

VERUSCA CRISTINA PIZZATTO FONTANIVE

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISES *IN VITRO* E *IN VIVO* DA  
TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITE DE COBALTO  
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

GUARAPUAVA

2012

**Verusca Cristina Pizzatto Fontanive**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISES *IN VITRO* E *IN VIVO* DA  
TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE COBALTO  
PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Dissertação a ser apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas à Universidade Estadual do Centro-Oeste.

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica**

**Co-orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil**

Guarapuava

2012

F681s Fontanive, Verusca Cristina Pizzatto  
Síntese, caracterização e análises *in vitro* e *in vivo* da toxicidade de nanopartículas de ferrita de cobalto para aplicações biomédicas / Verusca Cristina Pizzatto Fontanive. -- Guarapuava, 2012  
xiv, 77 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012  
Orientador: Luiz Fernando Cótica  
Co-orientador: Najeh Maissar Khalil  
Banca examinadora: Valdirlei Fernandes Freitas, David Livingstone Alves Figueiredo

Bibliografia

1. Farmácia. 2. Nanopartículas. 3. Ferrita de cobalto (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). 4. Toxicidade. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

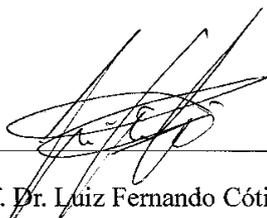
CDD 615

## TERMO DE APROVAÇÃO

VERUSCA CRISTINA PIZZATTO FONTANIVE

### SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE FERRITE DE COBALTO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Dissertação aprovada em 12 de dezembro de 2012, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



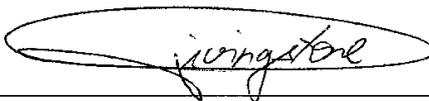
Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica - UEM

Orientador/Presidente



Prof. Dr. Valdirlei Fernandes Freitas - UEM

Membro



Prof. Dr. David Livingstone Alves Figueiredo - UNICENTRO

Membro

GUARAPUAVA-PR

2012

Ao meu noivo pela ajuda fundamental e aos meus queridos pais, irmão e cunhada pelo constante incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, onde busquei forças em todos os momentos.

Aos meus pais, Idene e Sérgio, que me incentivaram e acreditaram em mim e no sucesso deste mestrado.

Ao meu irmão, Messias, que é mais do que um irmão, é um amigo, minha cunhada Liliane.

Ao meu noivo Rafael, que sempre me deu força, ficou do meu lado em todas às horas, especialmente nas piores, fundamental. *Te amo!*

Às minhas amigas que, mesmo longe, estão sempre presentes e me apoiando, minhas verdadeiras e sempre amigas: Marli, Cátia, Jessika, Simone, Ronisa e Saionara, essenciais em minha vida.

À minha amiga e colega de mestrado Janaína com que dividi viagens, conversas e muito aprendizado, muito obrigada pela ajuda.

Ao meu amigo Tiago que muito me ajudou, sempre disponível.

Às colegas Viviane e Luciana que me ajudaram em experimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Fernando Cótica pela oportunidade de trabalho e desta conquista, persistência e imensa ajuda.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, que ajudou para que este trabalho se realizasse.

À contribuição das alunas de IC do Prof. Najeh na UNICENTRO.

Aos ICs do Prof. Luiz Fernando da UEM, quando estive em Maringá, pelo auxílio na produção das nanopartículas.

À contribuição da secretária Elisângela, sempre pronta para responder meus e-mails cheios de dúvidas.

À FADEP – Faculdade de Pato Branco que disponibilizou seus laboratórios para realização do experimento *in vivo* e do Prof. Ms. Oriel, parceiro fundamental.

Ao Dr. André Mazuco, do Laboratório São Roque de Coronel Vivida onde foram realizadas às análises bioquímicas.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	- Métodos de síntese de NPs.....	21
<b>Figura 2</b>	- Representação da difração de raios X por um cristal.....	24
<b>Figura 3</b>	- Comportamento magnético de nanopartículas.....	27
<b>Figura 4</b>	- Esquema demonstrando carreamento de fármacos utilizando nanopartículas magnéticas e um gradiente externo de campo magnético..	30
<b>Figura 5</b>	- Diagrama esquemático de ensaios de citotoxicidade em hemácias e leucócitos polimorfonucleados.....	34
<b>Figura 6</b>	- Demonstração esquemática dos compostos e procedimento utilizados para síntese de NPFC's através do método sol-gel.....	37
<b>Figura 7</b>	- Difractografia de raios X nas diferentes temperaturas de síntese de NPFC's (A - 300°, B - 400°, C - 500° C).....	42
<b>Figura 8</b>	- Demonstração da curva de histerese característica de materiais magnéticos.....	43
<b>Figura 9</b>	- Micrografia da microscopia eletrônica de varredura, escala de 10 nm.....	44
<b>Figura 10</b>	- Micrografia da microscopia eletrônica de transmissão, escala de 100 nm.	45
<b>Figura 11</b>	- Efeito de NPFC's sobre hemácias. Hemácias (5%) incubadas a 37° C por 24 h sob constante agitação na ausência ou presença de diferentes concentrações de NPFC's. A liberação de hemoglobina, após centrifugação, foi determinada pela leitura da absorbância em 540nm...	46
<b>Figura 12</b>	- Efeito de NPFC's sobre a viabilidade de LPMN. Concentrado de LPMN incubados por 6h à 37° C na ausência ou presença de diferentes concentrações de NPFC's, realizado com Azul de Trypan 1,5%.....	48
<b>Figura 13</b>	- Cortes histológicos dos rins de camundongos machos do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.....	53
<b>Figura 14</b>	- Corte histológico do rim de camundongos machos, que receberam a suspensão de NPFC's na dose 5 mg/Kg via oral com presença de cistificação/calcificação.....	54
<b>Figura 15</b>	- Corte histológico do fígado de camundongos machos do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.....	55
<b>Figura 16</b>	- Cortes histológicos do baço de camundongos machos do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.....	57
<b>Figura 17</b>	- Cortes histológicos do rim de camundongos fêmeas do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.....	60
<b>Figura 18</b>	- Cortes histológicos do fígado de camundongos fêmeas do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.....	62

**Figura 19** - Cortes histológicos do baço de camundongos fêmeas do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral..... 64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	- Massas dos reagentes de acordo com a proporção molar de Etilenoglicol: Nitrato de Ferro e Co:Fe.....	36
<b>Tabela 2</b>	- Média e desvio padrão dos marcadores bioquímicos no grupo dos camundongos machos na ausência e na presença de diferentes concentrações da suspensão de NPFC's.....	49
<b>Tabela 3</b>	- Análise de variância dos dados dos marcadores bioquímicos em camundongos machos.....	49
<b>Tabela 4</b>	- Média dos valores da dosagem de uréia entre camundongos machos, na ausência e na presença de diferentes concentrações da suspensão de NPFC's.....	50
<b>Tabela 5</b>	- Média e desvio padrão dos marcadores bioquímicos no grupo dos camundongos fêmeas na ausência e na presença de diferentes concentrações da suspensão de NPFC's.....	51
<b>Tabela 6</b>	- Análise de variância sobre os dados dos marcadores bioquímicos em camundongos fêmeas.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
Co	Cobalto
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Ferrita de cobalto
DMSA	Ácido dimercaptossuccínico
DRX	Difração de raios X
FAL	Fosfatase alcalina
Fe	Ferro
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Magnetita
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Maghemita
HE	Hematoxilina/eosina
IRM	Imagem por ressonância magnética
LPMN	Leucócitos polimorfonucleados
M	Magnetização
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Ferrita de níquel
Nm	Nanômetro
NPFC	Nanopartícula de ferrita de cobalto
NPFC's	Nanopartículas de ferrita de cobalto
NP	Nanopartícula
NPs	Nanopartículas
SER	Sistema retículo endotelial
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
VSM	Magnetômetro de amostra vibrante
ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Ferrita de zinco

## RESUMO

Nanopartículas magnéticas (NPs) são produzidas, principalmente, a partir de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) e  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (maghemita), como também de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (ferrita de cobalto),  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  (ferrita de níquel), entre outras. As NPs de ferrita de cobalto (NPFC's) apresentam diversas aplicações possíveis na área biomédica, dentre as quais se destacam: a liberação controlada de fármacos, agentes de contraste para imageamento por ressonância magnética, carreadores de fármacos guiados por campo magnético, tratamento de tumores via hipertermia, separação biomolecular magnética e diagnóstico. Frente tantas possibilidades de aplicação das NPs magnéticas foi desenvolvido, via processo sol-gel modificado, a síntese de NPFC's com tamanhos entre 30 e 100 nm. Realizaram-se caracterizações via difratometria de raios X, análises magnéticas, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Após essas determinações, realizaram-se testes *in vitro* com células sanguíneas humanas, utilizando diferentes concentrações das NPFC's verificando a possível citotoxicidade. Os testes utilizados foram de viabilidade em leucócitos polimorfonucleados (LPMN) e hemácias, onde não ocorreu citotoxicidade sobre as células na presença de NPFC's. O experimento *in vivo* foi realizado com camundongos, machos e fêmeas, sendo administrada por via oral uma suspensão de NPFC's em diferentes concentrações por sete dias. Ao final, foram coletadas amostras para dosagem de creatinina, uréia, fosfatase alcalina (FAL), aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), na avaliação dos marcadores bioquímicos, em geral, não houve alterações significativas que demonstrassem danos, exceto por alteração na dosagem de uréia no grupo dos camundongos machos. Foram retirados fígado, rins e baço dos animais para avaliação histológica, em dois cortes do rim, do grupo dos camundongos machos que receberam a suspensão de NPFC's, observou-se formação de cistificação/dilatação, no entanto nas demais análises dos órgãos não ocorreram alterações significativas indicando danos. Os resultados demonstraram que as NPFC's apresentam biocompatibilidade contribuindo na avaliação para a possível utilização de NPFC's para no direcionamento de fármacos.

**Palavras-chave:** nanopartículas, ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ), toxicidade.

## ABSTRACT

Magnetic nanoparticles (NPs) are produced mainly from  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetite) and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (maghemite), as well as  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (cobalt ferrite),  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  (nickel ferrite), among others. The NPs of cobalt ferrite (NPFC's) have several possible applications in the biomedical field, among which stand out: the controlled release of drugs, contrast agents for magnetic resonance imaging, carriers of drugs guided by magnetic field treatment of tumors via hyperthermia, magnetic separation and biomolecular diagnostics. From many possibilities for applying the magnetic NPs was developed by sol-gel modified synthesis NPFC's with sizes between 30 and 100 nm. Characterizations were performed via X-ray diffraction, magnetic analysis, scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. After these determinations were carried out in vitro with human blood cells using different concentrations of NPFC's checking the possible cytotoxicity. The tests were polymorphonuclear leukocytes in feasibility (PMNL) and red blood cells, where there was no cytotoxicity on the cells in the presence of NPFC's. The experiment was performed in vivo in mice, male and female, being orally administered a suspension of NPFC's in different concentrations for seven days. Finally, samples were collected for measurement of creatinine, urea, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), assessment of biochemical markers, in general, there were no significant changes that would show damage, except for changes in the levels of urea in the group of male mice. Were removed liver, kidney and spleen of the animals for histological evaluation in two cuts the kidney, the group of male mice that received the suspension NPFC's, it was observed the formation of cistificação / dilation, however in the other analyzes organs no changes indicating significant damage. The results showed that the NPFC's biocompatibility feature contributing to the evaluation of the possible use NPFC's for the targeting of drugs.

**Keywords:** nanoparticles, cobalt ferrita ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ), toxicity.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1	Objetivos gerais.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
3.1	Nanotecnologia.....	19
3.2	Nanopartículas magnéticas.....	20
3.3	Métodos de síntese de nanopartículas.....	20
3.4	Caracterização de nanopartículas magnéticas.....	22
3.4.1	Difração de raios X.....	23
3.4.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	24
3.4.3	Microscopia eletrônica de transmissão.....	25
3.5	Comportamento magnético.....	26
3.5.1	Magnetômetro de amostra vibrante.....	28
3.6	Aplicações das nanopartículas magnéticas.....	28
3.7	Avaliação da toxicidade.....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1	Síntese de nanopartículas de ferrita de cobalto.....	36
4.2	Caracterização de nanopartículas de ferrite de cobalto.....	37
4.2.1	Difratometria de raios X.....	37
4.2.2	Magnetômetro de amostra vibrante.....	38
4.2.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	38
4.2.4	Microscopia eletrônica de transmissão.....	38
4.3	Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de ferrita de cobalto.....	39
4.3.1	Avaliação da citotoxicidade sobre hemácias.....	39
4.3.2	Avaliação da citotoxicidade sobre leucócitos polimorfonucleados.....	40
4.4	Avaliação da toxicidade de nanopartículas <i>in vivo</i> .....	40
4.4.1	Avaliação de marcadores bioquímicos.....	41
4.4.2	Avaliação histológica.....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
5.1	Caracterização de nanopartículas de ferrite de cobalto.....	42
5.1.1	Difratometria de raios X.....	42
5.1.2	Magnetômetro de amostra vibrante.....	43
5.1.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	43
5.1.4	Microscopia eletrônica de transmissão.....	44
5.2	Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de ferrita de cobalto <i>in vitro</i> ...	45
5.2.1	Avaliação da citotoxicidade sobre hemácias.....	45
5.2.2	Avaliação da citotoxicidade sobre leucócitos polimorfonucleados.....	47
5.3	Avaliação da toxicidade de nanopartículas de ferrita de cobalto <i>in vivo</i>	49
5.3.1	Avaliação dos marcadores bioquímicos.....	49
5.3.1.1	Avaliação dos marcadores bioquímicos em camundongos machos.....	49
5.3.1.2	Avaliação dos marcadores bioquímicos em camundongos fêmeas.....	50

5.3.2	Avaliação histológica após administração de nanopartículas de ferrita de cobalto	52
5.3.2.1	Avaliação histológica após administração de nanopartículas de ferrita de cobalto em camundongos machos.....	52
5.3.2.2.	Avaliação histológica após administração de nanopartículas de ferrita de cobalto em camundongos fêmeas.....	58
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica tem realizado pesquisas no intuito de melhorar as características dos fármacos, especialmente, na elaboração de formas farmacêuticas adequadas, via de administração mais eficaz, evitando a ação de interferentes, direcionando os fármacos, visando, assim, à redução dos efeitos colaterais, da toxicidade e garantindo o efeito desejado. Várias tecnologias são empregadas para melhorar o sabor, controlar a liberação, prolongar seu efeito e, dessa forma, melhorar a qualidade de vida das pessoas que necessitam fazer uso contínuo de fármacos.

Dentre tantas inovações e possibilidades, a nanotecnologia é mais uma ferramenta para esse segmento. Por serem estruturas nanométricas, elas auxiliam na incorporação de fármacos, na absorção, no transporte, através da corrente sanguínea, oferecendo sistemas que aumentam a eficácia dos fármacos sem elevar o risco de danos dessas substâncias. As NPs magnéticas, compostas de diferentes materiais, são consideradas muito promissoras para uso na incorporação de fármacos. Sendo as NPs magnéticas biocompatíveis, além dos benefícios acima citados, possibilitam a incorporação de fármacos que poderão ser direcionados ao seu local de ação. As NPs magnéticas devido suas características podem contribuir com a redução da dose do fármaco, direcionando este para seu local de ação, evitando que venha a atuar em outros órgãos ou tecidos, reduzindo os efeitos colaterais, menor risco de toxicidade, menor tempo de circulação no organismo, controle adequado da dose, local de ação e tempo de eliminação.

Os materiais magnéticos podem ser compostos de diferentes átomos ou íons com vários momentos magnéticos. As NPs magnéticas para aplicações biológicas são sintetizadas normalmente a partir de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita),  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (maghemita),  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (ferrita de cobalto),  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  (ferrita de níquel) e demais óxidos (YANG *et al*, 2006), já as NPFC's demonstram uma forte reação ao campo magnético (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006).

Na última década, nanoestruturas magnéticas de ferritas, como as de cobalto, atraíram intenso interesse científico e tecnológico, por possuírem uma vasta aplicação na área da saúde devido à possibilidade de manipulação química das propriedades magnéticas (YUAN *et al*, 2010).

As aplicações de ferritas de cobalto baseiam-se nos seguintes princípios físicos:

- A aplicação controlada de gradientes de campo magnético (uma força magnética) em torno do local de destino desejado, para posicionamento remoto das NPs magnéticas em órgãos ou tecidos (segmentação, implantes magnéticos, separação magnética aplicada ao sequenciamento de DNA);
- A utilização do momento magnético das NPs magnéticas como uma perturbação da ressonância nuclear de prótons (contraste para Imagem por Ressonância Magnética - IRM);
- Uso de partículas magnéticas agitadas por um campo magnético com fins de aquecimento (hipertermia magnética) (TOMITAKA *et al*, 2009).

As ferritas de cobalto possuem um enorme potencial para aplicações em diversas áreas tecnológicas, podendo ser utilizadas em casos de hipertermia magnética, liberação prolongada de fármacos (em tratamento de tumores), transporte de enzimas, preparação de fluídos magnéticos, catálise e IRM (AVDEEV *et al*, 2010; KIM *et al*, 2008; THASSU *et al*, 2007; WANG *et al*, 2011).

Quando utilizadas como agentes de contraste em ressonância magnética, as NPs magnéticas possuem grande utilidade. Melhoram o contraste da imagem para o monitoramento de células específicas e acompanhamento do seu destino, sendo o tempo de permanência delas no organismo um critério importante no procedimento de imagem (SCHLORF *et al*, 2011).

Na hipertermia - produção de calor acima da temperatura normal do corpo – as NPs podem ser usadas clinicamente para a erradicação de células cancerosas após alcançarem certos órgãos ou tecidos, onde se encontram os tumores. O aquecimento é relacionado a uma reversão magnética que gera calor, causando a hipertermia e destruindo o tumor, por estresse oxidativo, sem causar dano aos tecidos próximos, que não contêm as NPs (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006; KIM *et al*, 2008; NAQVI *et al*, 2010; VO-DINH, 2007). O bloqueio da passagem de nutrientes no endotélio capilar também é responsável pelo rompimento celular (SINCAI *et al*, 2001).

Nas aplicações biomédicas, as NPFC's podem ser revestidas para garantir a estabilidade coloidal, maior tempo de circulação, superfícies funcionais e propriedades diagnósticas. O encapsulamento por sílica, por exemplo, é usado para prevenir ou minimizar intoxicação por vazamento dos íons de cobalto, além de outros revestimentos. (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006; WANG *et al*, 2011; YANG *et al*, 2006). O revestimento é útil para conferir mais estabilidade e biocompatibilidade (GUGLIELMO *et al*, 2010).

No entanto, para uma alta eficácia em aplicações biológicas, as ferritas de cobalto devem obedecer algumas exigências, como serem o mais esférica possível, serem biocompatíveis e superparamagnéticas (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006).

Sendo assim, a justificativa deste trabalho está apoiada no fato de que, a aplicação de NPFC's no desenvolvimento de novas formas de tratamentos demonstrou importantes resultados. Estes apresentam algumas vantagens que justificam a sua utilização, tais como, (i) desempenho terapêutico superior em relação a fármacos veiculados através de formas farmacêuticas convencionais; (ii) aumento da adesão do paciente ao tratamento devido à diminuição no número de doses diárias e de efeitos colaterais e (iii) tratamento de doenças para as quais as terapias convencionais são limitadas ou oferecem grave toxicidade.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

O objetivo consiste na síntese de NPFC's, por um método de fácil execução e boa reprodutibilidade, caracterização de NPFC's, através da determinação do tamanho, composição, comportamento magnético e avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Desenvolver os protocolos para obtenção de NPFC's;
- Proceder à síntese de NPFC's de acordo com os protocolos desenvolvidos;
- Caracterizar as NPFC's quanto à morfologia, diâmetro, propriedades magnéticas e composição;
- Avaliar a citotoxicidade sobre hemácias e LPMN;
- Determinar o efeito da administração oral da suspensão de NPFC's, sobre marcadores bioquímicos (FAL, ALT, AST, uréia e creatinina) e sobre fígado, rins e baço de camundongos machos e fêmeas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Nanotecnologia

A nanotecnologia surgiu há mais de 20 anos como empreendimento científico, sua evolução, junto com a bioquímica, veio como uma nova ferramenta para auxiliar na visualização e detecção de reações biológicas nos organismos vivos em escala nanométrica (VO-DINH, 2007).

Os nanomateriais diferem significativamente de outros materiais por dois fatores principais: o aumento da área de superfície e os efeitos quânticos. Sendo assim, podem ter propriedades como reatividade, características elétricas e comportamentos *in vivo* modificados (THASSU *et al*, 2007). As propriedades dependentes do tamanho e a proximidade das dimensões de macromoléculas biológicas levaram a uma aproximação entre nanotecnologia e biologia, trazendo grandes avanços em diagnósticos médicos, terapias específicas, bem como para biologia molecular e celular. A combinação de nanotecnologia molecular e biologia possibilitam a geração de novos dispositivos capazes de analisar as estruturas celulares a nível molecular de processos até então impossíveis de investigação (VO-DINH, 2007).

A faixa de tamanho dessas partículas, que possuem maior interesse no campo da biologia e da medicina, está entre 1 a 100 nm, materiais que, neste intervalo, possuem diferentes propriedades. A área da superfície aumenta drasticamente, o que irá apresentar um novo produto químico com propriedades físicas melhoradas em comparação ao mesmo material em tamanho maior (THASSU *et al*, 2007; VO-DINH, 2007).

O conhecimento da nanotecnologia também oferece aplicações na agricultura, no controle da poluição do ar, na nanoeletrônica, na saúde, no armazenamento e produção de energia (THASSU *et al*, 2007).

### 3.2. Nanopartículas magnéticas

As NPs magnéticas são feitas normalmente de magnetita, maghemita, ferrita de cobalto, ferrita de níquel e demais óxidos (YANG *et al*, 2006). Na última década, nanoestruturas superparamagnéticas de ferritas, como as de cobalto, atraíram intenso interesse científico e tecnológico por possuírem vasta aplicação na área da saúde pela possibilidade de manipulação química de algumas propriedades, como composição, tamanho, formato e comportamento magnético em nível atômico (YUAN *et al*, 2010).

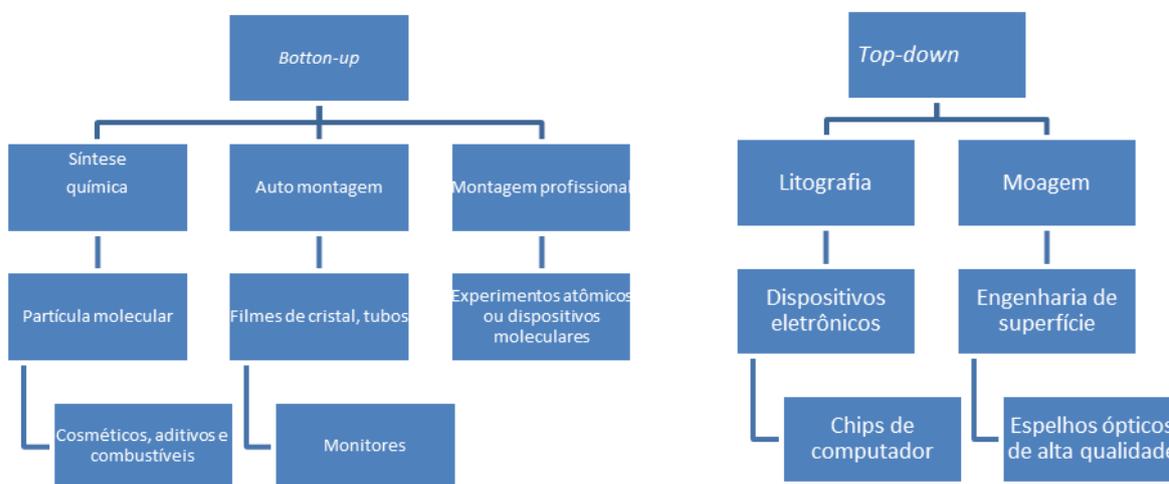
Os diâmetros das NPs magnéticas utilizadas estão entre 2 e 150 nm. O tamanho da partícula influencia nas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. Partículas muito grandes, em torno de 300 nm, são usadas como agente de contraste para ressonância magnética do trato gastrointestinal, enquanto partículas menores (20 nm) são úteis como carreadores para tratamento de tumores (VO-DINH, 2007).

A ferrita de cobalto possui excelente estabilidade química e física, controle preciso sobre composição e estrutura, sendo o sucesso de sua aplicação prática dependente dessas propriedades (GUGLIELMO *et al*, 2010; MATTEI, PEREZ, 2009).

### 3.3. Métodos de síntese de nanopartículas magnéticas

Dois tipos de processos podem ser utilizados na produção de NPs, o *top-down* e o *bottom-up*. O *top-down* envolve a redução de materiais de tamanho maior para micro e nanoescala, partindo da macroescala, reduzindo todas as partículas numa imagem tridimensional, chamadas assim de pontos quânticos. O processo pode ser realizado de três maneiras, síntese química, automontagem e montagem posicional. Os processos *bottom-up* utilizados para fabricação de nanomateriais são processos sol-gel, deposição química a vapor, pirólise a laser, condensação molecular, processo hidrotermal e outras técnicas desenvolvidas recentemente. Constroem a nanoestrutura átomo por átomo, molécula por molécula (figura 1) (THASSU *et al*, 2007; VO-DINH, 2007).

Figura 1: Métodos de síntese de nanopartículas.



Adaptado de THASSU *et al*, (2007, p. 4)

A aplicação de ferrita de cobalto é fortemente influenciada pelas propriedades magnéticas. Para uso biomédico de NPFC's estas devem possuir uma faixa estreita de distribuição de tamanho, um alto valor de magnetização, além de forma esférica uniforme e comportamento superparamagnético em temperatura ambiente (CABUIL *et al*, 2011; LI *et al*, 2010). O sucesso da aplicação prática depende da capacidade de controle dessas características, fortemente afetadas pelo processo de síntese (MATTEI, PEREZ 2009; VICENTE *et al*, 2002).

Várias rotas de síntese estão sendo exploradas para preparação de NPFC's, como coprecipitação, via hidrotermal, microemulsão, hidrólise forçada e vias de oxidação-redução. Contudo, a maior dificuldade nesses métodos tradicionais é a aglomeração dessas partículas e, na maioria dos casos, a dificuldade do controle do tamanho e forma, o que restringe muito sua aplicação (KASHEVSKY *et al*, 2008; LI *et al*, 2010).

A fim de resolver esse problema, a decomposição termal de precursores organometálicos em soluções orgânicas com altas temperaturas tem sido explorada na preparação de NP monodispersa de ferrita de cobalto com controle de tamanho e forma. A maior desvantagem é que o método necessita de reagentes tóxicos e caros, alta temperatura de reação e uma operação complexa (LI *et al*, 2010).

A síntese através do método sol-gel consiste em uma técnica de processamento de materiais que, a partir de sais reagentes (nitratos, cloretos e sulfatos), extensivamente

hidrolisáveis em soluções aquosas, resulta em espécies pequenas (podendo chegar a dimensões nanométricas), polinucleares, as quais sofrem condensação e precipitam durante o aumento do pH. Estas características são importantes quando se pensa na obtenção de pós muito finos.

A técnica sol-gel para síntese de NPFC's, que também pode ser utilizada para a síntese de outras ferritas, é simples de ser executada, possui boa reprodutibilidade, baixo custo e estabilidade de NPFC's formadas conforme demonstrado em outros estudos (VENDRAME, 2011).

A síntese de NPFC's de forma adequada, com distribuição de tamanho estreita, estabilidade e formato esférico uniforme é fundamental para estudos e uso em aplicações biomédicas. Sendo esse método de grande aplicabilidade, por atender a esses requisitos.

### **3.4. Caracterização de nanopartículas magnéticas**

O tamanho nanométrico é uma característica das NPs e, quantificar este com precisão é importante. A forma das NPs também interfere, pode ser esférica, retangular, entre outras, influenciando na área e no diâmetro. Resultados como, forma de distribuição e tamanho, podem depender do processo de obtenção da nanoestrutura (GUPTA, KOMPELLA, 2006).

Há um grande número de métodos para a caracterização de NPs como: espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons), ressonância magnética nuclear, difração de raios X (DRX), espalhamento de luz estático, turbidimetria, partícula única de sensor óptico, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia de força atômica, filtração, fracionamento de um campo de fluxo, hidrodinâmica cromatográfica, eletroforese, calorimetria diferencial de varredura, além de métodos acústicos como espectroscopia acústica.

A determinação das características da partícula pode sofrer variação no resultado conforme o método de análise escolhido (GUPTA, KOMPELLA, 2006; THASSU *et al*, 2007).

Nesse sentido, as análises realizadas na caracterização das NPFC's serão de DRX, MEV e TEM.

### 3.4.1. Difração de raios X

A DRX é uma técnica analítica versátil e não destrutiva utilizada para avaliação de sólidos cristalinos, o que abrange materiais naturais e sintéticos, revelando informações sobre sua estrutura cristalina (BEDÊ, 2010).

Ocorre a DRX sempre que uma frente de ondas passa através de fendas cuja separação é comparável ao comprimento de onda da radiação. Necessariamente, pode-se dizer que a técnica de medida DRX é baseada na interação da radiação eletromagnética de comprimento de onda ( $\sim 0,1$  nm) com planos de átomos do sólido cristalino (SCHETTINO JÚNIOR, 2009).

A estrutura cristalina é uma distribuição regular tridimensional de átomos no espaço. Estes átomos permanecem organizados formando, em uma direção, uma variedade de planos paralelos separados entre si por um espaçamento interplanar  $d$ , conforme as características do material. Para qualquer cristal, os planos existem em uma série de orientações diferentes, cada qual com seus próprios espaçamentos  $d$  particulares (SCHETTINO JÚNIOR, 2009).

Quando um feixe de raios X monocromático com comprimento de onda incide sobre um material cristalino em um ângulo  $\theta$ , a difração ocorre somente quando a distância percorrida pelos raios refletidos de planos sucessivos difere por um número  $n$  inteiro de comprimento de onda, como mostra a figura 2 (BEDÊ, 2010).

Um feixe difratado é produzido somente quando algumas condições geométricas, expressas pela lei de Bragg (equação 1), são satisfeitas.

$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad (\text{eq. 1})$$

sendo:

$\lambda$  = comprimento de onda dos raios X incidentes

$d$  = espaçamento interplanar

$\theta$  = ângulo de difração

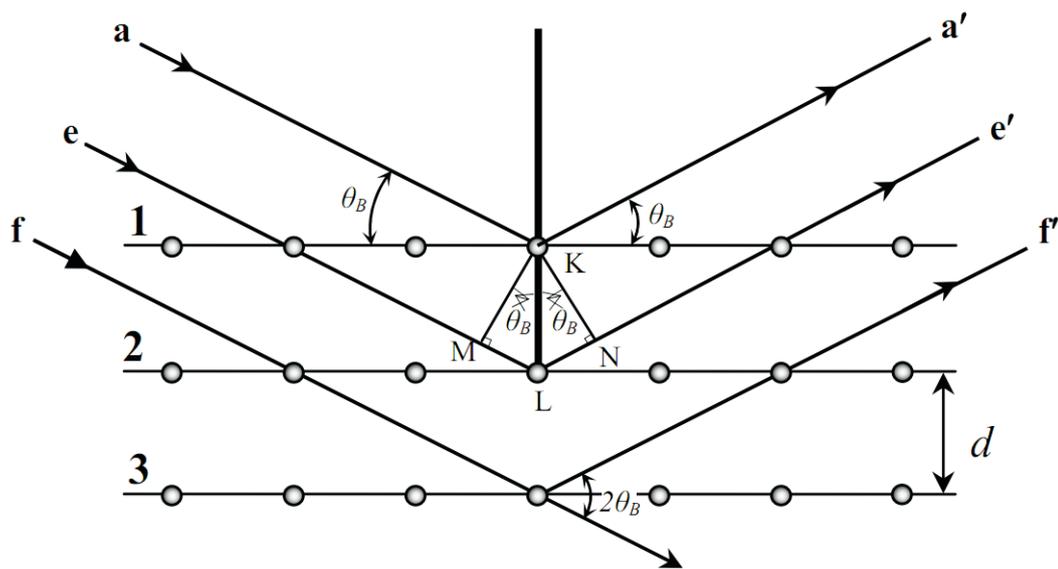
$n$  = múltiplo inteiro do comprimento de onda

O ângulo  $2\theta$  pode ser determinado sem dificuldade, pois  $2\theta$  é o ângulo formado pelo feixe incidente, ou pelo seu prolongamento, com o feixe difratado.

Na figura 2, o diagrama esquemático demonstra que sempre que o ângulo  $\theta_B$  (ângulo de Bragg) apresentar diferença de caminho óptico entre os feixes incidentes e difratados,  $a-1-a'$  e

e-2-e', distância MLN, for igual a um número inteiro  $n$  de comprimento de onda  $\lambda$  haverá interferência construtiva. Esta condição define a lei de Bragg. Assim, é possível relacionar os espaçamentos de rede  $dhKL$  (onde  $h, K, L$  são os índices de Miller) com a distância MLN pela equação de Bragg (SCHETTINO JÚNIOR, 2009).

Figura 2 - Representação da difração de raios X por um cristal.



Fonte: Schettino Junior (2009).

O uso de sistemas computacionais para a identificação dos difratogramas obtidos em DRX é bastante comum. Estes difratogramas, que são os gráficos de intensidade por ângulo de difração, identificam as amostra através da comparação desses com fichas catalogadas, como o arquivo ICDD-JCPDS (*International Centre for Diffraction Data - Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) (FREITAS, 2009).

### 3.4.2. Microscopia eletrônica de varredura

Embora a DRX seja uma técnica de caracterização indispensável, em alguns casos ela depende de informações como a composição dos elementos químicos e a morfologia física da amostra. Essas informações podem ser obtidas, simultaneamente, pela espectroscopia de fluorescência de raios X e Microscopia Eletrônica de Varredura (LIMA, 2010).

Fundamentalmente, o microscópio eletrônico de varredura é um microscópio que utiliza elétrons em vez de luz para formar imagens tridimensionais da superfície. A versatilidade da MEV se encontra na possibilidade da captação e medida das diversas radiações provenientes das interações elétron-amostra. Estas interações podem revelar informações da natureza da amostra incluindo composição, topografia, morfologia (LIMA, 2010).

A MEV produz imagens de uma amostra por varredura de um feixe de elétrons sobre a superfície da amostra que irá resultar em outras radiações como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados, raios X. A captação dessas radiações gera sinais que contêm informações sobre a topografia da superfície da amostra, composição e outras propriedades (DIAS, 2011; VIANA, 2011).

A MEV é útil na análise microestrutural de materiais sólidos. Embora exista a complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de fácil interpretação.

A maior resolução conseguida pelo microscópio eletrônico de varredura fica entre o microscópio ótico (MO) e o microscópio eletrônico de transmissão. A grande vantagem do microscópio eletrônico de varredura em relação ao MO é sua resolução e perfil de profundidade, na ordem de 2 a 5 nm (20 - 50 Å). (DIAS, 2011).

### **3.4.3. Microscopia eletrônica de transmissão**

Na Microscopia Eletrônica de Transmissão um canhão gera um feixe de elétrons de alta energia que, guiado por um conjunto de lentes magnéticas, incide sobre a amostra. Assim, os feixes transmitidos e difratados, são recombinados na construção da imagem que é projetada na tela do microscópio e capturada por uma única câmara digital, tendo projeções bidimensionais (ALVES, 2007). Desta maneira fornece imagem com maior ampliação visualizando cada partícula.

A vantagem do TEM frente às demais técnicas está na capacidade de observação de dois pontos separados por uma dada distância, e assim, quanto menor a distância que o microscópio conseguir distinguir entre dois pontos, maior será a resolução do equipamento, ou seja, o poder de resolução (FREITAS, 2011). É uma das técnicas mais adequadas quando se deseja obter imagem direta da NP (BEDÊ, 2010).

### 3.5. Comportamento magnético

Dentre todas as propriedades físicas da matéria, o comportamento magnético (magnetização de saturação, energia de anisotropia, temperatura de ordenamento magnético, transição de fases magnéticas e cristalinas) talvez seja o que desperta o maior interesse científico e tecnológico. Assim, por conta das peculiaridades que o comportamento magnético adquire quando observado nas NPs magnéticas, essas constituem uma classe de materiais que merecem uma especial atenção (SCHETTINO JÚNIOR, 2009).

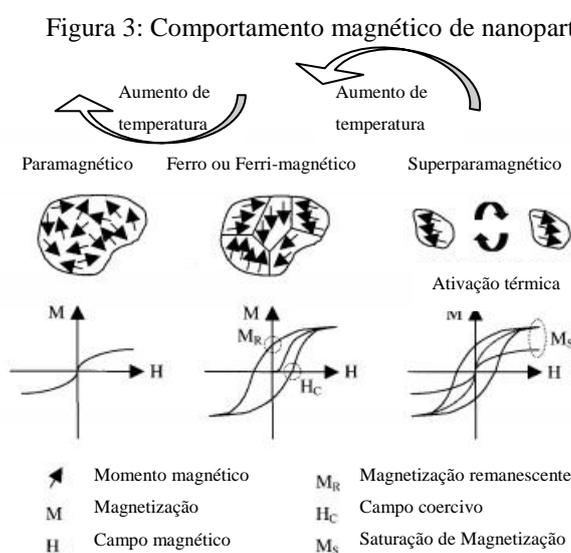
As propriedades magnéticas dos materiais estão relacionadas principalmente ao comportamento dos spins. O comportamento magnético de diferentes materiais pode ser classificado como diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo e superparamagnetismo (figura 3), além do antiferromagnetismo e ferrimagnetismo. Materiais diamagnéticos não possuem um momento de spin, mas possuem um momento orbital. Esse comportamento se justifica pelo fato dos elétrons apresentarem uma tendência a se agruparem em pares com spins orientados em direções opostas, sabendo que cada par tem um spin total nulo, consequentemente a maior parte dos átomos com número par de elétrons possui um spin total nulo fazendo com que o campo de indução magnética seja oposto ao campo externo, resultando em uma repulsão deste campo externo. Materiais paramagnéticos possuem elétrons desemparelhados e ordenados aleatoriamente, alinham-se quando expostos a um campo magnético externo (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006; SILVA, 2008; VENDREAME, 2011; VO-DINH, 2007).

Os ferromagnéticos têm seus elétrons desemparelhados e geralmente apresentam magnetização diferente de zero (SILVA, 2008). Reagem fortemente a um campo magnético externo, possuem estrutura organizada de domínio magnético e um estado de magnetização uniforme (VO-DINH, 2007). Sua orientação é aleatória, porém, quando expostos a um campo magnético tendem a se alinhar conforme este e, após o desligamento do campo, observa-se uma magnetização remanescente. Novamente, para conseguir uma aleatoriedade, mais energia deve ser fornecida através de um campo magnético externo de direção oposta, um campo coercivo, voltando à magnetização nula (figura 3) (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006).

Dependendo do tamanho da partícula, a energia térmica pode ser suficiente para que o momento magnético oscile em diferentes direções, assumindo um comportamento superparamagnético, com maior magnetização. Isso pode ser definido pela estrutura da partícula e forma da superfície (figura 3) (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006; LAN *et al.*, 2011; VO-DINH, 2007; YUAN *et al.*, 2010).

A ferrita de cobalto é uma estrutura de espinélio mista. O comportamento superparamagnético é atribuído em razão do tamanho da maioria das partículas, que deve ser muito pequeno para manter propriedades ferromagnéticas (NLEBEDIM *et al*, 2010; XIAO *et al*, 2010).

Materiais abaixo de 20 nm não retêm a magnetização devido à falta de um único domínio, no entanto são responsivos a um campo magnético. O tamanho crítico é 10 nm para o material estar numa condição superparamagnética e não mais ferromagnética (GUPTA, KOMPELLA, 2006; XIAO *et al*, 2010; YUAN *et al*, 2010).



Adaptado de Hafeli, Chastellain (2006, p. 399)

O tamanho, a composição, via de síntese de NPs magnéticas é determinante para o uso da NP. Embora partículas superparamagnéticas, ferro e ferrimagnéticas, podem ser utilizadas para transporte de fármacos, NPs superparamagnéticas são favoráveis para aplicações biomédicas devido seu comportamento não magnético quando na ausência da aplicação de um campo magnético externo, evitando assim sua aglomeração (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006).

### 3.5.1. Magnetômetro de amostra vibrante

O desempenho magnético de um sistema composto de NPs é condicionado às propriedades físicas individuais de cada partícula e do ambiente em que está inserida. Entre as mais importantes características físicas estão o tamanho, a distribuição de tamanho e a morfologia das partículas, parâmetros intrínsecos dos materiais (anisotropia magnetocristalina e magnetização de saturação, entre outras), interação superfície/interface, etc. (SCHETTINO JÚNIOR, 2009).

O magnetômetro de amostra vibrante (VSM) é um instrumento científico que mede propriedades magnéticas sendo amplamente utilizado nos laboratórios de pesquisa devido seu bom desempenho, simplicidade funcional e baixo custo operacional (DIAS, 2011; FREITAS, 2009).

De forma geral, um magnetômetro é formado por um conjunto de equipamentos usados para medir o momento magnético de uma amostra para um determinado valor de campo aplicado.

Os componentes básicos de um magnetômetro são:

- Fonte de corrente;
- Eletroímã;
- Sensor de campo magnético;
- Sistema para movimentação da amostra;

Se uma amostra de qualquer material é submetida a um campo magnético uniforme, criado entre os polos de um eletroímã, um momento de dipolo será induzido. Se a amostra vibra senoidalmente, uma corrente elétrica senoidal pode ser induzida em bobinas adequadamente posicionadas. O sinal tem a mesma frequência da vibração e sua amplitude será proporcional ao momento magnético e posição relativa ao sistema de bobinas. Através da medição do campo, é possível obter a curva de histerese do material (DIAS, 2011).

### 3.6. Aplicações das nanopartículas magnéticas

Com a dispersão estável de NPs magnéticas em água ou álcool há oportunidade de várias aplicações biomédicas, tornando viável seu uso como agentes de contraste em IRM

(AVDEEV *et al*, 2010; FERGUSON *et al*, 2009; KIM *et al*, 2008; SCHLORF *et al*, 2011), carreadores de fármacos guiados por campo magnético (KIM *et al*, 2008; YUAN *et al*, 2010) tratamento de tumores via hipertermia (KIM *et al*, 2008; THASSU *et al*, 2007; VO-DINH, 2007), separação biomolecular magnética e para diagnósticos (FERGUSON *et al*, 2009).

A utilização de NPs para carreamento de fármacos com o intuito de melhorar a administração, a eficácia e reduzir os efeitos colaterais cresceu muito nos últimos anos, tanto na pesquisa farmacêutica quanto clínica. Um sistema de liberação de fármacos deve possuir a capacidade de direcionamento e o controle deste. Os parâmetros que trazem benefícios para sua utilização e eficácia terapêutica incluem intervalos prolongados para administração, redução da toxicidade, dosagem reduzida e maior adesão, além do aumento da atividade e estabilidade do fármaco (FERRARI, 2008; GUPTA, KOMPELLA, 2006; THASSU *et al*, 2007).

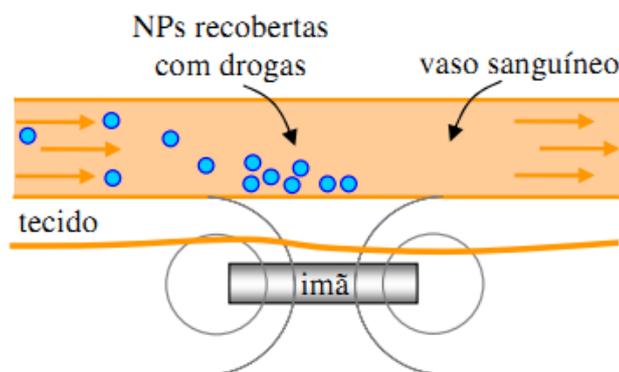
Em contraste com micropartículas, NPs são suficientemente pequenas para evitar embolia, podendo ser administradas via endovenosa (GUPTA, KOMPELLA, 2006). Os sistemas de entrega de fármacos por NPs devem ter algumas características como longa circulação no sangue, permanecendo assim por longo período no organismo, direcionamento para alvos através de mecanismos específicos (como ligantes na superfície) e não específicos, uso de revestimentos, capacidade de penetrar no interior das células evitando degradação lisossomal, retenção nos tecidos, resposta a estímulos do sitio patológico específico (pH, temperatura, aplicação de um campo externo magnético ou ultrassom), liberação intracelular do medicamento, sistemas que possuem interesse em pesquisa (FERRARI, 2008; HAFELI, CHASTELLAIN, 2006; THASSU *et al*, 2007).

As vantagens oferecidas por esses sistemas incluem proteção contra degradação da droga, direcionamento para liberação em alvos específicos, aumento da biodisponibilidade, redução da dose, redução de efeitos colaterais, liberação prolongada. Um dos desafios é o equilíbrio entre toxicidade e efeito terapêutico (THASSU *et al*, 2007).

Para conferir aumento de estabilidade e biocompatibilidade, as NPFC's também podem ser revestidas com diferentes materiais como sais metálicos, demonstrando assim diferente comportamento biológico (GUGLIELMO *et al*, 2010).

Ainda, NPs superparamagnéticas são úteis no direcionamento da liberação de fármacos, utilizando pulsos eletromagnéticos (GUPTA, KOMPELLA, 2006), conforme esquema da figura 4.

Figura 4: Esquema demonstrando carreamento de fármacos utilizando nanopartículas magnéticas e um gradiente externo de campo magnético.



Fonte: Alves, (2007)

Apesar de avanços na compreensão do metabolismo do câncer o problema de direcionamento de quimioterápicos continua sendo um desafio. Muitos agentes antineoplásicos possuem estreita margem terapêutica de segurança, causando efeitos colaterais sistêmicos. O uso de NPs no direcionamento desses fármacos, com maior especificidade para o tecido tumoral através da aplicação de um campo magnético externo, contribui na redução da dose e dos efeitos indesejáveis, menos efeitos tóxicos, direcionamento altamente eficaz e segurança do índice terapêutico (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006; THASSU *et al*, 2007; TOMITAKA *et al*, 2009).

Através da excitação magnética, as NPs magnéticas tornam-se aquecidas, o calor gerado através desta depende de propriedades da NP bem como da frequência e amplitude do campo ( KIM *et al*, 2008). A hipertermia gerada favorece a destruição de células neoplásica, oferecendo assim, terapia múltipla em uma única partícula no tratamento de neoplasias (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006; KASHEVSKY *et al*, 2008; KIM *et al*, 2008; THASSU *et al*, 2007).

Já foram realizados experimentos em ratos com tumores, tratados por hipertermia induzida por um campo magnético, através da administração de NPFC's, por via subcutânea e oral, com aquecimento até 43° C, demonstrando não haver efeito tóxico no local das aplicações subcutâneas após 60 dias e nem a presença das NPs no estômago (KASHEVSKY *et al*, 2008).

A inoculação intratumoral de fármacos antitumorais por partículas magnéticas possui a vantagem de atingirem maior concentração no tumor com menores doses de fármacos. Porém, se o local for de difícil acesso, a administração de fármacos, ligados a transportadores

magnéticos pela circulação sanguínea, requer aumento da dose para compensar a perda do material (fígado, baço, sistema de macrófagos), o que pode induzir um efeito tóxico (SINCAI *et al*, 2001).

A possibilidade de endocitose das NPs magnéticas e a obstrução dos vasos que elas podem ocasionar dificulta a liberação dos fármacos em tecidos específicos. No entanto, as NPs também podem dificultar o recebimento de nutrientes pelos transportadores de membrana e ocasionar lise celular, auxiliando na terapia contra o câncer (SINCAI *et al*, 2001).

O direcionamento de fármacos utilizando NPs magnéticas como carreadores pode ser utilizado em: antibacterianos, anti-inflamatórios, antiartríticos, fármacos para dissolução de coágulos, entre outros (HAFELI, CHASTELLAIN, 2006).

Um importante requisito das NPs, além da capacidade de direcionamento à tecidos específicos, é evitar a retenção por filtros biológicos, como o sistema retículo endotelial (SRE) (THASSU *et al*, 2007).

Do ponto de vista magnético, as partículas com forte reação magnética são desejáveis. O cobalto atinge este objetivo, mas sua toxicidade é uma desvantagem. Para prevenir ou minimizar esse efeito o encapsulamento é ideal, como o feito por sílica. O revestimento deve ser por material biocompatível e ser o mais esférico possível (GUGLIELMO *et al*, 2010; HAFELI, CHASTELLAIN, 2006).

NPs de óxido de ferro são rapidamente internalizadas por fagocitose, para que possuam estabilização em solução e redução na absorção geralmente são revestidas por dextran. Pela característica de rápida internalização de magnetita elas são bem adaptadas para marcação ou monitoramento de células fagocíticas úteis em tumores e em células endoteliais. Quando a NP é utilizada para captação de imagem a permanência desta no interior da célula é um critério importante (SCHLORF *et al*, 2011).

Os macrófagos são o compartimento central do SRE ou mononuclear fagocitário, sendo assim, NPs entregues no organismo, *in vivo*, via sistêmica ou em um compartimento, serão interceptadas pelo SRE, pois são corpos estranhos a serem fagocitados e, se este for ativado, ocorrerá formação de espécies reativas de oxigênio, fenômeno do estresse oxidativo. Dessa maneira, os testes com macrófagos são importantes para avaliação da toxicidade. Estudos com NP de óxido férrico superparamagnético frente macrófagos, *in vitro*, em concentrações de 25 µg/mL por 3 horas mostram 100% de viabilidade e após 6h 95% de viabilidade (NAQVI *et al*, 2010).

Não há relatos de possível mudança química das NPs ao penetrarem em compartimentos celulares diferentes. Testes de citotoxicidade realizados com NPFC's em

células Balb/3T3, por 24h com diferentes concentrações (entre 10 e 1000 µg/mL), demonstraram viabilidade de 95% (na menor concentração) a 80% (maior concentração). A determinação de cobalto indicou captação aumentada em função do aumento de concentração e tempo de exposição. Pesquisa da localização intracelular de ferrita de cobalto mostrou sua presença principalmente no plasma e em região peri nuclear. Acima de certo limite de concentração, o plasma e a membrana tornam-se mais vulneráveis permitindo fácil penetração da NP. O dano celular ocasionado por sobrecarga de NPFC's resultou em alterações na morfologia, possível stress oxidativo, inflamação e citotoxicidade. No entanto, as células são capazes de captar grande quantidade de NPs, mantendo sua viabilidade. Ferro e cálcio também foram dosados, estando elevados, evidenciando desenvolvimento possível de um processo de defesa e de morte celular (MARMORATO *et al*, 2011).

### 3.7. Avaliação da toxicidade

De acordo com a definição dada pela Sociedade Americana de Testes e Materiais, NPs possuem tamanho que variam de 1 a 100 nm em duas ou três dimensões. São estruturas promissoras para serem utilizadas no direcionamento de fármacos e sistemas de diagnóstico. Porém, sua avaliação representa um grande desafio devido às características físico-química, cinéticas e por seus efeitos tóxicos em grande parte desconhecidos (GUGLIELMO *et al*, 2010).

A redução no tamanho das NPs melhora sua biodisponibilidade, mas também aumenta a reatividade das partículas, o que representa um perigo potencial para a saúde. Compreender as propriedades das NPs e seus efeitos é fundamental antes de qualquer uso clínico o que requer esforços multidisciplinares para desenvolvimento adequado de metodologia através da implementação de instrumentos complementares para caracterização físico-química relevantes das NPs e avaliação dos processos bioquímicos que ocorrem nas células (MARMORATO *et al*, 2011).

Para que NPs de óxido de ferro superparamagnéticas possam ser utilizadas em aplicações *in vivo* é fundamental conhecer o limite de segurança, sendo necessários estudos mais elaborados para avaliar os efeitos dependentes da concentração de NP sobre a função celular e sua toxicidade (KASHEVSKY *et al*, 2008; NAQVI *et al*, 2010).

No final dos anos 80 iniciaram-se estudos do impacto das partículas nanométricas na saúde. NPs podem apresentar comportamento biológico único mesmo quando as propriedades

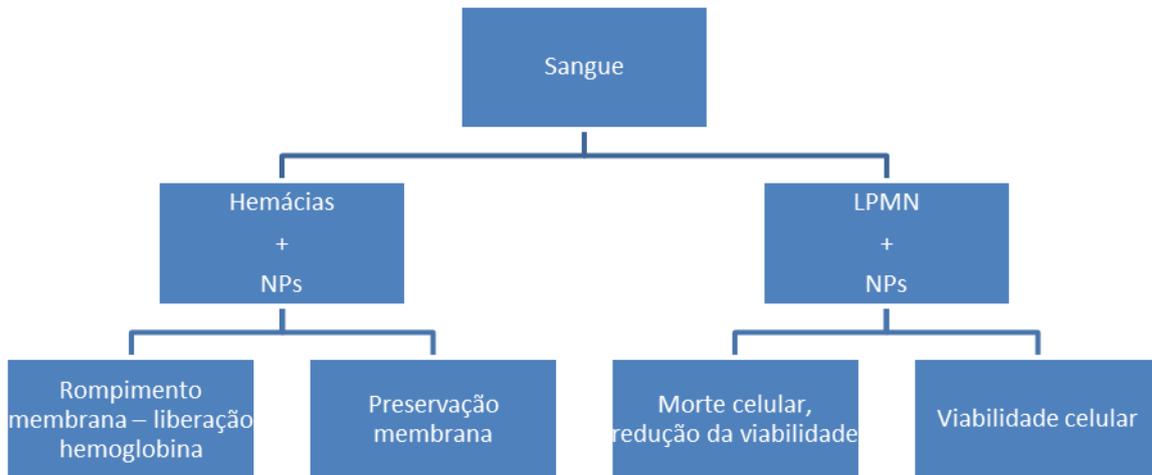
físicas e químicas permanecerem inalteradas em relação às partículas maiores, pois elas podem atravessar barreiras e membranas impermeáveis às partículas maiores. É importante antecipar, reconhecer, avaliar e controlar os riscos que envolvem o tamanho das partículas, forma, funcionalidade, concentração, frequência e duração à exposição, protegendo assim pesquisadores da área de saúde, trabalhadores da produção e usuários (MONTEIRO, TRAN, 2007).

Para avaliação toxicológica devem ser considerados diferentes parâmetros como tamanho das partículas, forma, superfície, estrutura química, entre outros. Requer uma abordagem interdisciplinar, envolvendo aspectos que vão desde a física, química, biologia até a medicina. Considerando mobilidade no corpo, via de penetração, tamanho, área superficial, reatividade e estrutura química das NPs (GUGLIELMO *et al*, 2010; GUPTA, KOMPELLA, 2006; MONTEIRO, TRAN, 2007).

Para avaliação de risco no uso de NPs, como dose, local de ação, via de administração, são necessários estudos farmacocinéticos. Ampliar os conhecimentos sobre sua absorção, distribuição, metabolização e eliminação com base no SRE, além do risco de aglomerações, produzindo grandes partículas, antes e após absorção podendo ocorrer deposição em tecidos. Quanto menor a partícula, maior a capacidade de resposta inflamatória e geração de espécies reativas de oxigênio a nível pulmonar. Sendo assim é essencial o desenvolvimento de modelos de toxicidade e rastreio *in vivo* e *in vitro* para desenvolvimento seguro da nanotecnologia (MONTEIRO, TRAN, 2007).

Algumas células podem ser utilizadas como determinantes na toxicidade de fármacos e outros compostos. O sangue humano possui vários tipos celulares com propriedades estruturais e metabólicas bem particulares, sendo um tecido importante na avaliação de estudos farmacológicos e toxicológicos, parâmetro para avaliação de riscos. (SANTOS, 2009). Quando ocorre lesão na membrana das hemácias há liberação de hemoglobina, a qual é um importante marcador na avaliação de citotoxicidade (figura 5) e de fácil dosagem.

Figura 5: Diagrama esquemático de ensaios de citotoxicidade em hemácias e leucócitos polimorfonucleados.



Um ensaio amplamente utilizado na verificação de viabilidade celular é o de Azul de Trypan. Ele é utilizado para determinar lesão na membrana do LPMN, células sanguíneas que em geral são obtidas em grande quantidade facilmente. As células mortas, que estão inviáveis, são coradas, demonstrando seu dano, inviabilidade (SANTOS, 2009).

Para a possível aplicação *in vivo* de NPFC's, estas devem ser compatíveis com o sistema biológico, desta forma, o modelo animal é importante na avaliação dos possíveis efeitos causados pela administração de NPFC's. As dosagens de marcadores bioquímicos auxiliam no diagnóstico e monitoramento de lesões causadas em órgãos específicos. Sendo assim, foram utilizadas análises de alguns marcadores para avaliação de possível dano hepático através das dosagens de FAL, AST, ALT e possível dano renal dosando creatinina e uréia.

A FAL encontra-se presente em praticamente todos os tecidos corporais, no entanto, ocorre em níveis particularmente elevados no epitélio intestinal, túbulos renais, ossos, leucócitos, fígado e placenta. Elevações leves ou moderadas são observadas em distúrbios do parênquima hepático, entre outras situações. Da mesma maneira, ALT e AST, são dosadas para avaliação de dano celular no parênquima hepático (MILLER, GONÇALVES, 1999).

A creatinina é produzida nas células a partir do catabolismo da creatina (componente de alto conteúdo energético). O processo ocorre em grande parte nas células musculares, a creatinina é então liberada ao plasma para ser posteriormente filtrada nos glomérulos e excretada na urina, sendo sua determinação importante na avaliação da função renal. A

medida da uréia constitui um recurso amplamente utilizado para avaliação da função renal, no entanto podem ocorrer alterações nas concentrações séricas por condições não renais (OLIVEIRA, 2003).

Propriedades tóxicas frente diversos tipos de células, estabilidade, biodistribuição, excreção, estão entre os estudos realizados com diversas NPs. Experimentos com NPs magnéticas, como magnetita, frente células cancerosas, *in vitro*, mostraram alta estabilidade, elevada incorporação, o que dependente da linhagem celular em estudo (AVDEEV *et al*, 2010).

Estudos *in vitro*, de citotoxicidade com cultura de células HeLa expostas a diversas concentrações de NP magnéticas de magnetita, ferrita de níquel e ferrita de zinco, demonstraram adesão à superfície bem como internalização, resultado da endocitose e acúmulo em vacúolos digestivos, sendo a toxicidade provavelmente causada por sobrecarga da partícula. Quando estas partículas possuem revestimento como com o dextran ou outros polímeros há melhora na biocompatibilidade, porém NPs de vários ferritas possuem biocompatibilidade significativa mesmo sem revestimento (TOMITAKA *et al*, 2009).

Em experimento com NPFC's *in vitro* foi demonstrada baixa citotoxicidade das NPs frente cultura de células HeLa e linhagens L929, apresentando viabilidade acima de 80% após 24h em concentrações de 200 µg/mL (LU *et al*, 2011).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Síntese de nanopartículas de ferrita de cobalto

A técnica utilizada para síntese foi de química sol-gel para obtenção das NPs de óxidos mistos de ferro e cobalto, convencionalmente utilizada por outros grupos de pesquisa.

A síntese das NPs foi realizada no laboratório do Grupo de Desenvolvimento de Dispositivos Multifuncionais (GDDM) do Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá (UEM) utilizando-se um arranjo experimental simples composto por um agitador magnético, um béquer, termômetro de mercúrio e um suporte universal.

A massa dos reagentes foi calculada através das proporções molares de etilenoglicol: nitrato de ferro, fixadas em 20:1. E também da proporção Co: Fe = 1: 2. Os resultados foram colocados no quadro 1 a seguir.

Tabela 1: Massas dos reagentes de acordo com a proporção molar de Etilenoglicol: Nitrato de Ferro e Co:Fe

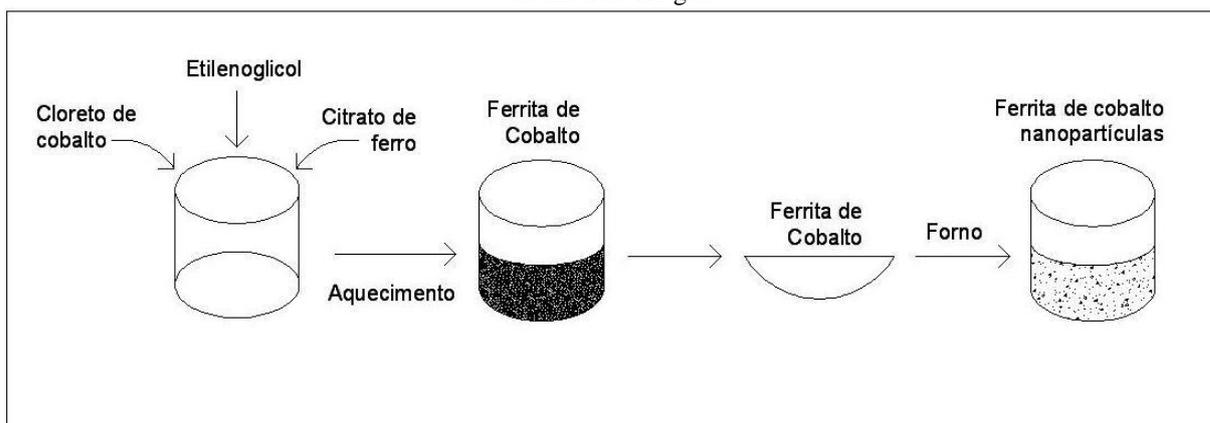
Proporção Molar	Massa dos reagentes (g)		
	Etilenoglicol $C_2H_6O_2$	Nitrato de ferro $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	Cloreto de cobalto $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
20	24,83	8,08	2,38
Peso Molecular (g/mol)	62,07	404,00	238,00

**Obs.:** a densidade do etilenoglicol é de 1,11 g/mL.

Primeiramente, mediu-se a massa de cada reagente numa balança analítica de acordo com a proporção molar de etilenoglicol 20:1, sendo considerada a relação com o cloreto de cobalto, de Co: Fe = 1: 2. As quantidades medidas foram colocadas no béquer juntamente com quantidades adequadas de etilenoglicol, que foi adicionado através de uma pipeta e de um pipetador. O béquer foi levado ao agitador magnético, e o termômetro preso ao suporte universal para maior controle da reação (figura 6). O procedimento foi realizado sob aquecimento, permanecendo entre 90° e 100° C, até mudar o aspecto líquido para um aspecto mais viscoso, parecendo um gel, 45 minutos. O produto obtido foi colocado em duas barquinhas de alumina que foram levadas a um forno tubular resistivo onde permaneceu por 2h. As temperaturas escolhidas para síntese foram 300°, 400° e 500° C. O aumento da

temperatura foi programado para 5° C a cada minuto e controlado através de um termopar. O tratamento térmico foi realizado sob atmosfera de argônio por ser uma atmosfera inerte e propícia para a formação do composto desejado. Após o resfriamento natural do composto, este foi pulverizado em um cadinho com um pistilo para desaglomerar. Realizou-se DRX, MEV e MET e, a caracterização magnética com a utilização de um VSM.

Figura 6: Demonstração esquemática dos compostos e procedimento utilizados para síntese de NPFC's através do método sol-gel.



## 4.2. Caracterização de nanopartículas de ferrita de cobalto

As determinações de DRX e a caracterização magnética foram realizadas nos laboratório do GDDM do Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e, as imagens de MEV e TEM foram realizadas no COMCAP (Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa), UEM.

### 4.2.1. Difratomia de raios X

Os pós obtidos foram analisados através da técnica de DRX, em um difratômetro SHIMADZU XRD 7000 (radiação Cu K $\alpha$ ). As análises das amostras de ferrita de cobalto em pó, sintetizada nas diferentes temperaturas, 300°, 400° e 500° C foram conduzidas com velocidades de varredura 2°/min, no intervalo de 10 a 80° e em temperatura ambiente.

As amostras de NPFC's foram colocadas em discos no difratômetro, em pó, receberam os feixes de raios X monocromáticos, sendo que a posição angular e intensidade dos picos difratados resultantes da radiação produziram um padrão de difração característico da

amostra. As posições dos picos obtidos nos difratogramas foram comparadas com os catalogados no ICDD-JCPDS, possibilitando a confirmação da fase, estrutura, das NPs.

#### **4.2.2. Magnetômetro de amostra vibrante**

Foi utilizado um aparelho construído no GDDM-UEM, com as especificações necessárias para determinação do comportamento magnético.

A amostra de NPFC's sintetizadas à 400° C (amostra melhor avaliada pela DRX, apresentando picos característicos da ferrita de cobalto), foi fixada na extremidade de uma haste rígida e esta, presa a um transdutor eletromecânico (tipo alto falante) que exerce sobre a amostra um movimento de vibração. Após, aplicou-se um campo magnético perpendicularmente a direção de vibração da amostra. Dessa maneira, a amostra magnética levou a uma variação de fluxo magnético nas bobinas coletoras. Quando esta amostra vibra a uma dada frequência, uma voltagem é induzida nas bobinas coletoras, exibindo o comportamento magnético.

#### **4.2.3. Microscopia eletrônica de varredura**

As imagens de MEV foram realizadas em um microscópio SHIMADZU SS-550 Superscan. A amostra, em pó de NPFC's sintetizada a 400° C, foi colocada em um equipamento de "Sputtering", que a recobriu com uma fina camada de ouro, tornando-a condutora. Dessa maneira, após incidência dos feixes de elétrons foi obtida a micrografia através do detector de elétrons secundários. As micrografias foram obtidas analisando a superfície das NPFC's sintetizadas a 400° C.

#### **4.2.4. Microscopia eletrônica de transmissão**

Para as imagens de TEM utilizou-se um microscópio JEOL TEM 1400 com canhão de Tungstênio em 120 KV. A amostra das NPFC's sintetizadas a 400° C foi suspensa em álcool etílico. Em seguida, uma pequena gota desta suspensão foi aplicada em uma grade de 300 Mesh de cobre recoberta com um filme de carbono (Roley) de 25 mm de espessura.

### **4.3. Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de ferrita de cobalto *in vitro***

#### **4.3.1. Avaliação da citotoxicidade sobre hemácias**

As coletas de sangue e o experimento de citotoxicidade *in vitro* foram realizados no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), aprovado pelo Comitê de Ética Humana, parecer nº 49553 de 29/05/2012.

Foram coletados 5 mL de sangue venoso, acondicionado em um tubo de ensaio com 20 µL de heparina (anticoagulante). Após, realizou-se centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm (Centrífuga Benfer) para separação do plasma e das hemácias. O sobrenadante, plasma, foi removido por aspiração cuidadosa, sendo acrescentado o mesmo volume de solução tampão salina (NaCl 0,85% 50mM, pH 7,4; PBS) ao concentrado, repetindo-se o processo citado anteriormente nas mesmas condições por três vezes.

O hematócrito foi determinado através de um tubo microcapilar, centrifugado em microcentrífuga por 5 minutos a 2500 rpm (Centrífuga Micro Spin Haematocrit), separando assim hemácias e plasma. O volume globular foi ajustado para 5%, através da diluição das hemácias em 50mL solução tampão (NaCl 0,85% 50mM, glicose 6 mM, pH 7,4), adicionado de 10 µL de solução de penicilina 30 mg/mL e 10 µL de solução de estreptomicina 50 mg/mL.

Para realização desse experimento foram utilizadas diferentes concentrações de NPFC's suspensas em PBS, no experimento, adicionou-se 980 µL do concentrado de hemácias e 20 µL da solução de NPFC's, no ensaio controle, adicionou-se 980 µL do concentrado de hemácias e 20 µL de PBS. Os tubos foram incubados à 37° C (Estufa Quimis) em constante agitação a 150 rpm (Homogenizador de sangue AP2 Phoenix). Após 24h de incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos em 4000 rpm, e realizou-se a leitura da absorbância do sobrenadante (Espectrofotômetro Spectra Max), para determinação da hemoglobina liberada. A citotoxicidade sobre as hemácias é proporcional à quantidade de hemoglobina liberada.

#### **4.3.2. Avaliação da citotoxicidade sobre leucócitos polimorfonucleados**

Foram coletados 5mL de sangue venoso acondicionado em um tubo de ensaio com 10 µL de heparina (anticoagulante), adicionados 2mL de dextran 2% (preparado em solução salina 0,85%). Esta solução foi mantida em estufa por 15 minutos à 37° C (Estufa Quimis) com inclinação de 45°, para precipitação e separação das hemácias e dos LPMN, que migraram para a superfície. Após cuidadosa aspiração dos LPMN, foi realizada centrifugação por 10 minutos à 2500rpm (Centrífuga Benfer), sendo os LPMN depositados, formando pellets. A solução de Turk foi utilizada para promover a lise celular das hemácias e plaquetas, facilitando a observação dos LPMN na câmara de Neubauer para contagem (HAPNER *et al*, 2010, BRUGIN, 2007).

Para determinação da viabilidade, o concentrado de LPMN foi incubado em microplacas, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de uma suspensão de NPFC's por 6 horas à 37° C em constante agitação a 150 rpm (Incubadora com agitação orbital QUIMIS Q816M20). Após 6 horas, iniciou-se a contagem dos LPMN em câmara de Neubauer, utilizando Azul de Tripán 1,5%. Os LPMN que incorporaram o corante, em azul, foram contados como células inviáveis, sofreram dano na membrana na presença da suspensão de NPFC's, e as que não incorporaram o corante, contadas como células viáveis, não sofreram dano, dessa maneira calculou-se a viabilidade celular em percentual.

#### **4.4. Avaliação da toxicidade de nanopartículas de ferrita de cobalto *in vivo***

Neste experimento, foram utilizados 36 camundongos albinos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), 18 fêmeas e 18 machos adultos (de aproximadamente 60 dias de vida e 45g de peso). Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais, parecer 020/2012, ofício nº 032/2012 de 05/07/2012 da UNICENTRO.

Os animais foram mantidos em caixas individuais de polipropileno, sob condições de temperatura (20°- 23°) e ciclo de claro e escuro controlados, com livre acesso a ração e a água, na FADEP – Faculdade de Pato Branco, separados em seis grupos, três grupos de camundongos machos e três grupos de camundongos fêmeas, cada grupo com n=6.

Antes do início do experimento os animais passaram por um processo de ambientação de sete dias. O grupo 1 dos camundongos machos, controle, recebeu um solução salina 0,9%

estéril. O grupo 2 de machos recebeu a suspensão NPFC's na dose de 1 mg/Kg e, o grupo 3 recebeu a suspensão de NPFC's na dose de 5 mg/Kg. Este mesmo procedimento foi realizado para o grupo dos camundongos fêmeas.

A administração, via gavagem, da salina estéril 0,9% e as diferentes soluções de NPFC's ocorreu em dose única diária, durante sete dias, sempre no mesmo horário, de acordo com o peso de cada animal.

#### **4.4.1. Avaliação de marcadores bioquímicos**

No oitavo dia, os animais foram anestesiados, com xilazina e ketamina. Após, as amostras de sangue foram coletadas via punção cardíaca para dosagem de creatinina, uréia, AST, ALT e FAL. Devido quantidade reduzida de amostra obtida e da ocorrência de hemólise no grupo de camundongos fêmeas optou-se por não determinar AST e ALT neste grupo, priorizando as demais dosagens. O sangue coletado foi acondicionado em tubos de ensaio sem anticoagulante para obtenção do soro. As análises foram realizadas através do método cinético em aparelho automatizado (BS-200 MINDRAY), utilizou-se kit Dialab<sup>®</sup>.

#### **4.4.2. Avaliação histológica**

Ao término da coleta, ocorreu o procedimento de eutanásia através do deslocamento cervical. Em seguida, os camundongos foram colocados sobre um campo operatório e, utilizando-se um bisturi, realizou-se incisão frontal, reta, e procedeu-se a retirada do fígado, baço e rins.

Em seguida, os órgãos coletados foram colocados em recipientes com solução de formol a 10% e tampão fosfato (pH 7,0). As análises foram realizadas no laboratório Histocenter, em Guarapuava/PR, onde confeccionaram as lâminas para análise histológica. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina/eosina (HE), analisados e fotografados em um microscópio.

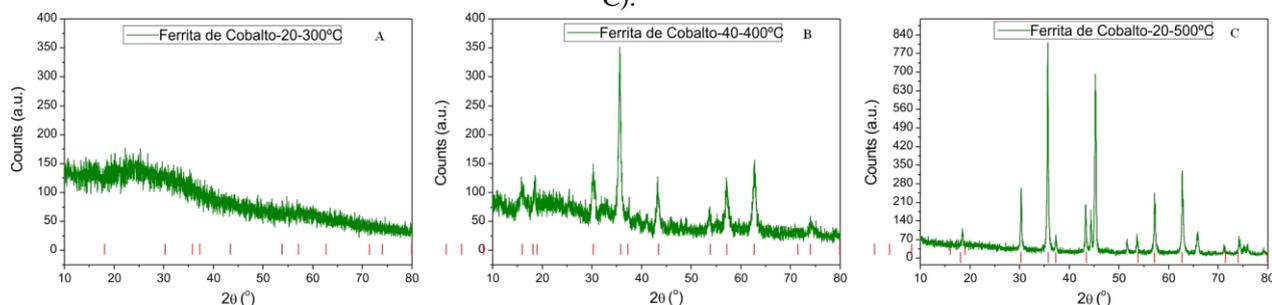
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização de nanopartículas de ferrita de cobalto

#### 5.1.1. Difração de raios X

A difratografia, através da incidência de raios X, revela informações de estrutura ou fase das NPs e do tamanho de cristalino. A boa definição dos picos de difração da amostra pode confirmar que o método utilizado para a obtenção da NPFC em questão é válido.

Figura 7: Difratoograma de raios X nas diferentes temperaturas de síntese de NPFC's (A-300°, B-400° e C-500° C).



Conforme se observa na figura 7 A, as NPs produzidas na temperatura de 300° C, demonstraram formação de partículas muito pequenas, dificultando desta maneira a caracterização da composição dessas NPs, assim não se pode afirmar a presença de ferrita de cobalto, sendo esta NP não utilizada nos experimentos.

Na amostra de ferrita de cobalto sintetizada na temperatura de 400° C (figura 7 B) os picos obtidos, comparados com os padrões do ICDD-JCPDS das fases de identificação mostram que foram identificados picos de difração característicos de ferrita de cobalto na amostra, junto com outros pequenos picos, os quais podem ser relacionados com a formação de um óxido metálico, portanto, não é possível garantir que seja a única fase presente. Na amostra de NPFC's, obtida na temperatura de 500° C (figura 7 C), ocorreu grande formação de outros óxidos metálicos, que não eram de interesse.

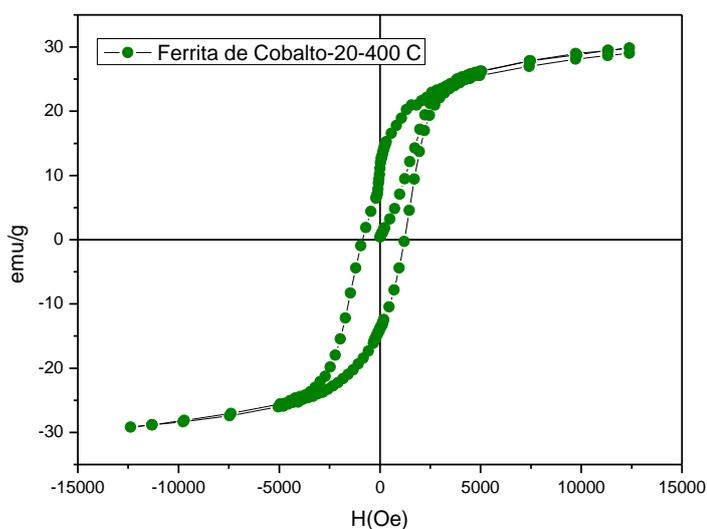
Dessa maneira, as NPFC's utilizadas para os testes *in vitro* e *in vivo* foram aquelas sintetizadas a 400° C, por apresentarem menor quantidade de fases espúrias, garantindo a presença de ferrita de cobalto através da análise da difratometria, pois informações sobre a

estrutura cristalina da NP é de grande importância na avaliação do aspecto biocompatibilidade/toxicidade.

### 5.1.2. Magnetômetro de amostra vibrante

Nas caracterizações magnéticas as NPFC's sintetizadas a 400° C foram analisadas utilizando-se de um VSM, obtendo-se as curvas de histerese apresentadas na figura 8, a qual garante a propriedade magnética da NPFC, ou seja, apresenta magnetização, superposição de comportamento de materiais ferrimagnético com superparamagnético, já que os tamanhos variam entre 30 e 100 nm.

Figura 8: Demonstração da curva de histerese característica de materiais magnéticos.

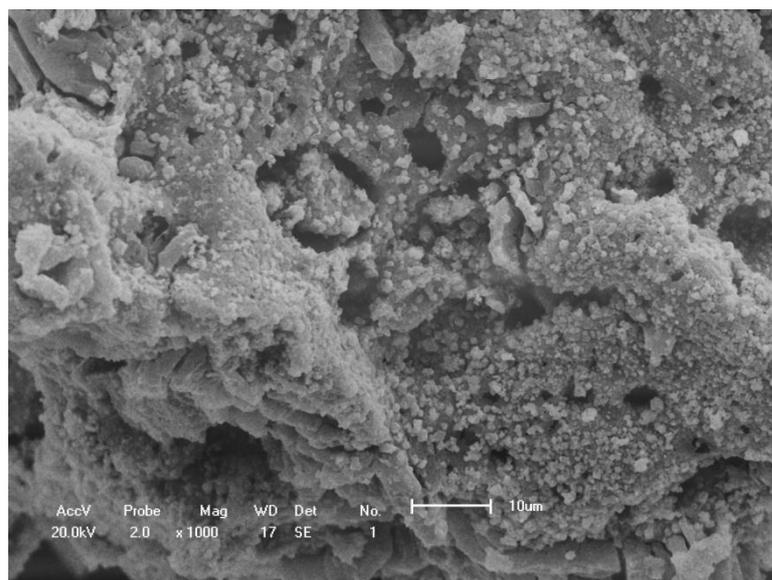


### 5.1.3. Microscopia eletrônica de varredura

Através da incidência de feixes de elétrons, sobre as NPFC's, devidamente preparadas, em menor ampliação, forma-se uma imagem geral das NPs, MEV.

Na micrografia de NPFC's sintetizadas à 400° C (figura 9), imagem tridimensional da superfície de NPFC's, observa-se morfologia homogênea na forma de aglomerados de NPFC's.

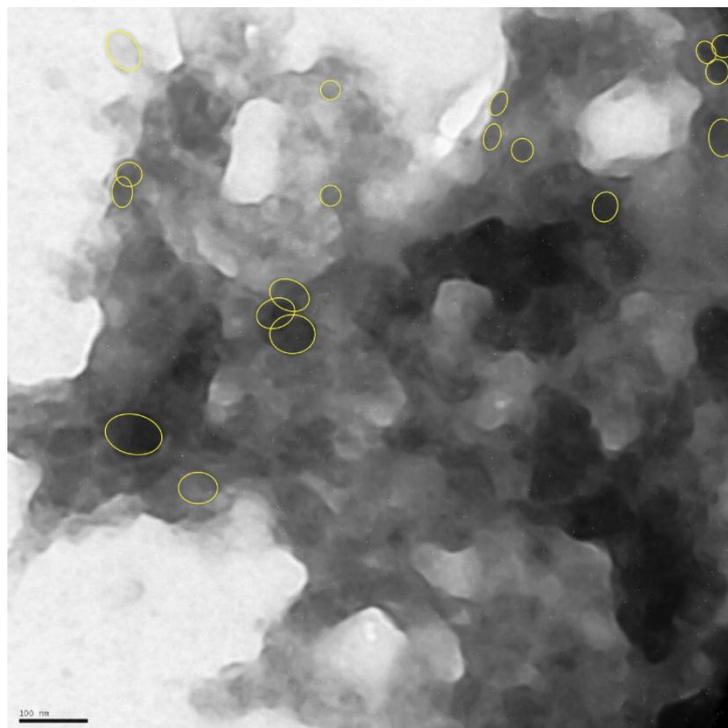
Figura 9: Micrografia da microscopia eletrônica de varredura, escala de 10 nm.



#### 5.1.4. Microscopia eletrônica de transmissão

Na micrografia (figura 10), observa-se que as NPFC's possuem forma aproximadamente esférica, são homogêneas, porém com tendência a aglomeração e distribuição de tamanho entre 30 e 100 nm, o que permite o comportamento superparamagnético. As imagens da micrografia de NPFC's são condizentes com o esperado através do processo de síntese sol-gel.

Figura 10: Micrografia da microscopia eletrônica de transmissão, escala de 100 nm.



A confirmação da composição de NPFC's, do tamanho, do formato, das características magnéticas de NPFC's são parâmetros fundamentais para avaliar biodisponibilidade, eliminação e grau de biocompatibilidade das NPs, sendo essencial à determinação desses aspectos para testes *in vitro* e ou *in vivo*.

## 5.2. Avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de ferrita de cobalto *in vitro*

### 5.2.1. Avaliação da citotoxicidade sobre hemácias

Este ensaio baseou-se na determinação da hemoglobina liberada no sobrenadante após 24h de incubação e posterior centrifugação. O efeito citotóxico de NPFC's sobre as hemácias foi avaliado a partir da quantidade de hemoglobina liberada na amostra frente às diferentes concentrações de NPFC's (0,02, 0,01, 0,005 e 0,0025 mg/mL concentrações finais). A leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de 540 nm.

A figura 11 demonstra o perfil de liberação da hemoglobina na ausência ou na presença da suspensão de NPFC's. Na ausência da suspensão de NPFC's, no tubo controle, o

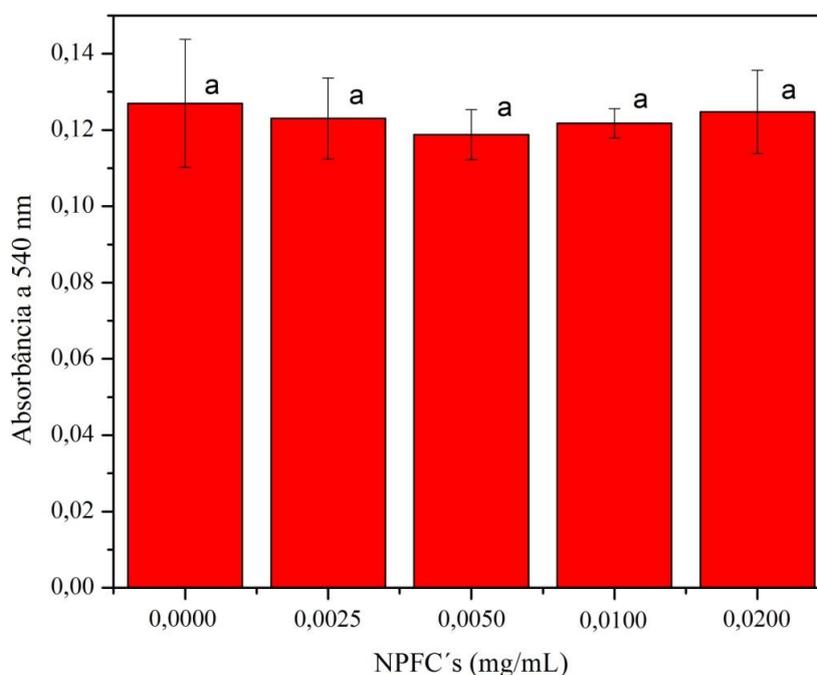
valor absorvância foi de aproximadamente 0,125. Na presença de diferentes concentrações da suspensão de NPFC's as leituras de absorvância foram semelhantes ao controle demonstrando que neste ensaio, nas condições preconizadas, não apresentaram citotoxicidade frente às hemácias.

As dosagens de hemoglobina após 24 horas de exposição do concentrado de hemácias frente as diferentes concentrações da suspensão de NPFC's foram submetidas aos testes de normalidade e de homogeneidade de variâncias. Os dados da dosagem de hemoglobina em 24 horas foram normais pelo teste de Shapiro-Wilk e demonstraram heterogeneidade de variâncias pelo teste de Levene.

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi realizado sobre os dados das dosagens de hemoglobina, não demonstrando diferença estatística.

O perfil de liberação de hemoglobina, o que determina a taxa de hemólise, ou seja, o dano causado às hemácias, na ausência e na presença de diferentes concentrações de NPFC's foi muito semelhante, não havendo hemólise significativa das hemácias, demonstrando não haver citotoxicidade *in vitro* de NPFC's.

Figura 11: Efeito de NPFC's sobre hemácias. Hemácias (5%) incubadas a 37° C por 24 h sob constante agitação na ausência ou presença de diferentes concentrações de NPFC's. A liberação de hemoglobina, após centrifugação, foi determinada pela leitura da absorvância em 540nm.



Em estudo semelhante com concentrado de hemácias na ausência e presença de diferentes concentrações de NPs de óxido férrico (magnetita), avaliando a liberação de hemoglobina através da leitura de absorvância, observou-se resultados semelhantes em relação a este ensaio (VENDRAME, 2011).

O perfil de liberação de potássio, como indicador de dano de membrana celular, apresentou resultados similares, demonstrando não possuírem atividade citotóxica em hemácias (CÓTICA *et al*, 2011).

É importante ressaltar, que para a possível administração de NPFC's para seres humanos, elas não podem causar danos celulares e em tecidos. Poucos estudos *in vitro* com NPs magnéticas estão descritos na literatura. No entanto, experimento como o realizado, avaliação da liberação de hemoglobina como marcador de dano em hemácias, é amplamente utilizado em outros estudos, como por exemplo, que verificam a atividade antioxidante e antifúngica de *Camellia sinensis*, resveratrol e, avaliação de compostos orgânicos de selênio e telúrio (CAMARGO, 2011; MENDES, 2011; SANTOS, 2009).

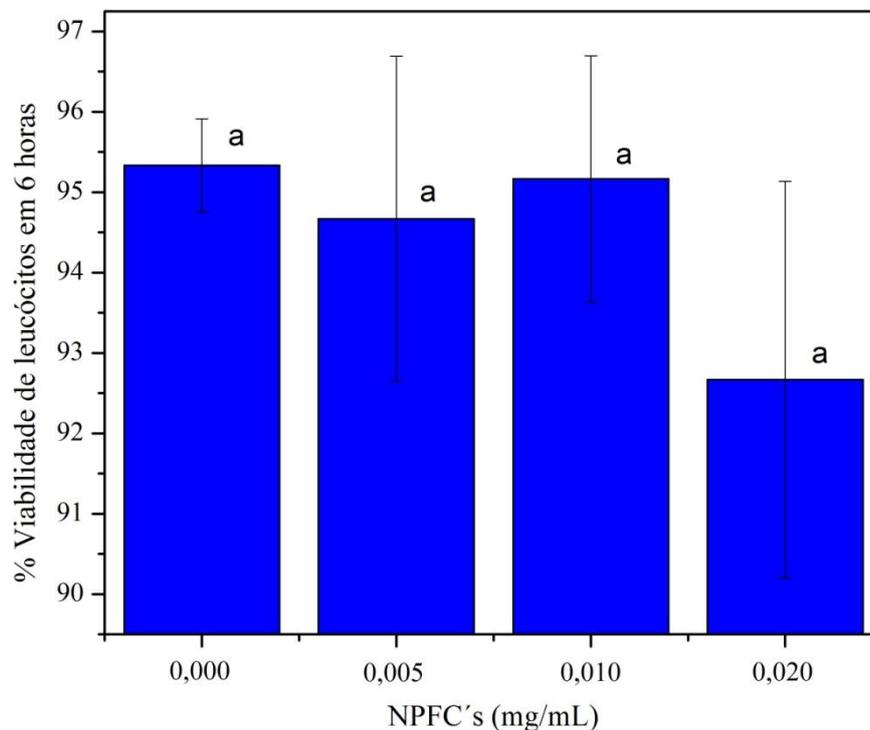
### **5.2.2. Avaliação da citotoxicidade sobre leucócitos polimorfonucleados**

Esse ensaio utilizou o teste do azul de Trypan para determinar a possível citotoxicidade de NPFC's sobre LPMN. A viabilidade celular dos LPMN foi determinada na ausência e na presença de diferentes concentrações da suspensão de NPFC's (0,02, 0,01, 0,005 mg/mL concentrações finais).

A figura 12 apresenta a viabilidade celular dos LPMN, em percentual de LPMN viáveis, na ausência ou presença da suspensão de NPFC's em diferentes concentrações, após 6 horas de incubação a 37° C e sob agitação constante.

A viabilidade celular dos LPMN na presença das diferentes concentrações de NPFC's manteve-se muito próxima a viabilidade do ensaio controle. Tanto na ausência como na presença de NPFC's observa-se que não houve citotoxicidade sobre os LPMN, demonstrando compatibilidade nas condições descritas no experimento.

Figura 12: Efeito de NPFC's sobre a viabilidade de LPMN. Concentrado de LPMN incubados por 6h à 37° C na ausência ou presença de diferentes concentrações de NPFC's, realizado com Azul de Trypan 1,5%.



A análise estatística dos dados de porcentagem de viabilidade de LPMN na presença de NPFC's após 6 horas apresentou-se normal e com homocedasticidade entre as variâncias e, por isso, uma análise de variância foi feita para averiguar as médias entre os grupos. As médias não diferem significativamente entre si (valor de  $p = 0,31$ ) ao nível de significância de 5%.

Devido o resultado de ausência da toxicidade significativa sobre LPMN que alterem sua viabilidade frente a suspensão de NPFC's reforça-se o interesse de síntese de NPFC's para aplicações biomédicas e, assim, a utilização em outros experimentos para continuidade da avaliação da toxicidade de NPFC's.

Na literatura registram-se experimentos realizados sobre células sanguíneas *in vivo*, porém não há muitos relatos de experimentos *in vitro*, no entanto o ensaio de viabilidade de LPMN tem utilidade na determinação de dano. Afinal, estas NPs estarão em contato direto com células sanguíneas na possível aplicação biomédica, sendo fundamental a ausência de toxicidade.

### 5.3. Avaliação da toxicidade de nanopartículas de ferritas de cobalto *in vivo*

#### 5.3.1. Dosagens dos marcadores bioquímicos

##### 5.3.1.1. Dosagens dos marcadores bioquímicos em camundongos machos

O teste de Levene para se averiguar a homogeneidade de variância foi realizado e todos os dados dos marcadores bioquímicos mostraram que há homocedasticidade entre as variâncias. Assim, optou-se pelo teste paramétrico de análise de variância com teste de Tukey como teste para contrastes de médias.

Nas dosagens desses marcadores em camundongos machos, após 7 dias de administração da suspensão de NPFC's, grupo 1 NPFC's (1 mg/Kg) , grupo 2 NPFC's (5 mg/Kg) e no grupo controle, pode-se observar que não houve diferença estatística entre eles nas determinações de ALT, AST, creatinina e FAL (tabela 2 e 3). A atividade de uréia, nos camundongos machos, difere significativamente nos tratamentos, ao intervalo de confiança de 95% (tabela 2 e 3).

Tabela 2. Média e desvio padrão dos marcadores bioquímicos no grupo dos camundongos machos na ausência e na presença de diferentes concentrações da suspensão de NPFC's.

Marcador	Controle	NPFC's 1	NPFC's 2
ALT (U/L)	59,33±24,68	89,50±30,45	68,66±15,60
AST (U/L)	367,83±188,94	237,83±113,04	250,16±88,84
FAL (U/L)	110,33±96,13	155,66±43,76	212,83±124,83
URÉIA (mg/dL)	44,25±20,34	77,50±22,50	71,00±14,24
CREATININA (mg/dL)	0,37±0,22	0,4116±0,03	0,38±0,07

Tabela 3. Análise de variância dos dados dos marcadores bioquímicos em camundongos machos.

Marcador	Valor de p
ALT (U/L)	0,1235
AST (U/L)	0,2261
FAL (U/L)	0,2031
URÉIA (mg/dL)	0,0220
CREATININA (mg/dL)	0,8560

A alteração na dosagem da uréia demonstra que pode ter ocorrido início de lesão renal ocasionada pela administração de NPFC's por via oral. Esse resultado pode indicar efeito tóxico destas NPFC's administradas na dose 1 e 5 mg/Kg durante sete dias.

Utilizou-se o teste de Tukey para se comparar as médias dos valores de atividade de uréia nos tratamentos: controle (C), NPFC's (1 mg/Kg) e NPFC's (5 mg/Kg) (tabela 4).

Tabela 4. Média dos valores da dosagem de uréia entre camundongos machos, na ausência e na presença de diferentes concentrações da suspensão de NPFC's.

Tratamento	Média
C	44,25 <sup>a</sup>
NPFC's (1 mg/Kg)	77,50 <sup>c</sup>
NPFC's (5 mg/Kg)	71,00 <sup>ac</sup>

**Obs:** letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias e letras diferentes indicam que há diferença estatística significativa.

Dessa maneira, confirmou-se no ensaio que há diferença estatística nas amostras nas duas doses da suspensão de NPFC's administradas aos animais (NPFC's 1 mg/Kg e 5 mg/Kg).

Em estudo semelhante, realizado com NP magnéticas a base de maghemita, revestidas com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico, administradas via endovenosa em camundongos machos por 90 dias, a avaliação dos marcadores ALT, AST, FAL, gama glutamil transferase (GGT), creatinina e desidrogenase láctica, não demonstrou alterações significativas em relação ao grupo controle, que não recebeu a NP magnética, demonstrando que o seu uso, via endovenosa, não causou dano hepático e nem dano renal, avaliados pelos marcadores bioquímicos (MOREIRA, 2012).

### 5.3.1.2. Dosagens dos marcadores bioquímicos em camundongos fêmeas

As determinações dos marcadores ALT e AST nos camundongos fêmeas não foram realizadas por ser obtida quantidade insuficiente de amostra devido dificuldade na coleta e hemólise ocorrida, fator que pode interferir na avaliação de alguns marcadores. Portanto, se optou por dosar a creatinina, uréia e FAL, sendo a avaliação renal considerada mais importante nesse momento.

Analogamente à análise sobre os dados das dosagens dos marcadores bioquímicos nos machos, a análise estatística dos dados das dosagens de creatinina, uréia e FAL nas fêmeas, foi realizada com intervalo de confiança de 95%. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos em nenhum dos marcadores bioquímicos das fêmeas (tabela 5 e 6).

Tabela 5. Média e desvio padrão dos marcadores bioquímicos no grupo dos camundongos fêmeas na ausência e na presença de diferentes concentrações da suspensão de NPFC's.

Marcador	Controle	NPFC's 1	NPFC's 2
FAL (U/L)	125,00 ± 36,60	161,00 ± 1,41	122,50 ± 61,50
URÉIA (mg/dL)	43,00 ± 5,29	52,00 ± 12,73	48,50 ± 12,37
CREATININA (mg/dL)	0,37 ± 0,05	0,37 ± 0,04	0,34 ± 0,07

Tabela 6. Análise de variância dos dados dos marcadores bioquímicos em camundongos fêmeas.

Marcador	Valor de p
FAL (U/L)	0,6220
URÉIA (mg/dL)	0,5696
CREATININA (mg/dL)	0,6980

Neste estudo, com suspensão de NPFC's, sem revestimento, sintetizadas pelo método sol-gel, não houve alterações significativas nas dosagens de creatinina, uréia e FAL, o que indica possivelmente ausência de dano renal, mesmo tendo realizado o experimento sem revestimento de NPFC's administradas via gavagem.

De maneira semelhante, o uso de magnetolipossomas, à base de NP de maghemita em camundongos fêmeas, por via endovenosa, durante 30 dias, demonstrou na avaliação bioquímica de creatinina, FAL, uréia e ALT que não ocorreu alterações nesses parâmetros, não apresentando possível dano hepático nem dano renal (COELHO, 2008).

Outro experimento realizado com NP de maghemita recoberta com ácido dimercaptossuccínico (DMSA) associada à anfotericina B, em camundongos fêmeas, por via intraperitoneal durante 80 dias. Nas dosagens de ALT, FAL, GGT, uréia, creatinina, não se observou aumento significativo destes marcadores, demonstrando-se ausência de dano hepático e renal com o uso das NPs associadas a anfotericina B (PEIXOTO, 2008).

### **5.3.2. Avaliação histológica após administração de nanopartículas de ferrita de cobalto**

#### **5.3.2.1. Avaliação histológica após administração de nanopartículas de ferrita de cobalto em camundongos machos**

O aspecto morfológico foi observado por microscopia, considerando os órgãos do grupo controle como referência em relação aos grupos que receberam a suspensão de NPFC's (nas dosagens de 1 mg/Kg e 5 mg/Kg).

No grupo controle de camundongos machos o parênquima renal apresentou glomérulos em quantidade adequada, sem alterações histológicas e ausência de alterações túbulo-intersticiais (figura 13 A).

No grupo dos camundongos machos que recebeu a concentração de 1 mg/Kg da suspensão de NPFC's, o parênquima renal apresentou-se com glomérulos em número adequado, sem alterações histológicas, ausência de alterações túbulo-intersticiais e não se observou a formação de aglomerados de NPFC's (figura 13 B).

Em cortes histológicos de dois camundongos, foram observados infiltrados inflamatórios linfoplasmohistiocitário focal perivascular intraparenquimatoso.

No entanto, no grupo dos camundongos machos que recebeu a concentração de 5 mg/Kg da suspensão de NPFC's ocorreu formação de infiltrado inflamatório focal perivascular intraparenquimatoso com congestão vascular e artefatos de compressão (figura 13 C), ocorrendo cistificação/dilatação em alguns cortes (figura 14).

Na avaliação dos marcadores bioquímicos que auxiliam no monitoramento de possível lesão renal, dosagem de uréia e creatinina, a uréia apresentou valor elevado nos grupos de camundongos machos que receberam a suspensão de NPFC's nas duas doses (1 mg/Kg e 5 mg/Kg), e o resultado da análise histológica do rim deste grupo confirmou dano causado ao órgão após administração de uma dose elevada da suspensão de NPFC's.

Figura 13: Cortes histológicos dos rins de camundongos machos do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.

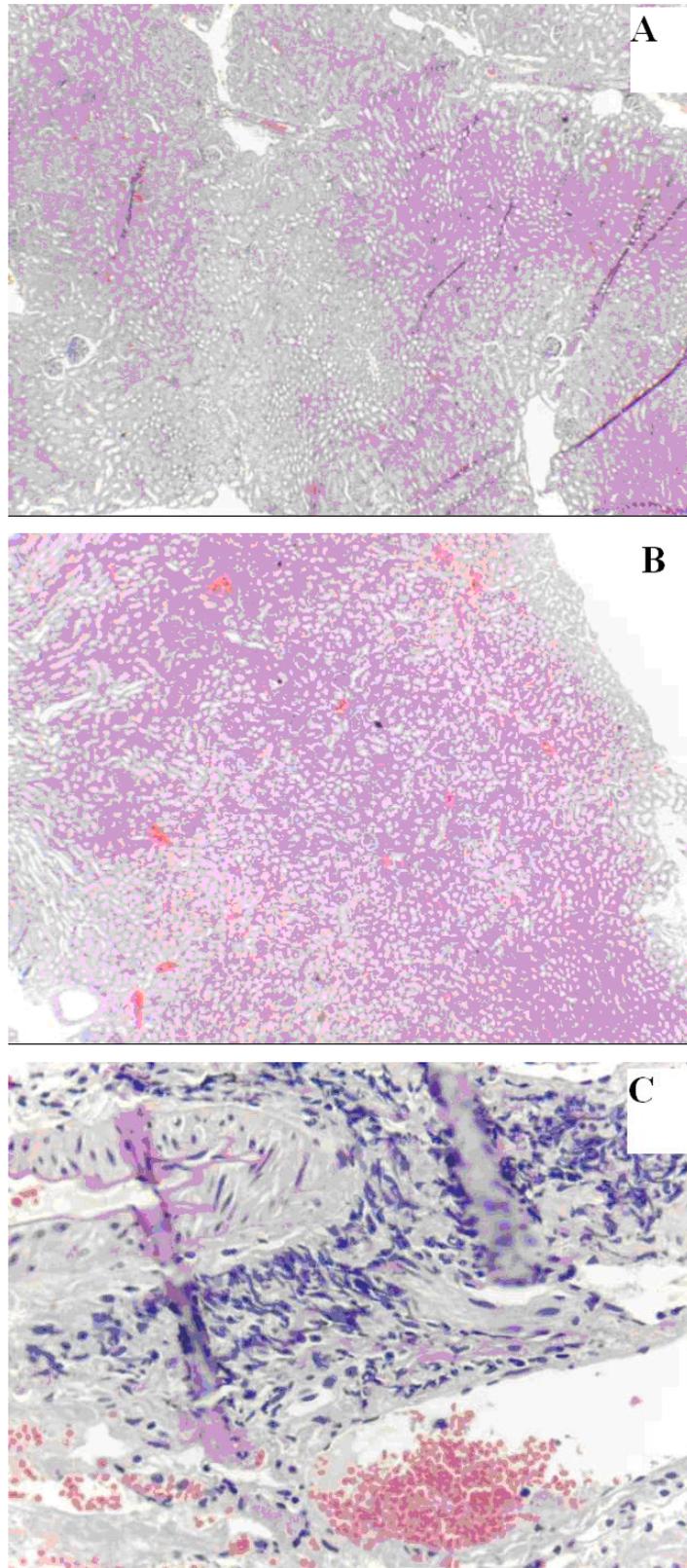
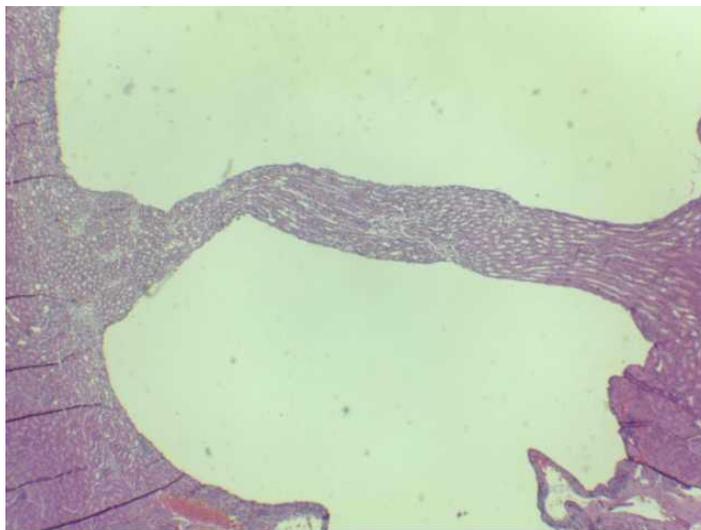


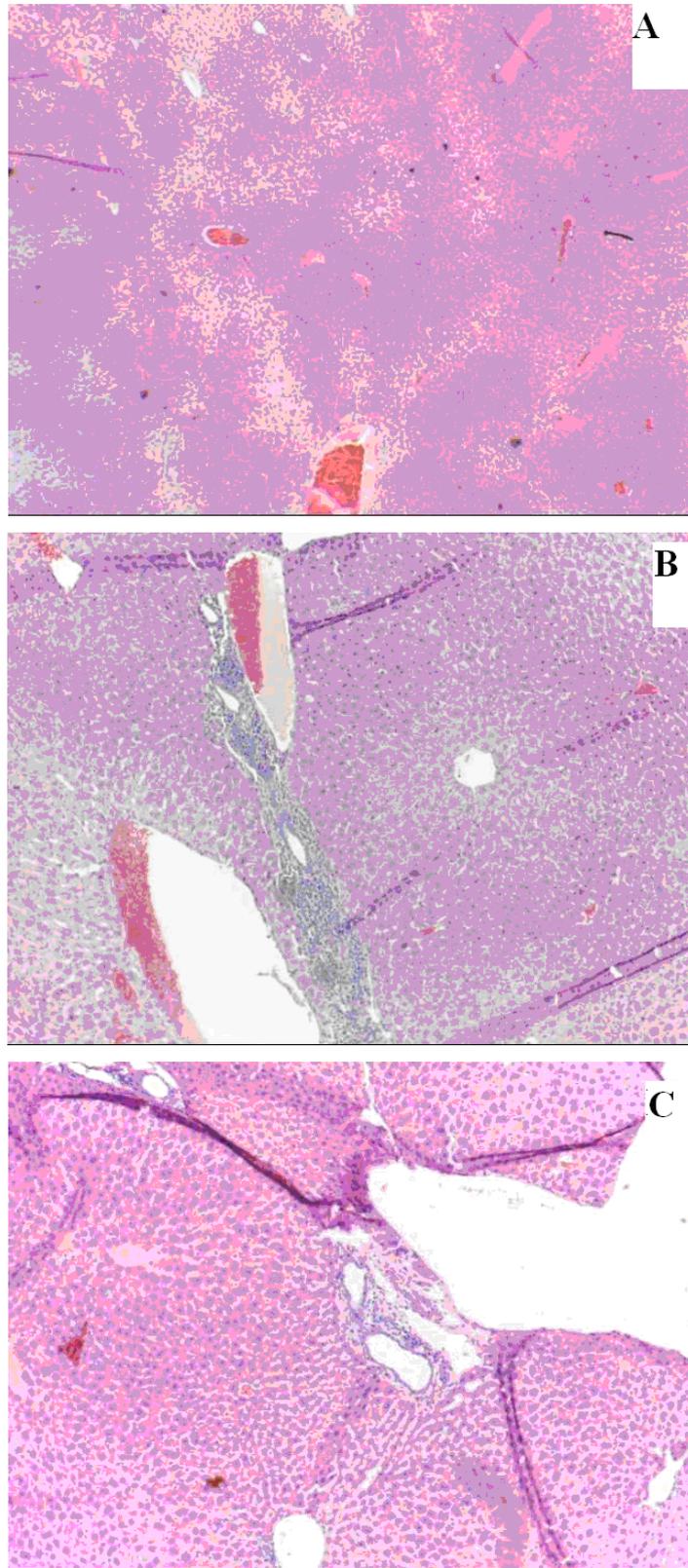
Figura 14: Corte histológico do rim de camundongos machos, que receberam a suspensão de NPFC's na dose 5 mg/Kg via oral com presença de cistificação/calcificação.



A avaliação do fígado no grupo controle apresentou-se normal, com arquitetura geral preservada, sem alterações (figura 15 A).

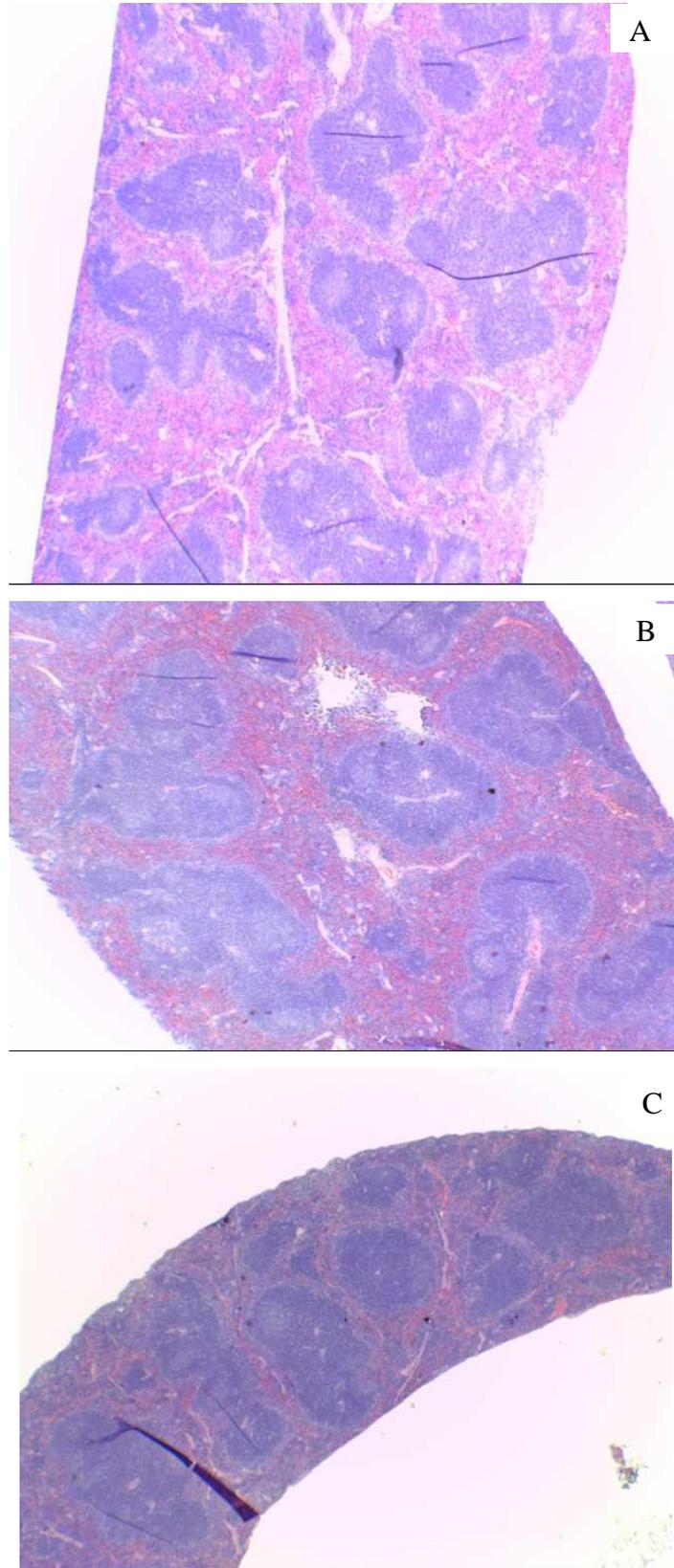
Por ser o fígado um órgão central no metabolismo, o seu monitoramento é de grande importância na avaliação de dano hepático ocasionado pela administração de fármacos ou mesmo NPs portanto, um adequado acompanhamento dos marcadores bioquímicos e a avaliação histológica auxilia na avaliação de possível toxicidade que as NPFC's possam causar à este órgão. Nos cortes analisados do fígado, observou-se a formação de infiltrado inflamatório crônico moderado linfoplasmocitário com poucos eosinófilos de permeio, em espaço porta, sem agressão de lâmina limitante, em ambos os grupo de camundongos machos que receberam as diferentes doses da suspensão de NPFC's, 1 e 5 mg/Kg (figura 15 B e 15 C). Os marcadores bioquímicos utilizados para monitoramento do dano neste órgão, AST, ALT e FAL, apresentaram-se com seus valores de dosagens normais, indicando a possível ausência de lesão hepática na administração da suspensão de NPFC's.

Figura 15: Corte histológico do fígado de camundongos machos do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.



A análise dos cortes do baço do grupo controle dos camundongos machos não apresentou qualquer alteração histológica (figura 16 A). Da mesma maneira nos grupos de camundongos machos que receberam as diferentes concentrações da suspensão de NPFC's (1 mg/Kg figura 16 B e 5 mg/Kg figura 16 C) não se observou alterações histológicas, demonstrando possível ausência de toxicidade após sua administração.

Figura 16: Cortes histológicos do baço de camundongos machos do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.



Análises histológicas de baço, fígado, rim e pulmão, realizados com camundongos machos em experimento com NPs magnéticas recobertas com ácido 2,3 dimercaptosuccínico apresentaram aspecto morfológico preservado, sem formação de processos inflamatórios, ausência de danos, demonstrando aglomeração das NPs magnéticas variadas (MOREIRA, 2012).

As avaliações histológicas, do fígado, baço, e as dosagens dos marcadores bioquímicos no grupo dos camundongos machos na dose 1 mg/Kg da suspensão de NPFC's não apresentou alterações que indiquem danos nestes órgãos, demonstrando possível biocompatibilidade para aplicações biomédicas. A análise de marcadores bioquímicos junto com avaliação histológica é de grande utilidade como parâmetros para avaliação do possível uso de NPFC's. Nos rins ocorreu alteração nas doses de 1 mg/Kg e 5 mg/Kg da suspensão de NPFC's, observou-se formação de processo inflamatório, alteração na dosagem da uréia e, cistificação/calcificação em um dos cortes histológicos do grupo de camundongos machos que recebeu a suspensão de NPFC's na dose de 5 mg/Kg, o que precisa ser reavaliado em outros experimentos.

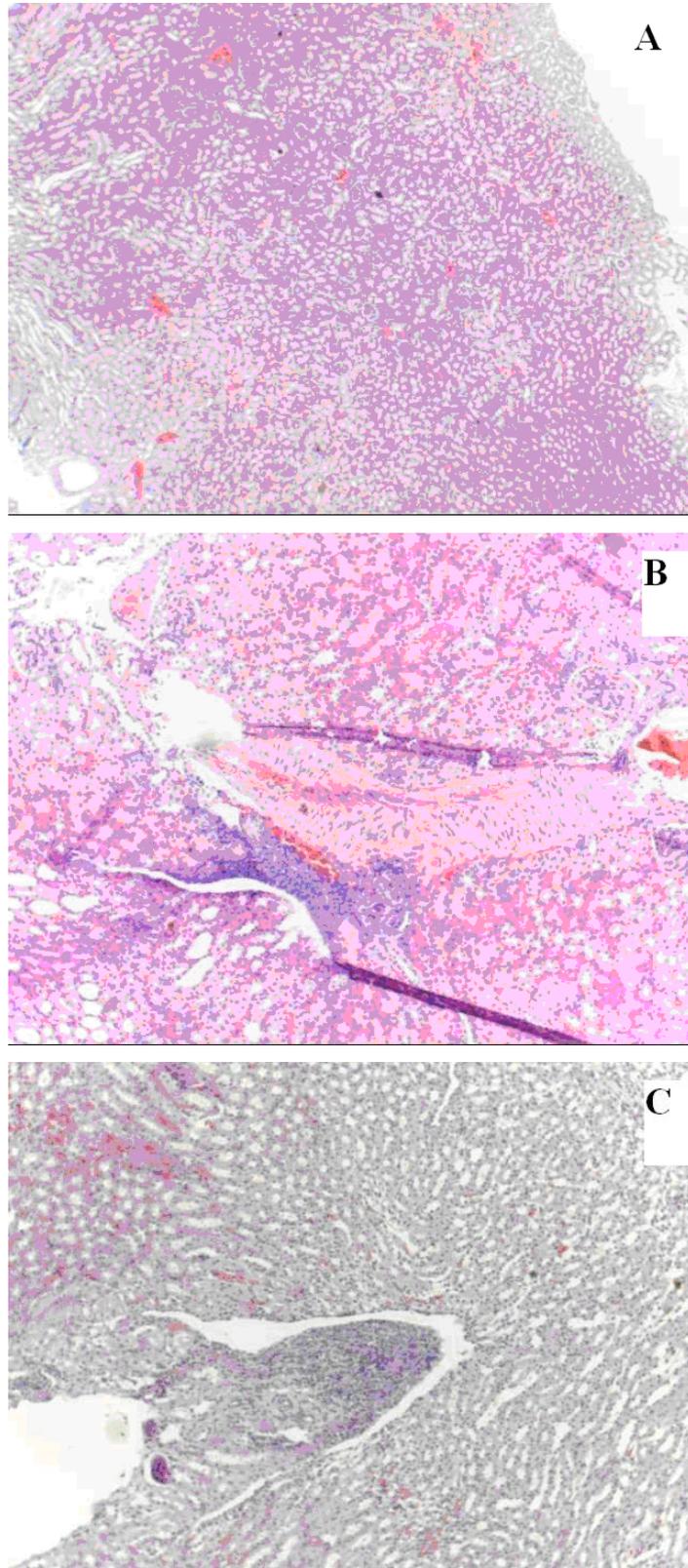
### **5.3.2.2. Avaliação histológica após administração de nanopartículas de ferrita de cobalto em camundongos fêmeas**

Para avaliação de danos em órgãos do grupo dos camundongos fêmeas procedeu-se da mesma maneira, no entanto, na análise de dano hepático não foi possível obtenção da amostra de material para determinação dos marcadores bioquímicos, sendo realizada somente avaliação de marcadores bioquímicos da função renal. Nos cortes histológicos dos rins do grupo controle de camundongos fêmeas a arquitetura geral encontrou-se preservada (figura 17 A).

A análise de cortes histológicos dos rins do grupo de camundongos fêmeas que receberam suspensão de NPFC's na dose 1 mg/Kg observou-se, em um dos cortes, infiltrado inflamatório linfoplasmohistocitário focal perivascular intraparenquimatoso (figura 17 B) da mesma maneira que foi observada a presença de processo inflamatório em um dos cortes histológicos do grupo de camundongos fêmeas que recebeu a suspensão de NPFC's na dose de 5 mg/Kg (figura 17 C).

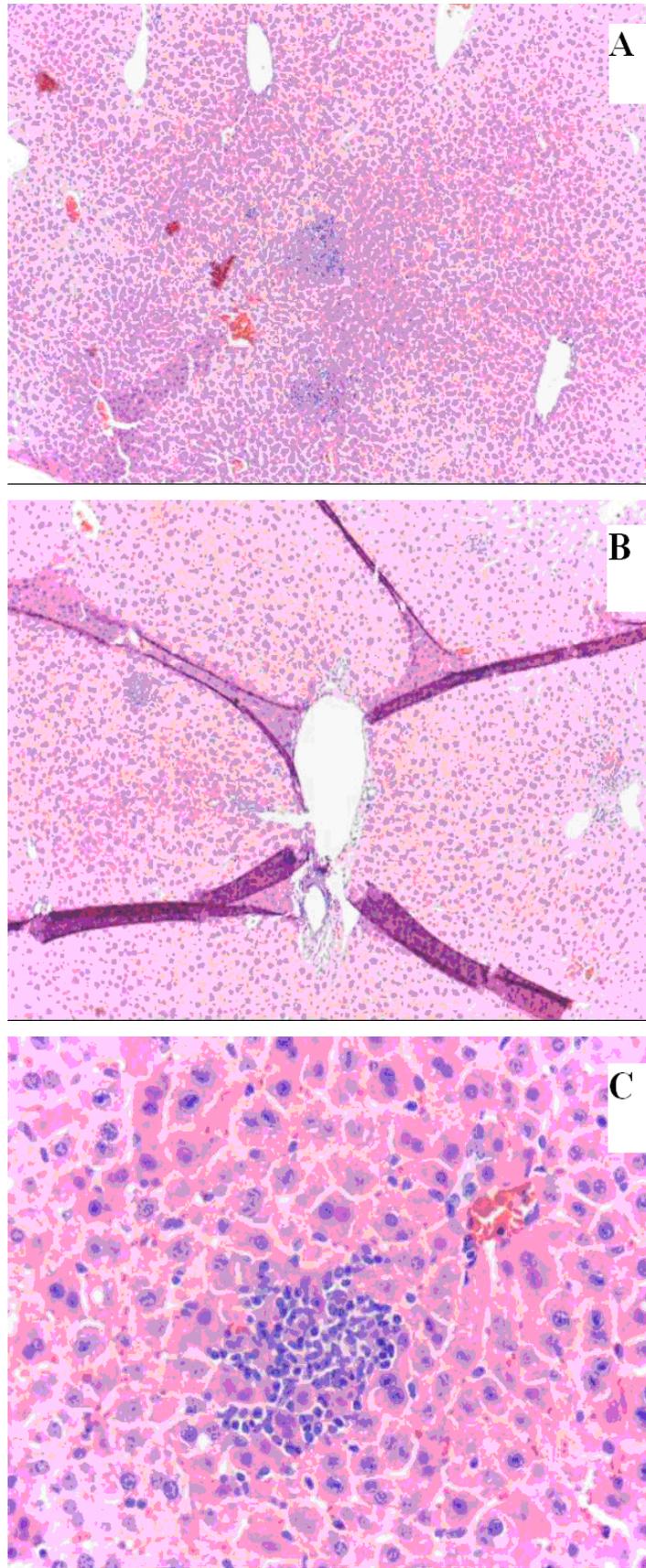
A dosagem dos marcadores bioquímicos, uréia e creatinina, nos camundongos fêmeas, que receberam a suspensão de NPFC's por via oral, na menor e na maior dose, apresentaram resultados normais, contribuindo na avaliação de possível dano renal causado pelo uso de NPFC's. Estudos que avaliam marcadores bioquímicos e análises histológicas são importantes para analisar com mais eficácia as NPFC's, mostrando questões pouco observadas.

Figura 17: Cortes histológicos do rim de camundongos fêmeas do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.



O fígado do grupo controle dos camundongos fêmeas apresentou, em alguns cortes, infiltrado inflamatório crônico discreto intraparenquimatoso multifocal (figura 18 A). No grupo de camundongos fêmeas que recebeu a suspensão de NPFC's na dose menor, 1 mg/Kg, observou-se formação de infiltrado inflamatório crônico discreto linfoplasmocitário, em espaço porta, sem agressão de lâmina limitante. Além de pequenos agregados inflamatórios intraparenquimatosos (figura 18 B). No grupo da maior dose, 5 mg/Kg da suspensão de NPFC's os cortes histológicos demonstraram pequenos agregados inflamatórios intraparenquimatosos, circundando hepatócitos apoptóticos (figura 18 C).

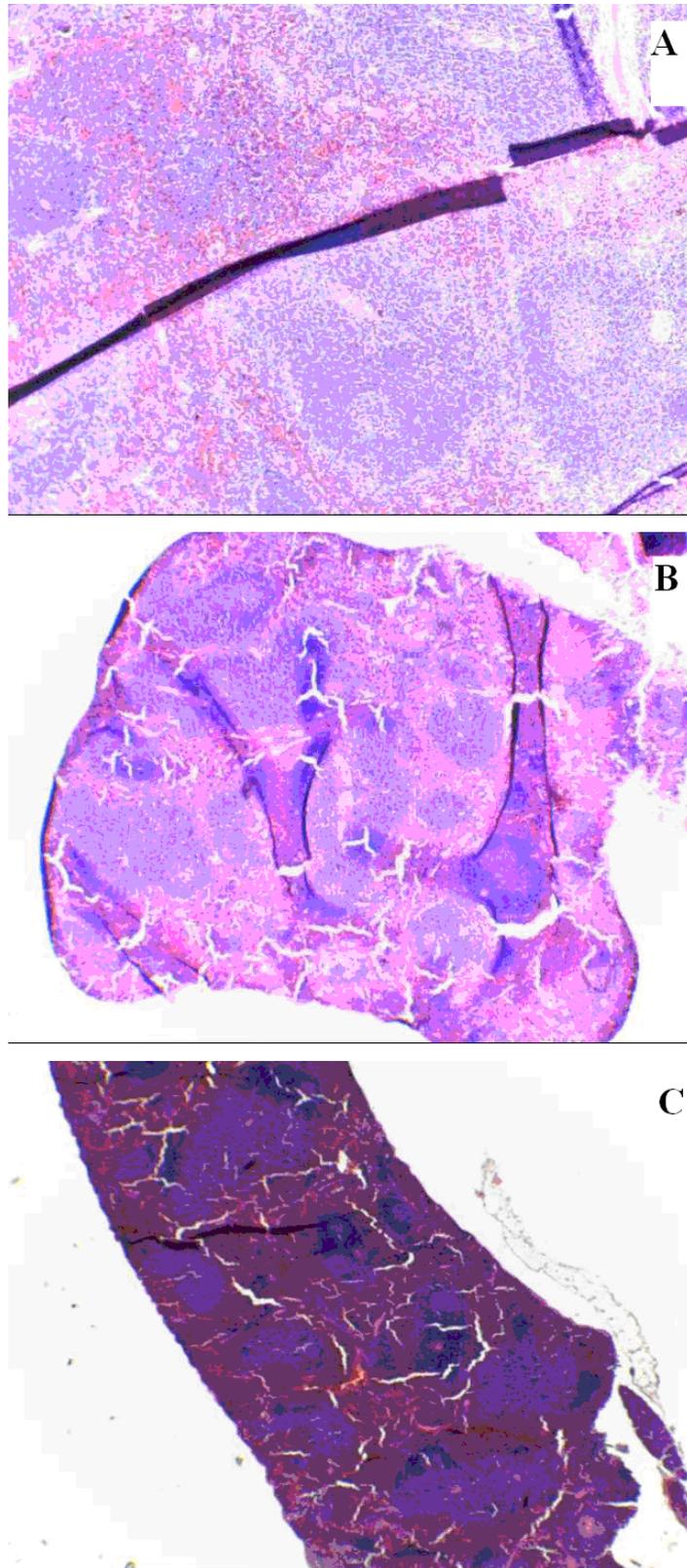
Figura 18: Cortes histológicos do fígado de camundongos fêmeas do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.



No grupo controle de camundongos fêmeas não foi observada nenhuma alteração histológica nos cortes analisados do baço (figura 19 A).

Nos grupos de camundongos fêmeas que receberam a suspensão de NPFC's o baço teve suas características histológicas preservadas, não demonstrando alterações em nenhuma lâmina, tanto no grupo de camundongos fêmeas que recebeu a menor dose da suspensão NPFC's, 1 mg/Kg (figura 19 B), como no grupo que recebeu a maior dose, 5 mg/Kg, administradas via oral por 7 dias (figura 19 C).

Figura 19: Cortes histológicos do baço de camundongos fêmeas do grupo controle (A), e dos grupos que receberam a suspensão de NPFC's nas doses de 1 mg/Kg (B) e de 5 mg/Kg (C) via oral.



O experimento realizado com camundongos fêmeas que receberam a suspensão de NPFC's, nas doses 1 mg/Kg e 5 mg/Kg, demonstrou infiltrado inflamatório moderado no fígado e rins, como também aparente ausência de dano hepático, renal e no baço. O resultado da avaliação dos cortes histológicos corresponde com as análises dos marcadores bioquímicos deste mesmo grupo.

Outros estudos utilizando camundongos fêmeas, que receberam fluídos de NPs magnéticas de maghemita recobertas por citrato, não demonstraram alterações histológicas significativas em pulmão, fígado e baço, ausência de dano renal e hepático com potencial biocompatibilidade para aplicações biomédicas (COELHO, 2008). Experimentos com NP magnéticas recobertas com DMSA e anfotericina B demonstraram formação de aglomerados de NPs em fígado, baço e pulmão, com ausência de dano e com formação de um processo inflamatório mais severo nos rins e fígado, atribuídos a anfotericina B e não a NP administrada (PEIXOTO, 2008).

Dentro da área farmacêutica, diversos fármacos, para que possam ser utilizados com segurança, necessitam de monitoramento da função hepática e renal por causarem possíveis danos. Este monitoramento permite avaliar o risco/benefício no uso do fármaco bem com o tempo de administração, o ajuste de dose adequado, para assim, obter o melhor resultado da terapia proposta.

O uso das estatinas ou vastatinas, inibidores da hidroximetil glutaril-coenzima A, como a sinvastatina, lovastatina, atorvastatina, entre outras, em alguns casos, demonstra pequena incidência de toxicidade hepática, com elevação sérica das transaminases de até três vezes o nível normal, o que torna necessário suas determinações. Essas elevações são frequentemente intermitentes, porém não estão associadas a outras evidências de hepatotoxicidade. Em pacientes com hepatopatias ou histórico de consumo excessivo de álcool estes níveis podem ultrapassar três vezes o limite da normalidade, sendo a medicação suspensa nos pacientes sintomáticos ou assintomáticos. O aumento das creatinofosfocinases, embora raro, é descrito no uso de todas as estatinas, sendo traduzido como agressão muscular (KATZUNG, 2005; SILVA, 2006; RANG *et al*, 2007).

No uso da vancomicina a nefrotoxicidade raramente é observada na utilização de doses-padrão em pacientes com função renal normal ou com doses bem ajustadas em pacientes com insuficiência renal. O maior risco deste efeito é observado em pacientes geriátricos e, o monitoramento das concentrações sanguíneas do fármaco auxilia na prevenção de possíveis lesões renais (SILVA, 2006).

A anfotericina B pode causar nefrotoxicidade, sendo esta a reação tóxica mais significativa. Este efeito pode ter um componente reversível que é a redução da perfusão renal e um componente irreversível, que ocorre usualmente na administração prolongada. Algumas vezes são observadas alterações nos testes de função hepática (SILVA, 2006).

Apesar da comprovação de alterações dos níveis séricos de alguns marcadores bioquímicos, que avaliam função renal ou hepática, os fármacos causadores destas continuam em uso, necessitando de monitorando de possíveis danos, pois, na maioria das vezes, estes são reversíveis, não ocasionando maiores problemas para o paciente.

As análises que avaliam os possíveis danos hepáticos e renais são realizadas em dosagens séricas, não considerando as possíveis alterações ou extensão de lesões diretamente nos órgãos. No experimento *in vivo* utilizou-se a avaliação histológica para acompanhar possíveis alterações, observando-se que as dosagens séricas dos marcadores citados, que avaliam possíveis danos hepáticos e ou renais, mostraram-se dentro de valores normais, com exceção da uréia no grupo dos camundongos machos que receberam as doses da suspensão de NPFC's (1 mg/Kg e 5 mg/Kg). Portanto, as alterações encontradas nos rins e fígado, no uso agudo dessas NPFC's podem ser interpretadas como adaptativas e reversíveis, não causando danos significativos e nem permanentes no fígado e no rim dos grupos analisados de acordo com o experimento realizado. Estas análises são fundamentais para avaliação da toxicidade de NPFC's, que demonstraram possível biocompatibilidade conforme as análises realizadas. Apesar dos possíveis danos causados pelas NPFC's serem reversíveis, para o uso seguro é adequado considerar sua administração por tempo limitado e sob monitoramento.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na síntese, caracterização e avaliação de citotoxicidade *in vitro* e toxicidade *in vivo* de NPFC's para aplicações biomédicas foram:

- A síntese de NPFC's via método sol-gel, com alta temperatura, produziu amostras com estreita distribuição de tamanho e forma controlados, através de um método inovador, com baixo custo e boa reprodutibilidade. Sua composição, tamanho, distribuição e características magnéticas foram comprovadas através das análises de difratometria de raios X, MEV, TEM e VSM;
- A suspensão de NPFC's nas diferentes concentrações demonstrou baixa citotoxicidade frente hemácias e LPMN;
- A análise dos marcadores bioquímicos demonstrou alteração somente na dosagem da uréia no grupo dos camundongos machos, sendo que ALT, AST, FAL e creatinina permanecerem dentro da normalidade, sem presença de dano hepático ou renal significativos;
- A alteração da uréia pode significar possível início de dano renal no uso agudo da suspensão de NPFC's;
- A avaliação do fígado, rins e baço não apresentou danos significativos após administração da suspensão de NPFC's;
- As alterações que foram encontradas nos rins e fígado, no uso agudo dessas NPFC's podem ser interpretadas como adaptativas e reversíveis, de acordo com o experimento realizado, no entanto, com ressalva para a necessidade de avaliação futura de outros marcadores para segurança na possível administração das NPFC's.

Os objetivos de sintetizar NPFC's com controle de tamanho, composição, reprodutibilidade e características magnéticas adequadas para aplicações biomédicas foram alcançados, bem como, as avaliações de citotoxicidade *in vitro* e toxicidade *in vivo* demonstraram compatibilidade, ou seja, biocompatibilidade das NPFC's, contribuindo na avaliação para a possível utilização de NPFC's no direcionamento de fármacos.

Partindo desses resultados, surge a perspectiva para estudos futuros da avaliação do dano renal através da determinação de outros marcadores bioquímicos, como dosagem de sódio e potássio, determinação do volume urinário, entre outros, além disso, experimentos

para avaliar a incorporação de fármacos às NPFC's, bem como, sua toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALVES, T.M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro para aplicações biomédicas**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- AVDEEV, M. V.; MUCHA, B.; LAMSZUS, Z.; VÉKAS, L.; GARAMUS, V.M.; FEOKZYSTOV, A., V.; MARINICA, O.; TURCU, R.; WILLUMET, R. Structure and in Vitro biological testing of water-based ferrofluids stabilized by monocarboxylic acids. **Langmuir Article**. (2010), 8503-8509.
- BEDÊ, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomedical**. Dissertação (Mestrado) - Ciência dos Materiais Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2010.
- BRUGIN, A. **Avaliação da biocompatibilidade/Toxicidade de Fluido Magnético composto de nanopartículas de maghemita recobertas com citrato em camundongos fêmeas Swiss**. Dissertação (mestrado) – Patologia Molecular. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília, 2007.
- CABUIL, V.; DUPUIS, V.; TALBOT, D.; NEVEU, S. Ionic magnetic fluid based on cobalt ferrite nanoparticles: Influence of hydrothermal treatment on the nanoparticle size. **J. of Magnetism and Magnetic Materials**. 323 (2011) 1238-1241.
- CAMARGO, L. E. A. de. **Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze obtida por diferentes formas de produção**. Dissertação (Mestrado) – Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual do Centro-Oeste. Guarapuava, 2011.
- COELHO, J. P. **Avaliação da biocompatibilidade de magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita**. Dissertação (Mestrado) - Patologia Molecular. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. Brasília 2008.
- CÓTICA, L. F.; FREITAS, V. F.; DIAS, G. S.; SANTOS, I. A.; VENDRAME, S. C.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R.M.; STARUCH, M.; JAIN, M. Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. **J. of Magnetism and Magnetic Materials**. 2011.
- DIAS, Bruno Leal. **Síntese, caracterização e nanoestruturação de esferas funcionais submicrométricas**. Dissertação (Mestrado) – Física. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.
- FERGUSON, R. M.; MINARD, K. R.; KRISHNAN, K. M. Optimization of nanoparticle core size for magnetic particle imaging. **J. of Magnetism and Magnetic Materials**. 321 (2009) 1548-1551.
- FERRARI, M. **Multifunctional pharmaceutical nanocarriers**. Springer, Boston. p. 484, 2008.

FREITAS, V. F. **Mecanosíntese e caracterizações ferróicas de cerâmicas de (1-x) BiFeO<sub>3</sub>-(x)PbTiO<sub>3</sub>**. fl. 119. Dissertação (Mestrado) – Física. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2009.

GUGLIELMO, C. D.; LOPEZ, D. R.; LAPUENTE, J.; MALLAFRE, J. M. L.; SUÀREZ, M. B. Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: A first *in vitro* approach. **Reproductive Toxicology**. 30 (2010), 271-276.

GUPTA, R. B.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticle technology for drug delivery**. Taylor & Francis Group, New York. v.159, p.1-18, 2006.

HAFELI, O.; CHASTELLAIN, M. **Nanoparticulates as drug carriers**. Imperial College Press, Londres. cap.18, p. 397-411, 2006.

HAPNER, C. D.; DEUSTER, P.; CHEN, Y. Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. **Chemico-Biological Interactions**, 2010.

KASHEVSKY, B. E.; AGABEKOV, V. E.; KASHEVSKY, S. B.; KEKALO, K. A.; MANINA, E.Y.; PROKHROV, I.V. Study of cobalt ferrite nanosuspensions for low-frequency ferromagnetic hyperthermia. **Particuology**. 6 (2008) 322-333.

KIM, D. K.; NIKLES, D. E.; JOHNSON, D. T.; BRAZEL, C. S. Heat generation of aqueously dispersed CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as heating agents for magnetically activated drug delivery and hyperthermia. **J. of Magnetism and Magnetic Materials**. 320 (2008), 2390-2396.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LAN, N. T.; DUONG, N. P.; HIEN, T. D. Influences of cobalt substitution and size effects on magnetic properties of coprecipitated CoFe ferrite nanoparticles. **J. of Alloys and Compounds**. 509 (2011) 5919-5925.

LI, X-H.; XU, C-L.; HAN, X-H.; QIAO, L.; WANG, T.; LI, F-S. Synthesis and magnetic properties of nearly monodisperse CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles through a simple hydrothermal condition. **Nano Express**. 5:1039-1044, 2010.

LIMA, D. de A.. **Quantificação de fases cristalinas de incrustações em colunas de produção de petróleo pelo método Rietveld**. fl. 109. Dissertação (Mestrado) – Ciência e Engenharia do Petróleo. Natal - RN, 2010.

LU, H.; LIU, G.; WANG, X.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; SHI, J.; YANG, H.; HU, H.; YANG, S. Solvothermal synthesis of cobalt ferrite nanoparticles loaded on multiwalled carbon nanotubes for magnetic resonance imaging and drug delivery. **Acta Biomaterialia**. 7 (2011) 3496-3504.

MARMORATO, P.; CECCONE, G.; GIANONCELLI, A.; PASCOLO, L.; PONTI, J.; ROSSI, F.; SALOMÉ, M.; KAULICH, B.; KISKINOVA, M. Cellular distribution and degradation of cobalt ferrite nanoparticles in Balb/373 mouse fibroblasts. **Toxicology Letters**, 2011.

MATTEI, Y.C.; PEREZ, O. P. Synthesis of high-coercivity cobalt ferrite nanocrystals. **Microelectronics J.** 40 (2009), 673-676.

MENDES, J. B. E. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas poliméricas contendo resveratrol.** Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2011

MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. **Laboratório para o clínico.** 8. ed. São Paulo: Atheneu 1999.

MONTEIRO-R, N. A.; TRAN, C. L. **Nanotoxicology: characterization, dosing and health effects.** Informa Healthcare, New York. p. 450, 2007.

MOREIRA, V. C. **Múltiplas injeções de nanopartículas magnéticas a base de maguemita recobertas com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico em camundongos: biocompatibilidade e toxicidade.** Dissertação (Mestrado) - Ciências da Saúde. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília 2012

NAQVI, S.; SAMIM, M.; ABDIN, M. Z.; AHMED, F. J.; MAITRA, A. N.; PRASHANT, C.K.; DINDA, A.K. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. **Internacional J. of Nanomedicine.** (2010), 5: 983-989.

NLEBEDIM, I.C.; RANVAH, N.; WILLIAMS, P.I.; MELIKHOV, Y.; SNYDER, J.E.; MOSES, A.J.; JILES, D.C. Effect of heat treatment on the magnetic and magnetoelastic properties of cobalt ferrite. **J. of Magnetism and Magnetic Materials.** 322 (2010) 1929-1933.

OLIVEIRA, J. B. A. de. **Exames laboratoriais para o clínico.** Rio de Janeiro: Medsi, 2003

PEIXOTO, Danielle Lima Guedes. **Avaliação da biocompatibilidade da anfotericina B em duas formulações: livre e associada com nanopartículas magnéticas.** Dissertação (Mestrado) - Patologia Molecular. Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

SANTOS, D. B. **Avaliação dos efeitos de compostos orgânicos de selênio e de telúrio sobre a integridade estrutural e funcional de células sanguíneas humanas.** Dissertação (Mestrado) - Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2009.

SCHETTINO JUNIOR, M. A. **Obtenção e caracterização de nanopartículas Magnéticas inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro.** Tese (Doutorado) - Física. Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo. Espírito Santo, 2009.

SCHLORF, T.; MEINCKE, M.; KOSSEL, E.; GLÜER, C.C.; JANSEN, O.; MENTLEIN, R. Properties of iron oxide nanoparticles for cellular and molecular magnetic resonance imaging. **Internacional J. of Molecular Sciences.** 2011, 12-23.

SILVA, D. de O. **Nanopartículas de cobalto preparada em líquidos iônicos: síntese, caracterização e aplicação em processo Fischer-Tropsch**. 151f. Dissertação (Mestrado de Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SINCAI, M.; GÂNGA, D.; BICA, D.; VÉKÁS, L. The antitumoral effect of loco regional magnetic cobalt ferrite in dog mamary adenocarcinoma. **J. of Magnetism and Magnetic Mateials**. 225 (2001) 235-240.

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. **Nanoparticulate drug delivery systems**. Informa Heakthcare, New York. p. 382, 2007.

TOMITAKA, A.; HIRUKAWA, A.; YAMADA, T.; MORISHITA, S.; TAKEMURA, Y. Biocompatibility of various ferrite nanoparticles evaluated by *in vitro* cytotoxicity assays using HeLa cells. **J. of Magnetism and Magnetic Materials**. 321 (2009) 1482-1484.

VENDRAME, S. C. **Síntese, caracterização e análise de citotoxicidade de nanopartículas de magnetita para aplicações biomédicas**. Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava 2011.

VIANA, D. S. F. **Síntese e propriedades ferroicas do composto LUF<sub>e</sub>2O<sub>4</sub>**. Dissertação (Mestrado) – Física. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2011

VICENTE, J.D.; BOSSIS, G.; LACIS, S.; GUYOT, M. Permeability measurements in cobalt ferrite and carbonyl iron powders and suspensions. **J. of Magnetism and Magnetic Materials**. 251 (2002) 100-108.

VO-DINH, T.; **Nanotechnology in biology and medicine: methods, devices and applications**. Taylor & Francis Gorup, Boca Raton. p. 762, 2007.

WANG, H.; HUANG, J.; WANG, C.; LI, D.; DING, L.; HAN, Y. Immobilization of glucose oxidase using CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanoparticles as carrier. **Applied Surface Science**. 257 (2011), 5739-5745.

XIAO, S. H.; LUO, K.; ZHANG, L. The structural and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles formed *in situ* in silica matrix. **Materials Chemistry and Physics**. 123 (2010) 385-389.

YANG, J.; PARK, S. B.; YOON, H. G.; HUH, Y. M.; HAAM, S. Preparation of poly\_ε-caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. **International Journal of Pharmaceutics**. 324 (2006) 185-190.

YUAN, H.L.; WANG, Y.Q.; SHAO, M.Z.; LIU, L.S.; CHEN, X. L.; LOU, S. Y.; YUAN, R. J.; HAO, Y. M.; L. I, N. Low-temperature preparation of superparamagnetic CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> microspheres with high saturation magnetization. **Nano Express** (2010), 5:1817-1821.

## 8. ANEXOS

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

### PROJETO DE PESQUISA

---

**Título:** Síntese, caracterização e análise de citotoxicidade de nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto.

**Área Temática:**

**Pesquisador:** Verusca Cristina Pizzatto Fontanive

**Versão:** 1

**Instituição:** Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

**CAAE:** 01635212.0.0000.0106

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

---

**Número do Parecer:** 49553

**Data da Relatoria:** 29/05/2012

**Apresentação do Projeto:**

As nanopartículas magnéticas são estruturas muito promissoras no uso para diagnóstico, incorporação de fármacos, ação de hipertermia. Sendo assim será desenvolvido através de um método sol-gel modificado a síntese de nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto, método simples e baixo custo, após, será realizada a caracterização dessas nanopartículas por microscopia eletrônica, espectros de infra vermelho, difração de raio X além de caracterizações magnéticas. E, analisar a citotoxicidade dessas nanopartículas frente células sanguíneas, hemácias e leucócitos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos do presente projeto de pesquisa consistem na síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas e subsequentes ensaios de citotoxicidade in vitro, tendo como requisitos a obtenção de nanopartículas de ferrite de cobalto de tamanhos e distribuição uniformes e avaliar o efeito dessas nanopartículas sobre hemácias e neutrófilos humanos (in vitro).

**Objetivo Secundário:**

Obtenção de nanoestruturas uniformes em distribuição de tamanho e características magnéticas, conforme o método sol-gel modificado. Protocolos para avaliação de hemólise e toxicidade em leucócitos. Análise da biocompatibilidade de nanopartículas magnéticas de ferrite de cobalto in vitro.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Uma síntese de nanopartículas adequadas, com tamanho e distribuição controlados, comprovados pelas análises e caracterizações físicas, a demonstração da biocompatibilidade da nanopartícula de ferrite de cobalto in vitro, frente hemácias e leucócitos, com ausência, ou toxicidade praticamente nula, indica a possibilidade de testes in vivo com modelos animais para outros experimentos posteriores. E, futuramente, experimentos para a incorporação de fármacos a essas nanoestruturas, para auxiliar no direcionamento desses, redução de dose e assim, contribuindo na diminuição dos danos à saúde de pacientes que utilizem medicamentos com grande potencial de toxicidade no organismo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os resultados serão apresentados como média +- desvio padrão. Comparações estatísticas serão feitas pela ANOVA com 95% de confiança.

Diferenças serão consideradas estatisticamente significantes com p 0,05.

Desfecho Primário:

Síntese de nanopartículas de ferrite de cobalto com tamanho, distribuição e características magnéticas adequadas através do método de síntese sol-gel, um método simples e de baixo custo, não demonstram toxicidade nas diferentes concentrações destas partículas testadas frente células sanguíneas, leucócitos e hemácias, sendo fator determinante na comprovação de biocompatibilidade.

**Desfecho Secundário:**

As nanopartículas produzidas pelo método sol-gel não apresentam tamanho e distribuição compatíveis com estruturas nanométricas demonstrando toxicidade em sistema biológicos in vitro (células sanguíneas).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A pesquisa apresenta relevância do ponto de vista científico na possibilidade de testes de novos fármacos, através de testes in vitro, protegendo seres humanos.

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

sem pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado acompanha o voto da relatora.

GUARAPUAVA, 03 de Julho de 2012

---

Assinado por:  
Sueli Godoi



## Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

### COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 032/2012 - CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 05 de julho de 2012

Senhora Pesquisadora

1. Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado: **“Síntese, caracterização e análise de citotoxicidade de nanopartículas de Ferrite de Cobalto”**, parecer 020/2012 foi analisado e considerado **APROVADO**, pelo Comitê de Ética em Uso de Animais de nossa Instituição em Reunião Ordinária no dia 04 de Julho de 2012.
2. Em atendimento à Resolução 196/96 do CNS, deverá ser encaminhado ao CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
  - Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados ao CEUA assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa.
  - Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados ao CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
  - **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise do CEUA.

Pesquisadora: Verusca Cristina Pizzatto Fontanive

Atenciosamente

Prof. Rosilene Rebeca  
**Coordenadora do CEUA/UNICENTRO**  
 Port. 1.983/2011 - GR/UNICENTRO

A SENHORA: Verusca Cristina Pizzatto Fontanive  
 DEFARM: Departamento de Farmácia  
 UNICENTRO

Home Page: <http://www.unicentro.br>

**Campus Santa Cruz:** Rua Pres. Zacarias 875 – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090 – CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR  
**Campus CEDETEG:** Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX: (42) 3629-8100 – CEP 85.040-080 – GUARAPUAVA – PR  
**Campus de Irati:** PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000 – FAX: (42) 3421-3067 – CEP 84.500-000 – IRATI – PR

Protocolo 020/2012

Interessados: Verusca Cristina Pizzatto Fontanive

Prof. Najeh M. Khalil

Orientador: Prof. Luiz Fernando Côtica (UEM)

Avaliador: Prof<sup>a</sup> Giuliana Gelbcke Kasecker Botelho

Título do Projeto: Síntese, caracterização e análise de citotoxicidade de nanopartículas de Ferrite de Cobalto.

Parecer: O projeto tem como objetivo a avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de ferrite de cobalto em camundongos por meio de análises bioquímicas de função renal e hepática, além da avaliação histológica de fígado, baço e rins.

O projeto encontra-se bem fundamentado e a metodologia corretamente justificada. Os objetivos condizem com a hipótese e os métodos experimentais empregados estão de acordo com as diretrizes de bem estar animal.

Com base no relato acima, o projeto fica na situação aprovado.

## GLOSSÁRIO

Biodisponibilidade – fração da dose de um fármaco administrado, não alterado, que atinge a circulação sistêmica.

Gavagem – método de introdução de alimentos líquidos no estômago.

Hemácias – células da série vermelha do sangue.

Leucócitos polimorfonucleados – ou glóbulos brancos, células que circulam no sangue com função de defesa.

PBS – tampão fosfato salino, isotônico.

Sistema Retículo Endotelial – sistema orgânico constituído por células, situadas em diferentes locais no organismo dotadas de capacidade fagocitária, com função de defesa.

Trypan – corante de exclusão.

Turk – corante para contagem de leucócitos.