

5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A preparação dos materiais para serem utilizados como sistemas de liberação (DDS) e/ou carreadores em radiofármacos consistiu na síntese e caracterização de três materiais: SBA-15, SBA-15/HAP_1 e SBA-15/HAP_2. Dentre esses, dois tiveram hidroxiapatita (HAP) incorporada em suas estruturas por dois métodos diferentes. A hidroxiapatita foi sintetizada pelo método de via úmida através da reação entre sais de fosfato.

Posteriormente, os materiais foram marcados com o radioisótopo ^{99m}Tc e tiveram suas marcações e biodistribuições avaliadas.

A SBA-15 foi conjugada com o aptâmero Anti-MUC1 e sua toxicidade e reconhecimento pelas células do tipo MDA-MB 468 também foram avaliadas.

5.1. Síntese dos materiais

5.1.1. SBA-15

A sílica mesoporosa SBA-15 foi sintetizada utilizando-se procedimento similar ao reportado por Zhao, 2000 (Figura 10). Os reagentes utilizados na síntese foram: tetraetil ortosilicato (TEOS, Merck-Schuchardt, Mm: 208,33, CAS: 78-10-4) como fonte de sílica; e o surfactante copolímero pluronic P-123 [Poly(ethylene glycol)-*block*-poly(propylene glycol)-*block*-poly(ethylene glycol)] (Aldrich Chemicals, Mm=5800, CAS: 9003-11-6) como agente direcionador de estrutura.

Na síntese, 4,0 g do copolímero P-123 foram dissolvidos sob agitação numa solução contendo 30 g de água deionizada e 90 g de ácido clorídrico (HCl) 2M. Após a dissolução completa do copolímero P-123, 11,84 g de TEOS foram

adicionados lentamente à solução a 40°C sob agitação. Após 24 horas, o gel foi transferido para um recipiente de teflon hermeticamente fechado e aquecido em uma estufa a 100°C. Após 48 horas, o sólido foi resfriado a temperatura ambiente e lavado com água destilada três vezes, seguido de secagem a temperatura ambiente.

A amostra seca foi calcinada a 500°C por 10 horas, com taxa de aquecimento de 1°C/min com ar sintético numa vazão de 30 mL/min.

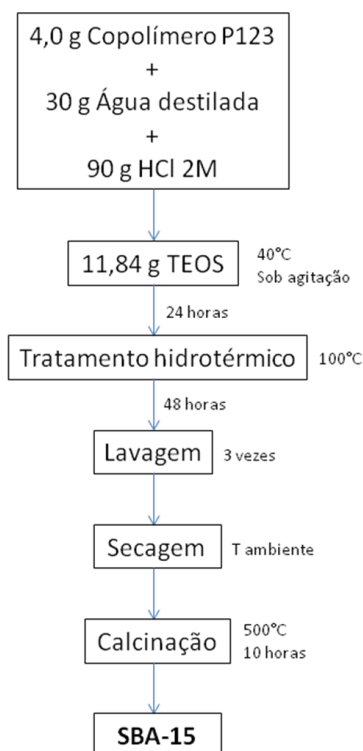


Figura 10 – Fluxograma da síntese da SBA-15.

5.1.2. SBA-15 impregnada com hidroxiapatita (SBA-15/HAP_1)

A SBA-15/HAP_1 foi sintetizada utilizando-se procedimento similar ao reportado por Díaz, 2006 (Figura 11). Os reagentes utilizados na síntese foram: tetraetil ortosilicato (TEOS, Merck-Schuchardt, Mm: 208,33, CAS: 78-10-4) como fonte de sílica; o copolímero pluronic P-123 [Poly(ethylene glycol)-*block*-poly(propylene glycol)-*block*-poly(ethylene glycol)] (Aldrich Chemicals, Mm=5800, CAS 9003-11-6) como agente direcionador de estrutura; cloreto de

cálcio anidro (CaCl_2 , Mm=110,98, CAS: 10043-52-4); fosfato de sódio dibásico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mm=178, CAS: 7558-79-4 / 7782-85-6) e hidróxido de amônio (NH_4OH , Mm=35, CAS: 1336-21-6) como precursores da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

A síntese foi realizada em duas etapas:

1. Preparação da matriz dopada com Ca

Na primeira etapa, 2,03 g do copolímero P-123 foram dissolvidos sob agitação numa solução contendo 15 g de água deionizada, 45 g de ácido clorídrico (HCl) 2M e 3,2 g de CaCl_2 . Após a dissolução completa do copolímero P-123, 6,0 g de TEOS foram adicionados lentamente à solução a 40°C sob agitação. Após 24 horas, o gel foi transferido para um recipiente de teflon hermeticamente fechado e aquecido em uma estufa a 80°C sem agitação. Após 24 horas, o sólido foi resfriado até a temperatura ambiente, e em seguida, seco na mesma temperatura.

2. Precipitação da hidroxiapatita no interior da matriz

Na segunda etapa, uma solução de 3,2 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ com 30 mL de água destilada foi adicionada lentamente sobre uma suspensão da matriz dopada com cálcio em 25 mL de água deionizada a temperatura ambiente sob agitação. O pH da solução foi ajustado para aproximadamente 10 com solução de NH_4OH . Após 2 horas de agitação, a mistura foi transferida para um recipiente de teflon hermeticamente fechado e aquecida em uma estufa a 80°C por 24 horas sem agitação. Após 24 horas, o sólido foi resfriado até temperatura ambiente e lavado com água destilada três vezes seguido de secagem em uma estufa a temperatura ambiente.

A amostra foi calcinada a 500°C por 10 horas, com taxa de aquecimento de 1°C/min com ar sintético numa vazão de 30 mL/min.

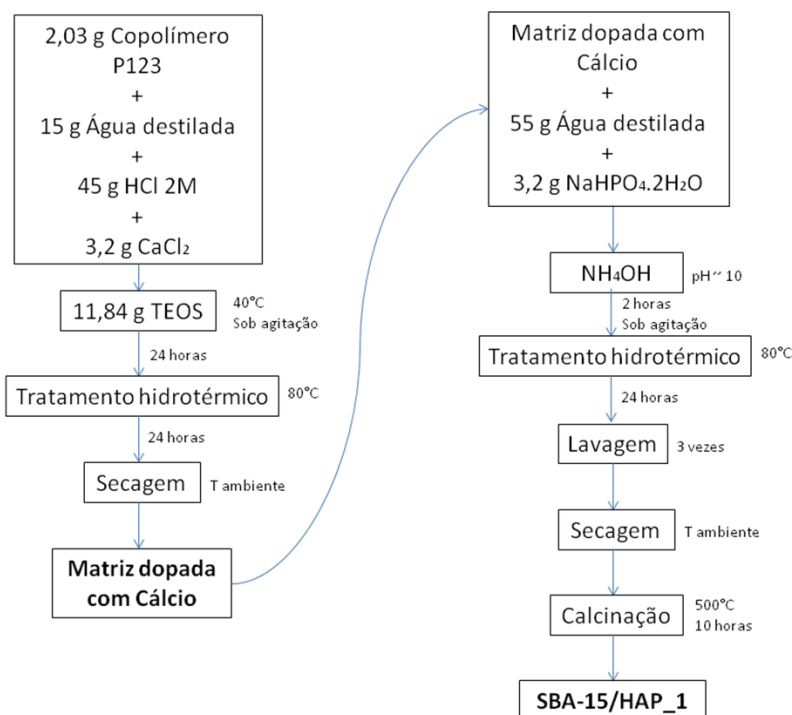


Figura 11 – Fluxograma da síntese da SBA-15/HAP_1.

5.1.3. SBA-15 impregnada com hidroxiapatita (SBA-15/HAP_2)

A SBA-15/HAP_2 foi sintetizada usando-se os seguintes reagentes: SBA-15 calcinada preparada conforme mencionado no item 4.1.1 para ser utilizada como suporte para precipitação da hidroxiapatita; cloreto de cálcio anidro (CaCl_2 , $M_m=110,98$, CAS: 10043-52-4) e fosfato de sódio dibásico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M_m=178$, CAS: 7558-79-4 / 7782-85-6) e hidróxido de amônio (NH_4OH , $M_m=35$, CAS: 1336-21-6) como precursores da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

Na síntese, primeiramente foram preparadas duas soluções: uma contendo 0,845 g de CaCl_2 em 26 g de água deionizada (1) e uma contendo 1,050 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 20 g de água deionizada (2). Na síntese, 1 g da sílica mesoporosa SBA-15 calcinada foi adicionada sob agitação em 50 g de água deionizada formando uma suspensão. Posteriormente, sob agitação, adicionou-se lentamente a solução 1 sobre a suspensão a 40°C. Depois, adicionou-se a solução 2 lentamente. O pH da solução foi então ajustado para aproximadamente 10 com solução de NH_4OH . Após 24 horas, o gel foi transferido para um recipiente de

teflon hermeticamente fechado e aquecido em uma estufa a 80°C sem agitação. Após 24 horas, o produto foi lavado com água destilada 3 vezes, seguido de secagem em estufa a temperatura ambiente (Figura 12)

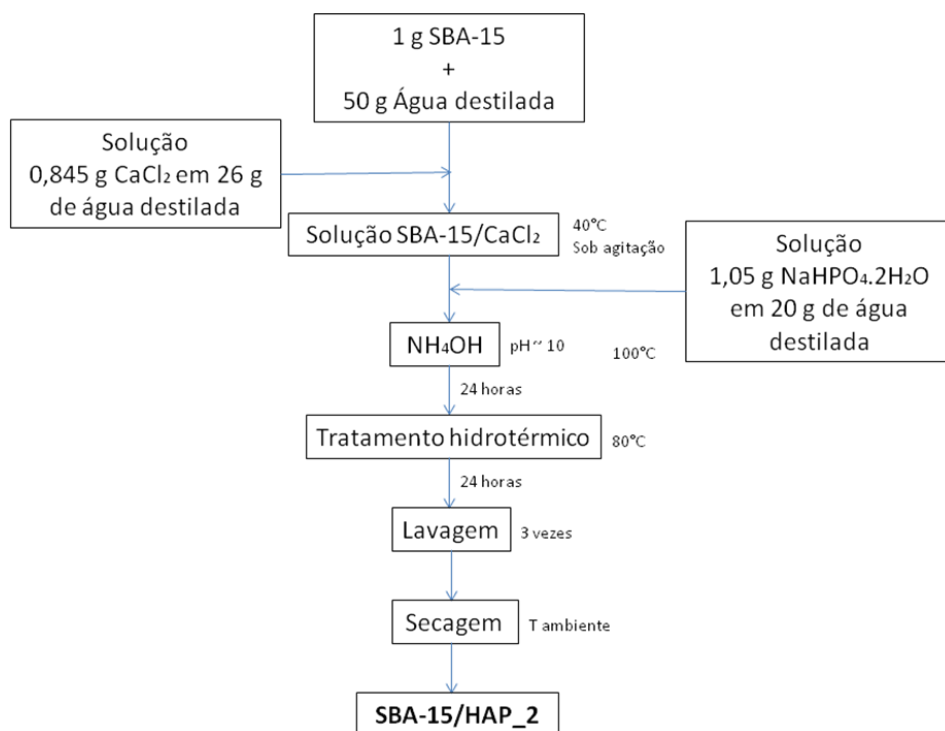


Figura 12 – Fluxograma da síntese da SBA-15/HAP_2.

5.1.4. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita foi sintetizada com procedimento similar a de Araújo, 2007, usando-se os seguintes reagentes: cloreto de cálcio anidro (CaCl_2 , $M_m=110,98$, CAS: 10043-52-4) e fosfato de sódio dibásico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $M_m=178$, CAS: 7558-79-4 / 7782-85-6) e hidróxido de amônio (NH_4OH , $M_m=35$, CAS: 1336-21-6) como precursores da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). O material foi sintetizado em condições similares as condições utilizadas em 4.1.2 e 4.1.3, exclusivamente para comparação entre as características físico-químicas com a SBA-15/HAP_1 e a SBA-15/HAP_2.

Na síntese, 3,20 g de CaCl_2 foram adicionados a 75 mL g de água destilada. Posteriormente, uma solução de 3,19 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 60 mL de água destilada foram adicionados lentamente sob agitação a 40°C. O pH da

solução foi então ajustado para 10 com solução de NH_4OH . Após 24 horas sob agitação, o precipitado foi separado por filtração, lavado repetidamente com água deionizada e seco a temperatura ambiente por 24 horas.

5.2. Marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

A marcação foi realizada segundo metodologia descrita abaixo (Figura 13).

Primeiramente, foi preparada uma solução 2% dos materiais em água destilada. Para a marcação, utilizou-se 2 tubos sob vácuo: (1) Cloreto estanoso (SnCl_2) (4 mg) e ácido clorídrico 0,1M (HCl); e (2) amostra contendo 2% do material (150 μL).

No tubo 1, adicionou-se 10 mL de solução salina com SnCl_2 (0,4 mg/mL) e HCl (0,01M). Em seguida, no tubo 2 contendo 150 μL da amostra 2%, adicionou-se 0,15 mL do tubo 1 sob agitação. Aguardou-se 20 minutos em repouso. E então, no tubo 2, adicionou-se 300 μL de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (100 μCi). Após 10 minutos é realizada a avaliação da eficiência da marcação.

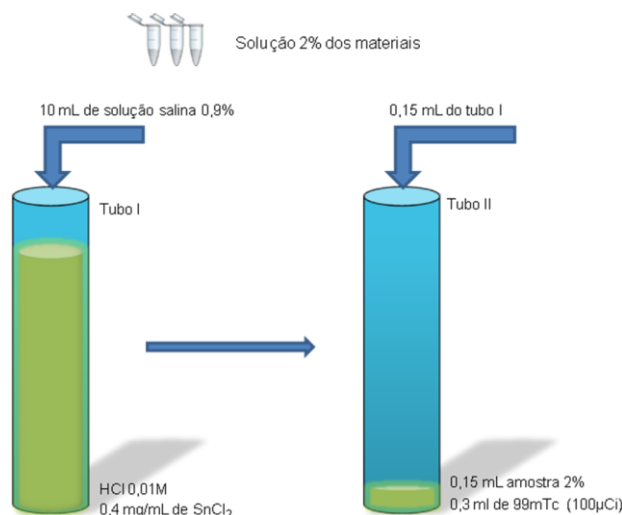


Figura 13 – Esquema da metodologia de marcação das amostras.

5.3. Aptâmero Anti-MUC1

5.3.1. Preparação

O aptâmero foi selecionado utilizando a metodologia SELEX contra a forma glicosilada da MUC1 (Anti-MUC1) como descrito por Ferreira, 2009. A seqüência de interesse, 5'-GGC GTA CGG TAG GCG GGG TCA ACT G-3', também publicado como Apt F em estudos de ficcionalização (DaPieve, 2009) foi comprada por MWG Eurofins UK purificada por HPLC e apresentando uma modificação com a fluoresceína isotiocianato (FTIC) no final 5', para permitir potencial acoplamento em preparações radiofarmacêuticas e leitura por microscopia confocal. O aptâmero foi utilizado sem mais manipulações para conjugação nas partículas de SBA-15.

5.3.2. Conjugação com a SBA-15

Após obtenção da sílica mesoporosa SBA-15 e do aptâmero anti-MUC1, foi preparada uma solução 10% da SBA-15 em soro fisiológico e então, adicionou-se o aptâmero a 2% e agitou-se por 30 minutos para formação do complexo, que foi denominado SBA-15/Anti-MUC1.

5.4. Caracterização dos Materiais

5.4.1. Análise elementar (AE)

A determinação dos teores de Silício (Si), Cálcio (Ca) e Fósforo (P) dos materiais foi realizada utilizando-se a técnica de Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES). Utilizou-se o espectrômetro de emissão ótica da Perkin Elmer, modelo Optima 4300 DV.

As amostras foram solubilizadas antes de serem analisadas. Primeiramente, 0,05 g dos materiais foram pesados e misturados a 1 g de metatetraborato de lítio (fundente) num cadinho de platina. Em seguida, a mistura foi fundida em mufla a 1000°C por 10 minutos. Posteriormente, a mistura fundida foi dissolvida em uma solução de ácido nítrico (HNO₃) 10%_{v/v} sob agitação. A solução foi adicionada e avolumada a 50 mL com a solução de ácido nítrico (HNO₃) 10%_{v/v} em tubo falcon. Foi realizado o teste em branco, onde apenas 1 g do fundente foi utilizado.

A técnica permitiu avaliar as razões Si/Ca/P, possibilitando definir a razão Ca/P da HAP formada e verificar a variação nas concentrações das espécies adicionadas durante a síntese.

5.4.2. Análise termogravimétrica (ATG)

A determinação do perfil termogravimétrico dos materiais foi realizada utilizando-se equipamento Shimadzu modelo DTG-60, utilizando-se N₂ gasoso numa vazão de 30 mL/min. A análise foi realizada na faixa de temperatura de 30°C a 600°C com taxa de aquecimento de 5 °C/min utilizando-se aproximadamente 7 mg de amostra.

A análise termogravimétrica fornece informações sobre a estabilidade térmica das amostras, da composição da fase precursora e também de possíveis espécies intermediárias formadas no decorrer do experimento.

5.4.3. Difração de raios-X (DRX)

A difração de raios-X em baixo ângulo dos materiais foram realizadas em um equipamento Siemens D5000 Kristalloflex usando filtro de Ni e fonte de radiação CuK α ($\lambda=0,15406$ nm) operando em voltagem de 40 kVe corrente de 40 mA. As varreduras foram realizadas na faixa de 2 θ de 0 a 10 com tempo de contagem de 3 segundos com intervalos de 0,02°. A determinação do

difratograma dos materiais na faixa de 2θ de 10 a 80 foi realizada em um equipamento X'Pert Pro Panalytical e fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0,15406$ nm).

Os difratogramas fornecem informações sobre estrutura e composição dos materiais. É possível calcular o espaçamento (d) e o parâmetro de célula (a_0) para determinação de possíveis distorções das redes cristalinas. O parâmetro de célula unitária " a_0 " foi calculado a partir da seguinte equação: $a_0 = 2 * d_{100} / \sqrt{3}$.

5.4.4. Fisissorção de nitrogênio

A determinação da área específica total, volume e tamanho de poros e a distribuição de poros foram determinados no equipamento ASAP 2010 da Micrometrics, a partir da adsorção e desorção de nitrogênio à -196°C . Os materiais calcinados foram pré-tratados a 300°C sob vácuo. A área específica e o diâmetro médio dos poros foram calculados pelo método BET (Brunauer–Emmet–Teller), enquanto o volume e a distribuição de poros foram calculados pelo método BJH (Barrett–Joyner–Halenda).

5.4.5. Infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

Os espectros da região do infravermelho dos materiais foram obtidos no espectrômetro Nicolet modelo Nexus 470, com ajuste de 120 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} na faixa de comprimento de onda de 450 a 4000 cm^{-1} . Para realização da análise, as amostras foram diluídas e maceradas em brometo de potássio (KBr) numa concentração de 2%_{p/p} para posterior confecção das pastilhas, utilizando uma prensa Caver com 7 toneladas.

Os espectros fornecem informações sobre as bandas das vibrações associadas à matriz de sílica e à hidroxiapatita.

5.4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens dos materiais foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo LSM 5800. As amostras foram recobertas com camada de ouro (26 nm) para observação a 10 kV. O equipamento também permite a realização de espectrometria de dispersão de energia (EDS), para identificar os elementos presentes.

As micrografias foram realizadas em diversos aumentos e forneceram informações sobre a morfologia da superfície das partículas. O EDS permitiu a determinação da composição química em diversas regiões das partículas.

5.4.7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL, modelo JEM 2010 com filamento LaB6 como fonte de elétrons e operado a 200 kV. Para análise, aproximadamente 10 mg de amostra foram adicionadas num béquer contendo 80 mL de álcool isopropílico e submetidos a um banho de ultrassom por 3 minutos. Posteriormente, recolheu-se uma alíquota superficial dessa solução, que foi gotejada sobre a grade de cobre, permitindo depositar o material o mais disperso possível.

As micrografias foram realizadas em diversos aumentos e forneceram informações sobre a morfologia da matriz, dos canais das partículas e das partículas depositadas sobre ela.

5.4.8. Difração a laser

Os tamanhos de partículas foram medidos em um equipamento Zetaplus modelo Zeta potential analyzer da Brookhaven instruments corporation pelo método de difração de raios laser.

Primeiramente foram preparadas suspensões de 1, 0,5 e 0,2 mg/mL. A medição do tamanho de partículas das suspensões foi realizada de três formas: suspensão recém-preparada, após banho de ultrassom por 5 minutos e sobrenadante da suspensão após repouso de 1 hora.

5.5. Avaliação da atividade e citotoxicidade

5.5.1. Marcação

A avaliação da marcação dos materiais foi realizada por cromatografia de camada fina (TLC) em papel Whatman nº 1 como fase estacionária (Figura 14). A cromatografia foi realizada usando-se 7 µl de cada material marcado com o radioisótopo ^{99m}Tc . A fase móvel utilizada foi 0,7 mL de acetona. A radioatividade das tiras foi verificada em contador gama (Packard, Cobra II). O estudo de estabilidade foi realizado com medições em 30 min, 1 h, 2h, 4 h, e 8 h.

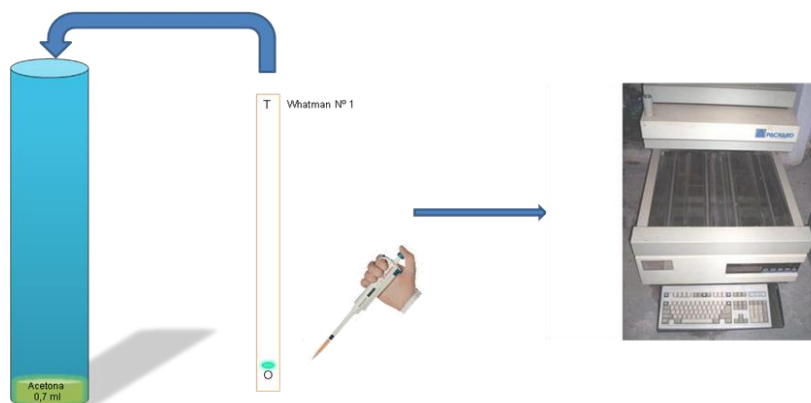


Figura 14 – Esquema da avaliação da marcação por cromatografia.

5.5.2. Biodistribuição

Os estudos de biodistribuição foram realizados em ratos do tipo Wistar. As amostras marcadas foram administradas por via intravenosa. Imagens planas foram obtidas após 30 minutos e 1 hora e meia em gama câmara Millenium (GE healthcare) (Figura 15). Posteriormente, os ratos foram sacrificados e seus órgãos removidos, pesados e a radioatividade específica contada em contador gama Packard modelo Cobra II. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) por dose injetada por grama de tecido.

A fórmula utilizada para o cálculo da % dose/órgão foi:

$$\% \text{ dose/órgão} = \frac{\text{contagem da marcação} * 100}{\text{Atividade total injetada}}$$

Atividade total injetada



Figura 15 – Esquema da avaliação da biodistribuição em ratos.

5.5.3. Microscopia confocal

As imagens foram realizadas em um microscópio confocal Olympus, modelo DSU.

As micrografias foram realizadas em diversos aumentos e forneceram informações sobre a fluorescência das células MDA-MB 468, da SBA-15 e da interação entre o conjugado SBA-15/Anti-MUC1 e as células MDA-MB 468 de adenocarcinoma metastático de seio.

5.5.4. Citotoxicidade

As linhagens celulares utilizadas para a avaliação da citotoxicidade foram a MDA-MB-435 (melanoma humano), HCT-8 (adenocarcinoma coloretal humano) e SF-295 (glioblastoma humano) fornecidas pelo National Cancer Institute (USA). As células foram cultivadas em RPMI 1640 com soro fetal bovino 10% e antibióticos 1% e incubadas a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. A SBA-15/Anti-MUC1 foi dissolvida em água mili-Q em concentrações de 1 mg/mL. A citotoxicidade foi avaliada pelo método colorimétrico MTT com o brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium. As células foram adicionadas em pratos contendo 96 cavidades com as seguintes densidades: 0.7 x 10⁵ (HCT-8), 0.1 x 10⁶ (SF-295) e 0.1 x 10⁶ (MDA-MB-435).

A amostra foi incubada com as três linhagens de células por 72 h em concentração única de 5 µg/mL numa incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. Após a incubação, elas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Então, 150 µL da solução de brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) foi adicionada nos pratos e os pratos foram encubados por 3 h, depois disso, foram centrifugados e o sobrenadante removido, deixando um precipitado azul (formazan). O pellet foi ressuscitado em 150 µL de DMSO (dimetil sulfóxido) estéril e agitado por 20 minutos até completa dissolução do precipitado. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm. A dextrorubicina (DOX), antineoplásico, foi utilizada como controle positivo.

Os experimentos foram analisados de acordo com as médias e os respectivos intervalos de confiança por regressão não linear pelo prisma GraphPad. A amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes. Uma escala de intensidade foi utilizada para checar o potencial

citotóxico da amostra testada. A amostra foi classificada em: sem atividade (SA), pouca atividade (PA, inibição do crescimento celular – 10 a 50%), atividade moderada (Mo, inibição do crescimento celular – 50 a 75%) e muita atividade (MA, inibição do crescimento celular – 75 a 100%).