

Caracterização de nanopartículas Fe_3O_4 funcionalizadas com óleo essencial de Croton cajucara Benth como plataforma para aplicações em biomedicina

J. J. ATOCHE-MEDRANO

F. H. ARAGÓN

J. A. H. COAQUIRA

Núcleo de Física aplicada, Universidade de Brasília, Brasília DF 70910-990, Brasil.

Abstract

Nesse trabalho foi obtido nanopartículas de magnetita usando o método de decomposição térmica, posteriormente foram funcionalizadas com óleo essencial de Croton cajucara Benth, sendo esta espécie conhecida pelas propriedades gastroprotetoras, podendo de essa forma o sistema ser candidato como plataforma para aplicações em biomedicina. Difração de raios-x foi usado para caracterizar o tamanho do cristalito, obtendo-se um tamanho ~ 10.1 nm com elevada cristalinidade sem evidencia de outras fases cristalinas além da magnetita (Fe_3O_4), o ajuste usando refinamento Rietveld evidenciou uma boa concordância com a magnetita. A morfologia e tamanho das nanopartículas funcionalizadas foram realizadas usando microscopia eletrônica de transmissão (MET), os resultados mostraram, forma esférica e tamanho ~ 14 nm com baixa polidispersão ($\sigma \sim 0.3$) para amostra com dupla cobertura orgânica. As medidas da magnetização em função do campo magnético mostrou um comportamento superparamagnético a 300 K para as amostras funcionalizadas. O efeito observado a partir do recobrimento com óleo essencial sobre as nanopartículas mostrou uma diminuição nas interações entre partículas, segundo os resultados ZFC (Zero field cooled) e FC (Field cooled), onde o sistema funcionalizado mostrou uma temperatura de bloqueio menor (T_b) ~ 35 K quando comparado ao sistema sem óleo essencial (T_b) ~ 215 K. Finalmente foram realizados ensaios para teste de viabilidade celular in vitro usando fibroblastos (NIH/3T3) com linhagem celular, para avaliar o efeito citotóxico do sistema funcionalizado, os resultados mostraram que a partir de um valor menor a 2.5 mg/mL se incrementou a viabilidade celular, o que sugere um valor adequado para realizar outros ensaios complementares para aplicações em biomedicina.

Palavras-Chave: Nanopartículas magnetita, caracterização magnética, ensaio in vitro.

1 Introdução

Atualmente o uso de materiais magnéticos biocompatíveis tem sido de grande interesse pelas diversas potenciais aplicações em biomedicina, como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética (IMR) 1, entrega de fármacos em sítios alvo (drug delivery) 2, ou hipertermia magnética 3. Após obter as

nanopartículas existem diversos materiais orgânicos que podem ser usados para recobrir as nanopartículas, como dextran, quitosana ou óleos essenciais 4 . Croton cajucara Benth (CCB) é uma planta da parte norte do Brasil que é comumente usada para tratamento de distúrbios gástricos. 5 . Nesse trabalho, foram obtidas nanopartículas de magnetita com reduzido tamanho, para serem usadas como carregador de óleo essencial de CCB visando possível tratamento em biomedicina, usando campo magnético externo para aproveitar as propriedades de superparamagnetismo das nanopartículas funcionalizadas.

2 Materiais e Métodos

Nanopartículas de magnetita foram obtidas usando uma variação da rota por decomposição térmica [6]. O óleo essencial foi obtido a partir das folhas de CCB usando método de hidrodestilação [7]. Foram usadas duas amostras: a primeira amostra foi obtida após finalizar o processo de Síntese chamada M1. Posteriormente foi adicionado sobre uma parte da primeira amostra o óleo essencial para finalmente obter a segunda amostra M2. A caracterização estrutural foi feita usando um difratômetro (Bruker, modelo D8 Advance) com uma fonte Cu $k\alpha$ e ângulo de varredura $20^\circ - 80^\circ (2\theta)$, com velocidade $0.5^\circ/\text{min}$ e passo 0.05° . A caracterização morfológica e tamanho das duas amostras foram realizadas usando MET usando um microscópio JEOL modelo 1011 operando a 80 kV. A partir das imagens obtidas foram contadas ~ 1200 nanopartículas usando o programa ImageJ, na construção dos histogramas foi usado uma distribuição log-normal, considerando uma seleção de classe mediante o método de Sturges [8].

A caracterização magnética das duas amostras foi realizada usando um dispositivo supercondutor de interferência quântica (SQUID) modelo MPMS3. O ensaio de viabilidade celular (MTT) foi realizado para avaliar a citotoxicidade, visando possíveis aplicações biomédicas do sistema funcionalizado. Para isso foi usado uma concentração inicial de 50 mg/mL de amostra M2. O revestimento foi feito numa placa de 96 poços contendo cada poço $100\mu\text{L}$ de meio de cultura e a linha de células de fibroblasto 5×10^3 NIH/3T3 incubadas durante 24 horas. Uma diluição em série (10 vezes) foi preparada a partir da concentração inicial para M2, Control-CTRL (solução salina), controle Tween 20 - CTRL TWEEN (usado para auxiliar na diluição do sistema no meio de cultura).

3 Resultados e discussão

Analises estruturais

A figura 1 mostra o espectro de difração de raios-x (DRX) da amostra M1, a partir do espectro foi identificado a fase cristalina da magnetita, a mesma que está em concordância com os dados do JCPDS (card no. 01-088-0315), onde pode ser observado que não existe presença de outra fase cristalina. O padrão de DRX foi refinado usando método de Rietveld, usando a interface GSAS (General Structure Analysis System)

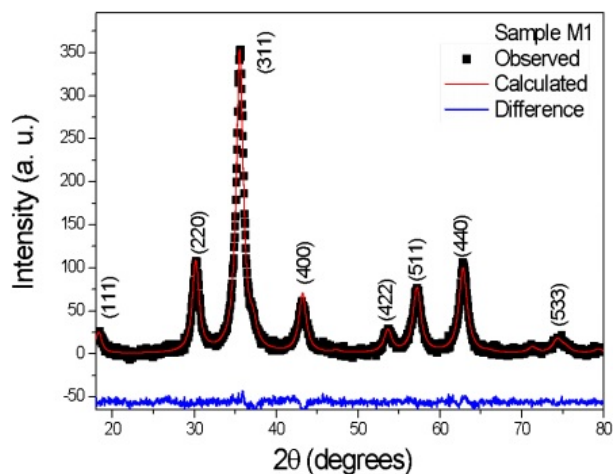


Figure 1: Difratoograma da amostra M1 a temperatura ambiente. Os pontos representam a medida experimental, a linha vermelha continua representa o valor calculado e a linha azul a diferença entre esses valores.

O valor do tamanho do cristalito usando a equação de Debye-Scherrer [9] foi de $\langle D \rangle_{XRD} = 10.1 \pm 0.3$ nm.

Analises morfológicas

Na figura 2 a) e b) é mostrado a micrografia das amostras M1 e M2 junto com as distribuições de tamanho.

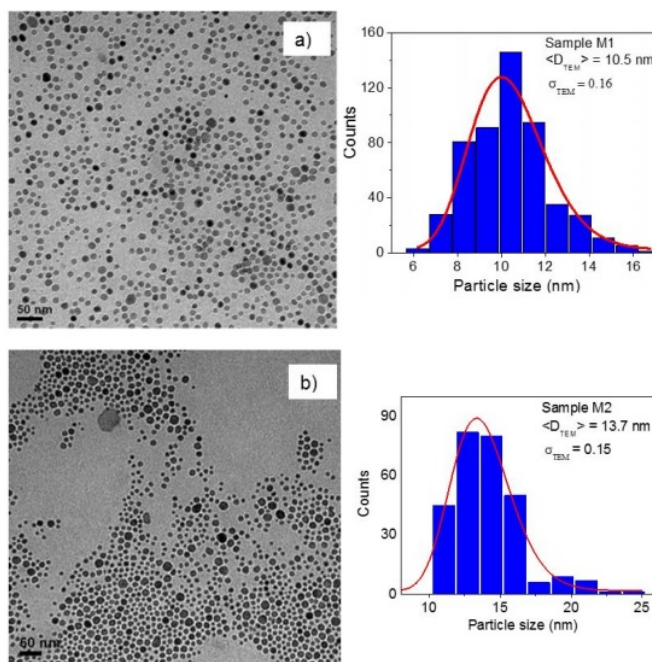


Figure 2: a) Micrografia das nanopartículas de magnetita recobertas com ácido oleico (OA) M1; b) micrografia das nanopartículas recobertas com OA e adicionalmente recobertas com óleo essencial (EO) M2.

Os diâmetros médios obtidos para M1 foi de 10.5 ± 0.1 nm com polidispersão (σ) = 0.16, enquanto

que para a amostra M2 foi de 13.7 ± 0.3 nm, com polidispersão (σ) = 0.15. Esses valores de polidispersão baixos sugerem uma distribuição de tamanho monodispersa, possivelmente relacionada à rota de síntese usada [10]. O incremento do tamanho da amostra M2 seria consequência do recobrimento adicional com o EO. Os valores encontrados para as amostras M1 e M2 evidenciam uma boa concordância com os valores obtidos a partir de DRX, sugerindo ausência da chamada camada morta na superfície cristalina, que é usual quando usado outra rota de sínteses como por exemplo a Co-precipitação química [11].

Propriedades magnéticas

Figura 3 a) e b) apresenta curvas de magnetização em função do campo magnético (curva de histerese), para um rango de ± 70 kOe, para 300 K e 5 K. Nas figuras inseridas é mostrado com maior detalhe as curvas de histerese, a partir dos resultados para ambos casos, um comportamento superparamagnético é evidenciado, o que está em concordância para partículas com valores menores a 30 nm a temperatura ambiente [12].

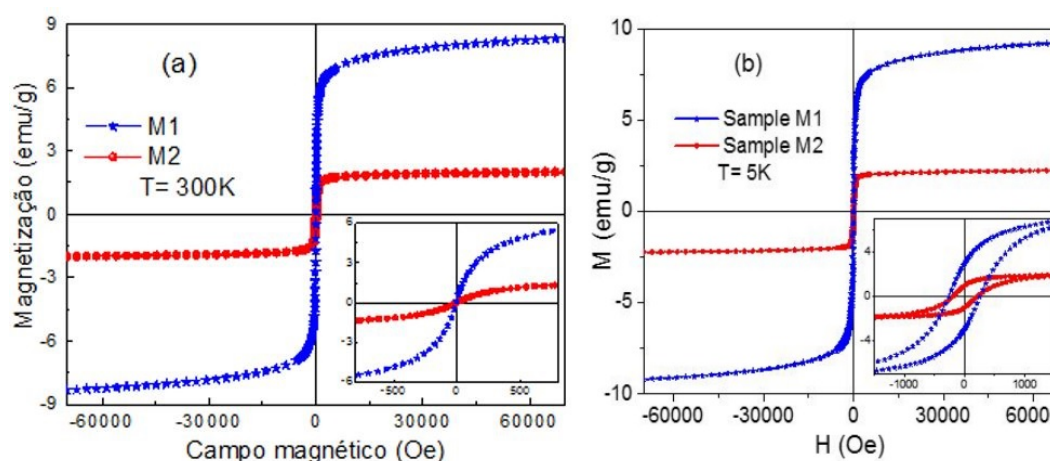


Figure 3: Curvas de histerese a) 300 K e b) 5 K das nanopartículas de magnetita recobertas com AO (M1) e OA com recobrimento adicional de EO (M2).

A Figura 4 mostra as (ZFC) e (FC) das amostras M1 e M2 mostrando uma transição evidente do estado bloqueado para o superparamagnético em torno da temperatura média de bloqueio (T_B), que está relacionada ao ponto máximo da curva ZFC. No entanto, as duas amostras mostram um comportamento de relaxamento térmico bastante diferente do momento magnético, com o máximo da curva ZFC deslizando para baixo de ~ 210 K para ~ 35 K, enquanto foi adicionado EO como segunda camada. Similares resultados referidos à diminuição dos valores de T_B após a funcionalização de nanopartículas com surfactantes orgânicos já foi relatada na literatura [13]. A partir do diâmetro obtido a partir da micrografia para a amostra M2 e a relação para a temperatura de bloqueio $T_B = \frac{K_{EFF}V}{25k_B}$ onde K_{EFF} é a constante de anisotropia efetiva, V é o volume das nanopartículas, e k_B é a constante de Boltzmann, o valor de $T_B \sim 30$ K foi estimado para sistema sem interação, aleatoriamente orientado e forma esférica, que estão em concordância com os valores encontrados para as curvas ZFC associadas à amostra M2. De outro lado a amostra M1 mostrou uma temperatura $T_B \sim 210$ K o que estaria associada com uma forte interação entre as partículas, quando comparadas à amostra M2 (~ 30 K). Além disso, a chamada temperatura irreversível

(T_{IRR}), definida como a temperatura onde as curvas FC e ZFC se juntam enquanto o sistema é aquecido de temperaturas mais baixas a altas, é diferente para as amostras (M1 e M2), passando de quase zero para a amostra M1 até ~ 215 K para a amostra M2. Essas características descritas acima, sugerem que para a amostra M1 as nanopartículas se encontram mais próximas umas de outras, enquanto que para a amostra M2 as partículas se encontram mais afastadas umas das outras devido ao recobrimento adicional. Porém, parece que ocorreu um recobrimento não homogêneo, em vez de homogêneo, das moléculas de OA por moléculas de OE ao realizar o segundo revestimento. Essa hipótese poderia ser sustentada pela mudança de TB em relação ao T_{IRR} observado na amostra M2.

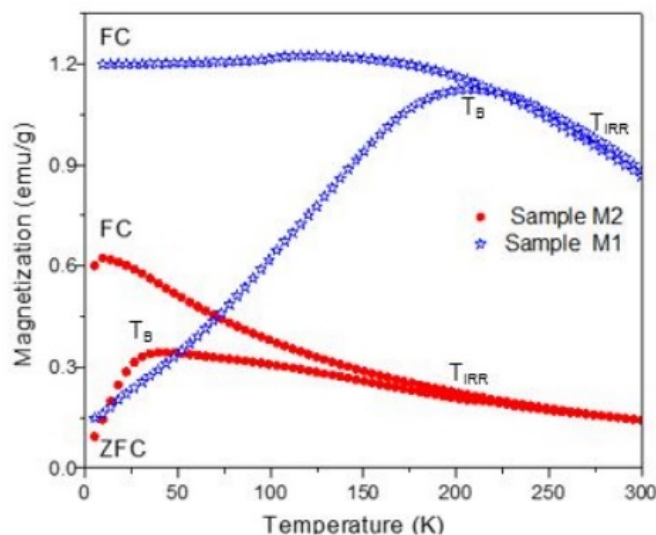


Figure 4: Medidas de magnetização em função da temperatura, ZFC and FC, das amostras M1 e M2. O campo usado durante as a medida foi de 30 Oe.

Viabilidade celular

A figura 5 mostrou que a partir da quinta diluição a viabilidade celular aumentou em relação às primeiras diluições (com maior concentração de nanopartículas), sugerindo que o sistema M2 da concentração de 2.5 mg/mL apresentaria baixa toxicidade em Células NIH/3T3. Outros ensaios in vitro são necessários usando outras concentrações e outras linhas celulares para complementar os resultados do sistema.

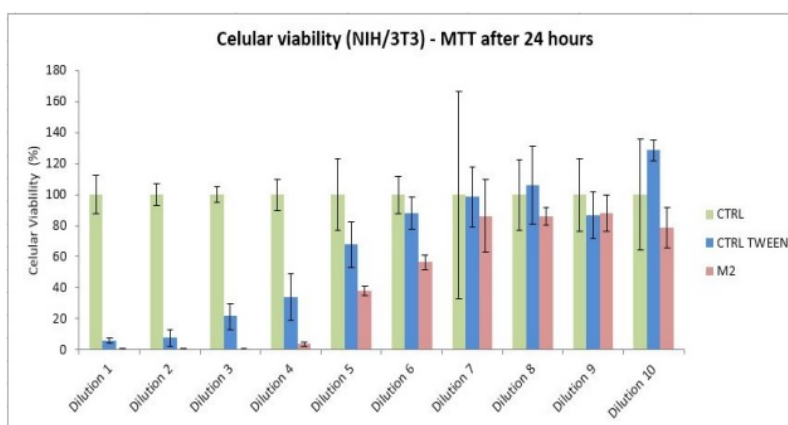


Figure 5: Ensaio MTT para a amostra M2, mostrando aumento da viabilidade celular abaixo da 5ª diluição.

4 Conclusões

Nanopartículas de magnetita monodispersas com diâmetro médio de $\sim 10\text{nm}$ foram sintetizadas com sucesso e revestidas com ácido oleico (amostra M1) e óleo oleico mais óleo essencial (amostra M2). A amostra M1 foi obtida usando uma rota de decomposição térmica, enquanto a amostra M2 foi produzida a partir da amostra M1 tratando esta última com óleo essencial. A análise usando DRX evidenciou a presença da magnetita, usando TEM foi obtido tamanho de 10.5 nm para M1 e 13.7 nm para M2, os valores estão em concordância respeito do tamanho do cristalito obtido por DRX. As medidas magnéticas evidenciaram que foi reduzido assim drasticamente a interação partículas-partículas para a amostra M2, conforme confirmado pelo seu menor valor de temperatura de bloqueio ($T_B = 35\text{ K}$) avaliado a partir de uma medida ZFC. Encontramos o valor da T_B experimental da amostra M2 muito próximo do valor estimado a partir da relação clássica $T_B = \frac{K_{EFF}V}{25k_B}$ ($\sim 30\text{ K}$), que explica as nanopartículas magnéticas que não interagem. Diferentemente, o maior valor de T_B ($\sim 210\text{ K}$) que encontramos na amostra M1 sugere uma forte interação partículas-partículas atribuída tanto à magnetização de saturação mais elevada quanto à única camada de revestimento superficial. De fato, nossos resultados revelam uma combinação única de propriedades térmicas e magnéticas da amostra M2, sugerindo sua aplicação em biomedicina a partir do resultado de viabilidade celular (MTT), para o fornecimento de óleo essencial usando magneto-hipertermia.

5 Agradecimentos

À CAPES, pelo apoio financeiro concedido. Ao laboratório de Geofísica da Unb, pelas medidas de DRX. Ao laboratório da Biologia, pelas medidas MET. À Dra. Graziela Joanitti e ao Mg. Henrique Loback, do Instituto da Biologia, pelo apoio na realização do ensaio MTT.

6 Referências bibliográficas

- [1] AMIRI, S.; SHOKROLLAHI, H. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, n. 1, p. 1-8, 2013.
- [2] CHOWDHURI, A. R.; BHATTACHARYA, D.; SAHU, S. K. Magnetic nanoscale metal organic frameworks for potential targeted anticancer drug delivery, imaging and as an MRI contrast agent. *Dalton Transactions*, v. 45, n. 7, p. 2963-2973, 2016.
- [3] WABLER, M.; ZHU, W.; HEDAYATI, M.; ATTALURI, A.; ZHOU, H.; MIHALIC, J.; GEYH, A.; DEWEESE, T. L.; IVKOV, R.; ARTEMOV, D. Magnetic resonance imaging contrast of iron oxide nanoparticles developed for hyperthermia is dominated by iron content. *International Journal of Hyperthermia*, v. 30, n. 3, p. 192-200, 2014.
- [4] MIHAI GRUMEZESCU, A. Essential oils and nanotechnology for combating microbial biofilms. *Current Organic Chemistry*, v. 17, n. 2, p. 90-96, 2013.
- [5] HIRUMA-LIMA, C. A.; TOMA, W.; DE SOUZA GRACIOSO, J.; DE ALMEIDA, A. B. A.; BATISTA, L. M.; MAGRI, L.; DE PAULA, A. C. B.; SOARES, F. R.; NUNES, D. S.; BRITO, A. R. M. S. Natural trans-crotonin: The antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 25, n. 4, p. 452-456, 2002.
- [6] SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D. B.; RAOUX, S.; RICE, P. M.; WANG, S. X.; LI, G. Monodisperse $m\text{Fe}_2\text{O}_4$ ($m = \text{Fe}, \text{Co}, \text{Mn}$) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, n. 1, p. 273-279, 2004.
- [7] BOUTEKEDJIRET, C.; BENTAHAR, F.; BELABBES, R.; BESSIERE, J. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 18, n. 6, p. 481-484, 2003.
- [8] LIANG, J.; DU, N.; SONG, S.; HOU, W. Magnetic demulsification of diluted crude oil-in-water nanoemulsions using oleic acid-coated magnetite nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 466, p. 197-202, 2015.
- [9] CULLITY, B. *Elements of X-ray Diffraction*. Addison and Wesley Publishing Company Inc. Reading, USA, p. 32-106, 1978.
- [10] PATSULA, V.; MOSKVIN, M.; DUTZ, S.; HORÁK, D. Size-dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 88, p. 24-30, 2016.
- [11] KIM, D. K.; MIKHAYLOVA, M.; ZHANG, Y.; MUHAMMED, M. Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry of Materials*, v. 15, n. 8, p. 1617-1627, 2003.
- [12] PRADHAN, P.; GIRI, J.; BANERJEE, R.; BELLARE, J.; BAHADUR, D. Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 311, n. 1, p. 208-215, 2007.
- [13] GUARDIA, P.; BATLLE-BRUGAL, B.; ROCA, A.; IGLESIAS, O.; MORALES, M.; SERNA, C.; LABARTA, A.; BATLLE, X. Surfactant effects in magnetite nanoparticles of controlled size. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 316, n. 2, p. e756-e759, 2007.