

# NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS ENCAPSULADAS COM POLÍMEROS PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CÂNCER POR HIPERTERMIA

C. J. Percin<sup>1</sup>, S. A. Yoshioka<sup>1,2</sup>, A. M. de Oliveira<sup>3</sup>, V. A. Chitta<sup>4</sup>; N. N. P. Cerize<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil

<sup>2</sup>Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil

<sup>3</sup>Instituto de Pesquisas Tecnológicas – São Paulo, Brasil

<sup>4</sup>Instituto de Física – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

e-mail: caio.percin@usp.br

**Resumo:** Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro foram sintetizadas por método de coprecipitação e revestidas com os polímeros Eudragit e maltodextrina, através de técnica de secagem empregando o Nano Spray Dryer. As nanopartículas poliméricas superparamagnéticas foram desenvolvidas para aplicação no tratamento de câncer por hipertermia magnética.

**Palavras-chave:** nanopartículas superparamagnéticas, Eudragit, hipertermia magnética, Nano Spray Dryer.

**Abstract:** *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles were synthesized by coprecipitation method and coated with Eudragit and maltodextrin polymers, through drying technique using Nano Spray Dryer. The polymeric magnetic nanoparticles were developed for cancer therapy by magnetic hyperthermia.*

**Keywords:** *superparamagnetic nanoparticles, Nano Spray Dryer, Eudragit, magnetic hyperthermia.*

## Introdução

Um dos mais desafiadores e ainda não resolvidos problemas de saúde da sociedade moderna é o câncer. Apesar das terapias comuns, como cirurgia, quimioterapia, radiação ou combinações delas, estarem em constante aperfeiçoamento, há muitas terapias alternativas promissoras em estudo. Uma delas é a hipertermia, que vem sendo testada clinicamente [1].

A terapia por hipertermia é um tipo de tratamento no qual o corpo ou uma determinada região do corpo é exposto a altas temperaturas. Sua atividade é baseada no fato de que um aumento de temperatura até 42 °C pode induzir a morte de células tumorais [2], ou torná-las mais sensíveis aos efeitos da radiação ou fármacos antitumorais [3], visto que elas são menos resistentes a aumentos bruscos de temperatura do que as células normais ao redor.

O princípio da hipertermia magnética (HT) consiste na administração de um fluido magnético em um tumor com a subsequente aplicação de um campo magnético alternado, que irá promover o aquecimento

da região. Até o momento, a HT é apresentada como uma técnica não invasiva promissora, eficiente em aplicar a hipertermia em tecidos profundos e pouco acessíveis.

Este fluido magnético é composto por nanopartículas magnéticas. Devido a sua biocompatibilidade e baixa toxicidade no corpo humano, nanopartículas de óxido de ferro têm sido muito utilizadas para a aplicação de HT, além de também atuarem como agentes de contraste em ressonância magnética, sistemas de liberação de fármacos, separação magnética de compostos, entre outras [4]. Desde que tenham tamanho até aproximadamente 50 nm, estas partículas apresentam comportamento superparamagnético, ou seja, são fortemente magnetizadas por um campo magnético externo, porém não apresentam magnetização se o campo externo é nulo.

A alta razão entre área de superfície e volume destas nanopartículas resulta em tendência a agregação e a serem absorvidas por proteínas plasmáticas após administração intravenosa, levando a uma rápida remoção pelo sistema reticuloendotelial (SRE). Portanto, as nanopartículas são comumente protegidas com um revestimento polimérico para melhorar sua dispersibilidade e estabilidade [5].

Nanopartículas funcionalizadas com carboidratos, como a maltodextrina, têm o potencial de ultrapassar barreiras biológicas como a membrana plasmática e a barreira hematoencefálica [6], o que permite sua aplicação para o tratamento de glioblastomas, por exemplo. O Eudragit® é um copolímero de ácido metacrílico e metil metacrilato, desenvolvido para sistemas de liberação de fármacos, com cadeias que permite ligações covalentes com outras moléculas de interesse, como fármacos.

Neste trabalho, foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro nanoencapsuladas com os polímeros maltodextrina e Eudragit, através do aparelho Nano Spray Dryer. As partículas foram caracterizadas quanto a tamanho, composição química, perfil cristalográfico, morfologia e propriedade magnética. A expectativa é que essas

nanopartículas poliméricas magnéticas possam ser eventualmente empregadas no tratamento de câncer por hipertermia, através de administração intravenosa e aplicação de campo magnético alternado.

### Materiais e Métodos

Cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto ferroso tetra hidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e  $\text{NH}_3$  (25%), da Merck. Eudragit S100 da Evonik Industries, Maltodextrina da Givaudan e Tween 80 (Polissorbato 80) da Mapric Produtos Farmacocsméticos também foram utilizados. Os reagentes foram utilizados sem mais purificações.

**Síntese de nanopartículas de óxido de ferro** – foi aplicado o método de co-precipitação. Basicamente, 100 mmol (19,89 g) de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 150 mmol (40,55 g) de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foram solubilizados em 140 ml água destilada e 50 ml de  $\text{NH}_3$  foi adicionada gota a gota, em um sistema com agitação mecânica de 300 rpm e aplicação de ultrassom constantes. A adição da base durou 5 min e, após mais 40 min de agitação e sonicação, a suspensão foi coletada e lavada 3 vezes com o auxílio de um ímã para separar magneticamente as partículas. Por fim, a amostra foi seca em estufa.

**Nanoencapsulação** – No caso das partículas com maltodextrina, foi feita dispersão de 100 ml de água com Tween 80, maltodextrina e óxido de ferro, nas proporções 1%, 1% e 0,2% em massa, respectivamente. Para as partículas com Eudragit, a suspensão de 100 ml teve proporção de 0,1% em massa de Eudragit e 0,01% de partículas magnéticas; foi necessário adicionar aproximadamente 1ml de NaOH (1 M) para solubilizar o Eudragit. Primeiramente, as nanopartículas de magnetita secas foram dispersas em água através da aplicação de ultrassom, depois os polímeros foram adicionados e novamente foram aplicados ultrassom e agitação mecânica, para então as dispersões serem utilizadas como fluido de alimentação no Nano Spray Dryer.

**Secagem no Nano Spray Dryer** – os nanoencapsulados foram preparados no Nano Spray Dryer B-90 da marca BUCHI, com as seguintes condições: Temperatura de entrada: 120°C, Temperatura de saída: 54°C, atomização da membrana piezoelétrica: 100%, temperatura do bico: 119°C; pressão: 70 mbar, fluxo de gás: 130 l/min. Finalmente, o particulado gerado foi coletado no compartimento eletrostático.

**Caracterização** – As partículas foram caracterizadas por: Microscopia Eletrônica de Varredura por microscópio de alta resolução (SEM-FEG) da marca FEI, modelo Quanta 3D, e por microscópio da marca LEO, modelo 440, com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.); Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) usando pastilhas de KBr, em um intervalo entre 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 scans, utilizando um equipamento Shimadzu IRAffinity-1; Difração de raios-x (DRX) em um difratômetro de raios-x Shimadzu XRD-6000, com fonte de Co, entre 20° e 80°; e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) em

aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), com as partículas dispersas em água; magnetização por aparelho Cryogenic S600 SQUID Magnetometer, a temperatura fixa de 300 K.

### Resultados

As nanopartículas de óxido de ferro puras foram visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura, como mostra a Figura 1. Observa-se que as nanoestruturas apresentaram-se aglomeradas após o processo de precipitação, quando não têm recobrimento, porém é possível notar que cada uma delas possui diâmetro de aproximadamente 30 nm. Tal fato é confirmado pela medida de DLS das partículas, cujo gráfico de distribuição dos tamanhos pode ser observado na Figura 2. Os picos de diâmetro medidos variaram entre 28 e 50 nm, por 4 medidas (sobreposição obtida a partir de diferentes leituras).

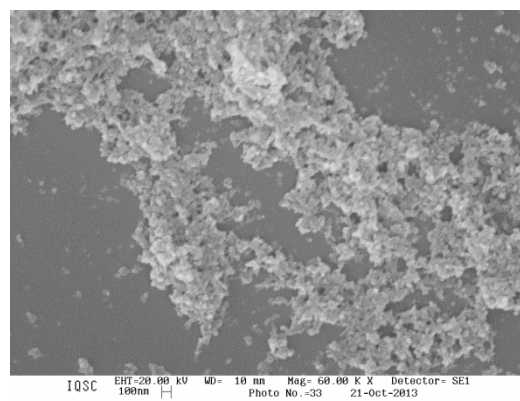


Figura 1 - Nanopartículas de magnetita visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

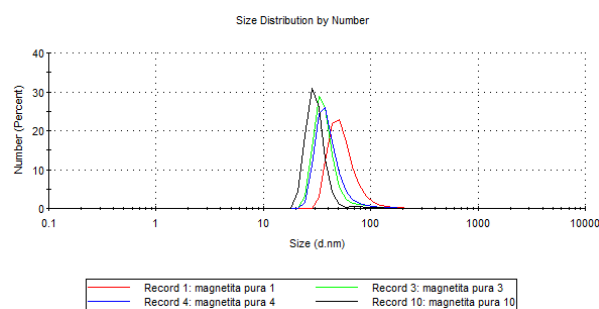


Figura 2 – Gráfico de tamanho das nanopartículas de óxido de ferro obtido por DLS pelo aparelho Zetasizer Nano ZS. A distribuição está em percentual de partículas por diâmetro. As medidas variam entre 28 e 50 nm. O índice de polidispersividade foi de 0,288.

As partículas de óxido de ferro sintetizadas também foram caracterizadas por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR) e por difração de raios-X. O espectro de FT-IR apresentado na Figura 2 mostra pico em torno de 580  $\text{cm}^{-1}$  ( $T=26\%$ ) atribuído ao estiramento da ligação Fe-O das nanopartículas de magnetita e pico largo entre 3300 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  ( $T=50\%$ ), atribuído à presença de O-H preso na mistura, produto da síntese química.

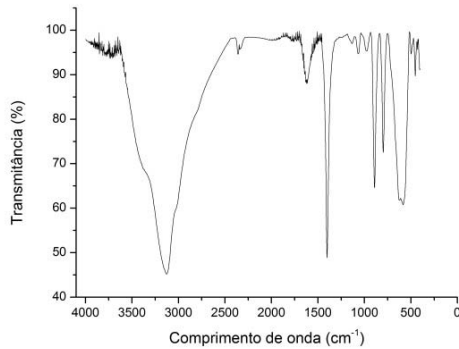


Figura 3 - Espectro de FT-IR das nanopartículas de magnetita.

O espectro de difração de raios-x da amostra de óxido de ferro, registrado na Figura 4, permite a verificação da presença de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), goethita ( $\text{FeOOH}$ ) e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , conforme comparação com biblioteca de dados do equipamento.

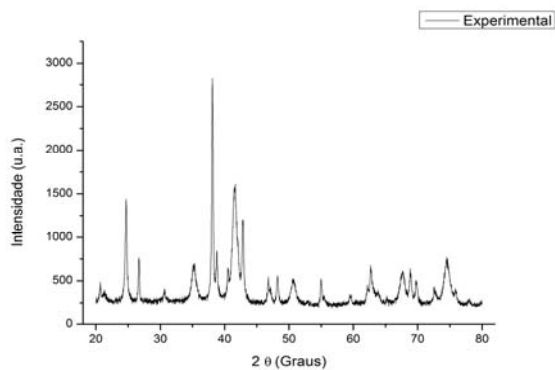


Figura 4 - Espectro de difração de raios-x das nanopartículas de magnetita.

As figuras 5 e 6 são imagens de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas poliméricas magnéticas formadas com o polímero Eudragit. Observa-se a presença de nanopartículas esféricas, de superfície regular, da ordem de aproximadamente 300nm, o que evidencia a formação das nanopartículas poliméricas contendo a magnetita. Não são visualizadas nanopartículas com tamanhos inferiores a 30 nm, com aspecto de contraste escuro da imagem, o que evidenciaria nanopartículas superparamagnéticas não encapsuladas. A figura 6 mostra uma imagem mais aproximada, com ampliação de 25000x, permitindo uma breve avaliação do tamanho das partículas, que varia de aproximadamente 320 a 955 nm. As medidas de DLS destas partículas apresentaram pico principal de 825 nm na distribuição de tamanho, com índice de polidispersividade de 0,346 confirmando os resultados da micrografia de SEM-FEG.

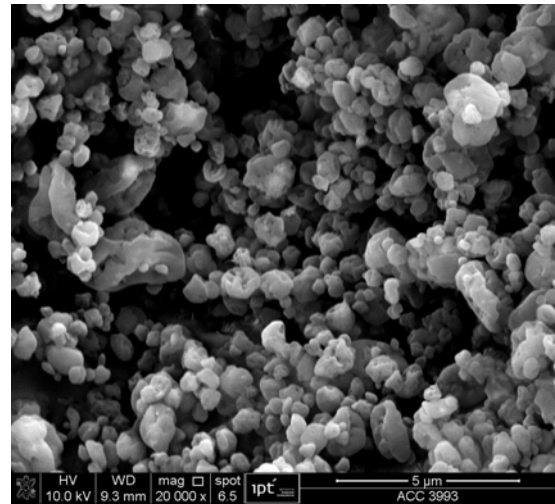


Figura 5 - Imagem de MEV das nanopartículas de magnetita recobertas por Eudragit.

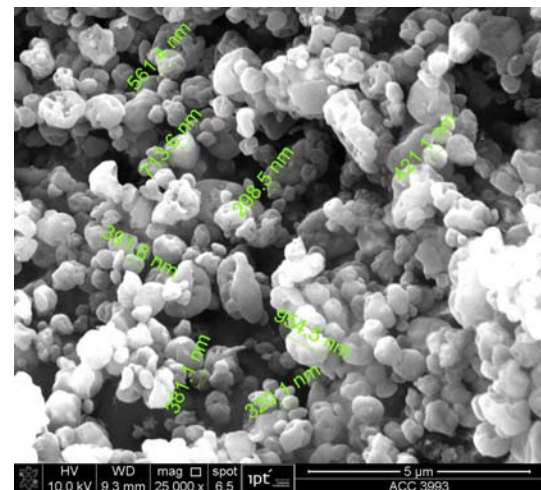


Figura 6 - Imagem de MEV das nanopartículas poliméricas magnéticas formadas por Eudragit, com detalhe do tamanho das partículas, entre 320 e 955 nm.

As nanopartículas de maltodextrina foram caracterizadas quanto ao tamanho por DLS, como mostra a Figura 7. A distribuição de tamanho apresentou diâmetro médio em torno de 255 nm.

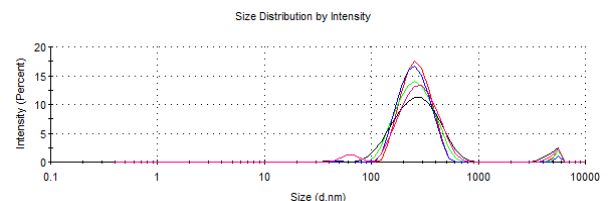


Figura 7 – DLS das partículas de óxido de ferro nanoencapsuladas com maltodextrina. O pico principal apresenta tamanho de partícula em torno de 255 nm. O índice de polidispersividade foi de 0,333.

O gráfico da magnetização das nanopartículas em função do campo magnético externo está apresentado na figura 8. As nanopartículas de magnetita puras e também as nanopartículas poliméricas encapsuladas com Eudragit e maltodextrina contendo magnetita en-

capsulada apresentaram comportamento superparamagnético, visto que não estão magnetizadas quando o campo externo é removido ( $M = 0$  quando  $H = 0$ ). A magnetização de saturação das nanopartículas de magnetita pura foi de 39 emu/g, enquanto das nanopartículas de maltodextrina foi de 2,6 emu/g e das de Eudragit foi de 2,3 emu/g. A magnetização de saturação das nanopartículas reflete a quantidade de óxido de ferro presente nelas e, de acordo com essa premissa, dividimos o valor de magnetização das partículas poliméricas pelo valor de magnetização das nanopartículas de óxido de ferro puras para estimar a porcentagem em massa de óxido de ferro presente nas partículas. Assim, as nanopartículas de maltodextrina apresentaram 6,7% de óxido de ferro, e as de Eudragit, apresentaram 5,9%. Estes valores podem ser utilizados para estimar o rendimento do processo de nanoencapsulação da magnetita por Nanospray dryer, sendo que a porcentagem teórica adicionada foi de 10% de magnetita. Logo, para as nanopartículas de Eudragit obteve-se um rendimento de 59% e para as de maltodextrina o valor foi de 67%.

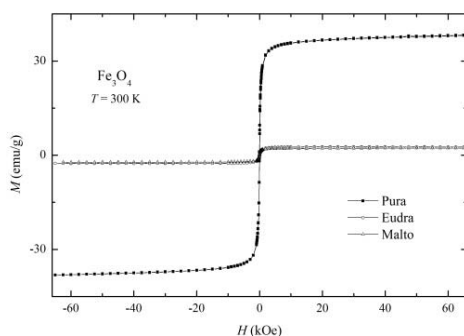


Figura 8 – Gráfico de magnetização das nanopartículas de óxido de ferro puras, das com Eudragit e das com maltodextrina. Valores de magnetização de saturação de 39, 2,3 e 2,6 emu/g, respectivamente. Dados obtidos por aparelho SQUID.

### Discussão

A primeira parte do trabalho foi a síntese das nanopartículas de óxido de ferro por co-precipitação. A rota de síntese foi utilizada para produzir magnetita, porém, como verificado pelo experimento de difração de raios-x, a oxidação do material levou a formação de hematita e goethita, que também são magnéticas e, portanto, isso não confere grandes problemas. O  $\text{NH}_4\text{Cl}$  é um produto da síntese que não pôde ser retirado totalmente nas lavagens e deve ser evitado nas amostras finais, para aumentar a magnetização do produto. O valor da magnetização de saturação está intimamente ligado à capacidade das partículas de gerarem calor, característica determinante para a aplicação aqui requerida das nanopartículas.

O processo de nanoencapsulação polimérica e a formação de material particulado pelo Nano Spray

Dryer foi bem sucedido, como pode ser verificado pelos estudos de magnetização, pelas imagens de MEV e avaliação de tamanho por DLS.

### Conclusão

Neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro encapsuladas com polímeros Eudragit e maltodextrina. As caracterizações das nanopartículas magnéticas quanto ao tamanho, morfologia, composição química e perfil cristalográfico evidenciaram a formação de magnetita, mas também de outros derivados do óxido de ferro. Além disso, foi desenvolvido um método de encapsulação destas nanopartículas pela técnica de nano spray dryer, empregando dois diferentes polímeros. O processo de nanoencapsulação permitiu a formação de partículas poliméricas magnéticas, com potencial para aplicação no tratamento de câncer por hipertermia, em função da biocompatibilidade dos materiais empregados e do potencial de magnetização exibido pelo núcleo, que pode promover aquecimento e efeito de citotoxicidade quando da aplicação de campo magnético alternado.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Capes pela bolsa de mestrado concedida e ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), que possibilitou a parceria através do Programa Novos Talentos.

### Referências

- [1] Hergt R, Dutz S, Muller R, Zeisberger M. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. Em: Journal of Physics-Condensed Matter, v. 18, ed. 38; 2006. p. S2919-S2934.
- [2] Silva et al. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. Em: International Journal of Nanomedicine, v. 6; 2011. p. 591-603.
- [3] Salunkhe AB, Khot VM, Pawar SH. Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review. Em: Current Topics In Medicinal Chemistry, v. 14, ed. 5; 2014. p. 572-594.
- [4] KARAAGAC et al. A Simple Way to Synthesize Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Air Atmosphere: Iron Ion Concentration Effect. Em: IEEE Transactions on Magnetics, v. 46, no. 12; 2010. p. 3978-3983.
- [5] SUN et al. PEG-Mediated Synthesis of Highly Dispersive Multifunctional Superparamagnetic Nanoparticles: Their Physicochemical Properties and Function In Vivo. Em: ACS NANO, v. 4, ed. 4; 2010. p. 2402-2410.
- [6] MOROS et al. Monosaccharides versus PEG-Functionalized NPs: Influence in the Cellular Uptake. Em: ACS NANO, v. 6, ed. 2; 2012. p. 1565-1577.