

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

LAYLLA SILVA RAMALHO

***ESTUDO DO EFEITO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
BIOCOMPATÍVEIS NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS E
INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE CAPTURA E EXOCITOSE DAS
NANOESTRUTURAS POR CARDIOMIÓCITOS***

Goiânia,
maio de 2012

Laylla Silva Ramalho

***ESTUDO DO EFEITO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS
BIOCOMPATÍVEIS NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DE RATOS E
INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE CAPTURA E EXOCITOSE DAS
NANOESTRUTURAS POR CARDIOMIÓCITOS***

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Física da Universidade Federal de Goiás
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Física.*

Orientador: Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis

(Instituto de Física - UFG)

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro

(Instituto de Ciências Biológicas - UFG)

Goiânia,
maio de 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG mr

R165e Ramalho, Laylla Silva.
Estudo do efeito de nanopartículas magnéticas biocompatíveis no sistema cardiovascular de ratos e investigação do processo de captura e exocitose das nanoestruturas por cardiomiócitos [manuscrito] / Laylla Silva Ramalho. – 2012.
94 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis; Coorientador: Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 2012.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

Apêndices.

1. Nanopartículas magnéticas. 2. Ratos – Sistema Cardiovascular. I. Título.

CDU: 620.3:616.12-008

AGRADECIMENTOS

Durantes esses dois anos em que foi desenvolvido o meu trabalho de mestrado, recebi ajuda de muitas pessoas. Alguns me auxiliaram academicamente e outros me dando estrutura física e moral. Gostaria de agradecer a cada um deles que de uma forma ou outra me auxiliou durante o desenvolvimento deste trabalho, e de antemão peço desculpas caso eu me esqueça de citar o nome de alguém.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela minha existência e os dons por Ele concedidos a mim.

Agradeço à minha mãe, Maria de Fátima Ramalho, por todo o cuidado, carinho, dedicação e principalmente o amor que tens por mim. Ela é responsável por toda a estrutura física e moral que hoje possuo.

Agradeço aos meus irmãos Wilzianne e João Victor Ramalho por fazerem os meus mais felizes.

Agradeço ao meu namorado, Celio Seixo de Brito Junior, pelo apoio, dedicação, cuidado e amor. Por acreditar em mim e no meu trabalho, e além de tudo, me fazer muito feliz.

Ao meu orientador prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis, pela paciência ao me ensinar, dedicação ao meu trabalho, e por confiar a mim este projeto tão bonito. Além de tudo agradeço por me ensinar a ser uma pesquisadora e amar essa profissão. Ainda tenho muito a aprender.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Carlos Henrique de Castro pela paciência ao me ensinar a trabalhar com sistemas biológicos, pela dedicação que teve com o meu trabalho e por todas as contribuições no meu amadurecimento enquanto pesquisadora.

Aos meus colegas do grupo Nanodots magnéticos que de uma forma ou outra contribuíram no desenvolvimento do meu trabalho. Em especial o Milton Rodrigues pela ajuda com as medidas de magnetoforese, o Nicholas Zufelato com a ajuda na síntese do fluido magnético e algumas amostras utilizadas e o Luis Cesar Branquinho por me acompanhar e me auxiliar durante todo o meu trabalho.

Aos meus colegas do grupo de Fisiologia de Órgãos Isolados por me ensinarem e auxiliarem durante os experimentos de coração isolado e *in-vivo*. Em especial à Ava Mayara pela ajuda com os experimentos de coração isolado de ratos, à Gisele pela ajuda nas cirurgias para canulação de artéria e veia femoral em ratos.

Aos professores do Instituto de Física que contribuíram na minha formação enquanto física.

E a todos os meus amigos e familiares.

RESUMO

Fluidos magnéticos (FM) consistem de nanopartículas magnéticas formadas por ferritas dispersas em um líquido carreador formando uma composição coloidal. Estas nanoestruturas têm atraído a atenção da comunidade biomédica já que possuem aplicações na área de carreadores de fármacos, detecção de doenças, e podem, ainda, contribuir para o tratamento de diversas doenças, inclusive cardiovasculares. Este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar o efeito *ex-vivo* de nanopartículas magnéticas biocompatíveis no funcionamento de corações de ratos e, *in-vivo*, na pressão arterial e frequência cardíaca de ratos wistar e, também, (ii) investigar o processo de endocitose/adsorção e exocitose/dessorção de nanopartículas magnéticas biocompatíveis em cardiomiócitos via técnica de magnetoforese. As amostras foram sintetizadas e caracterizadas por Difração de Raio-X (DRX), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM). A função cardíaca foi avaliada pela técnica de Langendorff com fluxo constante. Por outro lado, para avaliar o efeito das nanopartículas nos parâmetros cardiovasculares *in vivo*, artéria e veia femoral foram canuladas e o registro da pressão arterial e frequência cardíaca foi realizado após 24 hs. A infusão do fluido magnético nos corações isolados promoveu ligeiro aumento na pressão intraventricular diastólica e uma queda na pressão intraventricular sistólica. O fluido promoveu uma leve diminuição na pressão de perfusão, o que representa uma vasodilatação coronariana, sendo esse efeito reversível durante a lavagem. A infusão das nanopartículas magnéticas não promoveu alterações significativas na pressão arterial ou frequência cardíaca. Estes resultados sugerem a viabilidade para a utilização clínica das nanopartículas magnéticas. Adicionalmente, experimentos de magnetoforese foram realizados para avaliar fenômenos associados à interação de nanopartículas com cardiomiócitos dissociados do coração de ratos. Diferentes amostras de nanopartículas de ferrita de manganês, contendo diâmetros distintos e diferentes camadas de cobertura, foram avaliadas em função do tempo de incubação. Observou-se, além de um processo endocitótico (ou adsortivo), um mecanismo exocitótico (ou dessorativo) a partir de um tempo crítico. Um modelo matemático que incluiu ambos os mecanismos foi desenvolvido e, conjuntamente com outros da literatura, permitiu estimar o tempo de “wrapping” de cada nanopartícula. Os resultados mostraram-se fortemente dependente do diâmetro das nanopartículas e, inclusive, corroboram com modelos teóricos de endocitose de nanopartículas mediada por receptores.

ABSTRACT

Magnetic fluids consist of surface-coated magnetic nanoparticles dispersed in a liquid carrier. These nanostructures have attracted a lot of attention of the biomedical community because of its possible applications as drug carriers, disease detection, and also on the treatment of several diseases, including cardiovascular ones. This work had the following objectives: (i) evaluate the effect *ex-vivo* of biocompatible magnetic nanoparticles in the rat heart function and, *in-vivo*, in the arterial blood pressure and heart rate of the rats, as well as, (ii) investigate the endocytosis and exocytosis of the nanoparticles through a magnetophoresis technique. The samples were characterized by X-ray diffraction (XRD), Dynamic light scattering (DLS) and Vibrating sample magnetometer (VSM). The cardiac function was evaluated by the Langendorf technique under constant flow. On the other hand, in order to evaluate the effect of nanoparticles in the cardiovascular parameters, femoral artery and vein were cannulated and arterial pressure and heart rate were measured after 24 hs. The magnetic fluid infusion in the isolated heart showed a tiny increase of the intraventricular diastolic pressure and a decrease of the intraventricular systolic pressure. No changes were observed in perfusion pressure. The infusion of the magnetic nanoparticles in the rats had not promoted any significant variations of the artery pressure or the heart rate. These results suggest that magnetic nanoparticles can be used on clinical trials. In addition, magnetophoresis experiments were performed in order to investigate phenomenon associated to nanoparticles and dissociated cardiomyocytes interactions from rat heart. Different samples containing distinct particle sizes and coating layers were evaluated as function of incubation time. It was observed that, besides endocytosis (or adsorption), an exocytosis (or desorption) mechanism start to occur above a critical time. A mathematical model that takes into account both mechanisms were developed which, together with other works from the literature, allowed us to estimate the individual wrapping time of the nanoparticles. The results show a strong dependence upon nanoparticle diameter and corroborate with theoretical models of receptor-mediated endocytosis of nanoparticles.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Fluidos magnéticos	19
1.2	aplicações de fluidos magnéticos	22
2	OBJETIVOS	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	síntese do fluido magnético	26
3.1.1	Síntese das nanopartículas de magnetita	26
3.1.2	Recobrimento das nanopartículas com citrato	27
3.2	Caracterização do fluido magnético.....	28
3.2.1	Difratometria por Raios-X	28
3.2.2	Espalhamento de Luz Dinâmico	30
3.2.3	Magnetometria de Amostra Vibrante.....	31
3.3	Coração isolado de ratos.....	37
3.4	Canulação de artérias e veias femorais.....	40
3.5	Protocolo de isolamento de cardiomiocitos.....	41
3.6	Magnetoforese.....	43
3.7	Modelo matemático que descreve o processo de internalização (ou adsorção a membrana celular) de nanopartículas pelas células.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1	Difração de raios-x.....	55
4.2	Magnetometria de amostra vibrante (Vsm).....	57

4.3	efeito do fluido magnético no coração isolado de ratos	59
4.4	Análises de amostras dos corações isolados por magnetometria de amostra vibrante	64
4.5	efeito do fluido magnético na pressão arterial e frequência cardíaca de animais acordados.....	66
4.6	Magnetoforese.....	68
5	CONCLUSÕES	83
6	PERSPECTIVAS	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-1 Representação esquemática de um fluido magnético (a) surfactado (b) iônico (c) iônico-surfactado.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 3-1- Fotografia do Difratorômetro de Raios-X da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.	29
Figura 3-2- Fotografia do ZetaSizer (Nano-ZS, Nano Series) da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.	30
Figura 3-3- Diagrama esquemático do VSM.....	31
Figura 3-4- Arranjos de bobinas de detecção usadas no VSM [3].	32
Figura 3-5- Fotografia do VSM EV7 System do Laboratório de Magnetometria e Magnetotransporte do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.	32
Figura 3-6- Aparato experimental utilizado no ensaio de perfusão.....	39
Figura 3-7- Aparato experimental utilizado no ensaio de dissociação de cardiomiócitos.	42
Figura 3-8 - Diagrama de bloco do aparato experimental utilizado.	44
Figura 3-9 – Diagrama que representa a disposição da amostra com relação ao imã. ...	45
Figura 3-10- Fotografia do aparato experimental utilizado no experimento de magnetoforese.....	45
Figura 3-11 - Gráfico do número de nanopartículas em função do tempo para diferentes tempos de captura.	51
Figura 3-12 - Gráfico do número de nanopartículas que permanecem endocitadas (ou adsorvidas) em função do tempo para diferentes valores da razão entre o número de nanopartículas exocitadas (N_{exo}) e o número de nanopartículas capturadas (N_{cap}).	52
Figura 3-13 - Gráfico do número de nanopartículas em função do tempo para diferentes tempos t_{minexo}	53

Figura 3-14 - Gráfico do número de nanopartículas em função do tempo para diferentes razões entre τ_{exo} e τ_{cap}	54
Figura 4-1 - Difratoograma de nanopartículas de magnetita recobertas com (A) o dobro da concentração de citrato, (B) a concentração padrão de citrato e (C) cobertura com a metade da concentração de citrato.....	56
Figura 4-2 - Curva de magnetização em função do campo magnético aplicado das amostras de nanopartículas de magnetita recobertas com citrato em (A) fluido e (B) pó.	58
Figura 4-3 - Efeito do fluido magnético na pressão intraventricular sistólica (A) e diastólica (B) decorações isolados de ratos, os corações foram perfundidos pela técnica de Langendorff. Os dados estão expressos como média \pm EPM (Two-way Anova seguido do pos-teste LSD de Fisher). * $p < 0,05$ vs. basal, + $p < 0,05$ vs controle, nos respectivos tempos.....	61
Figura 4-4- Efeito do fluido magnético na pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos, os corações foram perfundidos pela técnica de Langendorff. Os dados estão expressos como média \pm EPM (Two-way Anova seguido do pos-teste LSD de Fisher). * $p < 0,05$ vs. basal, + $p < 0,05$ vs controle nos respectivos tempos.....	62
Figura 4-5- Efeito do fluido magnético na pressão de perfusão de corações isolados de ratos, os corações foram perfundidos pela técnica de Langendorff. Os dados estão expressos como média \pm EPM (Two-way Anova seguido do pos-teste LSD de Fisher). * $p < 0,05$ vs. basal, + $p < 0,05$ vs controle nos respectivos tempos.	62
Figura 4-6 - Efeito do fluido magnético na frequência cardíaca de corações isolados de ratos, os corações foram perfundidos pela técnica de Langendorff. Os dados estão expressos como média \pm EPM.....	63

Figura 4-7- Resultados experimentais de magnetometria dos orações perfundidos pelo fluido magnético. (A) momento magnético x campo aplicado para o coração 1 e (B) curva de magnetizacão para três corações.	65
Figura 4-8- Efeito <i>in vivo</i> do fluido magnético. Gráficos da pressão arterial sistólica (A) e diastólica (B). E gráfico da variação da frequência arterial (C). Os dados estão expressos como média ± EPM (One-way Anova seguido do pos-teste de Bonferroni). 67	
Figura 4-9 - Fotografia da trajetória de um cardiomiócito magnético que se moveu devido gradiente de campo magnético.	71
Figura 4-10 - Gráfico da velocidade média dos cardiomiócitos em função do tempo... 73	
Figura 4-11 - Gráfico do número de nanopartículas por célula em função do diâmetro para diferentes tempos de incubação.	74
Figura 4-12 –Gráfico do número de nanopartículas de ouro internalizadas em diferentes tipos de células em função do tamanho das nanopartículas [23].....	75
Figura 4-13 - Gráfico do número de nanopartículas internalizadas em função do tempo.	76
Figura 4-14 - Gráfico do número de nanopartículas (SPIO) internalizadas em função do tempo em macrófagos [24].	78
Figura 4-15- Gráfico da quantidade de massa em função do tempo.	78
Figura 4-16 - Diâmetro da nanopartícula e o tempo de wrapping correspondente como função de um parâmetro não-específico F [18].	82
Figura I 1 - Ilustração do sistema circulatório e das câmaras cardíacas de mamíferos [30].....	87
Figura I 2- Ilustração do coração com os vasos sanguíneos responsáveis pela circulação sanguínea [31].....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1 - Dados de mortalidade segundo causas definidas e regiões no Brasil em 2005. Dados coletados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Governo Federal.	Erro! Indicador não definido.
Tabela 3-1 - Tabela contendo a composição e concentrações dos sais da Solução de Krebs-Ringer.	38
Tabela 4-1 - Resultados experimentais de magnetometria dos fluidos sintetizados.	58
Tabela 4-2 - - Dados obtidos no experimento de Espalhamento de Luz Dinâmico.	59
Tabela 4-3- Valores basais das pressões intraventriculares sistólica e diastólica, pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo e pressão de perfusão, n=10, * P<0,05.	60
Tabela 4-4 – Valores basais da pressão arterial e da frequência cardíaca dos experimentos com animais vivos.....	66
Tabela 4-5– Amostra de dados obtidos no experimento de magnetoforese.....	72
Tabela 4-6- Parâmetros utilizados nos cálculos do número de nanopartículas internalizadas em função do tempo.	77
Tabela -4-7– Valores de t_w para as condições do nosso sistema.	80
Tabela II. 1–Composição do CIB	90
Tabela II. 2–Composição do Tyrode.	91

PREFÁCIO

A presente dissertação insere-se na área de nanomedicina que avalia o potencial da utilização de nanoestruturas para **aplicações teranósticas**, ou seja, diagnósticas e/ou terapêuticas. Em particular, sua subárea é denominada nanomagnetismo biomédico, já que avalia efeitos biomédicos utilizando nanoestruturas magnéticas.

Na literatura estes sistemas têm sido utilizados para a detecção de diferentes doenças, inclusive as cardiovasculares [1], já que estes sistemas apresentam-se como excelentes agentes de contraste no processo de imageamento por ressonância magnética nuclear (ou mesmo na tomografia computadorizada [2]); no desenvolvimento de terapias inovadoras para o tratamento de neoplasias malignas, via, por exemplo, a entrega de calor localizada por meio do fenômeno de magnetohipertermia [3; 4; 5; 6], que consiste de um aumento de temperatura das nanopartículas quando submetidas a ação de campo magnético alternado com frequência e amplitude adequadas; entrega controlada de fármacos/genes via liberação termoinduzida ou vetorização magnética [7]; marcação de células-tronco [8; 9], entre outras aplicações.

A vasta possibilidade de aplicações de nanopartículas magnéticas em diversas doenças torna este sistema um sistema de grande interesse acadêmico e industrial. Entretanto, nesta dissertação o nosso interesse principal está na utilização de nanopartículas magnéticas na área cardiovascular. Para tal utilizou-se fluidos magnéticos biocompatíveis, que consistem de nanopartículas magnéticas contendo recobrimento molecular adequado para garantir sua estabilidade em pH fisiológico. Foram tratadas aqui questões fundamentais que podem auxiliar, no futuro, no desenvolvimento de terapias inovadoras mais eficazes para o tratamento de algumas doenças cardiovasculares, conforme explicado mais adiante.

Nossos objetivos principais foram:

(i) avaliar o efeito *ex-vivo* de nanopartículas magnéticas biocompatíveis no funcionamento de corações de ratos wistar (técnica de Langendorf) e, *in-vivo*, na pressão arterial e frequência cardíaca de ratos wistar;

(ii) investigar o processo de endocitose (ou adsorção a superfície da membrana) e exocitose (ou desorção a superfície da membrana) de nanopartículas magnéticas biocompatíveis em cardiomiócitos via técnica de magnetoforese.

O primeiro objetivo visou avaliar a toxicidade dessas nanoestruturas e sua influência no funcionamento do coração. Apesar de encontrarmos efeitos associados à presença de nanoestruturas (possivelmente internalizadas) nos cardiomiócitos, ficou claro que no modelo *in vivo* tal sistema não apresenta (dentro das condições experimentais) qualquer efeito nocivo a sua utilização visando aplicações biomédicas. A partir daí foi decidido entender melhor a interação de nanopartículas com os cardiomiócitos. Estes foram dissociados do coração (protocolo de Takao Shioya [10]) e colocados em uma solução (tyrode), um determinado volume dessa solução contendo cardiomiócito foi separado em um eppendorf que continha também nanopartículas magnéticas. Foi variado, então, o tempo de incubação e o diâmetro das nanopartículas, e por meio da técnica de magnetoforese foi investigada a interação das nanopartículas com os cardiomiócitos. Um modelo que leva em conta mecanismos endocitóticos/adsortivos e exocitóticos/dessortivo foi desenvolvido e permitiu aferir que a interação dessas nanoestruturas foi fortemente dependente da escala de tamanho das nanopartículas. A técnica utilizada, apesar de simples, foi inovadora neste tipo de estudo e, forneceu resultados muito importantes para o entendimento da dinâmica de interação entre as nanopartículas e os cardiomiócitos. Estas informações podem ser de

fundamental importância na marcação de células-tronco (diferenciadas ou não), assim como no direcionamento localizado das mesmas para regiões de interesse terapêutico. Algumas destas questões serão brevemente discutidas no final da dissertação já que esta foi, e ainda é, na verdade a grande motivação para desenvolver os estudos aqui relatados.

A presente dissertação foi dividida em cinco capítulos distribuídos da seguinte forma:

O Capítulo 1 faz uma breve introdução sobre fluidos magnéticos e os sistemas utilizados no trabalho assim como suas possíveis aplicações biomédicas. O Capítulo 2 apresenta os objetivos gerais e específicos do trabalho. O Capítulo 3 descreve as metodologias utilizadas na dissertação, como síntese e caracterização do fluido magnético, descrição dos experimentos de coração isolado de ratos e dos registros dos parâmetros cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) *in vivo*, dissociação de cardiomiócitos para verificar a interação entre nanopartículas e cardiomiócitos, bem como para investigar o processo endocitótico/adsortivo e exocitótico/dessortivo. Também foi feito um modelo teórico que estima (a partir da análise dos dados experimentais) o número de nanopartículas interagentes em cada cardiomiócito. O Capítulo 4 discute os resultados obtidos no trabalho e as novas perspectivas para a pesquisa. O Capítulo 5 apresenta as conclusões obtidas sobre o que foi verificado na pesquisa desenvolvida nesta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vem acontecendo uma revolução na ciência e na tecnologia com o surgimento de uma nova área de pesquisa, a nanociência e a nanotecnologia. Essa revolução deve-se a observações de que materiais em escala nanométrica, ou materiais nanoestruturados, podem apresentar diferentes propriedades físicas e químicas e biológicas (propriedades elétricas, térmicas, magnéticas, dentre outras) quando comparados com sistemas macroscópicos (“bulks”) de mesma composição.

Em geral, tal fenômeno está associado a efeitos de superfície, pois com a miniaturização dos materiais, a fração entre o número de átomos contidos na superfície de uma partícula e o número de átomos contidos em todo o seu volume aumenta drasticamente. Esse é um dos fatores que tornam esse tipo de materiais tão importante, e que os diferenciam dos materiais macroscópicos.

A nanociência e a nanotecnologia são, respectivamente, o ramo da ciência que estuda as propriedades desses materiais, e a área que estuda suas aplicações tecnológicas (biomédicas, ambientais, etc.). O domínio da nanotecnologia compreende estruturas entre 0,1 e 300 nm (desde dimensões atômicas até aproximadamente o comprimento de onda da luz visível), dimensões onde as propriedades dos materiais podem ser determinadas e também controladas de acordo com cada interesse [11]. Atualmente, podem-se produzir de maneira controlada e reprodutiva, filmes finos e multicamadas (sistemas com uma dimensão reduzida), nanofios, nanotubos e nanobastões (sistemas com duas dimensões reduzidas), e nanopartículas e pontos quânticos (sistemas com as três dimensões reduzidas).

Nanociência e nanotecnologia se caracterizam por alto grau de multidisciplinaridade visto que diversos problemas e estudos com sistemas

nanoestruturados demandam equipes de diversas áreas do conhecimento, por exemplo: físicos, químicos, biólogos, farmacêuticos, dentre outros. Essa característica torna os estudos nessa área cada vez mais abrangentes e de aplicações muito interessantes.

Diversas áreas da saúde, por exemplo, ainda precisam ser exploradas e desenvolvidas tecnologias para diagnóstico e terapia de determinadas doenças, e o caráter multidisciplinar da nanociência e da nanotecnologia as tornam interessantes para esse tipo de aplicação.

As doenças cardiovasculares tem sido a principal causa de mortes em todas as regiões do Brasil. A Tabela 1.1 abaixo mostra dados da mortalidade segundo causas e regiões do Brasil para dados obtidos no ano de 2005, coletados pela Secretaria de Vigilância em Saúde. Desta forma, quaisquer estudos com aplicações em cardiologia são de grande interesse para a ciência e para a sociedade.

Tabela 1.1- Dados de mortalidade segundo causas definidas e regiões no Brasil em 2005. Dados coletados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Governo Federal.


Secretaria de Vigilância em Saúde **SVS** anos

Mortalidade segundo causas definidas e regiões. Brasil, 2005

	REGIÕES					
	N	NE	SE	S	CO	BRASIL
1	DAC	DAC	DAC	DAC	DAC	DAC
2	Causas Externas	Causas Externas	Neoplasias	Neoplasias	Causas Externas	Neoplasias
3	Neoplasias	Neoplasias	Causas Externas	Causas Externas	Neoplasias	Causas Externas
4	DAR	DAR	DAR	DAR	DAR	DAR
5	DIP	DEndócrinas	DAD	DEndócrinas	DIP	DEndócrinas
6	Afecções Perinatais	DIP	DEndócrinas	DAD	DAD	DAD
7	DEndócrinas	DAD	DIP	DIP	DEndócrinas	DIP
8	DAD	Afecções Perinatais	Afecções Perinatais	Afecções Perinatais	Afecções Perinatais	Afecções Perinatais
9	Anomalias Congênicas	DAGU	DAGU	DSNerv	DSNerv	DAGU
10	DAGU	DSNerv	DSNerv	DAGU	DAGU	DSNerv
11	DSNerv	Anomalias Congênicas	Anomalias Congênicas	Anomalias Congênicas	Anomalias Congênicas	Anomalias Congênicas

DAC: Doenças do Aparelho Circulatório; DAR: Doenças do Aparelho Respiratório; DIP: Doenças Infecciosas e Parasitárias; DAD: Doenças do Aparelho Digestivo; DAGU: Doenças do Aparelho Gênito - Urinário; DSNer: Doenças do Sistema Nervoso

Fonte: SIM/SVS/MS

Ministério da Saúde  GOVERNO FEDERAL

Com isso o presente trabalho tem como interesse principal a utilização de nanopartículas magnéticas na área cardiovascular. Para tal foram sintetizados e caracterizados fluidos magnéticos biocompatíveis, que consistem de nanopartículas magnéticas contendo recobrimento molecular adequado para garantir sua estabilidade em pH fisiológico, e utilizados para diagnosticar efeitos em sistemas cardiovasculares *ex-vivo* e *in-vivo* em ratos wistar. Os experimentos realizados visam avaliar a possibilidade do uso desses fluidos magnéticos para auxiliar, no futuro, no desenvolvimento de terapias inovadoras mais eficazes para o tratamento e diagnóstico de algumas doenças cardiovasculares.

1.1 FLUIDOS MAGNÉTICOS

Um tipo de material nanoestruturado que vem ganhando muita atenção nas últimas décadas são os fluidos magnéticos (FM). O fluido magnético consiste de nanopartículas magnéticas dispersas em um líquido carreador que pode ser polar (água) ou apolar (óleos e hidrocarbonetos) formando uma composição coloidal. As nanopartículas magnéticas são formadas basicamente por ferritas (magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), etc.), sendo constituídas, geralmente, por monodomínios magnéticos.

Os primeiros fluidos magnéticos foram desenvolvidos na década de 60 por Solomon S. Papell na Agência Espacial Norte Americana (NASA). O fluido foi preparado pela técnica de moagem [12]. Papell usou um pó micrométrico de um metal ou de um óxido metálico e o reduziu a escala nanométrica por meio de moagem na presença de um agente químico. Esta técnica é demorada e pouco eficiente comparada a outras técnicas utilizadas atualmente.

Os métodos de preparação de fluidos magnéticos consistem basicamente em três etapas: síntese de nanopartículas magnéticas, tratamento superficial das nanopartículas para a introdução de um agente promotor de estabilização coloidal, e dispersão das nanopartículas na fase líquida (peptização). Dentre as diversas técnicas de síntese de fluidos magnéticos destacam-se:

- Método de coprecipitação por hidrólise em meio aquoso: utilizado principalmente para preparar nanopartículas de óxidos de ferro. Sua preparação consiste na coprecipitação dos íons metálicos em soluções aquosas por meio de reações de hidrólise alcalina, seguida de condensação e polimerização.

- Método de coprecipitação em microemulsão (micela reversa): microemulsões são suspensões coloidais constituídas de no mínimo três componentes, sendo dois deles líquidos imiscíveis (água e um solvente orgânico) e o terceiro um surfactante. Nanogotículas de água são dispersas no solvente orgânico e adquirem estabilidade coloidal, que é promovida pelo surfactante adsorvido na superfície das nanogotículas, impedindo coalescência das mesmas. Esses sistemas podem ser utilizados para a síntese de nanopartículas fazendo-se o uso das nanogotículas como nanoreatores. Podem-se empregar as mesmas reações utilizadas para coprecipitação em meio aquoso.

- Método de decomposição de compostos de coordenação: é muito utilizado na preparação de fluidos magnéticos à base de nanopartículas metálicas. A síntese consiste na decomposição de compostos como $\text{Fe}(\text{CO})_5$ e $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ em solventes orgânicos, na presença de um surfactante ou de um polímero, em atmosfera inerte.

De modo geral, os fluidos magnéticos sintetizados atualmente são caracterizados por núcleos magnéticos em escala nanométrica recobertos por uma camada de cobertura estabilizante que podem ser cadeias funcionais surfactantes (FM surfactados), íons (FM iônico) ou uma combinação das cadeias funcionais surfactantes com íons (FM iônico-surfactado) dispersos em um líquido carreador estabilizante. A Figura 1.1 abaixo mostra uma representação esquemática do fluido magnético iônico, surfactado e o iônico-surfactado.

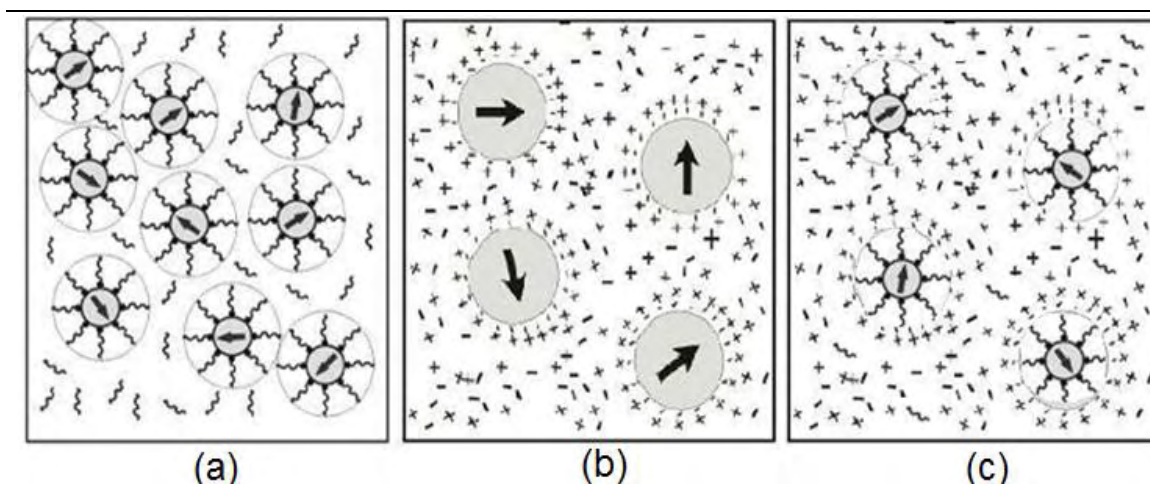


Figura 1.1 - Representação esquemática de um fluido magnético (a) surfactado (b) iônico (c) iônico-surfactado.

A dispersão das nanopartículas em um solvente permite a formação de um fluido macroscopicamente homogêneo. A estabilidade coloidal deste fluido está relacionada a interações do tipo nanopartícula-nanopartícula e nanopartícula com moléculas ou íons no líquido dispersante.

As interações apresentadas se devem a um conjunto de contribuições energéticas que explicam a estabilidade coloidal. A interação de Van der Waals é uma contribuição atrativa e está associada a flutuações no dipolo elétrico das nanopartículas, essa contribuição está sempre presente e dependente da distância entre as mesmas, essa dependência é de r^{-1} quando as nanopartículas estão próximas e r^{-6} quando estão distantes, daí a importância de se ter a camada de cobertura contribuindo para manter as nanopartículas afastadas umas das outras reduzindo a formação de aglomerados das mesmas.

Outra interação sempre presente é a dipolar magnética, nesse caso não só a distância é importante, mas também a posição relativa, pois a interação depende também do ângulo entre os dois momentos magnéticos. Outras duas interações bastante relevantes são a repulsão elétrica gerada pela distribuição de carga na superfície das

nanopartículas nos fluidos iônicos, e a repulsão estérica resultada da não-interpenetração das camadas de cobertura.

1.2 APLICAÇÕES DE FLUIDOS MAGNÉTICOS

Devido à grande interdisciplinaridade que os estudos em nanociência possuem, podemos citar algumas aplicações na área biomédica como, estudos com nanoestruturas relacionadas à comunicação e transporte de sinais entre células, gravação e/ou estímulo neuronal via transporte molecular, alta resolução espacial e temporal no imageamento celular [13], carreador de drogas, agente de contraste para diagnóstico de doenças, dentre outras aplicações.

As nanopartículas podem atuar na área de cardiologia como carreadoras de fármacos, agentes de contraste, dentre outras aplicações, contribuindo com possíveis soluções para a cura de diversas doenças cardiovasculares. A nanopartícula pode inclusive carrear simultaneamente diferentes fármacos e agentes de contraste aderidos em sua superfície. Existem certos parâmetros determinantes para a aplicação das nanopartículas em sistemas cardiovasculares são eles parâmetros geométricos, biológicos e biofísicos [14; 15].

O Imageamento por Ressonância Magnética Nuclear (IRMN) é uma técnica muito utilizada para o diagnóstico de fisiopatologias cardiovasculares. Há mais de uma década o gadolínio, metal paramagnético, tem sido utilizado como agente de contraste em IRMN. Nanopartículas Magnéticas (MNP) de óxido de ferro constituem outra grande classe de agentes moleculares para uso em IRMN, pois apresentam caráter superparamagnético e modulam uniformemente o campo magnético [1].

As características das partículas são as responsáveis para cada aplicação biomédica. Essas características são basicamente, as propriedades físico-químicas da partícula, sua geometria, tamanho e as moléculas adsorvidas na superfície.

O direcionamento da nanopartícula quando inserida no organismo é uma das grandes especulações da nanociência, pois é necessário que se saiba a sua posição no organismo e efeito local gerado pela sua presença, esse domínio é muito importante também para o desenvolvimento de novas tecnologias para diagnóstico e tratamento de patologias.

Alguns estudos mostram que essas partículas em escala nanométrica são capazes de serem internalizadas em determinadas células por um processo de endocitose. Endocitose é o termo geral que define o processo realizado por células ao importar moléculas extracelulares selecionadas, vírus, microorganismos e nanopartículas, a endocitose inclui os processos de pinocitose e fagocitose.

Acerca desse processo o mecanismo mais efetivo para que a nanopartícula seja internalizada na célula, é recobrir sua superfície com moléculas que possam atrair contra moléculas ligantes em sua superfície de modo a blindar a nanopartícula quando esta está próxima da membrana celular, o processo de internalização depende também da forma [16] e do tamanho da partícula. Nesse processo pode-se controlar a nanopartícula favorecendo ou não a endocitose, de acordo com o interesse do estudo em questão. O processo de endocitose de partículas é de fundamental importância em várias áreas, como carreadoras de ativos, liberação controlada de fármacos, e em nanotoxicologia. Decuzzi e Ferrari realizaram estudo teórico onde foi apresentado um raio ótimo, que segundo determinadas condições da camada de cobertura da nanopartícula facilitaria o processo endocitótico das nanopartículas pela célula [17; 18].

O controle da internalização das nanopartículas é de fundamental importância para aplicação em tratamentos de doenças cardiovasculares, como por exemplo, em um caso de infarto do miocárdio acometendo morte celular, pode ser utilizado o processo de internalização das nanopartículas magnéticas para vetorizar células tronco diferenciadas para a região de interesse na tentativa de restaurar a região do coração. Dentre outras diversas aplicações desse estudo.

2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente dissertação são investigar o efeito de nanopartículas magnéticas biocompatíveis na função cardíaca de ratos e o processo de internalização dessas nanopartículas em cardiomiócitos.

Os objetivos específicos a serem alcançados são:

- Sintetizar fluidos magnéticos contendo nanopartículas de magnetita recobertas com diferentes concentrações de citrato.

- Caracterizar os fluidos magnéticos por meio das técnicas de difração de raios-X, magnetometria de amostra vibrante e espalhamento de luz dinâmico.

- Dominar o experimento de perfusão de coração isolado de rato wistar.

- Estudar o efeito *ex vivo* de nanopartículas magnéticas na contratilidade cardíaca e vasomotricidade coronariana de ratos.

- Estudar o efeito *in vivo* de nanopartículas magnéticas na pressão arterial e frequência cardíaca *in vivo*.

- Verificar e identificar interação, seja por internalização ou adsorção, das nanopartículas na membrana celular de diferentes nanopartículas magnéticas com cardiomiócitos via experimento de magnetoforese e verificar o número de nanopartículas interagentes por célula. Avaliando o efeito magnetoforético de células com nanopartículas a base de ferrita de manganês com diferentes camadas de cobertura e distintos diâmetros.

- Investigar o processo exocitótico e endocitótico de nanopartículas magnéticas biocompatíveis em cardiomiócitos por meio da técnica de magnetoforese.

3 METODOLOGIA

3.1 SÍNTESE DO FLUIDO MAGNÉTICO

O fluido magnético utilizado no trabalho foi sintetizado no Laboratório de sínteses do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

3.1.1 Síntese das nanopartículas de magnetita

A reação de formação da magnetita é dada pela seguinte equação:



Seguindo a estequiometria dessa reação, foram realizadas as seguintes etapas:

- Foram pesados em uma balança de precisão 0,990 g de cloreto ferroso tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) responsável pela liberação do íon Fe^{2+} e 2,708 g de cloreto férrico hexahidratado ($\text{Fe}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) responsável pela liberação do íon Fe^{3+} , cada um em um béquer. Após pesar os sais, adicionou-se 12,5 ml de água destilada em cada béquer. Todos os reagentes utilizados na síntese são da marca Sigma.
- Em outro béquer foi pesado 4,999 g de NaOH, adicionados 75 ml de água destilada e colocado no agitador magnético com rotação de 1000 rpm.
- A solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ e a de $\text{Fe}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ foram misturadas e colocadas em um funil; essa mistura foi gotejada na solução de NaOH sob agitação 1000 rpm durante 30 minutos. Esse processo formou um fluido de coloração negra (magnetita) que permaneceu em agitação durante uma hora.

-Após o processo de agitação o fluido foi retirado do agitador e medido seu pH. O pH mostrou-se ácido e foi modificado controlando a adição de uma solução de 1 M de NaOH até atingir pH neutro.

3.1.2 Recobrimento das nanopartículas com citrato

A molécula de citrato ($C_6H_8O_7$) possui três grupos carboxila, e é um dos grupos carboxila quem se liga à superfície da nanopartícula. Foram feitos três diferentes recobrimentos, um com uma quantidade padrão (2,75 g/ml) de citrato adicionado ao fluido, outro com a quantidade de citrato reduzida à metade e outro com o dobro de citrato. As etapas do recobrimento das nanopartículas são as seguintes:

- Após controlar o pH do fluido sintetizado, o fluido foi separado em três diferentes béqueres contendo 40 ml de fluido cada.
- Foram pesadas três diferentes quantidades de ácido cítrico (citrato) em três diferentes béqueres 0,116 g, 0,233 g e 0,058 g e foi acrescentado a cada béquer 2,13 ml de água destilada.
- Após diluir o citrato em água cada quantidade de citrato foi adicionada a um béquer contendo o fluido magnético e o fluido submetido à agitação magnética. O pH foi novamente controlado até atingir um valor próximo a 4 (pH=3.96). O fluido permaneceu em agitação durante 120 min. a uma temperatura de 85 °C.
- Após o período de agitação cada fluido foi colocado em tombamento, ou seja, colocado em um sistema que rotaciona o recipiente fechado contendo o fluido a baixas velocidades ($\cong 15 \text{ rot/min}$), durante 24 h. Esse processo é responsável por homogeneizar a distribuição dos grupos estabilizantes e facilitar sua adsorção à superfície das nanopartículas.

- Após o tombamento os fluidos foram submetidos ao processo de diálise, ou seja, colocados em pequenos sacos feitos de uma membrana semipermeável que permite a troca de íons entre o fluido e o meio externo. Esses sacos foram imersos em um béquer contendo 5 L contendo água destilada. O processo de diálise durou 48 hs, e teve como resultado fluidos magnéticos macroscopicamente estáveis contendo nanopartículas de magnetita recobertas por moléculas de citrato em pH fisiológico.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO MAGNÉTICO

3.2.1 Difratometria por Raios-X

A Difratometria por Raios-X (DRX) é uma das técnicas mais utilizadas para caracterizar nanopartículas magnéticas (pó) já que, fornece informações sobre composição e cristalinidade do material. É utilizada também para avaliar o diâmetro das nanopartículas.

A técnica se baseia no fenômeno de difração que ocorre quando ondas eletromagnéticas interagem com fendas (ou partículas) da mesma ordem de grandeza que a do seu comprimento de onda. Em sistemas cristalinos cuja estrutura é muito bem organizada, os feixes espalhados sofrem interferências (construtivas ou destrutivas) características, formando um padrão de difração capaz de fornecer diversas informações qualitativas do sistema analisado.

A condição para formação de interferências construtivas no fenômeno de difração é dada pela Lei de Bragg:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (3.1)$$

onde d é a distância entre os planos de difração, θ o ângulo de incidência, λ o comprimento de onda dos raios-x, e n um número inteiro. Para determinar o diâmetro da nanopartícula é utilizada a equação de Scherrer

$$d = \frac{0,93\lambda}{\Delta \cos \alpha} \quad (3.2)$$

onde α e Δ são parâmetros fornecidos pelo equipamento e correspondem respectivamente ao ângulo de difração e a largura a meia altura do pico principal corrigida com relação a um padrão de silício.

A Figura 3.1 abaixo mostra uma fotografia do Difratorômetro de Raios-X (SHIMADZU, LabX, XRD-6000) da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, que foi utilizado para as medidas realizadas neste trabalho.



Figura 3.1- Fotografia do Difratorômetro de Raios-X da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

3.2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico

A técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) é utilizada para medir a distribuição de tamanho de pequenas partículas, da ordem de micro a nanômetros, em suspensão. O diâmetro da partícula medido pelo DLS é denominado diâmetro hidrodinâmico e se refere a como a partícula se difunde numa determinada solução. Portanto não mede apenas seu tamanho, mas também avalia o efeito da camada de cobertura adsorvida na superfície da partícula.

A técnica também é capaz de determinar o Potencial Zeta, ou seja, o potencial elétrico médio na superfície da partícula contida no sistema analisado. Na presente dissertação, particularmente, investigamos fluidos magnéticos iônico-surfactados, que garantem a estabilidade coloidal também via mecanismos de repulsão eletrostática.

A Figura 3.2 abaixo mostra uma fotografia do ZetaSizer (Nano-ZS, Nano Series) da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, que foi utilizado para as medidas realizadas neste trabalho.



Figura 3.2- Fotografia do ZetaSizer (Nano-ZS, Nano Series) da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

3.2.3 Magnetometria de Amostra Vibrante

A Magnetometria de Amostra Vibrante, ou VSM (Vibrating Sample Magnetometer) foi desenvolvida por S. Foner [20] em 1955 e é atualmente uma das técnicas mais utilizadas, não só por ser relativamente sensível (sensibilidade da ordem de 10^{-5} emu), mas também por seu funcionamento simples e baixo custo de manutenção. A técnica nos dá informações sobre as propriedades magnéticas da amostra através da curva de histerese, e se baseia na obtenção de magnetização por indução [21].

A Figura 3.3 abaixo mostra um diagrama do equipamento.

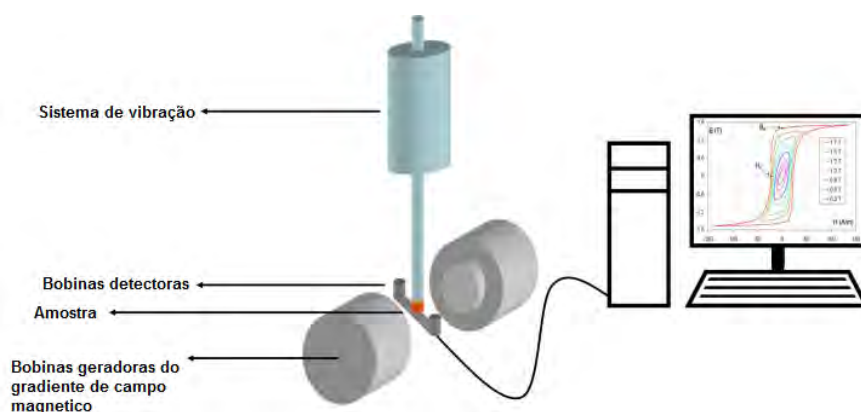


Figura 3.3- Diagrama esquemático do VSM.

O VSM consiste em uma haste rígida fixa a um vibrador (um alto-falante). A amostra deve ser colocada na outra extremidade da haste e posicionada entre dois eletroímãs e um conjunto de bobinas detectoras. Para se obter o sinal da magnetização, faz-se vibrar a amostra perpendicularmente ao campo aplicado que, ao oscilar, produz uma variação do fluxo de campo magnético local, gerando uma corrente induzida alternada nas bobinas detectoras posicionadas em torno da amostra. Desta forma é registrada a intensidade do momento magnético da amostra. Nesta configuração a voltagem produzida nas bobinas é dada por

$$V = 2\pi\mu GfA \cos 2\pi ft \quad (3.3)$$

onde μ é o momento magnético da amostra, f a frequência de oscilação, A amplitude de oscilação, G é um fator que depende da geometria das bobinas detectoras e t o tempo.

Abaixo, a Figura 3.4 mostra as possíveis configurações para as bobinas detectoras do VSM. No nosso equipamento temos a configuração (a).

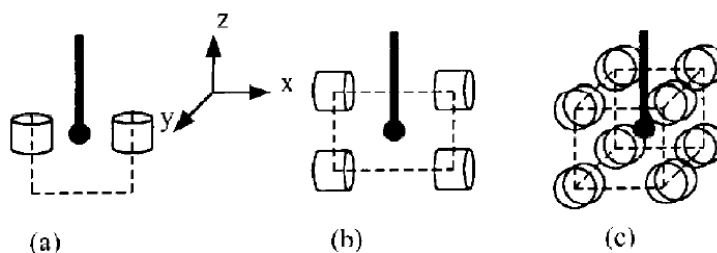


Figura 3.4- Arranjos de bobinas de detecção usadas no VSM [3].

A Figura 3.5 abaixo mostra uma fotografia do VSM EV9 System do Laboratório de Magnetometria e Magnetotransporte do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás. Este equipamento foi utilizado para as medidas realizadas neste trabalho e pode aplicar um campo magnético de até 20.000 G (2 T).



Figura 3.5- Fotografia do VSM EV7 System do Laboratório de Magnetometria e Magnetotransporte do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

Para sistemas muito pequenos como as nanopartículas a curva de magnetização exibe comportamento superparamagnético, caracterizado pela ausência de histerese e magnetização somente sob ação de campo. Para esses sistemas nanométricos, ocorre que sem aplicação de campo a energia de agitação térmica predomina sobre a energia de interação magnética. A curva de magnetização desses sistemas pode ser simulada com a função de Langevin, que é obtida pela média dos momentos magnéticos das partículas sob ação de campo magnético.

A função de Langevin é obtida a partir do seguinte procedimento. Primeiramente, é importante lembrar que o torque devido a um campo magnético \vec{H} sobre o momento magnético de cada partícula é dado por

$$|\vec{\tau}| = |\vec{\mu} \times \vec{B}| = |\vec{\mu} \times (\mu_0 \vec{H})| = \mu_0 \mu H \sin \theta \quad (3.4)$$

onde \vec{B} é o vetor indução magnética em um ponto, $\vec{\mu}$ o momento magnético da amostra, μ_0 a permeabilidade magnética do meio e θ o ângulo entre o momento magnético e o campo magnético. Por outro lado, a energia gasta para girar o momento magnético da nanopartícula de um ângulo θ' é

$$W = \int_0^{\theta'} \tau d\theta = \int_0^{\theta'} \mu_0 \mu H \sin \theta d\theta = \mu_0 \mu H (1 - \cos \theta'). \quad (3.5)$$

Essa energia deve ser usada no fator de Boltzmann $\left(e^{\frac{W}{k_B T}}\right)$ para o cálculo do valor esperado do momento de dipolo magnético.

Considerando que quaisquer orientações do momento de dipolo de uma nanopartícula são equiprováveis, a probabilidade $p(\theta)d\theta$ de que o momento de dipolo faça um ângulo entre θ e $\theta+d\theta$ com relação a \vec{H} será a razão entre a área de um anel infinitesimal de raio $1 \cdot \sin \theta$ e espessura $1 \cdot d\theta$ e a área de superfície de uma esfera de raio unitário, logo

$$p(\theta)d\theta = \frac{2\pi \sin \theta}{4\pi(1)^2} d\theta = \frac{\sin \theta}{2} d\theta. \quad (3.6)$$

Para um sistema com N partículas de mesmo momento de dipolo magnético o número $n(\theta)d\theta$ de momentos alinhados entre θ e $\theta+d\theta$ é obtido multiplicando-se o valor de $p(\theta)d\theta$ por N

$$n(\theta)d\theta = \frac{N}{2} \sin \theta d\theta. \quad (3.7)$$

Porém, de acordo com a mecânica estatística, na presença de campo aplicado e a uma temperatura T a orientação provável é proporcional ao *fator de Boltzmann*, assim,

$$n'(\theta)d\theta \propto e^{-\frac{W}{k_B T}} n(\theta)d\theta = e^{-W/k_B T} \frac{N}{2} \sin \theta d\theta \quad (3.8)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann. O uso de \propto indica que para que seja densidade de proporcionalidade, esse fator deve ser normalizado pela integral do fator de Boltzmann sobre o espaço de configurações. Nesse caso, a constante de proporcionalidade é dada pela seguinte condição

$$\int_0^\pi n'(\theta)d\theta = N. \quad (3.9)$$

Como a componente do momento de dipolo efetivo na direção do campo é $\mu \cos \theta$, temos em termos da função de distribuição $n'(\theta)d\theta$ que o valor médio é dado por

$$\bar{\mu} = \langle \mu \cos \theta \rangle = \frac{\int_0^\pi \mu \cos \theta n'(\theta) d\theta}{\int_0^\pi n'(\theta) d\theta}. \quad (3.10)$$

Substituindo-se o valor de $n'(\theta)d\theta$ na equação anterior temos

$$\bar{\mu} = \frac{\int_0^\pi \mu \cos \theta e^{-\mu H (1-\cos \theta)/kT} \frac{N}{2} \sin \theta d\theta}{\int_0^\pi e^{-\mu H (1-\cos \theta)/kT} \frac{N}{2} \sin \theta d\theta} = \frac{\int_0^\pi \mu \cos \theta e^{-\mu H \cos \theta/kT} \frac{N}{2} \sin \theta d\theta}{\int_0^\pi e^{-\mu H \cos \theta/kT} \frac{N}{2} \sin \theta d\theta} \quad (3.11)$$

resolvendo esta integração pelo método da substituição com $u = \frac{\mu_0 \mu H}{K_B T} \cos \theta$ e $\varepsilon = \frac{\mu_0 \mu H}{K_B T}$,

fica

$$\langle \mu \rangle = \frac{\mu \int_{-\varepsilon}^{\varepsilon} u e^u du}{\varepsilon \int_{-\varepsilon}^{\varepsilon} e^u du}. \quad (3.12)$$

Realizando uma integração por partes e usando a relação $e^\alpha - e^{-\alpha} = 2 \sinh \alpha$ teremos

$$\langle \mu \rangle = \frac{\mu}{\varepsilon} \left(\frac{\varepsilon \cosh \varepsilon - \sinh \varepsilon}{\sinh \varepsilon} \right) = \mu \left(\coth \varepsilon - \frac{1}{\varepsilon} \right) \quad (3.13)$$

e

$$\frac{\langle \mu \rangle}{\mu} = \coth \varepsilon - \frac{1}{\varepsilon} = L(\varepsilon) \quad (3.14)$$

que é a chamada função de Langevin de primeira ordem. Note que a quantidade $\frac{\langle \mu \rangle}{\mu} = \frac{M}{M_S}$, ou seja, a razão entre a média do momento de dipolo pelo módulo do momento de dipolo de cada partícula equivale á razão da magnetização (M) da amostra pela magnetização de saturação (M_S) da mesma, que é a magnetização máxima atingida por uma amostra quando há um campo magnético aplicado, ou seja, é quando todos os momentos de dipolos contidos na amostra estão alinhados com o campo. Enquanto o momento de dipolo da partícula é expresso por $\mu = \frac{\pi}{6} M_{sol} D^3$, onde D é o diâmetro da nanopartícula e M_{sol} é a magnetização do sólido (nanopartículas), que depende do material que constituem as nanopartículas.

A magnetização de saturação do sistema (fluido magnético), em geral, é numericamente igual ao produto da magnetização do sólido (nanopartículas), pela fração volumétrica (ϕ) do sistema ocupado por essas partículas, logo

$$\frac{\langle \mu \rangle}{\mu} = \frac{M}{M_S} = \frac{M}{\phi M_{sol}} = L(\varepsilon). \quad (3.15)$$

Os cálculos acima são válidos para um sistema de muito baixa dispersidade, ou seja, quando todas as nanopartículas possuem o mesmo diâmetro. Entretanto, em uma amostra real o sistema é polidisperso, ou seja, neste caso a magnetização é dada por

$$M = \frac{N\pi}{6} M_S \int_0^\infty L(\varepsilon) D^3 P(D) dD \quad (3.16)$$

com

$$P(D) = \frac{e^{-2\sigma^2}}{D_m \sigma \sqrt{2\pi}} e^{\left(\frac{-\ln^2(\frac{D}{D_m})}{2\sigma^2}\right)}, \quad (3.17)$$

onde a função $P(D)$ é a distribuição de diâmetros (função lognormal [21]) dada em termos do diâmetro modal D_m e a dispersão σ .

Com o objetivo de obter a magnetização da amostra foram realizadas medidas de magnetometria das amostras em fluido e em pó, visto que esta análise permite determinar a magnetização da partícula e o número de partículas por volume de fluido. Para tal fim, primeiramente é importante salientar que as curvas obtidas no experimento nos fornecem o momento magnético total da amostra. Portanto, é necessário termos o volume do material para dividirmos pelos dados coletados pelo equipamento e, assim, obter o valor da magnetização, que é expressa em unidades de emu/cm^3 . Entretanto, por facilidade, medimos a massa da amostra e obtivemos a magnetização específica em emu/g . Abaixo apresentamos o procedimento matemático para obter a magnetização de saturação em unidades de emu/cm^3 .

A relação entre a magnetização do fluido, M_{fluido} , (emu/cm^3) e a magnetização específica da partícula, M_{part} , (esta última em emu/g) é dada pela seguinte expressão

$$M_{fluido} = \left(\frac{\rho_{part}}{\rho_{fluido}} \cdot \Phi \right) M_{part} L(\varepsilon) \quad (3.18)$$

Onde $\Phi = N V_{part}/V_{fluido}$, N é o número total de partículas na amostra, ρ_{part} e ρ_{fluido} ambos em (g/cm^3) são a densidade da partícula e do fluido magnético, respectivamente. Quando ocorre a evaporação do líquido carreador obtemos uma amostra em pó de nanopartículas de magnetita. Note que neste caso, temos que a magnetização do pó dada por

$$M_{po} = M_{part} L(\varepsilon) \quad (3.19)$$

que para valores altos de campo aplicado, aonde $L(\varepsilon) \rightarrow 1$, obtém-se $M_{po} \rightarrow M_{part}$. Dessa forma, a magnetização da nanopartícula dada em emu/g é obtida quando no limite de saturação da curva de magnetização do pó. A magnetização de saturação em emu/cm^3 é então, dada pelo produto da magnetização de saturação do pó em emu/g pela densidade da magnetita ($5,1\text{g}/\text{cm}^3$).

Note que utilizando estas relações facilmente obtemos informação acerca da fração volumétrica de nanopartículas.

3.3 CORAÇÃO ISOLADO DE RATOS

Para avaliar a função cardíaca *ex-vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff com fluxo constante. Foram utilizados 18 ratos Wistars machos pesando 250-300g, fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás, onde 10 ratos foram utilizados na perfusão das nanopartículas magnéticas e 8 como controle. Nesta técnica o coração do animal foi isolado (retirado do organismo), conectado ao sistema de perfusão (Figura 3.6) e por ele foi perfundida uma solução nutritora (Tabela 3.1). Para isso os animais foram eutanasiados por decaptação 10 minutos após a aplicação de 400

μl de anticoagulante (heparina). Após a abertura da cavidade torácica, os corações foram retirados do animal e colocados em um béquer contendo solução nutritora em temperatura de aproximadamente 4°C. A solução resfriada tem por objetivo diminuir o metabolismo do miocárdio e o consumo de O₂ no período logo após o sacrifício até a canulação do coração. Os restos de tecido pulmonar e vascular, traquéia e esôfago que acompanhavam o coração são removidos, e em seguida, a aorta ascendente era seccionada na altura de sua primeira ramificação (tronco braquiocefálico), e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão contendo a solução nutritora, permitindo assim que a solução nutritora percorra retrogradamente o coto aórtico remanescente promovendo o fechamento da valva aórtica e conseqüentemente a perfusão das artérias coronarianas. O tempo do sacrifício até o início da perfusão era de aproximadamente 5 minutos. Caso o período de preparação excedesse este tempo o coração deveria ser descartado.

Os corações foram perfundidos com fluxo constante de 9-11 ml/min. a uma temperatura de 37±1 °C.

Tabela 3.1 - Tabela contendo a composição e concentrações dos sais da Solução de Krebs-Ringer.

Composto	Concentração em mM
NaCl	118,41
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
Dextrose anidra	11,65
NaCO ₃	26,24

Para análise dos parâmetros de contratilidade miocárdica, um pequeno balão conectado a um transdutor de pressão foi inserido na câmara ventricular esquerda por meio de um acesso feito no átrio esquerdo. Por meio desse transdutor, registrou-se a pressão intraventricular sistólica (contração ventricular) e diastólica (relaxamento ventricular). Outro transdutor de pressão foi acoplado ao sistema por uma abertura imediatamente acima do coração para o registro da pressão de perfusão. Por meio deste registro foi possível avaliar a vasomotricidade (constricção e relaxamento) dos vasos coronarianos.

A Figura 3.6 abaixo mostra o aparato experimental utilizado no experimento de coração isolado.

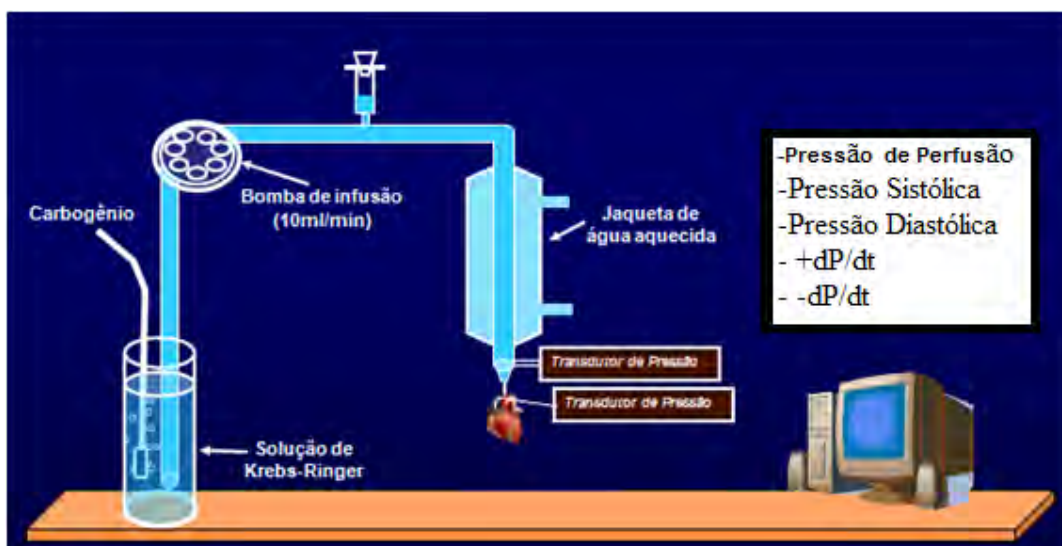


Figura 3.6- Aparato experimental utilizado no ensaio de perfusão

Após a canulação do coração, aguardava-se um período de 20-30 minutos para a estabilização do coração (período basal) e posteriormente 2 μ l de fluido magnético eram adicionados a 200 ml de solução nutritora. O fluido magnético era constituído por magnetita recoberta por citrato na concentração padrão de recobrimento. A solução com o fluido foi perfundida no coração isolado por 10 minutos. Após esse período, os corações eram novamente perfundidos com a solução nutritora controle por um período

adicional de 10 minutos. Este procedimento tinha como objetivo avaliar se as alterações induzidas pelo fluido magnético eram reversíveis ou irreversíveis.

Após ter realizado os experimentos com coração isolado dos ratos perfundindo com fluido magnético, os corações foram secados em estufa por 24 horas, depois cada um separadamente foi submetido a moagem e suas amostras foram analisadas por VSM e também por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) a fim de verificar a presença de nanopartículas residuais no coração mesmo eles tendo sido submetidos a lavagem.

O experimento foi aprovado pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFG, parecer número 179/09. Os dados foram expressos com média \pm EPM. Para a análise estatística dos resultados dos corações isolados foram realizados os testes Two-way Anova seguido do pós-teste LSD de Fischer.

3.4 CANULAÇÃO DE ARTÉRIAS E VEIAS FEMORAIS

Para o registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca em ratos acordados foi realizada a canulação crônica da artéria e veia femorais de ratos. A cânula utilizada na canulação foi confeccionada no Laboratório de Órgãos Isolados do ICB-UFG foram usados 4 cm de tubo PE-10 soldado a 10 cm de tubo PE-50 para a artéria e 3,0 cm de tubo PE-10 soldado a 10 cm de tubo PE-50 para a veia.

Para a canulação foram selecionados ratos de 250-300 g. Após a anestesia com ketamina (0,7 ml/100 g do animal) e xilazina (0,3 ml/100 g do animal), foi feita uma incisão na parte inferior do abdômen onde a veia e artéria femorais foram dissecadas e expostas. A cânula foi preenchida com heparina diluída (0,1 ml/10 ml soro) e inserida com PE-10 na artéria através de um pequeno corte feito na mesma, analogamente para a

veia. As extremidades PE-50 foram transpassadas por sob a pele do dorso e exteriorizadas, após esse procedimento os animais foram suturados e colocados em gaiolas individuais. Realizado o processo cirúrgico cada rato foi mantido em repouso por 24 h para então serem realizados os registros de pressão arterial e frequência cardíaca no animal vivo.

Após 24 h que a cirurgia foi realizada e injetada heparina diluída nas cânulas para impedir a formação de coágulos, a cânula ligada à artéria foi conectada a um transdutor de pressão a fim de registrar a pressão arterial sistólica e diastólica com derivações eletrônicas para registro de frequência cardíaca. A cânula ligada à veia femoral foi utilizada para administração do fluido magnético.

Aguardado um período de 1 h para a estabilização do animal ao ambiente, foi injetado 20 µl de fluido magnético de magnetita recoberta por citrato diluído em 0,5 ml de soro estéril pela cânula venosa e foram registradas a pressão arterial e frequência cardíaca por mais 1 h.

3.5 PROTOCOLO DE ISOLAMENTO DE CARDIOMIOCITOS

O protocolo de isolamento de cardiomiócitos, células constituintes do coração, foi realizado baseando-se no método de Shioya [10].

O aparato utilizado no experimento (Figura 3.7) consiste de uma coluna de vidro, por onde passa a solução de perfusão (Anexo 1), envolvida por uma jaqueta de água aquecida. Os corações eram perfundidos com pressão constante de 65 mmHg.



Figura 3.7- Aparato experimental utilizado no ensaio de dissociação de cardiomiócitos.

O animal foi heparinizado (400 μ l de heparina), 10 min antes da eutanásia por decapitação. Uma vez exposta a cavidade torácica, o coração era retirado do corpo do animal e colocado em um béquer contendo CIB (tampão de isolamento de células)+HEPES+EGTA, as concentrações para esta solução encontra-se no apêndice II desta dissertação, em temperatura de aproximadamente 4°C. O coração foi fixado a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão contendo CIB+HEPES+EGTA, esse procedimento foi necessário para retirar o sangue do coração limpando-o e teve duração de 5 min.

Enquanto o coração estava sendo perfundido por essa solução foi preparada a solução digestiva 1, ou seja foi diluída uma alíquota de enzimas (colagenase + protease), para que os cardiomiócitos se separassem, em 15 ml de CIB, a solução digestiva foi mantida em banho-maria uma temperatura de 36°C. Quando o coração mostrou-se limpo (ausente de sangue) a solução de CIB+HEPES+EGTA foi trocada pela solução digestiva 1, sendo perfundido por 5 min. Durante esse período foi preparada a solução digestiva 2, ou seja, diluiu-se uma alíquota de enzimas idêntica a da digestiva 1 em 15 ml de CIB.

Após 5 min de perfusão da solução digestiva 1 o coração foi retirado do sistema de perfusão, triturado, imerso no tubo contendo a solução digestiva 2 e mantido em banho-maria durante 15 min. Após o período de 15 min o conteúdo do tubo foi transferido para um béquer passando por um filtro com o objetivo de separar as células. O conteúdo do béquer (células+digestiva2) foi novamente despejado no tubo e centrifugado a uma velocidade de 300 rpm por 3 min. Formado-se um precipitado de células a solução de enzimas foi retirada utilizando-se uma pipeta. As células foram ressuspendidas com a solução 3 (15 ml de CIB + albumina 2 mg/ml) e mantidas em banho-maria por 5 min. Após esse período as células foram novamente centrifugadas (300 rpm por 3 min) e ressuspendidas em solução de albumina diluída em 10ml de Tyrode (ver composição no anexo 2).

3.6 MAGNETOFORESE

O fenômeno de magnetoforese consiste no movimento de corpos quando sujeitos a ação de força magnética, ou seja, na presença de gradiente de campo magnético. Esta técnica, recentemente implantada no laboratório, permite investigar a interação de nanopartículas com células já que é capaz de identificar se uma célula contém nanopartículas internalizadas ou adsorvidas em sua superfície. O experimento de magnetoforese é um método muito interessante para se estudar a interação entre partículas e células, por ser um experimento de rápida obtenção dos resultados e baixo custo.

No presente experimento o fluido magnético utilizado foi ferrita de manganês ($MnFe_2O_4$) recoberta por tripolifosfato de sódio e investigamos se e, em casos afirmativos, como as nanopartículas desse fluido interagem com cardiomiócitos. As nanopartículas utilizadas no experimento foram sintetizadas pelo aluno de mestrado

Nicholas Zufelato. A preparação da amostra consistiu em adicionar 5 μl de fluido magnético a 500 μl de uma solução de cardiomiócitos dispersos em tyrode. Após esse procedimento a amostra era mantida em banho-maria a temperatura de 36°C por tempos determinados de 10, 20, 30 e 40 min, e logo após esse período a amostra era rapidamente encaminhada para o aparato do experimento de magnetoforese.

O aparato experimental utilizado no experimento de magnetoforese constitui-se de um microscópio de luz com uma câmera digital integrada, responsáveis por registrar uma filmagem ampliada do fenômeno, uma placa de vidro apoiada sobre a lente do microscópio responsável por garantir que o ímã e a amostra estariam no mesmo plano, um ímã permanente cilíndrico feito de uma liga metálica de NdFeB responsável pelo gradiente de campo magnético, e um computador acoplado ao microscópio responsável por registrar o fenômeno magnetoforético. A Figura 3.8 abaixo mostra um diagrama de bloco do aparato experimental utilizado.

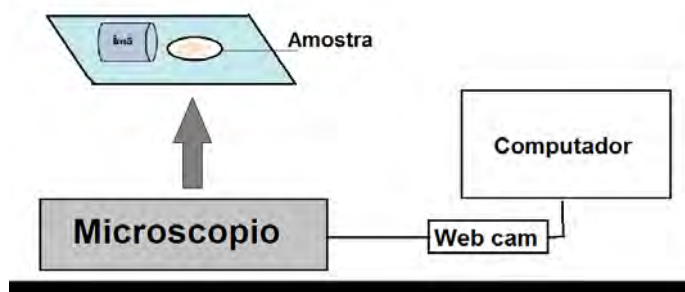


Figura 3.8 - Diagrama de bloco do aparato experimental utilizado.

Foi necessário confeccionar uma placa de vidro que se encaixasse sobre a bancada do microscópio e acima das objetivas para garantir que o ímã se mantivesse fixo e sua face frontal ficasse a uma distância de aproximadamente 2,2 cm da amostra de modo a garantir que o gradiente de campo magnético fosse constante na região onde se encontrava a amostra. A Figura 3.9 abaixo mostra um diagrama da disposição do ímã com relação à amostra. diagrama da disposição do ímã com relação à amostra.

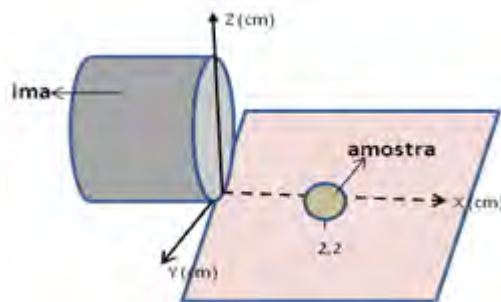


Figura 3.9 – Diagrama que representa a disposição da amostra com relação ao ímã.

E a Figura 3.10 abaixo mostra uma fotografia do aparato experimental da técnica de magnetoforese localizado no Laboratório de Magneto-óptica do Instituto de Física da UFG.



Figura 3.10- Fotografia do aparato experimental utilizado no experimento de magnetoforese.

Cabe ressaltar que os cardiomiócitos quando não contêm nanopartículas magnéticas possuem comportamento diamagnético. Portanto o fenômeno magnetoforético é devido somente às nanopartículas magnéticas conjuntas a essas células (internalizadas ou adsorvidas em sua superfície), já que para magnitudes tão pequenas de campo magnético, como é o nosso caso, a contribuição diamagnética dessas células são desprezíveis. Conforme dito anteriormente, as nanopartículas podem interagir com a célula estando aderidas a membrana celular e/ou internalizadas pela mesma. Deste modo, propomos tratar as células interagentes com as nanopartículas

como um dipolo magnético permanente, que apresenta um momento de dipolo magnético resultante μ_{cell} .

Da teoria eletromagnética, o momento de dipolo na presença de um campo magnético $B(x)\hat{x}$ sofre um torque a fim de se alinhar a esse campo experimentando uma força magnética $\vec{F}_m = \vec{\nabla}(\vec{\mu}_{cell} \cdot \vec{B})$. Como o dipolo é permanente, assumimos que $\vec{\mu}_{cell}$ é constante, uniforme e alinhado a \vec{B} , de forma que a força magnética se reduz a

$$\vec{F}_m = \mu_{cell} \frac{dB}{dx} \hat{x}. \quad (3.21)$$

Pode-se considerar ainda, em uma primeira aproximação que no centro da superfície frontal do ímã permanente, onde está posicionada a amostra, o campo é unidimensional, ou seja, $B(x)\hat{x}$, pois nessa região as linhas do campo \vec{B} são radiais e para fora.

A força magnética será responsável por deslocar a célula magnética. Entretanto, sabe-se pela lei de Stokes que quando um objeto esférico de raio r_{cell} se desloca com velocidade v num fluido homogêneo de viscosidade η este objeto sofre uma força de resistência ao movimento (atrito) igual a

$$\vec{F}_S = -6\pi\eta r_{cell} \vec{v} \quad (3.22)$$

Para objetos com geometrias diferentes, a equação de Stokes possui a mesma característica, diferindo somente de uma constante multiplicativa que varia de 1-1.4 na variável r_{cell} que depende do volume do objeto. No caso de cardiomiócitos a forma esférica não é válida, portanto torna-se necessário reescrever a lei de Stokes para objetos de formas diversas. Como uma aproximação, aonde desprezamos em um primeiro momento efeitos de escoamento decorrente de uma forma diferente e

considerando a célula uniforme, podemos reescrever o raio da célula esférica em termos de seu volume, ou seja,

$$r_{cell} = \left(\frac{3V_{cell}}{4\pi} \right)^{1/3} \quad (3.23)$$

onde V_{cell} é o volume do objeto (célula). O volume da célula é então calculado de acordo com a forma geométrica da mesma.

Finalmente, para que a célula se movimente com velocidade constante a força magnética deve ser igualada a força dada pela lei de Stokes. Portanto, neste caso temos que

$$F_S = F_m \quad (3.24)$$

$$6\pi\eta \left(\frac{3V_{cell}}{4\pi} \right)^{1/3} v = \mu_{cell} \frac{dB}{dx} \quad (3.25)$$

com $\mu_{cell} = NM_{sp}V_p$ e $V_p = \frac{\pi D^3}{6}$, onde N é o número de nanopartículas na célula, V_p o volume da nanopartícula, M_{sp} a magnetização de saturação e D o diâmetro da nanopartícula. Com isso temos que

$$6\pi\eta \left(\frac{3V_{cell}}{4\pi} \right)^{1/3} v = NM_{sp} \frac{\pi D^3}{6} \frac{dB}{dx} \quad (3.26)$$

E o número de nanopartículas que interagem com cada célula (internalizadas ou adsorvidas) pode ser determinado por

$$N = \frac{36\eta \left(\frac{3V_{cell}}{4\pi} \right)^{1/3}}{M_{sp} D^3} v \left(\frac{dB}{dx} \right)^{-1} \quad (3.27)$$

Todos esses parâmetros podem ser determinados experimentalmente fornecendo uma informação valiosa no estudo da interação dessas nanopartículas com os cardiomiócitos.

O experimento de magnetoforese nos fornece informações do tipo o número de nanopartículas interagentes nas células, a massa de partículas nas células, dentre outros parâmetros. Informações como o tempo que a célula leva para internalizar as nanopartículas, quantas são internalizadas, se após um determinado intervalo de tempo parte das nanopartículas internalizadas poderão ser exocitadas, ou seja, ejetadas pela células, e qual é esse intervalo de tempo e os motivos pelos quais a célula exocitou essas nanopartículas são de fundamental importância para as aplicações desses sistemas, sabendo que esses efeitos dependem também das características físico-químicas das nanopartículas [23].

3.7 MODELO MATEMÁTICO QUE DESCREVE O PROCESSO DE INTERNALIZAÇÃO (OU ADSORÇÃO A MEMBRANA CELULAR) DE NANOPARTÍCULAS PELAS CÉLULAS.

Nos últimos anos tem-se despertado interesse de alguns pesquisadores em caracterizar as interações entre células e nanopartículas. Existem na literatura modelos matemáticos que determinam a dinâmica de endocitose de nanopartículas por determinadas células em função do tempo de interação célula-nanopartícula [14; 17]. Esses modelos são utilizados por alguns pesquisadores para determinar o número de nanopartículas internalizadas pela célula para determinados tempos, mas já se sabe que o tamanho e a forma das partículas são fatores determinantes no processo de internalização [23; 16; 25; 26].

A equação que descreve a dinâmica de internalização das nanopartículas pela célula é dada por

$$\frac{dN_+(t)}{dt} = \frac{-[N_+(t) - N_{Sat}]}{\tau_{cap}} \quad (3.28)$$

onde N_+ é o número de nanopartículas captadas pela célula, N_{Sat} é o número máximo de nanopartículas que poderiam ser internalizadas pela célula (número para o qual ocorre saturação), e τ_{cap} é o tempo característico de endocitose. A equação (3.29) fornece uma solução da equação diferencial acima, e é dada por

$$N_+(t) = N_{Sat}(1 - e^{-t/\tau_{cap}}) \quad (3.29)$$

Um artigo publicado na *Nanoletters* em 2009 mostra que nanopartículas interagentes com células não só podem sofrer endocitose como também podem ser exocitadas pela célula [23]. Porém não conhecemos até o momento um modelo matemático presente na literatura que descreva a dinâmica de exocitose. Portanto, no presente trabalho foi construído um modelo que pudesse descrever essa dinâmica.

A fim de construir um modelo que determinasse o processo exocitótico de partículas por uma determinada célula, consideramos que a partir de uma concentração crítica de partículas internalizadas, mecanismos intracelulares são acionados para retirar o excesso de material indesejado, ou seja, promovendo exocitose (ou dessorção de nanopartículas da membrana celular).

A equação diferencial abaixo descreve a dinâmica do modelo matemático construído para o processo exocitótico (ou dessortivo).

$$\frac{dN_-(t)}{dt} = -\frac{N_-(t) - N_{exo}}{\tau_{exo}} \quad (3.30)$$

Com $N_-(t)$ o número de nanopartículas exocitadas pela célula, τ_{exo} o tempo característico de exocitose, e $N_{exo} = N_-(t \rightarrow \infty)$, ou seja, N_{exo} é igual ao número total de partículas exocitadas.

 Definindo

$$\Delta N_-(t) = N_{exo} - N_-(t) \quad (3.31)$$

e como $d(\Delta N_-(t)) = -dN_-(t)$, a equação (3.30) pode ser escrita como

$$\frac{d(\Delta N_-(t))}{dt} = \frac{-\Delta N_-(t)}{\tau_{exo}} \quad (3.32)$$

$$\int_{\Delta N_-(t=t_{min}^{exo})}^{\Delta N_-(t)} \frac{d\Delta N_-(t)}{\Delta N_-(t)} = \int_{t=t_{min}^{exo}}^t \frac{dt}{\tau_{exo}} \quad (3.33)$$

$$\ln\left(\frac{\Delta N_-(t)}{\Delta N_-(t=t_{min}^{exo})}\right) = -\frac{(t-t_{min}^{exo})}{\tau_{exo}} \quad (3.34)$$

$$N_{exo} - N_-(t) = (N_{exo} - N_-(t=t_{min}^{exo}))e^{-\frac{(t-t_{min}^{exo})}{\tau_{exo}}} \quad (3.35)$$

A condição de contorno é tal que $N_-(t \leq t_{min}^{exo}) = 0$, portanto

$$N_-(t) = N_{exo} \left(1 - e^{-\frac{(t-t_{min}^{exo})}{\tau_{exo}}} \right) \theta(t - t_{min}^{exo}) \quad (3.36)$$

onde $\theta(t - t_{min}^{exo})$ é uma função degrau definida como: $\theta(t - t_{min}^{exo}) = \begin{cases} 1, & \text{se } t > t_{min}^{exo} \\ 0, & \text{se } t \leq t_{min}^{exo} \end{cases}$.

Deve-se observar que o que nós obtemos no experimento de magnetoforese é a quantidade de nanopartículas dentro da célula (ou adsorvido a sua superfície) em um determinado tempo de incubação. Portanto o número (N) que obtemos é a diferença entre a quantidade de nanopartículas que entra na célula (N_+) pela que sai (N_-).

$$\Delta N(t) = N_+(t) - N_-(t) \quad (3.37)$$

$$\Delta N(t) = N_{cap} \left(1 - e^{-t/\tau_{cap}}\right) - N_{exo} \left(1 - e^{-\frac{(t-t_{min}^{exo})}{\tau_{exo}}}\right) \theta(t - t_{min}^{exo}). \quad (3.38)$$

Para $t \leq t_{min}^{exo}$, o número de nanopartículas dentro da célula (ou adsorvida a sua superfície) é igual a $\Delta N(t) = N_{cap} \left(1 - e^{-t/\tau_{cap}}\right)$. Enquanto no limite de $t \rightarrow \infty$ temos que $\Delta N(t) = N_{cap} - N_{exo}$ que nos fornece o número final de nanopartículas dentro da célula ou adsorvidas na membrana.

As Figuras 3.12, 3.13, 3.14 e 3.15 abaixo mostram a relação entre a quantidade de nanopartículas dentro da célula (N) e o número máximo de nanopartículas internalizadas (N_{sat}) em função do tempo de incubação variando diferentes parâmetros da equação (3.38) para se ressaltar a dependência de N com relação a cada um desses parâmetros. A Figura 3.11 abaixo mostra o gráfico de $\frac{N}{N_{sat}} \times t$ para diferentes tempos de captura (τ_{cap}), desconsiderando efeitos excitóticos (ou dessortivos).

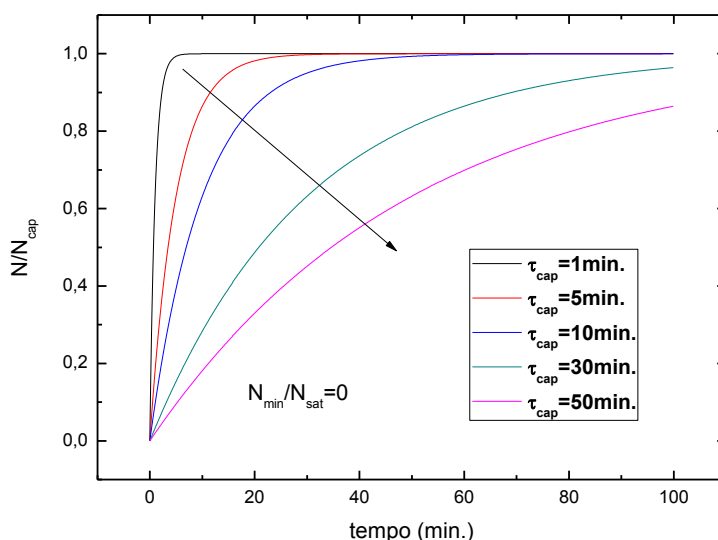


Figura 3.11 - Gráfico do número de nanopartículas em função do tempo para diferentes tempos de captura.

O gráfico acima mostra que quanto maior o tempo médio de captura, ou seja, o tempo que a nanopartícula leva para ser endocitada ou aderida a célula, maior será o

intervalo de tempo para que o número de nanopartículas interagentes chegue ao valor de saturação. Para uma aplicação biomédica esse resultado é muito importante, pois se as nanopartículas levam muito tempo para interagirem com a célula, a viabilidade celular pode já estar comprometida até que seja atingido um número de nanopartículas necessárias para a aplicação desejada, como por exemplo, a marcação de células tronco. Esse tempo de captura pode variar de acordo com as características da nanopartícula, sendo essa então uma forma de se controlar essa dinâmica.

A Figura 3.12 abaixo mostra o gráfico de $\frac{N}{N_{cap}} \times t$ para diferentes valores do número de nanopartículas exocitadas/dessorvidas (N_{exo}) em relação ao número de nanopartículas capturadas (N_{cap}).

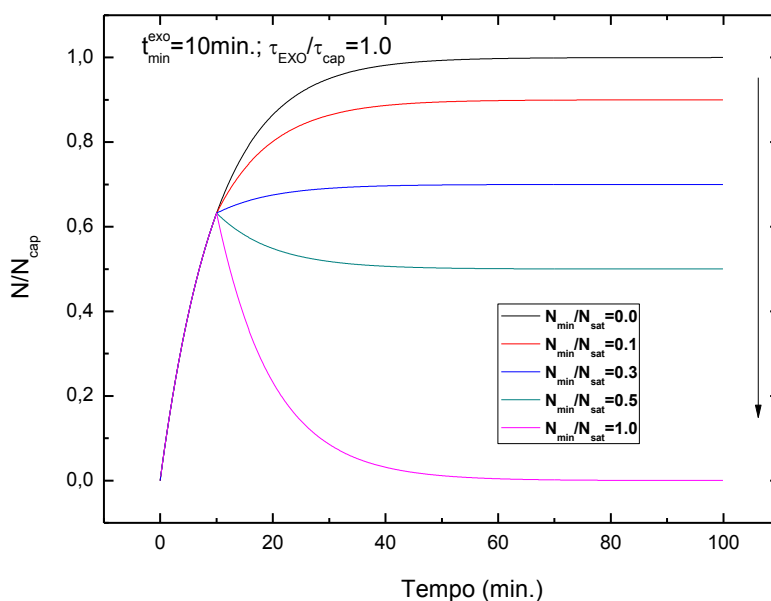


Figura 3.12 - Gráfico do número de nanopartículas que permanecem endocitadas (ou adsorvidas) em função do tempo para diferentes valores da razão entre o número de nanopartículas exocitadas (N_{exo}) e o número de nanopartículas capturadas (N_{cap}).

O gráfico nos mostra que quanto menor a razão do número de nanopartículas exocitadas/dessorvidas na membrana celular pelo número de nanopartículas capturadas maior será o número de nanopartículas que permanecem em interação com a célula ao longo do tempo. Para uma aplicação desse sistema em marcação e/ou vetorização de

células tronco não é interessante que todas as nanopartículas sejam excitadas após um curto intervalo de tempo. Obviamente, como mostrado no gráfico acima, é necessário que um determinado número de nanopartículas se mantenha na célula tempo suficiente para a aplicação. Portanto esse parâmetro deve também ser controlado.

A Figura 3.13 abaixo mostra o gráfico de $\frac{N}{N_{sat}} \times t$ para diferentes t_{min}^{exo} , que indica o tempo a partir do qual é iniciado o processo excitatório (ou dessortivo).

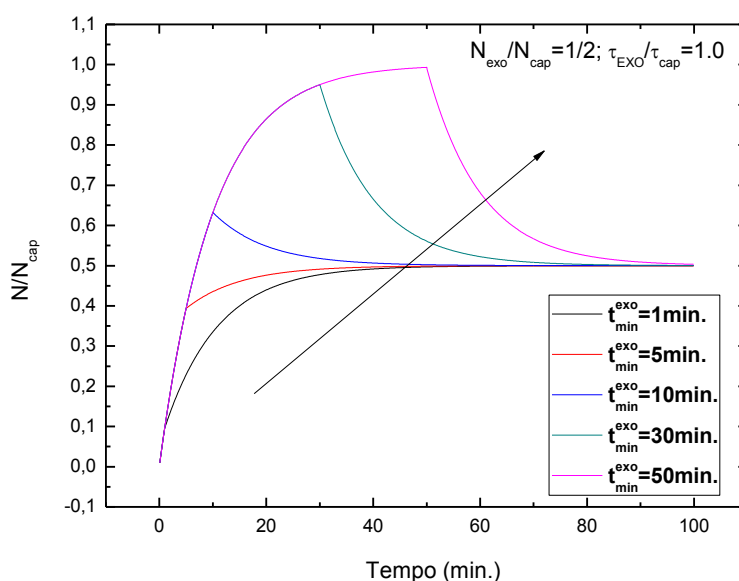


Figura 3.13 - Gráfico do número de nanopartículas em função do tempo para diferentes tempos t_{min}^{exo} .

É interessante para nosso sistema que a célula possa internalizar o maior número de nanopartículas sem que prejudique a viabilidade da célula. De acordo com o gráfico acima, um número maior de nanopartículas dentro da célula se mantém por mais tempo quando o tempo necessário para que se inicie o processo excitatório (dessortivo) é maior. Isto poderia indicar uma maior concentração crítica para se iniciar o processo.

Finalmente, na Figura 3.14 analisamos o efeito da razão entre o tempo característico de excitose (dessorção) e de captura (adsorção). A dinâmica apresentada aqui demonstra que quanto maior a razão τ_{exo}/τ_{cap} maior será o tempo necessário para se perceber qualquer efeito excitatório (ou dessortivo).

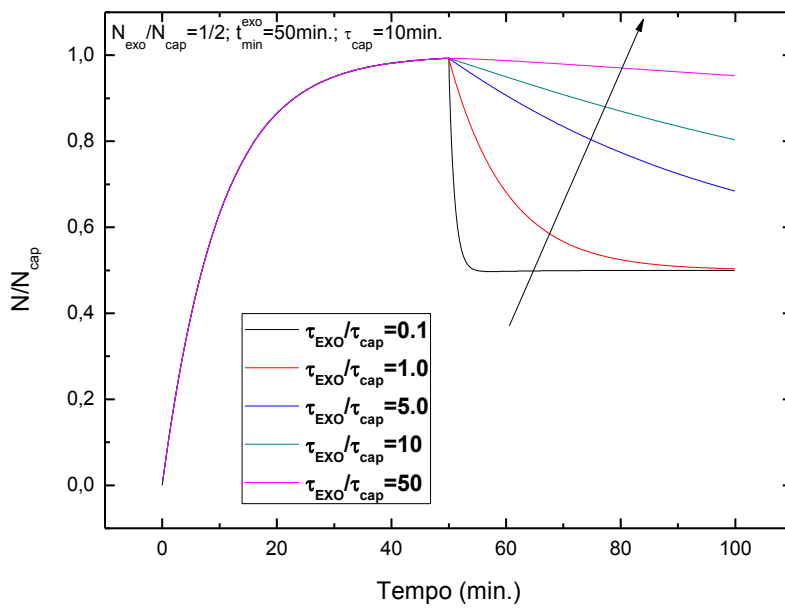


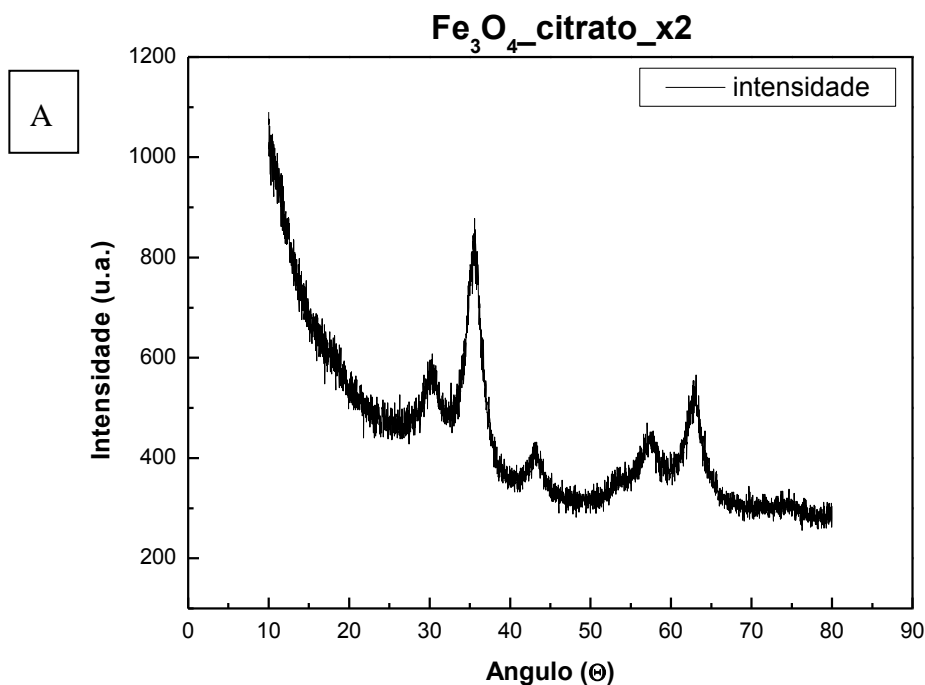
Figura 3.14 - Gráfico do número de nanopartículas em função do tempo para diferentes razões entre τ_{exo} e τ_{cap} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Estudos de DRX nos permitiram obter o diâmetro da nanopartícula e avaliar qualidade da síntese. Os dados obtidos pela difratometria de raios-x nos mostraram que a qualidade da síntese foi comprometida, de modo que a cristalinidade do material não está boa.

Os espectros de raios-X para a amostra de nanopartículas de magnetita recoberta com o dobro da concentração de citrato (Figura 4.1A), nanopartículas de magnetita recoberta com a concentração padrão de citrato (Figura 4.1B) e a amostra de nanopartículas de magnetita recoberta com a metade da concentração de citrato (Figura 4.1C) são apresentados a seguir.



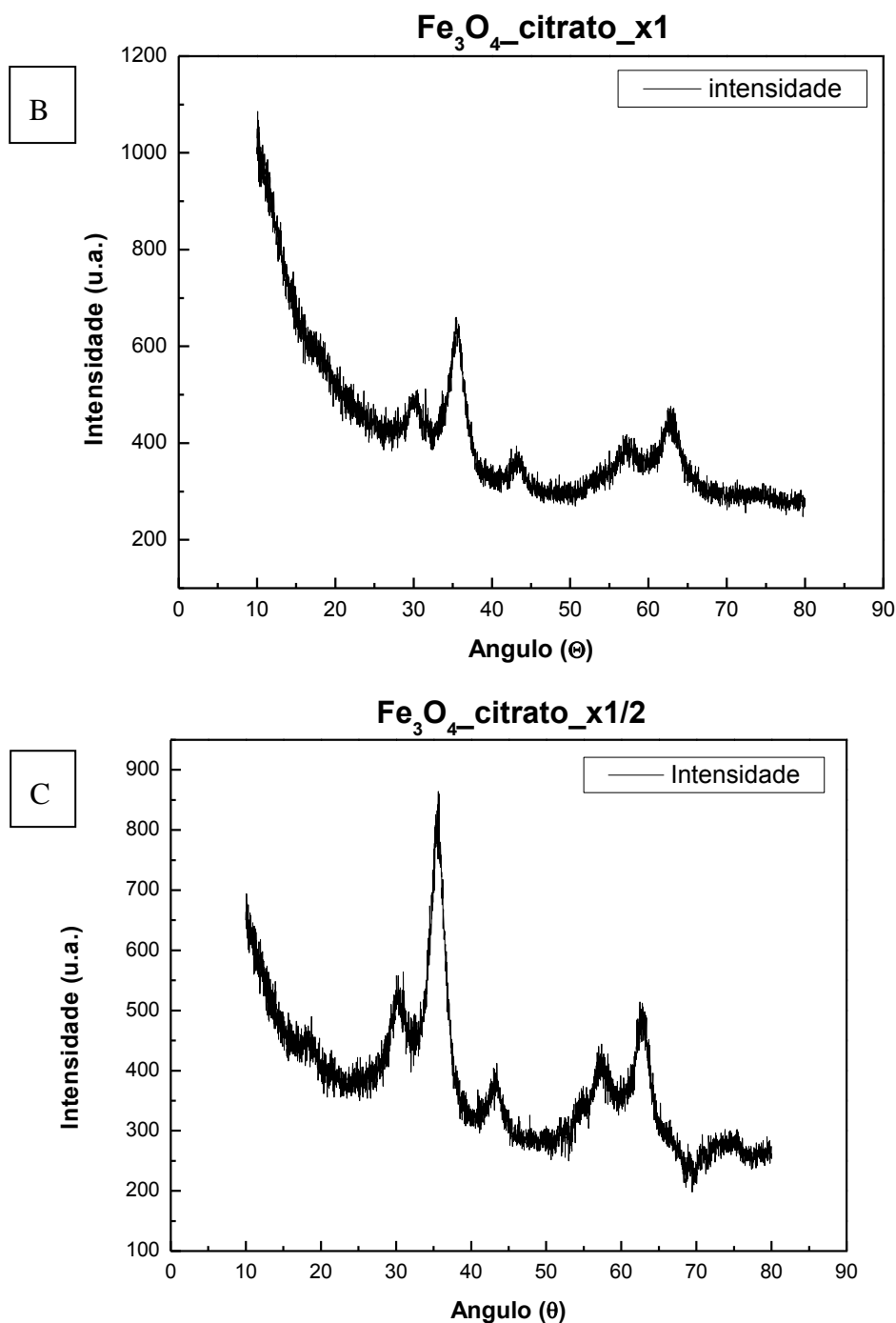
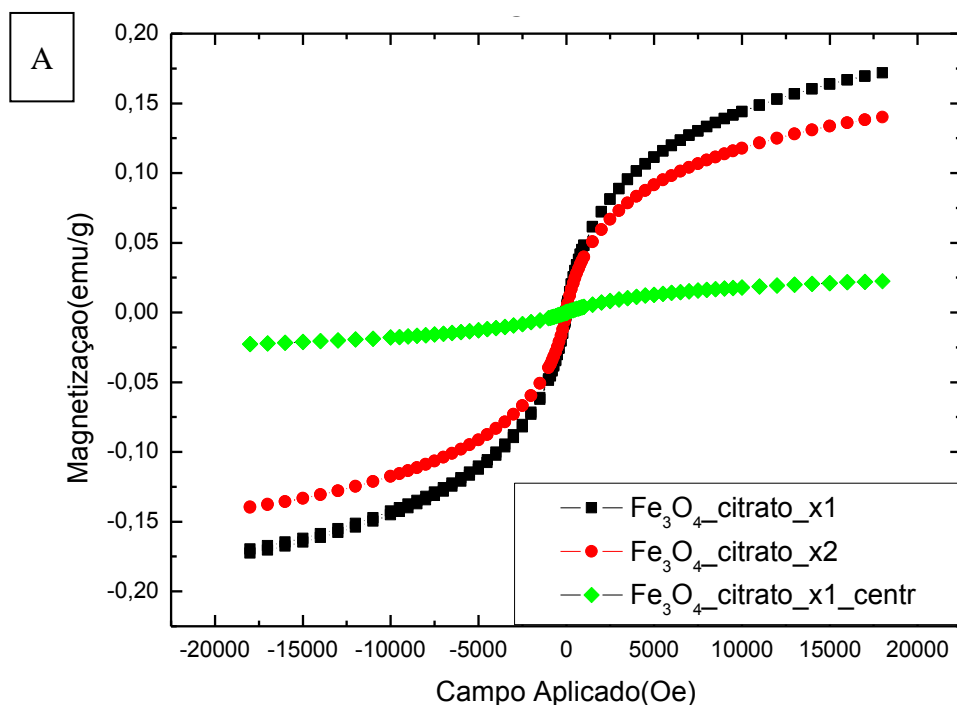


Figura 4.1 - Difratoograma de nanopartículas de magnetita recobertas com (A) o dobro da concentração de citrato, (B) a concentração padrão de citrato e (C) cobertura com a metade da concentração de citrato.

A partir dos difratogramas acima e utilizando a equação de Scherrer obtemos o diâmetro de (10 ± 1) nm para a amostra de nanopartículas de magnetita recoberta com o dobro da concentração de citrato, (10 ± 1) nm para a amostra de nanopartículas de magnetita recoberta com a concentração padrão de citrato e (5 ± 1) nm para a amostra de nanopartículas de magnetita recoberta com a metade da concentração de citrato.

4.2 MAGNETOMETRIA DE AMOSTRA VIBRANTE (VSM)

Com o objetivo de obter as medidas de magnetização da amostra foram realizadas avaliações por modo de Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM) das amostras sintetizadas em fluido e em pó, uma análise dessas medidas nos permite ainda determinar a magnetização da nanopartícula e o número de nanopartículas contidas num determinado volume do fluido (fração volumétrica). A Figura 4.2 abaixo mostra a curva de magnetização em função do campo magnético aplicado do fluido magnético (Figura 4.2A) e do pó (Figura 4.2B), para as amostras de magnetita recobertas com citrato na concentração padrão (x1), com o dobro da concentração padrão de citrato (x2) e com a metade da concentração padrão de citrato (x1/2) e para a amostra de magnetita recoberta com citrato na concentração padrão em fluido centrifugada por 30 min a 1800 rpm (x1_cent) essa foi a amostra utilizada no experimentos com ratos.



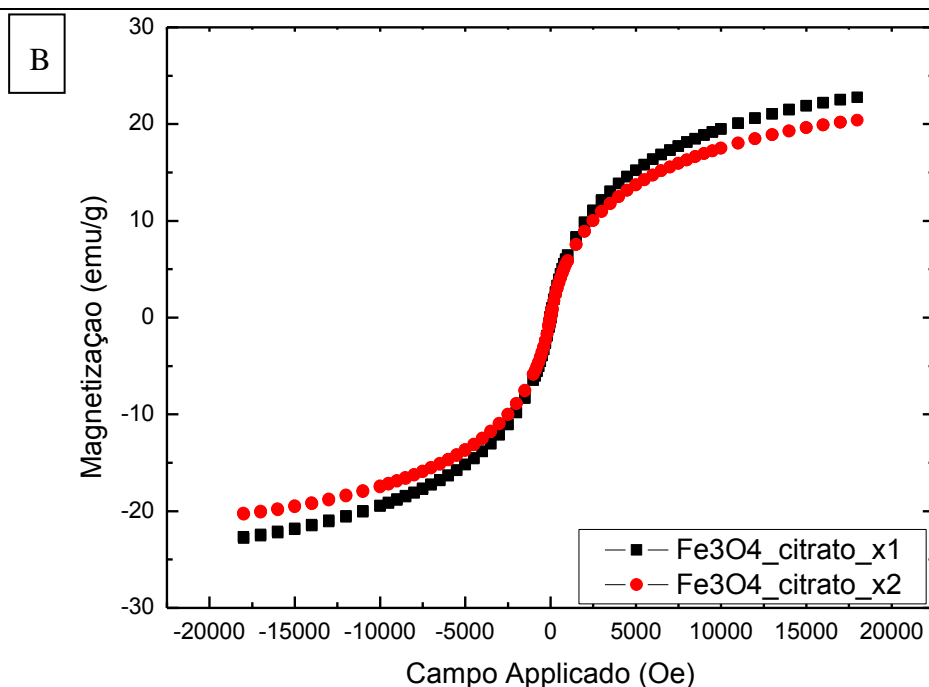


Figura 4.2 - Curva de magnetização em função do campo magnético aplicado das amostras de nanopartículas de magnetita recobertas com citrato em (A) fluido e (B) pó.

A partir dos dados de magnetometria foram obtidos os seguintes valores de magnetização para cada amostra, utilizando as equações (3.18), (3.19) e (3.20), obtemos os seguintes valores para a fração volumétrica (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Resultados experimentais de magnetometria dos fluidos sintetizados.

$\text{Fe}_3\text{O}_4_{\text{citrato}}$	Magnetização em emu/g	Magnetização em emu/cm^3	Fração volumétrica (ϕ)
x2 (pó)	$24,36 \pm 0,03$	$124,2 \pm 0,2$	0,71%
x1 (pó)	$27,26 \pm 0,03$	$139,0 \pm 0,2$	0,78%
x1/2	-----	-----	-----
x1_centrifugado (fluido)	$0,0295 \pm 0,0005$	$0,0295 \pm 0,0005$	0,11%

A técnica de DLS nos fornece a distribuição do diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta da superfície das nanopartículas. A Tabela 4.2 mostra os valores médios do diâmetro hidrodinâmico médio (D_H), o grau de dispersidade (PDI) e o potencial zeta (ξ) indicados pelo equipamento para cada amostra. Note que quanto maior o PDI, mais polidispersa é a amostra sugerindo uma maior formação de aglomerados de nanopartículas.

Tabela 4.2 - - Dados obtidos no experimento de Espalhamento de Luz Dinâmico.

Fluido Fe ₃ O ₄ _citrato	D _H (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
x2	35,0	0,314	-33,4
x1	34,8	0,558	-31,1
x1/2	78,1	0,183	-23,1
x1 centrifugado por 30 min	23,2	0,341	-17,2
x1 centrifugado por 30 min em solução de Krebs-Ringer	120,0	0,552	-11,9

A análise dos dados de DLS sugere uma saturação da concentração de moléculas de citrato na superfície das nanopartículas para as amostras x1 e x2, a amostras x1/2 mostrou um diâmetro hidrodinâmico maior sugerindo a formação de aglomerados provavelmente devido a uma menor cobertura superficial das nanopartículas pelas moléculas de citrato.

Os resultados também sugerem que ao centrifugar a amostra x1 o número de aglomerados diminuiu, diminuindo assim o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta. Essa mesma amostra ao ser colocada na solução de Krebs-Ringer, mistura com a qual os corações foram perfundidos, na proporção de 1:1000, formam aglomerados.

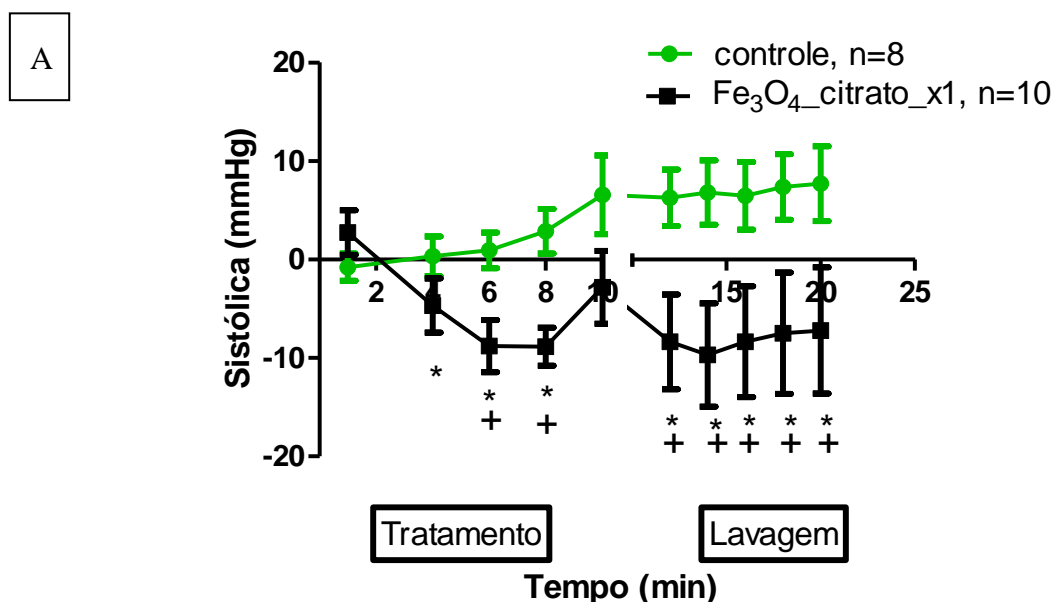
4.3 EFEITO DO FLUIDO MAGNÉTICO NO CORAÇÃO ISOLADO DE RATOS

Os corações de ratos foram submetidos à técnica de Langendorff com fluxo constante para a avaliação dos efeitos do fluido magnético na função cardíaca. Após um período de estabilização, o fluido foi perfundido e as possíveis variações dos parâmetros cardíacos foram analisadas. A tabela 4.3 apresenta os valores basais dos parâmetros cardíacos dos corações isolados.

Tabela 4.3- Valores basais das pressões intraventriculares sistólica e diastólica, pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo e pressão de perfusão, n=10, * P<0,05.

Pressão (mmHg)	Valor basal controle	Valor basal Fe ₃ O ₄ _citrato_x1
Intraventricular Sistólica	85,6 ± 0,7	78,5 ± 0,7
Intraventricular Diastólica	17,3 ± 0,2	15,9 ± 0,5
Desenvolvida do Ventrículo esquerdo	68,3 ± 0,2	63 ± 1
Pressão de Perfusão	79,9 ± 0,4	85 ± 1

O tratamento com o fluido magnético induziu significativa queda na pressão intraventricular sistólica, o que indica uma redução na contratilidade cardíaca. O processo de lavagem não reverteu esta alteração, o que pode ser observado no gráfico da variação da pressão intraventricular sistólica (Figura 4.3 A). Já na variação da pressão intraventricular diastólica ocorreu um aumento significativo durante os períodos de tratamento, efeito este que também se manteve na lavagem (Figura 4.3 B).



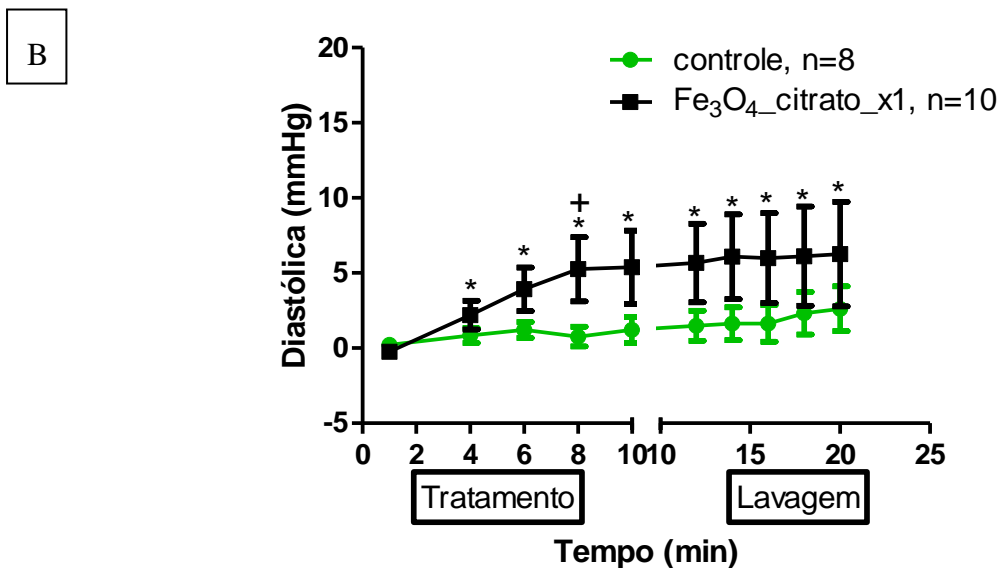


Figura 4.3 - Efeito do fluido magnético na pressão intraventricular sistólica (A) e diastólica (B) decorações isolados de ratos, os corações foram perfundidos pela técnica de Langendorff. Os dados estão expressos como média \pm EPM (Two-way Anova seguido do pos-teste LSD de Fisher). * $p < 0,05$ vs. basal, + $p < 0,05$ vs controle, nos respectivos tempos.

Os dados da contratilidade cardíaca mostram que os corações perfundidos pelo fluido magnético foram afetados de modo a alterar sua capacidade de ejeção, esse efeito possivelmente deve-se a interações entre as nanopartículas magnéticas com o tecido ou as células do coração. Os gráficos da pressão intraventricular acima (Figura 4.3) expressam a variação da pressão com relação a valores absolutos basais.

A pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (PDVE) agrupa os valores das pressões intraventricular sistólica e diastólica possibilitando uma análise integrada entre tais pressões.

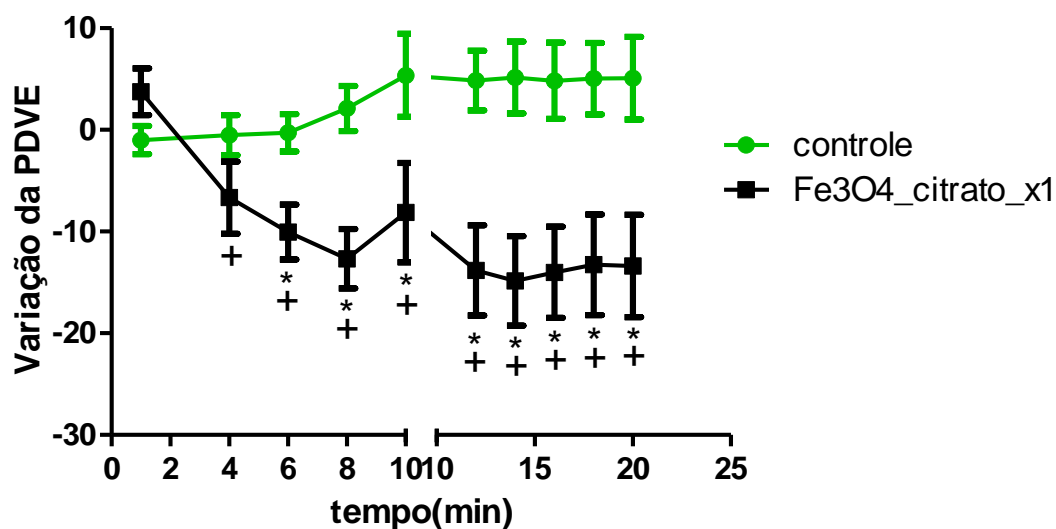


Figura 4.4- Efeito do fluido magnético na pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo de corações isolados de ratos, os corações foram perfundidos pela técnica de Langendorff. Os dados estão expressos como média \pm EPM (Two-way Anova seguido do pos-teste LSD de Fisher). * $p < 0,05$ vs. basal, + $p < 0,05$ vs controle nos respectivos tempos.

Como observado na Figura 4.4, o fluido promoveu diminuição significativa na pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo, o que representa uma diminuição na contratilidade cardíaca alterando o poder de ejeção do ventrículo esquerdo. Esse resultado está de acordo com os resultados obtidos da pressão intraventricular. Esses efeitos podem estar associados a mudanças na concentração de íons dentro dos cardiomiócitos.

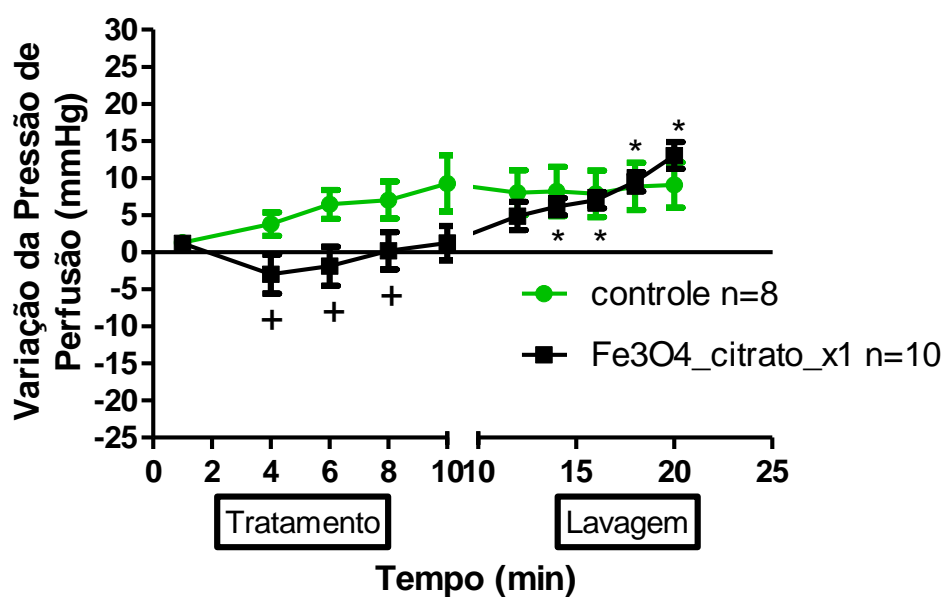


Figura 4.5- Efeito do fluido magnético na pressão de perfusão de corações isolados de ratos, os corações foram perfundidos pela técnica de Langendorff. Os dados estão expressos como média \pm EPM (Two-way Anova seguido do pos-teste LSD de Fisher). * $p < 0,05$ vs. basal, + $p < 0,05$ vs controle nos respectivos tempos.

Como observado na Figura 4.5, o fluido promoveu uma leve diminuição na pressão de perfusão, o que representa uma vasodilatação coronariana, sendo esse efeito reversível durante a lavagem. No período de lavagem foi observado um pequeno aumento da pressão de perfusão comparado ao basal, mas essa é característica do próprio procedimento experimental, pois foi observado também no grupo controle (Figura 4.5).

A frequência cardíaca nos corações isolados também foi analisada e não apresentou variação significativa quando foi comparado efeito máximo do fluido como valor basal (Figura 4.6).

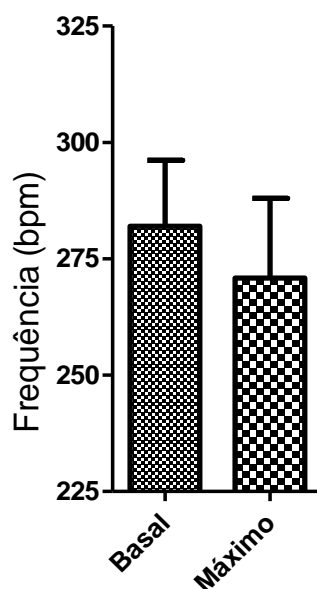
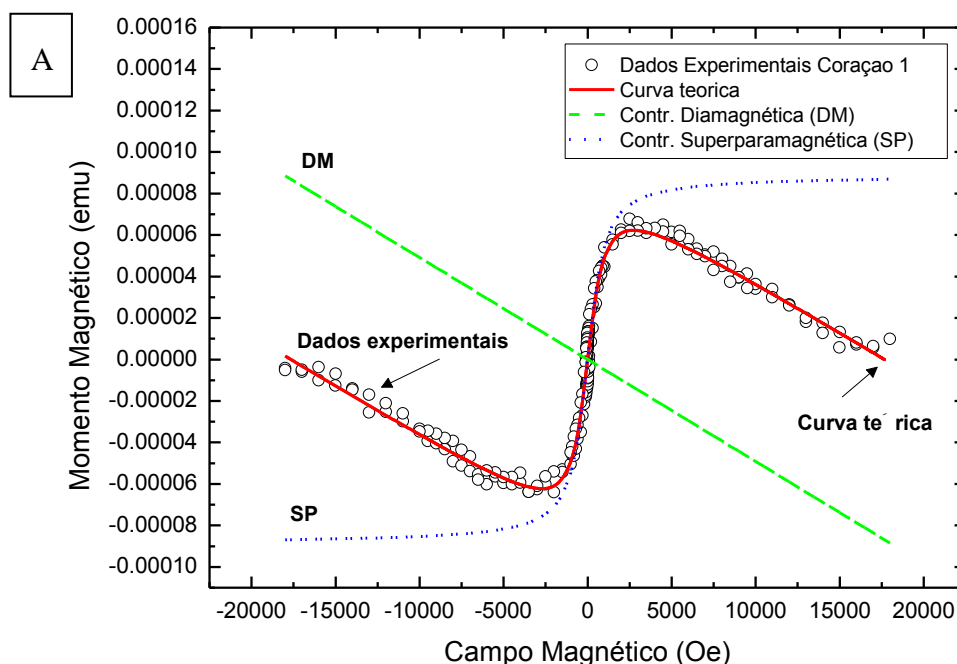


Figura 4.6 - Efeito do fluido magnético na frequência cardíaca de corações isolados de ratos, os corações foram perfundidos pela técnica de Langendorff. Os dados estão expressos como média \pm EPM.

Estudos revelam que a perfusão de nanopartículas de TiO_2 , SiO_2 e fuligem (printex 90) geraram um aumento significativo na frequência cardíaca em corações isolados de ratos resultando num efeito tóxico[22]. Esse efeito não se reproduziu para o fluido magnético utilizado no presente trabalho, em que o efeito observado foi na pressão intraventricular.

4.4 ANÁLISES DE AMOSTRAS DOS CORAÇÕES ISOLADOS POR MAGNETOMETRIA DE AMOSTRA VIBRANTE

Após ter realizado os experimentos com coração isolado dos ratos perfundindo com fluido magnético, os corações foram secados em estufa por 24 horas, depois cada um separadamente foi submetido a moagem e suas amostras foram analisadas por VSM a fim de verificar a presença de nanopartículas residuais no coração. Tal procedimento foi feito apesar da baixa concentração de fluido perfundido e os corações ainda terem sido submetidos a lavagem. A Figura 4.7 abaixo mostra que a amostra apresenta curva superparamagnética característica das nanopartículas magnéticas perfundidas nos corações. Na Figura 4.7-A, o gráfico do momento magnético em função do campo magnético aplicado para o coração 1 mostra que nos dados experimentais observamos uma contribuição diamagnética (devido aos componentes das células) e um sinal superparamagnético característico das nanopartículas. A Figura 4.7-B mostra o gráfico da magnetização em função do campo magnético aplicado para os corações 1, 2 e 3 tendo retirado o sinal diamagnético da amostra.



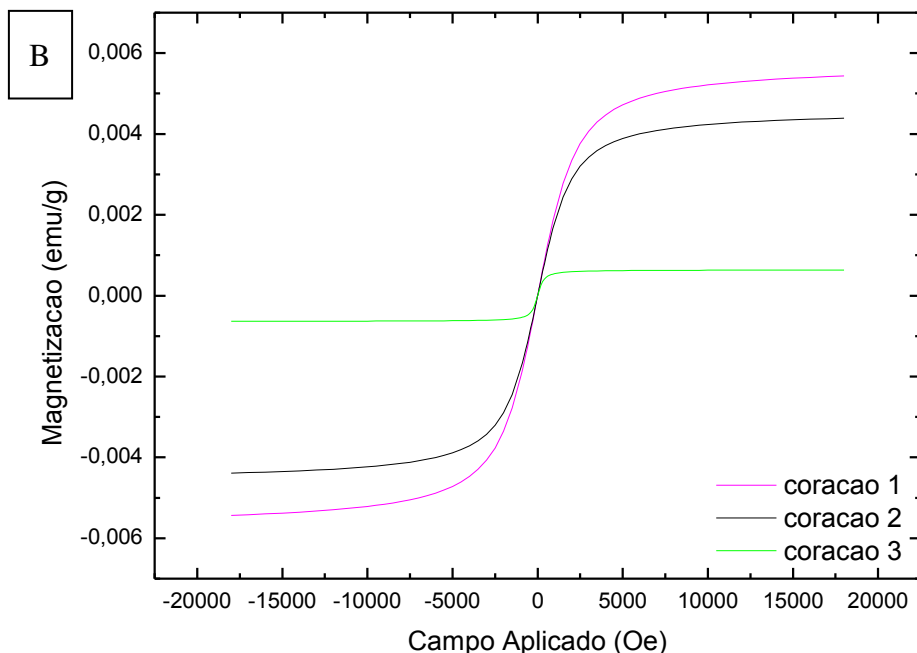


Figura 4.7- Resultados experimentais de magnetometria dos orações perfundidos pelo fluido magnético. (A) momento magnético x campo aplicado para o coração 1 e (B) curva de magnetização para três corações.

A equação do momento magnético da amostra (coração + nanopartículas) é dada por

$$\mu = n\mu_p L(\varepsilon) - \chi H \quad (4.1)$$

com $\varepsilon = \left(\frac{\mu_0 M_S V_p}{K_B T}\right) H$, onde n é o número de nanopartículas na amostra, μ_p é o momento magnético da partícula, $L(\varepsilon)$ é a função de Langevin e χ é susceptibilidade. O ajuste dos dados do coração 1 dado pela medida de VSM nos dá os seguintes valores:

$n \cong 3,89 * 10^{12}$ nanopartículas/grama, $\chi = (-4,9 \pm 0,2)10^{-9}$ e $\frac{\mu_0 M_S V_p}{K_B T} = (0,0025 \pm 0,0001)$. De acordo com o valor de ε encontrado foi possível estimar o diâmetro da nanopartícula obtendo-se o valor $D=11$ nm, equivalente ao valor determinado pela análise da nanopartícula por DRX.

Os dados de magnetometria (VSM) mostram que mesmo após a lavagem há nanopartículas residuais nos corações sugerindo assim, (1) uma internalização ou

adsorção das nanopartículas pelos cardiomiócitos, (2) deposição nas paredes dos vasos coronarianos ou (3) no interstício do tecido muscular cardíaco.

4.5 EFEITO DO FLUIDO MAGNÉTICO NA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE ANIMAIS ACORDADOS

Os ratos foram submetidos à canulação da artéria e veia femoral para a avaliação *in vivo* da pressão arterial e da frequência cardíaca dos ratos. A avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca foi feita 24 horas após a canulação. Foram avaliados 6 ratos.

A infusão das nanopartículas magnéticas não promoveu alterações significativas na variação da pressão arterial sistólica e diastólica ou da frequência cardíaca (Figura 4.8), com relação aos valores absolutos basais (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Valores basais da pressão arterial e da frequência cardíaca dos experimentos com animais vivos.

	Pressão Sistólica (mmHg)	Pressão Diastólica (mmHg)	Frequência cardíaca (B.P.M.)
Valor basal	139 ± 7	98 ± 9	379 ± 12

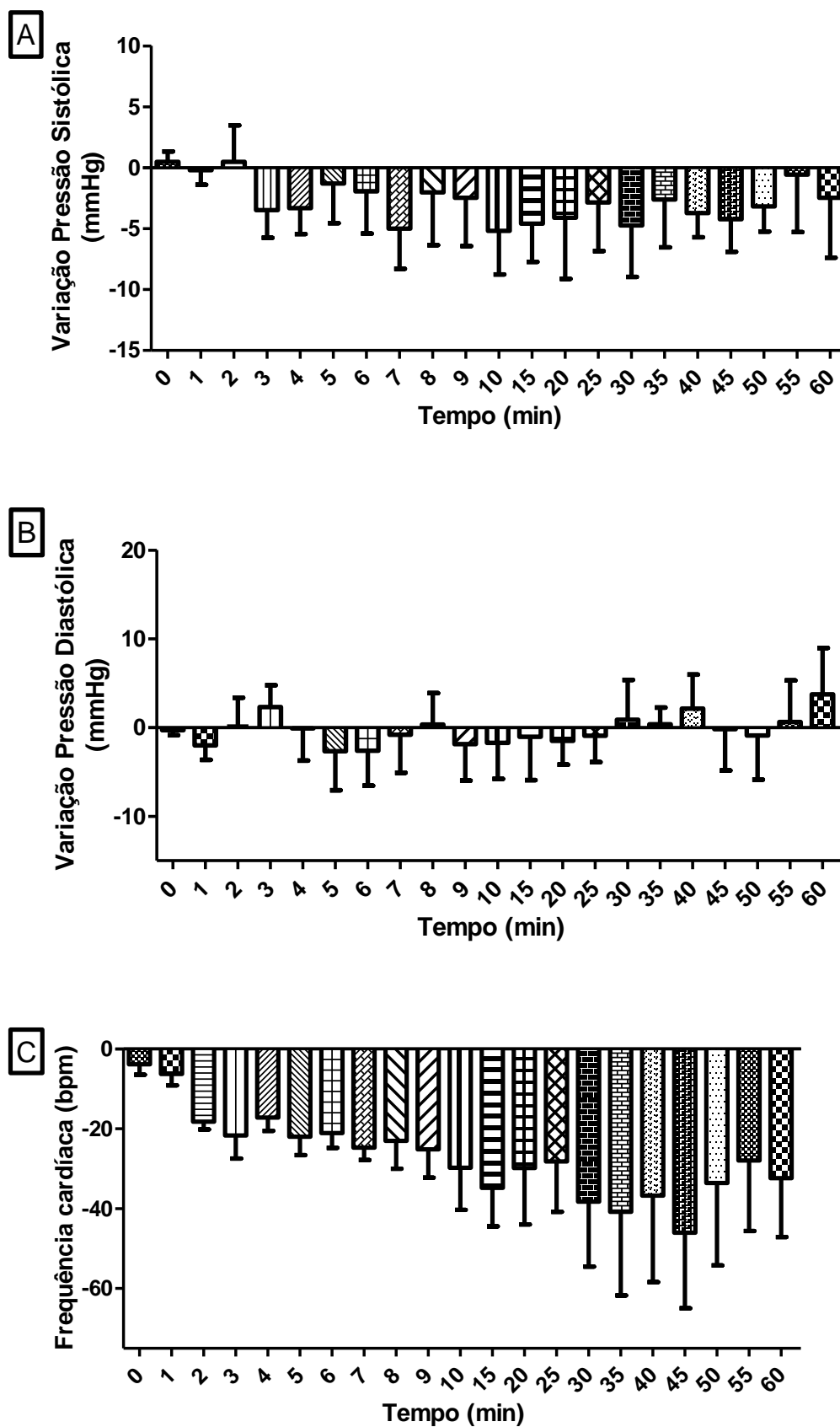


Figura 4.8- Efeito *in vivo* do fluido magnético. Gráficos da pressão arterial sistólica (A) e diastólica (B). E gráfico da variação da frequência arterial (C). Os dados estão expressos como média \pm EPM (One-way Anova seguido do pos-teste de Bonferroni).

4.6 MAGNETOFORESE

Magnetoforesse é o termo designado ao movimento de estruturas quando sob ação de gradiente de campo magnético. Essa técnica pode ser utilizada para detectar ou isolar componentes específicos. Por exemplo, atualmente, já existem aplicações tecnológicas associadas a separação de células-tronco (CT) utilizando microesferas magnéticas recobertas com marcadores moleculares específicos (anticorpos seletivos) que quando incubadas em uma solução contendo diversos tipos de células, ficam aderidas a membrana das CT, e são capazes de segregar/separar apenas as células de interesse biomédico.

Em nosso estudo, a técnica de magnetoforesse foi utilizada para avaliar o movimento de cardiomiócitos quando estas células contêm nanopartículas magnéticas. Logo, neste caso, na presença de um gradiente de campo magnético observa-se o movimento dos cardiomiócitos e determina-se, experimentalmente, sua velocidade. Como este parâmetro depende fortemente da quantidade de nanopartículas internalizadas (ou adsorvidas na membrana celular) foi possível investigar o processo de internalização ou adsorção de nanopartículas magnéticas por cardiomiócitos e quantificá-las, individualmente, para cada célula por meio da variação no experimento magnetoforético do tempo de incubação.

Inicialmente, no que diz respeito ao experimento de magnetoforesse, foi realizado um mapeamento do campo magnético na região onde é localizada a amostra de cardiomiócitos com nanopartículas magnéticas. Este mapeamento foi necessário, pois a velocidade de deslocamento das células depende do gradiente de campo magnético ($\frac{dB(z)}{dz}$, com $B(z) = Ae^{(-z/z_0)} + B_0$). Os seguintes parâmetros foram determinados para a nossa configuração experimental: $B_0 = (51 \pm 13)G$, $z_0 = (0.689 \pm 0.017)cm$,

$A=(4699\pm 63)$ G, $z=2,2$ cm, e $\frac{dB(z)}{dz} = (-2800 \pm 260)G/cm$, isto nos fornece um gradiente de campo uniforme na região experimental. Como anteriormente determinamos diversos parâmetros relevantes, e no presente experimento ainda é possível medir as dimensões da célula e a velocidade magnetoforética, pode-se, facilmente, determinar a quantidade de nanopartículas internalizadas utilizando a equação (3.27)

$$N = \frac{36\eta \left(\frac{3V_{cell}}{4\pi}\right)^{1/3}}{M_{sp}D^3} v \left(\frac{dB}{dx}\right)^{-1} \quad (4.2)$$

em conjunto com os dados medidos experimentalmente obtemos o número de nanopartículas na célula. Outra informação muito relevante é a massa de nanopartículas dentro da célula, e pode ser obtida com a seguinte equação

$$m = \frac{1}{6} N \rho \pi D^3 \quad (4.3)$$

onde $\rho = 5 \text{ g/cm}^3$ é a densidade da nanopartícula utilizada no experimento e D, seu diâmetro.

Vale ressaltar que o fluido magnético utilizado nos experimentos de coração isolado e *in-vivo* era constituído de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) recobertas por moléculas de citrato. Também foi realizado um experimento de magnetoforese com esse fluido, porém sua magnetização era muito baixa e não conseguimos verificar o efeito magnetoforético para o gradiente de campo utilizado. Por essa razão foi utilizada a ferrita de manganês que apresentava uma magnetização muito maior e continha a mesma camada de cobertura (citrato). Também foi aproveitada a oportunidade para avaliar nanopartículas com outros diâmetros e camadas de cobertura.

As amostras utilizadas no experimento constituíam 1 μl de fluido magnético diluído em 100 μl de solução de tyrode contendo cardiomiócitos. Os fluidos magnéticos utilizados eram constituídos por nanopartículas de ferrita de manganês (MnFe_2O_4) com três diferentes camadas de cobertura, são elas: recobrimento com moléculas de citrato, recobrimentos com moléculas de fosfato e, ainda, recobrimento por íons catiônicos. Os dois primeiros consistiam de fluidos magnéticos biocompatíveis, enquanto que o terceiro era um fluido magnético iônico estável em pH ácido.

O efeito magnetoforético foi medido por meio da velocidade média da célula, enquanto suas dimensões também são medidas experimentalmente. Lembre que no diagrama de bloco experimental apresentado na seção 3.6 há uma câmera acoplada ao microscópio responsável por registrar o movimento das células com nanopartículas magnéticas (células magnéticas) devido ao gradiente de campo magnético. O vídeo registrado pela câmera nos permitiu construir a trajetória de cada célula magnética e suas dimensões. A Figura 4.9 abaixo mostra diversos cardiomiócitos e a trajetória de um deles. É possível observar também a típica contração de uma cardiomiócito (devido ao potencial de ação) demonstrando que a célula está viável. De fato, nem todas as células estavam nestas condições por causa do procedimento (protocolo) de dissociação. Entretanto, no nosso experimento, apenas as que descreveram o movimento magnetoforético (células viáveis) foram analisadas.

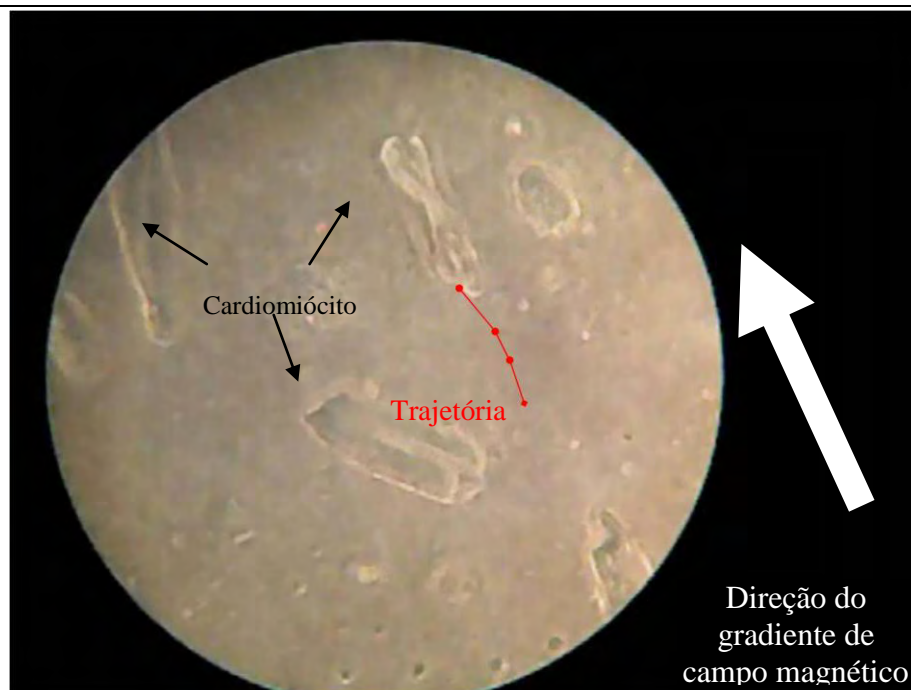


Figura 4.9 - Fotografia da trajetória de um cardiomiócito magnético que se moveu devido gradiente de campo magnético.

Os resultados obtidos da análise dos registros dos experimentos de magnetoforese fornecem informações de cada célula individualmente como as contidas na Tabela 4.5 abaixo para algumas das células analisadas. A idéia ao apresentar estes dados é apenas ilustrativa, com o intuito de que o leitor avalie de forma qualitativa o trabalho associado a determinação individual de cada parâmetro experimental.

Tabela 4.5– Amostra de dados obtidos no experimento de magnetoforese.

Célula	$v_{méd}$ ($\mu\text{m/s}$)	$V_{célula}$ (μm^3)	$N \cdot (10^6)$	m (pg)	\emptyset (%)
1	79,897	11742,9006	1,629965	10,26742611	0,017487
2	75,043	8532,43204	1,376334	8,66976087	0,020322
3	45,612	3853,35948	0,641823	4,042949126	0,020984
4	129,57	2670,28041	1,613415	10,16317493	0,07612
5	132,722	4550,90536	1,97408	12,43506818	0,054649
6	218,164	3768,7305	3,047222	19,19496983	0,101864
7	80,166	3327,1535	1,074164	6,766339932	0,040673
8	127,909	7140,08566	2,210675	13,92541766	0,039006
9	38,388	26151,681	1,022707	6,442206993	0,004927
10	32,462	46133,95967	1,044972	6,582459101	0,002854
11	56,095	38554,83372	1,700878	10,71411777	0,005558
12	28,111	61613,02638	0,996529	6,277303514	0,002038
13	21,189	32953,5178	0,609725	3,840758855	0,002331
14	25,69	39472,3589	0,785087	4,945396495	0,002506
15	27,606	15176,51472	0,613456	3,86426426	0,005092
16	26,195	41924,46148	0,816765	5,144938871	0,002454
17	55,938	51761,54242	1,871107	11,78642209	0,004554
18	34,253	126366,456	1,542761	9,718111297	0,001538
19	31,905	76451,53336	1,215375	7,655850917	0,002003
20	34,174	178002,2565	1,725415	10,86868419	0,001221
21	31,241	19857,01053	0,75931	4,783020045	0,004817
22	41,707	23549,45068	1,072981	6,758887189	0,00574
23	32,798	4063358448	1,012042	6,37502255	0,003138
24	32,289	20898,9732	0,798274	5,028466526	0,004812
25	26,581	12860,991	0,558966	3,521022327	0,005475
26	32,529	25292,96634	0,857025	5,398543684	0,004269
27	18,229	50540,0255	0,604919	3,810488447	0,001508
28	19,274	30430,15084	0,540086	3,402090601	0,002236
29	19,257	48128,08666	0,628701	3,960294488	0,001646

Note, então, que utilizando os dados obtidos é possível fazer diferentes análises a cerca da interação das nanopartículas com os cardiomiócitos para diferentes nanopartículas e tempos de incubação.

A Figura 4.10 mostra o gráfico da velocidade magnetoforética média dos cardiomiócitos na presença de gradiente de campo magnético em função do tempo de incubação para os três diferentes tipos de fluido utilizados.

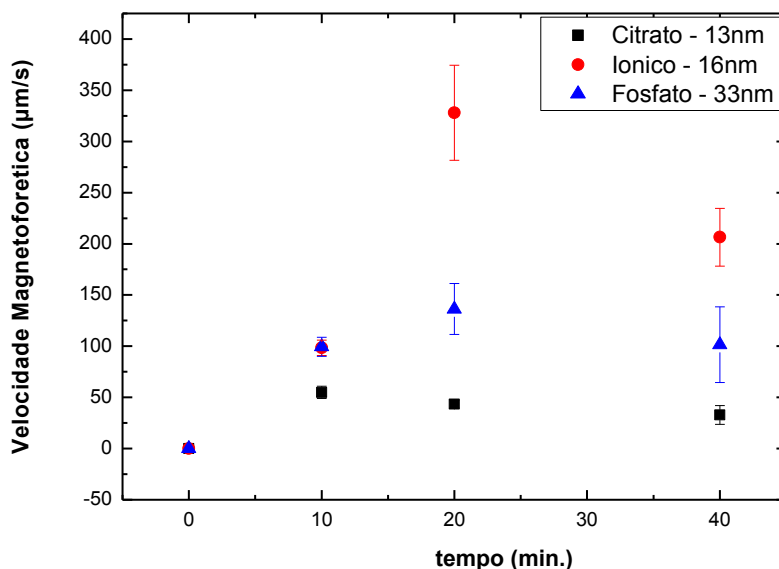


Figura 4.10 - Gráfico da velocidade média dos cardiomiócitos em função do tempo.

O resultado apresentado pela velocidade magnetoforética média indica que as nanopartículas não só interagem com os cardiomiócitos como também estão sendo internalizadas/adsorvidas por eles. E ainda, para cada um dos fluidos observamos que a velocidade aumenta com o tempo e depois começa a diminuir. A velocidade magnetoforética depende do número de nanopartículas dentro da célula ou aderidas a sua superfície. Logo, quando a velocidade magnetoforética da célula aumenta em função do tempo o resultado indica que aumentou também o número de nanopartículas internalizadas/adsorvidas a célula. Por outro lado, quando a velocidade começa a diminuir o oposto ocorre, ou seja, reduz-se o número de nanopartículas em relação ao valor máximo apresentado. Portanto, esse gráfico sugere, inicialmente, um processo endocitótico/adsortivo e a partir de um determinado tempo crítico, possivelmente um número crítico de nanopartículas, a própria célula desencadeia um processo responsável por retirar a quantidade “excessiva” de nanopartículas.

A Figura 4.11 mostra que o número de nanopartículas internalizadas pela célula é fortemente dependente de um parâmetro em especial, o diâmetro da nanopartícula, como podemos observar no gráfico do número de nanopartículas por célula em função do diâmetro para diferentes tempos de incubação. Em tempos curtos há uma maior quantidade de nanopartículas internalizadas para o fluido contendo nanopartículas com menor diâmetro, sugerindo que o processo de internalização das mesmas é mais rápido que em dimensões maiores. Por outro lado, após estabelecido o processo de internalização nossos resultados sugerem que existe uma diâmetro com maior eficiência de internalização/adsorção (aparentemente entre 16 e 33 nm).

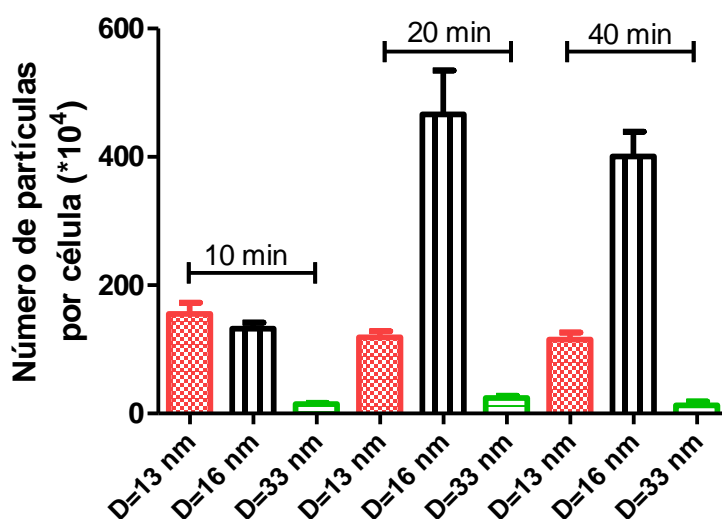


Figura 4.11 - Gráfico do número de nanopartículas por célula em função do diâmetro para diferentes tempos de incubação.

Cabe aqui ressaltar que outros trabalhos da literatura também apresentam resultados semelhantes. A Figura 4.12 ilustra este cenário observado em outros estudos em que o número de nanopartículas **de ouro** por célula em função da dimensão das mesmas para três diferentes linhagens celulares: fibroblastos (STO), célula HeLa (encontrada em câncer no ovário) e células tumorais cerebrais (SNB19). Seus resultados, em concordância como o presente estudo, sugerem um diâmetro ótimo para

o processo de internalização. Note também que diferentemente do presente experimento o número de nanopartículas por célula foi da ordem de 10^3 [23].

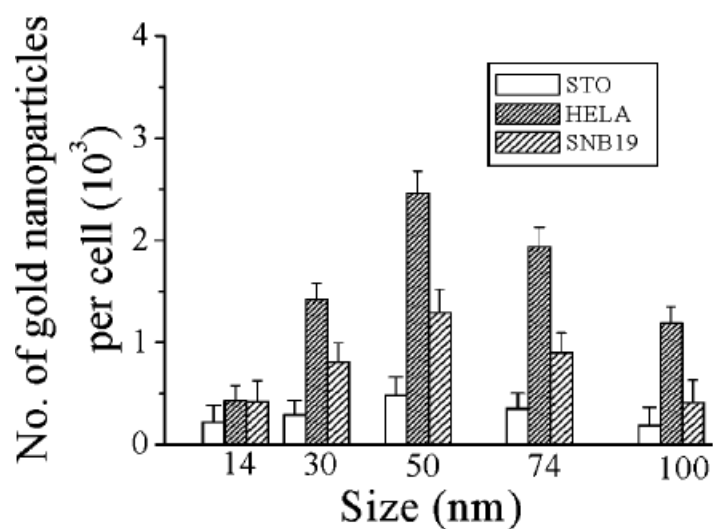


Figura 4.12 –Gráfico do número de nanopartículas de ouro internalizadas em diferentes tipos de células em função do tamanho das nanopartículas [23].

Os mesmos dados anteriores são apresentados de forma semelhante na Figura 4.13. Os símbolos representam o número de nanopartículas internalizadas/adsorvidas em função do tempo de incubação para as diferentes amostras. Obviamente, em 0 minuto não há qualquer nanopartícula internalizada ou adsorvida na membrana da célula.

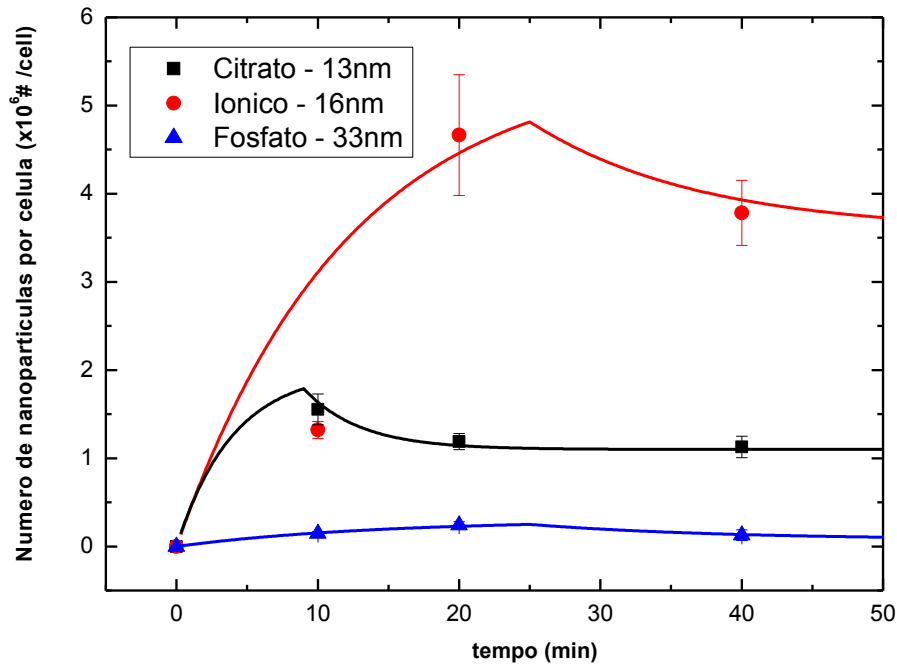


Figura 4.13 - Gráfico do número de nanopartículas internalizadas em função do tempo.

Por outro lado, as linhas sólidas foram obtidas a partir da análise dos dados experimentais utilizando o modelo apresentado na seção 3.7 referente ao processo de endocitose/adsorção e exocitose/dessorção de nanopartículas. Este cálculo teórico foi feito utilizando a equação (3.38),

$$\Delta N(t) = N_{cap} \left(1 - e^{-t/\tau_{cap}} \right) - N_{exo} \left(1 - e^{-\frac{(t-t_{min}^{exo})}{\tau_{exo}}} \right) \theta(t - t_{min}^{exo}). \quad (4.4)$$

para cada um dos fluidos utilizados. Aqui, nesta análise teórica, não há parâmetros livres. A partir de uma análise dos dados experimentais e das figuras 4.10, 4.11 e 4.13 na seção 4.6, selecionamos os valores dos parâmetros que melhor representariam os dados experimentais. Estes são apresentados na Tabela 4.7. Os dados, assim como sua análise teórica, sugerem que as nanopartículas, primeiramente, estão sendo capturadas pelas células e a partir de certa quantidade crítica (N_{min}) desencadeiam um processo

exocitótico. Este, aliás, parece depender de diversas características das nanopartículas (diâmetro, recobrimento molecular, etc).

Tabela 4.6- Parâmetros utilizados nos cálculos do número de nanopartículas internalizadas em função do tempo.

	N_{cap} (*10 ⁶)	τ_{cap} (min)	N_{exo} (*10 ⁶)	T_{exo} (min)	τ_{exo} (min)	t_{min}^{cap} (min)
Citrato	2,0	4,0	0,9	9,0	4,0	9,0
Iônico	5,5	12	1,93	25	12	25
Fosfato	0,3	14	0,23	25	14	25

Outro fator relevante a ser avaliado diz respeito à ordem de grandeza do número de nanopartículas internalizadas/adsorvidas por célula obtida utilizando a técnica de magnetoforese. Valores semelhantes foram encontrados em diversos artigos publicados recentemente com outras linhagens celulares e estimadas por outras técnicas (microscopia eletrônica de transmissão, absorção atômica, fluorescência e rádio-marcadores, entre outros)[23; 16; 25; 26]. Por exemplo, Lewin et al. publicaram um artigo em 2000 na Nature Biotechnology onde avaliaram a internalização de nanopartículas magnéticas (NM) recobertas por peptídeos (Tat) em células-tronco, e encontraram (via radiomarcadores) de $0.5-2 \times 10^7$ nanopartículas por célula; em 2011 Zablotskii et al. publicaram um artigo na Applied Physics Letters em que avaliaram, utilizando fluorescência, que as NM internalizadas em células de câncer de próstata estavam na faixa de $0.2-2 \times 10^7$ nanopartículas por célula; Também recentemente, em uma publicação na Biomaterials em 2011 Lunov et al. determinaram por espectroscopia a mesma ordem de grandeza para uma linhagem de macrófagos humanos (vide Figura 4.14). Portanto, nossos resultados sugerem que a quantificação de NM por meio da técnica de magnetoforese pode ser um interessante aliado para o estudo dos mecanismos de internalização de nanoestruturas magnéticas.

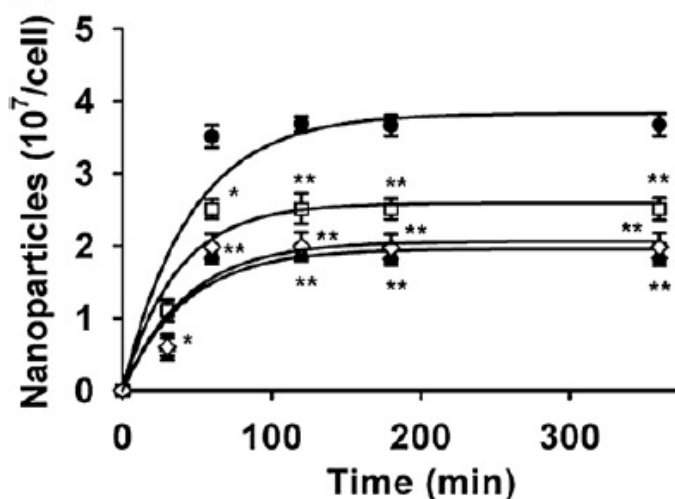


Figura 4.14 - Gráfico do número de nanopartículas (SPIO) internalizadas em função do tempo em macrófagos [24].

Outra análise muito importante a se fazer é a quantidade de massa das nanopartículas dentro da célula. Isto é relevante, pois não é necessariamente verdade que uma maior quantidade de nanopartículas indique uma maior quantidade em massa do material intracelular. É fundamental sempre avaliar o número com o diâmetro da nanoestrutura. A Figura 4.15 abaixo apresenta um gráfico da quantidade de massa em função do tempo de incubação.

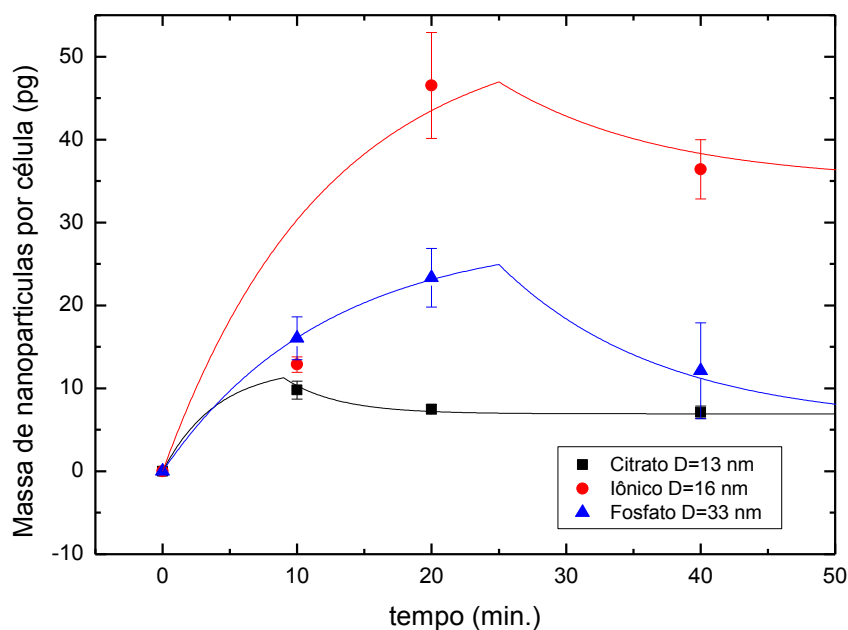


Figura 4.15- Gráfico da quantidade de massa em função do tempo.

É importante observar que embora o número de nanopartículas recobertas com tripolifosfato de sódio dentro da célula seja menor que para as nanopartículas com citrato, a massa para o fosfato é maior, já que o seu diâmetro é muito maior que a com citrato. De fato estes valores são obtidos utilizando a equação 4.2 e indicam a importância do volume da nanopartícula na determinação da massa internalizada.

Novamente, outros resultados publicados na literatura [25; 26] estão da mesma ordem de grandeza daqueles calculados neste trabalho. Em particular, Lewin et al. obtiveram valores entre 10 e 30 pg de nanopartículas magnéticas recobertas com peptídeo Tat por célula [8] enquanto Lunov et al. obtiveram da ordem de picogramas de ferro por célula [25]. Adicionalmente, cabe ressaltar, que nosso trabalho talvez seja o primeiro na literatura a avaliar o processo de internalização em cardiomiócitos.

Logo, os resultados obtidos pela técnica de magnetoforese são muito interessantes, pois são semelhantes a resultados da literatura para diferentes nanopartículas e células obtidos por meio de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, análise química, dentre outros. O diferencial da magnetoforese é que essa é uma técnica simples, de fácil manuseio, rápida obtenção de dados e também barata.

Há poucos anos o entendimento do processo de internalização de nanoestruturas era pouco conhecido. Entretanto, mais recentemente, resultados experimentais e teóricos começaram a melhorar o nosso entendimento acerca do mecanismo, mas ainda podem-se encontrar resultados contraditórios na literatura. Sabe-se, no entanto, que o processo de internalização de nanoestruturas é fortemente dependente da camada de recobrimento da nanopartícula, de sua carga superficial e da forma do objeto nanométrico [16; 14;27; 24; 23].

Existem diferentes mecanismos de internalização das nanopartículas com a célula, um deles é via receptores presentes na membrana celular (por exemplo:

scavenger e clatrininas [25, 23]) que se ligam à superfície da nanopartícula envolvendo-a e posteriormente endocitando-a, nesse processo cada nanopartícula leva um tempo (t_w) para ser internalizada, chamado “tempo de wrapping”, e esse tempo é fortemente dependente da forma e tamanho da nanopartícula. Existem diferentes modelos teóricos desenvolvidos para se encontrar o t_w , inclusive para diferentes geometrias das nanopartículas [18; 25; 26; 27]. Logo, para o estudo do tempo de wrapping consideramos que as nanopartículas estão sendo internalizadas.

Segundo estudos realizados por Lunov o termo t_w pode ser estimado usando a seguinte equação

$$t_w = \left(\frac{L}{a}\right)^2 \frac{1}{N_{sat}} t_{cap}. \quad (4.5)$$

onde L é o tamanho médio do cardiomiócito, enquanto a refere-se a um comprimento efetivo de captura. No nosso caso assumimos o tamanho típico de lisossomas contendo nanopartículas sendo endocitadas pelas células [4], ou seja, a entre 0,2 e 0,3 μm . O tempo de captura e o número de saturação de nanopartículas endocitadas foram obtidos na análise teórica dos dados experimentais (vide Tabela 4.8).

Tabela -4.7– Valores de t_w para as condições do nosso sistema.

	D (nm)	Comprimento do cardiomiócito, L (μm)	N_{cap} ($*10^6$)	t_{cap} (seg)	t_w (seg) a=0,2	t_w (seg) a=0,3
Citrato	13	117,4	2,0	4,0	42	18
Iônico	16	107,7	5,5	12	36	18
Fosfato	33	151,6	0,3	14	1.608	714

Logo, usando os dados apresentados na Tabela 4.6 podem-se estimar os valores de t_w considerando a entre 0,2-0,3. Como podemos observar na tabela acima o tempo de wrapping para a nanopartícula recoberta com citrato, carga superficial negativa, cujo diâmetro das nanopartículas é 13 nm, varia entre 18 e 42 segundos; para a nanopartícula provinda do fluido magnético iônico (D=16 nm), carga positiva, varia entre 18 e 36 s;

enquanto que para nanopartículas recobertas com moléculas de fosfato ($D=33$ nm), carga negativa, o t_w está entre 714 e 1.608 s.

Primeiramente, foi comparado o efeito do diâmetro com nanopartículas que possuem uma densidade de carga superficial negativa, ou seja, são elas: as nanopartículas recobertas com citrato e as com fosfato. A diferença básica entre as mesmas é o seu diâmetro. Observou-se, uma grande variação dos tempos de wrapping entre estas nanopartículas. Nossas estimativas discordam dos valores estimados por Zablotskii [27] e Lunov [25] cujo t_w seria da ordem de 10^{-2} s. Entretanto, concorda com o modelo teórico Decuzzi e Ferrari [18] com t_w de 35 s para uma nanopartícula com 14 nm (resultado semelhante foi estimado por Gao et al. [27], $t_w = 14$ s). Enquanto que para um diâmetro maior, 33 nm, estimaram um valor de t_w próximo a 650 s. Um dos resultados deste artigo está sendo apresentado na Figura 4.17. O parâmetro F diz respeito a um termo de interação entre nanopartículas e a superfície celular. Neste, F crescendo indica uma maior repulsão entre as moléculas da nanopartícula e a membrana, enquanto diminuindo indica o contrário.

Podemos, agora, então entender porque o tempo de wrapping não aumentou para a nanopartícula com 16 nm quando comparada à recoberta com citrato de 13 nm. Na nanopartícula com menor diâmetro a carga é negativa e interage (no que diz respeito a interação eletrostática) de forma repulsiva com a membrana, enquanto que a iônica apresenta carga superficial positiva, portanto maior afinidade com a membrana. De acordo com Decuzzi e Ferrari em seu modelo teórico a nanopartícula iônica deveria possuir um F menor do que a recoberta com citrato. Logo, foram analisados dois efeitos. Primeiramente, aumentando o diâmetro, aumenta-se o tempo de wrapping. Em segundo, alterando a carga de negativa para positiva diminui-se F , o que diminui o tempo de

wrapping. Logo, o fato da ordem de grandeza ser semelhante entre essas nanopartículas pode ser entendido como um efeito combinado destes dois parâmetros.

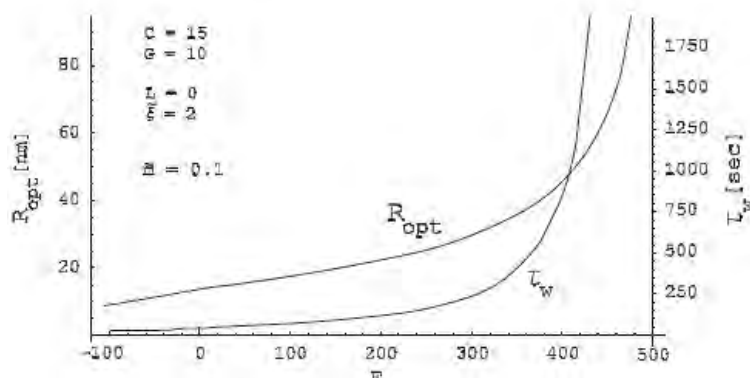


Figura 4.16 - Diâmetro da nanopartícula e o tempo de wrapping correspondente como função de um parâmetro não-específico F [18].

Essa informação juntamente com as demais anteriormente citadas formula todo o modelo de internalização de nanopartículas por cardiomiócitos. Ou seja, foi evidenciado, aqui utilizando a técnica de magnetoforese, que as nanopartículas são endocitadas/adsorvidas e posteriormente exocitadas/dessorvidas. Além disso, foi evidenciado que este processo é fortemente dependente do diâmetro das nanopartículas e sua densidade de carga superficial. Esta, por sua vez pode ser controlada alterando a quantidade de moléculas adsorvidas na superfície das nanopartículas ou por moléculas com diferentes grupos funcionais. A explicação teórica para os presentes resultados experimentais corrobora com o modelo teórico de Decuzzi e Ferrari [17].

5 CONCLUSÕES

O fluido magnético à base de magnetita recobertas com moléculas de citrato foi sintetizado pelo método de coprecipitação. As amostras foram caracterizadas por Difração de Raio-X (DRX), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM). A técnica de Difração de Raios-X permitiu estimar o diâmetro das nanopartículas e ainda mostrou que as mesmas possuíam baixa cristalinidade. A partir da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) foi possível obter que o diâmetro hidrodinâmico, a polidispersão das nanoestruturas na suspensão coloidal (PDI) e o potencial zeta. Foi demonstrado, como esperado, que estes parâmetros são fortemente dependentes do recobrimento molecular na superfície das nanopartículas.

Por outro lado, a função cardíaca foi avaliada por meio da técnica de coração isolado, técnica de Langendorff com fluxo constante, aonde foi verificado que o fluido magnético foi capaz de promover alterações na contratilidade cardíaca gerando ligeiro aumento da pressão intraventricular diastólica e diminuição da pressão intraventricular sistólica. Este efeito não foi reversível no período de lavagem. O aumento da pressão de perfusão foi verificado tanto para os animais sob tratamento quanto para os animais controle. Logo, concluímos que não houve efeito significativo neste parâmetro.

Nanopartículas magnéticas foram confirmadas em amostras de coração isolado (perfundidos com fluido magnético e posteriormente lavados) utilizando a técnica de magnetometria de amostra vibrante. Esse experimento nos mostrou que há uma quantidade residual de nanopartículas nos corações da ordem de 10^{12} nanopartículas por grama do órgão.

Para avaliar o efeito das nanopartículas nos parâmetros cardiovasculares *in vivo*, artéria e veia femorais foram canuladas e o registro da pressão arterial e frequência

cardíaca foi realizado após 24 hs. A infusão das nanopartículas magnéticas não promoveu alterações significativas na pressão arterial ou frequência cardíaca. Estes resultados sugerem a viabilidade para a utilização clínica das nanopartículas magnéticas.

Foram realizados experimentos utilizando a técnica de magnetoforese a fim de verificar a interação entre as nanopartículas magnéticas e cardiomiócitos dissociados de corações de ratos wistar. Os experimentos foram realizados com nanopartículas contendo três diferentes tamanhos e camadas de cobertura. A velocidade magnetoforética obtida nos experimentos mostra inicialmente um aumento em função do tempo de incubação e a partir de um tempo crítico o oposto é observado. Como a velocidade magnetoforética depende da quantidade de nanopartículas internalizadas/adsorvidas pela célula, pode-se concluir que verificamos dois processos dependendo do tempo de incubação: inicialmente endocitose/adsorção e posteriormente exocitose/dessorção de nanopartículas.

O resultado do número de nanopartículas internalizadas pelos cardiomiócitos em função do diâmetro das nanopartículas para diferentes tempos de incubação mostra que nanopartículas menores são internalizadas mais rapidamente pela célula que as nanopartículas maiores. Por outro lado, a partir de um determinado tempo de incubação, observamos que existe um diâmetro ótimo para a internalização das nanopartículas. Tais resultados concordam com outros, teóricos e experimentais, encontrados na literatura.

O número de nanopartículas internalizadas pela célula foi da ordem de 10^6 . Enquanto a quantidade de massa da nanopartículas presente em cada célula para o nosso sistema foi da ordem de picogramas por célula. Estes valores são semelhantes a outros encontrados na literatura via diferentes técnicas (apesar destes estudos serem entre nanopartículas com outras dimensões interagindo com distintas linhagens celulares).

Um modelo matemático que descreve a dinâmica de internalização das nanopartículas pelos cardiomiócitos, mecanismos endocitóticos/adsortivos e exocitóticos/dessortivos, foi desenvolvido. Esse modelo permitiu estimar os parâmetros relevantes no processo de internalização, já que apresentou-se em excelente concordância com os dados obtidos experimentalmente.

Utilizando este modelo teórico e outro da literatura foi possível estimar o tempo de “wrapping” (t_w), tempo necessário para endocitar uma única nanopartícula. Foram obtidos diferentes valores de t_w para cada nanopartícula, sendo fortemente dependentes do diâmetro de cada nanopartícula e da sua camada de cobertura. Tais resultados corroboram com modelos teóricos (recentemente publicados) de endocitose de nanopartículas mediadas por receptores.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas, é possível enfatizar, primeiramente, novos experimentos de coração isolado e de medida de frequência cardíaca e pressão arterial com nanopartículas à base de diferentes ferritas além de diâmetros e camadas de cobertura distintas. Pode-se, ainda, avaliar, os efeitos de diferentes concentrações de nanopartículas a serem perfundidas.

Podem ser sugeridos também novos experimentos de magnetoforese com o intuito de investigar de forma detalhada os efeitos com diferentes tempos de incubação, diâmetro das nanopartículas, camadas de cobertura (incluindo aqui o número de moléculas adsorvidas), e ainda nanopartículas magnéticas constituídas por outras ferritas.

Uma análise por microscopia eletrônica de transmissão nos auxiliaria a compreender os efeitos observados nos experimentos de coração isolado visto que esta técnica pode nos esclarecer se as nanopartículas encontram-se adsorvidas a superfície da membrana ou se foram internalizadas pelos cardiomiócitos.

Outro experimento interessante é aquele que mede o potencial de membrana da célula quando a mesma está na presença das nanopartículas magnéticas. Aqui a investigação de efeitos de concentração de nanopartículas e diâmetro das mesmas podem ser cruciais, assim como a avaliação de que, e se, canais iônicos podem ser influenciados pela presença das nanopartículas.

Uma vez observado, entendido e controlado o número de nanopartículas magnéticas internalizadas nestas células, pode-se pensar em realizar experimentos de vetorização para regiões pré-determinadas desses cardiomiócitos magnéticos mediados por força magnética. Os mesmos experimentos poderiam ser feitos em células-tronco antes de serem diferenciadas e quando estimuladas para tal.

I. APÊNDICE A – FUNCIONAMENTO DO CORAÇÃO

A função básica do sistema circulatório é a de levar material nutritivo e oxigênio as células. Este sistema é constituído por vasos arteriais e venosos, onde circula o sangue e vasos linfáticos, onde a linfa é formada. O coração, é um órgão muscular, e funciona como uma bomba contrátil-propulsora, responsável por promover a circulação sanguínea. As trocas entre o sangue e os tecidos ocorrem em extensas redes de vasos de calibre reduzido e de paredes muito finas – os capilares [29].

O coração é formado por quatro câmaras, dois átrios e dois ventrículos. Os átrios funcionam como bombas de escorva que forçam a passagem de sangue adicional para os ventrículos, antes que ocorra a contração ventricular. O ventrículo direito bombeia o sangue para os pulmões e o ventrículo esquerdo, para todas as outras partes do corpo. Os ventrículos contraem com grande força bombeando o sangue para os pulmões ou para a circulação sistêmica, portanto, os ventrículos são chamados *bombas de força* (ou *de potência*) [28]. A Figura I.1 abaixo apresenta um esquema do sistema circulatório e as câmaras do coração.

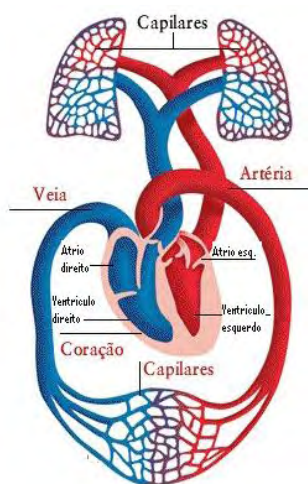


Figura I 1 - Ilustração do sistema circulatório e das câmaras cardíacas de mamíferos [30].

A bomba cardíaca funciona da seguinte forma: o sangue ao atingir o átrio direito, trazido pelas grandes veias, passa pela válvula tricúspide enchendo o ventrículo

direito. O ventrículo direito bombeia o sangue através da válvula pulmonar para a artéria pulmonar e, daí para os pulmões e, finalmente, pelas veias pulmonares, para o átrio esquerdo. Posteriormente o sangue passa pela válvula mitral para o ventrículo esquerdo, de onde, passando pela válvula aórtica, atinge a aorta e conseqüentemente, toda a circulação sistêmica. A Figura I.2 abaixo apresenta uma ilustração do coração juntamente com os vasos sanguíneos que o compõem.

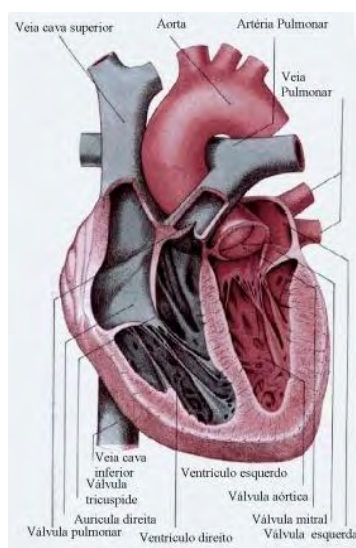


Figura I 2- Ilustração do coração com os vasos sanguíneos responsáveis pela circulação sanguínea [31].

O tecido muscular que forma o coração é de tipo especial – tecido muscular estriado cardíaco. O músculo cardíaco é bastante semelhante ao esquelético, mas possui duas características que o tornam muito adaptado a ação bombeadora do coração. Primeira, as *fibras do músculo cardíaco são interconectadas* entre si, de modo que um potencial de ação com origem em qualquer ponto da massa muscular pode se propagar por toda a sua extensão e fazer com que toda a massa contraia a um só tempo. Isso permite que o músculo cardíaco da parede de cada uma das câmaras contraia ao mesmo tempo e, portanto, empurre o sangue à diante. Segunda, o *potencial de ação do músculo cardíaco dura por cerca de três décimos de segundo*, o que é dez ou mais vezes maior que o potencial de ação da maioria dos músculos esqueléticos [28].

Corações de animais de sangue quente quando isolados, retirados do corpo do animal, continuam a contrair-se ritmicamente durante algum tempo, desde que colocados em uma solução líquida especial substitutiva do sangue. A essa propriedade deu-se o nome de **automatismo cardíaco**.

Este automatismo é decorrente da atividade do nódulo (ou nó) sino-atrial, considerado como o marca-passos do coração. Daí, ritmicamente, o impulso espalha-se ao miocárdio, resultando na contração. O impulso originado no nó sino-atrial se propaga nos átrios e chega ao nó átrio-ventricular, localizado na porção inferior do septo interatrial e posteriormente aos ventrículos através do feixe átrio-ventricular. Este, ao nível da porção superior do septo interventricular, emite os ramos direito e esquerdo, e assim, o estímulo alcança o miocárdio dos ventrículos. Ao conjunto destas estruturas de tecido especial é dada a denominação de sistema de condução [29]. O controle da atividade cardíaca é feito primordialmente pelo Sistema Nervoso Autônomo, por meio do parassimpático (atua inibindo) e do simpático (atua estimulando).

II. APÊNDICE B – COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS

A solução Cell Isolation Buffer (CIB) utilizada na dissociação dos cardiomiócitos é composta por

Tabela II. 1–Composição do CIB .

Composto	Concentração (mM)
NaCl	130
KCl	5,4
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,5
NaH ₂ PO ₄	0,33
Glicose	22
HEPES	25
EGTA	0,4
Insulina	0,00005

A solução de Tyrode utilizada na dissociação dos cardiomiócitos é composta por

Tabela II. 2–Composição do Tyrode.

Composto	Concentração (mM)
NaCl	140
KCl	5,4
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,5
NaH ₂ PO ₄	0,33
Glicose	11
HEPES	5
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Sosnovik, D. E.;Nahrendorf, M.; Weissleder, R., Molecular Resonance Imaging in Cardiovascular Medicine, *AHA Circulation*, v.115, p.2076-2086, 2007.
- [2] Weissleder, R. *et al* . An X-ray computed tomography imaging agent based on long-circulating bismuth sulphide nanoparticles, *Nature Materials*, v.5, p.118 – 122, 2006.
- [3] Pankhurst, Q. A. *et al*. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *Journal of Physics D-Applied Physics*, v.36, p. R167-R181, 2003.
- [4] Ivkov, R., Nearly complete regression of tumors via collective behaviour of magnetic nanoparticles in hyperthermia, *Nanotechnology*, v. 20, 2009.
- [5] Jordan, A. *Et al*. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticle, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.201, p. 413-419, 1999.
- [6] Jordan, A. *Et al*. Inductive heating of ferromagnetic particles and magnetic fluids – Physical evaluation of their potential for hyperthermia, *International Journal of Hyperthermia*, v. 9, p.51-68, 1993.
- [7] Levy, J. R. *et al*. High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents, *PNAS*, v. 105, n. 2, p.687-703, 2008.
- [8] Weissleder, R. *et al*. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells, *Nature Biotechnology*, v. 18, p.410-414, 2000.
- [9] Berman, S. M. C.;Walczak, P.;Bulte,J. W. M.,Tracking stem cells using magnetic nanoparticles, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 03, p.343-355, 2011.
- [10] Shioya, T.,A Simple Technique for Isolating Healthy Heart Cells from Mouse Models, *The Journal of Physiological Sciences*, v. 57, n. 6, p. 327-335, 2007.

-
- [11] Duran, N.; Mattoso, L.H.C.; Morais, P.C..Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicações, Artliber Editora, São Paulo, 2006.
- [12] Pappel, S. S., Low Viscosity Magnetic Fluid Obtained by the Colloidal Suspension of Magnetic Particles, US Patent 3, 215, 572, 1965.
- [13] Silva, G.A. Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges,*Nature reviews Neuroscience*,v.07, p.65 2006.
- [14] Decuzzi, P.; Ferrari, M., Design maps for nanoparticles targeting the diseased microvasculature, *Biomaterials*, v.29, p. 377-384, 2008.
- [15] Ferrari, M. *et al.* Intravascular Delivery of Particulate: Does Geometry Really Matter?,*Pharmaceutical Research*, Vol. 26, No 1, p. 235-243, 2009.
- [16] DeSimone, J. M. et al.The effect of particle design on cellular internalization pathways, *PNAS*, v. 105, n. 33, p. 11613-11618, 2008.
- [17] Decuzzi, P.; Ferrari, M., The role of specific and non-specific interactions in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles, *Biomaterials*, v.28, p.2915-2922, 2007.
- [18] Decuzzi, P.; Ferrari, M.,The Receptor-Mediated Endocytosis of Nonspherical Particles, *Biophysical Journal*, v.94, p.3790-3797, 2008.
- [19] Chae, K. et al.The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles.*Biomaterials*, v.32, p.9401-9414, 2011.
- [20] Foner, S. The vibrating sample magnetometer – experiences of a volunteer.*J. Appl. Phys.*,v.79, p.4740, 1996.
- [21] Guimarães A.P.,Magnetism and Magnetic Resonance in Solids, John Wiley & Sons, Inc., New York, Primeira Edição, 1988.
- [22] Stampfl, A., et al. Langendorff heart: a model system to study cardiovascular effects of engineered nanoparticles, *ACS Nano*, v.5, n.7, p.5345-5353, 2011.

-
- [23] Chithrani, B. D.; Chan, W. C. W., Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes, *Nano Letters*, v.7(6), p.1542-1550; 2007.
- [24] Li, X. Size and shape effects on receptor-mediated endocytosis of nanoparticles, *Journal of Applied Physics*, v.111, p.024702-1, 2012.
- [25] Lunov, O. et al. Modeling receptor-mediated endocytosis of polymer-functionalized iron oxide nanoparticles by human macrophages, *Biomaterials*, v.32, p.547-555, 2011.
- [26] Zaboltskii, V. et al. Nanomechanics of magnetically driven cellular endocytosis, *APPLIED PHYSICS LETTERS*, v.99, p.183701, 2011.
- [27] Gao, H.; Shi, W.; Freund, L. B., Mechanics of receptor-mediated endocytosis, *PNAS*, v.102, n.27, p.9469-9474, 2005.
- [28] Guyton, A. C., *Fisiologia Humana*, Editora Guanabara LV, São Paulo, sexta edição, 1988.
- [29] Dangelo, J. G.; Fattini, C. A., *Anatomia Básica dos Sistemas Orgânicos*, Editora Atheneu Rio, Rio de Janeiro, terceira edição, 2002.
- [31] <<http://biofis.hd1.com.br/SistCirculatorio.html>>. Acessado em 21 de abril de 2012.
- [32] <<http://www.infoescola.com/biologia/sistema-circulatorio/>>. Acessado em 21 de abril de 2012.