; Xie, H.; Mitragotri, S.; Smith, J. W. Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *Journal of Controlled Release* **2010**, *147*, 408-412.
- (48) Kolhar, P.; Doshi, N.; Mitragotri, S. Polymer Nanoneedle-Mediated Intracellular Drug Delivery. *Small* **2011**, *7*, 2094-2100.
- (49) Chu, K. S.; Hasan, W.; Rawal, S.; Walsh, M. D.; Enlow, E. M.; Luft, J. C.; Bridges, A. S.; Kuijper, J. L.; Napier, M. E.; Zamboni, W. C.; DeSimone, J. M. Plasma, tumor and tissue pharmacokinetics of Docetaxel delivered via nanoparticles of different sizes and shapes in mice bearing SKOV-3 human ovarian carcinoma xenograft. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2013**, *9*, 686-693.
- (50) Barua, S.; Mitragotri, S. Synergistic Targeting of Cell Membrane, Cytoplasm, and Nucleus of Cancer Cells Using Rod-Shaped Nanoparticles. *ACS Nano* **2013**, *7*, 9558-9570.
- (51) Chauhan, V. P.; Popovic, Z.; Chen, O.; Cui, J.; Fukumura, D.; Bawendi, M. G.; Jain, R. K. Fluorescent Nanorods and Nanospheres for Real-Time In Vivo Probing of Nanoparticle Shape-Dependent Tumor Penetration. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50*, 11417-11420.
- (52) Kolhar, P.; Anselmo, A. C.; Gupta, V.; Pant, K.; Prabhakarandian, B.; Ruoslahti, E.; Mitragotri, S. Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 10753-10758.
- (53) Godin, B.; Chiappini, C.; Srinivasan, S.; Alexander, J. F.; Yokoi, K.; Ferrari, M.; Decuzzi, P.; Liu, X. Discoidal Porous Silicon Particles: Fabrication and Biodistribution in Breast Cancer Bearing Mice. *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 4225-4235.
- (54) Yoo, J.-W.; Mitragotri, S. Polymer particles that switch shape in response to a stimulus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 11205-11210.
- (55) Reddy, L. H.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chemical Reviews* **2012**, *112*, 5818-5878.
- (56) Jia, F.; Liu, X.; Li, L.; Mallapragada, S.; Narasimhan, B.; Wang, Q. Multifunctional nanoparticles for targeted delivery of immune activating and cancer therapeutic agents. *Journal of Controlled Release* **2013**, *172*, 1020-1034.
- (57) Lima-Tenorio, M. K.; Pineda, E. A. G.; Ahmad, N. M.; Fessi, H.; Elaissari, A. Magnetic nanoparticles: In vivo cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *493*, 313-327.
- (58) Bao, G.; Mitragotri, S.; Tong, S. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering, Vol 15* **2013**, *15*, 253-282.
- (59) Yigit, M. V.; Moore, A.; Medarova, Z. Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy. *Pharm. Res.* **2012**, *29*, 1180-1188.

- (60) Boyer, C.; Whittaker, M. R.; Bulmus, V.; Liu, J.; Davis, T. P. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *Npg Asia Materials* **2010**, *2*, 23-30.
- (61) Mahmoudi, M.; Azadmanesh, K.; Shokrgozar, M. A.; Journeay, W. S.; Laurent, S. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 3407-3432.
- (62) Bourrinet, P.; Bengel, H. H.; Bonnemain, B.; Dencausse, A.; Idee, J. M.; Jacobs, P. M.; Lewis, J. M. Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Investigative Radiology* **2006**, *41*, 313-324.
- (63) Weissleder, R.; Stark, D. D.; Engelstad, B. L.; Bacon, B. R.; Compton, C. C.; White, D. L.; Jacobs, P.; Lewis, J. Superparamagnetic iron-oxide - pharmacokinetics and toxicity. *American Journal of Roentgenology* **1989**, *152*, 167-173.
- (64) Li, D.; Xia, Y. N. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? *Advanced Materials* **2004**, *16*, 1151-1170.
- (65) Huang, Z. M.; Zhang, Y. Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* **2003**, *63*, 2223-2253.
- (66) Pelipenko, J.; Kocbek, P.; Kristl, J. Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *484*, 57-74.
- (67) Rim, N. G.; Shin, C. S.; Shin, H. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomedical Materials* **2013**, *8*.
- (68) Greiner, A.; Wendorff, J. H. Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 5670-5703.
- (69) Luo, C. J.; Stoyanov, S. D.; Stride, E.; Pelan, E.; Edirisinghe, M. Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 4708-4735.
- (70) Gunn, J.; Zhang, M. Polyblend nanofibers for biomedical applications: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* **2010**, *28*, 189-197.
- (71) Rutledge, G. C.; Fridrikh, S. V. Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 1384-1391.
- (72) Burger, C.; Hsiao, B. S.; Chu, B. Nanofibrous materials and their applications. *Annual Review of Materials Research* **2006**, *36*, 333-368.
- (73) Balaji, A.; Vellayappan, M. V.; John, A. A.; Subramanian, A. P.; Jaganathan, S. K.; Supriyanto, E.; Razak, S. I. A. An insight on electrospun-nanofibers-inspired modern drug delivery system in the treatment of deadly cancers. *Rsc Advances* **2015**, *5*, 57984-58004.
- (74) Xie, J.; Wang, C.-H. Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to treat C6 glioma in vitro. *Pharmaceutical Research* **2006**, *23*, 1817-1826.
- (75) Kim, Y.-J.; Ebara, M.; Aoyagi, T. A Smart Hyperthermia Nanofiber with Switchable Drug Release for Inducing Cancer Apoptosis. *Advanced Functional Materials* **2013**, *23*, 5753-5761.
- (76) Amna, T.; Hassan, M. S.; Nam, K.-T.; Bing, Y. Y.; Barakat, N. A. M.; Khil, M.-S.; Kim, H. Y. Preparation, characterization, and cytotoxicity of

CPT/Fe₂O₃-embedded PLGA ultrafine composite fibers: a synergistic approach to develop promising anticancer material. *International Journal of Nanomedicine* **2012**, *7*, 1659-1670.

(77) Li, L.; Yang, G.; Li, J.; Ding, S.; Zhou, S. Cell behaviors on magnetic electrospun poly-D, L-lactide nanofibers. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2014**, *34*, 252-261.

(78) Park, C.-H.; Kang, S.-J.; Tijing, L. D.; Pant, H. R.; Kim, C. S. Inductive heating of electrospun Fe₂O₃/polyurethane composite mat under high-frequency magnetic field. *Ceramics International* **2013**, *39*, 9785-9790.

(79) Chen, Z.; Chen, Z. F.; Zhang, A. L.; Hu, J. M.; Wang, X. M.; Yang, Z. G. Electrospun nanofibers for cancer diagnosis and therapy. *Biomaterials Science* **2016**, *4*, 922-932.

(80) Shakil, A.; Osborn, J. L.; Song, C. W. Changes in oxygenation status and blood flow in a rat tumor model by mild temperature hyperthermia. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **1999**, *43*, 859-865.

(81) Amarjargal, A.; Tijing, L. D.; Park, C.-H.; Im, I.-T.; Kim, C. S. Controlled assembly of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on electrospun PU nanofibrous membrane: A novel heat-generating substrate for magnetic hyperthermia application. *European Polymer Journal* **2013**, *49*, 3796-3805.

(82) Basile, M. A.; d'Ayala, G. G.; Malinconico, M.; Laurienzo, P.; Coudane, J.; Nottelet, B.; Della Ragione, F.; Oliva, A. Functionalized PCL/HA nanocomposites as microporous membranes for bone regeneration. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2015**, *48*, 457-468.

(83) Kim, H.-W.; Lee, H.-H.; Knowles, J. C. Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006**, *79A*, 643-649.

(84) Loo, S. C. J.; Moore, T.; Banik, B.; Alexis, F. Biomedical Applications of Hydroxyapatite Nanoparticles. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2010**, *11*, 333-342.

(85) Garskaite, E.; Gross, K.-A.; Yang, S.-W.; Yang, T. C.-K.; Yang, J.-C.; Kareiva, A. Effect of processing conditions on the crystallinity and structure of carbonated calcium hydroxyapatite (CHAp). *Crystengcomm* **2014**, *16*, 3950-3959.

(86) Astala, R.; Stott, M. J. First principles investigation of mineral component of bone: CO₃ substitutions in hydroxyapatite. *Chemistry of Materials* **2005**, *17*, 4125-4133.

(87) Landi, E.; Celotti, G.; Logroscino, G.; Tampieri, A. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. *Journal of the European Ceramic Society* **2003**, *23*, 2931-2937.

(88) Webster, T. J.; Ergun, C.; Doremus, R. H.; Siegel, R. W.; Bizios, R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* **2000**, *21*, 1803-1810.

(89) Webster, T. J.; Siegel, R. W.; Bizios, R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* **1999**, *20*, 1221-1227.

(90) Turon, P.; del Valle, L. J.; Aleman, C.; Puiggali, J. Biodegradable and Biocompatible Systems Based on Hydroxyapatite Nanoparticles. *Applied Sciences-Basel* **2017**, *7*.

- (91) Uskokovic, V.; Uskokovic, D. P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2011**, *96B*, 152-191.
- (92) Li, B.; Guo, B.; Fan, H. S.; Zhang, X. D. Preparation of nano-hydroxyapatite particles with different morphology and their response to highly malignant melanoma cells in vitro. *Applied Surface Science* **2008**, *255*, 357-360.
- (93) Cui, X. H.; Liang, T.; Liu, C. S.; Yuan, Y.; Qian, J. C. Correlation of particle properties with cytotoxicity and cellular uptake of hydroxyapatite nanoparticles in human gastric cancer cells. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2016**, *67*, 453-460.
- (94) Ramírez-Agudelo, R.; Scheuermann, K.; Gala-García, A.; Monteiro, A. P. d. F.; Pinzón-García, A. D.; Cortés, M. E.; Sinisterra, R. D. Hybrid nanofibers based on poly-caprolactone/gelatin/hydroxyapatite nanoparticles-loaded Doxycycline: Effective anti-tumoral and antibacterial activity. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2018**, *83*, 25-34.
- (95) Hou, C.-H.; Hou, S.-M.; Hsueh, Y.-S.; Lin, J.; Wu, H.-C.; Lin, F.-H. The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3956-3960.
- (96) Huang, J.-Y.; Chen, M.-H.; Kuo, W.-T.; Sun, Y.-J.; Lin, F.-H. The characterization and evaluation of cisplatin-loaded magnetite-hydroxyapatite nanoparticles (mHAp/CDDP) as dual treatment of hyperthermia and chemotherapy for lung cancer therapy. *Ceramics International* **2015**, *41*, 2399-2410.
- (97) Chen, Y.; Yang, L.; Huang, S.; Li, Z.; Zhang, L.; He, J.; Xu, Z.; Liu, L.; Cao, Y.; Sun, L. Delivery system for DNazymes using arginine-modified hydroxyapatite nanoparticles for therapeutic application in a nasopharyngeal carcinoma model. *International Journal of Nanomedicine* **2013**, *8*, 3107-3118.
- (98) GhavamiNejad, A.; Sasikala, A. R. K.; Unnithan, A. R.; Thomas, R. G.; Jeong, Y. Y.; Vatankhah-Varnoosfaderani, M.; Stadler, F. J.; Park, C. H.; Kim, C. S. Mussel-Inspired Electrospun Smart Magnetic Nanofibers for Hyperthermic Chemotherapy. *Advanced Functional Materials* **2015**, *25*, 2867-2875.
- (99) Hou, R.; Zhang, G.; Du, G.; Zhan, D.; Cong, Y.; Cheng, Y.; Fu, J. Magnetic nanohydroxyapatite/PVA composite hydrogels for promoted osteoblast adhesion and proliferation. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2013**, *103*, 318-325.
- (100) Gloria, A.; Russo, T.; D'Amora, U.; Zeppetelli, S.; D'Alessandro, T.; Sandri, M.; Banobre-Lopez, M.; Pineiro-Redondo, Y.; Uhlarz, M.; Tampieri, A.; Rivas, J.; Herrmannsdoerfer, T.; Dediu, V. A.; Ambrosio, L.; De Santis, R. Magnetic poly(epsilon-caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposite substrates for advanced bone tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface* **2013**, *10*.
- (101) Panseri, S.; Cunha, C.; D'Alessandro, T.; Sandri, M.; Russo, A.; Giavaresi, G.; Marcacci, M.; Hung, C. T.; Tampieri, A. Magnetic Hydroxyapatite Bone Substitutes to Enhance Tissue Regeneration: Evaluation In Vitro Using Osteoblast-Like Cells and In Vivo in a Bone Defect. *Plos One* **2012**, *7*.

- (102) Panseri, S.; Cunha, C.; D'Alessandro, T.; Sandri, M.; Giavaresi, G.; Marcacci, M.; Hung, C. T.; Tampieri, A. Intrinsically superparamagnetic Fe-hydroxyapatite nanoparticles positively influence osteoblast-like cell behaviour. *Journal of Nanobiotechnology* **2012**, *10*.
- (103) Guo, Y.-P.; Guo, L.-H.; Yao, Y.-b.; Ning, C.-Q.; Guo, Y.-J. Magnetic mesoporous carbonated hydroxyapatite microspheres with hierarchical nanostructure for drug delivery systems. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 12215-12217.
- (104) Liu, T.-Y.; Huang, T. C. A novel drug vehicle capable of ultrasound-triggered release with MRI functions. *Acta Biomaterialia* **2011**, *7*, 3927-3934.
- (105) Pon-On, W.; Charoenphandhu, N.; Tang, I. M.; Jongwattanapisan, P.; Krishnamra, N.; Hoonsawat, R. Encapsulation of magnetic CoFe₂O₄ in SiO₂ nanocomposites using hydroxyapatite as templates: A drug delivery system. *Materials Chemistry and Physics* **2011**, *131*, 485-494.
- (106) Zhao, C.-X.; Yu, L.; Middelberg, A. P. J. Magnetic mesoporous silica nanoparticles end-capped with hydroxyapatite for pH-responsive drug release. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 4828-4833.
- (107) Chen, F.; Li, C.; Zhu, Y.-J.; Zhao, X.-Y.; Lu, B.-Q.; Wu, J. Magnetic nanocomposite of hydroxyapatite ultrathin nanosheets/Fe₃O₄ nanoparticles: microwave-assisted rapid synthesis and application in pH-responsive drug release. *Biomaterials Science* **2013**, *1*, 1074-1081.
- (108) Wu, H.-C.; Wang, T.-W.; Lin, F.-H.; Sun, J.-S. Characterization of Magnetic Hydroxyapatite Nanocrystallites and Potential Application for MRI Contrast Agent. *Current Nanoscience* **2011**, *7*, 902-907.
- (109) Mondal, S.; Manivasagan, P.; Bharathiraja, S.; Moorthy, M. S.; Kim, H. H.; Seo, H.; Lee, K. D.; Oh, J. Magnetic hydroxyapatite: a promising multifunctional platform for nanomedicine application. *International Journal of Nanomedicine* **2017**, *12*, 8389-8410.
- (110) Jin, J.; Zuo, G. F.; Xiong, G. Y.; Luo, H. L.; Li, Q. P.; Ma, C. Y.; Li, D. Y.; Gu, F.; Ma, Y. J.; Wan, Y. Z. The inhibition of lamellar hydroxyapatite and lamellar magnetic hydroxyapatite on the migration and adhesion of breast cancer cells. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2014**, *25*, 1025-1031.
- (111) Meng, J.; Zhang, Y.; Qi, X. J.; Kong, H.; Wang, C. Y.; Xu, Z.; Xie, S. S.; Gu, N.; Xu, H. Y. Paramagnetic nanofibrous composite films enhance the osteogenic responses of pre-osteoblast cells. *Nanoscale* **2010**, *2*, 2565-2569.
- (112) Ota, T.; Nishida, Y.; Ikuta, K.; Kato, R.; Kozawa, E.; Hamada, S.; Sakai, T.; Ishiguro, N. Heat-stimuli-enhanced osteogenesis using clinically available biomaterials. *Plos One* **2017**, *12*.
- (113) Begleiter, A. Clinical applications of quinone-containing alkylating agents. *Frontiers in Bioscience* **2000**, *5*, 1-35.
- (114) Bachar, G.; Cohen, K.; Hod, R.; Feinmesser, R.; Mizrahi, A.; Shpitzer, T.; Katz, O.; Peer, D. Hyaluronan-grafted particle clusters loaded with Mitomycin C as selective nanovectors for primary head and neck cancers. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4840-4848.
- (115) Kumazawa, J.; Yagisawa, M. The history of antibiotics: The Japanese story. *Journal of Infection and Chemotherapy* **2002**, *8*, 125-133.

- (116) Miyoshi, K. Induction of apoptosis in cultured malignant cell lines by anticancer agents. *Kyushu Shika Gakkai Zasshi* **1999**, *53*, 538-548.
- (117) Kaluzova, M.; Kaluz, S.; Lerman, M. I.; Stanbridge, E. J. DNA damage is a prerequisite for p53-mediated proteasomal degradation of HIF-1 alpha in hypoxic cells and downregulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. *Molecular and Cellular Biology* **2004**, *24*, 5757-5766.
- (118) Jaffe, N.; Traggis, D.; Enriquez, C. Evaluation of a combination of mitomycin c (nsc-26980), phenylalanine mustard (nsc-14210), and vincristine (nsc-67574) in treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer Chemotherapy Reports Part 1* **1971**, *55*, 189-&.
- (119) Yi, Y.; Li, Y.; Wu, H.; Jia, M.; Yang, X.; Wei, H.; Lin, J.; Wu, S.; Huang, Y.; Hou, Z.; Xie, L. Single-step assembly of polymer-lipid hybrid nanoparticles for mitomycin C delivery. *Nanoscale Research Letters* **2014**, *9*.
- (120) Eroglu, M.; Ozturk, E.; Ozdemyr, N.; Denkba, E. B.; Dogan, I.; Acar, A.; Guzel, M. Mitomycin-C-loaded alginate carriers for bladder cancer chemotherapy: In vivo studies. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **2005**, *20*, 197-208.
- (121) Prasad, P.; Shuhendler, A.; Cai, P.; Rauth, A. M.; Wu, X. Y. Doxorubicin and mitomycin C co-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles inhibit growth of sensitive and multidrug resistant human mammary tumor xenografts. *Cancer Letters* **2013**, *334*, 263-273.
- (122) Bareford, L. M.; Avaritt, B. R.; Ghandehari, H.; Nan, A.; Swaan, P. W. Riboflavin-Targeted Polymer Conjugates for Breast Tumor Delivery. *Pharmaceutical Research* **2013**, *30*, 1799-1812.
- (123) Eroglu, M.; Irmak, S.; Acar, A.; Denkbaz, E. B. Design and evaluation of a mucoadhesive therapeutic agent delivery system for postoperative chemotherapy in superficial bladder cancer. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, *235*, 51-59.
- (124) Gumusderelioglu, M.; Deniz, G. Sustained release of mitomycin-C from poly(DL-lactide) /poly(DL-lactide-co-glycolide) films. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2000**, *11*, 1039-1050.
- (125) Wu, H.-C.; Wang, T.-W.; Bohn, M. C.; Lin, F.-H.; Spector, M. Novel Magnetic Hydroxyapatite Nanoparticles as Non-Viral Vectors for the Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene. *Advanced Functional Materials* **2010**, *20*, 67-77.
- (126) Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* **2008**, *3*, 163-175.
- (127) Silva, C. C.; Vasconcelos, I. F.; Sombra, A. S. B.; Valente, M. A. Magnetic properties study on Fe-doped calcium phosphate. *Physica Scripta* **2009**, *80*.
- (128) Tampieri, A.; D'Alessandro, T.; Sandri, M.; Sprio, S.; Landi, E.; Bertinetti, L.; Panseri, S.; Pepponi, G.; Goettlicher, J.; Banobre-Lopez, M.; Rivas, J. Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fe-doped hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia* **2012**, *8*, 843-851.
- (129) Wu, H.-C.; Wang, T.-W.; Sun, J.-S.; Wang, W.-H.; Lin, F.-H. A novel biomagnetic nanoparticle based on hydroxyapatite. *Nanotechnology* **2007**, *18*.

- (130) Petchsang, N.; Pon-On, W.; Hodak, J. H.; Tang, I. M. Magnetic properties of Co-ferrite-doped hydroxyapatite nanoparticles having a core/shell structure. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2009**, *321*, 1990-1995.
- (131) Kramer, E.; Itzkowitz, E.; Wei, M. Synthesis and characterization of cobalt-substituted hydroxyapatite powders. *Ceramics International* **2014**, *40*, 13471-13480.
- (132) Zeng, X. B.; Hu, H.; Xie, L. Q.; Lan, F.; Jiang, W.; Wu, Y.; Gu, Z. W. Magnetic responsive hydroxyapatite composite scaffolds construction for bone defect reparation. *International Journal of Nanomedicine* **2012**, *7*, 3365-3378.
- (133) Thommes, M.; Kaneko, K.; Neimark, A. V.; Olivier, J. P.; Rodriguez-Reinoso, F.; Rouquerol, J.; Sing, K. S. W. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2015**, *87*, 1051-1069.
- (134) Tseng, C.-L.; Chang, K.-C.; Yeh, M.-C.; Yang, K.-C.; Tang, T.-P.; Lin, F.-H. p. Development of a dual-functional Pt-Fe-HAP magnetic nanoparticles application for chemo-hyperthermia treatment of cancer. *Ceramics International* **2014**, *40*, 5117-5127.
- (135) Santana, M.; Estevez, J. O.; Agarwal, V.; Herrera-Becerra, R. Room Temperature Crystallization of Hydroxyapatite in Porous Silicon Structures. *Nanoscale Research Letters* **2016**, *11*.
- (136) Chamritski, I.; Burns, G. Infrared- and Raman-active phonons of magnetite, maghemite, and hematite: A computer simulation and spectroscopic study. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109*, 4965-4968.
- (137) Gopi, D.; Ansari, M. T.; Shinyjoy, E.; Kavitha, L. Synthesis and spectroscopic characterization of magnetic hydroxyapatite nanocomposite using ultrasonic irradiation. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2012**, *87*, 245-250.
- (138) Agudelo, R. R. Preparação e caracterização de matrizes de liberação controlada de doxiciclina à base de nanofibras de policaprolactona e gelatina carregadas com nanopartículas de hidroxiapatita. Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.
- (139) Cornell, R. M.; Schwertmann, U.: *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*; WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2003. pp. 172-177.
- (140) Mayer, I.; Diab, H.; Felner, I. Ferric iron in synthetic carbonate apatites - a mossbauer-effect study. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1992**, *45*, 129-133.
- (141) Goya, G. F.; Berquo, T. S.; Fonseca, F. C.; Morales, M. P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *Journal of Applied Physics* **2003**, *94*, 3520-3528.
- (142) Boda, S. K.; Anupama, A. V.; Basu, B.; Sahoo, B. Structural and Magnetic Phase Transformations of Hydroxyapatite-Magnetite Composites under Inert and Ambient Sintering Atmospheres. *Journal of Physical Chemistry C* **2015**, *119*, 6539-6555.
- (143) Khorana, H. G. The chemistry of carbodiimides. *Chemical Reviews* **1953**, *53*, 145-166.

- (144) Park, J.; Kang, S. A Study on Surface, Thermal and Mechanical Properties of Absorbable PLGA Plate. **2013**, *6*, 73-82.
- (145) Porjazoska, A.; Goracinova, K.; Mladenovska, K.; Glavas, M.; Simonovska, M. Poly(lactide-co-glycolide) microparticles as systems for controlled release of proteins - Preparation and characterization. *Acta Pharmaceutica (Zagreb)* **2004**, *54*, 215-229.
- (146) Kesimli, B.; Topacli, A. Infrared studies on Co and Cd complexes of sulfamethoxazole. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2001**, *57*, 1031-1036.
- (147) Bouchoucha, A.; Terbouche, A.; Zaouani, M.; Derridj, F.; Djebbar, S. Iron and nickel complexes with heterocyclic ligands: Stability, synthesis, spectral characterization, antimicrobial activity, acute and subacute toxicity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2013**, *27*, 191-202.
- (148) Kartashov, V. S.; Shorshnev, S. V.; Arzamastsev, A. P. Identification of drugs by ¹³C NMR Spectroscopy - IV Sulfanilamides. *Plenum Publishing Corporation* **1993**, 921-923.
- (149) Kasperczyk, J. Microstructural analysis of poly (L,L-lactide)-co-(glycolide) by H-1 and C-13 nmr spectroscopy. *Polymer* **1996**, *37*, 201-203.
- (150) Simon, M.; Turoczi, C. M.; Badea, V.; Pop, M.; Zaharia, V.; Csunderlik, C. Synthesis of Symmetrically N,N '-di-substituted Aliphatic Ureas by Reaction of bis(o-nitrophenyl) Carbonate with Primary Amines. *Revista De Chimie* **2010**, *61*, 380-382.
- (151) Hezi-Yamit, A.; Sullivan, C.; Wong, J.; David, L.; Chen, M.; Cheng, P.; Shumaker, D.; Wilcox, J. N.; Udipi, K. Impact of polymer hydrophilicity on biocompatibility: Implication for DES polymer design. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2009**, *90A*, 133-141.
- (152) Lee, J. B.; Lee, S. H.; Yu, S. M.; Park, J.-C.; Choi, J. B.; Kim, J. K. PLGA scaffold incorporated with hydroxyapatite for cartilage regeneration. *Surface & Coatings Technology* **2008**, *202*, 5757-5761.
- (153) Chang, N.-J.; Jhung, Y.-R.; Issariyakul, N.; Yao, C.-K.; Yeh, M.-L. Synergistic Stimuli by Hydrodynamic Pressure and Hydrophilic Coating on PLGA Scaffolds for Extracellular Matrix Synthesis of Engineered Cartilage. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2012**, *23*, 2133-2151.
- (154) Vasita, R.; Mani, G.; Agrawal, C. M.; Katti, D. S. Surface hydrophilization of electrospun PLGA micro-/nano-fibers by blending with Pluronic (R) F-108. *Polymer* **2010**, *51*, 3706-3714.
- (155) Hou, Z.; Li, Y.; Huang, Y.; Zhou, C.; Lin, J.; Wang, Y.; Cui, F.; Zhou, S.; Jia, M.; Ye, S.; Zhang, Q. Phytosomes Loaded with Mitomycin C-Soybean Phosphatidylcholine Complex Developed for Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics* **2013**, *10*, 90-101.
- (156) Guimarães, P. P. G.; Oliveira, M. F.; Gomes, A. D. M.; Gontijo, S. M. L.; Cortés, M. E.; Campos, P. P.; Viana, C. T. R.; Andrade, S. P.; Sinisterra, R. D. PLGA nanofibers improves the antitumoral effect of daunorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *136*, 248-255.
- (157) Oliveira, M. F.; Suarez, D.; Barbosa Rocha, J. C.; Novaes de Carvalho Teixeira, A. V.; Cortes, M. E.; De Sousa, F. B.; Sinisterra, R. D. Electrospun nanofibers of polyCD/PMAA polymers and their potential application as drug delivery system. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2015**, *54*, 252-261.

- (158) Gandhi, P. J.; Murthy, Z. V. P. Measurement of solubility of mitomycin C in ethanol-water solutions at different temperatures. *Thermochimica Acta* **2012**, *545*, 163-173.
- (159) Fouad, H.; Elsarnagawy, T.; Almajhdi, F. N.; Khalil, K. A. Preparation and In Vitro Thermo-Mechanical Characterization of Electrospun PLGA Nanofibers for Soft and Hard Tissue Replacement. *International Journal of Electrochemical Science* **2013**, *8*, 2293-2304.
- (160) Iafisco, M.; Sandri, M.; Panseri, S.; Delgado-Lopez, J. M.; Gomez-Morales, J.; Tampieri, A. Magnetic Bioactive and Biodegradable Hollow Fe-Doped Hydroxyapatite Coated Poly(L-lactic) Acid Micro-nanospheres. *Chemistry of Materials* **2013**, *25*, 2610-2617.
- (161) Ranganath, S. H.; Wang, C. H. Biodegradable microfiber implants delivering paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2996-3003.
- (162) Fernandes, N. S.; Carvalho, M. A. D.; Mendes, R. A.; Ionashiro, M. Thermal decomposition of some chemotherapeutic substances. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **1999**, *10*, 459-462.
- (163) Kumar, C.; Mohammad, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, *63*, 789-808.
- (164) Johannsen, M.; Gneveckow, U.; Eckelt, L.; Feussner, A.; Waldofner, N.; Scholz, R.; Deger, S.; Wust, P.; Loening, S. A.; Jordan, A. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. *International Journal of Hyperthermia* **2005**, *21*, 637-647.
- (165) Fredenberg, S.; Wahlgren, M.; Reslow, M.; Axelsson, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-A review. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *415*, 34-52.
- (166) Nitanan, T.; Akkaramongkolporn, P.; Ngawhirunpat, T.; Rojanarata, T.; Panomsuk, S.; Opanasopit, P. Fabrication and evaluation of cationic exchange nanofibers for controlled drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, *450*, 345-353.
- (167) Monteiro, A. P. F.; Rocha, C. M. S. L.; Oliveira, M. F.; Gontijo, S. M. L.; Agudelo, R. R.; Sinisterra, R. D.; Cortés, M. E. Nanofibers containing tetracycline/ β -cyclodextrin: Physico-chemical characterization and antimicrobial evaluation. *Carbohydrate Polymers* **2017**, *156*, 417-426.
- (168) Guimaraes, P. P. G.; Oliveira, M. F.; Gomes, A. D. M.; Gontijo, S. M. L.; Cortes, M. E.; Campos, P. P.; Viana, C. T. R.; Andrade, S. P.; Sinisterra, R. D. PLGA nanofibers improves the antitumoral effect of daunorubicin. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2015**, *136*, 248-255.
- (169) Siepmann, J.; Gopferich, A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *48*, 229-247.
- (170) Hassan, M. K.; Hassan, R. M.; Abdalla, M. A. Synthesis and characterization of high-spin iron(III)-sulpha drug complexes and their biological-activity. *Monatshefte Fur Chemie* **1991**, *122*, 829-839.
- (171) Xu, J.; Xu, P. J.; Li, Z. G.; Huang, J.; Yang, Z. Oxidative stress and apoptosis induced by hydroxyapatite nanoparticles in C6 cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2012**, *100A*, 738-745.

- (172) Leeder, J. S.; Dosch, H. M.; Spielberg, S. P. Cellular toxicity of sulfamethoxazole reactive metabolites .1. inhibition of intracellular esterase-activity prior to cell-death. *Biochemical Pharmacology* **1991**, *41*, 567-574.
- (173) Hess, D. A.; Sisson, M. E.; Suria, H.; Wijsman, J.; Puvanesasingham, R.; Madrenas, J.; Reider, M. J. Cytotoxicity of sulfonamide reactive metabolites: apoptosis and selective toxicity of CD8(+) cells by the hydroxylamine of sulfamethoxazole. *Faseb Journal* **1999**, *13*, 1688-1698.
- (174) Toraya-Brown, S.; Fiering, S. Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. *International Journal of Hyperthermia* **2014**, *30*, 531-539.
- (175) Nakajima, K.; Yanagawa, T.; Watanabe, H.; Takagishi, K. Hyperthermia reduces migration of osteosarcoma by suppression of autocrine motility factor. *Oncology Reports* **2012**, *28*, 1953-1958.
- (176) Zagar, T. M.; Oleson, J. R.; Vujaskovic, Z.; Dewhirst, M. W.; Craciunescu, O. I.; Blackwell, K. L.; Prosnitz, L. R.; Jones, E. L. Hyperthermia for locally advanced breast cancer. *International Journal of Hyperthermia* **2010**, *26*, 618-624.
- (177) Teixeira, A. S.; Araujo, F. A.; Ferreira, M.; Barcelos, L. S.; Teixeira, M. M.; Andrade, S. P. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. *Life Sciences* **2006**, *78*, 1637-1645.
- (178) Mendes, J. B.; Rocha, M. A.; Araujo, F. A.; Moura, S. A. L.; Ferreira, M. A. N. D.; Andrade, S. P. Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvascular Research* **2009**, *78*, 265-271.
- (179) Marques, S. M.; Campos, P. P.; Castro, P. R.; Cardoso, C. C.; Ferreira, M. A. N. D.; Andrade, S. P. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvascular Research* **2011**, *82*, 246-252.
- (180) Castro, P. R.; Marques, S. M.; Campos, P. P.; Cardoso, C. C.; Sampaio, F. P.; Ferreira, M. A. N. D.; Andrade, S. P. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvascular Research* **2012**, *84*, 9-15.
- (181) Jutkina, J.; Marathe, N. P.; Flach, C. F.; Larsson, D. G. J. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Science of The Total Environment* **2018**, *616-617*, 172-178.
- (182) Zayyad, H.; Eliakim-Raz, N.; Leibovici, L.; Paul, M. Revival of old antibiotics: needs, the state of evidence and expectations. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2017**, *49*, 536-541.
- (183) Burman, L. G. The antimicrobial activities of trimethoprim and sulfonamides. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **1986**, *18*, 3-13.
- (184) Patel, O. G.; Mberu, E. K.; Nzila, A. M.; Macreadie, I. G. Sulfa drugs strike more than once. *Trends in Parasitology* **2004**, *20*, 1-3.
- (185) Rocha, D. P.; Pinto, G. F.; Ruggiero, R.; de Oliveira, C. A.; Guerra, W.; Fontes, A. P. S.; Tavares, T. T.; Marzano, I. M.; Pereira-Maia, E. C. Coordination of metals to antibiotics as a strategy to combat bacterial resistance. *Quimica Nova* **2011**, *34*, 111-118.

(186) Gambardella, A.; Bianchi, M.; Kaciulis, S.; Mezzi, A.; Brucale, M.; Cavallini, M.; Herrmannsdoerfer, T.; Chanda, G.; Uhlarz, M.; Cellini, A.; Pedna, M. P.; Sambri, V.; Marcacci, M.; Russo, A. Magnetic hydroxyapatite coatings as a new tool in medicine: A scanning probe investigation. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **2016**, *62*, 444-449.

ANEXO 1

Produção Científica

1. Artigos Publicados em Periódicos:

- Ana P. F. Monteiro, Cíntia M. S. L. Rocha, Michele F. Oliveira, Sávio M. L. Gontijo, Ricardo R. Agudelo, Rubén D. Sinisterra, Maria E. Cortés. Nanofibers containing tetracycline/ β -cyclodextrin: Physico-chemical characterization and antimicrobial evaluation. Carbohydrate Polymers. **2017** Vol. 156, p. 417-426. DOI :10.1016/j.carbpol.2016.09.059

- Ana P.F. Monteiro, Larissa D. Caminhas, José D. Ardisson, Roberto Paniago, Maria E. Cortés, Rubén D. Sinisterra. Magnetic nanoparticles coated with cyclodextrins and citrate for irinotecan delivery. Carbohydrate Polymers. **2017**. Vol. 163, p. 1-9. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.11.091

- Diego F. Suárez, Ana P. F. Monteiro, Daniele C. Ferreira, Frederico D. Brandão, Klaus Krambrock, Luzia V. Modolo, Maria E. Cortés, Rubén D. Sinisterra. Efficient antibacterial nanosponges based on ZnO nanoparticles and doxycycline. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. **2017**. Vol. 177, p. 85-94. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.018

- Ricardo Ramírez-Agudelo, Karina Scheuermann, Alfonso Gala-García, Ana P. F. Monteiro, Ana D. Pinzón-García, Maria E. Cortés, Rubén D. Sinisterra. Hybrid nanofibers based on poly-caprolactone/gelatin/hydroxyapatite nanoparticles-loaded Doxycycline: Effective anti-tumoral and antibacterial activity. Materials Science and Engineering: C. **2018**. Vol. 83, p. 25-34. DOI: 10.1016/j.msec.2017.08.012

2. Patentes depositadas:

- BR1320170201731: “COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO COMPOSTOS DE INCLUSÃO ENTRE INIBIDORES FARMACOLÓGICOS DA VIA MEK/ERK E CICLODEXTRINAS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS VIRAIS” Inventores: Claudio Antônio Bonjardim, Rubén Dario Sinisterra Millan, Leonardo Camilo de Oliveira, Hugo José Valencia Rivero, Ana Paula de Figueiredo Monteiro, Nídia Esther Colquehuanca Arias, Diogo Correa Mendonça. Data de Depósito: 21/09/2017

-“NANOFIBRAS COM HIDROXIAPATITA MAGNÉTICA: PREPARAÇÃO, FORMULAÇÕES E USOS” Inventores: Rubén Dario Sinisterra Millan, Maria Esperanza Cortés, Ana Paula de Figueiredo Monteiro. Em processo de Depósito.

3. Artigos submetidos e em fase de redação:

Ana P. F. Monteiro, Davyston C. Pedersoli, Luciano R. S. Lara, Rosana Z. Domingues, Humberto O. Stumpf, Maria E. Cortés, Rubén D. Sinisterra. Dual anticancer effect of magnetic nano-hydroxyapatite and mitomicyn C loaded in PLGA nanofibers: in vitro study. Journal of Materials Science and Engineering: C.

4. Trabalhos apresentados em congresso:

Ana P.F. Monteiro, Maria E. Cortés, Rubén D. Sinisterra. XV Brazilian MRS Meeting – SBPMat. Nanofibers with magnetic hydroxyapatite nanoparticles as dual treatment for cancer.