

Universidade Federal de Itajubá

Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia

Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências

Dissertação de Mestrado

**Síntese e Caracterização de
Microesferas Ferromagnéticas para
Utilização em Hipertermia**

Esdras Duarte dos Passos

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – UNIFEI

Fevereiro 2006

Esdras Duarte dos Passos

**Síntese e Caracterização de Microesferas Magnéticas para
Utilização em Hipertermia**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Universidade Federal de Itajubá, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências dos Materiais para Engenharia.

Área de concentração: Polímeros e Cerâmica.

Orientador: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – UNIFEI

Itajubá
Universidade Federal de Itajubá
2006

Dissertação defendida e aprovada, em 14 de 02 de 2006, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – Unifei

Prof. Dr. Demétrio Artur Werner Soares – Unifei

Prof.. Dr. Olga Zazuco Higa – IPEN-USP

Os meus pais, Daniel e Maura, pelo que me ensinaram a amar e respeitar; minha querida esposa, Tatiane e minhas filhas Byanca e Beatriz pelo amor e confiança; aos meus caros mestres a eterna gratidão pela riqueza dos seus ensinamentos.

Agradecimentos

Aproveito a oportunidade para agradecer a todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial agradeço:

Ao Prof. Dr. Álvaro Antonio Alencar de Queiroz, por sua orientação, amizade, dedicação, paciência e pela formação científica.

Ao Prof. Dr. Demétrio Artur Werner Soares, por sua amizade e pelo desenvolvimento do meu conhecimento teórico e científico.

Ao Prof. Dr. Vitório Alberto De Lorenci, por sua colaboração e apoio na realização deste trabalho.

A Prof. Dr. Olga Zazuco Higa - Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/IPEN-USP, pelos ensaios de citotoxicidade e análise MEV.

Ao professor Dr. Luis Francisco Pontin, pelo desenvolvimento do meu conhecimento teórico e científico.

Ao professor Dr. Sdnei de Brito Alves, pela colaboração com o programa de processamento de imagens.

Ao prof. Dr. Manoel Ribeiro da Silva por sua colaboração nas medidas de magnetização das amostras nos laboratórios do IF/UFRJ.

Aos demais professores do curso de mestrado, pelo desenvolvimento do meu conhecimento teórico e científico.

Aos colegas do curso de Mestrado em Materiais para Engenharia, em especial ao aluno Edson Giuliano pelo auxílio prestado nos procedimentos experimentais.

Aos funcionários da UNIFEI, em especial àqueles do Departamento de Física e Química – Instituto de Ciências, pela colaboração necessária para realização deste trabalho.

A todos os que de alguma forma me auxiliaram neste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	15
CAPÍTULO 1 – GENERALIDADES SOBRE O CANCÊR DE FÍGADO	17
<i>1.1- Introdução</i>	17
<i>1.2- Diagnóstico</i>	19
<i>1.3- Tratamento Clínico</i>	21
<i>1.4- Objetivos deste Trabalho</i>	27
<i>1.5- Conclusões</i>	28
<i>1.6- Referências bibliográficas</i>	29
CAPITULO 2 - O PROCESSO DE CONVERSÃO DE ENERGIA MAGNÉTICA EM CALOR	31
<i>2.1- Introdução</i>	31
<i>2.2- Estrutura dos Materiais Ferromagnéticos baseados na Estrutura Ítria-Ferro-Alumínio (YFeAl)</i>	37
<i>2.3-Conversão de energia magnética em calor</i>	39
<i>2.4-Conclusões</i>	40
<i>2.5-Referências Bibliográficas</i>	41

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E METODOLOGIA EXPERIMENTAL 43

<i>3.1-Síntese de Ferritas de YFeAl</i>	43
<i>3.2- Síntese de Microesferas de PHEMA/YFeAl</i>	48
<i>3.3– Difração de raios-X dos pós-cerâmicos obtidos</i>	52
<i>3.4- Caracterização Magnética das Microesferas de PHEMA/YFeAl</i>	55
<i>3.5- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	56
<i>3.6- Distribuição do tamanho de Partícula</i>	57
<i>3.7- Características Biocompatíveis</i>	59
<i>3.7.1- Citotoxicidade</i>	59
<i>3.7.2- Atividade Inflamatória (Hiperêmica)</i>	61
<i>3.8- Conclusões</i>	63
<i>3.9- Referências Bibliográfica</i>	64

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 66

<i>4.1- Síntese das Ferritas e Caracterização</i>	66
<i>4.2-Síntese das Microesferas Ferromagnéticas de PHEMA/YFeAl e Caracterização</i>	69
<i>4.3- Avaliação da Morfologia e Distribuição de Tamanho de Partículas (SEM)</i>	74
<i>4.4- Caracterização Magnética</i>	77
<i>4.5- Avaliação da Biocompatibilidade</i>	82
<i>4.5.1- Ensaio da citotoxicidade</i>	82

4.5.2- <i>Atividade Hiperêmica</i>	84
4.6- <i>Conclusões</i>	87
4.7- <i>Referências Bibliográficas</i>	88
CAPÍTULO 5 - ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO FÁRMACO	92
5-FU DAS MICROESFERAS DE PHEMA/YFeAl	
5.1- <i>Conclusões</i>	98
5.2- <i>Referências Bibliográficas</i>	99
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES GERAIS	101
CAPÍTULO 7- PERSPECTIVAS FUTURAS	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Agentes quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer de fígado.

Figura 2- Curvas de histerese BxH

Figura 3- Estrutura de Garnet

Figura 4- Seqüência experimental do processo de obtenção de partículas ferromagnéticas.

Figura 5- Forno tubular (Maitec FTE – 1600/H) (A) e pastilhas de *YFeAl* (B).

Figura 6- Processo utilizado para a obtenção de microesferas de PHEMA contendo partículas ferromagnéticas e 5-FU para o tratamento por hipertemia

Figura 7- Mecanismo de reação de polimerização por emulsão de HEMA

Figura 8- Difratorômetro Horizontal D/MAX-2000 IPEN/USP.

Figura 9- Difratorômetro SIEMENS, modelo DMAX 2000.

Figura 10- Diagrama do Magnetômetro de Amostra Vibrante (MAV).

Figura 11- Microscopia Eletrônica de Varredura IPEN/USP.

Figura 12- Sistema para processamento de imagens utilizando um microcomputador com software para análise de imagens.

Figure 13- Micrografia MEV das partículas magnéticas de *YFeAl* sintetizadas neste trabalho (A). A barra corresponde a 100 μm e (B) o histograma correspondente à distribuição do tamanho de partículas.

Figura 14- Difrátogramas de raios-X das ferritas magnéticas de AFO 05 (A), AFO 15 (B), YAFO 10 (C) e YAFO 40 (D).

Figura 15- Ilustração do tumor de fígado, ressaltando o tamanho de veias e artérias bem como a distribuição dos capilares sanguíneos de 4 a 16 μm de diâmetros (A) e (B).

Figura 16- Estrutura interna microesferas ocas de PHEMA. A barra indica 30 μm (A) e sua superfície da microesferas de PHEMA (B).

Figura 17- Micrografia de MEV das microesferas magnéticas da amostra de YAFO 20 20 μm (A) e 100 μm (B).

Figura 18-Distribuição de tamanho das microesferas *PHEMA/YFeAl* obtidas a partir da análise de imagem das micrografias MEV.

Figura 19- Histerese Magnética das Amostras (A) AFO 05, (B) AFO 10, (C) YAFO 15 e (D) YAFO 25.

Figura 20- Energia Magnética ($\text{J}\cdot\text{m}^3$) versus concentração de Ferro ($\text{mol}\%$).

Figura 21- Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) verso a variação de X da equação de estequiométrica (3.2).

Figura- 22 Curva de citotoxicidade das amostras cerâmicas ferromagnéticas.

Figura 23- Variação na concentração de macrófagos no exsudato com o tempo de implantação das microesferas de *PHEMA/YFeAl* (A) e Silicone de grau médico (B).

Figura 24- Atividade extracelular da fosfatase alcalina no exsudato de microesferas de YFeAl (A) e Silicone de grau médico (B) em função do tempo de implante.

Figura 25- Estrutura química do 5-FU.

Figura 26- Representação esquemática de microcápsulas poliméricas: Fármaco dissolvido no interior de microesferas ocas (a), nas paredes de microesferas ocas (b), retido em uma microesfera (c), dispersos molecularmente em microesferas (d).

Figura 27- Liberação do 5-FU em tampão PBS a 37°C de PHEMA/YFeAl microesferas (0,1 mg/g microesferas).

Figura 28- Dependência da liberação do 5-FU de $t^{1/2}$. Solução tampão PBS a 37°C e razão 5-FU/PHEMA-YFeAl microesferas: 0,1 mg/g microesferas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comportamento dos materiais com as grandezas μ e χ .

Tabela 2 - Classificação de acordo com o metal adicional.

Tabela 3 - Quantidade dos óxidos para cada amostra.

LISTA DE SÍMBOLOS

F – Força Colombiana	[N]
k – constante de Boltzmann	[J.K ⁻¹]
μ_0 – Permeabilidade do vácuo	1,260.10 ⁻⁹ [N.A]
e – carga elementar do elétron	1,602.10 ⁻¹⁹ [C]
m – Massa do elétron	9,102. 10 ⁻³¹ [kg]
r - Raio do cilindro	[m]
H – Campo magnético	[A.m ⁻¹]
m - Monopolo magnético	[A.m]
l - Comprimento do cilindro de área de seção transversal A	[m]
E - Energia potencial	[N.m]
M – Magnetização (Polarização magnética)	[A.m ⁻¹]
V - Volume	[m ³]
n - Densidade linear de espiras	[m ⁻¹]
I - Corrente que passa pelas espiras	[A]
B - Força de indução (Densidade de fluxo)	[T]
χ - Susceptibilidade magnética	-
T_c - Temperatura de Curie	[° C]
T - Temperatura de magnetização espontânea,	[° C]
C - Constante de Curie,	-
λ - Constante do campo médio	-
χ_{CW} - Susceptibilidade magnética de Curie-Weiss	-
Fe – Ferro	-
Fe_2O_3 – Óxido de ferro	-

Al – Alumínio	–
Al_2O_3 – Óxido de Alumínio	–
Y – Ítrio	–
Y_2O_3 – Óxido de Ítrio	–
Fe^{+3} – Íon de ferro	–
Al^{+3} – Íon de alumínio	–
Y^{+3} – Íon de ítrio	–
n_D – Índice de difração	–
d_i - Distância interplanar	[m]
θ - O ângulo de difração	[graus]
PSA - Persulfato de amônio	–
TEMED - <i>tetrametil</i> etilenodiamina	–
HEMA - metacrilato de 2-hidroxietila	–
PHEMA- Poli(metacrilato de 2-hidroxietila)	–
MEV – microscopia eletrônica de varredura	–
XDR – Difração de raios-X	–
$NPMs$ – Nanopartículas Magnéticas	–
MAV - Magnetômetro de Amostra Vibrante	–

RESUMO:

Uma variedade de procedimentos clínicos tem sido desenvolvido para a terapia do câncer durante o último século. O tratamento clássico do câncer inclui a retirada total do tumor e tecidos adjacentes em combinação com a quimioterapia, imunoterapia ou tratamento por radiação. O desenvolvimento da hipertermia trouxe um impulso adicional a terapia do câncer. No tratamento através da hipertermia as partículas magnéticas introduzidas nos tumores são aquecidas por indução através de um campo magnético em temperatura moderada (41-43 °C). As temperaturas que excedem 41 °C inativam as células cancerígenas preservando as células normais dos tecidos adjacentes. Devido as suas propriedades biocompatíveis, as microesferas poli (2-hidroxi metilmetacrilato) (PHEMA) e nanoesferas estão entre as mais promissoras transportadoras de partículas magnéticas. Uma importante área de nossa pesquisa de laboratório está focalizada na encapsulação de partículas magnéticas de $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$ (*YFeAl*) usando polímeros biocompatíveis para a produção da hipertermia. Quando microencapsulados os materiais magnéticos são protegidos de uma degradação enzimática extracelular e da citotoxicidade do *YFeAl*, devido a presença do metal. As microesferas poli (2-hidroxi metilmetacrilato) contendo as partículas policristalinas de $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$ ($0 \leq x \leq 2$) foram preparadas pela polimerização da suspensão num grupo de reatores usando persulfato de amônio e etileno glicidil dimetacrilato EGDMA. As microesferas sintetizadas foram caracterizadas por difração de raios-X (XRD) e microscopia eletrônica de varredura (SEM). A temperatura Curie (T_c) foi determinada das medições de sensibilidade magnética nos limites de temperaturas de 223-573 K. A curva derivada para o tamanho da distribuição determinada pela análise de diferencial granulométrico e a micrografia SEM por microesferas *PHEMA/YFeAl* mostraram monodispersibilidades (> 80%). A análise XRD revelou que as amostras de ítrio alumínio ferro garnet apareceram como uma só fase. A micrografia SEM de *YFeAl* revelou a presença de agregados de partículas finas irregulares. A temperatura Curie (T_c) de *YFeAl* estimada das curvas de magnetização decresceu com o conteúdo de alumínio provavelmente devido à redução do número de interação magnética principal. Os valores de T_c para as microesferas PHEMA contendo *YFeAl* nos limites de composição de $1.5 \leq x \leq 1.8$ estavam próximos a temperatura ambiente, indicando que as microesferas sintetizadas são

materiais promissores para o tratamento por hipertermia. A fim de avaliar a possível influência das microesferas *PHEMA/YFeAl* nas células, testes de citotoxicidade foram realizados. Foi observado que as microesferas não afetaram a viabilidade das células ou a taxa de crescimento da cultura celular. Conforme os resultados obtidos neste trabalho, as microesferas *PHEMA/YFeAl* sintetizadas parecem ser um material promissor para o tratamento por hipertermia. As microesferas *PHEMA/YFeAl* modularam a liberação de 5-Fluoruracil (5-FU) das microesferas magnetizadas, evitando as altas concentrações da droga que pode causar severa toxicidade sistêmica. As microesferas carregadas *PHEMA/YFeAl* mostraram uma hiperemia não significante, apresentando uma baixa reação inflamatória após a implantação. Os resultados obtidos neste trabalho são promissores para o projeto do sistema de fornecimento da droga no qual é necessário controlar ambos, a quantidade total da droga liberada e o perfil cinético.

ABSTRACT :

Several different sorts of clinical procedures have been developed to cancer therapy during the last century. The classical cancer treatment includes the total excision of tumor and adjacent tissues in combination with chemotherapy, immunotherapy or radiation treatment. The development of hyperthermia has brought an additional driving force to cancer therapy. In the hyperthermia treatment magnetic particles introduced in the tumors are inductively heated by a magnetic field at moderate temperatures (41- 43 °C). The temperatures that exceed 41 °C inactivate the cancer cells preserving the normal cells of the surround tissues. Due to their biocompatible properties, poly (2-hydroxy methylmethacrylate) (PHEMA) microspheres and nanospheres are among the most promising carriers for the magnetic particles. An important part of our laboratory's research is focused on the encapsulation of the $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$ (YFeAl) magnetic particles by using biocompatible polymers for hyperthermia treatment. When the microencapsulated magnetic materials are protected from extracellular enzymatic degradation and the cytotoxicity of the YFeAl due to metal presence may be avoided. Poly (2-hydroxy methylmethacrylate) microspheres containing the polycrystalline particles of $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$ ($0 \leq x \leq 2$) were prepared by suspension polymerization in a batch reactor using ammonium persulfate and as initiator and the cross-linker ethylene glycidil dimethacrylate EGDMA. The synthesized microspheres were characterized by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM). The Curie temperature (T_c) was determined from magnetic susceptibility measurements in the temperature range of 223-573 K. The derivative curve for the size of distribution determined by differential granulometric analysis and the SEM micrograph for PHEMA/YFeAl microspheres showed good monodispersities (> 80%). The XRD analysis reveals that yttrium aluminum iron garnet samples appear as a single phase. SEM micrograph of YIG reveals the presence of aggregates of irregular fine particles. The Curie temperatures (T_c) of YIG estimated from the magnetization curves decreased with the aluminum content probably due to the reduction of the number of the main magnetic interaction. The T_c values for the PHEMA microspheres containing YFeAl in the composition range of $1.5 \leq x \leq 1.8$ were near to room temperature, indicating that the synthesized microspheres are promissory materials for the hyperthermia treatment. In order

to evaluate the possible influence of the *PHEMA/YFeAl* microspheres on cells, cytotoxicity assay was carried out. It was observed that the presence of the microspheres did not affect the cell viability or the culture growth rate. According to the results obtained in this work, the synthesized *PHEMA/YFeAl* microspheres seems to be promising material for the hyperthermia treatment. The *PHEMA/YFeAl* microspheres modulates the release of the 5-Fluorouracil (5-FU) from magnetic microspheres, avoiding the high concentrations of the drug that may cause severe systemic toxicity. Loaded *PHEMA/YFeAl* microspheres showed a non-significant hyperemia, displaying low inflammatory reaction after implantation. The results obtained in this work are promising according to the design of the drug delivery systems in which is necessary to control both, the total amount of the drug and the kinetic profile.

1 GENERALIDADES SOBRE O CÂNCER DE FÍGADO

1.1 Introdução

O câncer se refere a um grupo de doenças diferentes que possuem algumas importantes características em comum. Todas afetam as células, as unidades básicas da vida.

O corpo humano é feito de vários tipos de células. Normalmente, as células crescem e dividem-se para produzir mais células do que o organismo necessita. Este é um processo muito bem organizado e regulado e que é necessário para manter o corpo sadio. Em determinadas circunstâncias, as células podem dividir-se sem que isto seja necessário e formar uma massa de tecidos chamada de tumor. Os tumores podem ser benignos ou malignos.¹

Os tumores malignos são considerados câncer. As células de um tumor maligno são anormais e divide-se sem controle ou organização. Estas células cancerosas podem invadir e destruir os tecidos em torno delas. Além disso, difundir-se por vasos sanguíneos ou linfáticos, através dos quais podem disseminar-se para outras partes do organismo. Esta disseminação de células cancerosas é chamada de metástase.

Qualquer órgão do corpo pode ser sede de um tumor maligno primário (isto é, originado a partir deste órgão) ou secundário (isto é, uma metástase ou invasão de um tumor originado em outro órgão). Sabe-se que os tumores malignos mais frequentes são os de pele, fígado, pulmão, próstata, estômago, intestino, mama e útero.

O câncer do fígado é o oitavo câncer mais comum no mundo. No Brasil, ele tem uma importância relativa menor, uma vez que não figura entre os dez mais incidentes. Essa doença afeta mais homens do que mulheres. Em 2003, aproximadamente 17 300 novos casos (11 700 homens e 5 600 mulheres). A cada ano, estima-se que 14 400 pessoas morrerão pela doença. A incidência e mortalidade do câncer hepático têm aumentado no mundo, principalmente em alguns países da Ásia e África. Cerca de 4% das mortes por câncer no Brasil, anualmente, são causados por câncer de fígado.²

Apesar de alguns fatores ambientais aumentarem o risco de desenvolver o câncer hepático (por exemplo, exposição a certos produtos químicos e ingestão de alimentos com aflatoxinas) os maiores riscos são a infecção crônica do fígado pelo vírus da hepatite B ou C e a cirrose hepática.

Os três tipos mais comuns de hepatite são a hepatite A, B e C. O vírus da hepatite A não costuma causar infecções crônicas e não está associado ao câncer de fígado. Pessoas infectadas pelo vírus B têm 100 vezes mais chance de desenvolver o câncer hepático. A hepatite viral B ou C é transmitida através de contato com sangue infectado ou outros fluidos corporais, como no contato sexual. A prevenção pode ser feita através de vacinação, no caso da hepatite B. Ainda não existe vacina para a hepatite C.³

O câncer de fígado é dividido em duas categorias: o primário do fígado e o secundário, ou metastático (originado em outro órgão e que atinge também o fígado). O termo 'primário do fígado' é usado nos tumores originados no fígado, como o hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular (tumor maligno primário mais freqüente que ocorre em mais de 80% dos casos), o colangiocarcinoma (que acomete os ductos biliares dentro do fígado), angiossarcoma (tumor do vaso sanguíneo) e na criança o hepatoblastoma.

Apesar de não estar entre as neoplasias mais prevalentes, o câncer hepatobiliar requer alta complexidade no seu diagnóstico e proficiência no tratamento. Porém, de acordo com os dados consolidados sobre mortalidade por câncer no Brasil em 1999, o câncer de fígado e vias biliares ocupava a sétima posição, sendo responsável por 4.682 óbitos.

O sudeste da Ásia, Japão e África do Sul apresentam uma incidência particularmente alta de carcinoma hepatocelular, enquanto que nos Estados Unidos, Grã Bretanha e região norte da Europa é raro encontrar este tipo histológico de tumor, observando-se taxas inferiores a 1 por cada 100 mil habitantes.⁴

O carcinoma hepatocelular ocorre em uma freqüência três vezes maior em homens do que em mulheres. A faixa etária, com maior predomínio nos Estados Unidos e Europa, está localizada entre 60 e 70 anos, enquanto que, nas áreas de grande incidência, o tumor ocorre em pacientes mais jovens, entre 30 e 50 anos. A forma fibrolamelar do carcinoma hepatocelular acomete pacientes mais jovens (5-35 anos) e, quando ressecável, o seu

prognóstico é tido por alguns como melhor em comparação com os outros hepatocarcinomas.⁵

Estudos de necrópsia mostraram que pacientes que morrem de alguma forma de câncer podem apresentar metástase para o fígado em até 35% das vezes durante o curso da doença. Os tipos que mais dão metástase para o fígado são: o carcinoma do pâncreas, o carcinoma colo-retal, o carcinoma de estômago, o carcinoma da mama, o carcinoma do esôfago, o carcinoma do pulmão e o tumor carcinóide.

A cirrose ocorre quando as células do fígado são destruídas e são substituídas por um tecido cicatricial. A maioria dos casos de cirrose são consequência do uso abusivo de bebidas alcoólicas. Outras causas incluem, hepatites virais, a hemocromatose (doença onde ocorre excesso de ferro no fígado) e alguns casos mais raros de doenças crônicas do fígado.⁶

1.2- Diagnóstico

Chama muita atenção no diagnóstico do câncer do fígado o pequeno tempo de evolução, ou seja, o paciente apresenta uma doença geralmente muito avançada ao diagnóstico com um tempo de evolução da sintomatologia muito curto. O tempo que o tumor leva para duplicar o volume de massa tumoral é muito curto em comparação com outros tumores, sendo em média de 4 meses no hepatocarcinoma.¹⁻⁷

A maioria dos pacientes apresenta alguma anormalidade dos níveis das bilirrubinas, fosfatase alcalina e transaminases. Em pacientes sabidamente cirróticos, o aumento brusco da fosfatase alcalina, seguida de pequena elevação das bilirrubinas e transaminases, é sugestivo de malignidade. A alfafetoproteína sérica se apresenta elevada em 75% a 90% dos pacientes com carcinoma hepatocelular. O tipo fibrolamelar não está associado a altos níveis de alfafetoproteína.²⁻⁹

Nos pacientes de alto risco, a identificação precoce do carcinoma hepatocelular poderá ser realizada facilmente através da dosagem de alfafetoproteína sérica e ultrassonografia hepática. A exatidão da ultrassonografia na identificação de pequenos tumores aumentou de 25% para 90% nos últimos 10 anos. Nos tumores metastáticos colo-

retais, pode-se notar em geral um aumento exacerbado da dosagem do antígeno carcinoembrionário (CEA).¹⁰

Dos exames laboratoriais a dosagem de alfafetoproteína é a que mais auxilia no diagnóstico do hepatocarcinoma. É uma substância secretada pelo fígado durante o período fetal e que após o nascimento para de ser produzida. Alguns tumores hepáticos e tumores testiculares podem produzir essa substância que é detectada no sangue o que ajuda o médico no diagnóstico. No hepatocarcinoma está aumentada em até 70% das vezes. Esse aumento é mais comum nos pacientes cirróticos e nos pacientes com tumores maiores. Também pode estar elevada em doenças benignas como nas doenças crônicas e hepatites. Os exames da função hepática são importantes para a quantificação da reserva funcional hepática de cada paciente, ou seja, quanto de fígado bom o paciente ainda tem, para que se possa programar melhor o tratamento.¹¹

A tomografia computadorizada, quando realizada com contraste endovenoso dinâmico, isto é, com cortes sem contraste, com contraste no tempo arterial e supra-hepático, consegue identificar lesões neoplásicas do fígado com exatidão de 75% a 90%. Porém, lesões menores do que 3 cm têm a sua detecção prejudicada devido à isodensidade do parênquima hepático normal.

O exame através da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) não apresenta grande diferença em relação ao estudo pela Tomografia Computadorizada, quanto à capacidade de identificar os tumores hepáticos primários ou metastáticos. Este exame pode definir um pouco melhor a extensão do tumor nos pacientes com cirrose hepática, assim como demonstrar os vasos principais sem a necessidade de administração de contraste venoso e diferenciação de lesões císticas.¹²

A laparoscopia permite uma visualização direta e a biópsia do tumor, além de avaliar a presença ou ausência de disseminação peritoneal. Sua eficácia aumenta quando associada à ultrassonografia videolaparoscópica.

A colangiressonância, a colangiogramia, a colangiografia endoscópica retrógrada ou percutânea transhepática podem ser úteis no diagnóstico e no planejamento do tratamento dos tumores, principalmente das vias biliares.¹³

1.3- Tratamento Clínico

A cirurgia, radioterapia e quimioterapia podem ser usadas para tratar os tumores hepáticos. O tipo de tratamento selecionado para cada paciente depende de alguns fatores tais como: se o tumor está limitado ao fígado, se está limitado à área onde se iniciou ou se espalhou por todo o fígado.

O tratamento cirúrgico é o que oferece a melhor chance de cura. Consiste na remoção de parte do fígado onde está localizado o tumor com uma margem de segurança tal que a parte remanescente do fígado tem a capacidade de se regenerar o que ajuda na recuperação funcional do fígado. No entanto, de acordo com a reserva funcional hepática do paciente, sabe-se até quanto do fígado pode ser retirado sem que acarrete uma insuficiência hepática no pós-operatório. Em alguns casos existe a necessidade do transplante hepático. Este procedimento só pode ser feito se o câncer está confinado no fígado e se existe um doador compatível.

A quimioterapia consiste na aplicação de drogas que inibem a formação e proliferação de células tumorais. Pode ser usada pela via sistêmica, quando é aplicada numa veia sistêmica periférica ou central que levam a droga para o coração que bombeia para todo o organismo inclusive o fígado. Também pode ser administrado diretamente na circulação hepática colocando-se um cateter na artéria hepática através de punção percutânea auxiliadas por técnicas de angiografia ou por colocação cirúrgica.

A quimioterapia faz uso de medicamentos para matar as células cancerosas. O paciente pode receber uma droga ou uma combinação delas. O tratamento dos tumores hepáticos é basicamente cirúrgico, porém ela é possível em uma pequena parcela dos pacientes. Existem alguns tratamentos paliativos, isto é, que melhoram sintomas, mas não aumentam o tempo de sobrevivência do paciente.

Na quimioterapia a droga mais ativa até o momento é a Doxorrubicina, para o tratamento de tumores primários e as taxas de resposta giram em torno de 10%. O 5-fluoracil, por via sistêmica é a droga mais comumente utilizada de forma isolada ou em associação com o ácido fólico e a cisplatina com respostas em torno de 20% a 30%. A quimioterapia intra-arterial hepática possibilita maior concentração da droga no fígado com

menor efeito tóxico sistêmico. Por esta via, o (+)-5-Fluoro-2'-deoxiuridina (FUDR) tem sido a droga mais empregada no tratamento do câncer de fígado.

A cisplatina (*cis* - diaminodicloroplatina II) foi sintetizada pela primeira vez em 1845, sendo constituída por um complexo de metal pesado, com dois átomos de cloro e duas moléculas de amônia na posição *cis* e tem sido considerada como a principal representante de uma classe de potentes agentes antineoplásicos, os complexos coordenados de platina (Figura 1). Este antineoplásico é efetivo na quimioterapia quando administrado por via intraperitoneal ou intravenosa. A cisplatina tem apresentado potencial terapêutico em grande variedade de neoplasias humanas. A cisplatina pode reagir com muitas estruturas celulares e moléculas, tais como membranas, proteínas e RNA, mas o alvo principal é o DNA.

Embora a cisplatina seja um dos agentes antineoplásicos mais eficazes no tratamento de vários tipos de tumores, a sua utilidade clínica está limitada devido ao surgimento de efeitos colaterais. Estes efeitos colaterais são náusea e vômito, hipomagnesemia, supressão da medula óssea, ototoxicidade, entretanto, o principal é a nefrotoxicidade.

Os efeitos adversos da cisplatina são atribuídos às alterações das funções renais, especialmente na indução de danos nos túbulos proximais. Estes danos causam uma diminuição na capacidade de filtração do rim com o conseqüente decréscimo do clearance da creatinina¹. Além disso, a nefrotoxicidade provocada pela cisplatina é caracterizada por alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais. A ação da cisplatina sobre as funções renais tem sido extensivamente investigada em mamíferos. O mecanismo pelo qual os compostos de platina induzem danos nas células renais ainda não está completamente esclarecido. Entretanto, a produção de radicais livres de oxigênio nas células tubulares dos rins, tem sido considerada um processo patológico importante na nefrotoxicidade provocada pela cisplatina. Alguns autores têm sugerido que o estresse oxidativo induzido pela cisplatina nos rins está associado com a toxicidade deste antineoplásico e que a peroxidação dos lipídios é um dos mecanismos envolvidos na sua nefrotoxicidade.

A aplicação de quimioterápicos direto na artéria hepática tem menos efeitos colaterais do que a sistêmica, uma vez que uma quantidade menor da droga chega a outros

tecidos. Desta maneira, a melhor indicação da quimioterapia é para o tratamento de tumores avançados limitados ao fígado. Para doença metastática, a quimioterapia sistêmica é mais bem indicada, já que por essa via circula em doses adequadas no fígado e nos outros tecidos onde se encontram as metástases. A Figura 1 mostra os principais agentes quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer.

Associado à utilização da quimioterapia pode-se empregar a quimioembolização onde sistemas de liberação controlada de fármacos são infundidas até que haja uma estagnação do fluxo arterial para o tumor, havendo ao mesmo tempo, um aumento da concentração local da droga com simultânea isquemia e necrose do tumor.

A radioterapia nos tumores hepáticos é limitada pela baixa tolerância do parênquima hepático à radiação. A dose tolerada fica abaixo da necessária para uma efetiva ação antitumoral e controle da lesão, mas acarreta alívio temporário de sintomatologia. É necessário avaliar os riscos de lesão do parênquima hepático normal: o que limita significativamente o emprego desta técnica.¹³⁻¹⁴

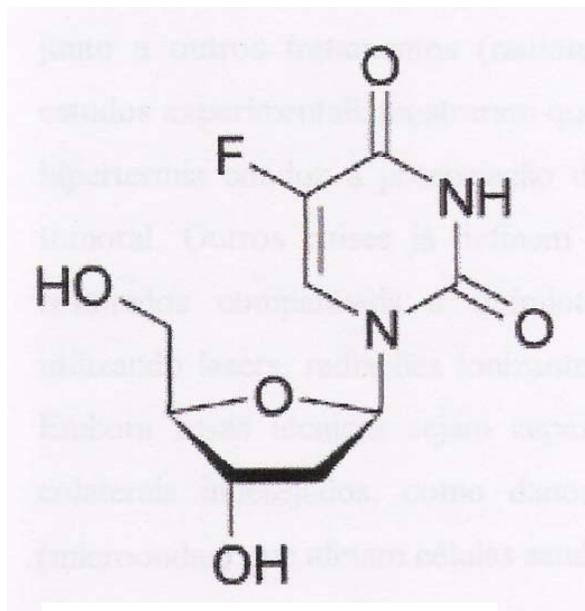
Uma técnica que trouxe perspectivas promissoras para o tratamento do câncer de fígado é a hipertermia. Desde 1860, a hipertermia tem sido usada como uma modalidade terapêutica para tumores. Neste tempo, foi notado que sarcomas faciais regrediam após quadros febris prolongados. Os estudos iniciais em seres humanos foram realizados em tumores cutâneos como carcinomas de células escamosas e melanomas malignos.

A hipertermia é definida como uma elevação da temperatura acima da temperatura normal. O mecanismo pelo qual a hipertermia atua ainda é desconhecido na literatura, mas sabe-se que quando a temperatura ultrapassa 41 °C, as enzimas sofrem desnaturação, a função das mitocôndrias é comprometida, as membranas celulares desestabilizam-se e as vias metabólicas dependentes de oxigênio são perturbadas concomitantemente com a taxa de morbidade e mortalidade celular.

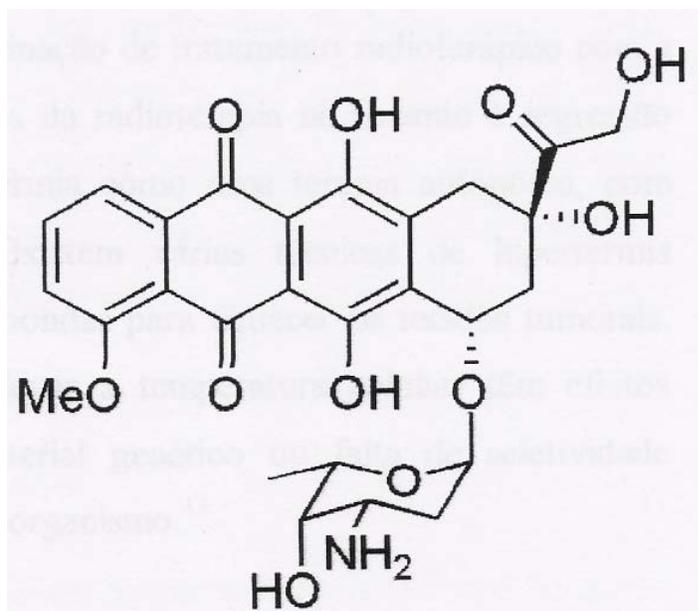
A maior sensibilidade de células hipóxicas, a termosensibilidade das células tumorais devido ao baixo pH e o fluxo reduzido de sangue nas células tumorais tornam a hipertermia um procedimento potencialmente útil quando a técnica é utilizada simultaneamente com agentes quimioterápicos ou radioterapia.

A principal limitação da hipertermia é a produção de fontes de calor. Os principais métodos de produção de calor no nível da área tratada são a irradiação do tumor com radiação eletromagnética de alta frequência (300 a 2450 MHz), baixa frequência (0,1 a 27 MHz), ultra-som (0,3 a 3 MHz) e lasers na região do infravermelho.¹³

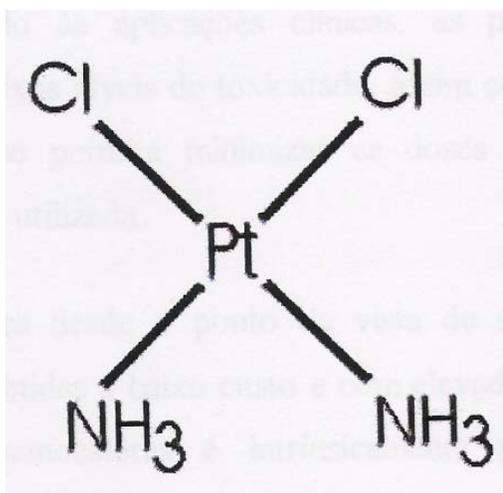
Uma técnica interessante para a produção de calor na região tumoral é a hipertermia magnética. O processo de hipertermia magnética está relacionado com a dissipação de energia quando um material ferromagnético é submetido a um campo externo variável no tempo. O objetivo da hipertermia magnética é a citólise dos tecidos tumorais através da hipertermia local, *via* aplicação remota de um campo magnético variável no tempo sobre monodomínios magnéticos previamente ligados às células cancerígenas. Neste caso, os efeitos de aquecimento em partículas magnéticas são devidos às perdas magnéticas (perdas de Néel) ou dissipação da energia durante a rotação da partícula no líquido (perdas de Brown).



(+)-5Fluoro-2'-deoxiuridina



Doxorrubicina



Cisplatina

Figura 1- Agentes quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer de fígado.

A Hipertermia Magnética é geralmente utilizada como terapia suplementar junto a outros tratamentos (radioterapia, por exemplo), sendo que na Holanda, os estudos experimentais mostraram que a combinação de tratamento radioterápico com a hipertermia conduz à potenciação dos efeitos da radioterapia no tocante à regressão tumoral. Outros países já definem a hipertermia como uma terapia autônoma, com resultados comparáveis à quimioterapia. Existem várias técnicas de hipertermia utilizando lasers, radiações ionizantes e microondas para aquecer os tecidos tumorais. Embora essas técnicas sejam capazes de elevar a temperatura celular, têm efeitos colaterais indesejados, como danos no material genético ou falta de seletividade (microondas) que afetam células saudáveis do organismo.¹⁵

O recente desenvolvimento de métodos de síntese de partículas magnéticas elevou a técnica da hipertermia da simples especulação teórica para a condição de tratamento complementar à radioterapia ou quimioterapia. Surge então uma nova estratégia nas ciências biomédicas para o controle/tratamento do câncer: a elevação da temperatura local da célula tumoral com o auxílio de materiais magnéticos biocompatíveis cujas aplicações terapêuticas estão em plena fase de expansão.

Visando às aplicações clínicas, as partículas magnéticas utilizadas devem apresentar baixos níveis de toxicidade, assim como um elevado momento de saturação magnética que permita minimizar as doses eletromagnéticas requeridas quando a radioterapia é utilizada.¹⁶

Embora desde o ponto de vista de sua produção, as partículas magnéticas possam ser obtidas a baixo custo e com elevada pureza, sua fabricação na topologia de microesferas/nanoesferas é intrinsecamente problemática, pois a elevada relação superfície/volume faz com que os efeitos da desordem superficial sejam dominantes. Neste sentido, o estudo de processos de síntese de encapsulamento de partículas magnéticas no nível de microesferas/nanoesferas é de fundamental importância para a obtenção de sistemas implantáveis para o tratamento de tumores por hipertermia.

1.4- Objetivos deste Trabalho

O desenvolvimento de novos materiais ferromagnéticos de baixa citotoxicidade, capaz de transformarem a energia magnética estocada em calor parece ser uma alternativa interessante no que tange ao desenvolvimento de novos materiais para utilização em hipertermia. Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho é a síntese de cerâmicas ferromagnéticas do tipo *YFeAl* com temperatura de Curie suficientemente baixa para utilização na técnica de hipertermia.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- (a) Investigar a síntese de partículas magnéticas de Ítria-Ferro-Alumínio (*YFeAl*) com baixa temperatura de Curie.
- (b) Desenvolver metodologias para o encapsulamento de partículas magnéticas de *YFeAl* em microesferas de Poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (PHEMA).
- (c) Obter um sistema de liberação controlada de fármacos para utilização na hipertermia magnética.
- (d) Investigar o comportamento biocompatível das microesferas magnéticas de *PHEMA/YFeAl* sintetizadas neste trabalho.

1.5- Conclusões

O hepatocarcinoma é uma das principais causas de morte por câncer em todo o mundo, sendo observado nas últimas décadas um rápido crescimento desta enfermidade. Uma das causas do preocupante avanço do câncer de fígado parece ser o aumento da incidência de infecção crônica causado pelo vírus da hepatite C. Várias estratégias clínicas foram desenvolvidas para o tratamento do câncer de fígado destacando-se de maneira clássica, a radioterapia e a quimioterapia. Entretanto, os efeitos colaterais associados aos tratamentos clássicos como as toxicidades inerentes aos fármacos utilizados ou a baixa eficiência da radioterapia incentivam a busca de métodos alternativos para o tratamento do câncer do fígado.

A hipertermia magnética aparece como uma terapia suplementar bastante interessante e cujos resultados iniciais apontados pela literatura nos incentivaram a buscar processos de síntese de partículas magnéticas de baixa toxicidade que pudessem contribuir para sua utilização em oncologia, particularmente no tratamento do câncer de fígado.

O presente trabalho se propõe a estudar a síntese de microesferas magnéticas de poli(metacrilato de 2-hidroxieta) (PHEMA) biocompatíveis e cuja temperatura de transição de Curie seja suficientemente baixa para sua aplicação na técnica da hipertermia. Adicionalmente, investigamos a liberação do quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) incorporados nas microesferas e cuja contribuição à técnica da hipertermia magnética pode ser de extrema significância no que tange à sua utilização em oncologia.

1.6- Referências Bibliográficas

- [1] DEVITA V. *Principles and Practice of Oncology*. Cancer, Lippincott-Raven, 6th edition, 2001
- [2] KUMAR V.; COTRAN R. S.; ROBBINS S. L., *Patologia Básica*, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 1991.
- [3] DJULBEGOVÍĆ B.; LIVINGSTONE C., *Decision-Making in Oncology. Evidence-Based Management*. enjamin Djulbegović. hurchill, 1st edition, 1997.
- [4] *What You Need to Know About Cancer* - Scientific American Special Issue. September 1996.
- [5] *The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*. American Cancer Society - Informed Decisions. Gerald Murphy. Viking, 1st edition, 1997.
- [6] BISHOP J. M., *Scientific American Molecular Oncology*.. Scientific American Inc, 1996.
- [7] ANTONY P.P., *Precursor lesions for liver cancer in humans*. *Cancer Res.*,36:2579-2583,1976.
- [8] BEASLEY, R. P., Lin, C., Hwang l., et al.: *Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus*: A prospective study of 22, 707 men in Taiwan. *Lancet*,1:1129-1133, 1981.
- [9] LUTWICK L. I., *Relation Ship between aflatoxins and hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma*. *Lancet*, 1:755, 1979.
- [10] ROSENBERG B. *Fundamental studies with cisplatin*. *Cancer* 1985; 55(15):2303-15.

- [11] JONES T.W.; CHOPRA S.; KAUFMAN J.S., FLAMENBAUN W.; TRUMP B., *Cis-diamminedichloroplatinum(II) induced renal failure in the rat. Correlation of structural and functional alterations*. Lab Invest 1985; 52(2):363-74.
- [12] CHOIE DD, LONGNECKER DS, DEL CAMPO A. *Acute and chronic cisplatin nephropathy in rats*. Lab Invest 1981; 44(5):397-402.
- [13] KLAHR S. *Oxygen radicals and renal diseases*. Miner Electrolyte Metab 1997; 23(3):40-3.
- [14] OVERGAARD J, OVERGAARD M. *Hyperthermia as an adjuvant to radiotherapy in the treatment of malignant melanoma*. Int J Hyperthermia 1987;3:483-501.
- [15] KIM JH, HAHN E., TOKITA N, NISCE LZ. *Local tumor hyperthermia in combination with radiation therapy*, Malignant cutaneous lesions. Cancer 1977;40:16-9.
- [16] KIM JH, HAHN E., TOKITA N. *Combination hyperthermia and radiation therapy for cutaneous malignant melanoma*. Cancer 1978;41:2143-8.

2 – O PROCESSO DE CONVERSÃO DE ENERGIA MAGNÉTICA EM CALOR

2.1- Introdução

A energia magnética estocada em um material magnético deve-se à orientação de dipolos magnéticos quando estes estão sujeitos à ação de um campo magnético.

Os pólos magnéticos são os equivalentes as cargas elétricas, conhecidas também como monopólos magnéticos. Sua existência não é estabelecida experimentalmente apesar de décadas de tentativas de sua detecção. Ocorrem sempre aos pares *N* e *S*, e na superfície da amostra. Apesar de não existirem, o conceito é muito útil em cálculos de fenômenos relacionados à estrutura de domínios magnéticos em materiais. A força magnética criada por um pólo magnético pode ser definida através do equivalente da lei de Coulomb, pela força (*F*) entre dois pólos m_1 e m_2 , que ocorrem entre dois magnetos cilíndricos:¹

$$F = k \frac{m_1 m_2}{r^2} \quad (1)$$

sendo $k=10^{-7}$ [N.A⁻²]

Assim, um pólo magnético cria um campo ao seu redor responsável por exercer a força em outro pólo magnético que esteja nas proximidades. Esta força é proporcional ao campo ou à intensidade do campo magnético *H* através da expressão:

$$\vec{F} = m\vec{H} \quad (2)$$

sendo *H* medido em A/m no SI e em Oersteds (Oe) no cgs.

Considerando o sistema com geometria cilíndrica, o momento de dipolo magnético $\vec{\mu}$, pode ser definido por:

$$\vec{\mu} = m\vec{l} \quad (3)$$

sendo m o pólo magnético e l o comprimento do cilindro de área de seção transversal A .

Um momento magnético situado em um campo \vec{H} esta sujeito a um torque, sendo a energia potencial (E) associada dada por:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{H} \quad (4)$$

Na pratica trabalha-se com amostras macroscópicas compostas de vários momentos magnéticos. Definimos então a *Magnetização* (\vec{M}) como sendo a soma de todos os momentos magnéticos elementares divididos pelo volume que ocupa (grandeza intensiva). Neste caso, M é dado por:

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum \vec{\mu}_i \quad (5)$$

A expressão (2) define o campo magnético solenoidal, por ser o produzido no laboratório por solenóides. Para um solenóide muito longo, no centro das espiras tem-se que:

$$B = \mu_0 nI \quad (6)$$

sendo n é a densidade linear de espiras e I a corrente que passa pelas espiras.

Considerando-se as linhas de indução magnética o campo magnético, representado pelas linhas de força de indução (B) ou densidade de fluxo é dado por:

$$\vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{M}) \quad (7)$$

sendo a unidade de B no SI o Weber/m² ou Tesla.

A razão entre B e H é denominada permeabilidade magnética (μ):

$$\mu = \frac{B}{H} \quad (8)$$

A susceptibilidade magnética (χ), é a grandeza que caracteriza um material magnético segundo sua resposta a um campo magnético aplicado, que pode ser estático (corrente contínua no solenóide) ou dinâmico (corrente alternada no solenóide). Muitas vezes, os materiais apresentam uma resposta não linear, de modo que se deve tomar o limite nulo da excitação (campo aplicado), ou seja:

$$\chi_{DC} = \lim_{H \rightarrow 0} \frac{M}{H} = \frac{\partial M}{\partial H} \quad (9)$$

Na prática utilizam-se campos estáticos pequenos o suficiente para se obter uma boa relação sinal/ruído, ou mede-se com pequenas excitações alternadas, utilizando

detecção síncrona. Neste caso diz-se que a susceptibilidade é alternada ou simplesmente susceptibilidade.

As grandezas μ e χ podem ser utilizadas para a caracterização dos materiais quanto às suas propriedades magnéticas. De maneira geral os principais tipos de comportamentos magnéticos conhecidos nos materiais são:

Tabela 1- Comportamento dos materiais com as grandezas χ e μ .

<i>Material</i>	X	μ
<i>Diamagnético</i>	<0	<1
<i>Paramagnético</i>	>0	>1
<i>Ferromagnético</i>	>>0	>>1
<i>Ferrimagnético</i>	>>0	>>1
<i>Antiferromagnético</i>	>0	>1

A caracterização dos materiais magnéticos envolve uma série de técnicas experimentais sendo a magnetização e a susceptibilidade magnética as mais importantes.

Em geral mede-se a magnetização em função do campo magnético aplicado à temperatura constante. As curvas obtidas denominam-se isotermas de magnetização $(M \times H)_T$.

De particular interesse neste trabalho são os materiais ferromagnéticos por ter um efeito magnético forte, capazes de produzir energia magnética em presença de um campo magnético oscilante, suficiente para obter temperatura desejável no interir de tecidos cancerígenos e a magnetização cessa acima de certa temperatura, chamada temperatura de Curie (T_c). Por estes motivos, materiais do tipo *YFeAl* podem ter sua temperatura de Curie moduladas para utilização na técnica de hipertermia.

O ferromagnetismo é caracterizado por uma magnetização espontânea do material a temperaturas abaixo de uma certa temperatura crítica. Isto é observado mesmo na ausência de um campo magnético aplicado ao material em questão. Esta situação sugere que os *spins*

dos átomos (ou moléculas) que constituem o material tenham uma forte tendência em alinhar-se uns aos outros, dando origem a um momento magnético espontâneo. Esta orientação espontânea tende a desaparecer gradualmente à medida que o sistema é aquecido. Neste caso, os *spins* tendem a um estado de desordem. A temperatura crítica T_c para a qual a magnetização espontânea desaparece, isto é, ocorre a transição entre "ordem" e "desordem", é chamada Temperatura de Curie.

A equação proposta para a razão entre a magnetização (M) e o campo magnético aplicado (H) em função da temperatura é definido como a susceptibilidade magnética de Curie-Weiss (χ_{CW}):²

$$\chi_{CW} = \frac{M}{H} = \frac{C}{(T - C\lambda)} = \frac{C}{(T - T_c)} \quad (10)$$

Sendo T temperatura de magnetização espontânea, C constante de Curie, λ constante do campo médio e T_c temperatura de Curie.

Neste caso, o ferromagnetismo é caracterizado em um material quando $\lambda > 0$. Quando $T \ll T_c$ os momentos magnéticos (μ_I) de um ferromagneto estão praticamente todos alinhados na escala microscópica. No entanto, numa amostra macroscópica, o momento magnético é muito menor do que o de saturação, sendo necessário a aplicação de um campo externo para saturar a amostra. Isto ocorre tanto em materiais policristalinos quanto em monocristais.

A explicação é que cada cristal é composto de pequenas regiões chamadas de domínios magnéticos, em que todos os μ_I 's estão alinhados, dando um momento magnético total de cada domínio grande, mas fazendo-se a soma sobre todos os domínios fica próximo de zero. Diz-se então que a amostra se encontra desmagnetizada.

A caracterização macroscópica dos materiais ferromagnéticos é feita através das curvas de magnetização ($M \times H$) ou de Indução ($B \times H$), que normalmente apresentam uma histerese e por isto são também conhecidas por curvas de histerese. A medida experimental de $M \times H$ é ilustrado na Figura 2.

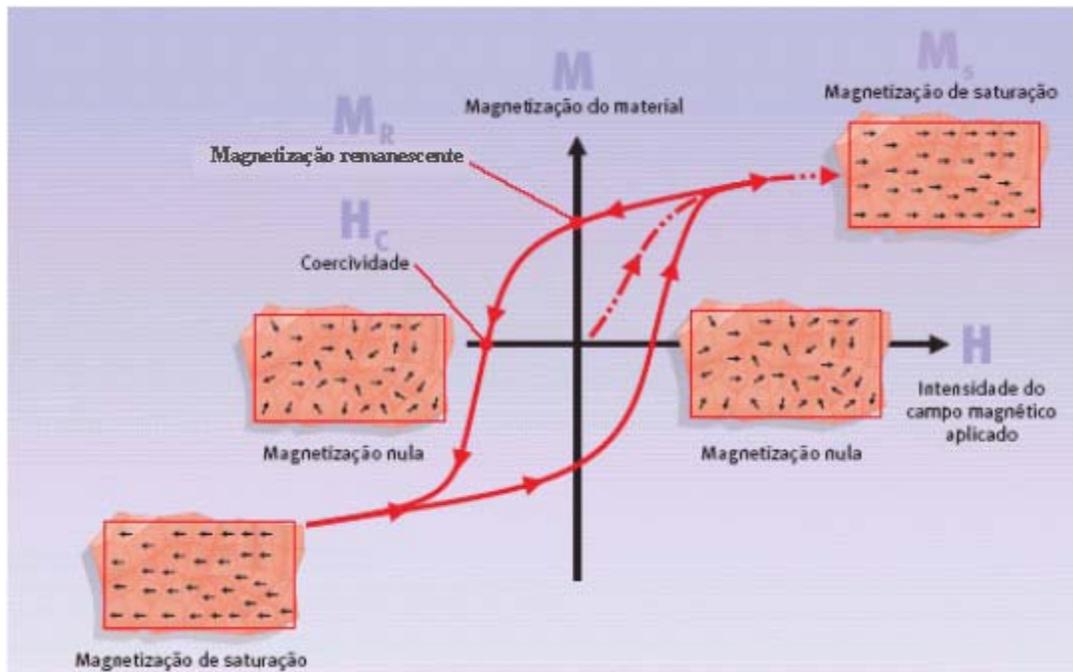


Figura 2: Curvas de histerese BxH.³

O ciclo de histerese como ilustrado na Figura 2 de um material magnético é obtido ao aplicar sobre ele um campo magnético e medir sua resposta (magnetização). O campo inicialmente é nulo e é aumentado gradativamente (linha tracejada), até o material não mudar mais sua magnetização com a aplicação de campo (magnetização de saturação). Depois, ele é reduzido até atingir o valor nulo novamente. Entretanto, após a aplicação do campo, geralmente o valor da magnetização não é o mesmo da magnetização inicial, sendo chamada magnetização remanescente (MR) ou simplesmente remanência. O sentido do campo é, então, invertido e vai sendo aumentado mais uma vez. O campo reverso necessário para fazer com que a magnetização retorne ao valor nulo é conhecido como campo coercivo ou coercividade (H_c). O campo continua sendo aumentado até, o material alcançar novamente o valor de saturação no sentido inverso. O campo é posteriormente reduzido e mais uma vez invertido, até fechar o ciclo

A área sob a curva é o trabalho magnético (W_H) relacionado ao alinhamento/desalinhamento dos pólos magnéticos no material. Neste caso, através do cálculo de integração da área da histerese magnética, obtém-se a energia magnética como mostra a Equação 14.

$$W_H = \oint H \cdot dB \quad (11)$$

2.2-Estrutura dos Materiais Ferromagnéticos baseados na Estrutura Ítrio-Ferro-Alumínio (*YFeAl*)

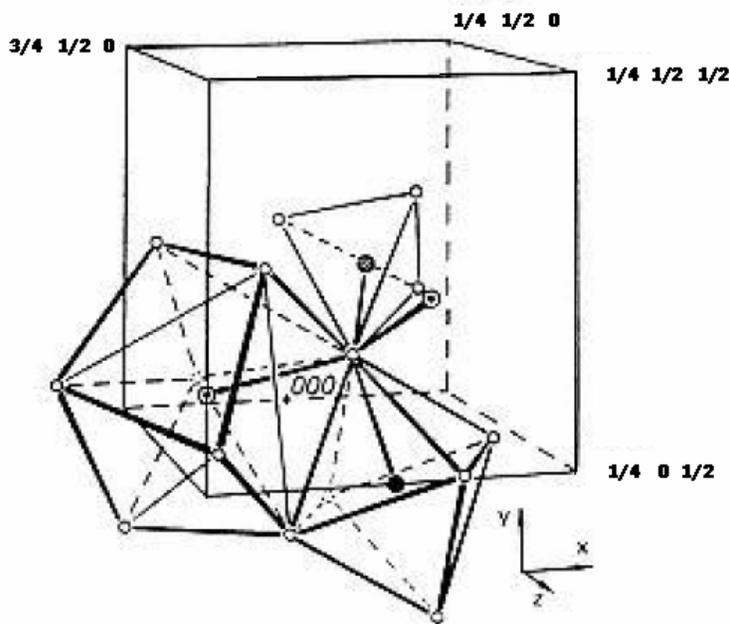
São de particular interesse para o tratamento de tumores por hipertermia os materiais cuja temperatura de transição de Curie são próximas à da ambiente. Vários materiais têm sido investigados na literatura quanto à sua T_C e sua adequação para utilização na hipertermia.¹¹

Sabe-se que materiais ferromagnéticos baseados na estrutura *YFeAl* possuem T_C muito próxima à da temperatura ideal para o tratamento por hipertermia. Tais materiais são denominados ferritas.

Geralmente as ferritas magnéticas têm uma estrutura de um spinélio com a fórmula química $MeO \cdot Fe_2O_3$ onde MeO recorre a uma combinação de dois ou mais óxidos de metal bivalentes, como ZnO , NiO , MnO , e CuO . A adição de óxidos bivalentes no metal em proporções estequiométricas pode resultar em vários tipos de materiais com propriedades diferentes, classificadas principalmente em três tipos: spinels, hexaferritas e estrutura do tipo de garnet. A Tabela 1 mostra a classificação das ferritas quanto ao metal substituinte na rede da magnetita (Fe_2O_3).

Tabela -2 Classificação de acordo com o metal adicional.

<i>Tipo</i>	<i>Formula</i>	
<i>Spinel</i>	$1\text{Fe}_2\text{-MeO}$	MeO =Metal de Transição
<i>Hexaferrita</i>	$6\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-1MeO}$	MeO = Grupo IIA
<i>Garnet</i>	$5\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-3Me}_2\text{O}_3$	Me_2O_3 = Oxido de metal de terra rara.

Figura 3: Estrutura de Garnet.¹²

Cada tipo de sítio do metal aceitará outros íons com um tamanho satisfatório: 0,9...1,05 Å. para substituição em locais do dodecaédricos, 0,65...0,8 Å para sítios do octaédricos e 0,4...0,64 Å em sítios tetraédricos. Assim íons de pentavalentes como V^{5+} e As^{5+} podem ocupar sítios de tetraédricos, enquanto nos caso Ca^{2+} a substituição dos íons em sítios do dodecaédricos pode ser por compensação.

A estrutura de Garnet, contém íons de Y^{3+} , não possui momento magnético; três íons de Fe^{3+} em sítios tetraédricos e se alinham antiparalelamente com dois Fe^{3+} em sítios octaédricos. Geralmente a estrutura do tipo garnet, os íons do metal Me^{3+} têm momentos magnéticos altos, comportam-se paramagnéticos no campo de troca produzido pela junção de Fe^{3+} . Assim, a baixa temperatura, as magnetizações resultantes são paralelas ao Me^{3+} ; considerando que a temperatura aumenta, Me^{3+} o momento diminui nitidamente. Então, será observada uma temperatura de compensação, T_{Comp} , na curva de magnetização, quando os sinais da magnetização espontâneos são contrários. Podem ser agrupadas as propriedades magnéticas de YIG em uma mesma gama extensiva, desde que todos os três sítios cristalográficos sejam diferentes e estejam disponíveis para substituições através de cátions diferente com vários estados de valência. Al ou substituições de Ga nos sítios de octaédricos podem abaixar 4pMs a 300 G; Substituições dos sítios A por Sc elevam 4pMs até 1900 G; substituições de terras raras aumentam anisotropia.

2.3- Conversão de energia magnética em calor

Recentemente, Tegus¹⁵ reportou a descoberta de vários materiais, o composto $2Y_3Fe_{(5-x)}Al_{(x)}O_{12}$, que apresenta grande variação de entropia magnética e temperatura de Curie em torno de 300 K, o que permite a sua utilização para refrigeração magnética em temperatura ambiente. A refrigeração magnética é baseada no efeito magnetocalórico (EMC), que corresponde ao aumento de temperatura quando um corpo magneticamente ordenado é submetido adiabaticamente a um campo magnético. Este processo é reversível, ou seja, a temperatura do corpo diminui quando é retirado o campo aumenta, possibilitando a sua utilização em um ciclo para aquecimento. As ótimas características magnetocalóricas deste composto e o seu baixo custo (não há terras raras em sua composição) o tornam um forte candidato a aquecimento magnético interno de um corpo.

O efeito magnetocalórico (EMC) corresponde à variação de temperatura que é observada quando um corpo magneticamente ordenado sofre uma variação na sua magnetização. Se esta é aumentada adiabaticamente, a entropia do corpo diminui devido ao ordenamento dos spins (mantendo constante a entropia total do sistema), e a temperatura do sistema aumenta. Inversamente, se a magnetização é diminuída ou reduzida a zero

adiabaticamente, aumentam entropia magnética e a temperatura do corpo. Em uma abordagem mais ampla, o efeito pode ser visto como descrevendo variações de entropia magnética de um sistema provocado por processos a que este sistema é submetido. Este efeito é conhecido desde 1881, mas somente após a descoberta do método de purificação e separação das terras raras é que começou a ser levado em conta efetivamente, pois o gadolínio, cuja temperatura de ordenamento magnético é próxima à temperatura ambiente, apresenta um efeito magnetocalórico grande o suficiente para que se possa pensar em aplicações tecnológicas. É preciso frisar que este efeito é mais evidente ao redor das transições de fase magnéticas, o que significa que o conhecimento do diagrama de fases magnético é importante para o estudo deste efeito. Há interesse principal em transições de fase de primeira ordem, pois, neste caso, as variações de entropia são mais intensas.

2.4- Conclusão:

Os materiais ferromagnéticos de dimensões da ordem de nanométricas ou micrométricas são capazes de transformarem a energia magnética em calor, destacando os óxidos de Y_2O_3 , Fe_2O_3 e Al_2O_3 . Estes materiais estão apresentando um efeito magnetocalórico suficiente para aplicações dentro da biomedicina.

É uma técnica que requer uma conexão de uma fonte de energia magnética externa. Está baseada nas idéias apresentadas por Gilchrist em 1975, está sendo recentemente usada.

¹⁶ As partículas ferromagnéticas são colocadas dentro de um campo magnético de baixa intensidade e agem como um aquecedor, absorvendo a energia de um campo eletromagnético e dissipando-as na forma de calor.

2.5- Referências Bibliográficas

- [1] KRAUS J.D. , *Eletromagnetismo* , Editora Guanabara S.A., Rio de Janeiro, RJ. 1978.
- [2] KITTEL C. *Introdução a Física do Estado Sólido*, Rio de Janeiro, Guanabara Dios, 1978.
- [3] KNOBEL M., *Aplicação do Magnetismo*, Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas (SP), Ciência Hoje vol. 36 nº 215.
- [4] REITZ. J.R.; MILFORD F. J.; CHRISTY R. W., *Fundamentos da Teoria Eletromagnética*, Editora Campus, RJ, 1982.
- [5] NOVAK, M. A., *Introdução ao Magnetismo*, IF-UFRJ.
- [6] CALLEN B., *Introducción a las teorías físicas de la termostática del equilibrio y de la termodinámica irreversible*, Editora AC, Madrid Espanã, 1981.
- [7] SHARP CORPORATION, OSAKA, JAPAN, *Sharp high-sensitivity high-temperature superconducting magnetic sensor successfully measures the magnetic field of the heart*, Biosensors & Bioelectronics Vol. 8 No. 7/8 (1993)
- [8] ZANETTI D. F., *Estudo de Sinterização e de Envelhecimento Térmico de Cerâmicas de Zirconio – Ítria por Espectroscopia de Impedância*, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1998.
- [9] SAMPAIO L. C., GERALDO R. C., *Técnicas de Magnetometria*, Revista Brasileira de Ensino de Física, vol. 22, no. 3, Setembro, 2000.
- [10] Zha L.L., *Magnetic ceramics for UHF applications*, The Ohio State University Group Inorganic Materials Science 2041 College Road, 281 Watts Hall Columbus H 43210-1178 USA, 2005.

[11] GRASSET F., MORNET S., DEMOURGUES A.; *Synthesis, magnetic properties, surface modification and cytotoxicity evaluation of $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$ ($0 \leq x \leq 2$) garnet submicron particles for biomedical applications*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 409–418 (2001).

[12] Zha L.L., *Magnetic ceramics for UHF applications*, The Ohio State University Group Inorganic Materials Science 2041 College Road, 281 Watts Hall Columbus H 43210-1178 USA, 2005.

[13] CHEN Y. F.; WU K.T.; YAO Y. D.; PENG C. H.; YOU K.L.; TSE W. S., *The influence of Fe concentration on $Y_3Al_{5-x}Fe_xO_{12}$ garnets*, Microelectronic Engineering 81 (2005) 329–335.

[14] SNEZHKO A.; ENGLISH J.; KOHOUT J.; STEPANKOVA H., *Temperature dependence of satellite structure of yttrium iron garnet containing $Y^{3+}(a)$ defects and $Al^{3+}(d)$ substitutions: experiment and model*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 234 (2001) 227–232.

[16] PANKHURST Q. A., CONNOLLY J., JONES S. K.; DOBSON J., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*, Journal of Physics, 36 (2003) R167–R181.

[15] <http://brazil.skeptdic.com/magnet.html>

3- MATERIAIS E METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1-Síntese de Ferritas de *YFeAl*

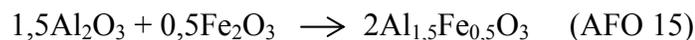
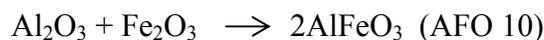
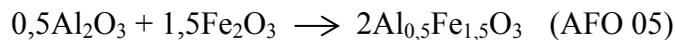
Nos últimos anos o desenvolvimento de cerâmicas ferromagnéticas ganhou grande impulso nas áreas da ciência dos materiais e da química do estado sólido. Para isto, métodos de síntese foram desenvolvidos de forma a possibilitar a obtenção de partículas de *YFeAl* ferromagnéticas com baixo grau de aglomeração e estreita faixa de distribuição de tamanho.

Neste trabalho, as sínteses de ferritas de *YFeAl* foram obtidas por via seca. Esta técnica de síntese de ferritas apresenta algumas vantagens tais como composição química reprodutível, homogeneidade química e alta pureza.¹

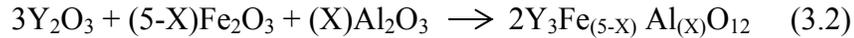
Para síntese de ferritas do tipo *YFeAl* as seguintes equações químicas envolvendo os óxidos metálicos Fe_2O_3 , Al_2O_3 foram obtidas:



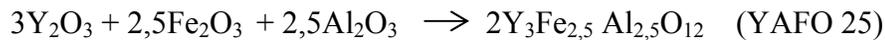
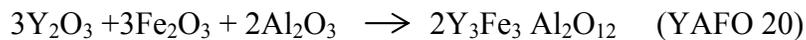
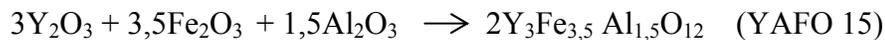
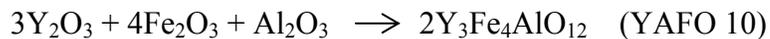
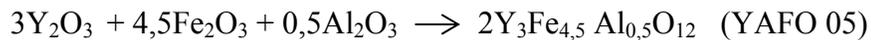
Neste sentido, a composição da cerâmica foi variada considerando as estequiometrias $x=0,5$; $1,0$ e $1,5$ respectivamente. No caso de $x=0,5$ (AFO 05), $x=1$ (AFO 10) e $x=1,5$ (AFO 15) as seguintes equações estequiométricas podem ser obtidas, respectivamente:



A estequiometria das reações para obtenção da cerâmica ferromagnética contendo o óxido de Ítrio (Y_2O_3) é dada por:



Uma vez que estudos da literatura indicam que a composição do óxido de ítrio na cerâmica exerce uma influência significativa na temperatura de transição de Curie, os seguintes conjuntos de estequiometrias foram considerados neste trabalho utilizando para x os valores de 0,5 (YAFO 05); 1,0 (YAFO 10); 1,5 (YAFO 15); 2,0 (YAFO 20); 2,5 (YAFO 25) e 4,0 (YAFO 40), respectivamente:



Para síntese das ferritas utilizou-se a técnica da metalurgia do pó. Os óxidos metálicos foram obtidos da Sigma/Aldrich com pureza de 99,99% e foram utilizados como

recebidos. Inicialmente os pós dos respectivos óxidos foram pesados com precisão analítica conforme a quantidade preestabelecida pela estequiometria das equações (3.1) e (3.2). A quantidade do pó utilizada para o preparo das cerâmicas é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Quantidade em gramas dos óxidos para cada amostra:

Amostra	Óxidos			Total (g)
	Al₂O₃ (g)	Fe₂O₃ (g)	Y₂O₃ (g)	
AFO 05	0,351	1,649	-	2,0000
AFO 10	0,7794	1,2200	-	1,9994
AFO 15	1,3140	0,6860	-	2,0000
YAFO 05	0,0704	0,9932	0,9363	1,9999
YAFO 10	0,1438	0,9008	0,9554	2,0000
YAFO 15	0,2203	0,8046	0,9752	2,0001
YAFO 20	0,2998	0,7044	0,9960	2,0002
YAFO 25	0,3828	0,5996	1,0176	2,0000
YAFO 40	0,6552	0,2565	1,0883	2,0000

Para o preparo das formulações cerâmicas, foram adicionados os pós de cada óxido pesado estipulando-se uma massa final de 2,0 gramas de pó por amostra. A homogeneização foi otimizada com a adição de etanol anidro. Após 2 horas de homogeneização no almofariz as amostras foram secas em estufa a 100 °C por 2 horas. Os pós homogeneizados foram submetidos a tratamento térmico em um forno tubular (Maitec FTE – 1600/H) a uma temperatura de 800 °C com velocidade de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de oxigênio por 2 horas. A Figura 4 ilustra o processo de obtenção das partículas ferromagnéticas de *YFeAl* utilizado neste trabalho.

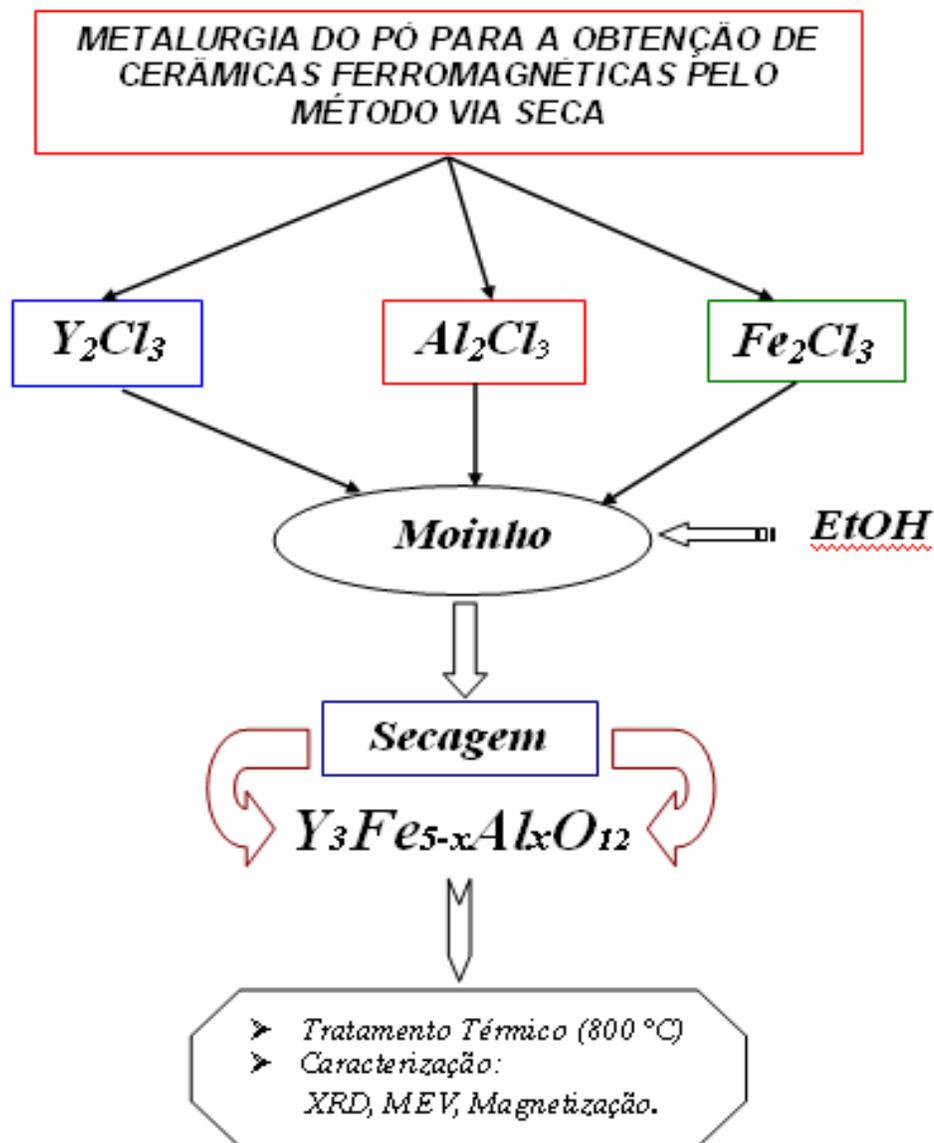
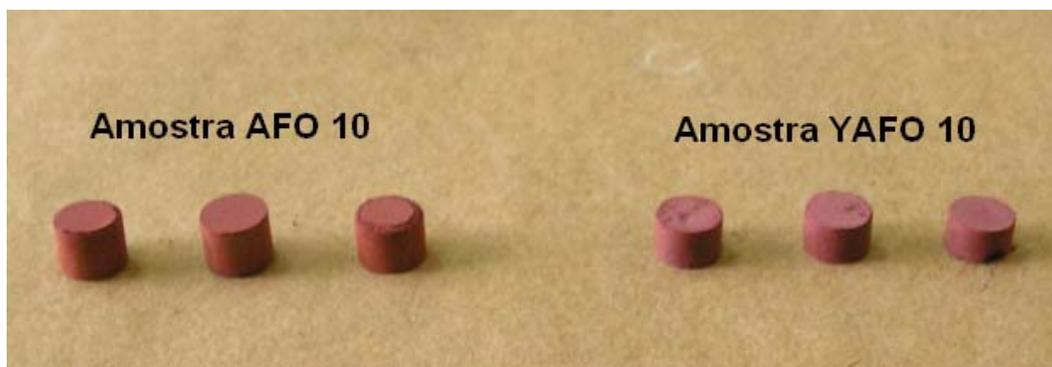


Figura 4- Seqüência experimental do processo de obtenção de partículas ferromagnéticas.

Pastilhas da cerâmica $YFeAl$ também foram obtidas após prensagem uniaxial dos pós previamente sintetizados e submetidos posteriormente a tratamento térmico em forno tubular e atmosfera de oxigênio como já previamente descrito. Neste sentido, pastilhas de diâmetro 7,75 mm foram obtidas após prensagem de 0,7 gramas do pó cerâmico em molde de aço inoxidável 316 NL e pressão de $191,5 \text{ N/m}^2$. A Figura 5 mostra o forno tubular (Maitec FTE – 1600/H) e pastilhas de $YFeAl$.



(A)



(B)

Figura 5- Forno tubular (Maitec FTE – 1600/H) (A) e pastilhas de *YFeAl* (B).

3.2 Síntese de Microesferas de PHEMA/*YFeAl*

As microesferas de PHEMA contendo as partículas ferromagnéticas de *YFeAl* e o agente quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) foram obtidas pela técnica de polimerização em suspensão, iniciada via radicais livres, a partir da decomposição térmica de um iniciador.

A fase orgânica (constituída de uma mistura de monômeros, de iniciador e de uma mistura de diluentes orgânicos) é dispersa por meio de agitação mecânica, sob a forma de gotas esféricas em uma fase aquosa. Durante a polimerização ocorre separação de fases, originando uma fase rica em polímero e outra rica em diluente. O polímero precipita na forma de esferas separando-se como um aglomerado de microesferas. Em seguida, ocorre a ligação das microesferas pela polimerização dos monômeros residuais que as solvatam. A estrutura morfológica formada depende da afinidade termodinâmica do diluente pelo polímero. Se o diluente apresentar afinidade pelo polímero, na etapa de separação de fases, as cadeias poliméricas e os núcleos se tornam menos emaranhados e, conseqüentemente, as microesferas mais solvatadas se apresentam menos compactadas, originando um maior número de poros de tamanho pequeno.

Neste trabalho, o monômero metacrilato de 2-hidroxietila (HEMA) obtido da Aldrich foi utilizado como recebido. Persulfato de amônio (PSA) e tetrametil etilenodiamina (TEMED) foram utilizados a uma concentração de 0,05% e 0,015% respectivamente, em relação ao número de mols totais do monômero HEMA. O composto TEMED reduz o tempo de meia-vida do PSA acelerando a formação de radicais livres e conseqüentemente a reação de polimerização do HEMA. Metil-etil-cetona (MEK) e ciclohexano (CH) foram utilizados como diluentes solvatante e não-solvatante respectivamente. O agente de suspensão utilizado foi gelatina a uma concentração de 1% (p/p) e o NaCl, a uma concentração de 2% (p/p), foi utilizado para promover o efeito "salting out".

O efeito da interação polímero-diluyente, representada pelo parâmetro de solubilidade de Hildebrand (δ), é o fator mais importante na formação da estrutura morfológica das microesferas. De acordo com a teoria dos parâmetros de solubilidade, quanto maior for a diferença entre os parâmetros do polímero e do diluyente ($\Delta\delta$), menor será a afinidade termodinâmica do diluyente pelo copolímero. Na síntese de microesferas reticuladas na presença de diluentes, quanto mais baixa é a afinidade termodinâmica do diluyente pelo polímero, mais cedo e em maior extensão ocorre a separação de fases e, como resultado disso, as cadeias poliméricas tornam-se mais emaranhadas e precipitam na forma de microesferas. Por outro lado, se o diluyente apresentar afinidade termodinâmica pelo polímero, a separação de fases ocorre mais tarde e em menor extensão, produzindo polímeros do tipo gel.

Neste trabalho, a fase aquosa (FA) foi preparada pela dissolução do agente de suspensão e do cloreto de sódio em água. A fase orgânica (FO) foi preparada dissolvendo-se o iniciador (PSA) no monômero (HEMA) à temperatura ambiente. O monômero foi então pré-polimerizado a 50 °C por 30 minutos, sob agitação magnética branda. Em seguida, a solução pré-polimerizada foi adicionada à mistura de diluentes (MEK/CH) que, após homogeneização, foi vertida no balão reacional já contendo a fase aquosa previamente preparada. A razão FA/FO foi mantida em 5/1 (v/v) em todas as reações.

As microesferas foram sintetizadas por meio de polimerização em suspensão aquosa. Inicialmente, a fase aquosa a 4 °C foi agitada mecanicamente a 800 rpm. Em seguida, foi adicionada a fase orgânica pré-polimerizada, agitando-se durante 20 minutos.

Após esse tempo, a mistura reacional, sob agitação de 800 rpm, foi aquecida a 30°C por 24 horas.

Ao término da reação, as microesferas foram lavadas exaustivamente com água destilada, para a retirada do agente de suspensão, e com etanol, para a retirada da mistura de diluentes e de monômero residuais, até que o filtrado fosse solúvel em água. As microesferas foram então peneiradas em peneirador hidráulico, utilizando peneiras de 25, 45, 100 e 140 mesh e, posteriormente, lavadas com metanol, para obtenção microesferas livres de impurezas, e secas em estufa, a 50 °C, por 72 horas.

O aspecto morfológico das microesferas foi observado com o auxílio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) e a análise de distribuição de tamanhos foi efetuado utilizando o software Himage ++ para aquisição e o tratamento computacional de imagens para análise da distribuição de tamanhos. A Figura 6 ilustra o procedimento adotado neste trabalho para a obtenção de microesferas de PHEMA contendo partículas de *YFeAl* ferromagnéticas e o quimioterápico 5-FU. A Figura 7 ilustra o mecanismo de polimerização do monômero HEMA.

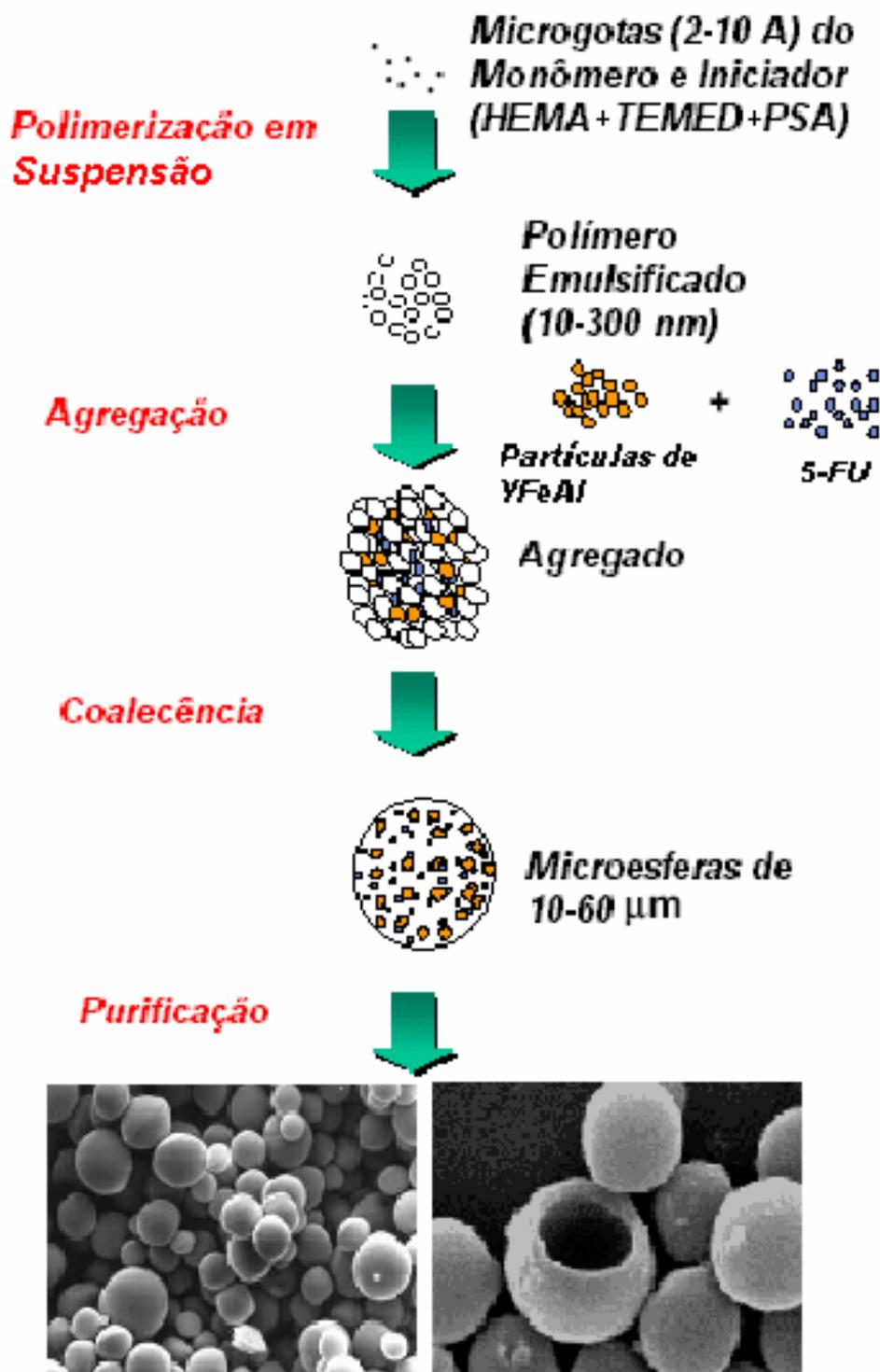


Figura 6- Processo utilizado para a obtenção de microsferas de PHEMA contendo partículas ferromagnéticas e 5-FU para o tratamento por hipertermia.

Mecanismo de reação da PHEMA

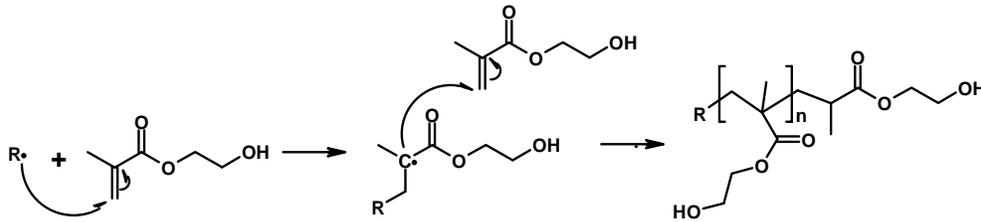


Figura 7- Mecanismo de reação de polimerização por emulsão de HEMA.

3.3 – Difração de raios-X dos pós-cerâmicos obtidos

Os materiais cerâmicos apresentam, normalmente, microestruturas. Neste sentido, as microestruturas podem ser caracterizadas por tamanho de grão, forma e distribuição dos grãos, quantidades de fases, orientação dos grãos e porosidade. De particular interesse para o estudo das cerâmicas magnéticas é a identificação de fases cristalinas específicas presentes no material. A difração de raios-X (DRX) é um método de grande utilidade na caracterização das fases cristalinas presentes em um material cerâmico.

A condição para que se observe a difração de um feixe de raios-X por um cristal é dado pela equação de Bragg:

$$m\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta \quad (3.3)$$

sendo θ o ângulo de difração, d a distância entre cada grupo de planos atômicos da rede cristalina, m a ordem da difração e λ o comprimento de onda do feixe de raios-X.

Os átomos localizados sobre os planos cristalinos são os que mais contribuem para a intensidade do feixe difratado. Por outro lado, os átomos situados exatamente à meia distância entre os planos cristalinos provocam a máxima interferência destrutiva. Os átomos que se situam em qualquer ponto intermediário interferem construtivamente ou destrutivamente, consoante a sua localização exata, mas o seu efeito é inferior ao respectivo máximo. Além disso, a capacidade de difração de um átomo, para os raios-X, depende do número de elétrons que aquele possui. Portanto, a posição dos feixes difratados por um sistema cristalino depende apenas das dimensões dos cristais e da forma da unidade repetitiva deste, bem como do comprimento de onda dos raios-X.

Quanto às intensidades dos feixes difratados, estas dependem, igualmente, do tipo de átomos presentes no cristal e sua localização na unidade fundamental repetitiva, a célula unitária. Não há portanto, duas substâncias que tenham exatamente o mesmo modelo de difração, quando se considera tanto a direção como a intensidade de todos os feixes difratados. O modelo de difração pode, portanto, considerar-se como que a “impressão digital” de um composto cristalino, sendo possível identificar-se individualmente os componentes cristalinos de uma mistura.

Neste trabalho, as cerâmicas ferromagnéticas de *YFeAl* foram caracterizadas quanto à sua fase cristalina por difratometria de raios-X. As medidas de difração de raios-X (DRX) das cerâmicas ferromagnéticas foram realizadas em um difratômetro DMAX 2000 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares- IPEN/USP. Os ensaios de difração de raios-X (DRX) foram realizados em amostras tanto na forma de pó quanto na forma de pastilhas. Utilizou-se um difratômetro marca SIEMENS, modelo DMAX 2000, operando com radiação de Cu-k α , com 2θ variando de 5° a 65°.



Figura 8- Difrátometro Horizontal D/MAX-2000 IPEN/USP.

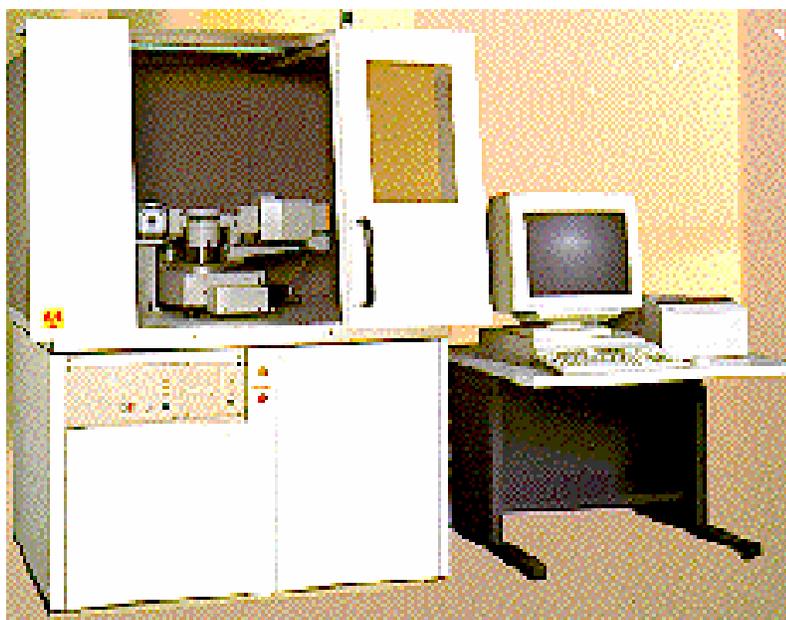


Figura 9- Difrátômetro SIEMENS, modelo DMAX 2000.

3.4 - Caracterização Magnética das Microesferas de *PHEMA/YFeAl*

O estudo do comportamento magnético da cerâmica *YFeAl* foi efetuado a fim de se determinar a temperatura de Curie e conseqüentemente o efeito magnetocalórico nas microesferas magnéticas. As caracterizações magnéticas dos materiais obtidos foram analisadas por um Magnetômetro de Amostra Vibrante (MAV). Na Figura 10 mostra-se um diagrama do MAV. Fazendo uma amostra vibrar a freqüência f , uma voltagem alternada é induzida nas bobinas de detecção. Esta voltagem é dada por;

$$E = \sigma GA2\pi f \cos(2\pi ft) \quad (3.4)$$

onde σ é o momento magnético da amostra, G é função da geometria das bobinas de detecção, e A é a amplitude de vibração.⁶

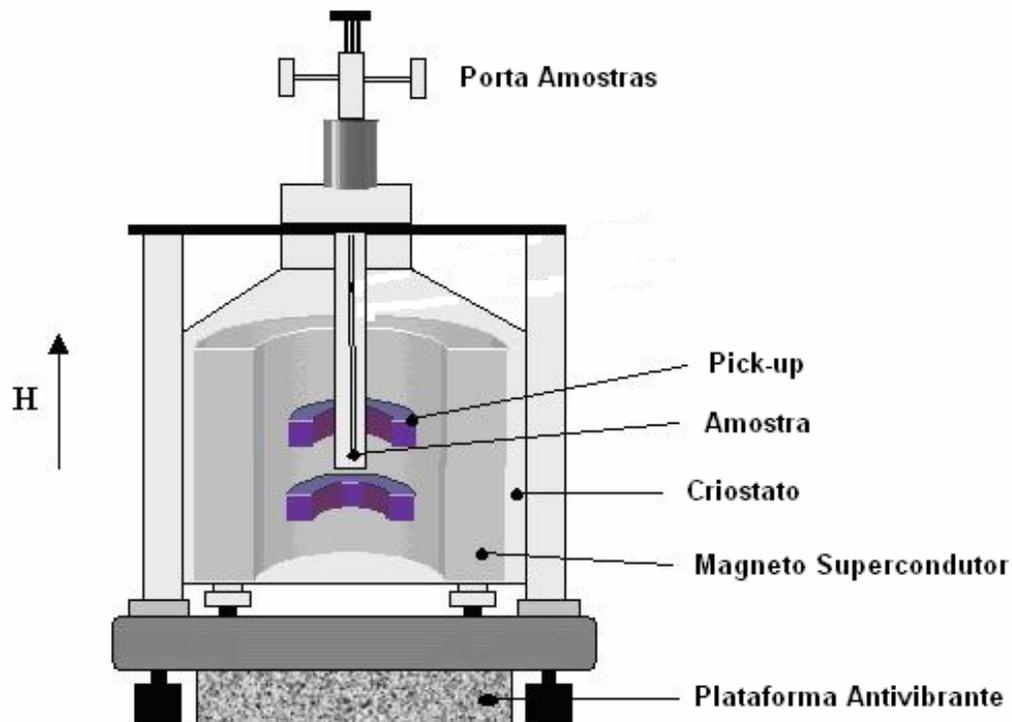


Figura 10- Diagrama do Magnetômetro de Amostra Vibrante (MAV).

O funcionamento de um MAV baseia-se na medida do campo magnético e sua resposta (magnetização), obtendo-se assim as curvas de magnetização (MxH) ou de Indução (BxH). Para isto a amostra é fixada na extremidade de uma haste rígida e o campo pode ser aplicado tanto na direção transversal como na longitudinal à direção de vibração. Usualmente a simetria axial é usada quando a fonte de campo magnético é uma bobina supercondutora. A outra extremidade da haste é fixada à membrana de um alto-falante ou a um motor com um sistema de polias ou engrenagens. O primeiro permite mais baixas amplitudes e mais altas frequências (tipicamente, 1 mm e 80 Hz), no entanto é menos estável quanta à amplitude de vibração.

O MAV possui uma sensibilidade de 10^{-5} emu. Vale a pena destacar dois detalhes: um deles é que a medida de magnetização feita com o deslocamento da amostra permite eliminar outras contribuições que não as oriundas da amostra; o segundo é que a medida é realizada com o auxílio de detecção síncrona com o uso de um amplificador lock-in, o que proporciona um grande aumento de sensibilidade.

Nos magnetômetros convencionais, os sistemas apresentam uma bobina de entrada (pick-up) que é conectada às bobinas de detecção (acopladas com a amostra), e uma bobina de modulação, que permite incorporar as vantagens técnicas da realimentação (feedback) e da detecção síncrona (lock-in).

3.5 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise por MEV ocorre da seguinte maneira: um feixe de elétrons é gerado termoionicamente por um filamento de tungstênio sob alta voltagem (0,5 a 50 kV). Este é colimado por uma lente condensadora e uma objetiva. A interação entre o feixe de elétrons e a amostra fornece informações sobre a forma, composição, estrutura cristalina e estrutura eletrônica do material. Os sinais gerados pela interação do feixe de elétrons com a amostra são coletados, convertidos em sinais eletrônicos e projetados numa tela de vídeo. Para que esse processo ocorra é necessário que a amostra seja metálica ou que receba uma fina camada condutora de ouro, liga ouro-paládio, cromo ou carbono em um processo de deposição por plasma. Através da MEV é possível obter informações da morfologia da

superfície de materiais sólidos e particulados, do tamanho de grão, distribuição de fases e tamanho de partículas.



Figura 11- Microscópio Eletrônica de Varredura IPEN/USP.

3.6 - Distribuição de tamanho de Partícula.

A distribuição do tamanho das microesferas de *PHEMA/YFeAl* foi estudada através da técnica de visão computacional. Neste sentido, as micrografias obtidas no MEV foram digitalizadas e representadas através de uma função discreta bidimensional $f(x,y)$, onde x e y são duas coordenadas espaciais.

O valor de $f(x,y)$ no ponto (x,y) é diretamente proporcional à intensidade luminosa neste ponto. Para que este sinal possa ser manipulado através de um computador, é necessário que o mesmo seja digitalizado no modo espacial e em amplitude, através de um processo denominado amostragem e quantização. A digitalização em coordenadas espaciais

é denominada amostragem, e a digitalizada em amplitude é referenciada como quantização em intensidade ou quantização em níveis de cinza. Esta digitalização resulta em imagens nos níveis de cinza, possuindo intensidades que variam entre 0 e 255.

A imagem digital obtida é representada através de uma matriz de n linhas por m colunas (Equação 3.5), onde cada amostra é também quantizada em intensidades. A imagem digital $f(x,y)$ possui então duas variáveis discretas x e y , onde $X = 0,1,2,3,\dots,n-1$ e $y = 0,1,2,3,\dots,m-1$. Cada elemento neste arranjo é denominado elemento de imagem ou pixel.

As micrografias MEV das microesferas *PHEMA/YFeAl* foram capturadas utilizando o software para sistemas de visão computacional HImage++ (Western Vision Software, Salt Lake City, UT, USA), utilizando-se um arquivo contendo uma série de algoritmos para o reconhecimento e análise de imagens.⁹ A Figura 12 ilustra o equipamento utilizado neste trabalho para a aquisição de imagens.

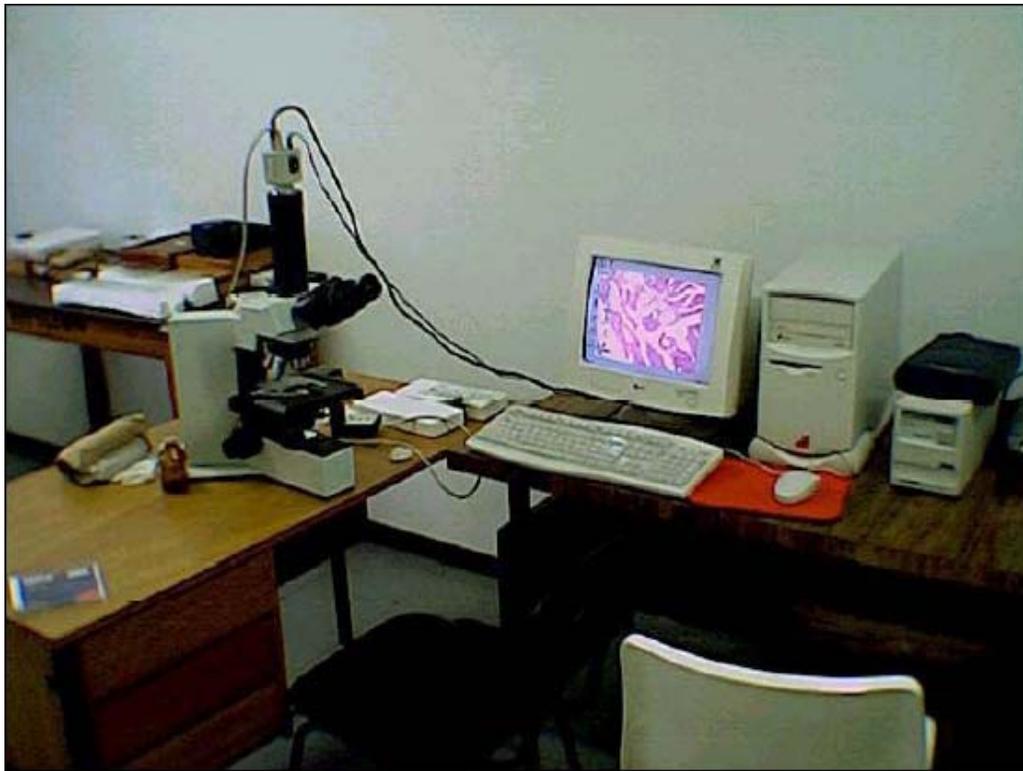


Figura 12- Sistema para processamento de imagens utilizando um microcomputador com software para análise de imagens.

3.7-Características Biocompatíveis

3.7.1- Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade representa a fase inicial do teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas, sendo utilizados como uma pré-seleção para detectar se o material em questão é conveniente para o implante além de analisar seus possíveis efeitos nos níveis celulares.

Existem dois tipos de testes *in vitro*: métodos de contato direto e métodos de contato indireto. No primeiro, as células são colocadas em contato com o material em teste, sendo normalmente semeadas na forma de uma suspensão celular sobre o material. Já os métodos de contato indireto podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que o material a ser testado é separado das células por uma barreira de difusão e o segundo tipo no qual um extrato do material a ser testado é colocado em contato com as células em condições *in vitro* em suspensão.

Uma cultura de CHO em monocamada é separada por tripsinização. A suspensão celular é centrifugada e o precipitado ressuspensado em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), após lavagem com PBS estéril. Uma microplaca de cultura celular de 96 poços é preparada a partir da adição de diluições crescentes do extrato do biomaterial (50 µl/poço, 4 poços/por diluição), em seguida, a placa é equilibrada a 37° C numa atmosfera úmida de 5% de CO₂, enquanto se efetua a tripsinização das células para o ensaio. Em seguida, pipeta-se 50 µl da suspensão celular (~3000 células) nos poços. O volume total em cada poço deve ser de 100 µl. Colunas controle de 4 poços são preparadas com o meio sem a colocação das células (branco) e meio, ao invés de extrato, com as células (controle negativo=100%). Posteriormente, a microplaca é incubada sob atmosfera úmida de CO₂. Após 72 h, 20 µl de uma mistura (20:1) de MTS a 0,2% e PMS a 0,09% em PBS é adicionada aos poços teste e deixa-se incubando por 2 horas. A incorporação do corante será medida por meio de um leitor de microplacas a 490nm contra o branco. A citotoxicidade (IC_{50%}) é estimada pela curva de interpolação, como a concentração do extrato do biomaterial resultante da inibição de 50% da incorporação do MTS,

correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação a concentração dos extratos a partir do gráfico.

Considerando a possível ação tóxica dos óxidos de ítrio, ferro e alumínio no organismo humano, decorrente a utilização destes materiais em tratamento de células neoplásicas é importante analisar a citotoxicidade destes compostos, uma vez que é necessário assegurar-se de que o material introduzido no tecido biológico possui características biocompatíveis.

O ensaio da citotoxicidade das cerâmicas de *YFeAl* foi realizado em colaboração com o laboratório de biologia molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP. As células utilizadas foram de ovário de hamster chinês, ATCC CHO k₁ (American Type Culture Collection) usando um corante vital (MTS) de acordo com as normas ISO.¹⁰⁻¹¹

Os extratos das amostra dos pós cerâmicos foram diluídas em série (50%, 25%, 12,5% e 6,25) e em seguida seus extratos foram adicionados ao meio de cultura de células CHO. Estas células foram cultivadas em meio MEM-FCS, em frascos plásticos à 37 °C em atmosferas de CO₂ (5% v/v). Após o crescimento celular, o meio de cultura foi removido e lavado com solução salina livre de cálcio e magnésio (PBS-CMF, pH 7,4), e tratado com solução 0,25% (m/m) de tripsina para remoção das células do meio de cultura das paredes do frasco. Após o tratamento com tripsina, as células foram transferidas para frasco plásticos onde foi centrifugada e lavada duas vezes com solução PBS-CMF. As células foram recolocadas em solução MEM-FCS sendo diluídas a uma concentração de 1x10² células/mL. No momento do ensaio, um volume de 2,0 ml desta suspensão celular contendo 1x10² células/mL foi distribuída em placas de Petri e incubado por cerca de 5h para que a adesão celular. O meio de cultura foi removido e substituído por 5,0mL de MEM-FCS fresco, nas placas de controle, e pelo extrato puro (100%) e sucessivamente pelos extratos diluídos [(50%, 25%, 12,5% e 6,25%)v/v], nas placas de cultura com as células aderidas. Todas as concentrações foram testadas em triplicata. Após a incubação das placas de cultura por sete dias a 37 °C em atmosfera de CO₂ 5%(v/v).¹¹

O meio de cultura foi removido das placas e fixado com solução salina de formalina (10% v/v de formaldeído). Em seguida as colônias identificados em cada uma das placas de

cultura foram contados e comparados com o número de colônias formadas na placa controle com linhagem celular CHO. Solução de fenol (0,02%*m/m*) e extratos de HDPE (60g em 60mL de solução ROMJ) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente.¹¹

3.7.2- Atividade Inflamatória (Hiperêmica)

Diferentes materiais sintéticos orgânicos e seus híbridos orgânicos/inorgânicos têm sido utilizados como implantes na medicina.¹² Do ponto de vista da bioengenharia o enxerto ideal seria aquele cuja topologia fosse consistente com o tecido biológico, deveria ser facilmente obtido e moldado e de baixo custo. Do ponto de vista bioquímico o material sintético “candidato” a biomaterial deveria causar o mínimo de reação tecidual, não induzindo ou causando a inflamação.¹³

Neste trabalho a atividade inflamatória das microesferas *PHEMA/YFeAl* foi avaliada medindo-se a atividade da fosfatase alcalina no exudato pós-implante, segundo metodologia experimental descrita por Marchant e outros.^[13] Foram utilizados 10 ratos *Wistar* albinos, adultos, machos, sadios, com peso variando entre 250 e 300 gramas, alojados no biotério de Técnica Cirúrgica da Faculdade de Medicina do Hospital Puerta de Hierro, Espanha. Os animais foram alocados em gaiolas apropriadas, máximo de cinco por gaiola, e receberam ração própria para ratos e água *ad libitum*.

Todos os animais do experimento foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico. A tranquilização foi realizada com mistura de fentanil-droperidol (Inoval) na dose de 0,3 cc/kg por via intramuscular e após 10 minutos foi feita indução anestésica com associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil-50) na dose de 0,4 cc/kg de peso vivo. Na manutenção da anestesia foi empregado o agente inalatório halotano. Cerca de 100 mg de microesferas de *PHEMA/YFeAl* pré-esterilizadas permaneceram em solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4) a 37 °C por 4 horas antes do implante. As microesferas de *PHEMA/YFeAl* foram implantadas subcutaneamente no nível da *panniculous carnosus*. Após a recuperação de sua atividade física, os ratos foram recolocados em suas gaiolas e não sofreram restrição alimentar.

Amostras do exsudato (0,5 mL) foi periodicamente aspirado sob condições estéreis apropriadas e a atividade da fosfatase alcalina foi medida por espectrofotometria segundo método descrito na literatura.¹⁴ Neste sentido, a fosfatase alcalina foi medida utilizando como substrato o p-Nitrofenil fosfato 0,01 M em tampão de dietanolamina 1M a pH 10,25. A intensidade da cor produzida, que é proporcional à atividade enzimática, foi lida em 405 nm. Uma unidade de fosfatase alcalina foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de p-nitrofenol em 1 minuto a 37 °C e pH 10,25. Silicone grau médico foi escolhido como material para o grupo controle por ser um dos materiais sintéticos mais extensivamente empregado na medicina.

Considerando que a introdução de um corpo estranho no tecido biológico comumente induz uma reação mediada predominantemente por macrófagos, o exsudato também foi analisado quanto à presença destas células fagocíticas derivadas dos monócitos sanguíneos. Para a contagem dos macrófagos foi adicionado 100 μL de uma solução corante de cristal violeta a 900 μL de exsudato. O número total de células por mililitro foi contado em câmara de Neubauer. A média dos quatro cantos da câmara, multiplicada por 10^4 , forneceu o número total de células por mililitro de exudato. Realizou-se a contagem diferencial de células, avaliando-se a porcentagem de macrófagos após contagem de 400 células em microscópio óptico comum, em aumento de 400 vezes, utilizando-se as colorações de Shorr e Giemsa. Nas lâminas que apresentaram muitos aglomerados celulares, a contagem diferencial foi feita, preferencialmente, na periferia.

Para análise dos resultados relativos a hiperemia causada pelos dois materiais (silicone e *PHEMA/YFeAl*), foi aplicado teste estatístico através de provas não paramétricas (análise de variância, seguida do teste de Friedman).¹⁵ O grau de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

3.8- Conclusões

Dentre os três elementos que compõem a moderna Ciência dos Materiais, a saber: Composição e Estrutura, Síntese e Processamento, Propriedades e Desempenho, o tripé Síntese, Estrutura e Propriedades é o elemento básico para a produção de novas cerâmicas magnéticas. As propriedades magnéticas e biocompatíveis são os fatores determinantes para a aplicação das cerâmicas na técnica da hipertermia. Neste sentido, um conjunto de experimentos foi programado neste trabalho a fim de tornar mais claras as inter-relações entre composição, estrutura, e propriedades (magnéticas e de biocompatibilidade).

As microesferas magnéticas de PHEMA/YFeAl contendo agentes quimioterápicos (5-FU) foram obtidas pela polimerização em suspensão à baixa temperatura. No que se refere às propriedades físicas das microesferas obtidas, estas foram caracterizados quanto à sua fase cristalina e distribuição do tamanho de partículas por difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. As propriedades magnéticas das microesferas obtidas foram analisadas utilizando-se como ferramental analítico o magnetômetro de amostra vibrante. Desta técnica é possível se obter informações importantes das propriedades magnéticas das microesferas obtidas, destacando-se neste trabalho a temperatura de transição de Curie (T_C).

Neste trabalho, o ensaio da biocompatibilidade foi programado através de dois ensaios, um em condições *in vivo* e outro em condições *in vitro*, a saber: o ensaio de hiperemia e o de citotoxicidade, respectivamente.

Acreditamos que embora os conjuntos de experimentos apresentados neste trabalho representem apenas um passo inicial na avaliação do tripé Síntese-Estrutura-Propriedades de biomateriais, estes parâmetros são de extrema significância para a avaliação de materiais sintéticos potencialmente candidatos a biomateriais.

3.9- Referencias Bibliográfica

- [1] KAWASHITA M., SHINEHA R.; MIN KIM H.; TADASHI KOKUBO T., *Preparation of ceramic microspheres for in situ radiotherapy of deep-seated cancer*, *Biomaterials* 24 (2003) 2955–2963.
- [2] LEE A. S.; JEONG J.; SHIN S., KIM J.; *Magnetic enhancement of iron oxide nanoparticles encapsulated with poly(d,l-lactide-co-glycolide)*, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 255 (2005) 19–25.
- [3] HIRAI T.; KAWAMURA Y.; KOMASAWA I., *Preparation of Y_2O_3 nanoparticulate thin films using an emulsion liquid membrane system*, *Journal of Colloid and Interface Science* 275 (2004) 508–513.
- [4] KAWASHITA M.; SHINEHA R.; HYUN-MIN K.; KOKUBO T., *Preparation of ceramic microspheres for in situ radiotherapy of deep-seated cancer*, *Biomaterials*, 24, 2955-2963, 2003.
- [5] RICARDO H. M. GODOI J. JR., RODRIGO F. C. ,*Partículas nanométricas de ferritas de Ítrio*, Instituto de Pesquisas da Marinha - IPqM , 1999.
- [6] GARSKAITE E.; GIBSON K., LELECKAITE A.; GLASER J., *On the synthesis and characterization of iron-containing garnets ($Y_3Fe_5O_{12}$, YIG and $Fe_3Al_5O_{12}$, IAG)*, *Chemical Physics* (2005).
- [7] ALEXIOU C.; ARNOLD W., *Magnetic mitoxantrone nanoparticles detection by histology, X-ray and MRI after magnetic tumor targeting*, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225, 187-193, 2001.

[8] ZHA L.L., *Magnetic ceramics for UHF applications*, The Ohio State University Group Inorganic Materials Science 2041 College Road, 281 Watts Hall Columbus H 43210-1178 USA, 2005

[9] LOW A., *Introductory Computer Vision and Image Processing*. London: McGraw-Hill Book Co., 1991.

[10] GILCHRIST T. L., *Heterocyclic Chemistry*, 2nd ed.; Longman Scientific: London, 1992: p.22.

[11] DE ALMEIDA, K. A.; DE QUEIROZ, A. A. A.; HIGA O. Z. ; ABRAHAM, G. A.; SANROMÁN J. J. *Biomed. Mat. Res. Part A.*, v. 68, n. 3, p.473-478, 2003.

[12] WILLIAMS, D.F. *Fundamental aspects of biocompatibility*, Biomaterials and biocompatibility, Florida, CRC Press, 1990., v.1.

[13] WILLIAMS D.F., *Review tissue-biomaterial interactions*. *J.Mater.Sci.* 22: 3421-45, 1987.

[14] MARCHANT R., HILTNER A., HAMLIN C., RABINOVITCH A., SLOBODKIN R., ANDERSON J.M. *In vivo biocompatibility studies. I. The cage implant system and a biodegradable hydrogel*. *J.Biomed.Mater.Res.* 17: 301-325, 1983.

[15] Altman DG, Gardner MJ., *Statistics with confidence*. England: British Medical Journal Books; 2000. p 28-35.

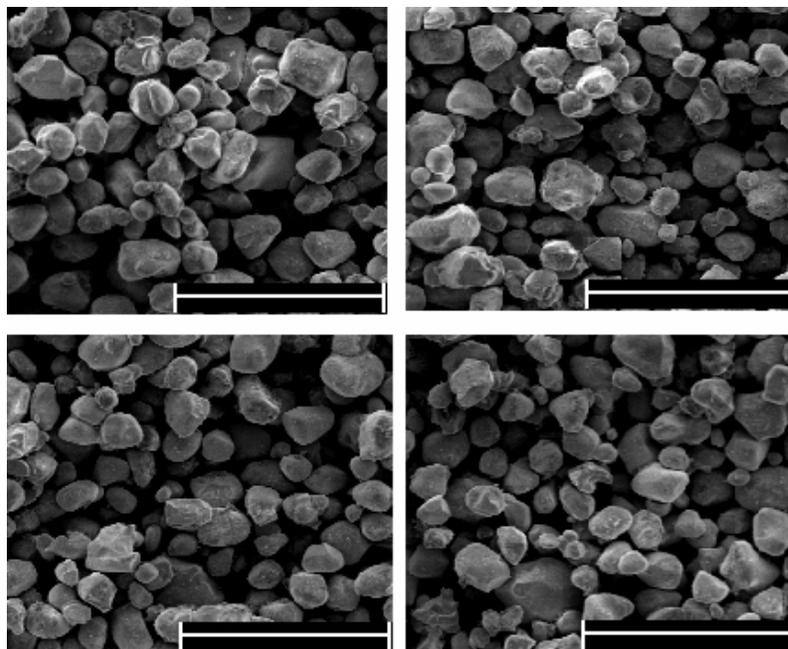
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados e discutidos em três etapas. Na primeira parte são apresentados os resultados da síntese das cerâmicas ferromagnéticas tipo *YFeAl* e sua caracterização microestrutural. Numa segunda etapa é estudado o efeito magnetocalórico das cerâmicas sintetizadas e discutido sua conveniência para aplicação em hipertermia. Na terceira parte são apresentados os resultados referentes à caracterização quanto a biocompatibilidade das microesferas de *PHEMA/YFeAl*.

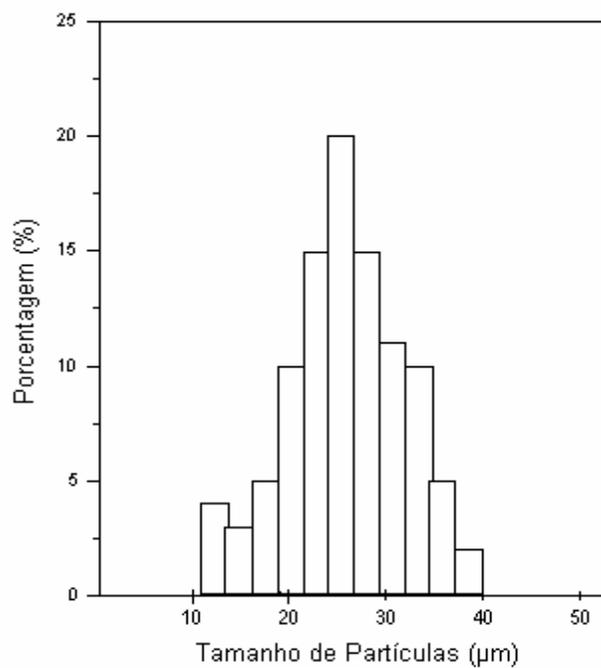
4.1- Síntese das Ferritas e Caracterização

Para se obter uma cerâmica ferromagnética com propriedades compatíveis com a sua utilização é necessária uma microestrutura com características químicas (composição e homogeneidade) e físicas (distribuição do tamanho e forma dos grãos e de poros) adequadas. Neste sentido, diferentes rotas de preparação de óxidos mistos têm sido propostas, mas ainda é necessário desenvolver métodos de preparação que sejam viáveis economicamente e confiáveis.¹⁻²

O pó cerâmico obtido apresentou uma morfologia aproximadamente esférica, com distribuição de tamanho de grãos aproximadamente homogênea, com a distribuição de tamanhos de partículas de 10 a 40 μm , conforme pode ser observado na Figura 13.



(A)



(B)

Figure 13- Micrografia MEV das partículas magnéticas de $YFeAl$ sintetizadas neste trabalho a barra corresponde a $100\ \mu\text{m}$ (A) e o histograma correspondente à distribuição do tamanho de partículas (B).

A composição das ferritas exerce um papel importante na sua morfologia cristalina. Neste sentido, o difratograma de RX visa a identificar as fases cristalinas presentes no material cerâmico. A Figura 28 apresenta os difratogramas de RX (DRX) das cerâmicas de YFeAl sintetizadas neste trabalho. Pode ser observado que o DRX da amostra AFO 15 (Figura 14 (B)) apresentou a fase cristalina da ferrita tipo Al-Fe e traços da fase cristalina da hematita (α -Fe₂O₃). O DRX da amostra AFO 05 (Figura 14 (A)) apresentou apenas a fase cristalina da ferrita de Al-Fe, devido provavelmente à baixa concentração de óxido de ferro na cerâmica.² As amostras de YAFO 10 (Figura 14-(C)) e YAFO 40 (Figura 14-(D)) apresentaram estruturas policristalinas amorfas. O pico característico do Y₂O₃ é evidenciado na Figura 14 (C). Observa-se que os picos característicos dos óxidos de Fe₂O₃ e Al₂O₃ bem como da fase cristalina de Al-Fe estão presentes em todas as amostras de cerâmicas sintetizadas.

Os principais planos cristalinos correspondentes aos óxidos de Fe₂O₃ (224), Al₂O₃ (024) (116) e Al-Fe (311).²

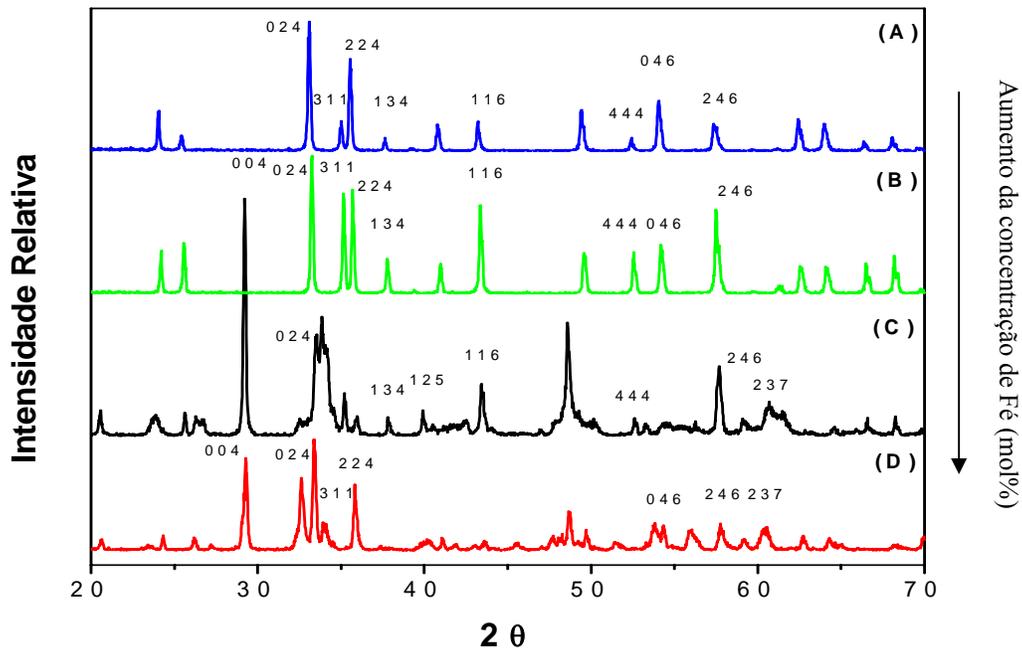


Figura 14- Difratogramas de raios-X das ferritas magnéticas de AFO 05 (A), AFO 15 (B), YAFO 10 (C) e YAFO 40 (D).

4.2-Síntese das Microesferas Ferromagnéticas de *PHEMA/YFeAl* e Caracterização

Acredita-se que os metais talvez sejam os agentes tóxicos mais conhecidos pelo homem. Há aproximadamente 2.000 anos a.C., grandes quantidades de chumbo eram obtidas de minérios, como subproduto da fusão da prata e isso provavelmente tenha sido o início da utilização desse metal pelo homem.

Os metais pesados diferem de outros agentes tóxicos porque não são metabolizados nem eliminados pelo homem. A atividade industrial diminui significativamente a permanência desses metais nos minérios, bem como a produção de novos compostos, além de alterar a distribuição desses elementos no planeta.

Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais, dependendo da dose e da forma química. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até mesmo o ser humano, mas eles são requeridos em baixas concentrações e podem causar severos danos aos organismos biológicos quando presentes nos tecidos em concentrações elevadas.

Os efeitos tóxicos dos metais sempre foram considerados como eventos de curto prazo, agudos e evidentes, como anúria e diarreia sanguinolenta, decorrentes da ingestão de ferro em elevadas concentrações. Atualmente, ocorrências a médio e longo prazo são observadas, e as relações causa-efeito são pouco evidentes e quase sempre subclínicas. Geralmente esses efeitos são difíceis de serem distinguidos e perdem em especificidade, pois podem ser provocados por outras substâncias tóxicas ou por interações entre esses agentes químicos.

A manifestação dos efeitos tóxicos inerentes à intoxicação por metais pesados está associada à dose e pode distribuir-se por todo o organismo, afetando vários órgãos, alterando os processos bioquímicos, organelas e membranas celulares. A experiência clínica deixa evidente que pessoas idosas e crianças sejam mais susceptíveis à contaminação por metal pesado.⁴

A intoxicação por alumínio (Al) tem sido associada à constipação intestinal, cólicas abdominais, anorexia, náuseas, fadiga, alterações do metabolismo do cálcio (raquitismo) bem como alterações neurológicas com graves danos ao tecido cerebral. Assim, inúmeros estudos consideram que o alumínio tem um papel extremamente

importante no agravamento do mal de Alzheimer (demência precoce). O excesso de alumínio também interfere com a absorção do selênio e do fósforo. Por outro lado, compostos de ítrio têm sido relatados como possuidores de significativo potencial carcinogênico.⁵

Com base no exposto, o processo de encapsulamento das partículas magnéticas obtidas neste trabalho é de fundamental importância para a obtenção de materiais implantáveis com propriedades biocompatíveis.

A pesquisa em materiais biocompatíveis tem sido uma das mais produtivas da ciência dos materiais. Como resultado, uma grande diversidade de novos materiais tendo como base metais e ligas, cerâmicas avançadas, polímeros e compósitos, têm sido produzidos e testados com a finalidade última de ser utilizado em contato com os tecidos biológicos.

Desde da descoberta, na década de 1960, por Wicheterle e Lim⁷, hidrogéis poli(metacrilato de metila) (PHEMA) foram extensivamente usados como materiais para ureteres, implantes cardiovasculares, substituições de cartilagens nasais, lentes de contato, dispositivos para liberação de drogas e recuperação de tecidos. Também foram usados em numerosas aplicações em odontologia como o enchimento do canal de raiz e na dentadura. A gama extensiva de aplicação de hidrogéis de PHEMA é devida à biocompatibilidade e à facilidade com que podem ser modificados e revestir materiais específicos com cerâmicas ferromagnéticas. Neste caso o encapsulamento com PHEMA de micropartículas magnéticas de *YFeAl* para o tratamento de hipertermia, torna o polímero promissor no revestimento.

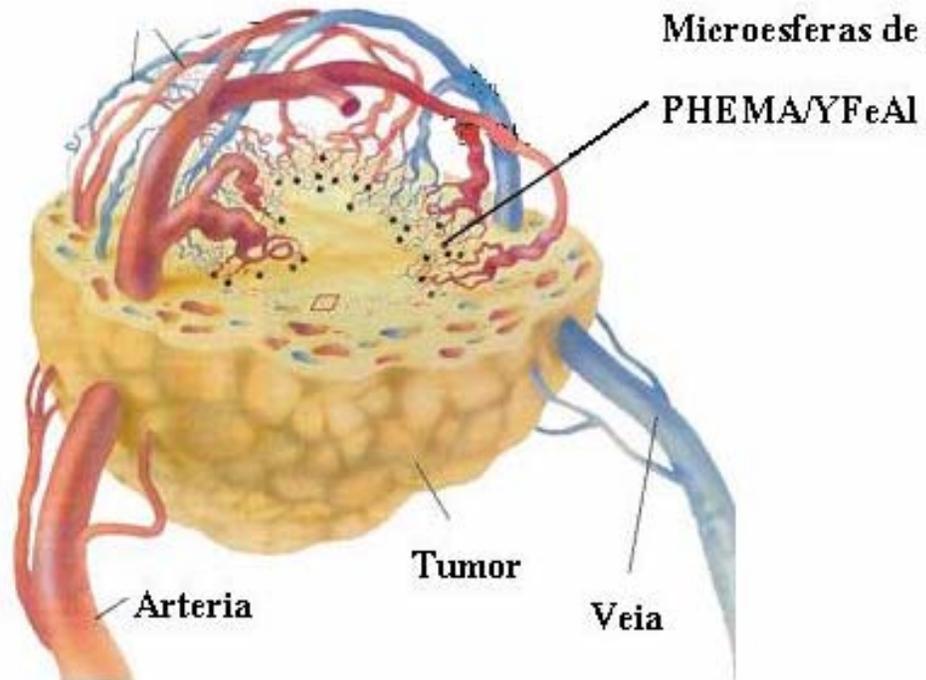
A importância dos hidrogéis como biomateriais se deve à semelhança de suas propriedades físicas com os tecidos vivos, tais como elevado conteúdo de água, consistência macia e elástica e baixa tensão interfacial.

Neste trabalho as partículas das cerâmicas ferromagnéticas de *YFeAl* foram encapsuladas pelo polímero PHEMA de forma a se obter um revestimento biocompatível. A Figura 16 mostra a estrutura interna de uma microesfera de PHEMA. Observa-se a formação de uma estrutura tipo esfera oca (“core shell”) que permite a acomodação das partículas magnéticas.

Para aplicação no tratamento por hipertermia, as microesferas magnéticas devem possuir uma distribuição de tamanhos relativamente homogêneos, uma vez que as veias (ou

artérias) presentes no fígado são da ordem de milímetros de diâmetros e chega nos capilares sanguíneos de 4 a 16 μm . A Figura 15 ilustra um tumor de fígado onde se ressaltam o tamanho das veias/artérias e o esquema de introdução das microesferas no fígado para o tratamento por hipertermia.

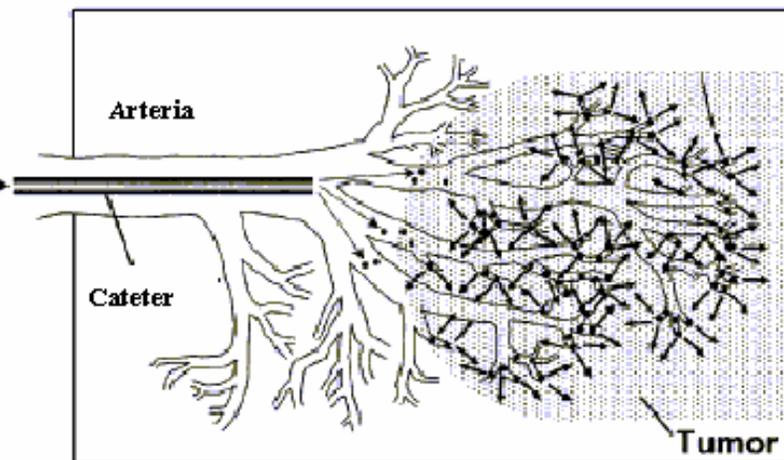
Um dos fatores mais importantes na obtenção de nanopartículas para tratamento de hipertermia magnética é a distribuição dos tamanhos das partículas. A síntese de microesferas ferromagnéticas neste trabalho tem levado à uma distribuição de tamanhos de partículas relativamente homogênea. A distribuição homogênea quanto ao tamanho das partículas favorece o processo de conversão da energia magnética em calor uma vez que os tamanhos das microesferas proporcionam uma distribuição da temperatura dentro do tumor.



(A)

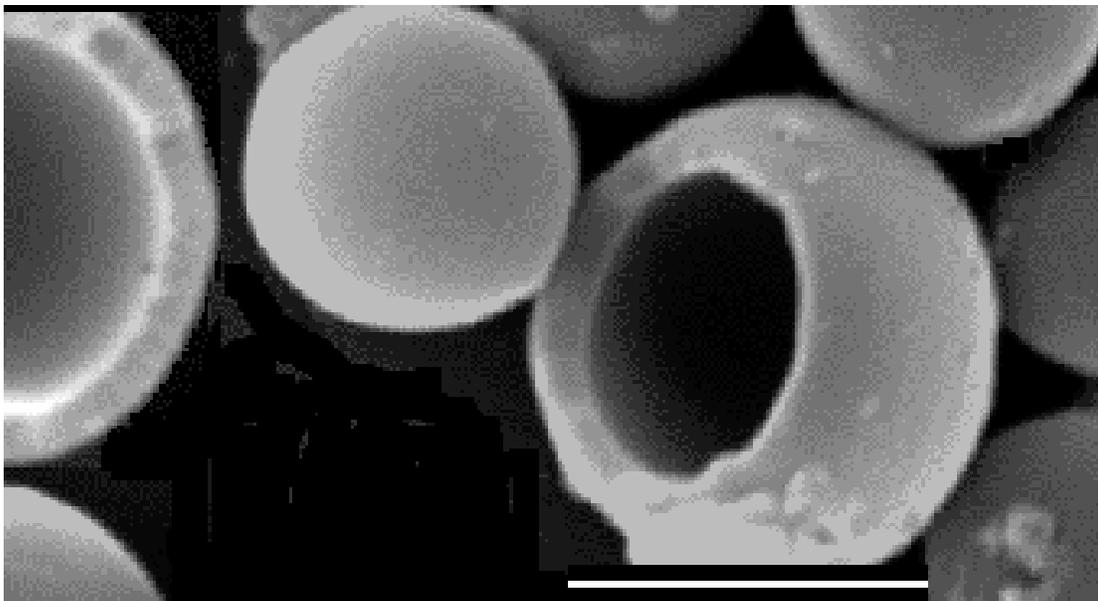
Microesferas de
PHEMA/YFeAl

20~30 μm ϕ

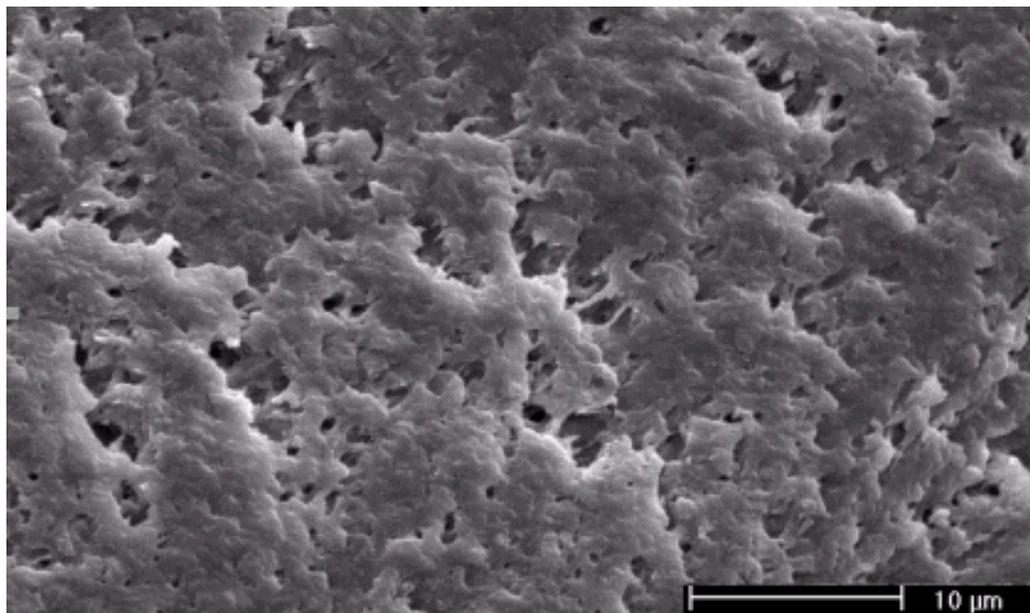


(B)

Figura 15- Ilustração do tumor de fígado, ressaltando o tamanho de veias e artérias bem como a distribuição dos capilares sanguíneos de 4 a 16 μm de diâmetros (A) e (B).



(A)



(B)

Figura 16- Estrutura interna microesferas ocas de PHEMA a barra indica 30 μm (A) e sua superfície da microesferas de PHEMA (B).

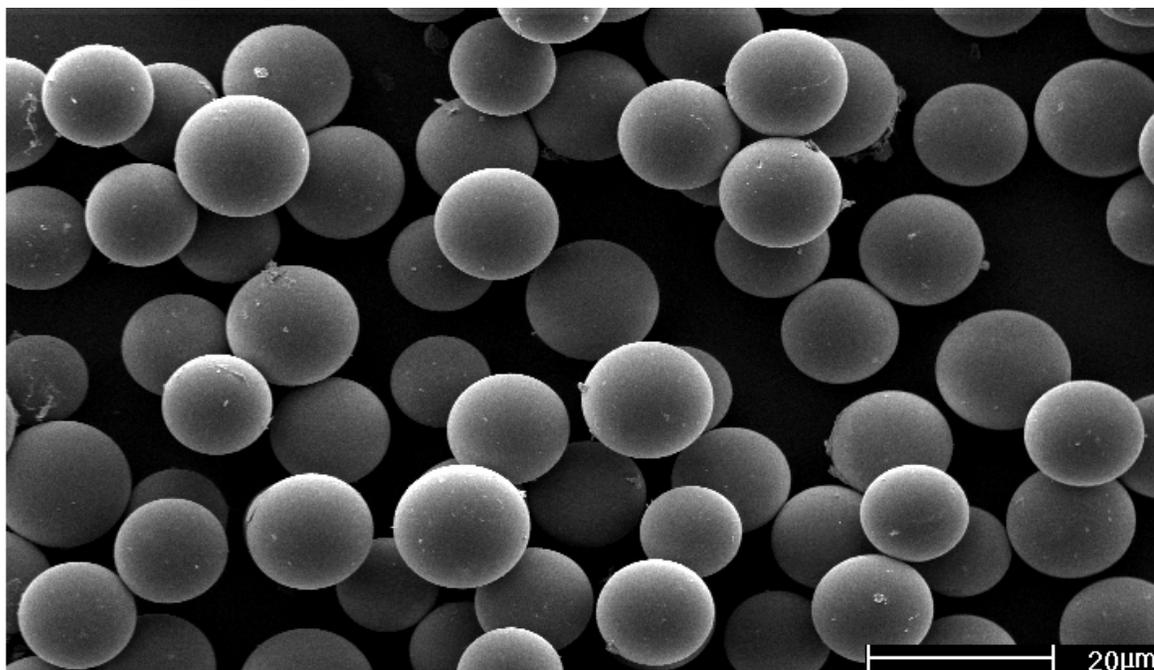
4.3- Avaliação da Morfologia e Distribuição de Tamanho de Partículas (SEM)

No sistema de polimerização em suspensão utilizado neste trabalho contendo iniciadores TEMED e PSA são dispersos numa fase aquosa onde todos são solúveis. A dispersão foi mantida pela combinação de forte agitação mecânica e pela adição de agentes de suspensão ou estabilizantes (gelatina). Enquanto a suspensão é mantida, as gotas de HMA são convertidas de um estado líquido de alta mobilidade, passando por um estado altamente viscoso (conversão entre 20 e 60%), para partículas sólidas de polímero (conversão > 70%). Os estabilizantes previnem a coalescência das gotas, inicialmente, e depois estabilizam as partículas de polímero quando o efeito gel se torna pronunciado.

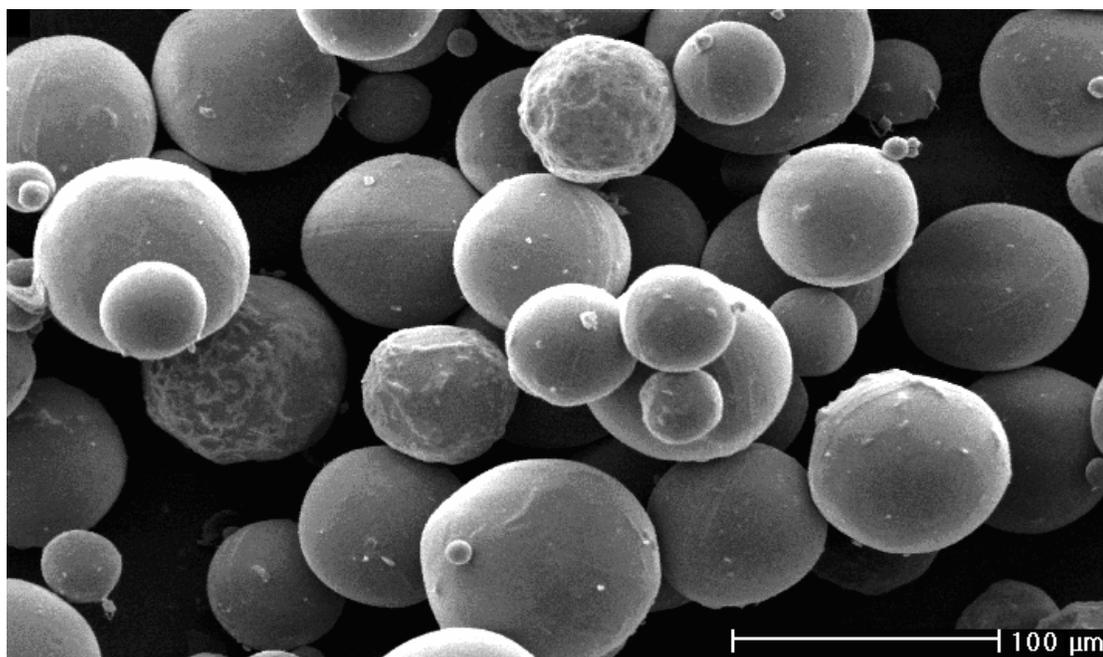
Vários estudos têm sido desenvolvidos para a avaliação dos principais fatores que afetam o diâmetro das microesferas obtidas a partir da polimerização em suspensão. Através da literatura, observa-se que as microesferas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 μm , no entanto, partículas com diâmetros em torno de 60 a 70 μm ou mesmo inferiores a 50 μm podem ser obtidas. A composição qualitativa, quantitativa e o método de preparação das microesferas obtidas a partir da polimerização em suspensão são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas.

A modelagem das microesferas (distribuição de tamanho) obtidas a partir da polimerização em suspensão não possui, ainda, uma teoria definitiva que permita definir estratégias de controle da curva de distribuição, em parte devido a não haver consenso sobre os mecanismos de coalescência de partículas envolvidos no processo de polimerização. Sabe-se, entretanto que o tamanho da microesfera depende do tipo de monômeros, concentração de estabilizante, condições de agitação e geometria do reator.⁸⁻⁹ Entretanto, outros fatores como a deposição de polímero pré-formado pode conduzir à diminuição de tamanho de partícula em relação à suspensão, devido provavelmente à redução da energia livre interfacial do sistema, no primeiro caso, ou mediante um efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas, no segundo.

A Figura-17 ilustram as micrografias MEV das microesferas de *PHEMA/YFeAl* obtidas neste trabalho.



(A)



(B)

Figura 17- Micrografia de MEV das microesferas magnéticas da amostra de YAFO 20
20 μm (A) e 100 μm (B).

A Figura 18 ilustra a distribuição do tamanho das microesferas de *PHEMA/YFeAl* obtidas neste trabalho, determinada a partir da análise de imagem das micrografias obtidas no microscópio eletrônico de varredura (MEV). O tamanho médio das microesferas obtidas neste trabalho situa-se entre 30 e 50 μm . Sendo o diâmetro médio dos capilares sanguíneos do fígado entre 4 a 16 μm . Este diâmetro das microesferas não impede o fluxo sanguíneo para células do fígado.

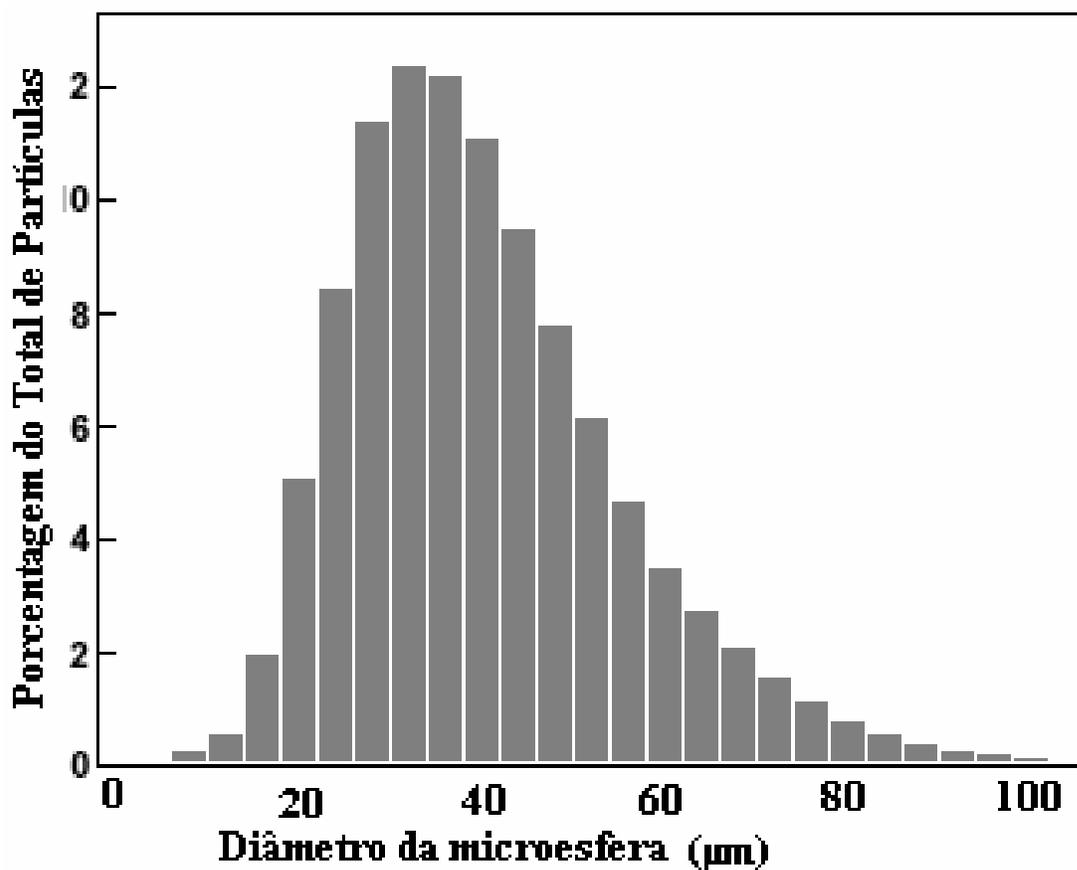
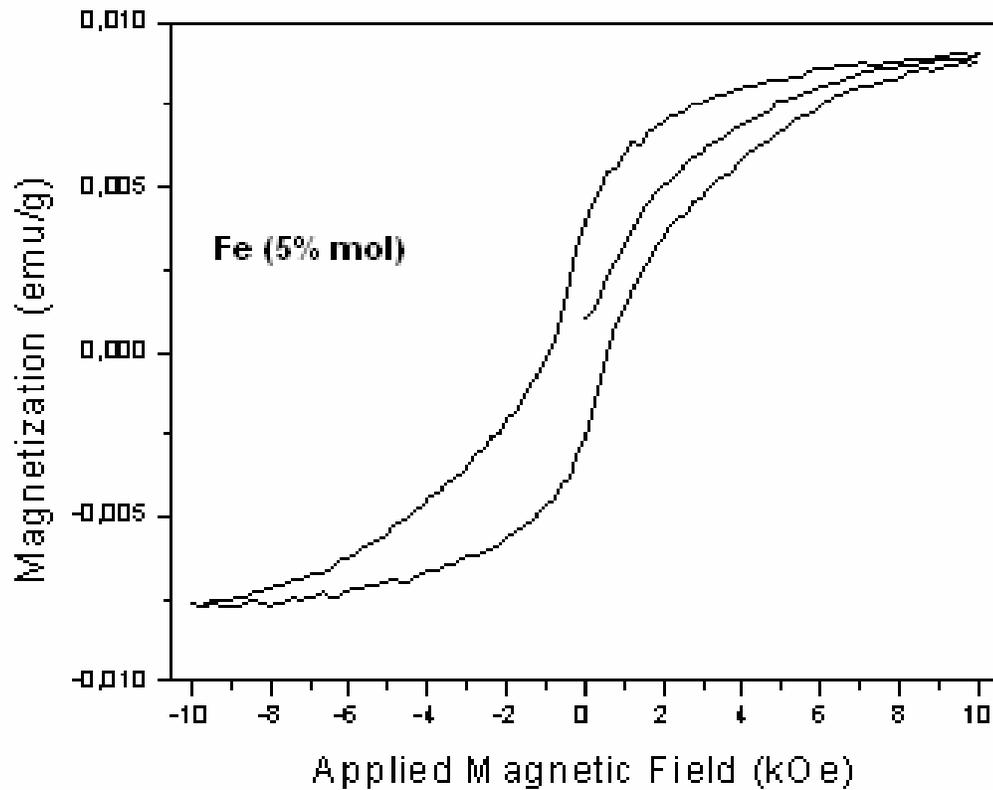


Figura 18-Distribuição de tamanho das microesferas *PHEMA/YFeAl* obtidas a partir da análise de imagem das micrografias MEV.

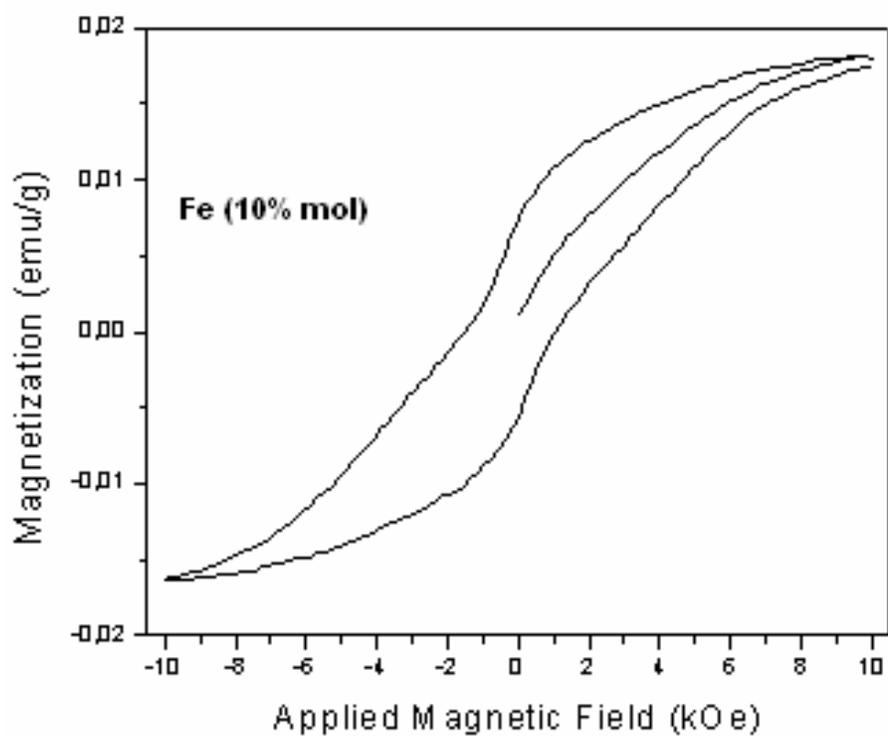
4.4- Caracterização Magnética

As características ferromagnéticas das cerâmicas *YFeAl* obtidas neste trabalho foram estudadas através da medida da histerese ferromagnética. Através das curvas BxH de histerese é possível o cálculo da energia magnética estocada no material devido aos momentos magnéticos das partículas.

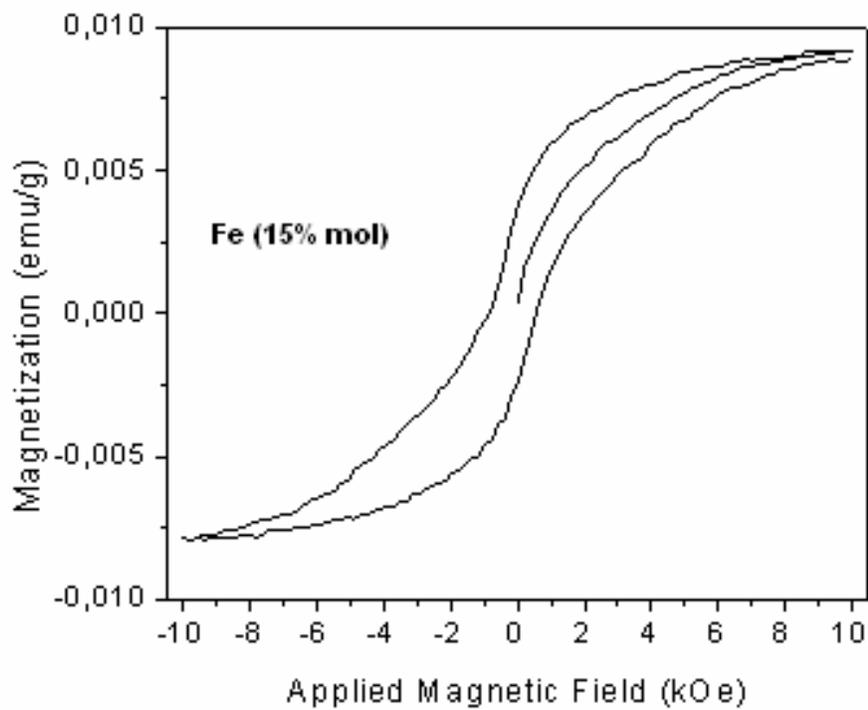
A Figura 19 mostram as curvas de histerese obtidas em magnetômetro de amostra vibrante como discutido anteriormente. Observa-se uma variação significativa da histerese magnética em função da concentração de ferro nas amostras.



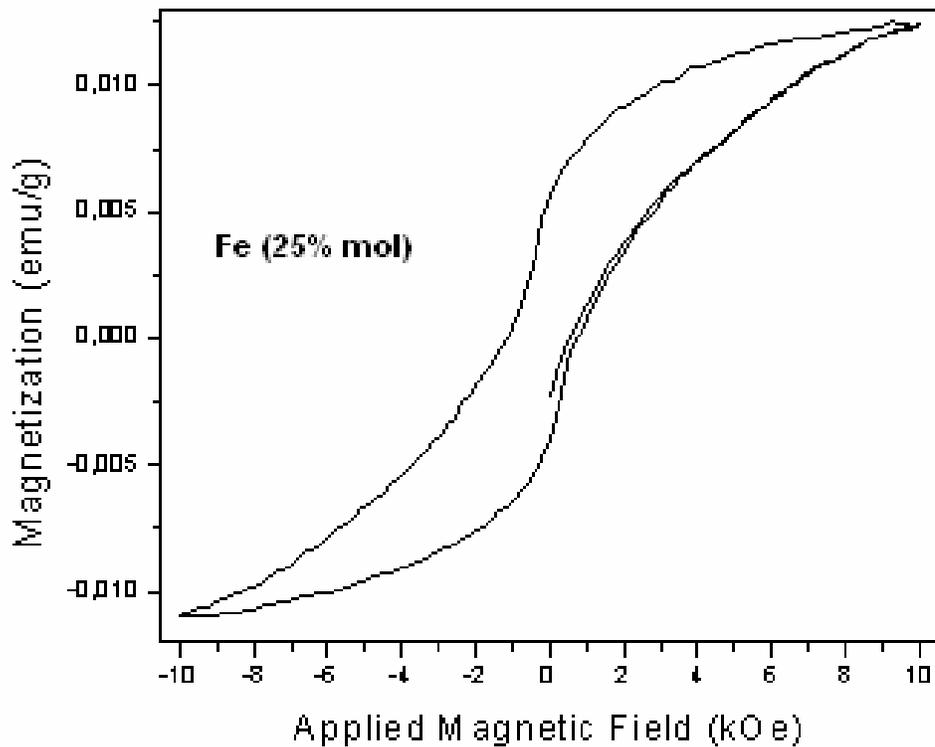
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 19- Histerese Magnética das Amostras (A) AFO 05, (B) AFO 10, (C) YAFO 15 e (D) YAFO 25.

Considerando-se a área sob as curvas englobadas no ciclos das histereses magnéticas apresentadas na Figura 19, calculou-se a energia magnética presente nas cerâmicas ferromagnéticas quando estas eram submetidas a um campo magnético. A Figura 20 mostra a energia de magnetização em função da concentração de ferro. Observa-se uma forte dependência da energia magnética estocada em função da concentração de Ferro (mol %).

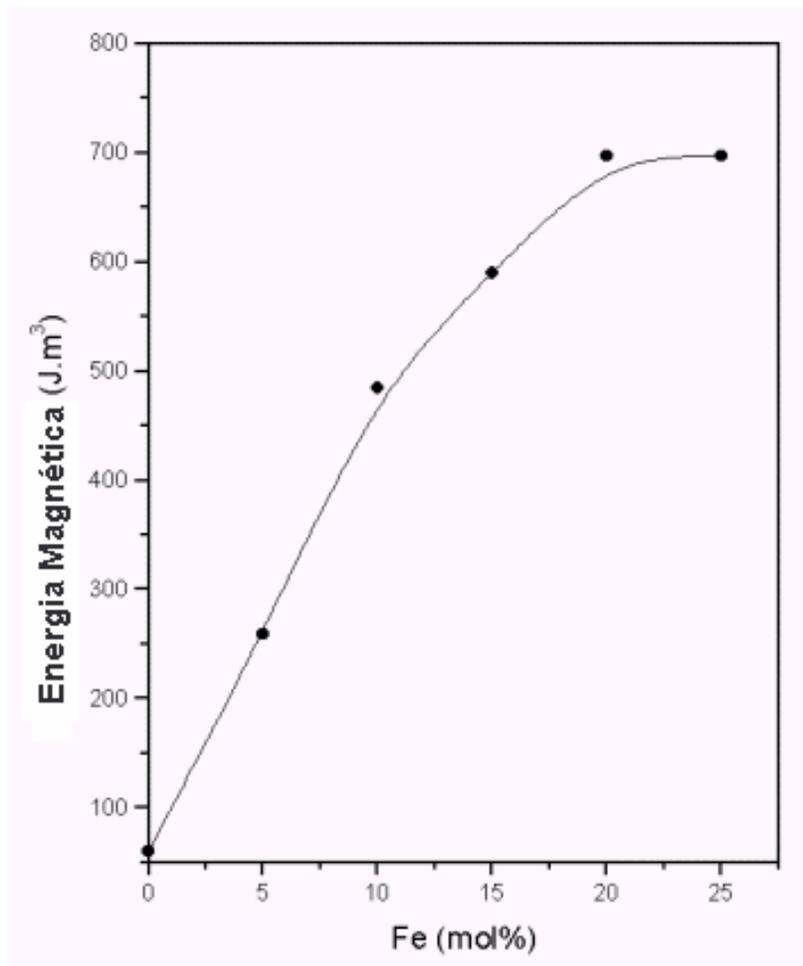


Figura 20- Energia Magnética ($J.m^3$) versus concentração de Ferro (mol%).

O tratamento por hipertermia exige uma elevação na temperatura do sistema quando este é submetido a um campo magnético. A Figura 21 mostra a evolução da temperatura quando as microesferas *PHEMA/YFeAl* são submetidas a um campo magnético oscilante. Observa-se que a temperatura ideal para o tratamento por hipertermia é atingida quando a estequiometria da reação na equação (3.2) é igual a 1,7 ($x=1,70$).

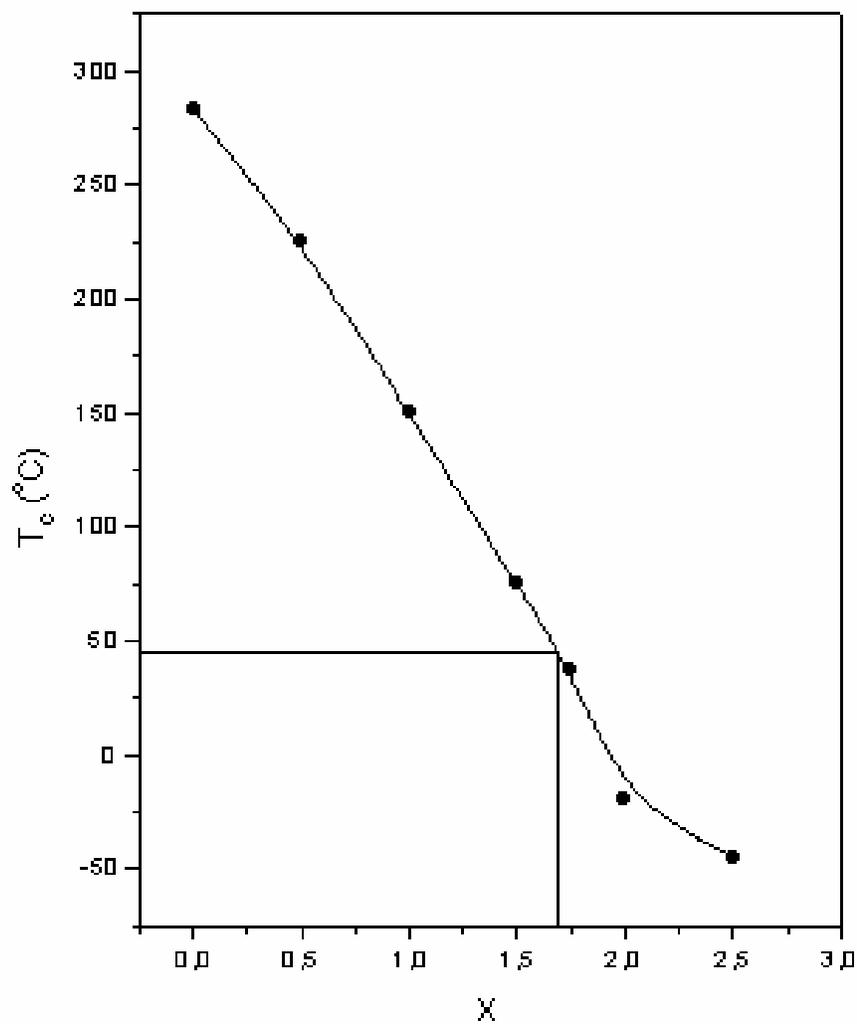


Figura 21- Temperatura ($^{\circ}$ C) versus a variação de X da equação estequiométrica (3.2).

4.5- Avaliação da Biocompatibilidade

4.5.1- Ensaio da citotoxicidade

Ensaio de toxicidade celular sempre foram entre os métodos de bioensaios, os primeiros a serem realizados para prever a toxicidade de substâncias a vários tecidos. A sua principal vantagem em relação aos ensaios tradicionais de toxicidade *in vivo* em camundongos, é que se espera uma resposta mais simples, sensível, econômica e homogênea.

O ensaio fundamenta-se no procedimento originalmente desenvolvido por Borefreund e Puerner (1984) para a triagem de agentes citotóxicos, em geral, sobre uma monocamada de células. O método é baseado na avaliação quantitativa de células viáveis, após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital do composto tetrazólio MTS e um agente acoplador de elétrons PMS. O MTS é biorreduzido pelas células a um produto formazan que é solúvel no meio de cultura e então efetuada uma análise colorimétrica da coloração incorporada, de acordo com Barltrop e col. (1991). A quantidade de MTS, o marcador da viabilidade celular, incorporada pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. A amostra testada que induz a toxicidade celular é medida em um intervalo de concentrações do extrato do biomaterial, e a concentração que produzir uma redução de 50% na absorção de MTS é tomado como o parâmetro de citotoxicidade.

O ensaio de citotoxicidade de biomateriais é efetuado conforme a ISO 10.993-part 5. A linhagem celular recomendada é que seja uma linhagem celular estabelecida de mamíferos obtida de um repositório reconhecido como o American Type Culture Collection (ATCC). É utilizado no ensaio uma cultura de células de ovário de hamster chinês (ATCC CHO K1).

O ensaio de citotoxicidade representa a fase inicial de teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas, sendo utilizados em uma primeira análise para detectar se o material apresenta características de biomaterial quanto à sua interação com tecido biológico.

As microesferas de PHEMA/YFeAl foram avaliada quanto à sua citotoxicidade através de sua interação com células de ovário de Hamster chinês em condições *in vitro*.

Na Figura 22, são apresentadas as curvas de viabilidade celular das microesferas magnéticas. Todas as amostras apresentaram comportamento semelhante ao controle negativo, não tóxico, com $IC_{50\%}$ maior que 50%. Somente as microesferas magnéticas YAFO 10 apresentaram uma ligeira toxicidade. Portanto, as microesferas magnéticas sintetizadas neste trabalho apresentaram resultados semelhantes, como materiais não tóxicos.

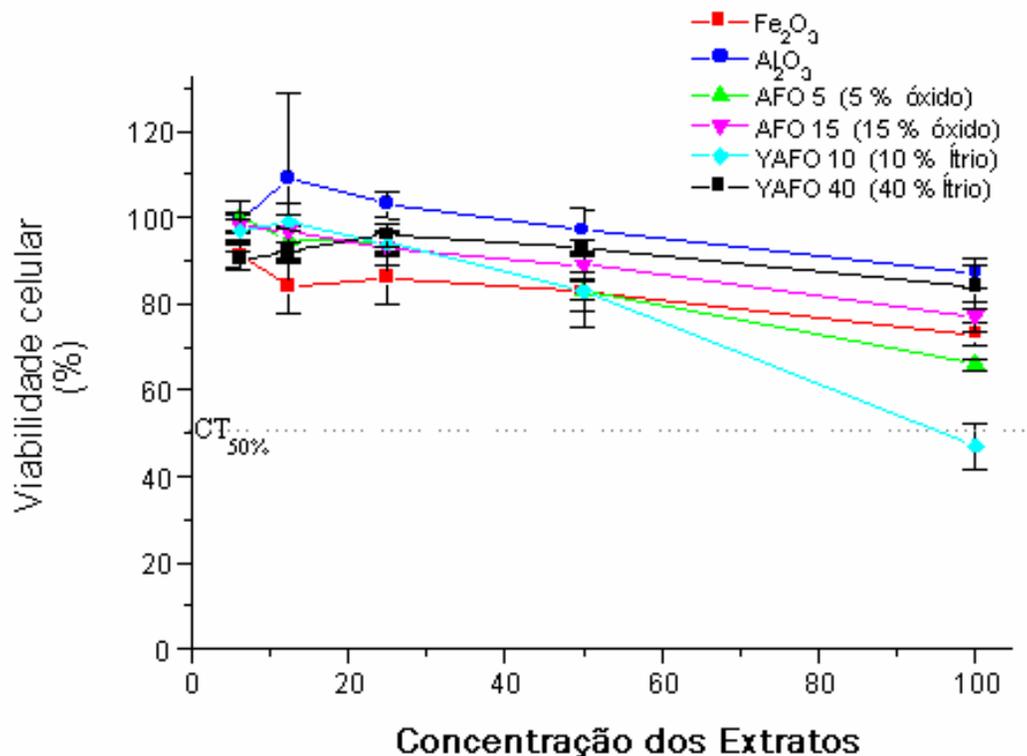


Figura- 22 Curva de citotoxicidade das amostras cerâmicas ferromagnéticas.

4.5.2- Atividade Hiperêmica

A resposta inflamatória a um implante sintético é controlada pela produção e difusão de mensageiros químicos derivados dos tecidos danificados e do exsudato inflamatório agudo. Os macrófagos estão entre as principais células efetoras da inflamação crônica, exercendo vários papéis. Uma vez ativados, os macrófagos exercem um papel fagocítico e secretor fundamental na defesa contra o agente agressor e são importantes na imunidade mediada por células. É fato conhecido da literatura que os macrófagos secretam os mediadores da inflamação aguda (particularmente o fator de ativação das plaquetas e metabólitos do ácido araquidônico), proteases e enzimas hidrolíticas (que causam dissolução do material extracelular), citocinas (que estimulam a proliferação dos fibroblastos e síntese do colágeno) e os fatores de crescimento.¹¹

A Figura 23 ilustra a variação da concentração de macrófagos no exsudato com o tempo de implante. Após duas semanas do implante a população de macrófagos diminuiu significativamente, indicando imunossupressão do processo inflamatório.

É fato bem conhecido da literatura que uma série de enzimas contidas nos leucócitos e macrófagos são liberadas no processo da inflamação, o que se traduz num aumento de sua atividade no local da reação inflamatória, enquanto que na zona de regeneração sua atividade é diminuída. A fosfatase alcalina é uma enzima presente nos leucócitos e macrófagos e por isso sua quantificação é de particular interesse para o estudo da relação entre o processo inflamatório e a biocompatibilidade dos materiais sintéticos.¹²

O processo inflamatório pós-implante das microesferas de *PHEMA/YFeAl* foi avaliado levando-se em conta a atividade da enzima fosfatase alcalina relativamente ao controle (silicone de grau médico). Os resultados apresentados na Figura 24 sugerem que a biocompatibilidade do sistema *PHEMA/YFeAl* é similar à do silicone grau médico, uma vez que a atividade da enzima fosfatase alcalina diminuiu significativamente em ambos os sistemas com relação ao tempo pós-implante.

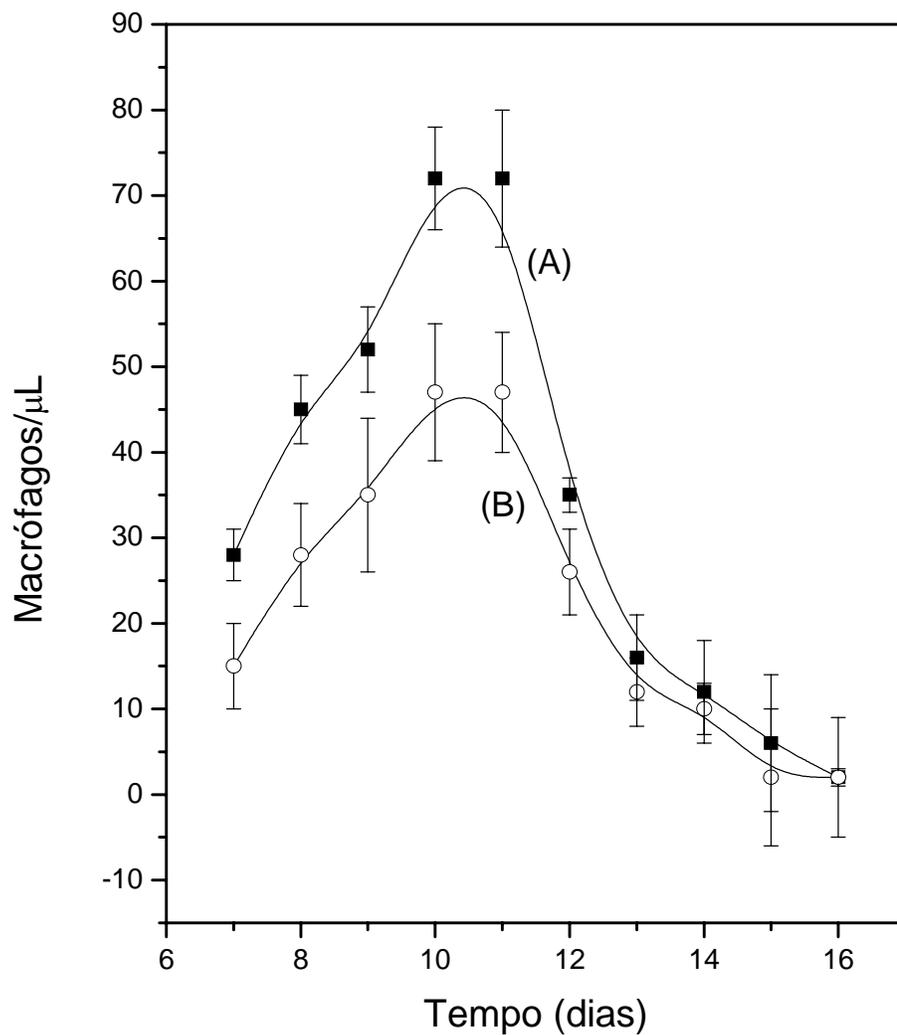


Figura 23- Variação na concentração de macrófagos no exsudato com o tempo de implantação das microesferas de *PHEMA/YFeAl* (A) e Silicone de grau médico (B).

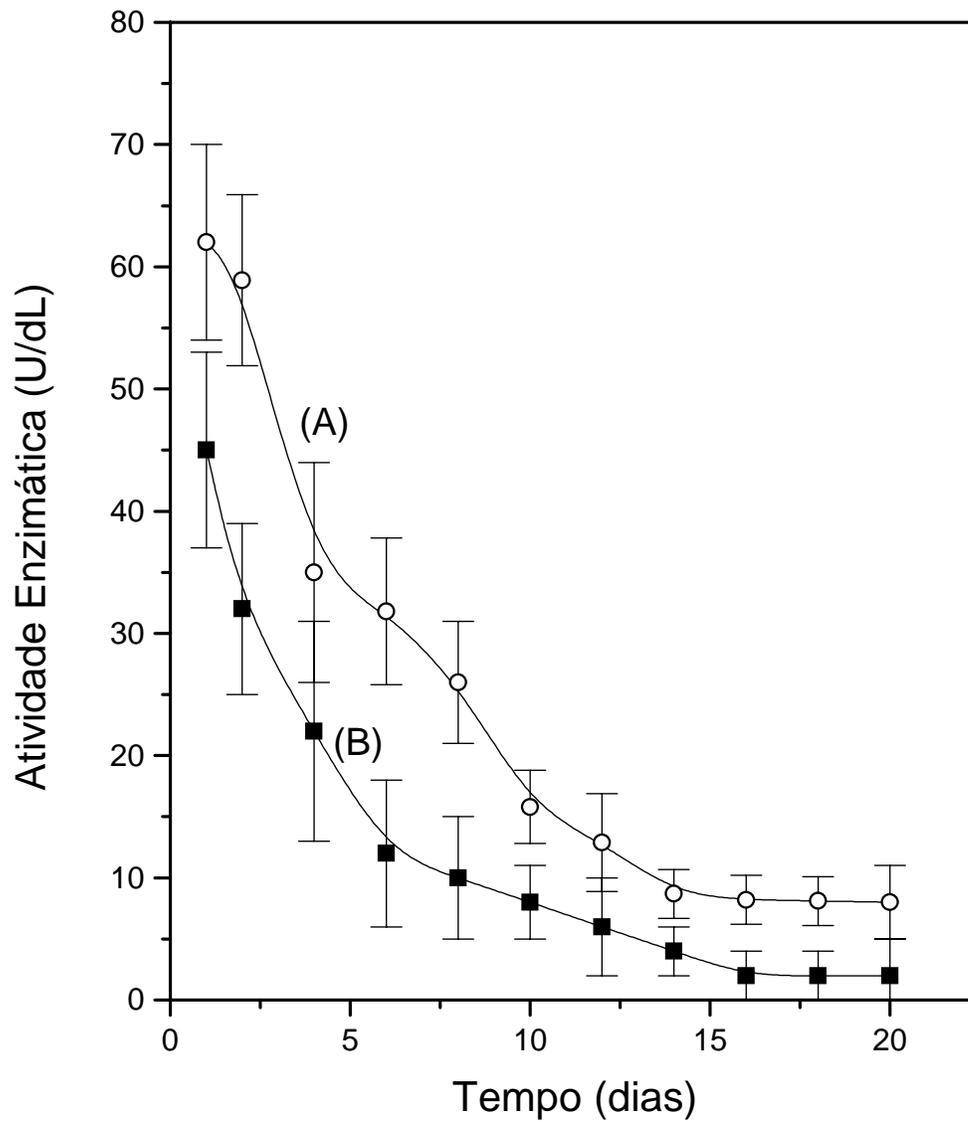


Figura 24- Atividade extracelular da fosfatase alcalina no exsudato de microesferas de *YFeAl* (A) e Silicone de grau médico (B) em função do tempo de implante.

4.6- Conclusões

O pó cerâmico obtido apresentou uma morfologia aproximadamente esférica, distribuição de tamanhos de partículas de 60 a 70 μm .

No difratograma de raios-X apresentou a fase cristalina ferrita Al-Fe e traços da fase secundários hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

As partículas das cerâmicas ferromagnéticas de *YFeAl* foram encapsuladas pelo polímero PHEMA e agente quimioterápico o 5-Fluorouracil (5-FU), apresentando revestimento biocompatível. A análise de citotoxicidade apresentou apenas citotóxico a amostra YAFO 10.

Observa-se que a temperatura ideal para o tratamento por hipertermia é atingida quando a estequiometria da reação na equação (3.2) é próximo a 1,7 ($x=1,70$).

O resultado apresentado na atividade hiperêmica indicou imunossupressão do processo inflamatório após duas semanas do implante a população de macrófagos diminuindo significativamente e a biocompatibilidade do sistema *PHEMA/YFeAl* é similar à do silicone grau médico uma vez que a atividade da enzima fosfatase alcalina diminuiu significativamente em ambos os sistemas com relação ao tempo pós-implante.

4.7- Referências Bibliográficas

[1] GRASSET F., MORNET S., DEMOURGUES A.; *Synthesis, magnetic properties, surface modification and cytotoxicity evaluation of $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$ ($0 \leq x \leq 2$) garnet submicron particles for biomedical applications*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 409–418(2001).

[2] CHEN Y. F.; WU K.T.; YAO Y. D.; PENG C. H.; YOU K.L.; TSE W. S., *The influence of Fe concentration on $Y_3Al_{5-x}Fe_xO_{12}$ garnets*, Microelectronic Engineering 81 (2005) 329–335.

[3] KOHILA T., *Effects of Aluminium and Lead on the Rodent Cerebral Synaptosomal Integral Proteins In Vivo and In Vitro*, Department of Clinical Veterinary Sciences University of Helsinki, Finland and Medical School University of Tampere, Finlan. 2004.

[4] SALGADO, P. E. T. *Toxicologia dos metais*. In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo, 1996.

[5] CHAN G.C.F. *Update on Targeted Therapy for Cancer*. Drug Review. 9(11):1-4, 2004.

[6] SAMPAIO L. C., GERALDO R. C., *Técnicas de Magnetometria*, Revista Brasileira de Ensino de Física, vol. 22, no. 3, Setembro, 2000.

[7] MICHEL PP, VYAS S, AGID Y., *Toxic effects of iron for cultured mesencephalic dopaminergic neurons derived from rat embryonic brains*, J Neurochem, 1992 Jul;59(1):118-27.

[8] COWIE J.M.G., *Chemistry & Physics of modern materials*, Polymers, New York (USA), Blackie & Son, 1991. pp. 77-81.

[9] PAINTER P.C., COLEMAN M.M. *Fundamentals of polymer science*. Lancaster-Pennsylvania (USA), 1994.

- [10] KITTEL C. *Introdução a Física do Estado Sólido*, Rio de Janeiro, Guanabara Dios, 1978.
- [11] STEVENS A., LOWE J. *Patologia*. SP, Ed. Manole, 1996. p. 75
- [12] SALTHOUSE T.N.; MATLAGA B.F.; Williams D.F., *Enzyme histochemistry of the cellular response to implants*. In: *Fundamental Aspects of biocompatibility*, Boca Raton, FL, CRC Press, 1981. pp. 233-257.
- [13] YUEN W. F.; FUNG K.P.; C.Y. LEE C. Y.; Y.M. CHOY Y. M., *Hyperthermia and tumour necrosis factor induced apoptosis via mitochondrial damage*, *Life Sciences* 67 (2000) 725-732.
- [14] LIONG E.; KONG K.S.; AU K. K.; LI J. Y.; XU G. Y., *Enhanced cytotoxicity and suppression of glucose transportate by combined treatment- of recombinant human tumour necrosis factor- α and rypertreemia on L929 cells*, *Life Scieaes*, Vol. 65, NO. 8, pp. PL 81-86.1999.
- [15] Kageyama, K.; Onoyama, Y.; Nakajima, T., *Rapid and simple gas chromatographic measurement of lactic acid in red blood cells, plasma, and tumor cells after hyperthermia*, *Life Sciences*, Vol. 51, pp. 407-410.
- [16] Anatoly A. K, Victor I.;Filippov R. N, *Application of magnetic liposomes for magnetically guided transport of muscle relaxants and anti-cancer photodynamic drugs*, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225 (2001) 95}100.
- [17] ANDREAS S.; LU B.; CHRISTOPH A., *Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting*, *Journal of Surgical Research* **95**, 200–206 (2001).

[18] Hilger R.; Hergt W.; Kaiser A., *Use of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer*, IEE Proceedings online no. (2005)5018.

[19] URS O. H.; SIOBHAN M.; SWEENEY.; BEVERLY A. B., *Externally Applied Magnetic Field. Preliminary In Vitro and In Vivo Results*, Nuct. Med. Biol. Vol. 22 No. 2, pp.147-155, 1995.

[20] MICHAEL F. X.. G.; EWA M. T.; RICHARD A. J., *Effects of hyperthermia and tumour necrosis factor on inflammatory cytokine secretion and procoagulant activity in endothelial cells*, Academic Press 10.1006/cyto.1999.

[21] SAUERWEIN W.; HESELMAN I.; K. OLTHOFF K.; H. SACK H., *Can low frequency, low intensity magnetic fields be used in cancer treatment*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 27 (1992) 347-359.

[22] VIROONCHATAPAQA E. H. S.; UENO M.; ADACHI I., *Magnetic targeting of thermosensitive magnetoliposomes to mouse livers in an in situ on-line perfusion system*, Life Sciences, Vol. 58, No. 24, pp. 2251-2261, 1996.

[23] Liu J.; Anthony G. F.; Sheng R., *In-vitro investigation of blood embolization in cancer treatment using magnetorheological Fluids*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 288 (2005) 354–365.

[24] Kumar A.G.; Gupta M., *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*, Biomaterials 26 (2005) 3995–4021.

[25] AHMAD S. N., *Hyperthermia treatment of cancer using magnetic nanoparticles*, Physics department, FSU, Tallahassee, FL 32306.

[26] Barcellos I. O.; Issa A. K.; Soldi V.; Pires A. T. N., *Influência do Comonômero e do Método de Polimerização na Cinética de Liberação de Fenobarbitona a partir de Hidrogéis*, Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau (FURB)

[27] <http://brazil.skeptidic.com/magnet.html>

[26] http://www.lincx.com.br/lincx/saude_a_z/conheca_examens/ressonancia.asp

[27]. Jeyanthi, R.; Rao, K.P. - *Biomaterials*, 11, 238 (1990).

[28] PANKHURST Q. A.; CONNOLLY J.; JONES S. K.; DOBSON J., *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36, 167-181, 2003.

[29] DE QUEROZ, A. A. A.; PASSOS, E. D.; SILVA, M. R.; HIGA, O. Z.; BRESSIANI, A. H. A.; BRESSIANI, J. C.; *Biocompatible superparamagnetic nanospheres for the cancer treatment in. iii congresso latino americano de órgãos artificiais e biomateriais 2004, Campinas, SP*, III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomaterias, 2004, p. 182.

[30] JORDAN A.; SCHOLZ R.; WUST P., *Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles*, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 201, 413-419, 1999.

[31] BOREFREUND, E, PUERNER, J.A., 1984. *A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay* (HTD/NR-90). *J. Tissue Culture Meth.* 9, 7-9.

[32] ARLTROP, J.A., *5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4,5-dimethylthiazol)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators*. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* 1, 611, 1991.

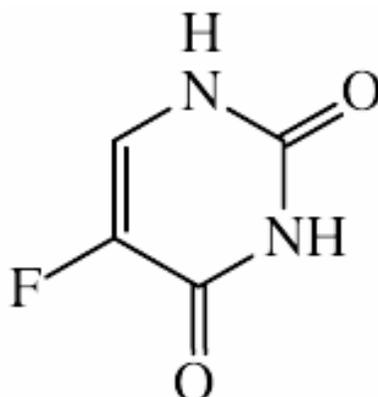
5- ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO FÁRMACO 5-FU DAS MICROESFERAS DE *PHEMA/YFeAl*

As principais formas de tratamento do câncer em qualquer idade são a cirurgia, a radioterapia, hipertermia e a quimioterapia. Outras modalidades chamadas adjuvantes podem ser utilizadas, como o transplante de medula óssea, a imunoterapia e os fatores de crescimento de colônias de granulócitos.

Como já discutido anteriormente, a hipertermia é uma técnica complementar às outras técnicas utilizadas no combate ao câncer, podendo ser utilizada antes ou depois da cirurgia, com o objetivo de reduzir o volume tumoral e, conseqüentemente, oferecer melhores condições de ressecção.

A escolha de um quimioterápico ideal para o tratamento do câncer é um verdadeiro dilema para o oncologista, pois apesar do grande número de quimioterápicos existentes no mercado, sua toxicidade contra células normais é a causa de inúmeros efeitos colaterais a saber: náuseas, vômitos, mielodepressão, anorexia, estomatite, diarreia, vômitos, gastrite, esofagite, fotossensibilidade, hiperpigmentação cutânea, neurotoxicidade entre outros. Tais efeitos colaterais agravam-se no tratamento de pessoas idosas e debilitadas, naturalmente mais sensíveis ao fármaco.

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um antimetabólito que bloqueia a síntese de DNA e RNA e a tradução de proteínas. Difunde-se bem em todos os tecidos e fluídos extracelulares, incluindo ascite, tumores, medula óssea, fígado, mucoso intestinal e líquido. É metabolizado pelo fígado. O 5-FU é um análogo da uracila com um átomo de flúor na posição C-5, como é mostrado na Figura 25.



Esquema 25- Estrutura química do 5-FU.

No meio intracelular o 5-FU, é convertido em vários metabólitos: fluorodioxuridina monofosfato (FdUMP), fluorodioxuridina trifosfato (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP). Esses são metabólitos ativos que interferem na síntese de RNA e na ação da enzima timidina sintetase (TS). A TS catalisa a metilação da deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP) com a utilização de um folato como doador metil. Esta reação fornece timidilato que é necessária para a replicação e o reparo do DNA. O FdUMP interage com a TS formando um complexo estável que bloqueia o substrato dUMP e inibe a síntese de dTMP. A depleção da dTMP resulta em depleção da deoxitimidina trifosfato (dTTP) que leva a alterações em outros deoxinucleotídeos. As alterações nos deoxinucleotídeos interrompem a síntese e o reparo do DNA, causando dano letal. Além disso, a inibição de TS resulta em acúmulo do dUMP, com aumento da deoxiuridina trifosfato. O dUTP e o FdUTP (metabólito do 5-FU) podem ser incorporados erroneamente ao DNA, o que impede o reparo da uracila através da excisão de nucleotídeo. Essas alterações levam à morte celular.¹

Embora o 5-FU seja um dos quimioterápicos mais comumente utilizados, seus efeitos colaterais hematológicos, gastrintestinais, cutâneos, neurológicos e sua nefrotoxicidade limitam sua utilização no combate ao câncer.²

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de vetores, capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do

regime de dosagem de princípios bioativos tem sido uma área de intensa pesquisa. Neste sentido, a síntese de microesferas constituídas por uma membrana polimérica capaz de alojar em seu interior o fármaco (Figura 26) tem atraído maior atenção da área médica e farmacêutica devido às suas potencialidades terapêuticas aliadas à maior estabilidade nos fluidos biológicos e uma redução significativa na toxicidade do fármaco devido ao processo de latenciação. A Figura 26 ilustra os principais sistemas vetores obtidos a partir de microesferas de polímeros amplamente utilizados na latenciação de fármacos.³⁻⁷

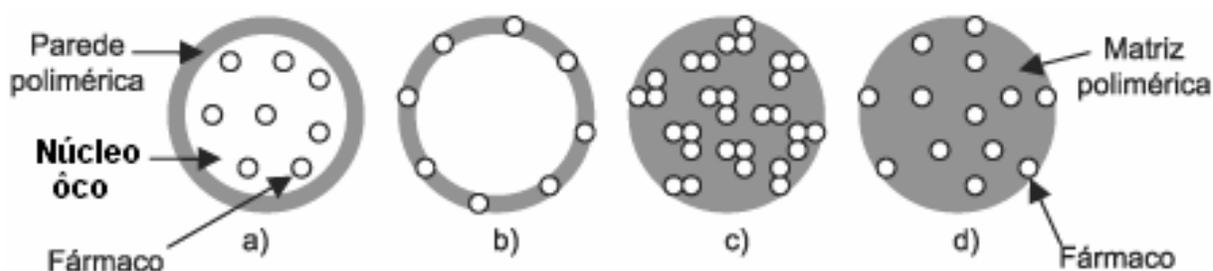


Figura 26- Representação esquemática de microcápsulas poliméricas: Fármaco dissolvido no interior de microesferas ocas (a), nas paredes de microesferas ocas (b), retido em uma microesfera (c), dispersos molecularmente em microesferas (d).

Neste trabalho, 5-FU foi incorporado às microesferas *PHEMA/YFeAl* para redução da toxicidade do agente antimetabólito e ao mesmo tempo permitir sua utilização junto com o tratamento do tumor por hipertemia. Microesferas de *PHEMA/YFeAl* contendo 5-FU foram preparadas após dispersão de 30 mg da droga no meio reacional da polimerização em suspensão. O conteúdo de 5-FU nas microesferas foi determinado utilizando a espectroscopia UV (Cary 50) e $\lambda_{\max}=266$ nm. Uma curva de calibração de 5-FU foi utilizada como referência ($C = 16.72A + 0.0416$ e $r^2 = 0.9998$). A eficiência do encapsulamento (razão entre o peso da droga encapsulada e o peso da droga adicionada ao processo) atingida neste trabalho foi de 85%.

A liberação de 5-FU das microesferas de *PHEMA/YFeAl* foi estudada em solução tampão fosfato (PBS) em pH 7,4 a 37 °C. Neste caso, cerca de 1,0 g de microesferas foram dispersas em 1000 mL de tampão PBS a 37 °C e mantidas sob agitação constante (60 rpm).

Alíquotas de 2 mL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e a quantidade de 5-FU liberada foi determinada com o auxílio da curva de calibração. O volume correspondente à alíquota retirada foi repostado por solução tampão para que o sistema permanecesse em equilíbrio.

A Figura 27 mostra a liberação do fármaco 5-FU em função do tempo. Observa-se que a liberação do fármaco atinge uma saturação quanto ao processo de dosificação do fármaco após um período de 60 horas. A liberação do 5-FU das microesferas de *PHEMA/YFeAl* é dominada por sua difusão através da matriz polimérica dada sua solubilidade no fluido fisiológico podendo-se considerar do ponto de vista cinético o fenômeno limitante do processo de liberação do fármaco. Durante o intervalo de tempo de 10 a 48 dias a variação da concentração do fármaco no meio fisiológico se ajusta com boa aproximação a uma reta (coeficiente de ajuste, $R=0,98787$), o que sugere uma concentração do fármaco praticamente constante neste intervalo de tempo.

Analisando-se a liberação do fármaco da matriz polimérica em função de $t^{1/2}$ (Figura 28), pode ser inferido que a cinética de liberação de 5-FU da matriz polimérica segue uma cinética onde a velocidade de liberação é proporcional a $t^{1/2}$. Estes dados estão em boa concordância com outros sistemas latenciados para a liberação de 5-FU existentes na literatura.⁸⁻⁹

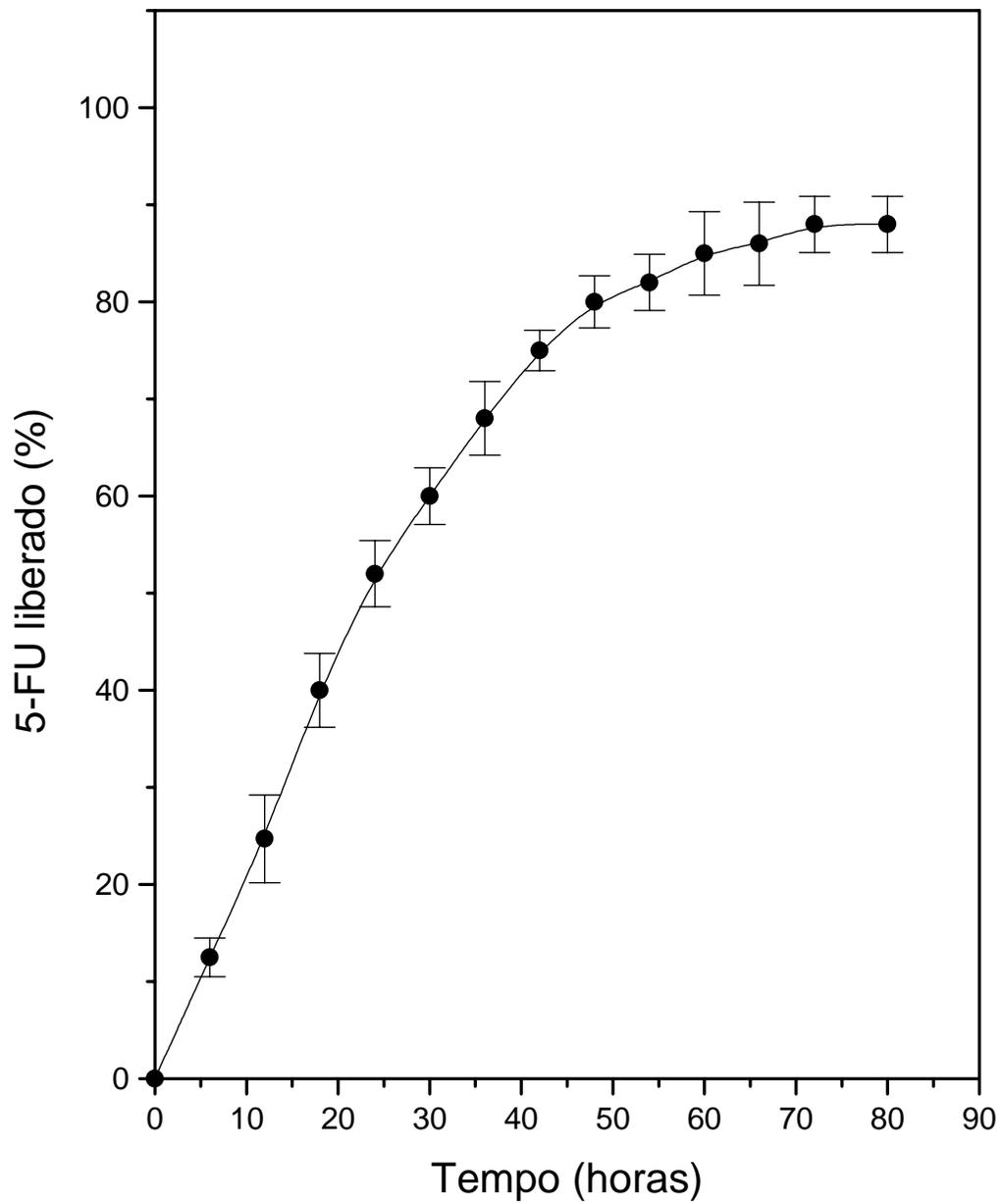


Figura 27- Liberação do 5-FU em tampão PBS a 37 °C de *PHEMA/YFeAl* microesferas (0,1 mg/g microesferas).

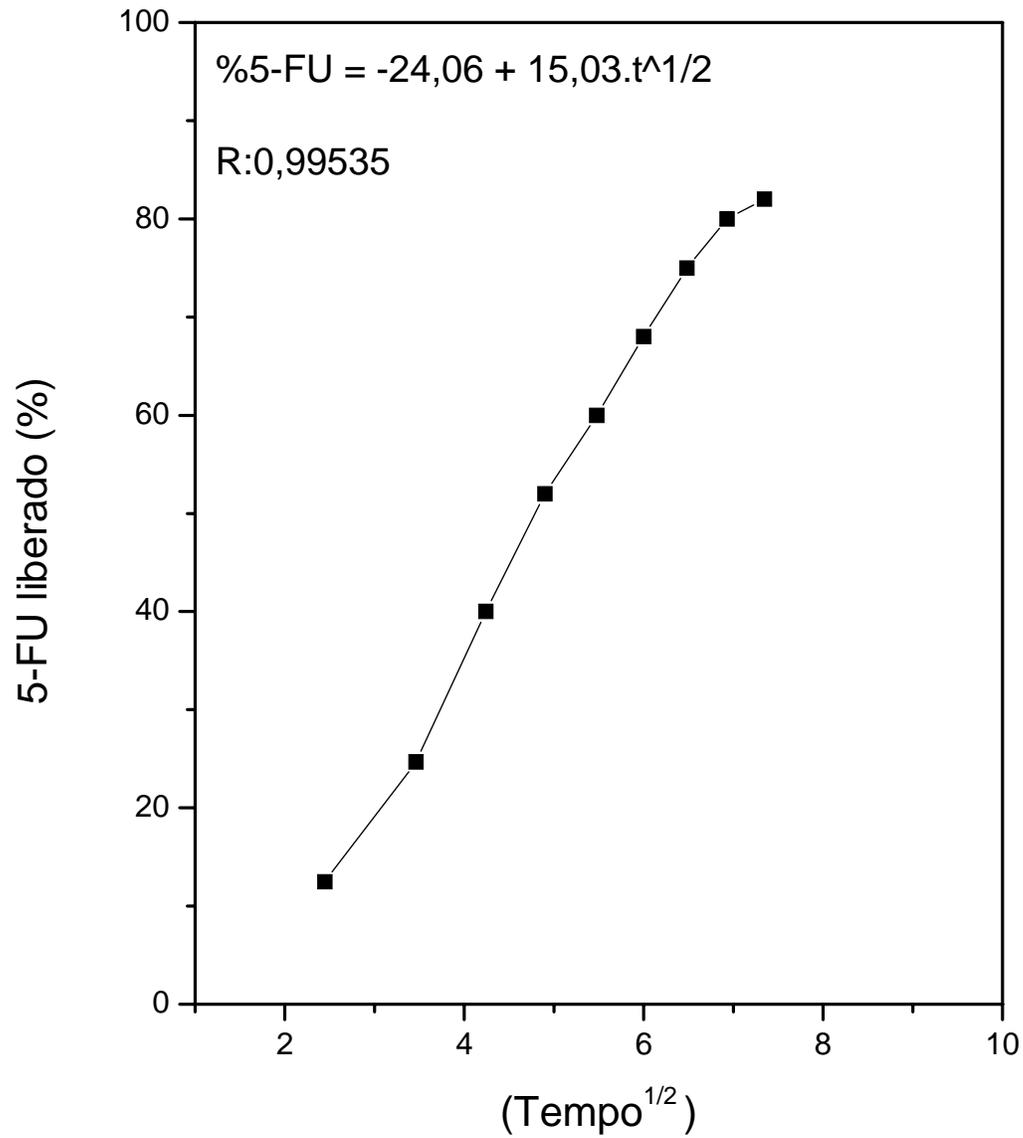


Figura 28- Dependência da liberação do 5-FU de $t^{1/2}$. Solução tampão PBS a 37 °C e razão 5-FU/PHEMA-YFeAl microesferas: 0,1 mg/g microesferas .

5.1- Conclusões

O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármaco tem sido alvo de pesquisas há pelo menos quatro décadas. Desde que foi sugerida sua aplicação na indústria farmacêutica, muitos resultados foram obtidos, especialmente na manipulação molecular de carreadores e no estudo de suas interações com as drogas encapsuladas.

Neste trabalho, utilizamos como sistema carreador microesferas magnéticas de *PHEMA/YFeAl*. O fármaco utilizado foi o 5-FU, amplamente utilizado como quimioterápico na área médica. A liberação da droga (5-FU) atingiu uma saturação quanto ao processo de liberação do fármaco após um período de 60 horas. O mecanismo dominante no processo de liberação do fármaco é o da difusão através de microporos existentes na parede das microesferas de *PHEMA/YFeAl*. Os dados cinéticos de liberação do fármaco sugerem uma cinética onde a velocidade de liberação é proporcional a $t^{1/2}$.

O carreador utilizado neste trabalho tem a vantagem de contornar propriedades físico-químicas limitantes (como a solubilidade aquosa ou em membranas) da droga encapsulada, melhorando assim sua farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição tecidual) e seus efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica) da mesma. O objetivo do sistema de liberação controlada de fármaco desenvolvido neste trabalho é o de manter a concentração do fármaco na faixa de ação terapêutica eficaz clinicamente, porém abaixo da dosagem tóxica por um tempo prolongado; utilizando-se de uma única dosagem.

O avanço alcançado neste trabalho pode vir a expandir de modo significativo, as opções na farmacoterapia do câncer utilizando como ferramental complementar a hipertermia. Vale lembrar que para pacientes com câncer a farmacoterapia é a principal ou senão a única saída para manter a liberação sob controle. Inclusive, a combinação de outros quimioterápicos poderá ser sugerida a partir deste estudo para o tratamento vetorizado do câncer em pacientes que não respondem ao tratamento convencional. Porém, pesquisas ainda são necessárias para a determinação dos limites da biocompatibilidade associados ao sistema aqui desenvolvido de forma a garantir de forma segura sua aplicação clínica.

5.2- Referencias Bibliográficas

- [1] GMEINER W.H. , *Novel Chemical Strategies for Thymidylate Synthase Inhibition*, Current Medicinal Chemistry, 12: 191-202, 2005.
- [2] BONASSA E.M.A., *Enfermagem em quimioterapia*. SP, Atheneu, 1998. pp. 199-200.
- [3] SEATON TL. ACNE. In: LEE-YOUNG L, KODA-KIMBLE MA (Eds) *Applied therapeutics*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA (2001) p. 3
- [4] GIANDALIA G.; DE CARO V.; CORDONE L. ; Giannola LI. , *Trehalose-hydroxyethylcellulose microspheres containing vancomycin for topical drug delivery*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 83-9, 2001.
- [5] SIVAKUMAR M.; PANDURANGA B.; RAO K., *Preparation, characterization and in vitro release of Gentamycin from corraline hydroxy apatite-gelatin composite microspheres*. Biomaterials 3175-3181, 2002.
- [6] DE JALON E.G.; BLANO-PRIETO M.J.; YGARTUA P.; SANTOYO S., *PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery*. Int. J. Pharm. 181-184, 2001.
- [7] BARRY B.W., *Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery*. Eur. J. Pharm. Sci. 101-114, 2001.
- [8] DENKBAS E.B.; SEYYAL M.; PISKINS E., *5-Fluorouracil loaded chitosan microspheres for chemoembolization*. J Microencapsul. 16(6):741-749, 1999.
- [9] SATO T.; KANKE M.; SCHROEDER H.G.; DELUCA P.P., *Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. I. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques*. Pharm Res. 5(1):21-30, 1988.

[10] ROSSLER B.; KREUTER J.; SCHERER D., *Collagen microparticles: Preparation and properties*. J. Microencapsul. 49-57, 1995.

[11] CRANK J., *The mathematics of diffusion*, Oxford University Press, 1975.

[12] BENOIT P., *Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded microparticles as biodegradable anticancer drug carriers*. J Pharm Pharmacol. 47:108-114, 1995.

[13] TOMLINSON E., *Passive and active vectoring with microparticles: localisation and drug release*. J Control Release. 2:385-391, 1985.

6 – CONCLUSÕES GERAIS

Nossos resultados mostram um horizonte promissor para a utilização de microesferas de *PHEM/YFeAl* contendo o quimioterápico 5-FU em hipertermia. Os resultados deste trabalho indicam que as microesferas podem ser sintetizadas através da polimerização em suspensão onde o núcleo da microesfera é preenchido com a cerâmica magnética e o agente quimioterápico (5-FU).

Em nosso trabalho, os estudos da estequiometria da cerâmica magnética do tipo $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$ sugerem que a composição adequada (x) para atingir-se a temperatura ideal para o tratamento por hipertermia parece ser igual a 1,70 (x=1,70). Entretanto, não conhecemos o mecanismo exato pelo qual a temperatura de transição de Curie (T_C) é atingida nesta composição. Aliada aos resultados deste trabalho, a modelagem molecular do sistema $Y_3Fe_{5-x}Al_xO_{12}$ é objeto de interessante pesquisa.

Como salientamos neste trabalho, poderão ser explorados nossos resultados para se obter microesferas magnéticas transportadoras de drogas para ambiciosas aplicações como, por exemplo, o tratamento do câncer de fígado. Entretanto, os resultados com relação à biocompatibilidade dos sistemas aqui sintetizados referem-se apenas aos ensaios fundamentais da experimentação *in vitro* e *in vivo*. a saber; citotoxicidade e hiperemia.

Podemos apontar como a principal dificuldade deste trabalho a obtenção de esferas com distribuição de tamanhos idealmente monodispersas não somente na escala micro mas também nanométrica. Entretanto, outros métodos de polimerização podem ser projetados para a obtenção de sistemas em escala nanométrica e cuja aplicação na medicina poderá atingir os horizontes sonhados.

Avaliando os ensaios *in vivo* e *in vitro* observamos que os resultados são satisfatórios e concordantes. O encapsulamento promove uma propriedade de biocompatibilidade significativa quanto ao processo de toxicidade tecidual após implante em animais. Embora os ensaios *in vivo* e *in vitro* tenham um significado importante para este trabalho, reconhecemos que uma experimentação animal de maior porte deve ser projetada onde um volume maior de dados estatísticos relativos a um conjunto de propriedades relativas à biocompatibilidade possa ser analisado com o rigor da estatística.

Os estudos da cinética de liberação do 5-FU indicam que a utilização do sistema PHEMA/YFeAl na área médica poderá garantir um tratamento de tumores localizados e com significativa redução da toxicidade do quimioterápico.

Acreditamos que nossa pesquisa trará uma contribuição significativa na obtenção de novos materiais para aplicação na hipertermia. Trabalhos futuros nesta área dirão da flexibilidade do método de aplicação em outros diferentes tipos de nanoesferas, por exemplo: biovidros. O que fizemos até agora representa apenas um primeiro passo nesta direção.

7- PERSPECTIVAS FUTURAS

A aplicação de microesferas PHEMA/YFeAl contendo o quimioterápico 5-FU representa uma vertente interessante quanto ao desenvolvimento de novos biomateriais em nosso país. Neste sentido, a química nanoscópica tem demonstrado ser uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de materiais em escala nanométrica.

Aliado à bioquímica e engenharia de materiais, partículas magnéticas de baixa toxicidade para o tecido biológico e ao mesmo tempo transportadoras de fármacos são oferecidas à medicina oncológica. Entretanto, a o elevado custo técnica de obtenção de microesferas biocompatíveis e do fármaco empregado excluem a população de baixa renda em nosso país são dois desafios que devem ser vencidos.

Espera-se que esta dissertação forneça as ferramentas iniciais para o desenvolvimento de sistemas simples e extremamente versáteis quanto ao seu tipo de aplicação na área da oncologia. O escopo do presente trabalho e obviamente, também o binômio tempo/instrumentação nos privaram de respostas a um conjunto de perguntas que surgiram após as respectivas análises dos resultados obtidos e que apresentamos aqui como as perspectivas ou sugestões para trabalhos futuros:

- 1 Estudar a hemocompatibilidade das microesferas obtidas quanto ao mecanismo de transporte de proteínas globulares e não globulares para uma melhor compreensão da interação entre o sistema sintético e o fluído fisiológico.
- 2 Medir a distribuição de cavidades nas micro- e nanoesferas sintetizadas em função da técnica de polimerização buscando, desta maneira, avaliar a efetiva área superficial dos sistemas obtidos.
- 3 Incorporar outros quimioterápicos e avaliar sua performance por técnicas *in vivo* e *in vitro*.
- 4 Estudar a influência de campos magnéticos oscilantes nos poros presentes nas paredes das micro- nanoesferas obtidas.

- 5 Utilizar de outros métodos de polimerização de forma a otimizar a distribuição do tamanho de partículas.
- 6 Analisar a influência das fases cristalinas na temperatura de transição de Curie ótima para a hipertermia.

Cada sugestão futura proposta acima tem como objetivo responder a perguntas altamente específicas e, cujas respostas contribuirão significativamente para o domínio da tecnologia de síntese de micro- nanoesferas magnéticas transportadoras de quimioterápicos. Acreditamos que as perguntas merecem respostas não somente para a satisfação intelectual, mas procurando também contribuir para que nossas universidades depositem seu olhar sobre àqueles que são nossa mais forte e pura motivação de existência científica: os excluídos de nossa sociedade.