

Análise por ativação neutrônica de nanomateriais visando aplicações biológicas

Rafael Gontijo Furst Gonçalves

Orientador: Prof. Maurício Veloso Brant Pinheiro

Co-Orientador: Prof. Arno Heeren de Oliveira

Dissertação de Mestrado
Ciências e Técnicas Nucleares

Belo Horizonte
Escola de Engenharia, UFMG

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Rafael Gontijo Furst Gonçalves

**ANÁLISE POR ATIVAÇÃO NEUTRÔNICA DE
NANOMATERIAIS VISANDO APLICAÇÕES
BIOLÓGICAS**

*Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências e Técnicas
Nucleares da Escola de Engenharia
Nuclear da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito parcial à
obtenção de título de mestre em Ciências
e Técnicas Nucleares.*

*Orientador: Prof. Maurício Veloso Brant
Pinheiro*

*Co-orientador: Prof. Arno Heeren de
Oliveira*

Belo Horizonte
Escola de Engenharia, UFMG

2008

“NÃO ENTRE EM PÂNICO!”

- Douglas Adams, em “O Guia do Mochileiro das Galáxias”

Agradecimentos

Como trabalhei com equipes de pesquisa de três locais diferentes, minha lista de agradecimentos é um pouco extensa. Tenho muito a agradecer a várias pessoas que me ajudaram durante diversas fases do mestrado.

Primeiro gostaria de agradecer ao meu orientador Maurício, que conheci durante a monitoria de física experimental e que depois se tornou meu orientador de iniciação científica e, posteriormente, de mestrado. Em todos os anos de convivência, sempre soube me orientar, elogiando nos acertos e chamando a atenção nos erros.

Ao Prof. Luiz Orlando, que me acolheu em seu laboratório por muitos anos e que transmite a todos muita empolgação em fazer ciência. Possui um ótimo senso de humor, além de um conhecimento amplo em diversas áreas, sendo referência na área de nanotecnologia. Por estas razões, sinto-me privilegiado por ter passado estes anos em seu laboratório.

Ao Prof. Klaus, com quem convivi durante a minha monitoria e também em alguns trabalhos isolados durante o mestrado.

Aos Profs. Rodrigo, André e Alexandre, que contribuíram muito na iniciação científica e em algumas fases do mestrado.

Também gostaria de agradecer ao meu Co-orientador Arno, que sempre se mostrou a disposição para ajudar no que fosse preciso, auxiliando nas imagens de microscopia eletrônica.

Às Profs. Cláudia e Dôra, que tratam todos respeitosamente e me auxiliavam sempre que havia algum problema.

A Andréa, que não tinha medo em falar coisas que precisavam ser ditas e auxiliou nos experimentos e cálculos de ativação neutrônica; e a Raquel, que na reta final trouxe novas idéias ao projeto e cedeu sua equipe e instalações para os experimentos de toxicologia.

A Amaral e Pitti, que contaram várias amostras no detector gama.

Gostaria também de prestar meu sincero agradecimento aos membros do laboratório de nanomateriais: Catão, Edelma, Erick, Eudes, Lívio e em especial ao Sérgio, que ajudou muito durante os dois anos, cedendo nanotubos nos momentos críticos.

A Ana Paula, aluna de Andréa, por ter ajudado nas contas e na fase final do mestrado. Agradeço também a equipe da Raquel que auxiliou nos experimentos de toxicologia e biodistribuição: Marcella, Marina, Paulo, Fabrício, Lucilene e Luíza.

Também agradeço ao Prof. Bernardo e seus alunos Bráulio e Guilherme, que me auxiliaram diversas vezes nas imagens de AFM.

Agradeço aos meus grandes amigos Matheus, Daniel, Breno e Luis, que propiciaram boas horas de lazer.

Finalmente, agradeço a minha mãe Marta, minha irmã Letícia e minha namorada Ariane, que me motivaram muito, principalmente na reta final, quando ficava desanimado nos momentos em que as coisas não corriam da forma planejada.

Agradeço ao CDTN, por fornecer suas instalações para os experimentos envolvendo material radioativo; à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), por fazer as imagens em seu microscópio eletrônico; e ao Departamento de Física (UFMG), por deixar todos os seus laboratórios sempre de portas abertas.

Devido ao apoio financeiro, gostaria de agradecer a CAPES (Coordenação de Pessoal de Nível Superior) e a Rede Nano.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de símbolos.....	xiv
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xviii
Capítulo 1 - Introdução.....	01
Capítulo 2 – Análise por ativação neutrônica.....	04
2.1 – Introdução.....	04
2.2 – Teoria.....	05
2.3 – Instrumentação.....	08
2.3.1 – Fonte de nêutrons.....	08
2.3.2 – Detectores e amplificadores.....	10
2.3.3 – Aquisição e processamento de sinais.....	12
2.4 – Isótopos de interesse.....	13
2.5 – Referências.....	17
Capítulo 3 – Filme de carbono amorfo para aplicações em braquiterapia.....	19
3.1 – Introdução.....	19
3.2 – Materiais e métodos.....	23
3.3 – Resultados e discussão.....	25
3.4 – Conclusões.....	29
3.5 – Referências.....	31
Capítulo 4 – Nanopartículas de ouro.....	32
4.1 – Introdução.....	32
4.2 – Classificação das NPs.....	32
4.2.1 – Nanopartículas metálicas.....	32
4.2.2 – Nanocápsulas.....	35
4.2.3 – Nanopartículas recobertas.....	37
4.3 – Materiais e métodos.....	38

4.3.1 – Síntese.....	38
4.3.2 – Funcionalização.....	39
4.3.3 – Caracterização.....	39
4.4 – Resultados e discussão.....	41
4.5 – Conclusões.....	45
4.6 – Referências.....	45
Capítulo 5 – Toxicologia e biodistribuição.....	48
5.1 – Introdução.....	49
5.2 – Materiais e métodos.....	53
5.2.1 – Nanopartículas de ouro.....	53
5.2.2 – Ativação neutrônica.....	54
5.2.3 – Modelo animal.....	54
5.2.4 – Modelo animal tumoral.....	55
5.2.5 – Toxicologia.....	55
5.2.6 – Biodistribuição.....	57
5.3 – Resultados e discussão.....	58
5.3.1 – Toxicologia.....	58
5.3.2 – Biodistribuição.....	58
5.4 – Conclusões.....	64
5.5 – Referências.....	65
Capítulo 6 – Nanotubos de carbono.....	67
6.1 – Introdução.....	67
6.2 – Materiais e métodos.....	70
6.2.1 – Síntese e purificação de SWCNT.....	70
6.2.2 – Funcionalização.....	73
6.2.3 – Decoração com AuNPs.....	73
6.2.4 – Caracterização.....	74
6.2.5 – Calculo teórico.....	75
6.3 – Resultados e discussão.....	76
6.3.1 – Purificação e funcionalização dos nanotubos.....	76
6.3.2 – Decoração.....	82
6.4 – Conclusões.....	85

6.5 – Referências.....	86
Capítulo 7 – Conclusões e perspectivas futuras.....	89
Apêndices.....	91
A – Técnicas experimentais.....	91
A1 – Espectrometria óptica UV-visível.....	91
A2 – Microscopia de força atômica (AFM)	92
A3 – Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	92
B – Relatórios de histopatologia.....	94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** Esquema da ativação neutrônica de um nuclídeo alvo pelo processo de captura radioativa seguido por uma desexcitação (prompt gamma). O núcleo radioativo decai por emissão beta no núcleo filho (product nucleus) e emite um gama (delayed gamma) [2.5]. (fonte: www.fcf.usp.br, consultado em julho de 2008).....05
- Figura 2.2** Esquema do Reator TRIGA MARK I IPR-R1. (fonte: www.cdtm.br, consultado em julho de 2008).....10
- Figura 2.3** Figura 2.3 – Fotografia de um sistema de detecção contendo um detector HP-Ge, um dewar de nitrogênio liquefeito para resfriamento, e uma câmara de blindagem de chumbo onde é inserida a amostra. (fonte: www.fi.tartu.ee consultada em julho de 2008).....11
- Figura 2.4** Decaimento por emissão β^- do ^{198}Au em $^{198\text{m}}\text{Hg}$, seguido pela emissão de raios gama até alcançar o estado fundamental (^{198}Hg). (fonte: National Nuclear Data Center, www.nndc.bnl.gov/chart/ consultado em julho de 2008).....15
- Figura 2.5** Decaimento por emissão β^- do ^{24}Na em $^{24\text{m}}\text{Mg}$, seguido pela emissão de raios gama até alcançar o estado fundamental (^{24}Mg). (fonte: National Nuclear Data Center, www.nndc.bnl.gov/chart/ consultado em julho de 2008).....15
- Figura 2.6** Decaimento beta do ^{60}Co seguido pela emissão de raios gama até atingir o estado fundamental do nuclídeo ^{60}Ni . (fonte: National Nuclear Data Center, www.nndc.bnl.gov/chart/ consultado em julho de 2008).....16
- Figura 2.7** Decaimento por emissão β^- do ^{41}Ar em $^{41\text{m}}\text{K}$, seguido pela emissão de raios gama até alcançar o estado fundamental (^{41}K). (fonte: National Nuclear Data Center, www.nndc.bnl.gov/chart/ consultado em julho de 2008).....17
- Figura 3.1** Esquema de implantação de sementes utilizando agulhas braquiterápicas. (fonte: <http://www.prostatelineimageatlas.com>, consultado em julho de 2008).....20
- Figura 3.2** Radiografia de paciente implantado com sementes braquiterápicas (fonte: <http://www.sgh.com.sg/> consultado em julho de 2008).....21
- Figura 3.3** Sementes comerciais ProstaSeed® I-125 (a); e I-Plant™ 125 (b) [3.10].....22

Figura 3.4	Modelo esquemático do aprisionamento de clusters de gás xenônio entre folhas de carbono amorfo [3.5].....	23
Figura 3.5	Secção de choque em função da energia dos nêutrons para as reações $^{124}\text{Xe}(n,\gamma)^{125\text{m}}\text{Xe}$ e $^{124}\text{Xe}(n,\gamma)^{125}\text{Xe}$. (fonte: http://www-nds.iaea.org/ngatlas2/ consultado em julho de 2008).....	26
Figura 3.6	Espectro gama das amostras 1, 5 e 6. Podemos ver em detalhe os picos de emissão gama do ^{125}Xe (188 e 242 keV) e do ^{135}Xe	27
Figura 3.7	Modelo de semente braquiterápica com 5 mm de comprimento, 0,8 mm de diâmetro e um filme de a-C com 20 μm de espessura (5% at. ^{124}Xe). A semente pode ainda ser encapsulada com um material radiopaco.....	28
Figura 3.8	Atividade do ^{125}I e ^{125}Xe após ativação neutrônica.....	29
Figura 4.1	Copo de Licurgo, taça romana do século IV. (fonte: The British Museum, www.britishmuseum.org consultado em julho de 2008).....	33
Figura 4.2	Imagem feita por TEM de nanopartículas de ouro com diferentes diâmetros [4.7].....	34
Figura 4.3	Esquema do fenômeno de plásmem de superfície que ocorre com a incidência de ondas eletromagnéticas sobre nanopartículas metálicas.....	34
Figura 4.4	Espectros de absorção óptica UV-vis normalizados. Os picos de absorção óptica de nanopartículas de ouro com diâmetros de 9 nm (517nm), 22 nm (521 nm), 48 nm (533 nm) e 99 nm (575 nm) [4.7].....	35
Figura 4.5	Esquema do processo de crescimento de uma fina camada metálica sobre um núcleo dielétrico. (fonte: http://cmbi.bjmu.edu.cn consultado em julho de 2008).....	35
Figura 4.6	Varição do espectro de absorção de nanocápsulas com a variação da espessura da camada metálica [4.12].....	36
Figura 4.7	As NPs podem ser estabilizadas através da adsorção de íons, criando uma força de repulsão devido a forças eletrostáticas [4.2].....	37
Figura 4.8	Figura 4.10 – Monômero do polivinilpirrolidona. (fonte: Wikipédia, www.wikipedia.org consultado em julho de 2008).....	38
Figura 4.9	Topografia medida por AFM da superfície da amostra onde foram depositadas as nanopartículas de ouro. Cada pico representa uma nanopartícula e seu diâmetro é determinado pela altura do pico.....	41
Figura 4.10	Superfície do substrato de mica em 2D mostrando as AuNPs.....	41
Figura 4.11	Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas de ouro.....	42

Figura 4.12 AFM de nanopartículas de ouro revestidas com Polivinilpirrolidona K30.....	43
Figura 4.13 Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas de ouro revestidas com PVP K30.....	43
Figura 4.14 – Espectro gama das AuNPs irradiadas durante 1 hora e analisadas em um detector HP-Ge. Podemos observar os picos de emissão de 411.8, 675.8 e 1087.7 keV do ¹⁹⁸ Au.....	44
Figura 5.1 Radiografia do camundongo antes (a) e após a injeção das nanopartículas (b). A seta indica o local onde o tumor foi implantado, confirmando uma maior retenção de AuNPs pelo tumor (fonte: Hainfeld et al., 2004).....	49
Figura 5.2 Valores de atenuação para diversas concentrações de AuNPs, utilizando água como controle (fonte: Cai et al., 2007).	50
Figura 5.3 Tumor de camundongo administrado com nanocápsulas de ouro e irradiados com laser: antes do tratamento (a) e 21 dias após tratamento (b) (fonte: Stern et al., 2007).....	51
Figura 5.4 ¹⁹⁸ AuNPs estabilizadas com goma arábica (fonte: Kannan, 2006).....	52
Figura 5.5 Porcentagem de dose injetada por grama de órgão: sangue (%DI mL ⁻¹), cérebro, cerebelo, tireóide.....	60
Figura 5.6 Porcentagem de dose injetada por grama de órgão: coração, pulmão, fígado e baço.....	61
Figura 5.7 Porcentagem de dose injetada por grama de órgão: estômago, intestino delgado e bexiga.....	62
Figura 5.8 Porcentagem de dose injetada por grama de órgão: rim, músculo, osso, pata com tumor e pata normal.....	63
Figura 5.9 %DI g ⁻¹ para a pata com tumor e a pata normal.....	64
Figura 6.1 Estrutura dos SWCNT (a), DWCNT (B) e fullerenos (C) (fonte: wikipédia, www.wikipedia.org consultado em julho de 2008).....	68
Figura 6.2 (a) Esquema da câmara de arco-elétrico; (b) Foto da câmara aberta logo após a síntese de SWCNTs, observe a formação de uma “teia”.....	71
Figura 6.3 Figura 6.3 – MEV de SWCNT após a síntese na câmara de arco-elétrico.....	76

Figura 6.4	(a) imagem por AFM de nanotubos funcionalizados (-COOH) e (b) topografia do substrato, indicando um diâmetro de 5 nm para o nanotubo.....	77
Figura 6.5	Concentração de impurezas contendo nanotubos de carbono crescidos por arco elétrico e retirados de regiões diferentes da câmara: região de alto rendimento (a) e de baixo rendimento (b).....	79
Figura 6.6	Concentração de elementos em MWCNT (as-grow) crescidos por CVD.....	79
Figura 6.7	Concentração de impurezas em fullerenos produzidos em nosso laboratório (UFMG) e adquiridos no mercado (Comercial).....	80
Figura 6.8	TEM de MWCNT sintetizados por CVD, detalhe mostrando os metais catalisadores dentro dos nanotubos, impedindo a sua remoção durante a purificação (barra de escala: 0,2 μm).....	81
Figura 6.9	AFM de um nanotubo de carbono decorado com nanopartículas de ouro pelo método da hidrazina: (a) área 5 x 5 μm^2 e (b) mesma região ampliada (área 1 x 1 μm^2).....	82
Figura 6.10	Espectro de absorção óptica de nanopartículas de ouro produzidas pelos métodos da hidrazina (a), com um pico de 547 nm; e UV (b), com o pico em 531 nm.....	83
Figura 6.11	TEM de SWCNT decorados com AuNPs (escala 0,2 μm).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Isótopos: abundância isotópica natural (Θ), secção de choque para nêutrons térmicos (σ), produto da ativação, meia-vida ($t_{1/2}$), modo de decaimento, energia de emissão gama e núcleo filho [2.9].....	13
Tabela 3.1	Parâmetros da amostras irradiadas.....	24
Tabela 3.2	Concentração de isótopos no filme de carbono amorfo determinados pela análise de ativação neutrônica.	27
Tabela 5.1	Animais utilizados na toxicologia do PVP (grupo 1), AuNP (grupo 2) e salina (grupo 3).	56
Tabela 5.2	Camundongos utilizados no estudo da biodistribuição das AuNPs.....	57
Tabela 5.3	Peso médio dos órgãos e tecidos coletados.....	59
Tabela 6.1	Amostras irradiadas com nêutrons.	78
Tabela 6.2	Análise por ativação neutrônica mostrando concentração de cobalto em amostras de SWCNT após etapas de purificação.....	81
Tabela 6.3	Número de átomos de ouro em função do diâmetro.....	84

LISTA DE SÍMBOLOS

NAA	análise por ativação neutrônica
PVP	poli(vinilpirrolidona)
HP-Ge	detector semiconductor de germânio ultra-puro
N ₂ H ₄	hidrazina
a-C	carbono amorfo
IBAD	deposição assistida por feixe de íons
SWCNT	nanotubos de carbono de parede única
MWCNT	nanotubos de carbono de parede múltipla
DWCNT	nanotubos de carbono de parede múltipla
CVD	deposição química por fase vapor
NP	nanopartícula
AuNP	nanopartícula de ouro
AuNP-SWCNT	nanotubo de carbono decorado com nanopartículas de ouro
¹⁹⁷ Au	isótopo do ouro de número de massa 197
¹⁹⁸ Au	isótopo do ouro de número de massa 198
¹²⁵ I	isótopo do iodo de número de massa 125
¹²⁴ Xe	isótopo do xenônio de número de massa 124
¹²⁵ Xe	isótopo do xenônio de número de massa 125
²⁸ Al	isótopo do alumínio de número de massa 28
DNA	ácido desoxirribonucléico
EC	captura eletrônica
IT	transição isomérica
IC	conversão interna
Bq	bequerel – unidade de medida de atividade
Ci	Curie – unidade de medida de atividade
Pa	pascal – unidade de medida de pressão
ε	Eficiência do detector
θ	abundância isotópica
σ	secção de choque
φ	fluxo de nêutrons
t _i	tempo de irradiação
t _c	tempo de contagem

t_d	tempo de decaimento
QD	ponto quântico
DI	deionizada
AFM	microscopia de força atômica
TEM	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PBS	tampão fosfato salino
CT	tomografia computadorizada
SPECT	tomografia computadorizada por emissão de fóton único
FDA	Food and Drug Administration
CPM	contagens por minuto
HCl	ácido clorídrico
HNO ₃	ácido nítrico

Resumo

Neste trabalho, utilizando a análise por ativação neutrônica (NAA) como principal ferramenta, caracterizamos diversos nanomateriais. A concentração de xenônio em um filme de carbono amorfo crescido pela técnica de deposição assistida por feixe iônico duplo (IBAD) foi medida utilizando a técnica de ativação neutrônica, os resultados encontrados para a concentração do gás xenônio no filme de carbono amorfo (5% at.) confirmaram os valores estimados para a técnica de crescimento. Estes resultados motivaram a construção de um modelo de semente radioativa contendo ^{125}I produzido pela irradiação com nêutrons para braquiterapia de câncer de próstata, resultando em um pedido de patente.

Nanopartículas de ouro (AuNP) foram sintetizadas seguindo o processo de Turkevich e analisadas por ativação neutrônica, confirmando as concentrações previstas durante sua síntese. As nanopartículas também foram caracterizadas por microscopia de força atômica e absorção óptica, encontrando-se um diâmetro médio de (4 ± 2) nm. As AuNPs foram encapsuladas com poli(vinil-pirrolidona) (PVP K30), impedindo que as nanopartículas se aglomerassem em meio salino (pH 7.4). As AuNP-PVP suspensas em água foram irradiadas com nêutrons, resultando em nanopartículas de ouro radioativas devido a reação nuclear $^{197}\text{Au}(n,\gamma)^{198}\text{Au}$.

Estudos de biodistribuição e toxicologia da solução contendo $^{198}\text{AuNP-PVP}$ foram realizadas em camundongos da espécie Swiss implantados com tumor Erhlich na pata. Os resultados toxicológicos indicaram que não houve efeitos tóxicos significativos. Os resultados de biodistribuição mostraram que as AuNPs-PVP se dirigem preferencialmente para certos órgãos como o fígado o baço e os rins. Além disto, em alguns tempos, a concentração no tumor é cerca de 100% maior que em tecidos saudáveis, indicando a possibilidade de utilizá-las como carreadores de drogas ou agentes de contraste para diagnóstico por imagem.

A partir dos resultados obtidos na biodistribuição das nanopartículas de ouro, estudamos a aplicação de AuNPs como marcadores de nanotubos para estudos de biodistribuição por NAA. Os nanotubos de carbono foram sintetizados, purificados, funcionalizados e decorados com nanopartículas de ouro e analisados por ativação neutrônica para um levantamento das impurezas e/ou resíduos de catalizadores. Na decoração dos nanotubos, foram analisados dois métodos: um método encontrado na

literatura, através da redução dos íons de ouro com radiação ultravioleta; e um novo método desenvolvido em nosso laboratório, utilizando hidrazina (N_2H_4) como agente redutor. O método da hidrazina apresentou melhores resultados, com um menor número de aglomerados de AuNPs. Os resultados indicaram que os métodos de decoração devem ser aprimorados antes de serem usados como marcadores de nanotubos para estudos de biodistribuição, pois os aglomerados de nanopartículas de ouro podem interferir nos resultados de biodistribuição.

Abstract

In this work we used the neutron activation analysis (NAA) as a main tool for nanomaterials characterization. The xenon concentration in amorphous carbon thin films (a-C films) grown by Ion Beam Assisted Deposition (IBAD) was measured by NAA. The results were used for modeling a radioactive seed containing ^{125}I produced by neutron irradiation of ^{124}Xe . This seed can be used for brachytherapy of prostate cancer. The results of the study motivate us to request a patent of the seed model.

Gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized by Turkevich method and analysed by NAA, the concentration of suspension were in agreement with expected. The mean diameter of the nanoparticles – measured by Atomic Force Microscopy (AFM) and Optical Absorption – was about (4 ± 2) nm. The AuNPs were encapsulated with poly(vinylpyrrolidone) K30 (PVP K30), reducing their clustering in pH 7.4 medium for biological applications. The AuNP-PVP suspension were neutron irradiated to induce the nuclear reaction $^{197}\text{Au}(n,\gamma)^{198}\text{Au}$ and create radioactive nanoparticles ($^{198}\text{AuNP-PVP}$).

Biodistribution and toxicological studies were done for $^{198}\text{AuNP-PVP}$ suspension in Swiss Mice with Erhlich tumour implanted. The toxicological studies revealed that there are no toxic effects due to AuNPs. The biodistribution results showed that the AuNPs go preferentially to some organs like liver and spleen. Our studies showed that the AuNPs-PVP's concentration in tumor is 100% higher than in health tissues and can be used as contrast agents for image diagnostic.

After the AuNPs toxicological and biodistribution studies we investigated the application of AuNPs as carbon nanotubes markers. The CNTs were synthesized, purified, functionalized and decorated with gold nanoparticles. They were analysed by NAA to detect impurities from catalyses residues. In CNTs AuNP-decoration, were analysed two methods: the first, found in literature, uses ultraviolet radiation to reduce the gold ions; the second, developed during our studies, uses hydrazine as reduction agent. The hydrazine method showed the best results, indicating less AuNPs clusters. This method should however be improved for later biodistribution studies.

Capítulo 1 - Introdução

O professor laureado com o prêmio Nobel, Richard Feynman, em sua palestra intitulada “*There is a plenty of room at the bottom*” [1.1] (1960) inspirou o surgimento de um novo campo de pesquisa: a nanotecnologia. Feynman utilizou de sua grande criatividade para mostrar às pessoas o enorme potencial de uma tecnologia que nos permitisse manipular e controlar dispositivos em escala nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Feynman não deixa de mostrar o seu fascínio pelas máquinas criadas pela natureza, as células, que são capazes de gerar energia, se movimentar e armazenar uma quantidade enorme de informação em seu DNA. Inspirado pelo que a natureza já alcançou, ele vai além, imaginando dispositivos que pudessem ser construídos *átomo por átomo*. Estes dispositivos teriam seu comportamento regido pelas leis da física quântica e, conseqüentemente, poderiam explorar algumas de suas propriedades, como os níveis de energia quantizados e o spin de elétrons. Décadas após a palestra de Feynman surgiram os primeiros resultados práticos relativos à manipulação de átomos isolados: em 1989, um grupo de pesquisa da IBM conseguiu, utilizando um microscópio de tunelamento, manipular 35 átomos de xenônio sobre um substrato de níquel, formando as letras IBM [1.2]. Nos últimos 15 anos, as ferramentas de manipulação de átomos foram aprimoradas, auxiliando na construção e caracterização de materiais nanométricos: os nanomateriais.

Os nanomateriais são os blocos de construção utilizados na fabricação dos dispositivos imaginados por Feynman. A cada ano, novos materiais surgem e suas aplicações se ampliam, abrangendo áreas como física, química, eletrônica, biologia e medicina. No campo da eletrônica, o limite clássico dos dispositivos eletrônicos já foi alcançado devido às barreiras impostas pela termodinâmica, como flutuações térmicas e dissipação de calor. A nanotecnologia utiliza a física quântica para superar os limites clássicos, construindo dispositivos menores e mais eficientes. Na área biomédica ou farmacêutica, os nanomateriais estão aumentando a eficiência de fármacos e radiofármacos, atuando como carreadores para órgãos ou organelas específicos de células, minimizando com isso efeitos indesejáveis em órgãos e tecidos saudáveis, e também ampliando as técnicas de diagnóstico de doenças. Na química, os nanomateriais são úteis na fabricação de eletrodos com maior superfície de contato, aumentando a eficiência das reações, sendo aplicados na construção de células de combustível e baterias [1.3]. Apesar das inúmeras aplicações citadas, a nanociência ainda é um

campo de pesquisa recente e muitas de suas possíveis aplicações ainda não foram totalmente exploradas e outras sequer vislumbradas.

Podemos citar, dentre os materiais mais importantes na nanotecnologia os fullerenos, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas e semicondutoras e, mais recentemente, os grafenos. Também já existem inúmeros exemplos de dispositivos que utilizam a nanotecnologia, como filmes finos – com alguns nanômetros de espessura – utilizados na fabricação de células fotovoltaicas e transistores.

Hoje a nanotecnologia já é uma realidade e, como qualquer tecnologia, apresenta lados positivos e negativos. Desta forma, é essencial que sejam estudados tanto seus benefícios quanto seus possíveis impactos negativos. Alguns dos nanomateriais, como nanotubos e nanopartículas, podem apresentar efeitos tóxicos a seres vivos. Assim, são necessários estudos toxicológicos e de sua biodistribuição nos organismos, através de pesquisas *in vitro* e *in vivo* [1.4].

Embora o tema seja importante, ainda há muitos estudos a se fazer até concluirmos se os nanomateriais poderão ser amplamente utilizados. Esta dissertação tem como objetivo a síntese, funcionalização e caracterização de materiais nanoestruturados visando aplicações biológicas. Dentre os métodos de caracterização, será utilizada a análise por ativação neutrônica (NAA), usada para detectar elementos e quantificar sua concentração através da irradiação de amostras com nêutrons, produzindo radionuclídeos.

O *capítulo 2* desta dissertação descreve a Análise por Ativação Neutrônica, apresentando seus fundamentos e suas principais aplicações, bem como as características do reator nuclear e detectores usados e a metodologia para o processamento de dados. Também serão detalhadas as principais características dos elementos irradiados durante a ativação neutrônica, como abundância isotópica, seção de choque, radionuclídeos gerados e meia-vida.

O *capítulo 3* descreve a caracterização por ativação neutrônica de um filme fino de carbono amorfo dopado xenônio natural crescido pela técnica de deposição assistida por feixe de íons, analisando a viabilidade da fabricação de sementes radioativas contendo ^{125}I para o tratamento de tumores.

O *capítulo 4* descreve a síntese, funcionalização e caracterização de nanopartículas de ouro, incluindo os dados obtidos na ativação neutrônica de nanopartículas de ouro em suspensão.

No *capítulo 5* são apresentados os resultados de testes de biodistribuição de nanopartículas de ouro suspensas em meio salino e recobertas com o polímero poli(vinilpirrolidona) K30.

O *capítulo 6* apresenta estudos envolvendo nanotubos de carbono e fullerenos, passando pela síntese, purificação, funcionalização, decoração com nanopartículas de ouro e vários métodos de caracterização, incluindo a ativação neutrônica. A partir dos resultados será analisada a viabilidade de utilizar a técnica de ativação neutrônica para realizar estudos de biodistribuição de nanotubos marcados com nanopartículas de ouro.

As conclusões são apresentadas no *capítulo 7*.

Nos apêndices são apresentados os resultados dos exames de histopatologia, bioquímica e hemograma bem como uma breve introdução sobre as técnicas de caracterização complementares utilizadas neste trabalho.

Referências

- [1.1] Feynman Rp; *There is a plenty of room at the bottom*; Engineering and Science Magazine, 5 (1960)
- [1.2] D. M. Eigler e E. K. Schweizer; Nature 344, 524 (1990)
- [1.3] Gunter Schmid (Ed.); *Nanoparticles: from theory to application*; Wiley VCH (2004)
- [1.4] Lara Lacerda, Alberto Bianco, Maurizio Prato, Kostas Kostarelos; Advanced Drug Delivery Reviews 58 (2006) 1460–1470

Capítulo 2 – Análise por ativação neutrônica

2.1 Introdução

A análise por ativação neutrônica (NAA) é uma técnica analítica, baseada em transições nucleares, sendo usada na análise quantitativa e qualitativa de elementos. Esta técnica surgiu através de um experimento desenvolvido por Hevesy e Lev [2.1], que perceberam que certas amostras contendo elementos se tornavam radioativas após a exposição a uma fonte de nêutrons. A técnica de ativação neutrônica se baseia na irradiação de uma amostra por um fluxo de nêutrons, causando transmutação dos núclídeos presentes. Após a irradiação, a amostra é levada a uma câmara de detecção para medir o espectro gama dos radionúclídeos criados. A partir do espectro gama é possível identificar e quantificar os radioisótopos presentes na amostra e, através de equações, calcular a concentração de elementos na amostra antes da irradiação.

Na indústria, a NAA é utilizada na medida de impurezas para o controle de qualidade, principalmente em materiais que contenham carbono, pois os isótopos naturais do carbono são pouco ativados e possuem baixa massa atômica, não absorvendo raios gama emitidos pelos radionúclídeos e causando pouca interferência na análise. Assim, materiais como fibra de carbono, grafite, diamante, polímeros ou quaisquer outros ricos em carbono podem ser analisados pela ativação neutrônica. A indústria do petróleo e seus derivados, a indústria farmacêutica e cosmética e também a indústria de carvão (Valkovic, 1983) [2.2], de metais, ligas e semicondutores utilizam a técnica para análise de impurezas. Na geologia, a NAA tem papel fundamental para o mapeamento de riquezas no solo e estudos de exploração, detectando mais de 40 elementos presentes em amostras de solos, rochas e sedimentos (Smith, 1983) [2.3]. No meio-ambiente, amostras de plantas e animais podem ser analisadas pela NAA, visto que a maior parte do organismo é feita de carbono e água. Também podem ser analisadas amostras de água e material particulado do ar, detectando prováveis poluentes.

Além das aplicações descritas acima, a técnica também pode ser usada na área biomédica, tanto na análise de elementos presentes no tecido humano, órgãos, dejetos, cabelo e unhas, bem como na ativação de elementos úteis em técnicas de diagnóstico e tratamento de doenças. Podemos citar como exemplo o tratamento de câncer de próstata

através da implantação de sementes radioativas contendo ^{125}I , obtido pela técnica de ativação neutrônica do ^{124}Xe [2.4].

2.2 Teoria

O processo de ativação neutrônica está esquematizado na figura 2.1 [2.5]. Segundo Lilley [2.6], quando um nêutron incide sobre uma amostra, existe uma probabilidade de que ele seja absorvido pelo núcleo de um átomo, processo chamado de captura radioativa. Quando isto ocorre, os núcleos ficam em um estado de energia excitado (núcleo composto) e emitem um ou mais raios gama (*gama pronto*) para alcançar o estado fundamental. Como os novos núcleos são instáveis (radionuclídeos), possuem a probabilidade de decair em outros nuclídeos (núcleo filho), por algum processo de decaimento radioativo. Após o decaimento, os núcleos filhos podem ainda emitir um ou mais raios gama atrasados ao decaírem do estado excitado ao estado fundamental. Os raios gama emitidos no decaimento radioativo são usados na detecção dos radionuclídeos.

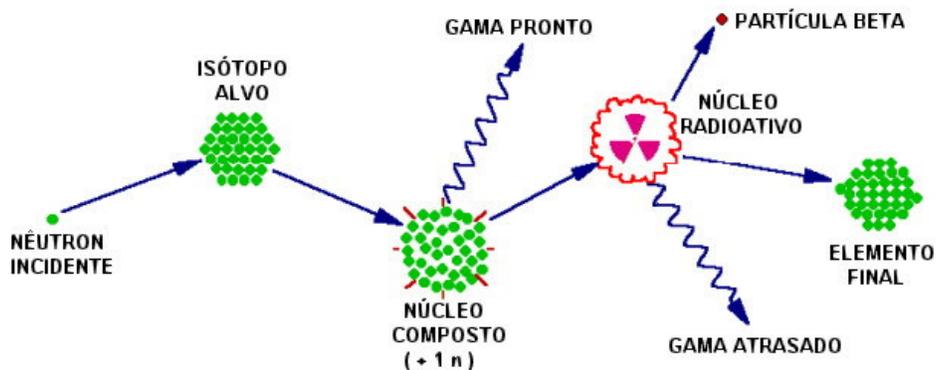


Figura 2.1 – Esquema da ativação neutrônica de um nuclídeo alvo pelo processo de captura radioativa formando um núcleo composto, sendo seguido por uma desexcitação (gama pronto). O núcleo radioativo decai por emissão beta no núcleo filho e emite um gama (gama atrasado) [2.5].
(fonte: www.fcf.usp.br, consultado em julho de 2008)

No processo de ativação neutrônica, a taxa com que os radionuclídeos são gerados (equação 2.1) [2.1] é proporcional ao número de nuclídeos presente na amostra (N_0) e ao fluxo de nêutrons (Φ). O fluxo de nêutrons nada mais é que a quantidade de nêutrons que atravessam, em um intervalo de tempo, uma secção de área, sendo sua unidade descrita em termos de nêutrons por segundo por centímetro quadrado ($n\ s^{-1}\ cm^{-2}$). A constante da equação 2.1 é chamada de secção de choque (σ). Ela é relacionada com a probabilidade de ocorrência de uma reação qualquer. Em reações nucleares, a

secção de choque é dada em barns ($1 \text{ barn} = 10^{-24} \text{ cm}^2$). A secção de choque nuclear é determinada experimentalmente e varia com a energia do nêutron incidente e com o isótopo alvo, não tendo uma relação direta com a secção de área transversal do núcleo. Desta forma, elementos químicos terão uma secção de choque diferente para cada um de seus isótopos.

$$\text{Taxa de ativação} = dN/dt = \sigma \Phi N_0 \quad (2.1)$$

O tipo de reação nuclear que pode ocorrer dependerá da energia dos nêutrons incidentes, sendo estes divididos em nêutrons térmicos (0,025 eV – 0,5 eV), epitérmicos (0,5 eV – 1 MeV) e rápidos (acima de 1 MeV). A captura radioativa (n,γ) envolve a absorção de nêutrons térmicos pelo núcleo alvo que, em um estado de estado de energia excitado, emite um raio gama para alcançar o nível de energia fundamental (estamos falando dos níveis de energia do núcleo e não das camadas eletrônicas). Além disso, algumas fontes possuem um fluxo de nêutrons térmicos, epitérmicos e rápidos, ocorrendo mais de um tipo de reação, como (n,p) e (n,α), e surgindo novos nuclídeos filhos no final da reação e dificultando o processo de caracterização. Também podem ser produzidos nuclídeos estáveis que não emitam raios gama. O gama emitido logo após a ativação neutrônica é chamado de gama pronto (do inglês, *prompt gamma*). O gama pronto só pode ser detectado quando as amostras são monitoradas durante o processo de ativação. Na espectrometria gama, os raios gamas detectados são chamados de *gamma atrasados* (do inglês, *delayed gamma*) e se originam do *decaimento radioativo* dos radionuclídeos produzidos durante a irradiação com nêutrons. Neste processo, o nuclídeo instável (radionuclídeo) produzido durante a ativação transmuta em outro nuclídeo (núcleo filho) através de um processo de decaimento como a captura eletrônica (EC, do inglês *Electronic Capture*), decaimento beta (β^+ ou β^-), transição isomérica (IT, do inglês *Isomeric Transition*), emissão alfa (α) ou Conversão Interna (IC, do inglês *Internal Conversion*).

A taxa de decaimento radioativo ou atividade (A) é proporcional ao número de radionuclídeos na amostra (N). A constante usada na construção da equação 2.2 [2.1] é chamada de constante de decaimento (λ) e é calculada a partir da meia-vida ($T_{1/2}$) do radioisótopo. O sinal negativo indica que a quantidade de nuclídeos N presentes na amostra diminui com o tempo.

$$A = dN/dt = -\lambda N, \quad \text{onde } \lambda = \ln(2)/T_{1/2} \quad (2.2)$$

Desta forma, a taxa de produção de radionuclídeos (*equação 2.3*) [2.1] na amostra irradiada será a soma das taxas de ativação (*equação 2.1*) e de decaimento (*equação 2.2*). Resolvendo esta equação encontramos o número de radionuclídeos após a ativação da amostra:

$$dN/dt = \sigma\phi N_0 - \lambda N \Rightarrow N = \sigma\phi N_0(1 - e^{-\lambda t_i})\lambda^{-1} \quad (2.3)$$

Como a atividade (A) é determinada pelo número de nuclídeos multiplicado pela constante de decaimento (λ) (*equação 2.2*), podemos concluir que a atividade da amostra após um tempo t_i de irradiação será: [2.1]

$$A = \sigma \Phi N_0 (1 - e^{-\lambda t_i}) \quad (2.4)$$

Assim, a amostra é levada a um detector gama para contagem durante um intervalo de tempo. A determinação e quantificação dos elementos presentes na amostra pode ser calculada através de dois métodos. No primeiro método, a concentração do elemento é calculada a partir de uma equação. Para isto, deve-se primeiramente determinar a quantidade de radionuclídeos na amostra através do cálculo da sua atividade, em Bequerel ($1 \text{ Bq} = \text{s}^{-1}$). A área do pico de emissão gama representa o número de detecções naquela faixa de energia em determinado intervalo de tempo. Também devemos nos lembrar que, após o processo de decaimento radioativo, o núcleo pode emitir mais de um raio gama. Assim, para o cálculo da atividade (A), devem ser considerados: a área do pico (Δ); o tempo de contagem (t_c); a eficiência do detector (ϵ) para aquela energia e distância; e a intensidade do pico gama (I) [2.1].

$$A = \Delta \lambda [I \epsilon (1 - e^{-\lambda t_c})]^{-1} \quad (2.5)$$

Levando em consideração o decaimento do isótopo ao longo da contagem e substituindo o resultado obtido em (2.5) na equação 2.4 e dividindo pela abundância natural do isótopo (θ) podemos calcular a concentração inicial de determinado elemento na amostra:

$$N_0 = \Delta [(\theta I \epsilon \sigma \Phi \lambda^{-1}) (1 - e^{-\lambda t_i}) (1 - e^{-\lambda t_c})]^{-1} \quad (2.6)$$

Também devemos considerar o tempo de decaimento t_d do isótopo criado decorrido entre o fim da ativação neutrônica e o início da contagem gama. Assim, este termo deve ser acrescentado na equação 2.6, obtemos com isso a equação 2.7:

$$N_0 = \frac{\Delta}{K e^{-\lambda t_d} \times (1 - e^{-\lambda t_i}) \times (1 - e^{-\lambda t_c})}, \quad \text{onde } K = I \times \varepsilon \times \theta \times \sigma \times \varphi \times \lambda^{-1} \quad (2.7)$$

No segundo método, mais geral, o cálculo da concentração independe do espectro do fluxo de nêutrons e das características do detector. O cálculo é realizado a partir do fator k_0 encontrado através dos dados obtidos através da irradiação de uma amostra que serve como comparador de fluxo de nêutrons. Este comparador, de concentração conhecida, é irradiado junto da amostra analisada. Segundo Simonits (1975) [2.7], o método k_0 é mais preciso pois anula os efeitos de flutuação no fluxo de nêutrons do reator durante o processo de ativação, tornando a medida mais confiável.

2.3 Instrumentação

Para estudos envolvendo a ativação neutrônica de materiais é necessário: uma fonte de nêutrons para a transmutação dos núclídeos presentes na amostra; um detector de raios gama, para transformar a radiação emitida pela fonte em um sinal eletrônico; pré-amplificador e amplificador, para reduzir a relação sinal/ruído; e um equipamento de aquisição e processamento de dados, para separar os sinais por energia, construir um espectro e, por último, identificar e calcular a concentração dos elementos presentes na amostra.

2.3.1 Fonte de nêutrons

Para a irradiação das amostras é necessária uma fonte de nêutrons que consiga manter fluxo constante de nêutrons com certa distribuição de energia. Existem diversas fontes de nêutrons, como aceleradores, fontes radioativas e reatores nucleares. Os aceleradores produzem nêutrons rápidos e as fontes radioativas são pequenas e compactas, permitindo o seu transporte para diferentes locais. No entanto, a maioria dos estudos de ativação neutrônica utiliza um reator nuclear como fonte de nêutrons. A produção de nêutrons em reatores nucleares deriva das reações de fissão nuclear de algum elemento radioativo. O processo de fissão espontâneo origina mais nêutrons que irão interagir com outros núcleos, produzindo uma reação em cadeia, o núcleo físsil

mais utilizado em reatores de pesquisa é o ^{235}U . Em um reator nuclear de pesquisa, o fluxo de nêutrons térmicos pode alcançar valores entre 10^{10} e 10^{14} $\text{n s}^{-1} \text{cm}^{-2}$, possuindo também um menor fluxo de nêutrons epitérmicos e rápidos. Em alguns estudos são utilizados filtros de Cádmio (1 mm) e Boro que bloqueiam a passagem dos nêutrons térmicos, utilizando-se os nêutrons epitérmicos no processo de ativação.

O reator usado neste estudo foi o TRIGA IPR-R1 (TRIGA - Training, Research, Isotopes, General Atomics) é um reator TRIGA Mark I, fabricado pela Gulf General Atomic (EUA) [2.8]. É um reator inerentemente seguro, utilizado para treinamento, pesquisa e produção de radioisótopos. O reator TRIGA foi inaugurado em 1960, no CDTN/CNEN em Belo Horizonte, e inicialmente operava a potência de 30 kW. Em 1972 ele passou a ser operado a potência de 100 kW. Desde 2003, sua potência de operação máxima é de 250 kW, no entanto ele ainda vem sendo operado a 100 kW. O combustível utilizado é o urânio enriquecido a 20% com 63 elementos combustíveis. O principal moderador deste reator é o hidreto de zircônio, homoganeamente misturado com o urânio. A refrigeração é feita com água leve desmineralizada, utilizando um refletor de grafita. Para controlar a reação em cadeia, são usadas três barras de carbeto de boro. Existem três dispositivos para irradiação: o tubo central, a mesa giratória e o sistema pneumático, sendo que valor médio do fluxo de nêutrons térmicos e epitérmicos na mesa giratória é de $6,6 \times 10^{11}$ e $3,0 \times 10^{10}$ $\text{n cm}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. A *figura 2.2* mostra um desenho da estrutura do Reator TRIGA MARK I IPR-R1.

Durante a irradiação, as amostras são armazenadas em recipientes feitos de um material que suporte o fluxo de nêutrons, podendo ser feitos de polietileno, alumínio ou quartzo. O polietileno geralmente é utilizado na irradiação de nêutrons térmicos. Porém, para fluxos de nêutrons muito altos, o polietileno se deteriora, tornando-se quebradiço e aumentando o risco de vazamento. Em recipientes de alumínio, o ^{27}Al (100% abundância isotópica) é ativado gerando ^{28}Al , porém a meia-vida deste radioisótopo é de 2,3 minutos, interferindo muito pouco durante a espectrometria gama. O vidro de quartzo geralmente é utilizado quando é necessária a irradiação de líquidos, devendo se levar em conta a pureza do quartzo, pois elementos presentes no vidro podem ser ativados, interferindo na análise.

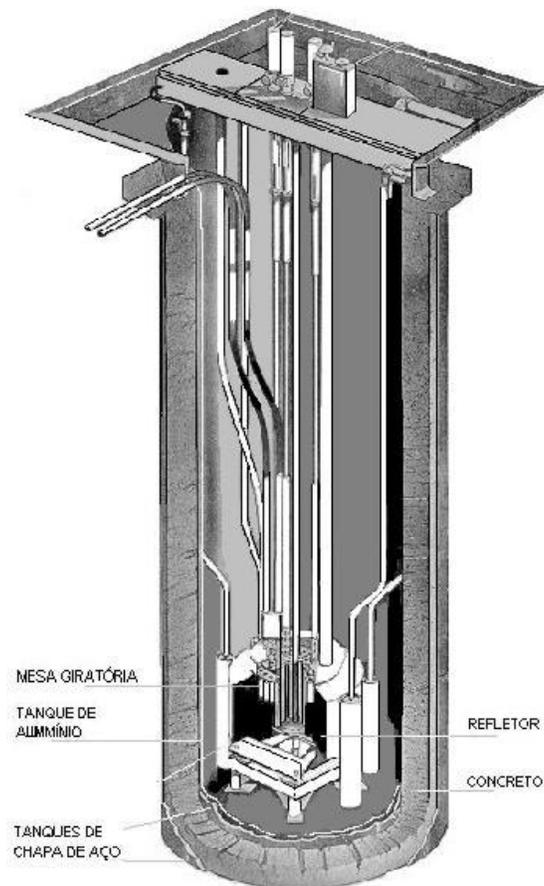


Figura 2.2 – Esquema do Reator TRIGA MARK I IPR-R1.
(fonte: www.cdtm.br, consultado em julho de 2008)

2.3.2 Detectores e amplificadores

A interação de raios gama com a matéria pode ocorrer através de três processos: efeito fotoelétrico, espalhamento Compton e produção de pares. No efeito fotoelétrico, um fóton é absorvido pelo átomo, ocorrendo emissão de um elétron (fotoelétron). A energia do fotoelétron é igual à energia do fóton menos a função trabalho do material. Assim, quando um raio gama incide em um átomo, elétrons nas camadas internas (maior energia) podem ser arrancados, ionizando o átomo e gerando fotoelétrons com até milhares de keV. Este processo é acompanhado por um rearranjo da camada eletrônica: para ocupar o buraco na camada interna do átomo, os elétrons das camadas superiores vão para as camadas internas, produzindo raios-x característicos que são emitidos ou absorvidos por outros elétrons. Nos detectores semicondutores, o efeito fotoelétrico é utilizado na detecção dos raios gama. Os níveis de energia permitidos aos

elétrons livres nos materiais semicondutores estão separados em duas bandas: a banda de valência (banda ocupada pelos elétrons) e a banda de condução (desocupada). Entre as duas bandas existe uma banda de energia proibida (*band gap*). Assim, para que um elétron absorva um fóton é necessário que a energia do fóton seja igual ou maior que esta banda de energia proibida. O detector semiconductor mais utilizado é o germânio ultra puro HP-Ge (do inglês, *High purity Germanium*). Estes detectores são utilizados por possuírem uma excelente resolução, embora possuam baixa eficiência. A eficiência nominal[†] varia conforme o detector utilizado. O detector MAESTRO, utilizado em nossos experimentos, possuía uma eficiência nominal de 50%. A *figura 2.3* mostra um desenho esquemático da câmara de detecção.

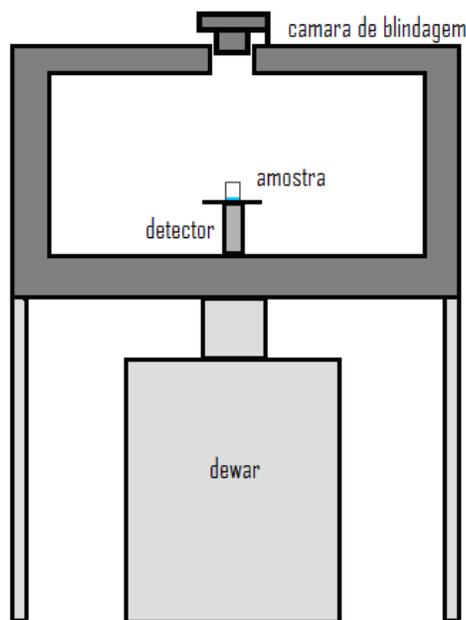


Figura 2.3 – Desenho esquemático de um sistema de detecção contendo um detector HP-Ge, um dewar de nitrogênio liquefeito para resfriamento, e uma câmara de blindagem de chumbo onde é inserida a amostra.

As paredes da câmara são feitas de chumbo para reduzir o ruído devido a radiação de background. Um *dewar* de nitrogênio líquido é usado no resfriamento do detector (77 K). Por possuir uma excelente resolução entre os picos (~ 1 keV), o detector HP-Ge consegue identificar radioisótopos com picos de emissão muito próximos. No entanto, eficiência de detecção deste aparelho é baixa quando comparada

[†] Eficiência comparada a um padrão de iodeto de sódio (INa).

a outros tipos de detectores. Assim, para experimentos onde o mais importante seja as contagens por minuto (cpm) em uma determinada faixa de energia, podem ser usados outros tipos de detectores, que possuam uma eficiência maior, mas que no entanto possuem uma menor resolução. O detector poço utilizado nos experimentos de biodistribuição de nanopartículas de ouro em camundongos possuía uma eficiência de 39% para faixas de energia de 412 keV.

Para a aquisição de dados durante a espectrometria gama, além do detector gama, são necessários um pré-amplificador de sinal, um amplificador e um software de aquisição de dados. Após a transformação, pelo detector gama, do fóton originado do núcleo (raios gama) ou da camada eletrônica do isótopo (Raios-X característicos) em um pequeno pulso elétrico, o pré-amplificador transforma o pulso gerado em um sinal detectável pelo amplificador. Ao chegar ao amplificador, o sinal adquire forma e é novamente amplificado (máximo de 10 V). A amplitude final do pulso será proporcional a energia do fóton original.

2.3.3 Aquisição e processamento de sinais

Depois de amplificados, os sinais são enviados a um computador e separados por canais de aquisição, cada canal corresponde a uma determinada faixa de energia (entre 1 e 2 keVs), varrendo-se uma faixa de 0 a 2048 monocanais. A partir deste ponto, o software *Genie 2000* (Canberra) [2.9] é utilizado na aquisição e análise dos sinais, gerando o espectro de emissão gama e raios-X característicos dos radionuclídeos presentes na amostra.

Após a aquisição do espectro da amostra, a próxima etapa consiste na identificação e quantificação dos nuclídeos a partir da energia e a altura dos picos. Para a identificação dos nuclídeos, deve-se utilizar uma biblioteca de dados dos radioisótopos a partir de catálogos ou de dados de centros de pesquisa disponíveis na internet [2.10]. Em alguns casos, devido à resolução de 1 a 2 keV, não é possível determinar de qual elemento é determinado pico de emissão. No entanto, este problema pode ser contornado cruzando-se dados como secção de choque dos nuclídeos, meia-vida dos radioisótopos e intensidade dos demais picos de emissão gama.

2.4 Isótopos de interesse

Nestes trabalhos, foram realizados diversos estudos paralelos, em cada um destes estudos existiam um ou mais isótopos cujas propriedades nucleares deviam ser analisadas. Os principais isótopos são mostrados na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Isótopos: abundância isotópica natural (Θ), secção de choque para nêutrons térmicos (σ), produto da ativação, meia-vida ($t_{1/2}$), modo de decaimento, energia de emissão gama e núcleo filho [2.10].

Núcleo alvo	Θ (%)	σ (barns)	Produto	$t_{1/2}$	Modo de decaimento	Energia gama (keV) (Intensidade %)	Núcleo filho
^{124}Xe	0.1	165	^{125}Xe	16.9 h	EC	188 (55), 243 (29), 55 (6)	^{125}I
^{126}Xe	0.09	3.5	^{127}Xe	36.4 d	EC	203 (68), 172 (26), 375 (17)	^{127}I
^{128}Xe	1.91	8	$^{129\text{m}}\text{Xe}$	8.89 d	IT	40 (8), 197 (5)	^{129}Xe
^{129}Xe	26.4	21	^{130}Xe	estável	—	—	—
^{130}Xe	4.1	0.45	$^{131\text{m}}\text{Xe}$	11.9 d	IT	164 (2)	^{131}Xe
^{130}Xe	4.1	26	^{131}Xe	estável	—	—	—
^{131}Xe	21.2	85	^{132}Xe	estável	—	—	—
^{132}Xe	26.9	0.05	$^{133\text{m}}\text{Xe}$	2.19 d	IT	233 (10)	^{133}Xe
^{132}Xe	26.9	0.45	^{133}Xe	5.24 d	IT	233 (10)	^{133}Xe
^{134}Xe	10.4	0.27	^{135}Xe	9.14 h	β^-	250 (90), 608 (3)	^{135}Cs
^{136}Xe	8.9	0.26	^{137}Xe	3.81 min	β^-	455 (31), 849 (1)	^{137}Cs
^{12}C	98.9	0.004	^{13}C	estável	—	—	—
^{13}C	1.1	0.001	^{14}C	5700 y	β^-	—	^{14}N
^{28}Si	92.2	0.177	^{29}Si	estável	—	—	—
^{29}Si	4.7	0.101	^{30}Si	estável	—	—	—
^{30}Si	3.1	0.107	^{31}Si	2.62 h	β^-	1266 (0.07)	^{31}P
^{197}Au	100	98.6	^{198}Au	2.69 d	β^-	411.8 (98.99)	^{198}Hg
^{40}Ar	99.6	0.67	^{41}Ar	1.82 h	β^-	1293.6 (99.16)	^{41}K
^{23}Na	100	0.53	^{24}Na	14.99 h	β^-	1368.6 (99.99) 2754.0 (99.85)	^{24}Mg
^{59}Co	100	37.2	^{60}Co	5.27 y	β^-	1173.228 (99.85) 1332.49 (99.98)	^{60}Ni

O primeiro elemento, xenônio, foi utilizado no estudo de um filme de carbono amorfo dopado com átomos de xenônio visando à fabricação de sementes radioativas contendo ^{125}I para tratamentos de câncer. Dentre os isótopos naturais, o de maior interesse é o ^{124}Xe , que possui abundância natural de 0,1%. Este isótopo pode ser utilizado na produção de ^{125}I pelo processo de ativação neutrônica. O ^{124}Xe possui uma secção de choque para nêutrons térmicos de 165 barns, sendo transmutado em ^{125}Xe . Este por sua vez decai no ^{125}I pelo processo de captura eletrônica (EC), emitindo principalmente raios gama de 188 keV (55%), 242 keV (29%) e 55 keV (6%). O ^{125}I é um radioisótopo com uma meia-vida em torno de 60 dias, decaindo em ^{125}Te pelo processo de captura eletrônica, possui um pico de emissão gama de 35,5 keV de 7%, sendo o restante por conversão interna (IC). O ^{125}I vem sendo usado em tratamentos de câncer devido à sua baixa energia, impedindo que tecidos sadios adjacentes ao local de tratamento sejam danificados. O carbono e o silício são elementos presentes no filme e por isso informações de seus isótopos naturais (^{12}C , ^{13}C , ^{28}Si , ^{29}Si e ^{30}Si) foram inseridos na tabela.

O ouro foi utilizado em estudos de biodistribuição e toxicologia de nanopartículas de ouro ativadas em camundongos. A figura 2.4 mostra a cadeia de decaimento do ^{198}Au . O ^{197}Au possui abundância isotópica de 100% e sua secção de choque é de 98,6 e 1550 barns para captura de nêutrons térmicos e na frequência de ressonância, respectivamente. O produto da ativação neutrônica, o ^{198}Au , possui meia-vida de 2,69 dias, decaindo em ^{198}Hg por emissão beta. O principal pico de emissão gama do ^{198}Au é de 411,8 keV (98,99%), este pico de emissão gama será usado na detecção do ^{198}Au presente na amostra e, conseqüentemente, medir a concentração de ouro. O detector que será utilizado para a contagem gama é o detector de poço, que possui uma alta eficiência (39%) para essa faixa de energia (412 keV), diminuindo o tempo necessário para a contagem do ^{198}Au nas amostras.

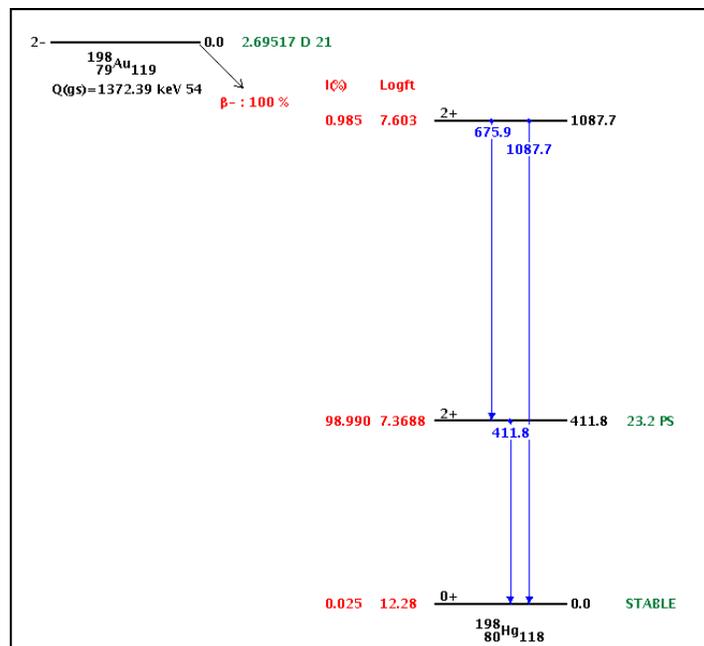


Figura 2.4 – Decaimento por emissão β^- do ^{198}Au em $^{198\text{m}}\text{Hg}$, seguido pela emissão de raios gama até alcançar o estado fundamental (^{198}Hg).
(fonte: National Nuclear Data Center, www.nndc.bnl.gov/chart/ consultado em julho de 2008)

O sódio é um dos elementos usados na síntese das nanopartículas de ouro. Na ativação neutrônica, o ^{23}Na é convertido em ^{24}Na e decai em ^{24}Mg por emissão beta (figura 2.5). Um dos picos de emissão gama observados neste processo é o de 1773 keV (99,85%).

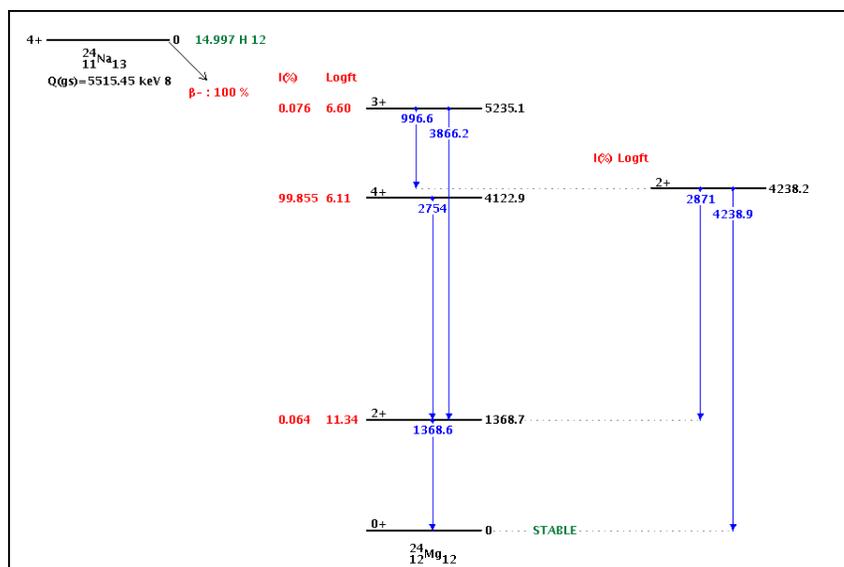


Figura 2.5 - Decaimento por emissão β^- do ^{24}Na em $^{24\text{m}}\text{Mg}$, seguido pela emissão de raios gama até alcançar o estado fundamental (^{24}Mg).
(fonte: National Nuclear Data Center, www.nndc.bnl.gov/chart/ consultado em julho de 2008)

O cobalto é um dos metais utilizados na síntese de nanotubos de carbono de parede única (SWCNT), atuando como catalisador junto com o níquel. O produto da síntese na câmara de arco-elétrico possui, além dos nanotubos, carbono amorfo e os metais usados na catálise. A partir da NAA do cobalto, será feito um estudo da eficiência nos processos de purificação dos nanotubos de carbono. O cobalto possui um único isótopo natural, o ^{59}Co , com secção de choque de 37,2 b. O radioisótopo produzido ^{60}Co , possui uma meia-vida de 5,27 anos, decaindo em ^{60}Ni por emissão beta. Os principais picos de emissão gama tem energia de 1173,2 keV (99,85%) e 1332 keV (99,98%). Medindo-se a concentração do cobalto na amostra após diversas etapas de purificação será possível analisar a eficiência deste método e verificar se existem outros contaminantes no processo de síntese. A figura 2.6 mostra a cadeia de decaimento do ^{60}Co .

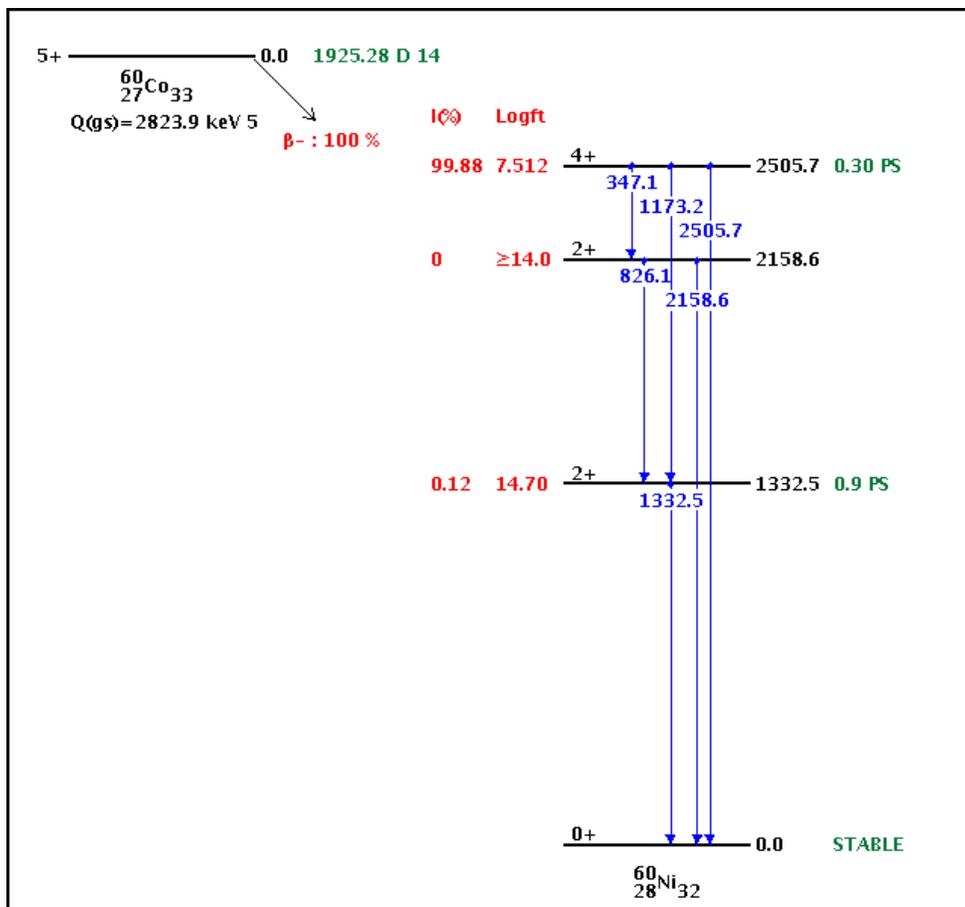


Figura 2.6 – Decaimento beta do ^{60}Co seguido pela emissão de raios gama até atingir o estado fundamental do nuclídeo ^{60}Ni .

(fonte: National Nuclear Data Center, www.nndc.bnl.gov/chart/ consultado em julho de 2008)

O argônio, presente em nossa atmosfera (~ 1%), geralmente é detectado na NAA, pois os tubos em que são inseridas as amostras para a irradiação são herméticos, impedindo que o ar presente nestes tubos saia após a irradiação ou detecção gama. Um dos isótopos naturais do argônio, o ^{40}Ar , possui abundância isotópica de 99,6% e seção de choque relativamente baixa (0,67 b). No entanto, possui um pico gama com intensidade de 99,16% (veja figura 2.7).

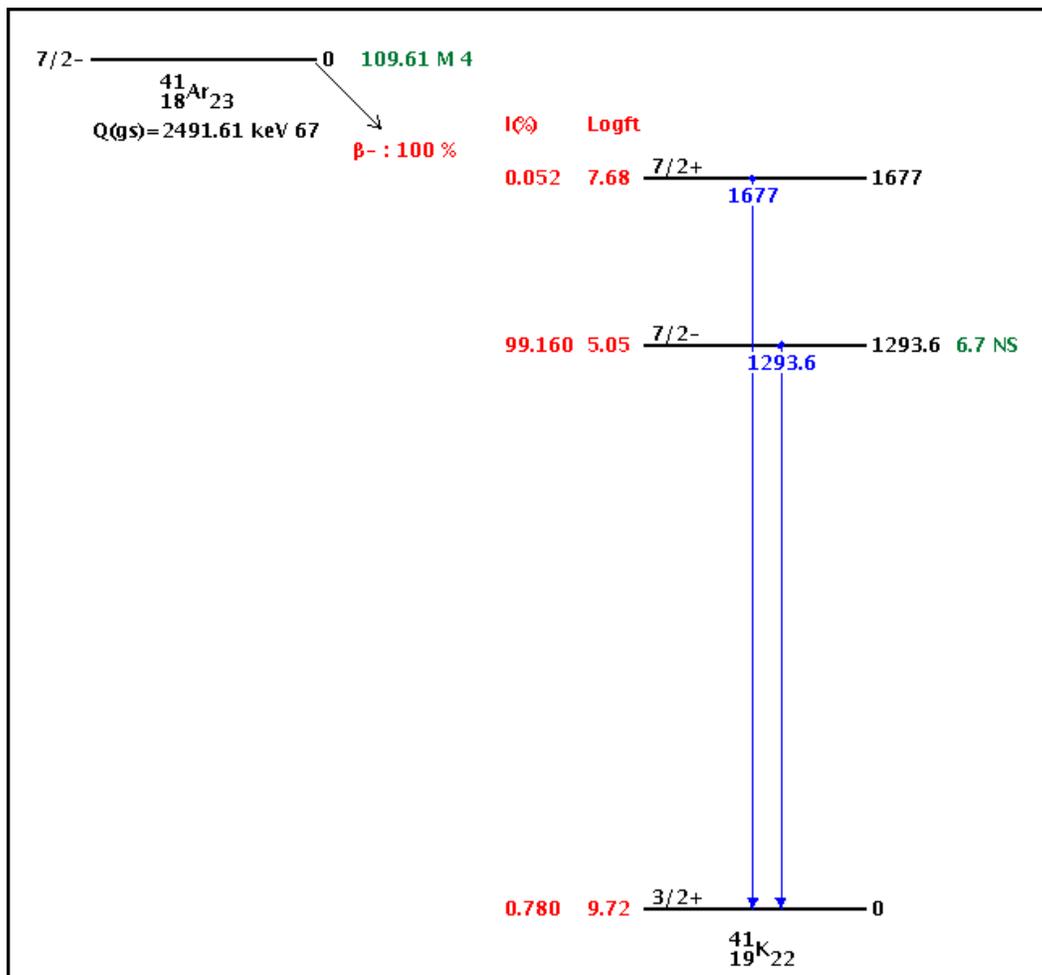


Figura 2.7 - Decaimento por emissão β^- do ^{41}Ar em $^{41\text{m}}\text{K}$, seguido pela emissão de raios gama até alcançar o estado fundamental (^{41}K).

(fonte: *National Nuclear Data Center*, www.nndc.bnl.gov/chart/ consultado em julho de 2008)

2.4 Referências

[2.1] Susan J Parry; *Neutron Activation Analysis*; Viridian Publishing (2003)

- [2.2] V. Valkovic; Trace Elements in Coal; CRC (2003)
- [2.3] K. A. Smith (ed.); Soil Analysis; Marcel Dekker (1983)
- [2.4] Randy V. Heysek, MD, FACRO; *Modern Brachytherapy for Treatment of Prostate Cancer*; Cancer Control 14 (2007)
- [2.5] Referencia da Figura
- [2.6] J. S. Lilley; Nuclear Physics: Principles and Applications; 2001
- [2.7] A. Simonits, F. De Corte e J. Hoste; *Single Comparator methods in reactor neutron activation analysis*; J. Radioanal. Chem. 24, 31-46 (1975)
- [2.8] Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear: <http://www.cdtm.br/>
- [2.9] Koskelo M J, Mercier M T; Quality assurance of automated gamma-ray spectrometric analysis; Applied Radiation and Isotopes **53**, 237-241 (2000)
- [2.10] National Nuclear Data Center: <http://www.nndc.bnl.gov/chart/>

Capítulo 3 – Filme de carbono amorfo para aplicações em braquiterapia

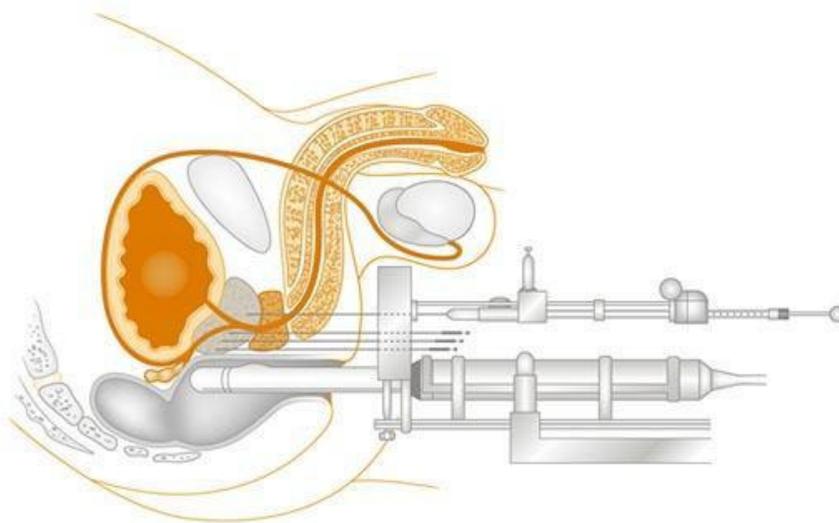
3.1 Introdução

A braquiterapia é uma técnica de tratamento de tumores onde uma fonte radioativa é introduzida próximo ou no interior do corpo do paciente visando irradiar o tumor (J. Woolsey, 2003) [3.1]. Este tipo de tratamento teve início em 1901 quando foram utilizadas pequenas quantidades de rádio em lesões da pele por um curto período de tempo. No entanto, a braquiterapia começou a ganhar força somente após a segunda guerra mundial na década de 50 quando foram criados novos métodos de fabricação de tubos radioativos, precursores das sementes braquiterápicas, diminuindo a exposição dos manipuladores à radiação.

Nos tratamentos utilizando sementes braquiterápicas, os radioisótopos localizados no interior da semente decaem espontaneamente em outros isótopos – instáveis ou estáveis –, emitindo radiação beta, gama e alfa durante o processo de decaimento. Esta radiação atinge o tecido biológico próximo à semente, levando à morte celular e reduzindo o volume do tumor. A braquiterapia pode ser utilizada no tratamento de tumores do cérebro, pulmão, olhos, fígado, baço, esôfago, próstata e seio [3.2]. A principal vantagem da braquiterapia está em seu tratamento localizado, diminuindo a dose absorvida pelo tecido sadio e reduzindo sensivelmente os efeitos colaterais devido a exposição do paciente à radiação.

A braquiterapia pode ser dividida em quatro tipos [3.2]: A **braquiterapia superficial** é usada no tratamento de tumores superficiais através de uma fonte lacrada colocada próximo ao tumor. A fonte utilizada na maioria dos casos é uma placa de ^{90}Sr selada por um invólucro de prata; a **braquiterapia intravascular** insere um cateter com material radioativo no interior do vaso sanguíneo. O radioisótopo mais difundido para esse tratamento também é o ^{90}Sr ; A **braquiterapia intracavitária** e **endoluminal** insere o material radioativo no interior de cavidades pré-existentes do corpo, esse tratamento é mais difundido em terapias ginecológicas. Por último, temos a **braquiterapia intestinal**, onde o material radioativo é inserido dentro do tecido tumoral, inicialmente eram usadas agulhas contendo ^{226}Ra , porém tratamentos mais modernos usam fios de ^{192}Ir ou sementes de ^{125}I para o tratamento do câncer de próstata. A braquiterapia se divide ainda em tratamentos que utilizam fontes de alta dose (HDR) e baixa dose (LDR).

Em tratamentos utilizando fontes de baixa dose (LDR), são utilizadas as sementes braquiterápicas com radioisótopos de meia-vida relativamente curta, como o ^{125}I ($t_{1/2} \sim 60$ dias). As sementes são implantadas individualmente no local do tratamento, dentro e/ou ao redor da lesão, através de agulhas braquiterápicas. Na figura 3.1 é mostrado um desenho esquemático da implantação de sementes radioativas através de agulhas braquiterápicas para o tratamento de câncer de próstata.



© Current Medicine

Figura 3.1 - Esquema de implantação de sementes utilizando agulhas braquiterápicas.
(fonte: <http://www.prostatelineimageatlas.com>, consultado em julho de 2008)

Os principais radioisótopos usados como fonte radioativa nas sementes braquiterápicas de baixa dose são o ^{103}Pd e o ^{125}I . Neste trabalho, estudaremos o ^{125}I produzido por ativação neutrônica do ^{124}Xe . Neste processo, após a reação $^{124}\text{Xe}(n,\gamma)^{125}\text{Xe}$, o ^{125}Xe (meia-vida de 16,9 horas) decai no ^{125}I , emitindo partículas β - e raios gama. O ^{125}I (National Nuclear Data Center, disponível em: www.nndc.bnl.gov/chart/) possui uma meia-vida de 59,4 dias, decaindo por captura eletrônica no ^{125}Te . No processo de decaimento, 7% da energia é liberada em raios gama de 35,5 keV e o restante é internamente convertido em raios-X com energias entre 27,2 e 31,9 keV. O ^{125}I é comumente utilizado em sementes braquiterápicas no tratamento de câncer de próstata (T. Solberg et al., 2002) [3.3].

Existem diversos modelos de sementes braquiterápicas na literatura que utilizam o ^{125}I como fonte radioativa. Estas sementes vêm sendo aprimoradas a várias décadas, solucionando problemas de fabricação, manipulação e tratamento. As principais características destas sementes são [3.4]: a semente deve emitir uma radiação com

distribuição espacial uniforme; a radiação emitida pela semente deve possuir uma energia relativamente baixa (< 50 keV), do contrário os tecidos sadios adjacentes ao local de tratamento podem ser atingidos e danificados; a semente deve ser visível quando implantada no corpo do paciente para permitir o seu correto posicionamento na área de tratamento; a semente não pode causar nenhum tipo de reação alérgica ou ser tóxica ao paciente; as sementes braquiterápicas em geral possuem dimensões de um grão de arroz, com um diâmetro que varia entre 0,2 e 0,8 milímetros e comprimento entre 2 e 5 milímetros; e, finalmente, a atividade das sementes devem atingir cerca de 1,0 mCi ($3,7 \times 10^7$ Bq). A *figura 3.2* mostra a radiografia de sementes implantadas no corpo do paciente.

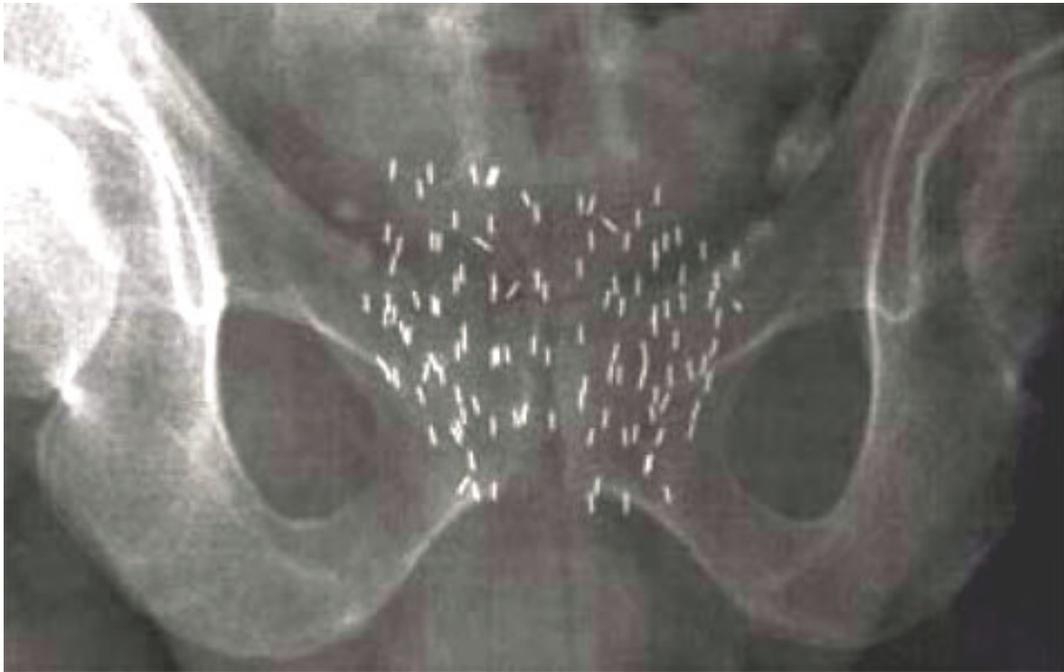


Figura 3.2 - Radiografia de paciente implantado com sementes braquiterápicas
(fonte: <http://www.sgh.com.sg/> consultado em julho de 2008)

Os modelos mais recentes de sementes buscam diminuir o sofrimento do paciente durante o tratamento, reduzir a chance de metástase e aumentar a eficiência do tratamento, bem como diminuir a dificuldade técnica e o custo de produção das sementes. A ProstaSeed® I-125 mostrada na *figura 3.3(a)* possui modelos 125SL e 125SH, de baixa e alta dose respectivamente, as sementes consistem numa cápsula de titânio com 0,05 milímetros de espessura soldada a laser contendo ^{125}I adsorvido em 5 esferas de prata que atuam também como radiomarcadores. As sementes possuem 4,5

milímetros de comprimento e 0,8 milímetros de diâmetro. No entanto, dentre as diversas sementes, a que merece maior destaque é a semente I-Plant^{TM 125}, figura 3.3(b), esta semente é fabricada através da implantação iônica de ¹²⁴Xe em um matriz de cerâmica. Após a implantação, as sementes são irradiadas com nêutrons, convertendo os isótopos de ¹²⁴Xe em ¹²⁵Xe. Posteriormente, o ¹²⁵Xe decai em ¹²⁵I, finalizando o processo. O núcleo da semente possui um marcador de raios-X de prata para visualização através de radiografia. Após a ativação, a semente é encapsulada com um material feito de titânio soldado a laser, garantindo grande resistência mecânica e evitando um problema comum de diminuição de dose nas extremidades da semente. O produto é compatível com agulhas braquiterápicas e aplicadores convencionais.

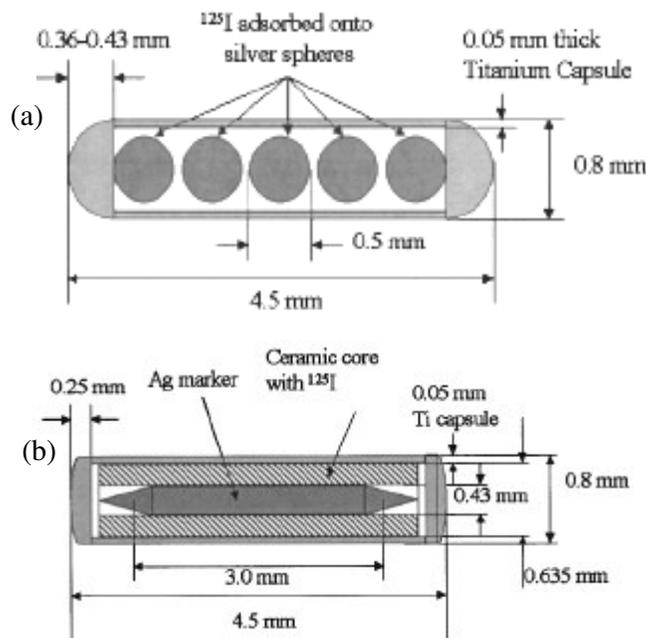


Figura 3.3 – Sementes comerciais ProstaSeed® I-125 (a); e I-Plant^{TM 125} (b) [3.10].

O objetivo do trabalho foi estudar a viabilidade de produção de sementes braquiterápicas através da ativação neutrônica de filmes de carbono amorfo dopados com ¹²⁴Xe. Os filmes finos (~ 100 nm) de carbono amorfo (filmes a-C) são materiais nanoestruturados que vêm sendo estudados e caracterizados ao longo das últimas duas décadas. Estes filmes possuem inércia química, propriedades mecânicas estáveis e são de fácil deposição e fabricação, tornando-os dispositivos de baixo custo de produção. As propriedades e estrutura dos filmes a-C variam conforme a proporção de ligações híbridas sp^2 e sp^3 entre os átomos de carbono (Lacerda et al., 2003) [3.5]. Estes materiais são de interesse para pesquisas principalmente por suas propriedades

eletrônicas que podem ser aplicadas na fabricação de telas planas ultrafinas (Amaratunga, 1996) [3.6]. Quando gases nobres (NG, *noble gases*) são implantados em uma matriz de carbono, estes se precipitam, formando *clusters*. Segundo Lacerda, estes NG clusters interagem com a matriz de carbono, alterando a pressão interna da rede. Segundo Lacerda, através de uma técnica de deposição de íons durante o crescimento do filme (IBAD, ion beam-assisted deposition), a pressão interna (ou estresse intrínseco) do filme de carbono podia ser modificada (1-11 GPa)

Um esquema da estrutura do filme pode ser visualizado na *figura 3.4*. O alto estresse intrínseco deste filme permite que os átomos sejam “aprisionados” a alta pressão, aumentando a concentração destes dopantes a taxas não obtidas através de outras técnicas, como a implantação iônica. As propriedades citadas acima permitem a fabricação de sementes contendo ^{124}Xe que, quando irradiadas, produzem sementes contendo ^{125}I , podendo ser usadas em tratamentos braquiterápicos.

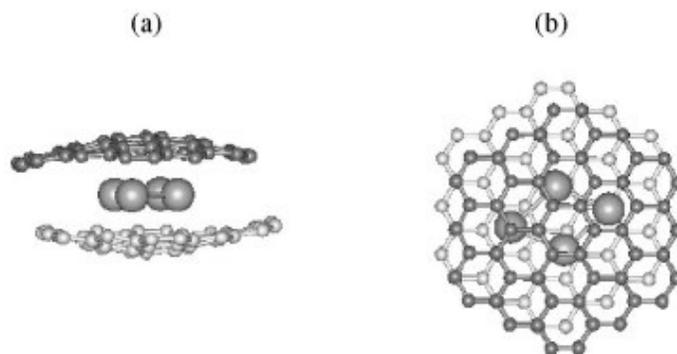


Figura 3.4 – Modelo esquemático do aprisionamento de clusters de gás xenônio entre folhas de carbono amorfo [3.5].

3.2 Materiais e Métodos

Os filmes foram preparados no Instituto de Física da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por deposição assistida de feixe iônico duplo (IBAD). Neste processo [3.5], em uma câmara a baixa pressão de 10^{-5} Pa, um feixe iônico de xenônio (99,999%) com energia de 1500 eV e corrente de 90 mA atinge um alvo de grafite. O carbono arrancado do alvo de grafite se deposita sobre um substrato de silício. Simultaneamente, um segundo feixe de xenônio com energia entre 0 e 400 eV incide sobre o filme de carbono durante o processo de crescimento. A pressão durante o

crescimento dos filmes foi mantida a 6×10^{-2} Pa. O resultado final foi um filme rico em ligações sp^2 e espessura variando entre 80 e 100 nm. A pressão interna do filme de carbono amorfo pode variar entre 1 e 12 GPa controlando-se as condições de deposição. O filme de carbono amorfo analisado possuía uma densidade de (2.2 ± 0.2) mg mm^{-3} e as amostras possuíam massas entre 19 e 31 mg. A massa de carbono amorfo em cada filme foi calculada a partir da densidade, espessura e massa total do filme. Quatro amostras foram irradiadas no reator nuclear TRIGA MARK-I localizado no centro de pesquisa do CDTN/CNEN, operando a 100 kW. O fluxo médio de nêutrons térmicos e epitérmicos foi de $6,6 \times 10^{11}$ e $3,0 \times 10^{10}$ n $cm^{-2} s^{-2}$ respectivamente. Os tempos de irradiação foram de 2, 4 e 8 horas. Após a irradiação, as amostras foram caracterizadas por espectrometria gama com um detector de germânio HP (Hiper-puro) com 15% de eficiência nominal e 1,85 keV FWHM para picos de 1332 keV de cobalto-60. As amostras irradiadas foram medidas a 5 e 10 cm de distância fonte-detector.

A massa do filme de carbono foi calculada através da sua densidade, espessura e área. Na *tabela 3.1* são mostrados os dados de cada amostra: a massa do substrato de silício (M_{Si}); a massa do filme de carbono amorfo (M_{a-c}); o tempo de irradiação (t_i) e o fluxo integrado (Φ); e, para as amostras analisadas por espectrometria gama, a distância amostra-detector (d) e o tempo de contagem (t_c).

Tabela 3.1 – Parâmetros da amostras estudadas

Sample	M_{Si} (± 1 mg)	M_{a-c} (± 0.2 ng)	t_i (h)	Φ (n cm^{-2})	d (cm)	t_c (min)
1	23	4.3	8	1.47×10^{15}	5	30
2	22	4.1	-	-	-	-
3	23	4.3	2	3.69×10^{14}	-	-
4	31	5.8	-	-	-	-
5	25	4.7	4	7.37×10^{14}	10	120
6	19	3.6	8	1.47×10^{15}	10	120

O software GENIE 2000 (CANBERRA) foi usado para aquisição de dados e análise do espectro. Neste software, os picos gama do espectro foram cruzados com um banco de dados para identificar os isótopos. O número de isótopos (N) foi determinado através da *equação 2.7* (abaixo) [3.7], onde: área dos picos (A); a eficiência do detector gama (ϵ); a abundância isotópica (θ); a secção de choque (σ); a constante de decaimento

do nuclídeo ativado (λ); o fluxo de nêutrons (φ); e os tempos de irradiação (t_i), decaimento (t_d) e contagem (t_c).

$$N = \frac{A}{K e^{-\lambda t_d} \times (1 - e^{-\lambda t_i}) \times (1 - e^{-\lambda t_c})}, \quad \text{onde } K = I \times \varepsilon \times \theta \times \sigma \times \varphi \times \lambda^{-1}$$

Através desta equação e da equação de decaimento radioativo mostrado na equação 3.1 [3.7], foi possível calcular a quantidade necessária de isótopos de ^{124}Xe sob um fluxo neutrônico de $10^{13} \text{ n s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Através destes resultados, construiu-se um modelo de semente braquiterápica a partir de um filme de carbono amorfo dopado com ^{124}Xe .

$$A(t) = A_0 \times \exp(-\lambda t) \quad (3.1)$$

O software ChainSolver (Romanov, 2003) [3.8] também foi utilizado no cálculo da atividade do modelo de semente. Neste software, foram inseridos como parâmetros os isótopos que se desejava analisar (^{124}Xe , ^{125}Xe , ^{125}I neste caso particular), a massa das amostras irradiadas, o tempo de irradiação, o fluxo de nêutrons, a energia dos nêutrons e o tempo decorrido após a irradiação. Os resultados obtidos a partir deste software forneceram informações como massa restante de cada isótopo e a atividade (Curie ou Bequerel) em função do tempo de irradiação ou tempo de decaimento.

3.3 Resultados e discussão

As propriedades nucleares dos isótopos do Xe, C e Si estão listados no capítulo 2 na *tabela 2.1*. A abundância natural, secção de choque, nuclídeos criados durante a ativação neutrônica e suas respectivas meias-vidas, modos de decaimento, emissões gama e nuclídeos filhos também são mostrados (National Nuclear Data Center) [3.9]. Os picos de emissão gama do ^{125}Xe , 188 keV (55%) e 242 keV (29%), foram utilizados para o cálculo da concentração de xenônio nas amostras. O pico de 55 keV (6%) não foi detectado devido a sua baixa intensidade e também por estar na faixa de interferência das emissões de raios-X derivadas das transições eletrônicas dos isótopos após o decaimento radioativo. Apesar da baixa abundância isotópica, o ^{124}Xe possui uma

secção de choque alta para nêutrons térmicos (165 barns). A *figura 3.5* mostra a secção de choque em função da energia dos nêutrons para as reações nucleares $^{124}\text{Xe}(n,\gamma)^{125}\text{Xe}$ (fonte: Nuclear Data Service).

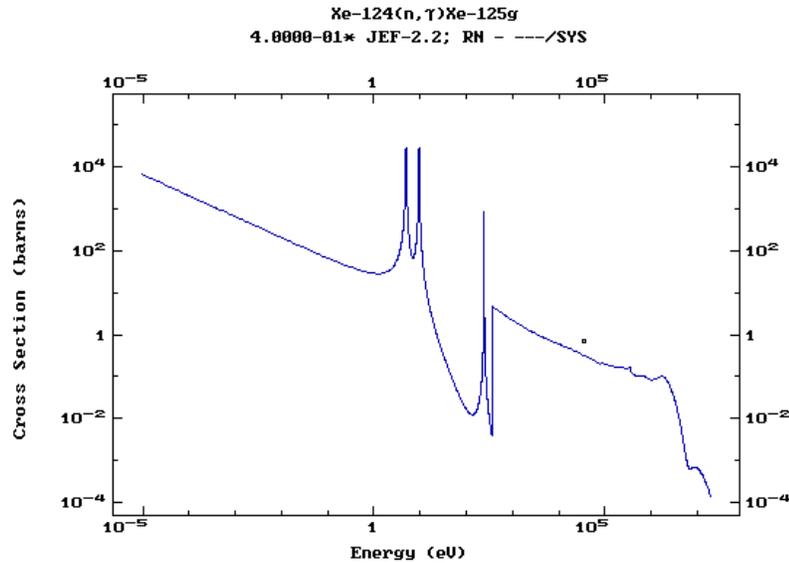


Figura 3.5 – Secção de choque em função da energia dos nêutrons para as reações $^{124}\text{Xe}(n,\gamma)^{125m}\text{Xe}$ e $^{124}\text{Xe}(n,\gamma)^{125}\text{Xe}$. (fonte: <http://www-nds.iaea.org/ngatlas2/> consultado em julho de 2008)

Na figura 3.6 são mostrados os espectros das amostras 1, 5 e 6. A concentração do ^{124}Xe nos filmes foi calculada através das áreas dos picos e dos parâmetros do detector. Os picos de 188 keV e 242 keV foram detectados facilmente e estão em concordância com os valores encontrados na literatura [3.9]. Também detectamos o pico de emissão de 250 keV do ^{135}Xe (250 keV), devido à ativação neutrônica do ^{134}Xe (abundância natural de 10,4% e secção de choque de 0,27 barns e intensidade gama de 90%). Os demais isótopos do xenônio não puderam ser detectados pela análise devido à pequena abundância isotópica natural, baixa secção de choque, fraca intensidade dos picos gama ou meia-vida dos isótopos ativados muito alta. Em relação ao carbono, o ^{14}C produzido pela ativação neutrônica do ^{13}C (estável) não foi detectado por este ser um emissor beta puro. No caso do silício, o único isótopo que é transmutado em um isótopo instável é o ^{30}Si , porém sua abundância natural, secção de choque e intensidade gama são muito baixos, impedindo a detecção. Também pôde ser observada uma mudança de intensidade da radiação de fundo (background) em cada um dos espectros, que pode ser explicada por emissões de raios-X derivadas dos decaimentos secundários.

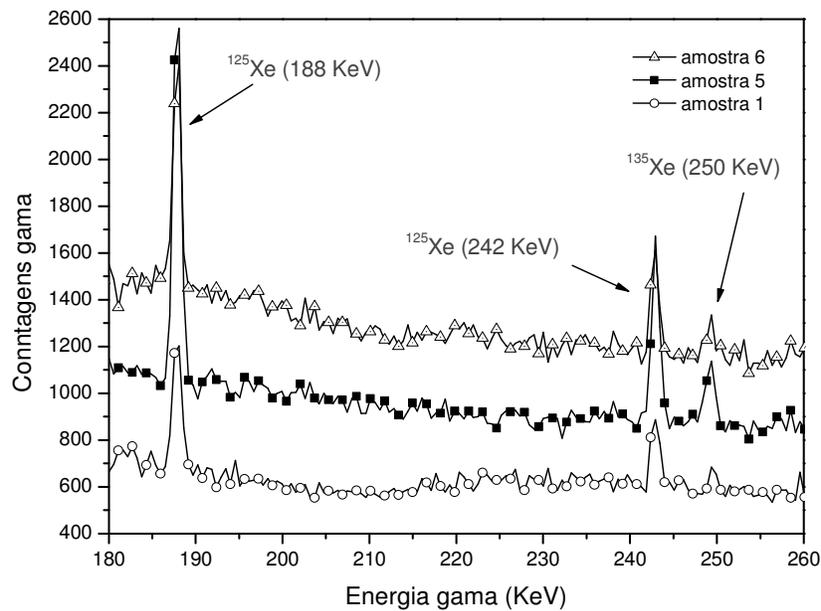


Figura 3.6 – Espectro gama das amostras 1, 5 e 6. Podemos ver em detalhe os picos de emissão gama do ^{125}Xe (188 e 242 keV) e do ^{135}Xe .

Utilizando a equação 2.7 e 3.1 e considerando a geometria amostra-detector para calibrar a curva de eficiência, calculamos a concentração de ^{124}Xe e ^{134}Xe no filme de carbono amorfo. A concentração de xenônio calculada está em acordo com o esperado (5%). Os resultados dos cálculos podem ser visualizados na *tabela 3.2*. Devido a baixa atividade, a concentração de Xe na amostra 1 não foi calculada. As demais amostras não foram levadas ao contador gama, servindo como controle para futuros experimentos.

Tabela 3.2 – Concentração de isótopos no filme de carbono amorfo determinados pela análise de ativação neutrônica.

Isótopos	Concentração (% at.)	
	Amostra 5	Amostra 6
^{124}Xe	$(6.3 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(4.3 \pm 0.5) \times 10^{-3}$
^{134}Xe	0.60 ± 0.06	0.42 ± 0.3
Xe	6.3 ± 0.3	4.3 ± 0.5

A partir destes valores foi possível construir um modelo teórico de uma semente braquiterápica a partir de um filme de carbono amorfo dopado com ^{124}Xe (100% de

abundância isotópica) e irradiada com nêutrons térmicos. Neste modelo teórico, um substrato cilíndrico, feito de titânio ou silício, com dimensões de 5 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro, possui um filme de carbono amorfo com espessura de 20 μm e dopado com ^{124}Xe (5% at.), totalizando $1,4 \times 10^{18}$ isótopos de ^{124}Xe na semente. Um desenho esquemático da semente pode ser visualizado na *figura 3.7*. O fluxo de nêutrons térmicos utilizado como parâmetro é de $10^{13} \text{ n s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, calculando-se neste modelo o tempo de irradiação necessário para a produção de uma semente com atividade de 1 mCi ($3,7 \times 10^7 \text{ Bq}$).

A *figura 3.8* mostra as curvas de atividade do ^{125}Xe e ^{125}I ao longo do tempo em nosso modelo de semente após 44 horas de ativação neutrônica. Nota-se que a atividade do ^{125}Xe logo após a irradiação decai rapidamente devido à meia-vida de 16,9 horas. A atividade do ^{125}I , por sua vez, sofre um aumento nos primeiros dias devido ao decaimento do ^{125}Xe em ^{125}I e também à sua meia-vida de 60 dias. Assim, próximo aos 7 dias após a irradiação, a atividade do ^{125}Xe será residual e a atividade do ^{125}I será de 1,10 mCi ($4,1 \times 10^7 \text{ Bq}$). Esta atividade se manterá por um período relativamente longo, possibilitando o transporte das sementes. Com base nos resultados descritos acima, pode-se notar que os parâmetros de síntese e irradiação são suficientes para se criar sementes radioativas com doses próximas a 1 mCi necessárias em tratamentos braquiterápicos. Um pedido de patente foi depositado basendo-se nos cálculos deste trabalho e tomando-se como referência o modelo de patente estudado.

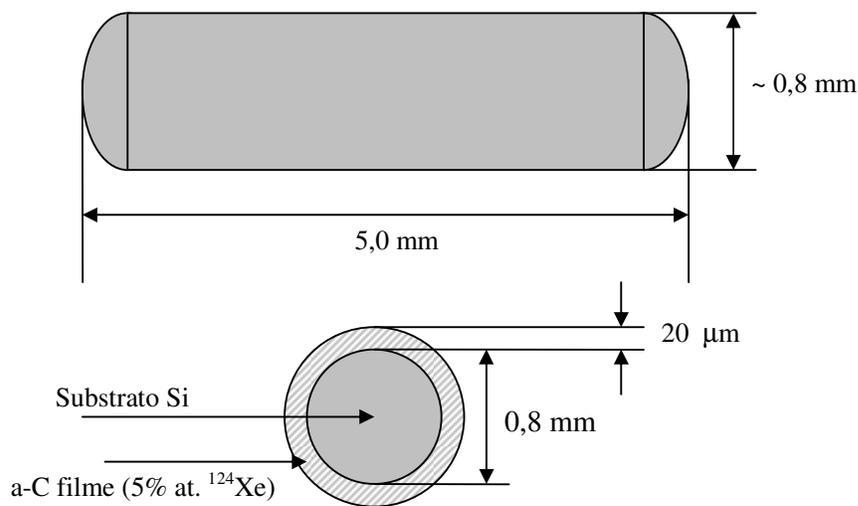


Figura 3.7 – Modelo de semente braquiterápica com 5 mm de comprimento, 0,8 mm de diâmetro e um filme de a-C com 20 μm de espessura (5% at. ^{124}Xe). A semente pode ainda ser encapsulada com um material radiopaco.

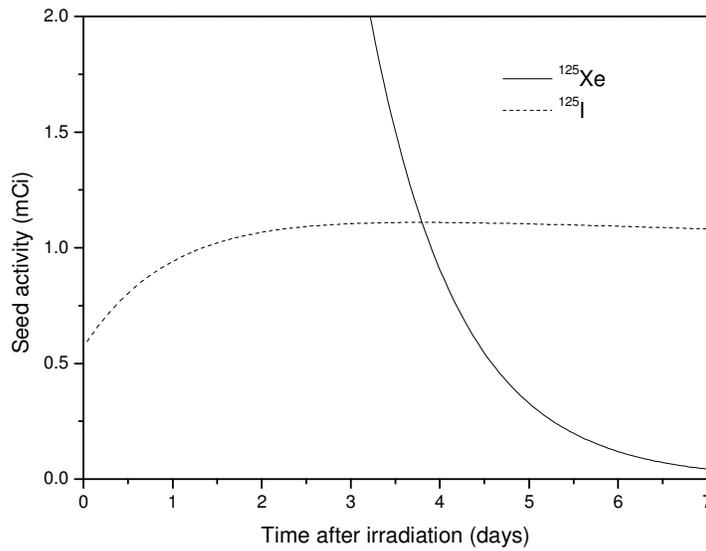


Figura 3.8 - Atividade do ^{125}I e ^{125}Xe após ativação neutrônica.

3.4 Conclusões

Neste estudo, caracterizamos filmes finos de carbono amorfo dopados com xenônio produzidos pela técnica IBAD. Os resultados obtidos pela ativação neutrônica dos filmes e análise gama do espectro dos isótopos ativados mostraram ser viável a produção de uma semente braquiterápica de 5 mm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro e com um filme a-C de 20 μm de espessura. Após a irradiação da semente durante 44 horas a um fluxo de $10^{13} \text{ n s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, é possível atingir atividades próximas a 1 mCi, decorrido um período de tempo necessário ao decaimento do ^{125}Xe . Utilizando os resultados deste estudo, serão confeccionados modelos de sementes com as dimensões descritas na patente para ativação e análise da atividade do ^{125}I e ^{125}Xe . O material utilizado como matriz para os radioisótopos – o carbono amorfo – permite que os parâmetros das sementes como, geometria, espessura do filme, concentração de ^{124}Xe , material envoltório, substrato, tempo de irradiação e fluxo de nêutrons, sejam alterados conforme o tipo de tratamento.

Esta semente possui uma vantagem em relação às sementes comerciais no que concerne à sua fabricação. Na maioria das sementes comerciais, o ^{125}I (radioativo) é incorporado à semente durante a sua fabricação, aumento o risco de contaminação de equipamento e pessoal envolvido na fabricação. Assim, já na primeira etapa da

confeção das sementes são necessários cuidados relacionados a radioproteção e impedindo que as sementes possam ser fabricadas em qualquer local. Em contrapartida, no presente método o isótopo incorporado a semente na primeira etapa de fabricação é o ^{124}Xe , isótopo não-radioativo. O ^{124}Xe é levado a um reator nuclear e irradiado somente na segunda etapa, permitindo que a primeira etapa da síntese seja realizada em qualquer local, não havendo a necessidade de radioproteção. Como o ^{124}Xe só é irradiado depois de implantado na semente, o risco de contaminação durante o manuseio das sementes também é reduzido.

O método citado acima, onde um isótopo não-radioativo é implantado em uma matriz para posterior ativação neutrônica é utilizado em uma das sementes comerciais citadas. No entanto, o método de incorporação do ^{124}Xe utilizado nesta semente é por implantação iônica, nesta técnica a maior parte dos isótopos implantados ficam localizados na superfície da matriz. A técnica IBAD, por sua vez, produz uma matriz de carbono amorfo dopada com ^{124}Xe em todo o seu volume, aumentando a concentração de isótopos e diminuindo o tempo de irradiação necessário, reduzindo os custos de produção da semente. Outro fator importante é que a matriz de carbono utilizada na semente é inerte e biocompatível, tornando-se ideal para uso medicinal.

Através dos resultados obtidos nos estudos e do modelo de semente calculado, foi depositado um pedido de patente que trata da confecção de sementes braquiterápicas utilizando a técnica de crescimento de filmes de carbono amorfo por feixe duplo de xenônio e posterior ativação neutrônica deste filme. O pedido da patente intitulada “*Processo de fabricação de semente radioativa para braquiterapia através da ativação neutrônica de uma matriz de carbono amorfo dopado com xenônio-124 e produto*”, foi depositado com o número de protocolo 014080003731.

A partir dos resultados obtidos deste estudo, será possível analisar outros materiais que sirvam como matriz de suporte para os radioisótopos. Filmes de nanotubos de carbono têm despertado o interesse de diversos centros de pesquisa devido a enorme área superficial destes materiais. Com base nestas informações e pela facilidade de produção de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, *multi-wall carbon nanotubes*), estes poderão ser usados como matriz de suporte para a adsorção do ^{124}Xe em suas paredes. Também serão estudados outros radioisótopos na fabricação das sementes além do $^{125}\text{Xe}/^{125}\text{I}$, ampliando o potencial de aplicação destes dispositivos.

3.5 Referência

- [3.1] J Woolsey , N Miller e D Theodorescu; *Permanent interstitial brachytherapy for prostate cancer : a current review*; World J Urol 21, 209 (2003).
- [3.2] Alain Gerbaulet et. al; ACCO 2002.
- [3.3] David Bottomley, Dan Ash, Bashar Al-Qaisieh, Brendan Carey, Joji Joseph, Shaun St Clair, Kathy Gould; *Side effects of permanent I125 prostate seed implants in 667 patients treated in Leeds*; Radiotherapy and Oncology 82, 46–49 (2007).
- [3.4] WO9941755-A, R. Robertson, Method for making iodine-125 loaded substrates for use in radioactive sources (1999) e J. Crook, N. Fleshner, C. Roberts, and G. Pond, Journal of Urology **179**, 141-145 (2008).
- [3.5] R. G. Lacerda, M. C. dos Santos, L. R. Tessler, P. Hammer, F. Alvarez, and F. C. Marques; *Pressure-induced physical changes of noble gases implanted in highly stressed amorphous carbon films*; Physical Review B **68** (2003).
- [3.6] Gehan A. J. Amaratunga; *Nitrogen containing hydrogenated amorphous carbon for thin-film field emission cathodes*; Appl. Phys. Lett. **68** 1996.
- [3.7] Susan J Parry; *Neutron Activation Analysis*; Viridian Publishing (2003).
- [3.8] Research Center for Atomic Reactor, I AEA 1404 code, *A tool to calculate nuclear transmutations in a neutron flux*, Chainsolver Romanov, E.G. (2003).
- [3.9] National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory www.nndc.bnl.gov/chart/.
- [3.10] Bret H. Heintz, Robert E. Wallace, James M. Hevezi; *Comparison of I-125 sources used for permanent interstitial implants*; Med. Phys. 28, 4 (2001).

Capítulo 4 – Nanopartículas de ouro

4.1 Introdução

As nanopartículas de ouro (AuNPs), ou ouro coloidal, são as nanopartículas metálicas mais estáveis e também são facilmente sintetizada através de diversos processos. Segundo Marie-Christine (2004) [4.1], o colóide de ouro já era utilizado desde o século V e IV a.C. no Egito e na China, sendo utilizados na coloração de vidro e cerâmica. No entanto, os processos de nucleação e crescimento das AuNPs, bem como suas propriedades físicas microscópicas ainda não eram conhecidas em detalhes. As nanopartículas de ouro só passaram a ser estudadas de uma maneira mais científica no final do século XVIII e início do século XIX após os trabalhos de Faraday, Mie e Turkevich [4.2].

Conforme a ciência envolvendo as nanopartículas foi se desenvolvendo, novos materiais começaram a ser utilizados na síntese de NPs, que passaram a receber classificações agrupando-as em categorias. Nas próximas seções serão descritas as principais categorias das NPs, enfatizando suas características físicas e possíveis aplicações biológicas, enfatizando as nanopartículas de ouro.

4.2 Classificação das NPs

4.2.1 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas de ouro foram as primeiras nanopartículas fabricadas. Isto se deve principalmente à facilidade de redução de íons de ouro presentes em uma solução contendo HAuCl_4^- . A *figura 4.1* mostra uma caneca do século IV, durante a fabricação do vidro, era imersa uma solução contendo nanopartículas de ouro. Devido às características de ressonância de plásmons de superfície, o copo reflete luz verde devido às propriedades do vidro e transmite luz vermelha devido à absorção de luz verde (~500 nm) pelas nanopartículas. Assim, quando é colocada uma fonte de luz no interior da caneca, o vidro passa a assumir uma coloração avermelhada, típica de soluções contendo nanopartículas de ouro com diâmetro médio entre 2 e 20 nm [4.4].



Figura 4.1 – Copo de Licurgo, taça romana do século IV [4.4]
(fonte: The British Museum, www.britishmuseum.org consultado em julho de 2008)

Segundo Marie-Christine (2004) [2.1], as NPs metálicas vêm sendo pesquisadas principalmente devido às suas propriedades ópticas. Elas são utilizadas na medicina na forma de colóides de nanopartículas metálicas, que são nanopartículas em suspensão. À medida que o tamanho das partículas se reduz, propriedades de superfície que normalmente são suprimidas por outros fenômenos, passam a prevalecer.

A fabricação de colóides de nanopartículas metálicas, seguindo critérios químicos, iniciou-se em meados do século XIX com experiências executadas por Michael Faraday [4.5]. Nestes experimentos, uma solução de ácido cloroáurico (HAuCl_4) era reduzida utilizando-se fósforo como agente redutor. O estudo de algumas propriedades físicas destas nanopartículas (NPs) foram realizados por Zsigmondy no fim do século XIX e início do século XX [4.6]. Mais tarde, em meados do século XX, os trabalhos de Turkevich forneceram um conhecimento detalhado sobre a nucleação, crescimento e aglomeração de colóides metálicos e permitiram a reprodutibilidade dos experimentos com uma distribuição de diâmetros de baixo desvio padrão [4.2]. Em geral, as nanopartículas metálicas possuem diâmetros que podem variar entre 2 e 100 nm, dependendo das condições de síntese. A *figura 4.2* mostra imagens por microscopia eletrônica de transmissão de Au-NPs com diversos diâmetros [4.7].

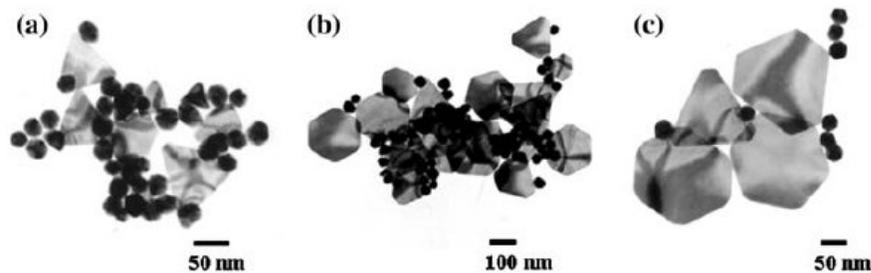


Figura 4.2 – Imagem feita por TEM de nanopartículas de ouro com diferentes diâmetros [4.7].

Diferente do que ocorre nas partículas semicondutoras, a absorção óptica das nanopartículas metálicas não se deve à criação de éxcitons, mas sim à ressonância dos elétrons de condução. Quando ocorre a incidência de ondas eletromagnéticas sob uma solução contendo nanopartículas metálicas – como o ouro e a prata – os elétrons da banda de condução oscilam de forma coerente com o campo elétrico da radiação, este fenômeno é denominado ressonância de plásmons de superfície. Com isto, a secção de choque para a absorção de luz na faixa do ultravioleta e visível (UV-vis) para estas nanopartículas torna-se bem mais intensa [4.8]. Um esquema do fenômeno de plásmon é demonstrado na figura 4.3.

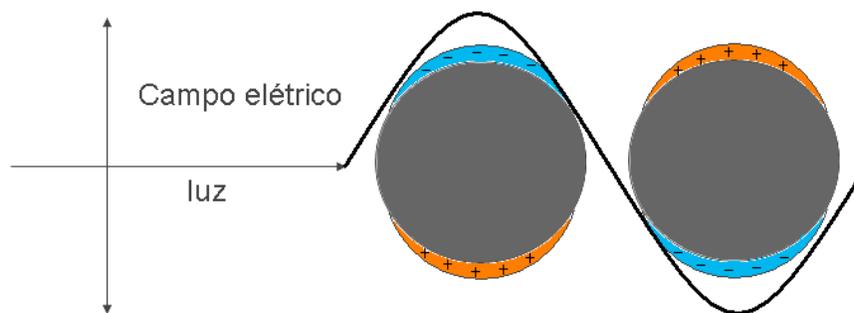


Figura 4.3 – Esquema do fenômeno de plásmon de superfície que ocorre com a incidência de ondas eletromagnéticas sobre nanopartículas metálicas.

Esta energia de oscilação dos elétrons da superfície das nanopartículas é rapidamente convertida em calor ao invés de luz visível (fluorescência), como nos QDs. Assim, o espectro óptico das nanopartículas metálicas é resultado da absorção de luz, não sendo observado um espectro de emissão. A *figura 4.4* mostra o espectro de absorção óptica para nanopartículas de ouro, note que o pico de absorção se desloca para direita com o aumento do diâmetro das Au-NPs [4.7].

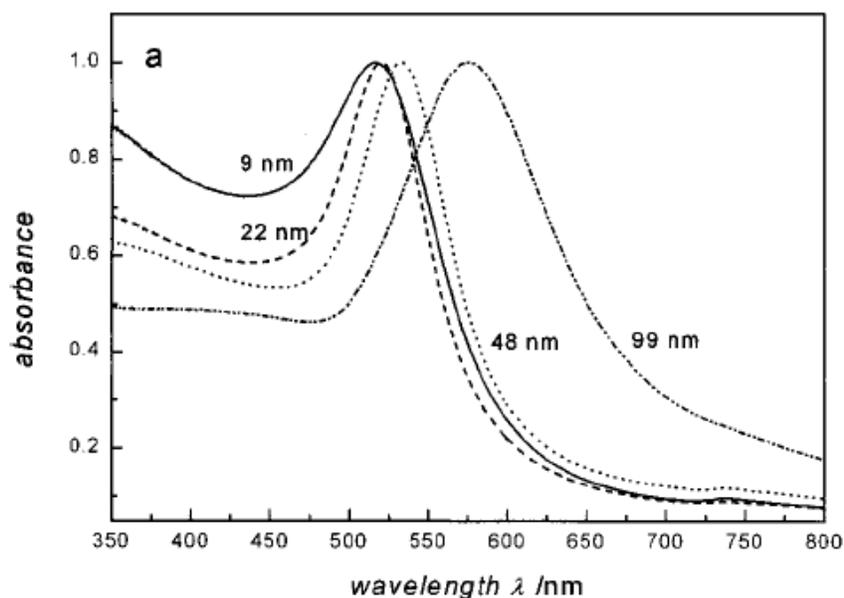


Figura 4.4 – Espectros de absorção óptica UV-vis normalizados. Os picos de absorção óptica de nanopartículas de ouro com diâmetros de 9 nm (517nm), 22 nm (521 nm), 48 nm (533 nm) e 99 nm (575 nm) [4.7].

4.2.2 Nanocápsulas

Novos métodos de síntese têm produzido nanopartículas no qual seu núcleo, entre 1 e 20 nm de diâmetro, é feito com um material dielétrico – como a sílica (SiO_2) e poliestireno – sendo sua superfície recoberta com uma fina camada metálica ou semicondutora de poucos nanômetros [4.10]. Estas partículas são chamadas de *nanocápsulas* (do inglês: *nanoshell*, *core shell* ou *core@shell*). O desenho esquemático da *figura 4.5* mostra o processo de formação da camada de ouro sobre um núcleo de sílica.



Figura 4.5 - Esquema do processo de crescimento de uma fina camada metálica sobre um núcleo dielétrico.

(fonte: <http://cmbi.bjmu.edu.cn> consultado em julho de 2008)

As nanocápsulas possuem uma secção de choque para absorção óptica até 106 vezes maior que outros corantes comerciais, como a *indocyanine Green* [4.11]. O espectro de absorção das nanocápsulas pode ser variado alterando-se o diâmetro do núcleo ou a espessura da camada externa, permitindo que as nanocápsulas absorvam na faixa do infravermelho (700 – 1400 nm). Como a luz infravermelha é transparente para tecidos biológicos, as nanocápsulas metálicas podem ser utilizadas em tratamentos fototérmicos de tumores [4.12, 4.13]. Neste tratamento, um feixe de laser infravermelho incide sobre a região onde estão localizadas as nanopartículas, a energia do plásmom de ressonância é rapidamente convertida em energia térmica, aumentando sensivelmente a temperatura da região e matando a célula cancerígena. Devido ao seu dinamismo, estas nanopartículas também podem ser utilizadas para estabilidade química de colóides, ganho de propriedades luminescentes, ajuste da estrutura de bandas, biosensores e carreadores de drogas [4.14]. A *figura 4.6* mostra a variação do espectro de absorção óptica de nanocápsulas de acordo com a espessura da capa metálica.

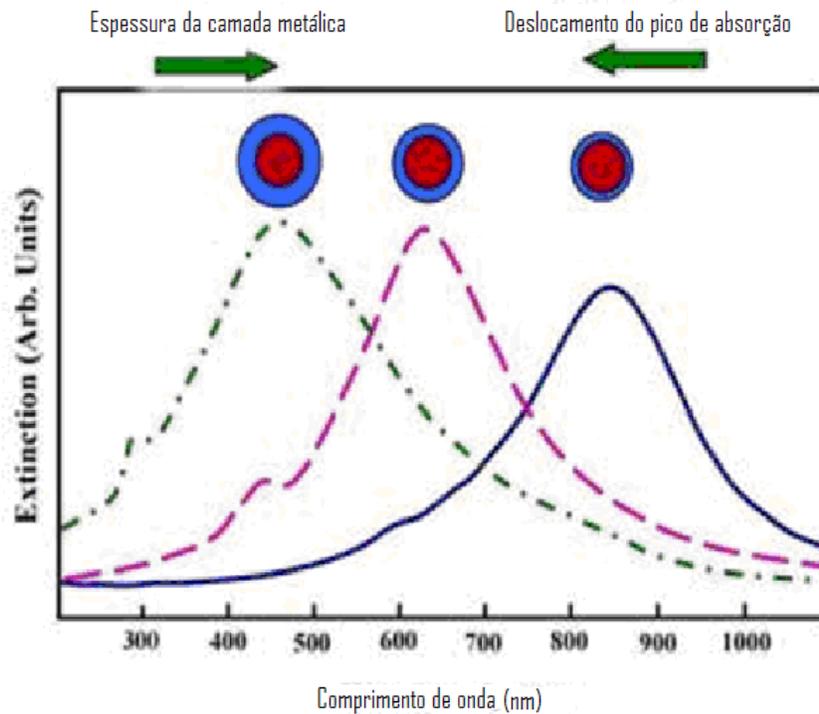


Figura 4.6 – Variação do espectro de absorção de nanocápsulas com a variação da espessura da camada metálica [4.12].

4.2.4 Nanopartículas recobertas

O interesse em nanopartículas na área médica tem crescido devido a sua habilidade de depositar drogas com dosagens mínimas, diminuindo efeitos colaterais e aumentando a chance de recuperação do paciente. As nanopartículas já vêm sendo utilizadas na prática clínica, sendo funcionalizadas com diferentes compostos, como micelas de polímeros, dendrímeros, conjugados de drogas, polipeptídeos e polissacarídeos [4.15]. Uma nanopartícula pode ter a sua superfície funcionalizada para aumentar o tempo de circulação no sangue, diminuir a toxicidade e direcionar as nanopartículas para algum tecido alvo. Alguns polímeros como o polietilenoglicol dão às nanopartículas propriedade “stealth”, tornando-as invisíveis às células fagocitárias do organismo e prevenindo a agregação de proteínas [4.16]. Em alguns casos, ocorre a agregação das NPs devido a força de atração e Van der Waals, exigindo-se que as nanopartículas sejam protegidas de alguma forma desta agregação. Uma das maneiras de manter a dispersão das partículas é ligando-se íons em sua superfície, criando com isto uma repulsão eletrostática entre as nanopartículas. A *figura 4.7* mostra este processo.

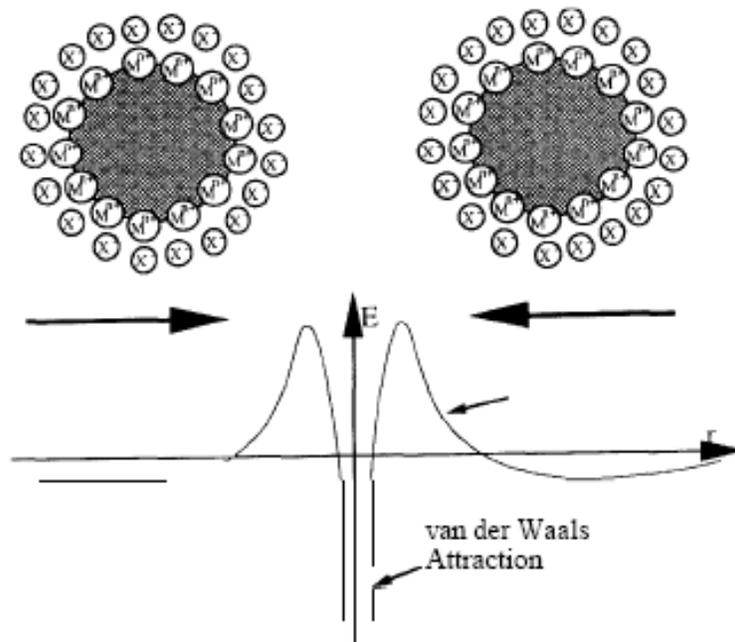


Figura 4.7 – As NPs podem ser estabilizadas através da adsorção de íons, criando uma força de repulsão devido a forças eletrostáticas [4.3].

No entanto, este método algumas vezes pode trazer problemas para aplicações *in vivo*. Segundo Marie-Christine [4.1], como o meio biológico possui pH 7.4, esta repulsão eletrostática pode ser anulada, acelerando o processo de agregação das nanopartículas. O segundo método de prevenir agregação das partículas é pela adsorção de polímeros, surfactantes ou superfícies ligantes, como o poli(vinilpirrolidona) (PVP) (figura 4.8) ou o poli(etilenoglicol) (PEG), fornecendo uma camada de proteção. Os polímeros devem possuir um grupo que possua afinidade com as nanopartículas e outro grupo que seja solúvel no meio em que as NPs estão dispersas. A escolha do polímero depende da solubilidade do colóide metálico, o solvente, e o grau de estabilidade fornecido pelo polímero. Polímeros naturais como a gelatina e agarose geralmente foram utilizados antes do desenvolvimento dos polímeros sintéticos, e estabilizadores – como acetato de celulose e nitrato de celulose – têm sido usados mais recentemente. O número de *Zsigmondy* é definido como a massa de polímero necessária para estabilizar 1 grama da solução padrão de ouro contendo 50 mg/L de ouro contra o efeito de coagulação em uma solução de cloreto de sódio (1%) [4.6].

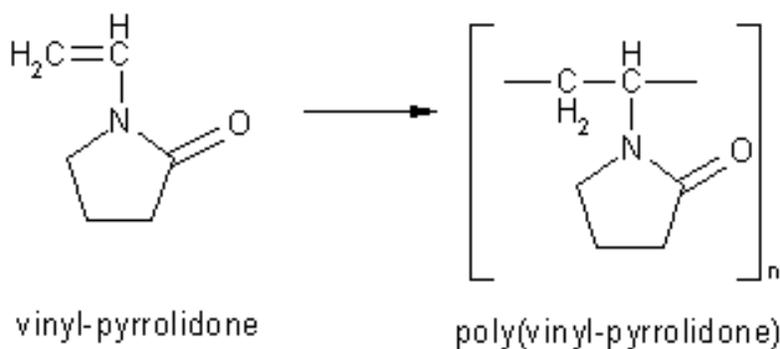


Figura 4.8 – Monômero do polivinilpirrolidona.
(fonte: Wikipédia, www.wikipedia.org consultado em julho de 2008).

4.2 Materiais e métodos

4.3.1 Síntese

As nanopartículas foram sintetizadas seguindo o método de Turkevich [4.2]. Inicialmente, a solução de ácido cloroáurico foi preparada com 208,3 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, acrescentando-se água deionizada (H_2O DI) até completar 500 mL de solução de ácido cloroáurico (1,06 mM). Esta solução foi utilizada no preparo das AuNPs em suspensão.

No preparo das AuNPs, foram necessários, além da solução de ácido cloroáurico 1,06 mM, H₂O DI e citrato de sódio (C₆H₅O₇Na₃·2H₂O a 0,0475 M). Acrescentamos água DI a 5,7 mL da solução de ácido cloroáurico até completar 10 mL. Esta solução foi aquecida sob agitação magnética até entrar em ebulição, sendo em seguida rapidamente acrescentado 850 µL da solução de citrato de sódio (0,0475 M). A partir daí, o processo de nucleação e crescimento das nanopartículas começa, podemos notar que a cor da solução passa do amarelo ao totalmente incolor, após 1 minuto a solução começa a adquirir uma cor azulada e, após 4-5 minutos, adquire a cor vermelha. A partir do volume final da solução, a concentração de ouro é de 103 µg mL⁻¹.

4.3.2 Funcionalização

As nanopartículas de ouro foram revestidas com polivinilpirrolidona K30 (PVP K30), um polímero solúvel em água e outros solventes polares, utilizado como carreador de drogas. O PVP impede que as nanopartículas aglomerem-se quando adicionadas a uma solução salina 0,9%. A concentração final da solução contendo o PVP foi de 103 µg mL⁻¹ de ouro e 5 µg mL⁻¹ de PVP.

4.3.3 Caracterização

Os processos utilizados para a caracterização de nanopartículas de ouro foram a microscopia de força atômica (AFM), absorção óptica e ativação neutrônica. A microscopia de força atômica é indicada para a medida da distribuição estatística das partículas. Como a sonda utilizada no processo não possui precisão para medidas no plano XY, o equipamento não é indicado para a medida da forma das nanopartículas.

A absorção óptica permite medir, através do espectro de absorção das partículas, a distribuição média do diâmetro das partículas, sendo que a largura média do espectro está relacionada ao desvio padrão da distribuição. A teoria para explicar a absorção de luz observada em soluções de NPs metálicas esféricas foi desenvolvida por Mie [4.1], resolvendo a equação de Maxwell para a interação entre uma onda eletromagnética e uma esfera metálica.

A partir de um espectrômetro óptico que atue em regiões próximas ao ultravioleta e luz visível é possível medir o diâmetro médio das nanopartículas e seu

desvio padrão. O resultado do espectro obtido depende da luz refletida e transmitida pela solução. Estas propriedades foram tratadas por Mie considerando-se nanopartículas esféricas. A secção de choque do fator de extinção σ_{ext} é calculada pela equação 4.1, onde V é o volume da nanopartículas, c é a velocidade da luz, ω é a frequência angular da luz incidente, n é o índice de refração do meio e ϵ_1 e ϵ_2 são as partes real e imaginária da função dielétrica do material, em nosso caso ouro, sendo encontrados em tabelas [4.17].

$$\sigma_{ext} = \frac{9Vn^3}{c} \cdot \frac{\omega\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2n^2]^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \quad (4.1)$$

O pico de absorção observado no espectro no comprimento de onda (λ) de 500 nm corresponde à excitação de dipolo elétrico devido a superfície de plasmon, uma oscilação cooperativa dos elétrons de condução na superfície da partícula. No entanto, o λ do pico experimental é menor do que quando calculado. A dificuldade em se medir ϵ_1 e ϵ_2 provavelmente é a responsável por esta diferença de resultados teóricos e experimentais. A largura do pico experimental também é maior que a do pico teórico. A intensidade do pico e sua posição variam com o tamanho e forma das nanopartículas, dependendo também da constante do meio. Com a mudança de tamanho das nanopartículas, o pico de absorção é deslocado e a largura do pico varia. O coeficiente de absorção varia linearmente com o volume das nanopartículas. Para calcular o diâmetro das nanopartículas foi utilizado o programa Mie Plot [4.18], a solução sintetizada foi diluída 10 vezes e levada para espectrometria de absorção. Comparando o espectro obtido e o espectro construído pelo programa, podemos determinar qual o diâmetro médio das AuNPs.

Duas alíquotas contendo AuNPs em suspensão em H₂O DI foram levadas ao reator TRIGA para confirmar as concentrações de ouro esperadas. A concentração teórica da amostra 1 era de 88 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e da amostra 2 de 139 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O volume das alíquotas era de 1 mL, sendo irradiadas durante 1 hora. As amostras foram contadas no detector HP-Ge durante 10 minutos, à distância de 30 cm amostra-detector. Pela análise por ativação neutrônica procuramos encontrar possíveis contaminantes e principalmente quantificar a concentração de AuNPs em suspensão.

4.4 Resultados e discussão

Nas figuras 4.9 e 4.10 são mostradas imagens topográficas em duas e três dimensões, respectivamente, de nanopartículas depositadas em um substrato de mica e analisadas por AFM. A figura 4.11 mostra a distribuição dos diâmetros das nanopartículas registrados nas figuras anteriores. Podemos notar que as nanopartículas ficaram bem distribuídas ao longo da mica, isto mostra que realmente existe uma repulsão eletrostática entre as nanopartículas, caso contrário seriam identificados *clusters* destas nanopartículas. O desvio-padrão encontrado também é bem satisfatório (4 ± 2 nm), possibilitando a utilização destas nos estudos de biodistribuição.

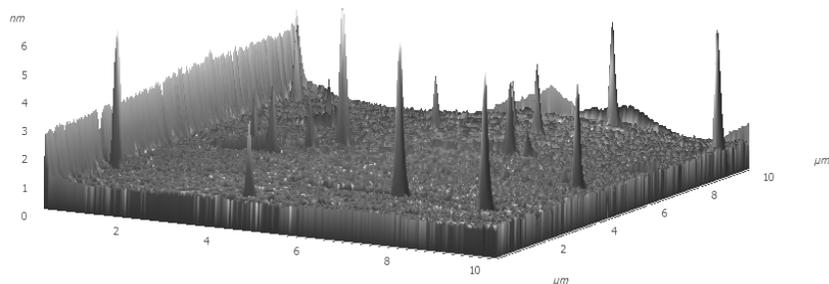


Figura 4.9 -Topografia medida por AFM da superfície da amostra onde foram depositadas as nanopartículas de ouro. Cada pico representa uma nanopartícula e seu diâmetro é determinado pela altura do pico.

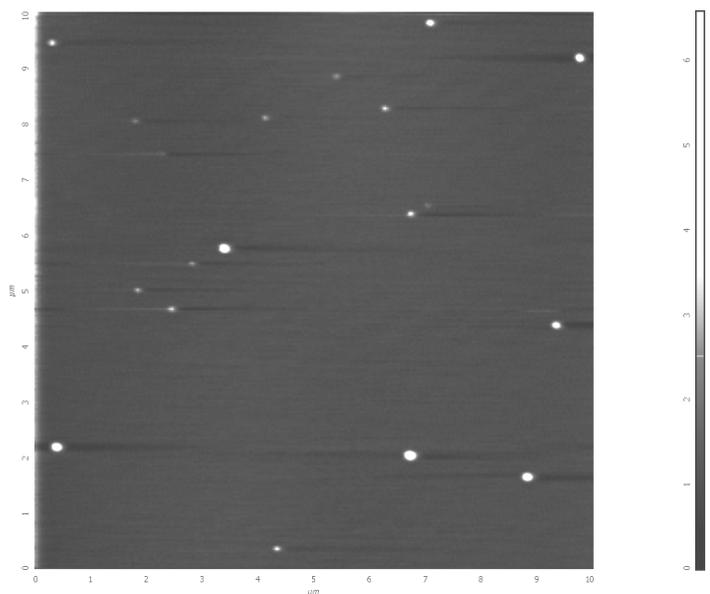


Figura 4.10 – Superfície do substrato de mica em 2D mostrando as AuNPs.

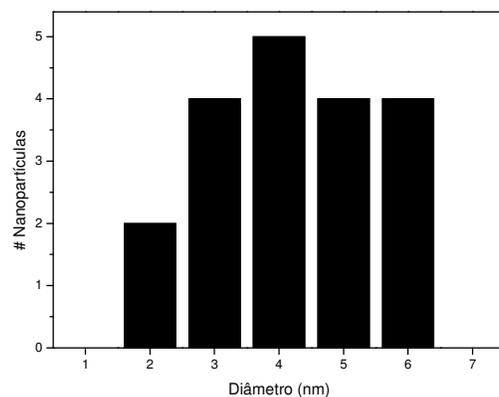


Figura 4.11 - Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas de ouro.

A figura 4.12 mostra uma imagem feita no AFM das nanopartículas com micelas de PVP K30. Nota-se que as nanopartículas encobertas com PVP apresentam um formato hexagonal. Este formato pode ser explicado como um defeito da ponta de prova usada na sonda de AFM: quando a ponta possui algum defeito, pode alterar o formato da imagem da superfície que está sendo medida, assim, as NPs adquiriram o formato da ponta, resultando neste forma hexagonal. O diâmetro das nanopartículas mostradas na figura foi de (110 ± 20) nm. Embora o desvio padrão seja relativamente alto (20%), não deve influir muito na medida de biodistribuição das nanopartículas. Observando a distribuição dos diâmetros na figura 4.13, notamos que abaixo de 90 nm não existe registro de NPs. Isto se deve porque, durante a varredura da superfície, o aparelho de AFM se calibrou pelas nanopartículas de maior diâmetro, este é um mecanismo que impede que a ponta de prova fique presa durante a varredura da superfície.

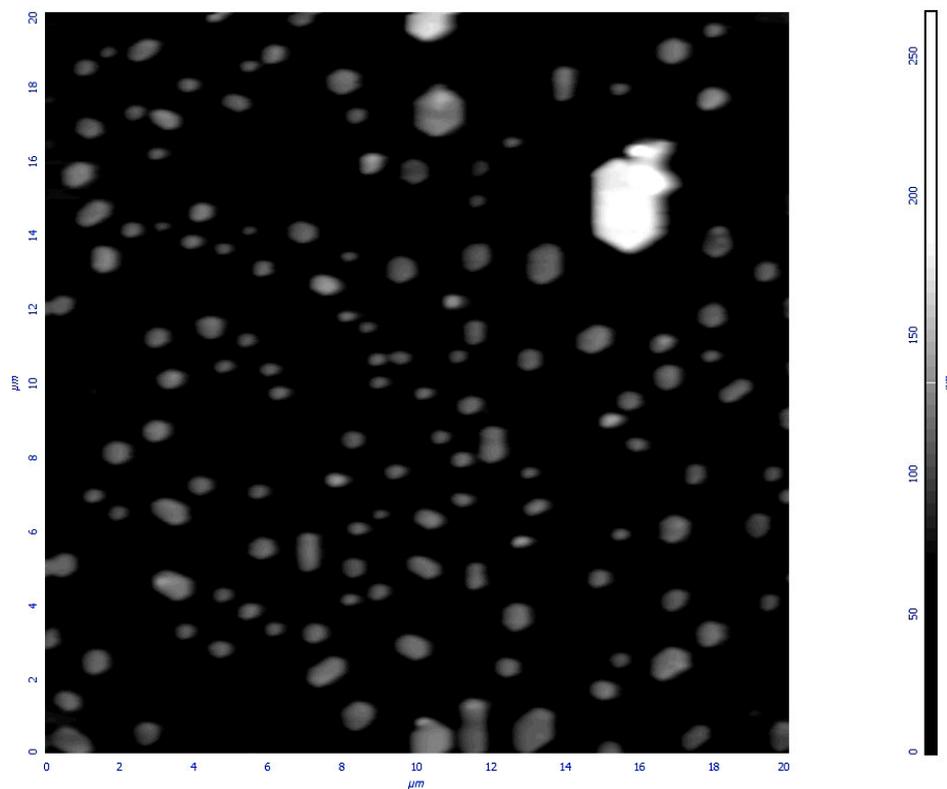


Figura 4.12 – AFM de nanopartículas de ouro revestidas com Polivinilpirrolidona K30.

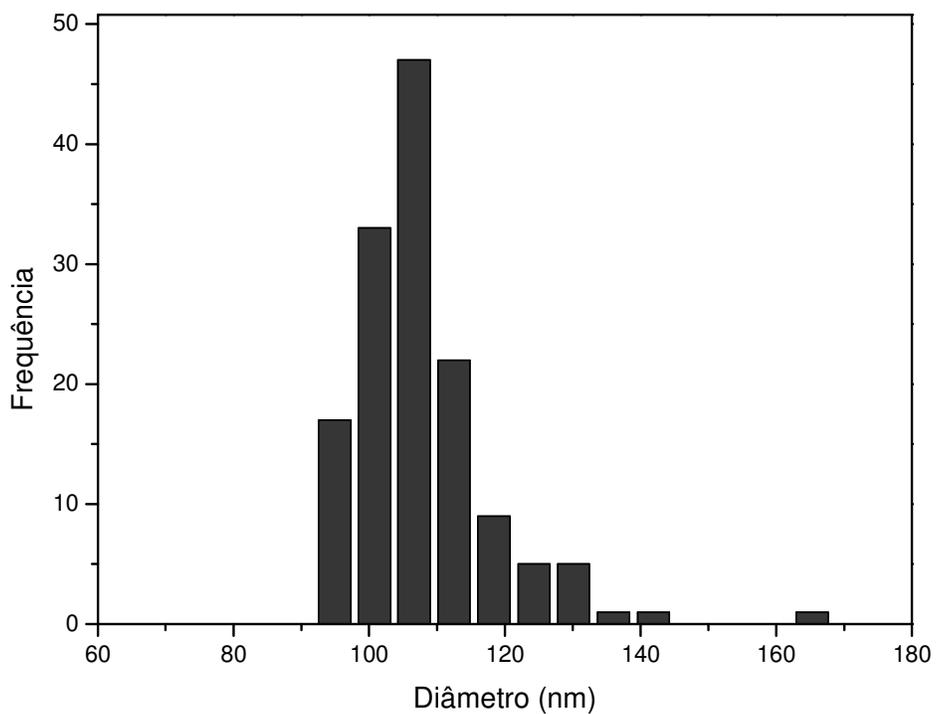


Figura 4.13 – Distribuição do diâmetro médio das nanopartículas de ouro revestidas com PVP K30.

A figura 4.14 mostra o espectro gama das amostras irradiadas contendo AuNPs suspensas em H₂O DI. Os três picos de emissão do ouro podem ser observados no espectro. O pico de 1293,7 keV do ⁴¹Ar também foi detectado. Este radioisótopo é produzido durante a irradiação do gás argônio presente em nossa atmosfera (~ 1%), ocorrendo a ativação do nuclídeo ⁴⁰Ar (abun. isot. = 99,6%) por captura de nêutrons. O pico de 1368,3 keV corresponde ao ²⁴Na, presente na solução devido ao citrato de sódio utilizado na síntese das nanopartículas. O pico de 847,6 keV não foi identificado. A concentração de ouro foi calculada através da área do pico de 411,8 keV. A concentração encontrada na amostra 1 foi de 79 µg mL⁻¹ (a concentração prevista de 88 µg mL⁻¹) e na amostra 2 foi de 122 µg mL⁻¹ (concentração prevista de 139 µg mL⁻¹), obtendo-se um erro de aproximadamente 10%, o que considero satisfatório para o método de síntese utilizado.

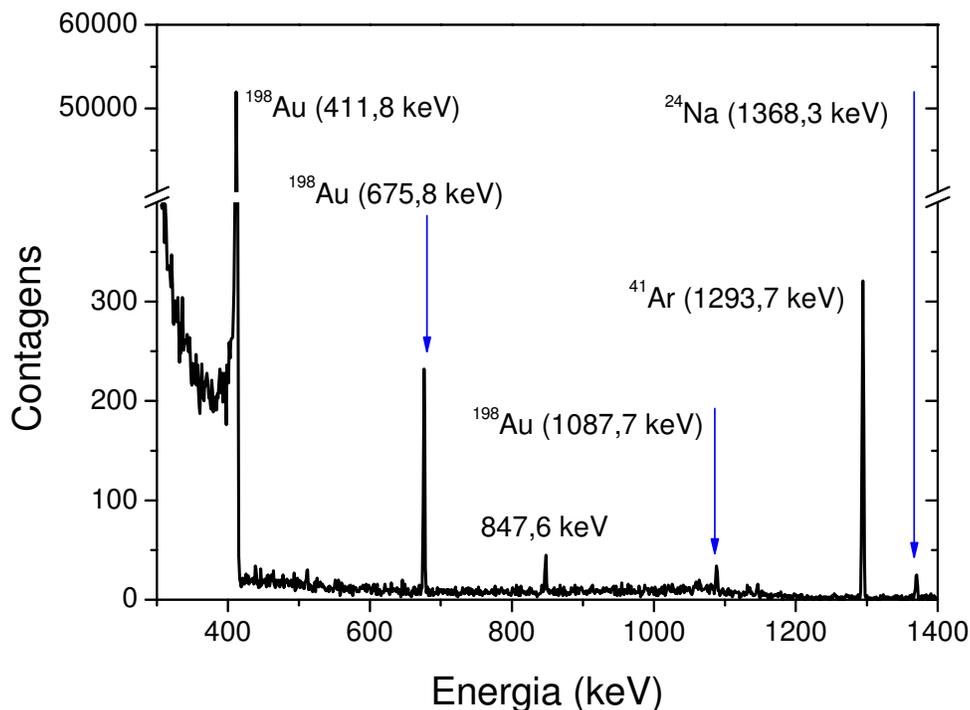


Figura 4.14 – Espectro gama das AuNPs irradiadas durante 1 hora e analisadas em um detector HP-Ge. Podemos observar os picos de emissão de 411.8, 675.8 e 1087.7 keV do ¹⁹⁸Au.

Com este resultado, mostramos as AuNPs suspensas podem ser usadas nos estudos de biodistribuição em camundongos. Como será utilizado o detector poço, a janela de detecção do pico do ^{198}Au permitirá que este seja detectado sem interferência de outros radioisótopos. O pico do ^{41}Ar não será registrado nos estudos de biodistribuição porque o gás argônio se dispersará na atmosfera após a abertura do recipiente que contém as amostras irradiadas. O pico do ^{24}Na ($t_{1/2} = 14,9$ horas) detectado se deve ao método de síntese de AuNPs utilizando citrato de sódio. No entanto, este pico também não atrapalhará nas medidas de biodistribuição, pois este possui uma meia-vida menor que do ^{198}Au , como os estudos serão feitos cerca de 30 horas após a ativação, a intensidade do pico diminuirá cerca de 4 vezes. Também devemos ressaltar que a energia do seu pico (1368 keV) está bem distante do pico de emissão do ^{198}Au (411,8 keV), não interferindo nas análises. O pico de 847,6 keV também não interferirá nas medidas devido a distancia do pico 411,8 keV do ^{198}Au . Para maiores informações sobre os isótopos, consulte a tabela 2.1.

4.5 Conclusões

Os resultados obtidos na absorção óptica e no AFM mostraram que o método de Turkevich é satisfatório na síntese das nanopartículas de ouro (4 ± 2) nm. A adição de PVP K30 à suspensão de nanopartículas impediu que estas se aglomerassem quando adicionada a solução salina, no entanto aumentaram em muito o diâmetro das nanopartículas (com as micelas de PVP) (110 ± 20) nm. Os resultados de NAA indicaram que o erro da concentração prevista foi de 10% e que também puderam ser detectados picos do ^{41}Ar , devido a presença na atmosfera do gás argônio, e do ^{24}Na , evidenciando a presença do citrato de sódio na síntese das AuNPs. Os resultados se mostraram satisfatórios, confirmando que a técnica de síntese e NAA poderão ser utilizadas na medida de biodistribuição de AuNPs em camundongos.

4.6 Referências

- [4.1] Marie-Christine Daniel and Didier Astruc; Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications

- toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology; Chem. Rev. 2004, 104, 293-346.
- [4.2] John Turkevich, Peter C. Stevenson, J. Hillier; *The formation of colloidal gold* (1953).
- [4.3] Gunter Schmid (Ed.); *Nanoparticles: from theory to application*; Wiley VCH (2004).
- [4.4] The British Museum (www.britishmuseum.org).
- [4.5] Faraday, M.; *Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light*; Philos. Trans. **147**, 145-181 (1857).
- [4.6] R. Zsigmondy, *Colloids and the Ultramicroscope* (1914).
- [4.7] Wei-Chieh Huang, Yu-Chie Chen; *Photochemical synthesis of polygonal gold nanoparticles*; J Nanopart Res 10, 697–70 (2008).
- [4.8] Pojarova, M.; Ananchenko, G. S.; Udachin, K. A.; Daroszewska, M.; Perret, F.; Coleman, A. W.; Ripmeester, J. A., *Chem. Mater.*, 18, 5817-5819 (2006).
- [4.9] Stephan Link and Mostafa A. El-Sayed; *Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles*; J. Phys. Chem. B 103, 4212-4217 (1999).
- [4.10] Suchita Kalele, S. W. Gosavi, J. Urban, S. K. Kulkarni; *Nanoshell particles: synthesis, properties and Applications*; CURRENT SCIENCE, 91 (2006).
- [4.11] M.L.J. Landsman, G. Kwant, G.A. Mook, W.G. Zijlstra; *Light- absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green*; J. Appl. Physiol. 40, 575–583 (1976).
- [4.12] Joshua M. Stern, Jennifer Stanfield, Wareef Kabbani, Jer-Tsong Hsieh and Jeffrey A. Cadeddu; *Selective Prostate Cancer Thermal Ablation With Laser Activated Gold Nanoshells*; THE JOURNAL OF UROLOGY 179, 748-753 (2008).
- [4.13] D. Patrick O'Neal, Leon R. Hirsch, Naomi J. Halas, J. Donald Payne, Jennifer L. West; *Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles*; Cancer Letters 209, 171–176 (2004).
- [4.14] G. F. PACIOTTI ET AL; *Colloidal Gold: A Novel Nanoparticle Vector for Tumor Directed Drug Delivery*; Drug Delivery, 11, 169–183 (2004).
- [4.15] Paolo Fortina, Larry J Kricka, David J Graves, Jason Park, Terry Hyslop, Felicia Tam, Naomi Halas, Saul Surrey and Scott A. Waldman; *Applications of nanoparticles to diagnostics and therapeutics in colorectal cancer*; TRENDS in Biotechnology 25 (2007).

- [4.16] Takuro Niidome, Masato Yamagata, Yuri Okamoto, Yasuyuki Akiyama, Hironobu Takahashi, Takahito Kawano, Yoshiki Katayama, Yasuro Niidome; *PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications*; Journal of Controlled Release 114, 343–347 (2006).
- [4.17] Shujuan Huang; Optical spectroscopic studies of the dispersibility of gold nanoparticle solutions; Journal of applied physics **92**, 12 (2002).
- [4.18] <http://www.philiplaven.com/mieplot.htm> consultado em julho de 2008.

Capítulo 5 – Biodistribuição de nanopartículas por ativação neutrônica

5.1 Introdução

As AuNPs já vem sendo usadas nas últimas décadas em ensaios imunológicos para a detecção de doenças, como câncer de ovário (Chaudhuri et. al., 1994) [5.1], estes ensaios são conhecidos como immunogold. No entanto, nos últimos anos surgiram novas formas de aplicação das AuNPs na biologia e na medicina, com o desenvolvimento de novas técnicas de síntese e funcionalização das nanopartículas, surgiu um grande número de técnicas de diagnóstico por imagem e tratamento de doenças, atuando também como carreadores de drogas (G. F. Paciotti et al., 2004) [5.2].

Segundo Hainfeld (2005) [5.3], as nanopartículas de ouro podem ser usadas no diagnóstico de tumores atuando como agente de contraste para Raios-X, apresentando um melhor contraste quando comparado a outros agentes, como o iodo. Neste trabalho, Hainfeld utilizou AuNPs de $1,9 \pm 0,1$ nm de diâmetro. As nanopartículas suspensas em tampão fosfato salino (PBS, *phosphate buffers saline*) e concentração de (270 mg mL^{-1}) foram administradas intravenosamente em camundongos, sendo injetado um total de 2,7 gramas de ouro por kg de animal. As nanopartículas permaneceram por mais tempo no sangue (*blood clearance*) quando comparado ao iodo. O autor ressalta que a porcentagem de dose injetada por grama de órgão (%DI g^{-1}) no baço e no fígado ($10,6 \pm 0,2 \text{ \% DI g}^{-1}$) foram baixas e que posteriormente as AuNPs foram eliminadas pelo rim ($\sim 7\%$ após 24 h). Os animais utilizados no trabalho sobreviveram por mais de um ano, apresentando comportamento normal sem evidência de qualquer efeito causado pela administração das AuNPs. Comparando os dois agentes de contraste (AuNPs e iodo), Hainfeld conclui que as AuNPs teriam um poder de contraste dez vezes maior. O uso das AuNPs se mostrou útil no diagnóstico de tumores, pois a capacidade de retenção no tumor se mostrou bem maior que no músculo (cerca de $2,5 \text{ \%DI g}^{-1}$ para o tumor e $0,3 \text{ \%DI g}^{-1}$ para o músculo após 24 horas).

Em outro trabalho publicado por Hainfeld (2004) [5.4], ele estuda o uso das AuNPs como forma de aumentar a eficácia da radioterapia. Baseando-se na capacidade do tecido tumoral de reter uma quantidade cerca de 8 vezes maior de nanopartículas de ouro do que os tecidos saudáveis, Hainfeld estudou o efeito em camundongos irradiados com Raios-X em dose terapêutica. Utilizando dois grupos controles: o primeiro grupo recebeu apenas a dose de radiação, sem a administração de AuNPs; o segundo grupo não recebeu a dose de radiação,

porém foi injetado com as AuNPs. Os resultados publicados mostraram que a taxa de sobrevivência após 1 ano foi de 86% para os camundongos administrados com AuNPs e irradiados contra 20% no grupo controle 1 e 0% no grupo controle 2. As nanopartículas utilizadas neste trabalho também possuíam um diâmetro de $1,9 \pm 0,1$ nm e a quantidade de ouro injetada foi de 2,7 gramas por kg de animal. Os animais foram irradiados localmente por 2 minutos após a injeção das nanopartículas a 250 kVp. Na figura 5.1 podemos ver uma radiografia retirada do camundongo antes e após a injeção das nanopartículas, mostrando através da seta (figura 5.1b) a região onde o tumor foi implantado, o aumento de contraste nesta região mostra que a retenção das AuNPs pelo tumor é maior do que em outros tecidos.

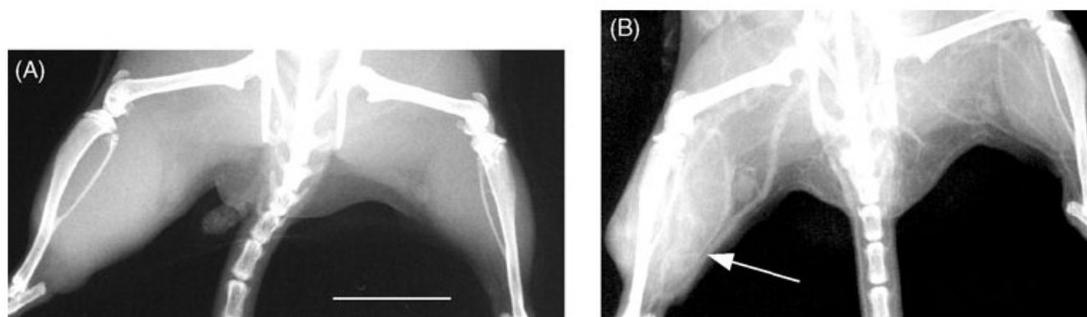


Figura 5.1 – Radiografia do camundongo antes (a) e após a injeção das nanopartículas (b). A seta indica o local onde o tumor foi implantado, confirmando uma maior retenção de AuNPs pelo tumor (fonte: Hainfeld et al., 2004).

Apesar dos resultados positivos, a quantidade de ouro necessária no diagnóstico por imagem e no tratamento por radioterapia é muito alto ($2,7 \text{ g kg}^{-1}$ de animal). Esta quantidade de ouro está bem próxima do limite de dose letal para 50% da amostragem (LD50 de $3,2 \text{ g kg}^{-1}$ de animal, segundo Hainfeld). Se fosse utilizada em humanos, a quantidade de ouro necessária seria de no mínimo 150 gramas, desconsiderando outros fatores como volume do tumor. No entanto, segundo Hainfeld, o diagnóstico por imagem utilizando tomografia computadorizada (CT, *computing tomography*) seria mais sensível e poderia utilizar AuNPs suspensas em concentrações de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, aumentando a margem de segurança e diminuindo o custo de tratamento, no entanto o autor não mencionou o volume injetado necessário.

Seguindo o trabalho de Hainfeld, Cai et al. (2007) [5.5] utiliza AuNPs na imagem de tumores por CT de raios-X. As nanopartículas utilizadas por Cai foram sintetizadas seguindo o método de Turkevich (~ 10 nm), sendo depois funcionalizadas com poli(etilenoglicol) (PEG). O diâmetro das NPs após a funcionalização foi de 38 nm. O uso do PEG foi escolhido por Cai porque este polímero aumenta o tempo de circulação das nanopartículas no sangue.

Nestes estudos, Cai conclui que, por possuir um maior número atômico e um maior coeficiente de absorção (em 100 keV, $5.16 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ para o ouro e $1.94 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$ para o iodo) e pela maior meia-vida no sangue (14.57 ± 3.27 horas contra < 10 minutos para o iodo) as AuNPs podem ser utilizadas como agentes de contraste. A figura 5.2 mostra o contraste das nanopartículas de ouro em um aparelho CT, mostrando que AuNPs a 0,85 M possuem um poder de contraste a solução de iodo 2,36 M utilizada em diagnósticos por imagem. Para concentrações de AuNPs menores (entre 0,01 e 0,0875 M), o contraste é baixo praticamente não existe diferença entre as AuNPs e uma solução salina.

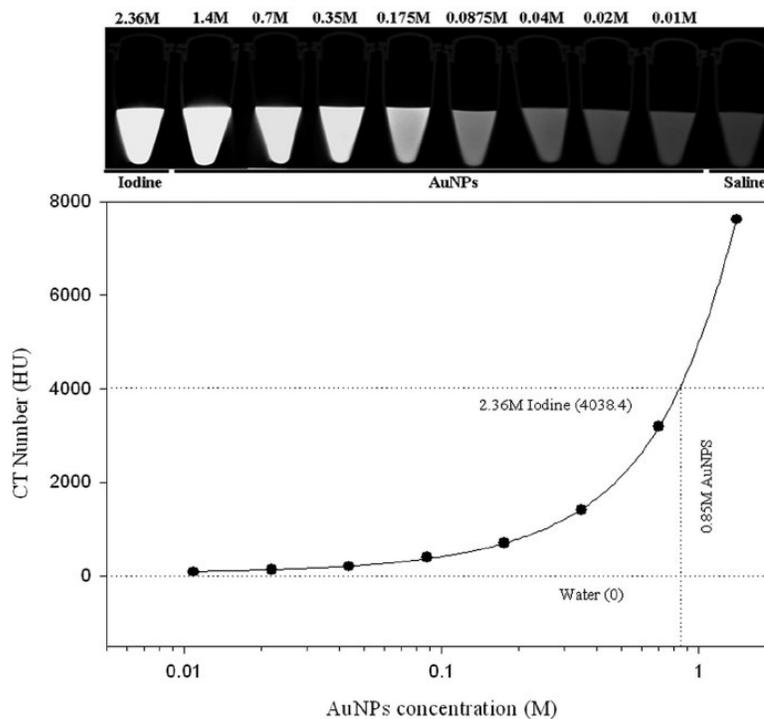


Figura 5.2 – Valores de atenuação para diversas concentrações de AuNPs, utilizando solução salina 0,9% como controle (fonte: Cai et al., 2007).

Uma outra maneira de se utilizar as AuNPs em tratamentos de câncer é através da absorção por plásmons de superfície. Este fenômeno, descrito de maneira mais detalhada no capítulo 3, está relacionado com a absorção de luz pelas nanopartículas de ouro, seguido pela conversão desta energia em calor. No entanto, para que o fenômeno possa ser aplicado no tratamento de tumores é necessário que as AuNPs absorvam luz na faixa do infravermelho (IR, infrared), que penetra mais no tecido, alcançando o local onde estão as AuNPs e matando as células do tumor devido ao aumento de temperatura. De acordo com Stern (2007) [5.6], as nanopartículas utilizadas em seu trabalho possuíam um núcleo de sílica de 110 ± 11

nm com uma camada de ouro de 10 nm, sendo definidas como nanocápsulas, e recobertas com poli(etilenoglicol) (para mais informações sobre nanocápsulas, consulte a seção 4.2.3). A concentração de NPs em suspensão foi de 3×10^9 part.mL⁻¹, sendo administrado um volume de 8,5 mL kg⁻¹ de animal. O local de implantação do tumor (subcutâneo) foi irradiado com um laser de 810 nm (4 W cm^{-2}) durante 3 minutos. Após 21 dias de irradiado, o tumor (volume ~ 40 mm³) sumiu em 14 dos 15 camundongos analisados, enquanto que no grupo de animais tratados apenas com o laser ou apenas com as NPs o volume do tumor subiu em média 2,5 vezes. A diferença de temperatura nos tumores quando irradiados com o laser atingiu até +34 °C para os animais administrados com as NPs contra +16 °C nos animais em que não houve administração de nanopartículas. Trabalhos semelhantes ao de Stern também foram publicados anteriormente por O'Neal et al. (2004) [5.7]. A figura 5.3 mostra o resultado do tratamento em um dos camundongos do estudo.

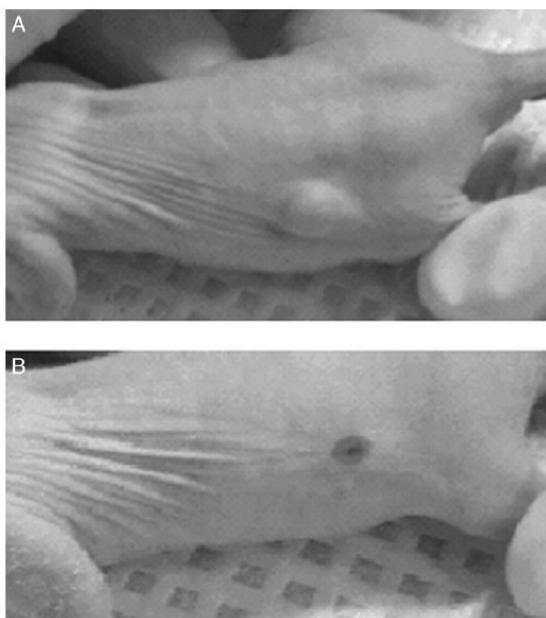


Figura 5.3 – Tumor de camundongo administrado com nanocápsulas de ouro e irradiados com laser: antes do tratamento (a) e 21 dias após tratamento (b) (fonte: Stern et al., 2007).

Além das inúmeras aplicações citadas até aqui, também devemos destacar as mudanças na toxicologia e biodistribuição das AuNPs quando ocorrem alterações em sua superfície e diâmetro. Segundo Balogh (2007) [5.8], o tamanho e a carga de superfície das nanopartículas alteram significativamente sua retenção no tumor e eliminação pelo organismo. Nestes estudos, realizados em camundongos, Balogh injetou nanopartículas carregadas positivamente com 22 e 5 nm de diâmetro, carregadas negativamente com 11 e 5

nm de diâmetro e nanopartículas neutras com 5 nm de diâmetro. As AuNPs, colocadas em suspensão em tampão fosfato salino pH 7,2, foram injetadas nos camundongos (16 mg kg^{-1} de animal). As de AuNPs de ouro foram analisadas por ativação neutrônica, utilizando padrões de ouro para determinar a concentração final pelo método k_0 . As amostras foram irradiadas durante 2 horas a um fluxo de $1,0 \times 10^{11} \text{ n s}^{-1} \text{ cm}^{-2} \text{ s}$ e analisadas 2 dias após a irradiação. Os estudos realizados por Balogh confirmam trabalhos publicados por Alexis *et al.* (2008) [5.9], sobre as mudanças do *clearance* de nanopartículas poliméricas, como o PEG (utilizado para recobrir AuNPs), de acordo com o tamanho das nanopartículas.

Alguns trabalhos destacam métodos de tratamento de tumores utilizando nanopartículas de ouro radioativas. Segundo Kannan (2006) [5.10], $^{198}\text{AuNPs}$ podem ser usadas no tratamento de câncer. O poder destrutivo destas nanopartículas viria das emissões beta ($\beta_{\text{max}} = 0,96 \text{ MeV}$) de pelo menos 2000 átomos em apenas uma $^{198}\text{AuNP}$, depositando uma dose de radiação letal em cada uma das células tumorais, tornando as nanopartículas muito mais letais que compostos farmacêuticos tradicionais. As AuNPs utilizadas por Kannan foram estabilizadas com goma arábica (figura 5.4), que foi utilizada para impedir que as nanopartículas de ouro se aglomerassem quando em contato com meio salino.

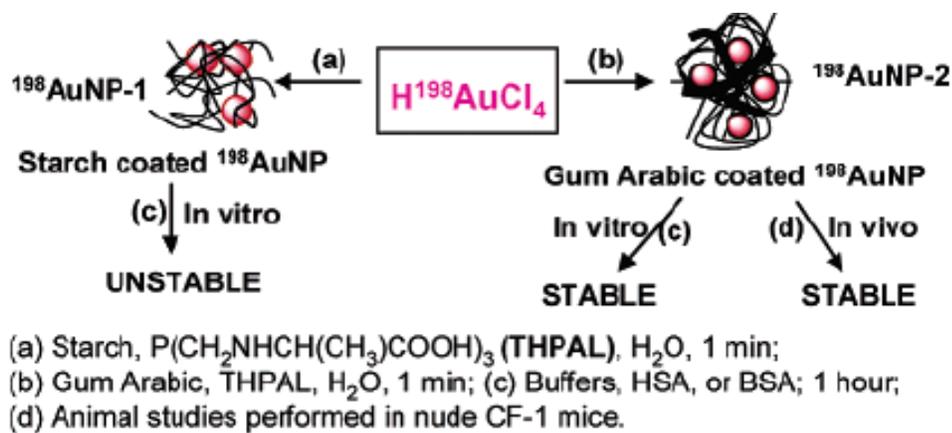


Figura 5.4 – $^{198}\text{AuNPs}$ estabilizadas com goma arábica

Segundo Kan *et al.* (2008) [5.11], além do potencial terapêutico das $^{198}\text{AuNPs}$, estas também podem ser utilizadas em diagnóstico por imagem através da tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT, *single photon emission computed tomography*). Estudos de biodistribuição de $^{198}\text{AuNPs}$ também já foram realizados em diversos animais, em um trabalho desenvolvido por Brain *et al.* (1999) [5.12]. Neste estudo,

Brain injetou em 13 espécies diferentes AuNPs em suspensão na concentração de $10 \mu\text{g}_{\text{Au}} \text{kg}^{-1}$ de animal diversas em cada uma das espécies (com exceção de duas, devido ao tamanho). Os resultados mostraram que a taxa de decréscimo da concentração de atividade no sangue foi exponencial em todas espécies.

Com base nestes estudos sobre o uso de AuNPs no diagnóstico e tratamento de doenças, podemos concluir que estes novos materiais serão cada vez mais utilizados na medicina, necessitando somente de estudos mais abrangentes. As vantagens em relação a outros tipos de tratamento se devem principalmente a atuação *in situ*, atuando diretamente nas células tumorais e depositando uma grande quantidade de energia, seja por emissão beta ou por aquecimento através da absorção de plásmons de superfície. Os efeitos colaterais causados ao paciente durante o tratamento com medicamentos convencionais são altos porque grande parte das drogas administradas são absorvidas por células saudáveis, alterando o seu metabolismo normal. As nanopartículas (metálicas e poliméricas) também auxiliarão nos tratamentos convencionais atuando como carreadores de drogas. Vários estudos de AuNPs utilizaram o poli(etilenoglicol) (PEG) para a funcionalização da superfície das nanopartículas, pois este polímero possui baixa toxicidade e é aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para usos clínicos. O PEG é um polímero hidrofílico que pode ser adsorvido ou ligado por ligação covalente a superfície de nanopartículas.

Utilizando os trabalhos citados como referência, realizaremos estudos toxicológicos e de biodistribuição com AuNPs estabilizadas com poli(vinilpirrolidona) (PVP) e irradiadas com nêutrons, produzindo $^{198}\text{AuNPs}$. O PVP foi escolhido em contrapartida ao poli(etilenoglicol) (PEG) por mostrar melhores resultados e também por ser de baixa toxicidade. Através deste estudo de toxicologia e biodistribuição de AuNPs utilizando NAA, será discutido no capítulo 6 a viabilidade de se utilizar a técnica em estudos similares para medida da biodistribuição de nanotubos de carbono marcados com $^{198}\text{AuNPs}$.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro ($103 \mu\text{g mL}^{-1}$) utilizadas neste estudo foram sintetizadas pelo método de Turkevich, com diâmetros entre (4 ± 2) nm. As AuNPs foram recobertas com

PVP ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) para evitar a aglomeração das AuNPs em meio salino. O diâmetro das AuNP-PVP foi de (110 ± 20) nm (mais detalhes podem ser encontrados no capítulo 4).

5.2.2 Ativação neutrônica

Foram levadas ao reator duas alíquotas contendo 4 mL de AuNPs cada uma. O tempo de ativação foi de 1 hora, após este período a solução de ouro adquiriu uma atividade de $3,4 \times 10^5 \text{ Bq mL}^{-1}$ ($7,6 \times 10^6 \text{ cpm mL}^{-1}$ no detector de poço). Antes de ser administrada nos animais, foi adicionada salina a 9% (AuNP 9:1 Salina v:v), obtendo uma solução com concentração de NaCl padrão (0,9%). A concentração final de $^{198}\text{AuNPs-PVP}$ foi de $93,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Au e $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PVP K30.

5.2.3 Modelo animal

O tratamento dado aos animais e a execução dos experimentos foram realizados respeitando-se as normas impostas pelo Comitê de Ética, com autorização do mesmo e em acordo com o Manual sobre cuidados no uso de animais em laboratório (*Institute of Laboratory Animal Resources – Commission on Life Sciences – National Research Council – Washington D. C.*), como recomendado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Nos estudos de toxicologia e de biodistribuição foi utilizado um total de 42 camundongos Swiss fêmeas, idade entre 4 e 5 semanas e pesando entre 20 e 25 gramas. Os camundongos foram acomodados em gaiolas pequenas (15cm x 30cm) com no máximo 4 animais e em gaiolas grandes (30cm x 50cm) com no máximo 15 animais. A maravalha das gaiolas era trocada a cada 2 ou 3 dias de forma a manter os animais em um ambiente seco e diminuindo o risco de infecções. Os camundongos tinham acesso à água potável e ração durante todo o tempo. Todos os animais foram sacrificados pelo método da guilhotina (marca Insight, modelo EB271), proporcionando o mínimo de sofrimento possível.

5.2.4 Modelo animal tumoral

Um grupo de 24 animais foi implantado com tumor de Ehrlich ascítico[†]. Este tipo de tumor possui alto índice mitótico e se caracteriza pela presença de poucas células inflamatórias, estroma escasso e presença de células anaplásicas[‡]. Além disso, é facilmente induzido em animais saudáveis, que não sejam imunossuprimidos, através do transplante direto de células tumorais retiradas de um animal que já possua neoplasia desenvolvida. O tumor de Ehrlich foi mantido através do transplante intraperitoneal seriado em camundongos Swiss, fêmeas, em intervalos de 7 dias. Para obtenção do modelo tumoral de Ehrlich foram retirados 3 mL do fluido ascítico. O fluido foi centrifugado (1000 rpm) e lavado 3 vezes em solução salina fisiológica para obtenção de um líquido denso e claro, correspondente a uma suspensão celular, com o mínimo de fibrina e hemáceas. Em seguida, as células do tumor de Ehrlich viáveis ($1,6 \times 10^6$) foram implantadas no membro posterior esquerdo dos camundongos Swiss, fêmeas, pesando entre 20 e 25 gramas, para obtenção do tumor na forma sólida. Após 1,5 semanas de implantado o tumor, os animais foram submetidos aos estudos de biodistribuição. Todos os experimentos de toxicologia e biodistribuição envolvendo camundongos foram realizados no Laboratório de Radiobiologia do CDTN.

5.2.5 Toxicologia

Os grupos de animais utilizados no estudo toxicológico são mostrados na *tabela 5.1*. Por questão de controle, as caudas dos animais foram marcadas com traços de várias cores diferentes. Os animais foram separados em 3 grupos. Os animais do grupo 1 (6 animais) foram injetados com uma solução de 250 μL PVP-K30 ($4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os animais do grupo 2 (8 animais) foram injetados com uma solução não-irradiada de 250 μL de AuNP-PVP ($93,5 \mu\text{g}_{\text{Au}} \text{mL}^{-1}$ e $4,5 \mu\text{g}_{\text{PVP}} \text{mL}^{-1}$) em solução salina. Os animais do grupo 3 (controle) (4 animais) foram injetados com uma solução de 250 μL de solução salina (pH 7.4). Os grupos foram separados em subgrupos e sacrificados 48 horas, 14 dias e 30 dias após a injeção da solução. Os órgãos, tecidos e sangue foram coletados para estudos bioquímicos, histopatológicos e hematológicos. Todos os animais do grupo 3 (SAL) foram sacrificados 48 horas após a injeção salina. No grupo 1 (PVP), 4 animais foram sacrificados 48 horas após a injeção e 2

[†] Tumor líquido desenvolvido no peritônio de animais inoculados com as células tumorais.

[‡] Células que perderam suas propriedades próprias (forma, dimensão, função).

animais foram sacrificados 14 dias. No grupo 2 (NP), 4 animais foram sacrificados 48 horas após a injeção, 2 animais 14 dias e mais 2 animais 30 dias após a injeção.

Tabela 5.1 – Animais utilizados na toxicologia do PVP (grupo 1), AuNP (grupo 2) e salina (grupo 3).

Animal	Grupo	Peso (g)	Tempo de sacrifício	Inscrição
Verde I	1	22,6	48 h	PVP1
Verde II	1	21,3	48 h	PVP2
Verde III	1	23,2	48 h	PVP3
Verde IV	1	24,8	48 h	PVP4
Vermelho I	1	22,5	14 d	PVP5
Vermelho II	1	23,1	14 d	PVP6
Preto I	2	25,8	48 h	NP3
Preto II	2	22,8	48 h	NP2
Preto III	2	22,7	14 d	NP5
Preto IV	2	22,5	14 d	NP6
Laranja I	2	22,6	30 d	NP7
Laranja II	2	21,7	30 d	NP8
Laranja III	2	23,9	48 h	NP1
Laranja IV	2	24,3	48 h	NP4
Azul I	3	26,3	48 h	SAL1
Azul II	3	26,3	48 h	SAL2
Azul III	3	21,5	48 h	SAL3
Azul IV	3	23,8	48 h	SAL4

O sangue dos animais foi recolhido diretamente em um eppendorf contendo anti-coagulante (EDTA 10%). Entre 3 e 5 minutos após o sacrifício, os animais eram dissecados e seus órgãos e tecidos armazenados em tubos Falcon de 50 mL, sendo acrescentado Formol tamponado (10%) para evitar deterioração. As carcaças dos animais foram identificadas em sacos plásticos de cor branca acondicionadas em um freezer de resíduos radioativos, sendo posteriormente descartadas de acordo com as normas do CDTN/CNEN. O sangue dos animais foi encaminhado para análise bioquímica e hemograma laboratorial no Departamento de Veterinária. Os seguintes órgãos foram levados para a análise histopatológica: bexiga, rins, coração, intestino delgado, fígado, pulmão, músculo, osso e cérebro.

5.2.6 Biodistribuição

No estudo de biodistribuição, foram utilizados 24 camundongos Swiss, fêmeas, idade entre 4 e 5 semanas, todos implantados com o tumor Erhlich. A *tabela 5.2* mostra os dados relativos a cada um dos animais usados no estudo.

Os animais foram sacrificados 0, 10, 30, 60, 180, 360, 1440 e 2880 minutos, sendo utilizados 2 animais em cada tempo para a estatística. A solução de AuNPs foi injetada nos animais 1 e 2 dias depois de irradiada. No primeiro dia, foi injetada nos grupo sacrificados 0, 10, 30 e 1440 e 2880 minutos após a injeção. No segundo dia, foi injetada nos grupos sacrificados 60, 180 e 360 minutos após a injeção. No primeiro dia, foi injetada uma solução de 200 µL (~700 µg de ouro kg⁻¹ de animal) nos camundongos dos grupos de 0, 10, 30, 1440 e 2880 minutos, a dose injetada correspondente a 800.000 cpm. Para compensar o decaimento do ouro ($T_{1/2} = 2,7$ dias), o volume da dose injetada nos camundongos do 2º dia passou para 250 µL (~900 µg de ouro kg⁻¹ de animal).

Tabela 5.2 – Camundongos utilizados no estudo da biodistribuição das AuNPs.

Animais	Tempo (min)	Peso (g)	Volume
NPAU 01	0 (1º dia)	26,6	200 µL
NPAU 02		28,8	200 µL
NPAU 03		24,0	200 µL
NPAU 04	10 (1º dia)	28,0	200 µL
NPAU 05		26,7	200 µL
NPAU 06		25,0	200 µL
NPAU 07	30 (1º dia)	25,5	200 µL
NPAU 08		26,8	200 µL
NPAU 09		26,8	200 µL
NPAU 10	60 (2º dia)	23,6	250 µL
NPAU 11		24,7	250 µL
NPAU 12		20,4	250 µL
NPAU 13	180 (2º dia)	26,7	250 µL
NPAU 14		26,0	250 µL
NPAU 15		24,8	250 µL
NPAU 16	360 (2º dia)	25,5	250 µL
NPAU 17		25,9	250 µL
NPAU 18		24,3	250 µL
NPAU 19	1440 (1º dia)	23,8	200 µL
NPAU 20		21,7	200 µL
NPAU 21		24,9	200 µL
NPAU 22	2880 (1º dia)	27,0	200 µL
NPAU 23		24,9	200 µL
NPAU 24		24,6	200 µL

Os órgãos e tecidos foram coletados, lavados com solução salina, pesados e encaminhados ao detector de poço para contagem. Para o pico do ouro (411,8 keV) o detector de poço possui uma eficiência de 39%. Cada órgão foi inserido em um tubo de contagem, sendo estes colocados suportes com capacidade para até 10 tubos. Estes suportes foram acondicionados no aparelho que, através de trilhos, levava as amostras até o local de contagem. Cada órgão foi contado por 60 segundos e os resultados foram salvos em disquete e impressos. Após a contagem as carcaças e órgão dos animais foram identificadas em sacos

plásticos de cor branca acondicionadas no freezer de resíduos radioativos, sendo posteriormente descartadas de acordo com as normas do CDTN/CNEN.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Toxicologia

Os relatórios dos exames bioquímicos, hemograma e histopatologia podem ser encontrados no *apêndice A*. Pelos resultados podemos concluir que alguns órgãos e tecidos sofreram lesões conforme o esperado, no entanto não existem grandes discrepâncias entre os valores encontrados para o grupo Controle e para os grupos 1 (PVP) e 2 (AuNPs-PVP). Assim, podemos concluir que tanto o PVP quanto as nanopartículas de ouro não apresentam reações tóxicas severas aos camundongos.

5.3.2 Biodistribuição

Os resultados da biodistribuição para o sangue, cérebro, cerebelo, tireóide, coração, pulmão, fígado, baço, estômago, intestino delgado, bexiga, urina, rim, músculo, osso, pata com tumor e pata normal são mostrados nas figuras a seguir. Cada órgão possui 8 colunas indicando os tempos em que foram feitas as contagens gama após administrada a solução contendo as nanopartículas de ouro irradiadas. As colunas representam a média de contagem de dois camundongos em cada tempo e a barra de erro representa o seu desvio padrão. O gráfico mostra a porcentagem de dose injetada por grama do órgão (%DI g⁻¹). Para o sangue e urina o valor representa na verdade a porcentagem de dose injetada por mililitro (%DI mL⁻¹). Também foi realizada a contagem (cpm) na cauda dos animais e descontado o valor de dose injetada encontrado do valor inicial. Assim, se em um camundongo foram injetados 800.000 cpm e, durante a contagem, encontrou-se 50.000 cpm na cauda, a dose injetada considerada para os demais órgãos para efeitos de cálculo (%DI g⁻¹) foi de 750.000.

A tabela 5.3 mostra o peso médio dos órgãos e seu desvio-padrão. Observando-se os gráficos das *figuras 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8* podemos perceber que nos primeiros minutos de injeção a maior parte da dose injetada se encontra no sangue do animal. Isto já era de se esperar, já que não houve tempo da solução ser incorporada pelos demais órgãos. Também notamos que a concentração de dose injetada no sangue vai diminuindo com o tempo, no

entanto 24 horas após a injeção podemos notar que ocorre um acréscimo repentino na porcentagem de dose injetada (%DI g⁻¹). Os resultados de maneira geral continham um desvio padrão muito alto devido ao pequeno número de animais utilizados em cada um dos tempos.

Tabela 5.3 – Peso médio dos órgãos e tecidos coletados

Órgão	Peso médio (g)	Desvio-padrão (g)
Cérebro	0.32	0.03
Cerebelo	0.1	0.05
Tireóide	0.09	0.01
Coração	0.17	0.02
Pulmão	0.32	0.02
Fígado	1.4	0.17
Baço	0.24	0.06
Estômago	0.41	0.05
Intestino delgado	0.22	0.06
Bexiga	0.04	0.01
Rim	0.41	0.04
Músculo	0.17	0.05
Osso	0.15	0.04
Pata tumor	0.45	0.04
Pata normal	0.22	0.02

Alguns órgãos como a tireóide, o coração, o pulmão e o estômago tiveram uma porcentagem de dose injetada baixa quando comparada a outros órgãos como o fígado e o baço. Em alguns órgãos não foi registrada nenhuma contagem em alguns tempos, este é o caso do cérebro, cerebelo, intestino delgado e bexiga, talvez devido à pequena amostragem. Também para tempos maiores, como 2880 min (48 h), não foi registrada nenhuma contagem em alguns órgãos, talvez pela queda da atividade do ouro ($t_{1/2} = 2,7$ dias). No entanto, para que a biodistribuição fosse feita em intervalos de tempo maiores que 48 horas deveria ter sido administrada uma dose maior que 800.000 cpm. Devido às normas de radioproteção adotadas pelo CDTN visando à segurança, a solução de ouro não poderia ser irradiada por um tempo maior, do contrário não seria possível retirar o material da Área do Reator devido aos limites de atividade permitidos em área controlada. Como o experimento exigia um grande número de pessoas envolvidas, optamos por manter a atividade no mínimo exequível para a realização do experimento seguindo os princípios básicos de radioproteção.

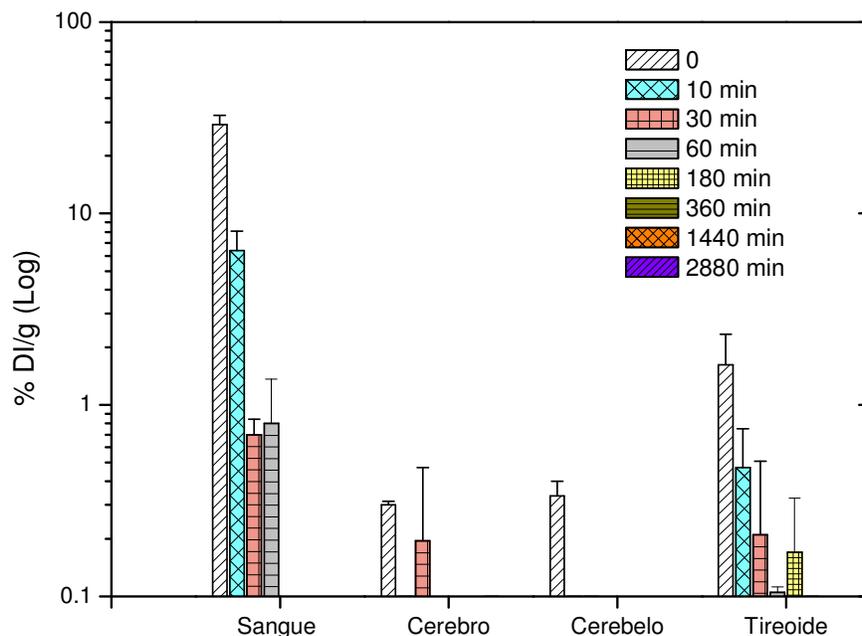


Figura 5.5 - Porcentagem de dose injetada por grama de órgão: sangue (%DI mL⁻¹), cérebro, cerebelo, tireóide.

Foi encontrado no cérebro e cerebelo a presença de nanopartículas em pequenas doses nos tempos 0 ($0,30 \pm 0,01$ %DI g⁻¹) cérebro e $0,33 \pm 0,06$ %DI g⁻¹ cerebelo) e 30 min (apenas cérebro). Analisando os resultados, podemos concluir que as nanopartículas não atravessaram as barreiras do cérebro, sendo a contagem encontrada devido à circulação do sangue. A tireóide apresentou uma pequena concentração decaindo logo em seguida até 180 minutos, não sendo registrado mais nenhuma contagem após este tempo.

No coração (figura 5.4), podemos observar uma concentração considerável no tempo 0 ($4,9 \pm 3,5$ %DI g⁻¹) devido à circulação das AuNPs no organismo. No entanto, esta concentração cai até seu último registro em 360 minutos ($0,22 \pm 0,18$ %DI g⁻¹), não havendo acumulação de AuNPs neste órgão. A concentração de nanopartículas no pulmão no instante inicial foi um pouco menor que no coração ($3,6 \pm 1,7$ %DI g⁻¹), diminuindo até o último registro no tempo 2880 min ($0,12 \pm 0,02$ %DI g⁻¹), isto evidencia que houve uma pequena retenção de nanopartículas neste órgão.

No baço, o ponto máximo da dose foi observado 3 horas (180 minutos) após a injeção da solução ativada, com um valor de 64 ± 1 %DI g⁻¹. Após este intervalo, a porcentagem

diminui até atingir o limite mínimo de $12,1 \pm 0,7 \text{ \%DI g}^{-1}$ no intervalo de 48 horas após a injeção. O pico de dose observado no fígado foi de $50 \pm 4 \text{ \%DI g}^{-1}$, 1 hora após a injeção, diminuindo até alcançar $14 \pm 1 \text{ \%DI g}^{-1}$ depois de 48 horas. No entanto, um fato que podemos observar nos dois órgãos é um rápido crescimento entre 0 e 10 minutos, seguido por uma diminuição entre 10 e 30 minutos. Verificando cada animal dos grupos de 10, 30 e 60 minutos, não observamos nenhum camundongo com contagens muito discrepantes. Esta concentração acentuada pode ter sido causada pelo diâmetro das AuNPs-PVP ($110 \pm 20 \text{ nm}$), já que não houve uma retenção tão grande nestes órgãos em outros estudos [2.3]. Talvez estes órgãos inicialmente eliminem as nanopartículas, ocorrendo posteriormente uma retenção devido a algum dano no tecido. Como podemos observar uma alta concentração mesmo no tempo de 2880 min, estes órgãos necessitariam de tempos de medida mais prolongados para descobrirmos se as nanopartículas são eliminadas ou não.

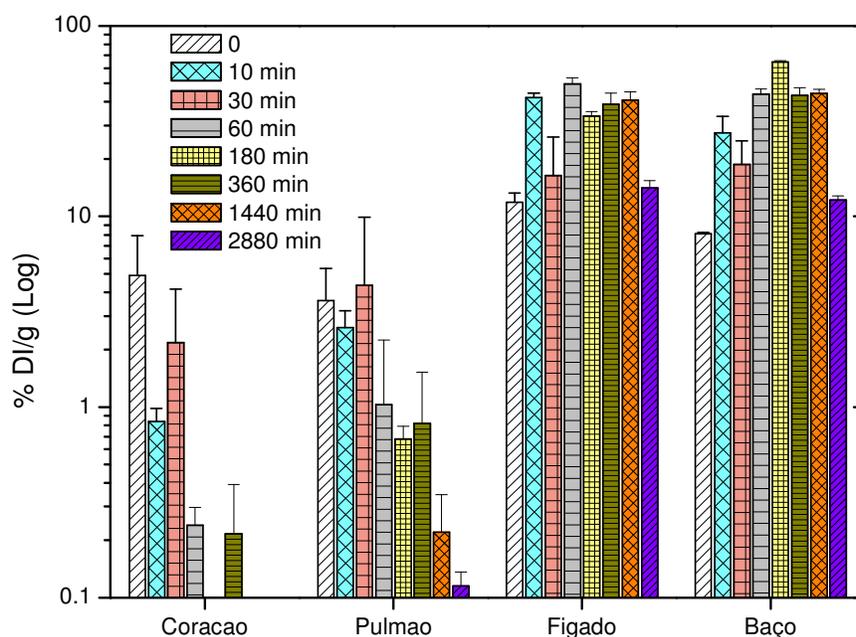


Figura 5.6 - Porcentagem de dose injetada por grama de órgão: coração, pulmão, fígado e baço.

O estômago (figura 5.7) teve um crescimento na concentração de AuNPs. No instante inicial a concentração de $0,33 \pm 0,03 \text{ \%DI g}^{-1}$, subindo até $2,0 \pm 1,0 \text{ \%DI g}^{-1}$ no tempo de 180 minutos, atingindo o valor de $0,8 \pm 0,7 \text{ \%DI g}^{-1}$ em 2880 min. O intestino delgado teve a maior concentração de nanopartículas no tempo inicial ($0,3 \pm 0,1 \text{ \%DI g}^{-1}$) e no tempo de 360

min observamos o último registro de $0,14 \pm 0,06$ %DI g^{-1} . Na bexiga, só foi registrado a presença de nanopartículas no tempo inicial ($0,14 \pm 0,2$ %DI g^{-1}). No entanto, a presença de AuNPs na bexiga só foi registrada em um dos animais, tornando o resultado para este órgão inconclusivo.

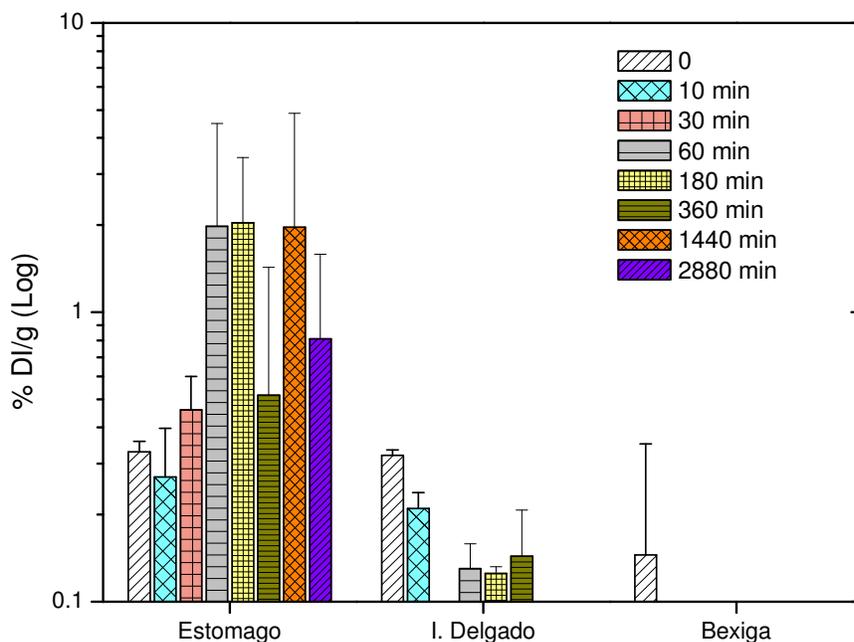


Figura 5.7 – Porcentagem de dose injetada por grama de órgão: estômago, intestino delgado e bexiga.

No rim (figura 5.8), a concentração inicial de nanopartículas foi de $2,70 \pm 0,8$ %DI g^{-1} . Em alguns tempos deste órgão (30 e 360 min), considerando o desvio padrão, podemos observar que as concentrações são maiores que no tempo inicial. O músculo teve uma concentração de $0,13 \pm 0,04$ %DI g^{-1} no tempo inicial, em alguns tempos não foi registrado nada. Para os tempos mais altos, como 1440 e 2880 min, isto já era esperado. No entanto, não houve registro no tempo de 10 min. e no tempo posterior (30 min) houve. Mais uma vez observamos que seria necessário um número maior de animais para obtermos resultados mais conclusivos.

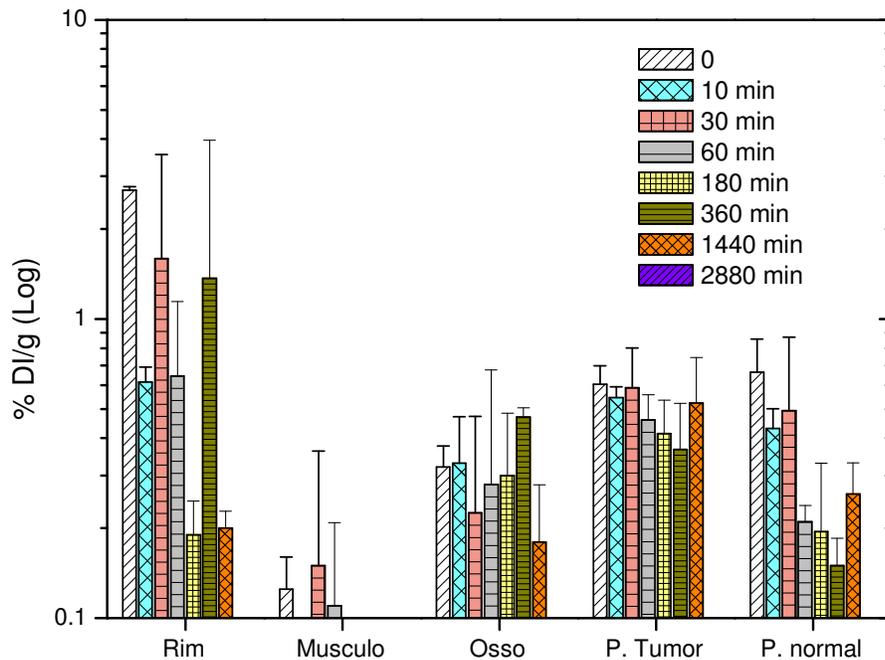


Figura 5.8 - Porcentagem de dose injetada por grama de órgão: rim, músculo, osso, pata com tumor e pata normal.

A figura 5.9 mostra em destaque a evolução temporal das concentrações de dose injetada na pata normal e na pata injetada com o tumor Ehrlich. O intervalo em que ocorre a maior concentração para o pata com tumor é logo após a injeção com $0,6 \pm 0,1$ % DI g^{-1} . No entanto, nos intervalos de 60, 180, 360 e 1440 minutos são encontrados resultados mais interessantes. Conforme observamos na figura, a retenção de nanopartículas na pata com tumor se mantém praticamente constante até o tempo de 1440 minutos, sofrendo um decréscimo acentuado no tempo de 2880. Na pata normal, a concentração de nanopartículas regride mais rapidamente. Em alguns intervalos de tempo (60, 180, 360 e 1440 min) a contagem observada para a pata com tumor é cerca de 100% maior que na pata normal. Isto mostra que ocorre uma maior retenção de nanopartículas no tecido tumoral devido à sua hipervascularização e deficiência linfática.

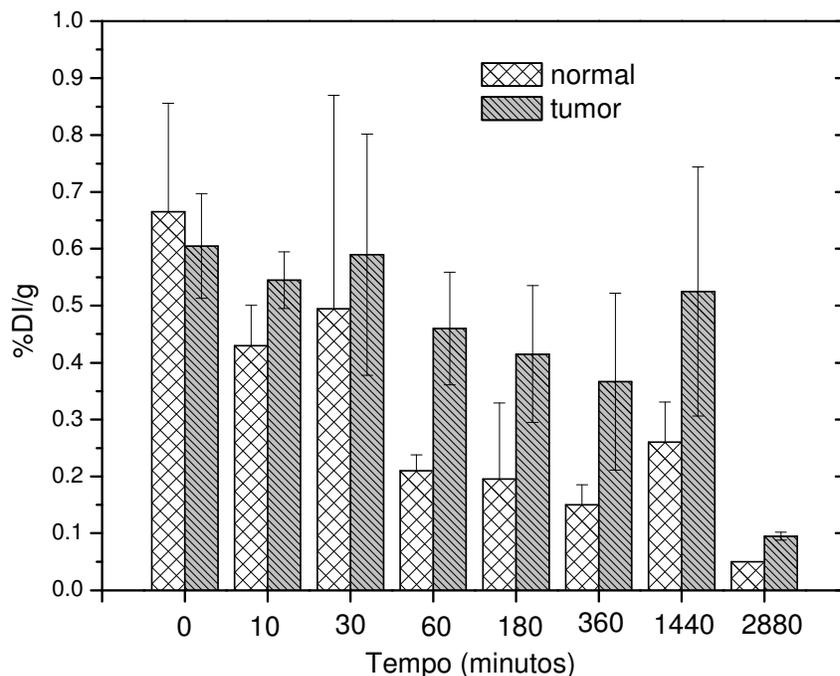


Figura 5.9 - %DI g⁻¹ para a pata com tumor e a pata normal.

5.4.1 Conclusões

Com apenas 1 hora de irradiação a um fluxo de $6,6 \times 10^{11} \text{ n s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ e $3,0 \times 10^{10} \text{ n s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para nêutrons térmicos e epitérmicos, respectivamente, foi possível medir a biodistribuição de uma solução de ouro coloidal ($\sim 90 \mu\text{g mL}^{-1}$) utilizando um detector poço com (39%) de eficiência. A técnica permitiu medir a concentração de AuNPs nos órgãos e tecidos utilizando uma concentração de ouro injetada ($\sim 700 \mu\text{g de Au kg}^{-1}$ de animal) bem menor que em outros trabalhos, que utilizaram até $2,7 \text{ g kg}^{-1}$ de animal (Hainfeld, 2006) [5.3]. Vale ressaltar que o tempo de irradiação utilizado foi de apenas 1 hora. Assim, poderíamos diminuir ainda mais a concentração de AuNPs administradas em outros estudos. A concentração 2880 minutos depois de administradas as nanopartículas no baço ($12,2 \pm 0,6 \text{ \% DI g}^{-1}$) e no fígado ($14 \pm 1 \text{ \% DI g}^{-1}$), mostrou que está ocorrendo retenção das nanopartículas nestes órgãos, talvez causado pelo diâmetro médio das nanopartículas (110 ± 20). Dentre os resultados apresentados, podemos destacar a porcentagem de dose injetada para a pata com tumor e pata normal dos camundongos, indicando uma retenção maior no tumor, o que

possibilita o uso de $^{198}\text{AuNPs}$ em diagnóstico por imagem, como o SPECT. Os resultados acima nos auxiliarão durante a análise dos nanotubos de carbono decorados com AuNPs (capítulo 6), verificando se a NAA pode ser usada em um estudo da biodistribuição dos nanotubos.

5.5 Referência

- [5.1] Tandra R. Chaudhuri, , Kurt R. Zinn, D.V.M., , J. Steven Morris, Gregory A. McDonald, Alfred S. Llorens, e Tuhin K. Chaudhuri; *Detection of Ovarian Cancer by ^{198}Au -Labeled Human Monoclonal Antibody*; *Cancer Supplemente* **73** (1994).
- [5.2] Paciotti and Lonnie Myer, David Weinreich, Dan Goia, Nicolae Pavel, Richard E. McLaughlin, Lawrence Tamarkin; *Colloidal Gold: A Novel Nanoparticle Vector for Tumor Directed Drug Delivery*; *Drug Delivery*, **11**, 169–183 (2004).
- [5.3] J F Hainfeld, D N Slatikin, T M Focella, and H M Smilowitz; *Gold nanoparticles: a new X-Ray contrast agent*; *The British Journal of Radiology* **79**, 248–253 (2006).
- [5.4] James F Hainfeld, Daniel N Slatkin and Henry M Smilowitz; *The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice*; *Phys. Med. Biol.* **49** (2004).
- [5.5] Quan-Yu Cai, MD, Sun Hee Kim, PhD, Kyu Sil Choi, PhD, Soo Yeon Kim, MS, Seung Jae Byun, MD, Kyoung Woo Kim, PhD, Seong Hoon Park, MD, Seon Kwan Juhng, MD, and Kwon-Ha Yoon, MD; *Colloidal Gold Nanoparticles as a Blood-Pool Contrast Agent for X-ray Computed Tomography in Mice*; *Investigative Radiology* **42** (2007).
- [5.6] Joshua M. Stern, Jennifer Stanfield, Wareef Kabbani, Jer-Tsong Hsieh and Jeffrey A. Cadeddu; *Selective Prostate Cancer Thermal Ablation With Laser Activated Gold Nanoshells*; *The Journal of Urology* **179**, 748-753 (2008).
- [5.7] D. Patrick O’Neala, Leon R. Hirschb, Naomi J. Halasc, J. Donald Payne, Jennifer L. West; *Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles*; *Cancer Letters* **209**, 171–176 (2004).
- [5.8] Lajos Balogh et. al; *Significant effect of size on the in vivo biodistribution of gold composite nanodevices in mouse tumor models*; *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **3**, 281–296 (2007).

- [5.9] Frank Alexis, Eric Pridgen, Linda K. Molnar, Omid C. Farokhzad; *Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles*; *Molecular Pharmaceutics* 507 (2008).
- [5.10] Raghuraman Kannan, Valerie Rahing, Cathy Cutler, Ravi Pandrapragada, Kavita K. Katti, Vijaya Kattumuri, J. David Robertson, Stan J. Casteel, Silvia Jurisson, Charles Smith, Evan Boote, e Kattesh V. Katti; *Nanocompatible Chemistry toward Fabrication of Target-Specific Gold Nanoparticles*; *J. AM. CHEM. SOC.* **128**, 11342-11343 (2006).
- [5.11] Kan, P.; Rahing, V.N.; Watkinson, L.D.; Carmack, T.L.; Lever, J.; Smith, C.J.; Loyalka, S.; Katti, K.V.; Cutler, C.S.; and Jurisson, S.S; *The Potential of Gum Arabic Stabilized Au-198 Nanoparticles (GA-AuNP) as a Radiotherapeutic Agent for Prostate Câncer*; 99th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Los Angeles, April (2008).
- [5.12] Joseph D. Brain, Ramon M. Molina, Malcolm M. DeCamp and Angeline E. Warner; *Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species* ; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **276**, 146-154 (1999).

Capítulo 6 – Nanotubos de carbono

6.1 Introdução

Dentre as várias classes de nanomateriais, os nanotubos de carbono estão entre os mais estudados ao longo das duas últimas décadas. Segundo Lin (2004) [6.1], os nanotubos de carbono (*CNT, Carbon Nanotubes*) podem ser definidos como folhas de grafeno enroladas, formando uma estrutura tubular. Existem CNTs com camada única (*SWCNT, Single-wall carbon nanotubes*), dupla camada (*DWCNT, Double-wall carbon nanotubes*) ou múltiplas camadas (*MWCNT, multi-wall carbon nanotubes*). O comprimento dos CNTs varia entre poucas dezenas de nanômetros a alguns micrometros e seu diâmetro varia entre 0,4 – 2,0 nm (*SWCNT*) e 2 – 100 nm (*MWCNT*).

Além dos nanotubos, outro nanomaterial de grande interesse é o fullereno [6.2]. O principal fullereno é o C_{60} , uma molécula esférica formada por 60 átomos de carbono, no entanto existem fullerenos com mais átomos de carbono como o C_{70} e C_{82} . Essa molécula atraiu interesse em diversas áreas de pesquisa devido a sua estrutura tri-dimensional e suas propriedades físico-químicas únicas. O diâmetro do C_{60} é de 0,7 nm, as ligações entre os carbonos hibridizados sp^2 formam 12 pentágonos e 20 hexágonos. Segundo Rao et al. (1995) [6.3], a descoberta do C_{60} foi motivada pela observação de espectros infravermelhos de aglomerados (*clusters*) de carbono ejetados por estrelas vermelhas gigantes. Pesquisadores da Rice University no Texas (US) aliados ao astrofísico inglês Sir H. Kroto ao tentar reproduzir o fenômeno em laboratório, usando a vaporização à LASER de um bastão de grafite na presença de He, verificaram no espectrômetro de massa que a fuligem formada continha dois picos bem distintos em massas iguais a 60 e 70 átomos de carbono. No ano de 1996 estes pesquisadores ganharam o Nobel pela descoberta. Os fullerenos foram batizados com esse nome em homenagem ao arquiteto americano Buckminster Fuller, idealizador de domos geodésicos contendo hexágonos intercalados por pentágonos. Na figura 6.1 é mostrada a estrutura de *SWCNT* e *DWCNT* e do C_{60} .

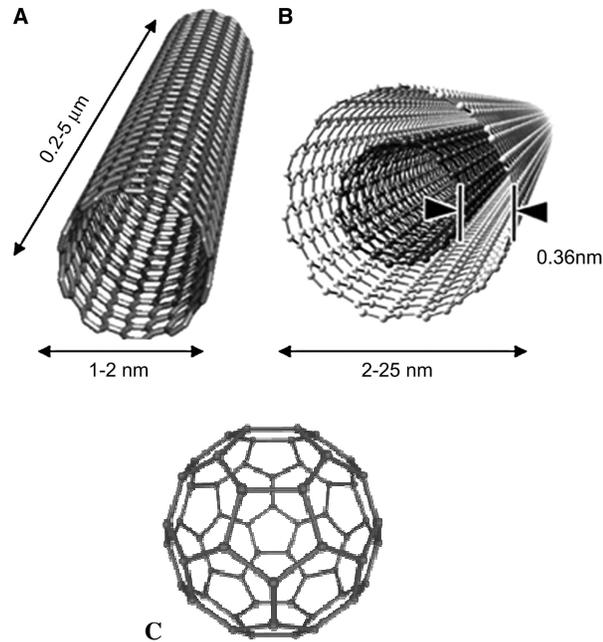


Figura 6.1 – Estrutura dos SWCNT (a), DWCNT (b) e C₆₀ (c).
 (fonte: wikipédia, www.wikipedia.org consultado em julho de 2008).

Segundo Rao, o interesse nos CNTs e fullerenos abrange diversas áreas como física, química, engenharia, biologia e medicina. Na física, devido às dimensões e propriedades eletrônicas de superfície, os nanotubos estão sendo utilizados na fabricação de nanotransistores, sendo também usados na fabricação de pontas de prova em microscópios de força atômica (AFM). Na química, devido à alta área superficial, foram desenvolvidas técnicas de decoração dos CNTs com metais catalisadores, como a platina, aumentando a eficiência de eletrodos usados em células de combustível (Dillon et al., 1997) [6.4]. Na biologia e na medicina, os nanotubos estão sendo marcados com diversos compostos para a realização de ensaios imunológicos (Wohlstadter et al., 2003) [6.5] e carregamento de drogas (Bianco et al., 2005) [6.6].

A quantidade de aplicações encontradas para os nanotubos mostra a importância que estes nanomateriais terão em um futuro próximo. No entanto, seus possíveis impactos no meio-ambiente e nos seres vivos ainda não foram totalmente investigados. Liu (Liu et al., 2007) [6.7] realizou estudos de biodistribuição de nanotubos de carbono em camundongos visando tratamento de tumores por carregamento de drogas. Lacerda (Lacerda et al., 2006) estudou as possíveis aplicações dos nanotubos na medicina, considerando os efeitos toxicológicos destes materiais no organismo [6.8]. No entanto, as características dos nanotubos como diâmetro, comprimento, número de camadas e compostos ligados em sua superfície variam muito em cada processo. As técnicas de

síntese, purificação, picotamento e funcionalização ainda não foram padronizadas e as técnicas de caracterização ainda estão sendo desenvolvidas. Assim, em uma mesma síntese, a distribuição de comprimentos de nanotubos pode variar devido a uma pequena alteração das condições iniciais, alterando resultados de testes *in vivo* e *in vitro* dos CNTs.

O material derivado da síntese dos SWCNT possui impurezas indesejáveis como metais catalisadores, nanopartículas de carbono e carbono amorfo, sendo necessária a purificação deste material. Dentre os métodos de purificação encontrados na literatura, os mais comuns utilizam etapas de aquecimento na presença de oxigênio para oxidar o carbono amorfo e as nanopartículas de carbono, intercaladas com etapas envolvendo ácidos para dissolver os metais catalisadores [6.9]. Para a funcionalização dos nanotubos, são usados ácidos fortes que consigam reagir com as paredes dos tubos, criando grupos carboxílicos (-COOH) ou hidróxidos (-OH). Um dos métodos de funcionalização utiliza refluxo em ácido nítrico (HNO₃) [6.10] ou refluxo/ultrasonificação em uma solução de HNO₃ e ácido sulfúrico (H₂SO₄) [6.11]. Estes métodos também se caracterizam por reduzir o comprimento dos nanotubos (picotamento), permitindo que os nanotubos passem por barreiras biológicas. Os nanotubos obtidos da síntese são insolúveis em meio aquoso, impedindo a sua aplicação em meio biológico. Com a criação dos sítios carboxílicos e do picotamento através da oxidação com solução ácida, os nanotubos podem se tornar solúveis (~2 mg mL⁻¹) em meio aquoso em pH 3, permanecendo estáveis durante meses [6.12]. Segundo Satishkumar et al. (1996) [6.13], a funcionalização de SWCNT através de um refluxo em ácido nítrico, ácido sulfúrico ou água régia por 24 horas levam à criação de cerca de 10²⁰ sítios carboxílicos por grama de nanotubo, considerando a massa atômica do carbono (12 g/mol), isto equivale a cerca de 1 sítio carboxílico a cada 500 átomos de carbono.

Outra maneira de dispersar os nanotubos de carbono em meio aquoso é com o uso de polímeros. Neste método, a cadeia linear dos polímeros se liga através de seu sítio hidrofóbico às paredes dos CNTs, cobrindo toda a sua superfície e podendo formar uma estrutura linear, helicoidal ou multi-helicoidal ao longo do nanotubo. Segundo O'Connell (M. C. O'Connell et al., 2001) [6.14], um dos polímeros utilizados neste método é o polivinilpirrolidona (PVP). Os nanotubos também podem ser funcionalizados com polietilenoglicol (PEG_{1500N}) e poli(vinil álcool) (PVA) sob aquecimento [6.8], estes polímeros possuem em sua cadeia propriedades úteis em

aplicações biomédicas, sendo o PVA degradável em meio biológico. De acordo com Harutyunyan (A. R. Harutyunyan et al., 2006) [6.8], a solubilidade em meio aquoso dos CNTs funcionalizados dependerá da solubilidade dos grupos funcionais, do número de grupos nas paredes dos nanotubos e da força de interação entre os grupos funcionais e os nanotubos, podendo alcançar solubilidades de até 87 mg mL^{-1} .

Dentre os métodos citados para estudos de biodistribuição de nanotubos, em nenhum deles utilizou-se nanotubos de carbono decorados com nanopartículas de ouro e irradiados com nêutrons para espectrometria gama, embora já tenham sido desenvolvidos diversos métodos de síntese de AuNP-CNTs. Basicamente, os métodos de decoração de nanotubos com nanopartículas utilizam os sítios criados nas paredes dos nanotubos durante a funcionalização como sítios de nucleação das nanopartículas. Jiang (2006) [6.15] descreveu um processo de decoração de nanotubos de carbono que tiveram sua superfície modificada durante a síntese por CVD. A adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante a síntese criou sítios (-COOH) e (-OH) nas paredes dos nanotubos, facilitando o processo de decoração com AuNPs [6.16].

Neste trabalho, nanotubos de carbono de parede única foram sintetizados, purificados, funcionalizados e decorados com nanopartículas de ouro. Os SWCNTs foram caracterizados por microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e espectrometria gama após ativação neutrônica. As nanopartículas foram caracterizadas por absorção óptica. Será discutido se os nanotubos decorados com AuNPs (AuNP-SWCNT) podem ser utilizados em meio biológico para o estudo da biodistribuição e toxicologia dos nanotubos através da ativação neutrônica das nanopartículas de ouro através da reação $^{197}\text{Au}(n,\gamma)^{198}\text{Au}$.

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 Síntese e purificação de nanotubos de carbono e fullerenos

As etapas de síntese, purificação, funcionalização e decoração dos SWCNT e MWCNT foram realizadas no laboratório de nanomateriais do Departamento de Física da UFMG. Para síntese dos SWCNT, utilizou-se o processo de arco-elétrico, mostrado na *figura 6.2*. O sistema consiste de uma câmara refrigerada à água, eletrodos de grafite dopados com metais catalisadores (Co 0,3% e Ni 0,3%) um cilindro de hélio, uma bomba mecânica e uma fonte de tensão de corrente contínua (Saban Eletric Corp) que

opera com uma tensão entre 0 e 40 V e correntes de até 1500 A. Inicialmente, a câmara foi evacuada com uma bomba mecânica até atingir-se o mínimo de pressão possível. A válvula da bomba de vácuo é fechada e outra válvula, ligada a um cilindro de hélio, é aberta preenchendo a câmara com gás hélio até uma pressão que permita um novo bombeamento. A válvula de hélio é fechada e o sistema é novamente bombeado, fazendo com que o ar oxigênio residual presente seja retirado. A câmara é então preenchida com gás He até uma pressão sistema entre 150 e 400 torr. Em seu interior, dois eletrodos (6 mm de diâmetro cada um) de grafite em posição vertical ficam separados a uma distância de 1 – 2 mm. Quando é aplicada uma tensão de 17 – 24 volts, forma-se um arco-elétrico e uma corrente de 90 – 120 A é transmitida entre os eletrodos. A temperatura do arco atinge valores entre 3700 e 4000 °C, formando um plasma através da ionização do gás entre os eletrodos. A alta temperatura do plasma arranca os átomos de carbono e catalisadores do eletrodo que, ao atingirem a parede da câmara resfriada, formam os nanotubos de carbono. Estes nanotubos estão imersos em uma fuligem que também contém impurezas: metais catalisadores e carbono amorfo. A fuligem possui um aspecto de “teia” ou “tecido”, indicando a formação de nanotubos durante a síntese. Este método consome cerca de 1g de eletrodo por minuto com uma corrente de 120 A.

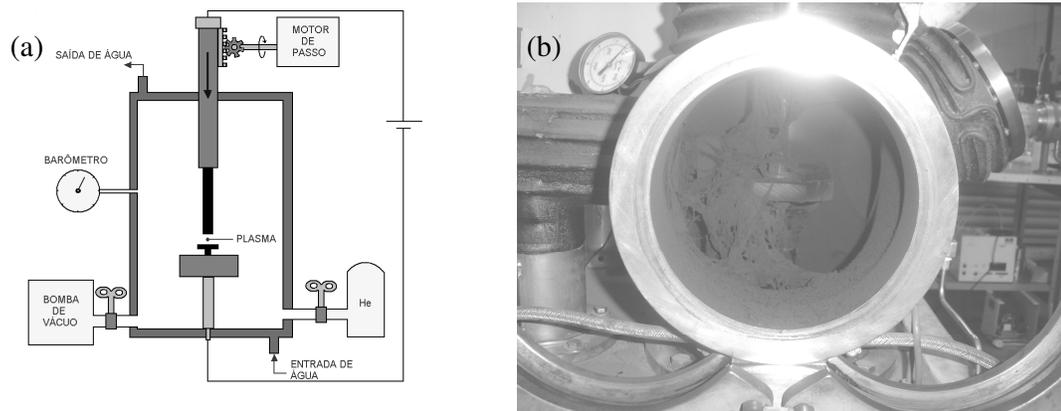


Figura 6.2 – (a) Esquema da câmara de arco-elétrico; (b) Foto da câmara aberta logo após a síntese de SWCNTs, podemos ver em detalhe a formação de uma “teia”.

A fuligem produzida durante a síntese possui essencialmente nanotubos de carbono, carbono amorfo e metais catalisadores. Em aplicações que necessitam de alto grau de pureza, a fuligem deve passar por processos de purificação até obtermos nanotubos de carbono com a concentração necessária. Em nosso processo de purificação

duas etapas são necessárias: a primeira tem como objetivo oxidar o carbono amorfo, para isso a fuligem é aquecida à temperatura de 400 °C durante 1 h sob atmosfera normal (presença de O₂). Na segunda etapa os metais catalisadores são retirados colocando-se a fuligem em contato com ácido clorídrico concentrado (HCl 12 M) durante 20 h, os metais ficam dissolvidos no ácido e depois as amostras são centrifugadas a 1500 G durante 10 minutos. Devido ao meio ácido, os nanotubos ficam no fundo do tubo *falcon*, o excesso de ácido é retirado, sendo acrescentada água destilada (H₂O DE), voltando novamente à centrifugação para retirar o resíduo de ácido. As duas etapas descritas acima foram realizadas três vezes para garantir uma boa purificação do material. Os nanotubos de carbono produzidos através deste método podem alcançar até 97% de pureza [6.17].

Os MWCNTs foram sintetizados através da deposição química por fase vapor (CVD, *Chemical Vapor Deposition*) [6.18]. Neste método, uma fonte de vapor contendo carbono – como o metano, etileno ou acetileno – percorre o interior de um tubo previamente aquecido (600 – 1200 °C). No centro deste tubo, é colocado um catalisador, como Fe, Ni ou Co, que auxiliará na formação dos nanotubos. Ao ser adsorvido na superfície do catalisador, ocorre a decomposição da molécula de carbono. Através do processo de nucleação do carbono na superfície do metal catalisador, ocorre o crescimento de nanotubos de carbono. O método de síntese por CVD é vantajoso, pois é mais simples e econômico que o método por arco elétrico.

A síntese dos fullerenos (C₆₀ e C₇₀) é realizada na mesma câmara arco-elétrica onde são sintetizados os nanotubos de carbono, no entanto alguns parâmetros são alterados. A pressão atmosférica utilizada durante a síntese dos fullerenos é de ~ 200 torr de He e o eletrodo de grafite não é dopado com metais catalisadores. Os demais parâmetros de síntese são os mesmos. Numa distância suficientemente pequena, aplica-se uma diferença de tensão entre os bastões produzindo com isso uma descarga entre os eletrodos, isso faz com que a temperatura do eletrodo de grafite alcance cerca de 4700°C. O plasma de carbono, quando entra em contato com o gás He, resfria rapidamente e se aglomera formando uma fuligem com cerca de 5% de fullerenos e o restante de carbono amorfo.

Os fullerenos foram purificados seguindo o processo de sublimação. Neste método, a fuligem produzida no forno é armazenada em um recipiente de grafite, esse recipiente é colocado no interior de um tubo de quartzo, que é inserido num forno cilíndrico. As extremidades do tubo de quartzo ficam fora do forno, criando um

gradiente de temperatura quando o forno é ligado. Uma das extremidades do tubo é fechada enquanto que na outra é instalada uma bomba mecânica e turbo-molecular, criando um vácuo de cerca de 10^{-6} torr. Com a bomba de vácuo funcionando, o forno é lentamente aquecido até se atingir a temperatura de 650°C , essa temperatura é mais do que suficiente para que os $\text{C}_{60}/\text{C}_{70}$ sublimem. Já no estado de vapor, conforme vão se afastando do centro do forno, os fullerenos se cristalizam nas paredes do tubo de quartzo de menor temperatura. O sistema é então desligado e, depois que o tubo atinge a temperatura ambiente, o material é retirado das paredes do tubo com uma espátula.

6.2.2 Funcionalização dos SWCNT

Os nanotubos são materiais hidrofóbicos, limitando sua aplicação em meio biológico e em reações químicas que utilizem água como solvente. Para tornar os nanotubos solúveis em água foi necessário funcionalizar suas paredes com grupos hidrofílicos, possibilitando a sua aplicação em meio biológico. O método escolhido para a funcionalização dos nanotubos de carbono foi desenvolvido por Marshall [6.11]. Neste método, os nanotubos ficaram em um refluxo em uma solução contendo ácido nítrico concentrado (HNO_3 65%) e ácido sulfúrico concentrado (98%) (HNO_3 3v:1v H_2SO_4) durante 4 horas, criando grupos carboxílicos (-COOH) nas paredes dos nanotubos (SWCNT-COOH).

6.2.3 Decoração com AuNPs

Os grupos carboxílicos produzidos durante a funcionalização possuem função dupla: tornar os nanotubos solúveis em água e servir como sítios de nucleação para a formação de nanopartículas de ouro. Segundo Zhang [6.16], em alguns processos de formação de nanopartículas de ouro em uma solução contendo nanotubos de carbono, a nucleação das nanopartículas de ouro ocorre preferencialmente sobre os grupos (-COOH) devido à menor energia do sistema. Assim, os sítios carboxílicos auxiliam na formação das nanopartículas de ouro.

Em nosso experimento, foram utilizados dois métodos para reduzir os íons de ouro e marcar os nanotubos de carbono de parede única com nanopartículas de ouro (AuNP-SWCNT): radiação UV e hidrazina. No primeiro método, foi feita uma solução com 16 mg de SWCNT-COOH, 10 mL de etileno glicol, 14 mL de água destilada e 200

μL de uma solução de HAuCl_4 0,1 M. A solução foi ultrasonificada durante 5 minutos para dispersar os nanotubos e depois irradiada com luz ultravioleta (UV) durante 50 minutos através de uma lâmpada que emite radiação com comprimentos de onda de 254 e 366 nm (16 W). Segundo Shujuan Huang (2002) [6.19], na presença de radiação ultravioleta, os íons de ouro são reduzidos, com a nucleação ocorrendo preferencialmente sobre os sítios carboxílicos. No método da hidrazina (N_2H_4), 16 mg de SWCNT-COOH foram acrescentados em 15 mL de água destilada, a solução foi ultrasonificada durante 5 minutos e então foi acrescentado 100 mL de HAuCl_4 e 5 mg de PVP K30. Sob agitação magnética, acrescentou-se 15 μL de hidrazina, permanecendo sob agitação durante 4 horas para assegurar o término da reação. Nos dois métodos de marcação, a solução foi filtrada em um filtro *Milipore* 0,45 μm PTFE, acrescentando-se 1000 mL de água destilada para retirar impurezas.

6.2.4 Caracterização

Os nanotubos foram caracterizados por diversas técnicas. A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foi realizada no centro de microscopia na Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus, BA). O aparelho é um Morgagni 268D, fabricado pela FEI Company, equipado com uma câmara CCD. O aparelho possui um aumento máximo de 180 mil vezes, operando a uma tensão de 100 kV. A grade de suporte dos nanotubos utilizada para a microscopia foi a *Carbon Type-A*, que possui um polímero recobrindo a malha de carbono. Para retirar o polímero, a grade foi mergulhada em uma solução de clorofórmio por 10 segundos. Os nanotubos foram suspensos em uma solução de álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) e ultrasonificados (55 Hz) durante 30 minutos para dispersão. Os nanotubos suspensos foram pipetados na grade de carbono e levados ao microscópio. Os nanotubos também foram analisados em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) no Laboratório de Microanálise do Departamento de Física, UFMG. O equipamento utilizado foi o JEOL da marca JKA 8900RL.

Os nanotubos também foram analisados por microscopia de força atômica (AFM) no laboratório de nanoscopia do Departamento de Física, UFMG. O microscópio utilizado é da marca NT-MDT, modelo Solver Pro-M, possuindo resolução no eixo-z de décimos de nanômetros. Os nanotubos foram suspensos em água

deionizada e ultrasonificados por 15 minutos para homogeneização, sendo depois pipetados em uma folha de mica previamente clivada. O programa utilizado para aquisição de imagens foi o Nova 1.0.26 RC1 versão 2004 da NT-MDT [6.20].

Os nanotubos decorados com AuNPs foram filtrados utilizando um sistema de vácuo e um filtro Milipore de 0,45 μm . Os nanotubos ficaram agregados ao filtro e as nanopartículas que não estavam ligadas aos nanotubos passaram através do filtro. As nanopartículas suspensas foram analisadas por espectrometria de absorção óptica para analisar o seu diâmetro médio através do pico de absorção.

Para detectar impurezas, as amostras foram analisadas por ativação neutrônica. A NAA foi realizada no CDTN, utilizando o reator TRIGA como fonte de nêutrons, e o detector HP-Ge para detecção. O software Genie 2000 foi usado na aquisição e processamento de dados (para maiores detalhes, consulte o capítulo 2). Para detecção dos núclídeos de meia-vida curta, as amostras foram irradiadas por 5 minutos e levadas para contagem. Depois foram novamente irradiadas por 8 horas e contadas durante 10 minutos, detectando com isso os isótopos de meia-vida longa. A distância amostra/detector utilizada durante as contagens foi de 30 cm.

6.2.5 Cálculo teórico

Os resultados obtidos na caracterização dos nanotubos decorados com AuNPs serão usados para verificar a viabilidade de se utilizar os AuNP-SWCNTs em estudos de biodistribuição. Para calcular o número de átomos de ouro N em uma nanopartícula será usada a equação (6.1) [6.21], onde D é o diâmetro da nanopartícula, M é a massa atômica do ouro (197 g/mol), N_A é o número de Avogrado ($6,02 \times 10^{23}$) e ρ é densidade da estrutura cristalina cúbica de face centrada (fcc) do ouro ($19,3 \text{ g cm}^{-3}$).

$$N = \frac{\pi\rho D^3}{6M} N_A \approx 30D^3 \quad , \text{ onde a unidade de } D \text{ é nm} \quad (6.1)$$

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Purificação e funcionalização de nanotubos

A *figura 6.3* é uma imagem feita em um microscópio de eletrônico de varredura de uma região contendo uma alta concentração de SWCNT do material recolhido após a sua síntese na câmara de arco-elétrico. Devido ao aumento máximo do aparelho, é difícil identificar as impurezas presentes na amostra, como partículas metálicas e carbono amorfo. No entanto, podemos identificar a formação de um emaranhado de nanotubos, confirmando a sua síntese. A formação do emaranhado de nanotubos dificulta a sua dispersão quando em meio líquido. Por este motivo, ao iniciar o processo de funcionalização, os nanotubos devem ser ultrasonificados por alguns minutos, garantindo uma melhor dispersão e aumentando a superfície de contato entre os nanotubos e o reagente.

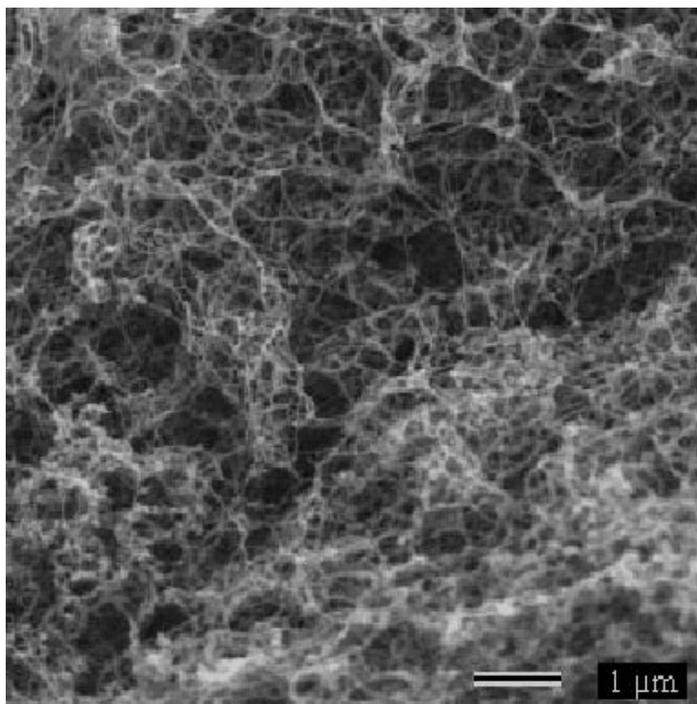


Figura 6.3 – MEV de SWCNT após a síntese na câmara de arco-elétrico.

A *figura 6.4* mostra uma imagem de AFM de um nanotubo funcionalizado (*figura 6.4 a*) e a topografia do substrato ao longo da linha (*figura 6.4 b*), indicando o diâmetro do nanotubo (a altura do substrato é de 1 nm). O diâmetro médio do SWCNT é

de 1,4 nm, no entanto em algumas regiões deste SWCNT-COOH (indicadas pelas setas na figura) o diâmetro atinge 5 nm. Esta mudança no diâmetro indica que formaram-se sítios carboxílicos na parede do nanotubo. A interação entre os sítios carboxílicos ligados ao nanotubo e a ponta da sonda de AFM altera a altura topográfica da amostra.

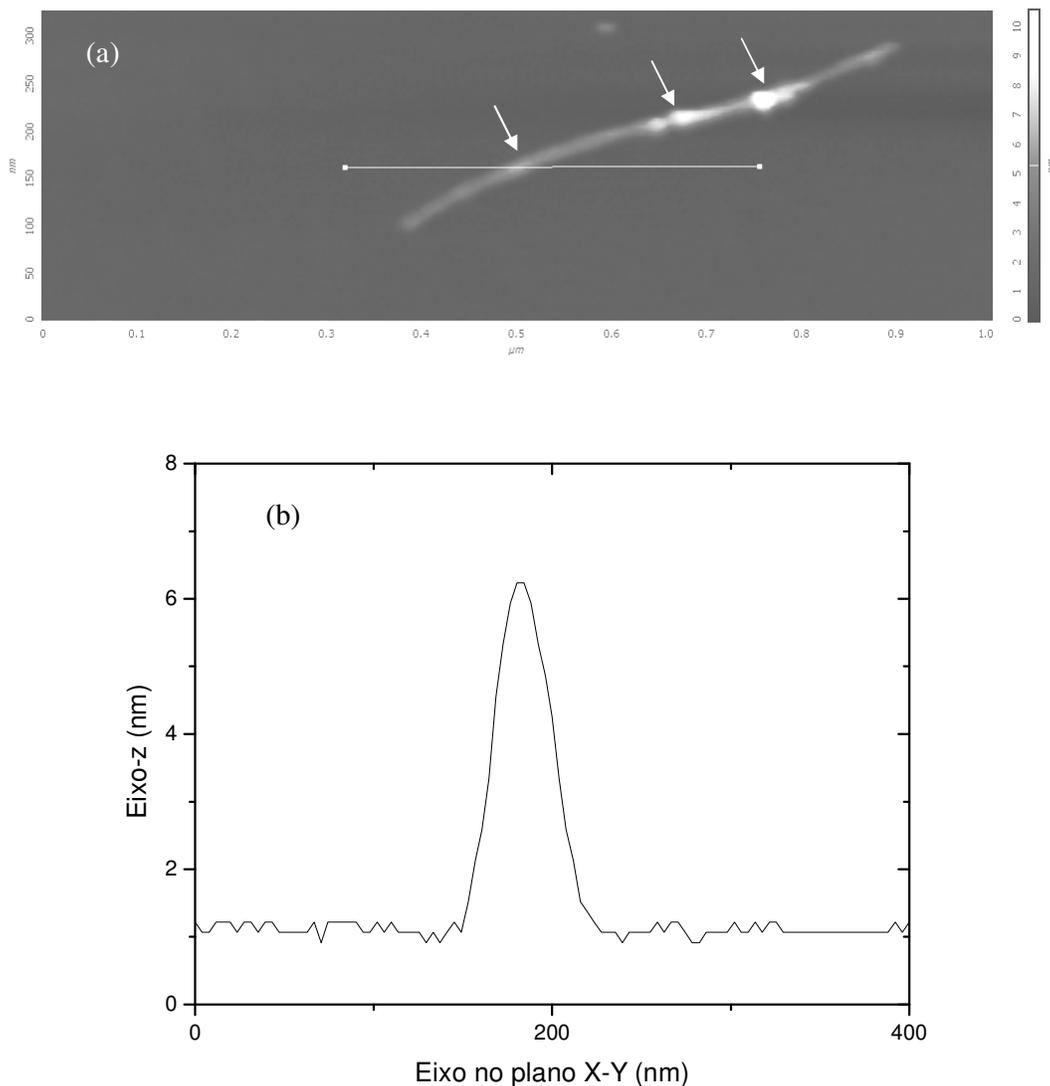


Figura 6.4 – (a) imagem por AFM de nanotubos funcionalizados (-COOH) e (b) topografia do substrato, indicando um diâmetro de 5 nm para o nanotubo.

As amostras analisadas por ativação neutrônica são mostradas na tabela 6.1. As amostras 1 e 2 contêm o material produzida na câmara de arco elétrico após a síntese, no entanto a amostra 1 foi recolhida de um local da câmara com alto rendimento de produção de nanotubos e a amostra 2 foi retirada de um local de baixo rendimento. A

amostra 3 contém MWCNT produzidos pelo método de CVD. As amostras 4 e 5 continham fullerenos (C_{60} e C_{70}) sintetizados e purificados em nosso laboratório (amostra 4) e C_{60} comerciais (amostra 5).

Tabela 6.1 – Amostras irradiadas com nêutron.

Amostra	Descrição	Massa irradiada (mg)
1	SWCNT de alto rendimento	8,9
2	SWCNT de baixo rendimento	12,5
3	MWCNT CVD	13,5
4	C_{60} UFMG	7,9
5	C_{60} comercial	8,3

Na *figura 6.5* são mostrados os gráficos da concentração de impurezas nas amostras 1 (*figura 6.5 a*) e 2 (*figura 6.5*). A concentração de cobalto na amostra 1 ($18000 \pm 1000 \mu\text{g g}^{-1}$) foi maior que na amostra 2 ($4000 \pm 1000 \mu\text{g g}^{-1}$). Como este metal é utilizado como catalisador na síntese dos SWCNTs, isto indica que a quantidade de nanotubos na amostra 1 é maior. A concentração de cloro, sódio e alumínio nas duas amostras é a mesma, indicando que a contaminação com estes elementos ocorreu durante a manipulação das amostras após a síntese. O cloro e o sódio podem ser encontrados em produtos comumente usados no laboratório de nanomateriais, como ácido clorídrico, NaCl e detergente. Resíduos destes elementos podem ter permanecido na vidraria após a lavagem. O alumínio provavelmente contaminou as amostras durante a pesagem, pois utiliza-se papel alumínio para forrar a bandeja da balança. Os demais elementos (Sm, K, Br, Zn, La, W) também devem ter contaminado as amostras através da vidraria, pois apresentam concentrações diferentes em cada uma das amostras. O outro metal catalisador utilizado na síntese – níquel – não pôde ser detectado pela técnica porque seus isótopos possuem uma seção de choque para nêutrons térmicos muito baixa.

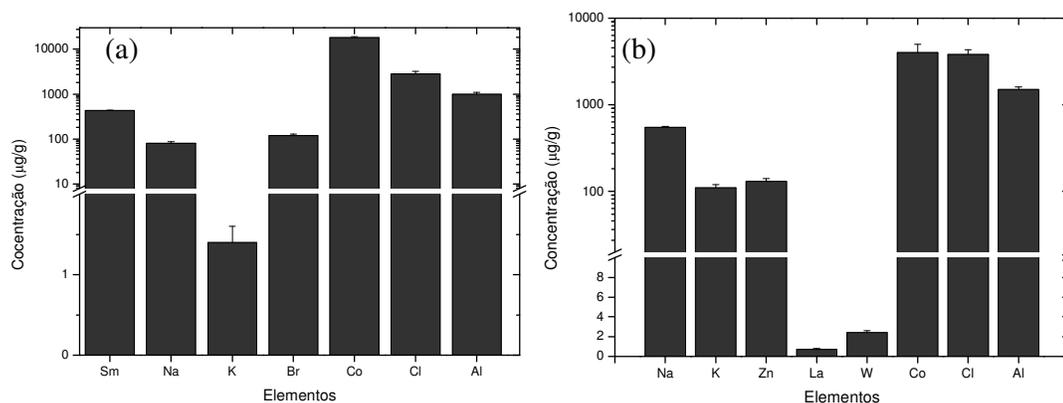


Figura 6.5 – Concentração de impurezas contendo nanotubos de carbono crescidos por arco elétrico e retirados de regiões diferentes da câmara: região de alto rendimento (a) e de baixo rendimento (b).

A *figura 6.6* mostra a concentração dos elementos dos nanotubos de carbono crescidos por CVD. O sódio, cloro e alumínio estão mais uma vez presentes, embora não sejam utilizados no processo de síntese, confirmando às suspeitas de contaminação após a síntese. A concentração de cobalto é muito baixa, como este metal não é utilizado na síntese dos MWCNT, provavelmente houve uma pequena contaminação com nanotubos single-wall, visto que as duas câmaras de síntese (arco-elétrico e CVD) ficam localizadas no mesmo local. Uma pequena concentração de Zn também foi detectada, mas sua origem não foi determinada.

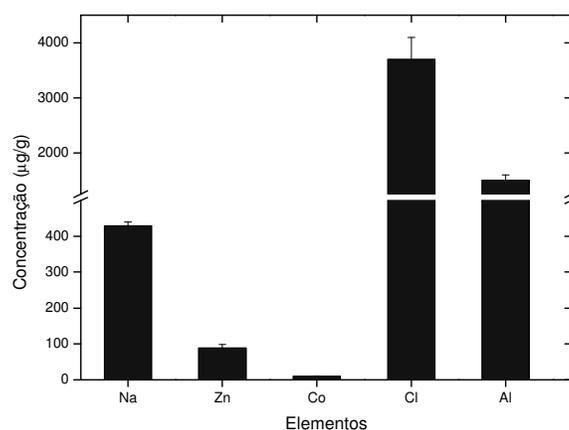


Figura 6.6 – Concentração de elementos em MWCNT (as-grow) crescidos por CVD.

A figura 6.7 mostra a concentração de impurezas em fullerenos sintetizados e purificados em nosso laboratório e em fullerenos adquiridos comercialmente. A presença de Cl, Al e Na nas duas amostras com a mesma concentração confirma mais uma vez que o material utilizado na armazenagem e manipulação dos fullerenos contaminou as amostras. No entanto, também identificamos nos fullerenos sintetizados em nosso laboratório a presença de Br ($2,3 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$), apesar de ser uma concentração muito baixa. Como este elemento também foi encontrado nos SWCNTs ($\sim 100 \mu\text{g g}^{-1}$) a contaminação deve ter se originado na própria câmara de arco-elétrico. Comparando os nanotubos de carbono e fullerenos sintetizados em nosso laboratório, podemos concluir que o processo de purificação dos fullerenos por sublimação se mostrou bem mais eficiente que os processos utilizados na purificação dos nanotubos de carbono.

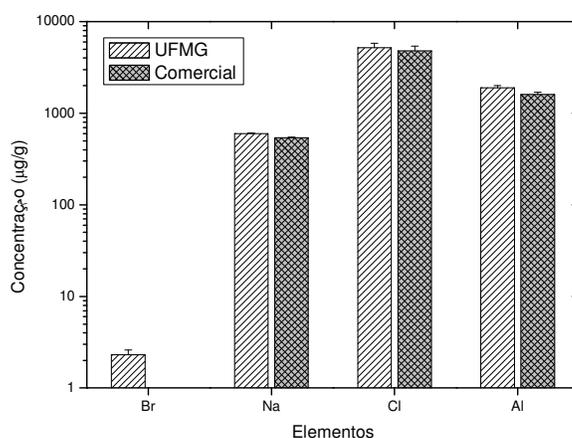


Figura 6.7 – Concentração de impurezas em fullerenos produzidos em nosso laboratório (UFMG) e adquiridos no mercado (Comercial).

A *tabela 6.2* mostra os resultados obtidos através da análise por ativação neutrônica na medida da concentração de cobalto (metal catalisador) em amostras de SWCNT após cada etapa de purificação. Como comentado anteriormente, o níquel não pode ser detectado pela técnica, embora seja na mesma concentração do cobalto na dopagem dos eletrodos (0,3 % at.). Observando a tabela podemos notar que a concentração de cobalto sobe na etapa 2. O motivo é que uma grande quantidade de carbono amorfo é oxidada após esta etapa, reduzindo a massa total da amostra e, com isto, aumentando a concentração de cobalto (μg de Co por g da amostra). Após a etapa 3 a concentração de cobalto quase não se altera, indicando uma limitação do processo de

purificação. O cobalto restante provavelmente se encontra no interior do nanotubo, impedindo o contato do metal com o ácido.

Tabela 6.2 – Análise por ativação neutrônica mostrando concentração de cobalto em amostras de SWCNT após etapas de purificação.

Etapas	Descrição	Concentração de Co ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	As-grow	42000 ± 1000
2	Forno 1 hora a 400 C	108000 ± 1000
3	HCl 20 horas	880 ± 50
4	Forno 1 hora a 400 C	1120 ± 50
5	HCl 20 horas	630 ± 30
6	Forno 1 hora a 400 C	890 ± 50
7	HCl 20 horas	910 ± 40

A *figura 6.7* mostra uma imagem feita por microscopia eletrônica de transmissão de nanotubos (MWCNT) purificados. Nas imagens de TEM, os metais absorvem o feixe de elétrons, criando pontos escuros e contrastando com os nanotubos feitos de carbono. Assim, as setas na figura indicam locais contendo metais no interior dos nanotubos, confirmando que parte dos metais catalisadores fica aprisionada em seu interior, impedindo que seja retirada durante os processos de purificação. Devido ao aumento máximo do microscópio utilizado, não foi possível identificar os metais catalisadores no interior dos SWCNTs purificados.

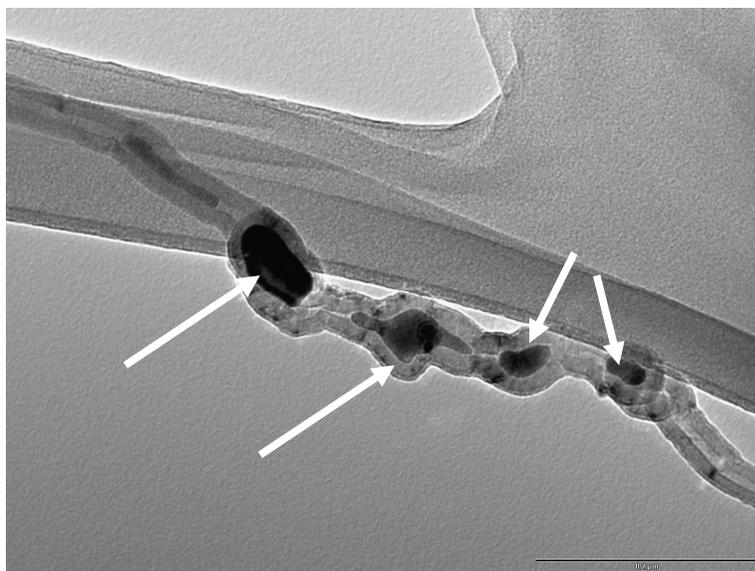


Figura 6.8 – TEM de MWCNT sintetizados por CVD, detalhe mostrando os metais catalisadores dentro dos nanotubos, impedindo a sua remoção durante a purificação (barra de escala: $0,2 \mu\text{m}$).

6.3.2 Decoração

A figura 6.8a mostra uma imagem de AFM de SWCNTs decorados com nanopartículas de ouro pelo método da hidrazina (indicado pelas setas), em detalhe podemos observar uma região específica da superfície da mica (figura 6.8b). As nanopartículas ficaram bem distribuídas ao longo deste nanotubo (indicado pelas setas). No entanto, ainda observamos a formação de aglomerados (círculo) de nanopartículas em vários locais, inclusive nos nanotubos. A altura medida nos locais indicados pelas setas foi de 16 nm. Não foram observadas nanopartículas presas aos nanotubos pelo processo de síntese com irradiação UV.

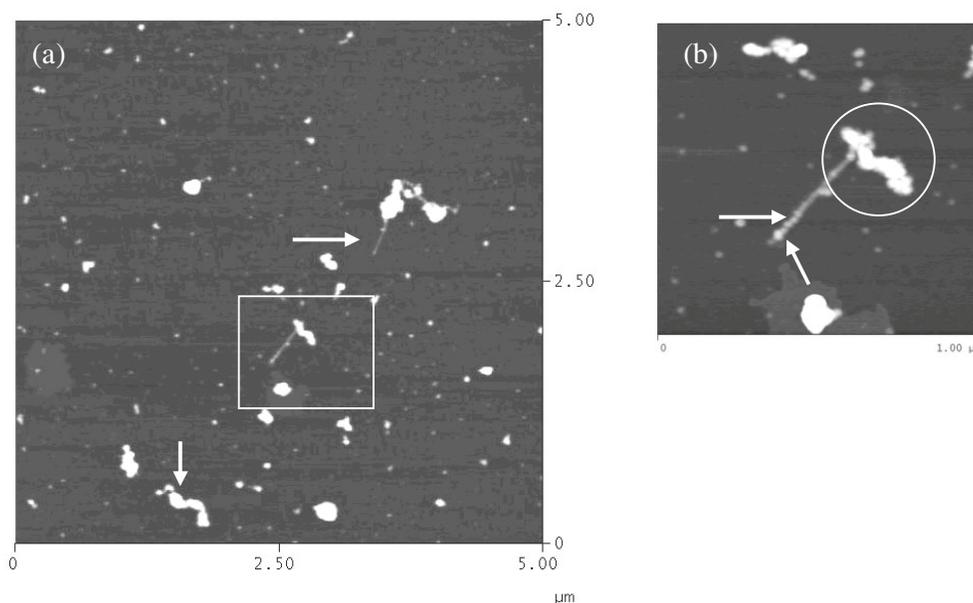


Figura 6.9 – AFM de um nanotubo de carbono decorado com nanopartículas de ouro pelo método da hidrazina: (a) área $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ e (b) região ampliada (área $1 \times 1 \mu\text{m}^2$).

Os dois métodos de decoração de nanotubos (hidrazina e UV) foram comparados por absorção óptica, utilizando um espectrômetro UV-vis. Após o processo de decoração, os nanotubos foram filtrados, as nanopartículas que não se prenderam aos nanotubos passaram pelo filtro e foram levadas para análise por absorção óptica. O espectro de absorção óptica é mostrado na *figura 6.9*. A diferença de intensidade entre os dois espectros se deve à concentração das duas soluções. O pico de absorção no método da hidrazina foi de 547 nm e no método UV foi de 531 nm. Utilizando o

Software MiePlot para partículas esféricas em meio aquoso, encontramos o diâmetro médio das nanopartículas entre 10 nm (hidrazina) e 20 nm (UV).

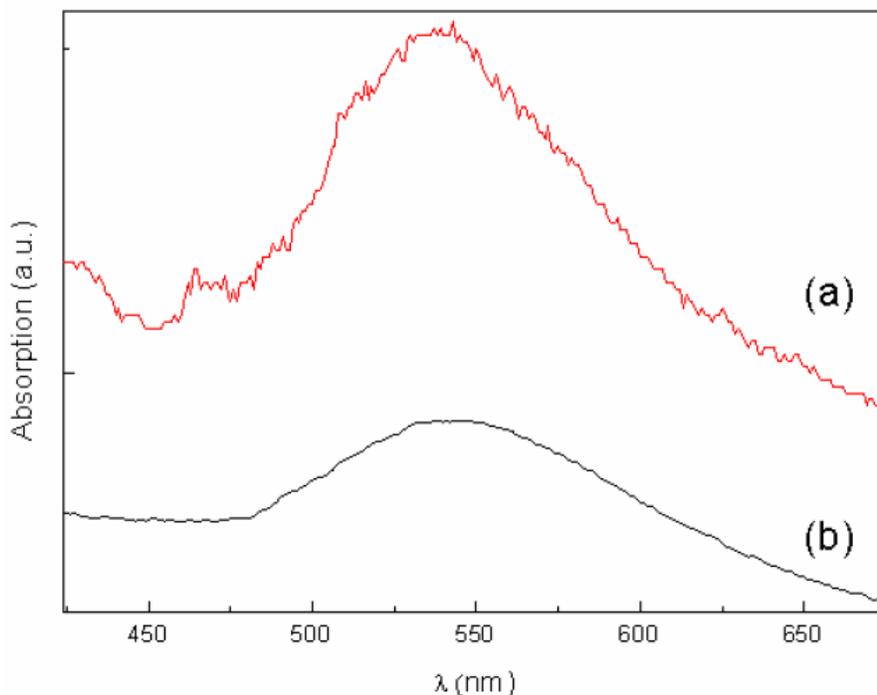


Figura 6.10 – Espectro de absorção óptica de nanopartículas de ouro produzidas pelos métodos da hidrazina (a), com um pico de 547 nm; e UV (b), com o pico em 531 nm.

A *figura 6.10* mostra uma imagem feita por microscopia eletrônica de transmissão dos nanotubos decorados com AuNPs pelo método da hidrazina. A resolução da imagem ficou baixa devido a uma falha durante a preparação da grade de carbono para depositar os nanotubos: nesta preparação, um polímero de proteção que envolve a grade é dissolvido em clorofórmio, no entanto, em alguns locais da grade o polímero não foi completamente retirado interferindo no feixe de elétrons. Observando a imagem, podemos perceber que existem pontos escuros nas paredes dos nanotubos, indicando a presença de um metal. Como os pontos não estão dentro dos nanotubos, mas sim em suas paredes, podemos concluir que os nanotubos analisados foram decorados com AuNPs. Também podemos notar que em alguns locais formaram-se aglomerados de Au ao longo da superfície do tubo.

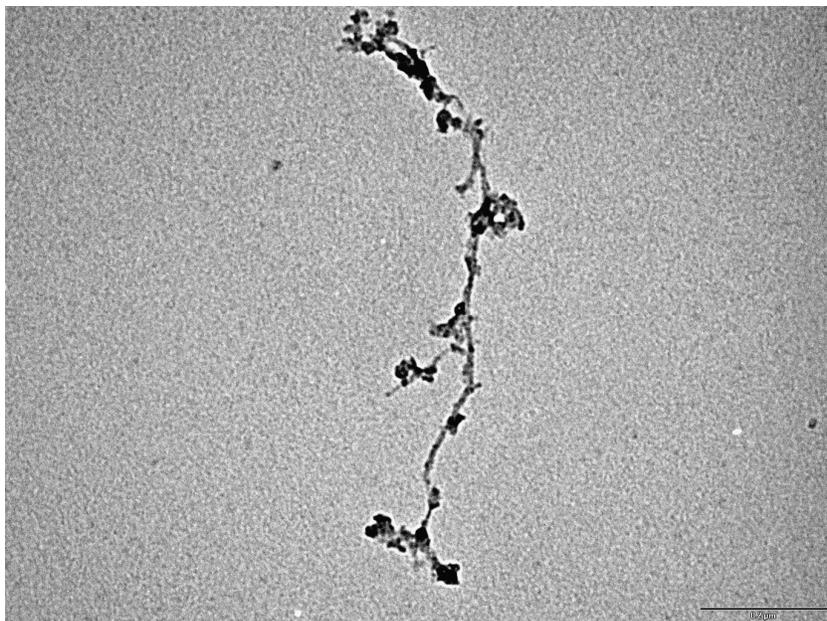


Figura 6.11 – TEM de SWCNTs decorados com AuNPs (escala 0,2 μm).

Os nanotubos decorados pelos métodos da hidrazina e UV foram analisados por ativação neutrônica, indicando uma concentração de ouro de $(0.20 \pm 0.01) \% \text{ at.}$ e $(0.041 \pm 0.004) \% \text{ at.}$ respectivamente. Estes resultados indicam que pelo método UV a nucleação das NPs não ocorre preferencialmente nas paredes dos nanotubos, sendo o método da hidrazina cerca de cinco vezes mais eficiente neste processo. Assim, no resultado obtido pelo método da hidrazina, existe 1 átomo de ouro para cada 500 átomos de carbono no nanotubo.

Seguindo os resultados obtidos em publicações anteriores (Satishkumar et al., 1996) [6.13], a concentração de sítios carboxílicos (-COOH) criados na parede dos nanotubos é de 10^{20} sítios g^{-1} de nanotubo, o que equivale a 1 sítio carboxílico para cada 500 átomos de carbono. Como em cada sítio pode ocorrer o crescimento de uma nanopartícula de ouro e o número de átomos de ouro varia com o cubo do diâmetro (equação 6.1), chegamos ao resultado da tabela (6.3).

Tabela 6.3 – Número de átomos de ouro em função do diâmetro

Diâmetro (nm)	Número de átomos de ouro
2	246
5	3858
10	30854
20	246919

Assim, uma pequena variação no diâmetro das nanopartículas aumenta consideravelmente o número de átomos. Considerando que as nanopartículas sintetizadas pelo método da hidrazina (Au 1:500 C) possuem um diâmetro médio de 10 nm, a concentração de nanopartículas presas aos nanotubos é de aproximadamente $4,0 \times 10^{16}$ AuNP g^{-1} de nanotubo. Este resultado é bem inferior ao número de sítios carboxílicos encontrados nos estudos desenvolvidos por Satishkumar [6.13]. No entanto, nem todos os sítios devem estar ligados às nanopartículas, pois desta forma os nanotubos se tornariam insolúveis.

Com base nestes cálculos, verificaremos agora se os nanotubos sintetizados pelo método da hidrazina podem ser utilizados em estudos de biodistribuição. Considerando trabalhos anteriores (Lacerda et. al, 2006) [6.8], os nanotubos são administrados em camundongos na concentração entre 1 – 5 mg kg^{-1} de animal. Assim, a quantidade de AuNPs administrada seria de $4,0 \times 10^{13}$ – $2,0 \times 10^{14}$ AuNP kg^{-1} de animal, o que equivale a 500 ± 100 μg de Au kg^{-1} de animal. Levando em conta os resultados do capítulo 5, em que a biodistribuição das AuNPs foi realizada por NAA injetando-se uma concentração de 700 μg de Au kg^{-1} de animal, concluímos que é possível utilizar a técnica de NAA em estudos de biodistribuição envolvendo nanotubos de carbono marcados com AuNPs. No entanto, os *clusters* de AuNPs observados nas imagens de AFM e TEM poderiam prejudicar as análises, interferindo no resultado da biodistribuição ou da espectrometria gama. Assim, as técnicas de síntese, funcionalização e decoração utilizadas ainda devem ser aprimoradas antes de realizarmos os estudos de biodistribuição.

6.4 Conclusões

Os resultados na análise de ativação neutrônica mostraram que a técnica é útil na quantificação de impurezas presentes em amostras de nanotubos após a síntese, purificação, funcionalização e decoração. Estes resultados demonstraram que parte do cobalto, utilizado na síntese dos nanotubos como catalisador, não é totalmente retirado após as etapas de purificação. A cobalto residual ao final da purificação (910 ± 40 μg g^{-1} de nanotubo), provavelmente não pode ser removido por se encontrar no interior do nanotubo, teoria confirmada por imagens de TEM que mostram metais no interior dos nanotubos.

As imagens em AFM e TEM permitiram visualizar nanotubos após as etapas de funcionalização e decoração com AuNPs, mostrando que ocorreu a decoração dos nanotubos de carbono. A concentração de ouro nos nanotubos decorados medida na NAA foi de $(0.20 \pm 0.01 \%)$. Com este resultado, a concentração de nanopartículas de ouro estimada foi de $4,0 \times 10^{16}$ AuNP g⁻¹ de nanotubos. Esta concentração permite que sejam feitos estudos de biodistribuição com nanotubos de carbono marcados com nanopartículas de ouro (AuNP-SWCNT) através da NAA. No entanto, ainda existem alguns problemas a serem resolvidos. As impurezas nas amostras, como carbono amorfo, metais catalisadores e aglomerados de nanopartículas de ouro poderão interferir em estudos biológicos de biodistribuição. A formação de aglomerados ou clusters de AuNPs pode interferir nos resultados, indicando uma concentração de nanotubos maior ou menor que a realidade. Desta forma, para que as AuNPs sejam utilizadas para marcar os nanotubos de carbono e sejam feitos os estudos da biodistribuição dos nanotubos de carbono através da ativação neutrônica do ¹⁹⁷Au, os processos de síntese, purificação, funcionalização e decoração dos SWCNT deverão ser aprimorados. Melhorando o processo de decoração ou marcação de nanotubos com nanopartículas de ouro, a biodistribuição dos nanotubos através da ativação neutrônica do ¹⁹⁷Au poderá ser utilizada. Alguns dos resultados descritos acima foram apresentados nos congressos NT07 realizado em Ouro Preto, no INAC07 realizado em Santos e no VII Encontro sobre diamante, carbono amorfo e nanotubos em 2007.

6.5 Referência

- [6.1] Yi Lin, Shelby Taylor, Huaping Li, K. A. Shiral Fernando, Liangwei Qu, Wei Wang, Lingrong Gu, Bing Zhou and Ya-Ping Sun; *Advances toward bioapplications of carbon nanotubes*; J. Mater. Chem., **14**, 527-541 (2004).
- [6.2] C. N. R. Rao, Ram Seshadri, A. Govindaraj and Rahul Sen; *Fullerenes, nanotubes, onions and related carbon structures*; Materials Science and Engineering, **15**, 209-262 (1995).
- [6.3] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley. *Nature*, **318** (1985) 162.
- [6.4] A. C. Dillon, K. M. Jones, T. A. Bekkedahl, C. H. Kiang, D. S. Bethune and M. J. Heben; *Storage of hydrogen in single-walled carbon nanotubes*; Nature **386**, 377-379 (1997).

- [6.5] Wohlstadter JN, Wilbur JL, Sigal GB, Biebuyck HA, Billadeau MA, Dong LW, Fischer AB, Gudibande SR, Jamieson SH, Kenten JH, Leginus J, Leland JK, Massey RJ, Wohlstadter SJ; *Carbon nanotube-based biosensor*; ADVANCED MATERIALS **15**, 1184 (2003).
- [6.6] Bianco A, Kostarelos K and Prato M; *Applications of carbon nanotubes in drug delivery*; Current Opinion in Chemical Biology **9**, 674-679 (2005).
- [6.7] Liu Z, Cai WB, He LN, Nakayama N, Chen K, Sun XM, Chen XY and Dai HJ; *In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice*; NATURE NANOTECHNOLOGY **2**, 47-52 (2007).
- [6.8] Lacerda L, Bianco A, Prato M and Kostarelos K; *Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology*; ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS **58**, 1460-1470 (2006).
- [6.9] Avetik R. Harutyunyan, Bhabendra K. Pradhan, Jiping Chang, Gugang Chen, and Peter C. Eklund; Purification of Single-Wall Carbon Nanotubes by Selective Microwave Heating of Catalyst Particles; J. Phys. Chem. B **106**, 8671-8675 (2002).
- [6.10] Hui Hu, Bin Zhao, Mikhail E. Itkis, and Robert C. Haddon; *Nitric Acid Purification of Single-Walled Carbon Nanotubes*; Phys. Chem. B **107**, 13838-13842 (2003).
- [6.11] Matthew W. Marshall, Simina Popa-Nita and Joseph G.; *Measurement of functionalised carbon nanotube carboxylic acid groups using a simple chemical process*; Carbon **44**, 1137-1141 (2006).
- [6.12] Chen J, Hamon MA, Hu H, Chen YS, Rao AM, Eklund PC, Haddon RC; *Solution properties of single-walled carbon nanotubes*; Science **282**, 95-98 (1998).
- [6.13] B C Satishkumar, A Govindaraj, J Mofokeng, G N Subbanna and C N R Rao; *Novel experiments with carbon nanotubes: opening, filling, closing and functionalizing nanotubes*; J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys. **29** 4925-4934 (1996).
- [6.14] M. J. O'Connell, P. Boul, L. M. Ericson, C. Huffman, Y. H. Wang, E. Haroz, C. Kuper, J. Tour, K. D. Ausman and R. E. Smalley; *Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping*; Chem. Phys. Lett., **342**, 265 (2001).

- [6.15] Hongjin Jiang, Lingbo Zhu, Kyoung-sik Moon, C.P. Wong; *The preparation of stable metal nanoparticles on carbon nanotubes whose surfaces were modified during production*; Carbon **45**, 655–661 (2007).
- [6.16] Ruili Zhang, Qingfeng Wang, Lu Zhang, Shengchun Yang, Zhimao Yang and Bingjun Ding; *The growth of uncoated gold nanoparticles on multiwalled carbon nanotubes*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **312**, 136-141 (2008).
- [6.17] Edelma Eleto da Silva, Síntese e Aplicação de Nanotubos de Carbono em Biotecnologia, Thesis of UFMG May (2007).
- [6.18] Alan M. Cassell, Jeffrey A. Raymakers, Jing Kong, and Hongjie Dai; Large Scale CVD Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes; J. Phys. Chem. B **103**, 6484-6492 (1999).
- [6.19] Shujuan Huang; Optical spectroscopic studies of the dispersibility of gold nanoparticle solutions; J. Appl. Phys., **92**, 15 (2002).
- [6.20] www.nmdt.com consultado em julho de 2008.
- [6.21] Introduction to Solid State Physics; Charles Kittell; Wiley (1995).

Capítulo 7 – Conclusões e perspectivas futuras

Os resultados dos estudos realizados durante o mestrado demonstraram a versatilidade da técnica de análise por ativação neutrônica (NAA), sendo eficiente na caracterização de contaminantes em nanomateriais, como metais usados como catalisadores na síntese e produtos utilizados na purificação, funcionalização e decoração.

A NAA do filme de carbono amorfo dopado com xenônio pela deposição assistida de feixe iônico duplo (IBAD) mostrou que este material pode ser utilizado na fabricação de sementes radioativas de ^{125}I através da ativação do ^{124}Xe para o tratamento do câncer de próstata. O material teria vantagens sobre outras sementes por ser irradiado após a fabricação da semente, diminuindo os riscos de contaminação.

A técnica também se mostrou útil na ativação de AuNPs visando estudos de biodistribuição em camundongos. O tempo de irradiação das nanopartículas de ouro necessário foi relativamente baixo (1 hora), devido a inúmeros fatores como secção de choque, abundância isotópica do ^{197}Au e intensidade gama. Os resultados de biodistribuição e toxicologia mostraram que as nanopartículas de ouro recobertas com PVP se concentram principalmente no fígado e baço. A quantidade de ouro administrada ($\sim 700 \mu\text{g kg}^{-1}$ de animal) está bem abaixo do usado em outros estudos ($2,7 \text{ mg kg}^{-1}$ de animal). Os resultados também confirmaram que o tumor Ehrlich retém as nanopartículas por mais tempo que o tecido sadio (1440 minutos). Os resultados positivos incentivam novos estudos de biodistribuição de AuNPs irradiadas com nêutrons utilizando diagnóstico por imagem, como o SPECT. No entanto, os métodos de síntese e funcionalização das nanopartículas deverão ser aprimorados, garantindo uma distribuição de diâmetro mais estreita e recobrando-as com outros compostos, como o PEG, para aumentar seu tempo de permanência no sangue, aumentando com isso a taxa de deposição no tumor.

De acordo com os resultados da NAA, os nanotubos de carbono sintetizados no Laboratório de Nanomateriais possuem impurezas que não são facilmente retiradas. O motivo mais provável é que parte das impurezas (incluindo os metais catalisadores) ficam retidas no interior dos nanotubos, impedindo que sejam retiradas na purificação. A NAA dos AuNPs-SWNT mostrou que a concentração de nanopartículas nos nanotubos foi de $4,0 \times 10^{16}$ AuNPs g^{-1} de nanotubo. Com esta concentração, para

realizar estudos de biodistribuição de nanotubos marcados com AuNPs em animais, seria necessário administrar 1-5 mg de nanotubos kg^{-1} de animal, obtendo com isso $600 \pm 100 \mu\text{g}$ de Au kg^{-1} de animal. No entanto, os métodos de decoração dos nanotubos com AuNPs ainda precisam ser aprimorados para diminuir os aglomerados de nanopartículas de ouro.

APÊNDICE

A – Técnicas experimentais

A1 – Espectrometria por absorção óptica UV-vis

A espectrometria de absorção óptica UV-vis é comumente utilizada na determinação de moléculas orgânicas e inorgânicas, podendo também ser utilizada na medida da concentração e diâmetro de nanopartículas. Esta técnica está baseada na medida de transmitância T ou absorvância A de uma solução (ou suspensão) contidas em cubetas feitas de material transparente a faixa de energia da luz ultravioleta e visível (160 – 780 nm), como o quartzo. De acordo com a Lei de Beer, a concentração de um analito é linearmente dependente à sua absorvância. Como ocorre reflexão de parte da luz incidente pelas paredes da cubeta, diminuindo a intensidade do feixe incidente, deve-se medir a intensidade do feixe em uma cubeta contendo apenas o material solvente, de forma a compensar esta perda. Na figura A.1 é mostrado um desenho esquemático de um sistema de absorção óptica. Um feixe de luz (F) é refletido por uma rede de difração (R), resultando em uma luz monocromática. A Rede pode ser movida em um ângulo θ para alterar o comprimento de onda da luz. A luz é refletida por um espelho (E) e atravessa a cubeta (C) contendo o material analisado, atingindo logo depois um fotodetector (D).

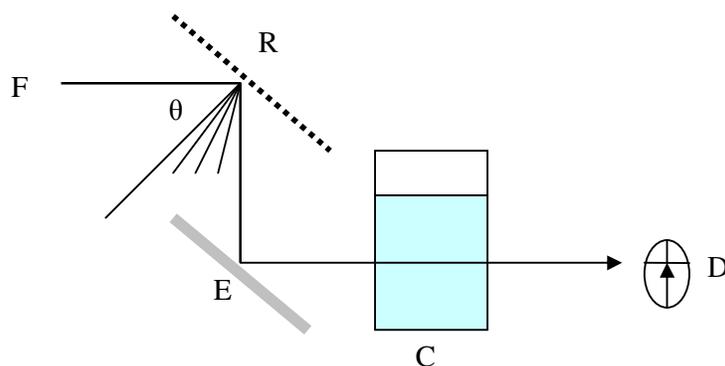


Figura A.1 – Esquema de um sistema da absorção óptica.

A2 – Microscopia de Força atômica

A microscopia de força atômica permite a resolução de átomos individuais tanto em superfícies condutoras como isolante. Um esquema do funcionamento de um AFM é mostrado na figura A.2. Neste método, uma alavanca ou sonda flexível (*cantilever*) com uma ponta de prova ou agulha (*tip*) é varrida ao longo de uma superfície. A força entre a ponta de prova e a superfície causa um pequeno movimento vertical na sonda (eixo-z). Para detectar este movimento, um laser incide sobre a sonda e é refletido. Um detector (photodiode) sensível à mudança de posição do laser permite que possa ser registrado, com precisão de 0,1 nm, o movimento da sonda no eixo-z. No entanto, como a ponta de prova sofre um alargamento em sua base, esta precisão de medida não é alcançada para movimentos no plano no plano xy. A superfície é varrida através de um piezoelétrico em sua base.

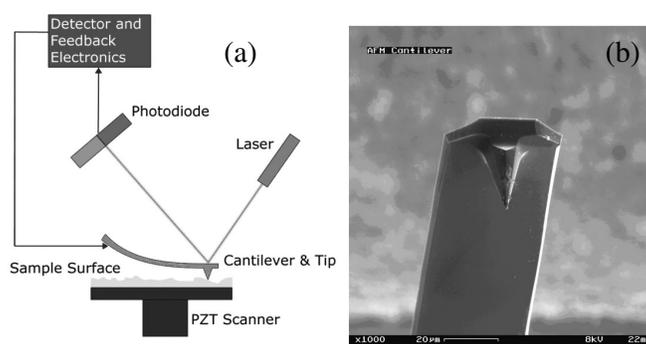


Figura A.2 – (a) Esquema da sonda de AFM varrendo um a superfície de um substrato, o movimento da sonda no eixo-z é registrado por um fotodiodo através da reflexão de um laser; (b) sonda de AFM ampliada 1000 vezes. (fonte: www.wikipedia.org , consultado em julho de 2008)

A3 – Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Nesta técnica um feixe de elétrons é transmitido através de uma amostra ultra-fina, interagindo com as camadas eletrônicas dos átomos presentes na amostra. São usados como substratos grades de carbono porosas (décimos de microns), permitindo que feixe de elétrons interaja diretamente com a amostra. Aparelhos mais recentes também podem identificar a estrutura cristalina de amostra através da figura de difração do feixe de elétrons. Esta técnica permite visualizar imagens. A resolução dos microscópios ópticos é proporcional ao comprimento de onda dos fótons. Da mesma maneira, a resolução dos microscópios eletrônicos está relacionada com a equação abaixo. Utilizando uma fonte de aceleração dos elétrons, os TEM obtém resoluções próximas abaixo de 0,05 nm.

$$\lambda_e \approx \frac{h}{\sqrt{2m_0E(1 + \frac{E}{2m_0c^2})}}$$

, onde m_0 é a massa de repouso do elétron e E é a sua energia.

B – Resultados das análises bioquímicas, histopatologia e hemogramas dos camundongos

Tabela A1 - Bioquímica

	<i>PROTAL</i>	<i>ALBUL</i>	<i>UREA</i>	<i>CREAT</i>	<i>BILI T.</i>	<i>AST</i>	<i>ALT</i>	<i>CK</i>
Grupo 2								
48 horas	5.5 ± 0.5	2.83 ± 0.3	49.67 ± 22	0.98 ± 1	3.4 ± 3.5	95.33 ± 30	36 ± 13	
14 dias	4 ± 0.7	2 ± 0.3	38 ± 5	0.1 ± 0	3.85 ± 2	42 ± 0	65 ± 0	4345 ± 1575
30 dias	5.1 ± 0.5	2.2 ± 0.1	140 ± 16	2 ± 0.2	4.21 ± 0.4	8 ± 2	18.5 ± 0.5	7680 ± 2120
Controle								
48 horas	4.53 ± 0.5	2.57 ± 0.4	55.33 ± 2	0.4 ± 0.4	2.28 ± 1.2	71.33 ± 27	44.67 ± 5	
Grupo 1								
48 horas	6.15 ± 0.3	2.75 ± 0.3	45 ± 10	1.45 ± 0.2	6.52 ± 0.4	15 ± 1	95 ± 0	7030 ± 2000
14 dias	5.05 ± 1	2.78 ± 0.5	52.5 ± 16	0.65 ± 0.6	2.11 ± 2.6	30.13 ± 18	85.5 ± 20	1170.5 ± 1166

Tabela A2 - Eritrograma

	<i>VG (%)</i>	<i>ER (10⁶/ul)</i>	<i>HB (g/dl)</i>	<i>CHCM (%)</i>	<i>VCM (fl)</i>	<i>RDW (%)</i>	<i>PTP (g/dl)</i>
Grupo 2							
48 horas	27.5 ± 0.7	9 ± 1	14 ± 1	50 ± 6	31 ± 5	17.9 ± 0.1	6.2 ± 0.3
14 dias	29 ± 6	8 ± 2	14 ± 0	51 ± 9	37 ± 4	17.9 ± 0.3	6.0 ± 0.3
Grupo 1							
48 horas	31.5 ± 8	10 ± 4	17 ± 6	52 ± 6	32 ± 4	17.1 ± 0.9	5.8 ± 0
14 dias	32 ± 2	8 ± 2	12 ± 2	9 ± 5	40 ± 7	17 ± 2	5.6 ± 0.3
Controle							
48 horas	32 ± 6	8 ± 1	13 ± 1	40 ± 3	40 ± 1	17 ± 2	6.0 ± 0.3

Tabela A3 - Leucograma

<i>Animal</i>	<i>Leucócitos</i>	<i>Neutrófilos</i>	<i>Linfócitos</i>	<i>Monócitos</i>	<i>Eosinófilos</i>	<i>plaquetas</i>
Grupo 2						
48 horas	5050 ± 636	670 ± 297	3848 ± 153	69 ± 98	463 ± 590	626.5 ± 37
14 dias	6850 ± 71	1161 ± 569	5448.5 ± 589	69 ± 1	172 ± 50	545 ± 35
Grupo 1						
48 horas	5300 ± 141	944 ± 419	4140 ± 560	216 ± 0		1100 ± 141
14 dias	4650 ± 212	807 ± 259	3726 ± 433	117 ± 38		363.5 ± 77
Controle						
48 horas	4300 ± 141	844 ± 362	3264 ± 136	192 ± 85		393.5 ± 93

Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

<p>Número do Exame: 08/00756</p> <p>Espécie: <i>Camundongo</i></p> <p>Nome do Animal</p> <p>Raça: Swiss</p> <p>Sexo:</p> <p>Idade: dias</p> <p>Peso: Kg</p> <p>Veterinário Responsável:</p> <p>Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239</p>	<p>Ficha Clínica Nº Externo</p> <p>Data de Recebimento: 10/7/2008</p> <p>Data do Óbito:</p> <p>Data da Necrópsia:</p> <p>Proprietário: Rafael Gontijo F. Gonçalo</p> <p>Tel./Fax: () -</p> <p>Procedência: UFMG</p>
--	--

Exame Solicitado: Necropsia Histopatológico Toxicológico Bacteriológico
 Viroológico Parasitológico Outros:

Material Enviado: Material Fresco - Carcaça Orgãos:
 Material Fixado:

Histórico:

Foram encaminhadas amostras de diversos órgãos de oito camundongos:

- 1 - NP 1
- 2 - NP 2
- 3 - NP 3
- 4 - NP 4
- 5 - PVP 1
- 6 - PVP 2
- 7 - PVP 3
- 8 - PVP 4

Achados Macroscópicos:

Histopatologia:

1 - NP 1

Fígado: Infiltrado neutrofilico e histiocitário focal e discreto.

Pulmão: Hemorragia multifocal discreta. Atelectasia multifocal a coalescente.

Encéfalo (Cérebro, cerebelo, hipocampo), rim, baço, coração e intestino delgado sem alterações histológicas significativas.

2 - NP 2

Pulmão: Hemorragia difusa.

Baço: Hiperplasia linfóide discreta.

Intestino delgado, pâncreas, fígado, coração, rim, adrenal, linfonodo (adjacente ao rim), esôfago e encéfalo (Cérebro, cerebelo, hipocampo) sem alterações histológicas significativas.

3 - NP 3

Pulmão: Hemorragia multifocal discreta.

Baço: Hiperplasia linfóide discreta.

Intestino delgado, pâncreas, fígado, coração, rim, músculo estriado esquelético e encéfalo (Cérebro, cerebelo, hipocampo) sem alterações histológicas significativas.

4 - NP 4

Pulmão: Hemorragia multifocal a coalescente.

Fígado: Infiltrado neutrofilico multifocal, periductal discreto (Colangite supurada multifocal discreta).

Baço: Hiperplasia linfóide discreta.

Coração, rim, músculo estriado esquelético e encéfalo (Cérebro, cerebelo, hipocampo) sem alterações histológicas significativas.

5 - PVP 1

Pulmão: Hemorragia multifocal discreta.

Baço: Hiperplasia linfóide discreta.

Intestino delgado, pâncreas, fígado, coração, osso longo, músculo estriado esquelético e encéfalo (Cérebro, cerebelo, hipocampo) sem alterações histológicas significativas.

6 - PVP 2

Pulmão: Hemorragia difusa e acentuada.

Baço: Hiperplasia linfóide discreta.

Intestino delgado, adrenal, fígado, coração, rim e encéfalo (Cérebro, cerebelo, hipocampo) sem alterações histológicas significativas.

7 - PVP3

Baço: Hiperplasia linfóide discreta.

Intestino delgado, pâncreas, coração, rim, pulmão, bexiga e encéfalo (Cérebro, cerebelo, hipocampo) sem alterações histológicas significativas.

8 - PVP4

Pulmão: Hemorragia multifocal.

Baço: Hiperplasia linfóide moderada.

Intestino delgado, fígado, coração, osso longo, músculo estriado esquelético e encéfalo (Cérebro, cerebelo, hipocampo) sem alterações histológicas significativas.

Exames Complementares:

Conclusão:

Comentários:

Todos os animais apresentaram hematopoiese extramedular no baço e, em alguns casos, no fígado. Contudo, este achado é normal em camundongos.

Alguns animais apresentaram alterações neuronais que foram interpretadas como artefato (Animais 1, 2, 3 e 6). Tais alterações poderiam ser também indicativas de hipóxia ou isquemia do SNC, mas para esta interpretação seriam necessária: mais informações sobre o protocolo experimental.

Belo Horizonte, 13/8/2008- Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Prof. Renato de Lima Santos
CRMV-MG 4.577
EV-UFMG

Sector de Patologia
Clínica e Cirurgia
-MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPTO. CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS
 SETOR DE PATOLOGIA



Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

Número do Exame: 08/00781

Ficha Clínica N°

Espécie: *camundongo*

Data de Recebimento:

Nome do Animal: Sal 1 azul

Data do Óbito:

Raça: swiss

Data da Necropsia:

Sexo:

Proprietário: Rafael Gontijo F. Gonçalo

Idade: dias

Tel./Fax: () -

Peso: Kg

Procedência: externo

Veterinário Responsável:

Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Exame Solicitado: Necropsia Histopatológico Toxicológico Bacteriológico
 Viroológico Parasitológico Outros:

Material Enviado: Material Fresco - Carcaça Orgãos:
 Material Fixado:

Histórico:

Não informado.

Achados Macroscópicos:

Encaminhado fragmentos de linfonodo, fígado, rim, pulmão, coração, intestino, baço, sistema nervoso central sem lesão aparente.

Histopatologia:

Fragmentos de rim, fígado, encéfalo (cérebro e cerebelo), intestino delgado, músculo estriado esquelético, pulmão, baço e bexiga, sem alterações histológicas significativas

Exames Complementares:

Conclusão:

Sem alterações histológicas significativas

Comentários:

Belo Horizonte, 4/8/2008 - Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

prof. Renato de Lima Santos
 CRMV-MG 4.577
 EV-UFMG

Setor de Patologia
 Deptº de Clínica e Cirurgia
 EV-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPTO. CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS
 SETOR DE PATOLOGIA



Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

Número do Exame: 08/00782

Espécie: *camundongo*

Nome do Animal: Sal 2 azul II

Raça: swiss

Sexo:

Idade: dias

Peso: Kg

Veterinário Responsável:

Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Ficha Clínica N°

Data de Recebimento:

Data do Óbito:

Data da Necropsia:

Proprietário: Rafael Gontijo F. Gonçalo

Tel./Fax: () -

Procedência:

Exame Solicitado: Necropsia Histopatológico Toxicológico Bacteriológico
 Viroológico Parasitológico Outros:

Material Enviado: Material Fresco - Carcaça Orgãos:
 Material Fixado:

Histórico:

Nã informado.

Achados Macroscópicos:

Encaminhado fragmentos de linfonodo, fígado, rim, pulmão, coração, intestino, baço, sistema nervoso central sem lesão aparente.

Histopatologia:

Fragmentos de fígado, vesícula biliar, intestino delgado, encéfalo (cérebro e cerebelo), músculo estriado esquelético, pulmão, adrenal e bexiga, sem alterações histológicas significativas
 Baço: Intensa hematopoese extramedular (normal no camundongo)

Exames Complementares:

Conclusão:

sem alterações histológicas significativas

Comentários:

Belo Horizonte, 4/8/2008 - Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Prof. Renato de Lima Santos
 CRMV-MG 4.577
 EV-UFMG

Setor de Patologia
 Deptº de Clínica e Cirurgia
 EV-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPTO. CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS
 SETOR DE PATOLOGIA



Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

Número do Exame: 08/00783

Ficha Clínica Nº

Espécie: *camundongo*

Data de Recebimento:

Nome do Animal: sal 3

Data do Óbito:

Raça: swiss

Data da Necropsia:

Sexo:

Proprietário: Rafael G.F. Gontijo

Idade: dias

Tel./Fax: () -

Peso: Kg

Procedência: externo

Veterinário Responsável:

Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Exame Solicitado: Necropsia Histopatológico Toxicológico Bacteriológico
 Viroológico Parasitológico Outros:

Material Enviado: Material Fresco - Carcaça Órgãos:
 Material Fixado:

Histórico:

Achados Macroscópicos:

Encaminhado fragmentos de baço, linfonodo, fígado, rim, intestino, encéfalo, e coração sem lesão aparente

Histopatologia:

Pulmão: Hemorragia multifocal discreta no parênquima pulmonar

Músculo estriado esquelético: infiltrado linfocitário difuso e discreto no tecido conjuntivo (fáscia) adjacente ao tecido muscular

Fragmentos de fígado, rim, intestino delgado, coração e encéfalo (cérebro e cerebelo) sem alterações histológicas significativas

Exames Complementares:

Conclusão:

Comentários:

Belo Horizonte, 4/8/2008 - Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Prof. Renato de Lima Santos
 CRMV-MG 4.577
 EV-UFMG

Setor de Patologia
 Deptº de Clínica e Cirurgia
 EV-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPTO. CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS
 SETOR DE PATOLOGIA



Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

Número do Exame: 08/00784	Ficha Clínica N°
Espécie: <i>camundongo</i>	Data de Recebimento:
Nome do Animal: Salina 4	Data do Óbito:
Raça: swiss	Data da Necrópsia:
Sexo:	Proprietário: Rafael Gontijo F. Gonçalo
Idade: dias	Tel./Fax: () -
Peso: Kg	Procedência:
Veterinário Responsável:	
Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239	

Exame Solicitado: Necropsia Histopatológico Toxicológico Bacteriológico
 Vírológico Parasitológico Outros:

Material Enviado: Material Fresco - Carcaça Orgãos:
 Material Fixado:

Histórico:

Não informado.

Achados Macroscópicos:

Encaminhado fragmentos de linfonodo, fígado, rim, pulmão, coração, intestino, baço, sistema nervoso central sem lesão aparente.

Histopatologia:

Músculo estriado esquelético: Área focal com proliferação de células mesenquimais, com algumas células multinucleadas, com núcleos enfileirados, compatível com proliferação de rabdomiócitos/células satélites. Infiltrado linfohistiocitário multifocal discreto

Pulmão: Congestão acentuada e hemorragia multifocal a coalescente

Baço: hiperplasia linfóide moderada

Fragmentos de fígado, coração, intestino delgado, encéfalo, pâncreas, rim e linfonodo, sem alterações histológicas significativas

Exames Complementares:

Conclusão:

Comentários:

Belo Horizonte, 4/8/2008 - Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Prof. Renato de Lima Santos
 CRMV-MG 4.577
 EV-UFGM

Setor de Patologia
 Deptº de Clínica e Cirurgia
 EV-UFGM



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPTO. CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS
 SETOR DE PATOLOGIA



Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

Número do Exame: 08/00799

Ficha Clínica Nº Externo

Espécie: *camundongo*

Data de Recebimento:

Nome do Animal: NP5

Data do Óbito:

Raça: swiss

Data da Necropsia:

Sexo:

Proprietário: Rafael Gontijo

Idade: dias

Tel./Fax: () -

Peso: Kg

Procedência:

Veterinário Responsável:

Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Exame Solicitado: Necropsia Histopatológico Toxicológico Bacteriológico
 Viroológico Parasitológico Outros:

Material Enviado: Material Fresco - Carcaça Orgãos:
 Material Fixado:

Histórico:

Achados Macroscópicos:

Encaminhados fragmentos de fígado, rim, músculo esquelético, baço, intestino delgado, pulmão e sistema nervoso central: sem lesão aparente

Histopatologia:

Músculo estriado esquelético: acúmulo de material basofílico amorfo e acelular entre as fibras musculares com mineralização discreta e multifocal na periferia e ausência de inflamação.
 Baço, pulmão, fígado, rim, intestino delgado e encéfalo: sem alterações histológicas significativas.

Exames Complementares:

Conclusão:

Comentários:

Belo Horizonte, 19/8/2008 - Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPTO. CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS
 SETOR DE PATOLOGIA



Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

Número do Exame: 08/00800

Ficha Clínica N°

Espécie: *camundongo*

Data de Recebimento:

Nome do Animal: NP 6

Data do Óbito:

Raça: swiss

Data da Necropsia:

Sexo:

Proprietário: Rafael Gontijo

Idade: dias

Tel./Fax: () -

Peso: Kg

Procedência: externo

Veterinário Responsável:

Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Exame Solicitado: Necropsia Histopatológico Toxicológico Bacteriológico
 Viroológico Parasitológico Outros:

Material Enviado: Material Fresco - Carcaça Orgãos:
 Material Fixado:

Histórico:

Achados Macroscópicos:

Encaminhados fragmentos de fígado, baço, intestino delgado, pulmão, coração e sistema nervoso: sem lesão aparente

Histopatologia:

Pulmão: hemorragia multifocal moderada.

Baço, rim, coração, encéfalo e intestino delgado: sem alterações histológicas significativas

Exames Complementares:

Conclusão:

Comentários:

Belo Horizonte, 19/8/2008- Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPTO. CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS
 SETOR DE PATOLOGIA



Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

Número do Exame: 08/00809	Ficha Clínica Nº Externo
Espécie: <i>camundongo</i>	Data de Recebimento:
Nome do Animal PVP5	Data do Óbito:
Raça: swiss	Data da Necropsia:
Sexo:	Proprietário: Rafael Gontijo
Idade: dias	Tel./Fax: () -
Peso: Kg	Procedência:
Veterinário Responsável:	
Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239	

Exame Solicitado: Necropsia Histopatológico Toxicológico Bacteriológico
 Viroológico Parasitológico Outros:

Material Enviado: Material Fresco - Carcaça Órgãos:
 Material Fixado:

Histórico:

Achados Macroscópicos:

Encaminhados fragmentos de músculo esquelético, fígado, rim, coração, pulmão, baço, intestino delgado e sistema nervoso central: Sem lesão aparente

Histopatologia:

Pulmão: congestão e edema discretos.
 Baço: congestão discreta.
 Coração, Músculo Estriado Esquelético, Fígado, Encéfalo, Intestino delgado: sem alterações histológicas significativas.

Exames Complementares:

Conclusão:

Comentários:

Belo Horizonte, 19/8/2008- Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Prof. Renato de Lima Santos
 CRMV-MG 4.577
 EV-UFMG

Setor de Patologia
 Deptº de Clínica e Cirurgia
 EV-UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 ESCOLA DE VETERINÁRIA
 DEPTO. CLÍNICA E CIRURGIA VETERINÁRIAS
 SETOR DE PATOLOGIA



Laudo Anatomopatológico

FEP/MVZ - Clínica - Laboratório de Diagnóstico Veterinário - CP 4747 - Belo Horizonte, MG 31270-971 - Tel.: (31) 3499-2294

Número do Exame: 08/00810	Ficha Clínica Nº Externo
Espécie: <i>camundongo</i>	Data de Recebimento:
Nome do Animal PVP 6	Data do Óbito:
Raça: swiss	Data da Necropsia:
Sexo:	Proprietário: Rafael Gontijo
Idade: dias	Tel./Fax: () -
Peso: Kg	Procedência:
Veterinário Responsável:	
Patologista Responsável: Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239	

Exame Solicitado: Necropsia Histopatológico Toxicológico Bacteriológico
 Viroológico Parasitológico Outros:

Material Enviado: Material Fresco - Carcaça Órgãos:
 Material Fixado:

Histórico:

Achados Macroscópicos:

Encaminhados fragmentos de músculo esquelético, fígado, rim, coração, pulmão, baço, intestino delgado e sistema nervoso central: Sem lesão aparente

Histopatologia:

Pulmão: hemorragia difusa e acentuada.
 Pâncreas: infiltrado linfocitário intersticial focal e discreto.
 Baço: hiperplasia linfóide discreta.
 Intestino delgado, encéfalo, fígado, coração e músculo estriado esquelético: sem alterações histológica significativas.

Exames Complementares:

Conclusão:

Comentários:

Belo Horizonte, 19/8/2008- Renato de Lima Santos - CRMV: 4577 - (031) 3499-2239

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)