



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

**Interferência de Nanopartículas
Magnéticas Administradas na Medula
Espinal na Resposta Comportamental
a um Estímulo Mecânico**

Priscila Amaral Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada
Co-Orientador: Prof. Dr. Helder José Ceragioli

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Priscila Amaral Ferreira
C. Amilcar Parada
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do
título de Mestre em Biologia
Molecular e Funcional, na área
de Fisiologia.

Campinas
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
SÍLVIA CELESTE SÁLVIO – CRB8/7039
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

F413i Ferreira, Priscila Amaral, 1982-
Interferência de nanopartículas magnéticas administradas na medula espinhal na resposta comportamental a um estímulo mecânico / Priscila Amaral Ferreira. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Carlos Amilcar Parada.
Corientador: José Helder Ceragioli.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nanopartículas. 2. Medula espinhal. 3. Canais iônicos. 4. Nociceptores. 5. Eletromagnetismo. I. Parada, Carlos Amilcar, 1960-. II. Ceragioli, José Helder. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Interference of magnetic nanoparticles administered in spinal cord in a behavioral response to mechanical stimuli

Palavras-chave em Inglês:

Nanoparticles

Spinal cord

Ion channels

Nociceptors

Electromagnetism

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Carlos Amilcar Parada [Orientador]

Vitor Baranauskas

Maria Cláudia de Oliveira Fusaro

Data da defesa: 07-12-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 07 de dezembro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Vitor Baranauskas


Assinatura

Prof^a. Dr^a Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro


Assinatura

Prof. Dr. Roberto José Maria Covolan

Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

Assinatura

Porque para Deus nada é Impossível. (Lc. 1.37)

Com todo o meu AMOR e DEDICAÇÃO INTENSA.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre me abençoando e me ajudando a realizar meus propósitos, conquistando os objetivos e sonhos traçados. Nunca me desamparando e estar comigo em todos os momentos da minha vida. E enfatizo toda a minha adoração, ao Deus do Impossível, que possibilitou a finalização e realização deste trabalho, como mais uma etapa de minha vida.

Ao Prof Dr Francesco Langone que me inseriu neste mundo acadêmico, como meu primeiro orientador, mas infelizmente, nos deixou tão cedo.

Sem palavras agradeço ao Prof. Dr. Carlos Almícar Parada que assumiu a minha orientação, mudando completamente a idéia inicial, e com o seu entusiasmo me ajudou a concluir este trabalho que para mim se mostrou extremamente desafiante.

Ao Prof. Dr. Helder José Ceragioli do Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng), do Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica da Faculdade de Engenharia Elétrica da Unicamp, pela co-orientação, por me auxiliar da finalização deste trabalho, pela fabricação das nanopartículas utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Iakov Kopelevitchv e ao pós graduando Robson Ricardo da Silva, que cederam o laboratório de Materiais e Dispositivos do Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW) da UNICAMP para a realização dos experimentos das propriedades magnéticas das nanopartículas.

Ao Prof. Dr. Vitor Baranauskas do Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng), do Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica da Faculdade de Engenharia Elétrica da Unicamp, pela fabricação das nanopartículas utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha banca de qualificação, Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas, Prof^a Dr^a Ana Paula Couto Davel e a Prof^a. Dr^a Maria Cláudia de Oliveira Fusaro, que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Instituto de Biologia da UNICAMP pela oportunidade de estudo concedida, mais especificamente ao Programa de Biologia Funcional e Molecular, coordenado pela Prof^a Dr^a Carmen Veríssima Ferreira. Agradecimento muito especial a secretária deste programa, Andréia Aparecida Vigilato, pela ajuda, compreensão e paciência nos momentos de decisão.

A CAPES, FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro a pesquisa realizada.

Agradecimento muito especial aos amigos do Laboratório de Dor: Dionéia, Elayne, Juliana e André, sem a contribuição e auxílio desses seria impossível a concretização deste trabalho.

A todos os professores do Instituto de Biologia, que de algum modo estiveram presentes durante a trajetória do mestrado, ensinando um pouco do universo da biologia para uma física.

Ao meu muito obrigada a minha Instituição, a qual tenho muito orgulho de fazer parte, ao Instituto de Criminalística do Estado de São Paulo, representada pelo meu chefe querido, Dr Edvaldo Messias Barros, Perito-Chefe, da Equipe de Perícias Criminalística de Americana, o qual sempre me encorajou e permitiu que terminasse esse trabalho. Juntamente pelo apoio dos meus colegas (amigos) que sempre acreditaram e me apoiaram Claudemir, Carlos, Maurício, Edilson e Felipe.

Especiais aos meus familiares e amigos por demonstrar companheirismo, incentivo, paciência e compreensão nos momentos de ausência a fim de concluir este trabalho. As minhas amigas Vanessa e Carla, pelo apoio incondicional e simplesmente por representarem uma amizade verdadeira.

Aos meus pais, Edson e Fátima, por possibilitarem que eu seja tudo o que sou hoje, principalmente a minha mãe por nunca deixar que eu desista de nenhum sonho. Ao meu irmão amado Leandro, pela coragem inspirada, a minha cunhada, Yara, pelo apoio na elaboração neste trabalho.

E ao meu amado esposo, Wladimir Junior, por estar ao meu lado, e me apoiar na realização deste estudo, compreendendo a importância da concretização deste trabalho em minha vida.

Enfim a todos que direta ou indiretamente possibilitou que este trabalho pudesse neste momento estar sendo lido por você.

Resumo

Nanopartículas são estruturas com dimensões nanométricas que vem demonstrando um potencial para várias aplicações, inclusive na área biológica. De acordo com o seu processo de síntese e crescimento estas partículas podem possuir propriedades magnéticas com maior ou menor magnitude.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a administração no espaço sub-aracnóide da medula espinal, de nanopartículas magnéticas altera o limiar de resposta a estímulos mecânicos aplicados em patas de ratos.

As nanopartículas de carbono (nanotubos ou nanofibras) foram caracterizadas através do espectro de Raman e o seu comportamento magnético caracterizado pelo ferromagnetismo foi avaliado através da curva de histerese. As nanopartículas foram administradas via intratecal em ratos Wistar machos levemente anestesiados com Isoflorano. A resposta comportamental ao estímulo mecânico foi avaliada por um analgesímetro eletrônico (Von Frey eletrônico) que mede o limiar mecânico de retirada da pata (nocicepção mecânica).

As nanopartículas foram classificadas de acordo com o comportamento magnético em: alto magnetismo e baixo magnetismo. A administração de nanopartículas (5, 20 ou 80 μg) com alto magnetismo, mas não com baixo magnetismo, diminuiu o limiar mecânico de retirada da pata, quando comparada com a administração do seu solvente propilenoglicol (20 μL). A diminuição do limiar mecânico foi observada nos tempos de 15, 30 e 60 minutos após a administração de 20 μg de nanopartículas com alto magnetismo, sendo que após este período as respostas retornaram aos seus limiares basais. Por outro lado, a administração intraplantar das nanopartículas não alterou o limiar mecânico quando comparados com as respostas basais. Portanto, a administração na medula espinal, mas não no tecido periférico, de nanopartículas com alto magnetismo diminuiu o limiar mecânico.

Em conclusão, os dados deste trabalho sugerem que a transmissão neuronal na medula espinal envolve uma atividade eletromagnética.

Palavras-chave: *nanopartículas, medula espinal, canais voltagem dependente, nocicepção, eletromagnetismo.*

Abstract

Nanoparticles are structures with nanometer dimensions that are emerging to various applications, including that one involved in biological area. According to their synthesis and growth techniques these particles can have magnetic properties with greater or lesser magnitude.

The objective of this study was to evaluate whether the magnetic nanoparticles administration in the subarachnoid space of the spinal cord induces changes in the mechanical nociceptive threshold in rats hind-paw.

The carbon nanoparticles (nanotubes or nanofibers) were characterized by Raman spectrum and their magnetic characterized by the ferromagnetism behavior was evaluated by the hysteresis curve. The nanoparticles were intrathecally administered in Wistar rats lightly anesthetized with Isoflorano. The behavioral response to mechanical stimulation was assessed by an electronic analgesimeter (electronic Von Frey) that measures the withdrawal mechanical threshold (mechanical nociception).

The nanoparticles were classified according to their magnetic behavior in: high magnetism and low magnetism. The administration (5, 20 or 80 μg) of high magnetism nanoparticles, but not of low magnetism nanoparticles, decreased the mechanical withdrawal threshold of the hind-paw, when compared with the administration of propylene glycol (20 μL). Decreasing in mechanical withdrawal threshold was observed at 15, 30 and 60 minutes after administration of 20 μg of high magnetism nanoparticles. After this period, the mechanical withdrawal thresholds returned to their normal baseline. In contrast, intraplantar administration of the nanoparticles did not alter the mechanical withdrawal threshold. Therefore, administration of high magnetic nanoparticles in the spinal cord, but not in peripheral tissue, decreases the mechanical withdrawal threshold.

In conclusion, our data suggest that neuronal transmission in the spinal cord involves an electromagnetic activity.

Keywords: *nanoparticles, spinal cord, voltage-dependent channels, nociception, electromagnetism.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de magnetização onde há processos irreversíveis caracterizando a formação de uma histerese. (SINNECKER, 2000)	35
Figura 2: Espectro de Raman dos Nanotubos (NT)	40
Figura 3: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (FESEM) dos Nanotubos (NT)	41
Figura 4: Imagem microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) dos Nanotubos (NT)	41
Figura 5: Espectro de Raman da Nanofibras (NF).....	43
Figura 6: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (FESEM) da Nanofibras (NF).....	43
Figura 7: Imagem microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) das Nanofibras (NF)	44
Figura 8: Ciclo de histerese magnética para a amostra de NT para $T = 300K$	45
Figura 9: Ciclo de histerese magnética para a amostra de NF para $T = 300K$	47
Figura 10: Limiar de resposta de retirada da pata ao estímulo mecânico em função da administração intratecal de high magnetic nanoparticles (HMN; painel A) ou low magnetic nanoparticles (LMN; painel B). A resposta de retirada da pata ao	

estímulo mecânico foi avaliada 15 minutos após as administrações.....49

Figura 11: Limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico em função do tempo, após a administração intratecal de HMN (20 μ g), LMN (20 μ g) ou veículo (20 μ L).....50

Figura 12: Limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico em função do tempo, após a administração intraplantar de HMN (20 μ g), LMN (20 μ g) ou veículo (50 μ L).....51

Figura 13: Limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico em função do tempo, após a administração intratecal de HMN (20 μ g) com a administração anterior subcutânea (DEXA ou salina).....52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIS: Segmento Inicial do Axônio

Ca_v: cálcio voltagem-dependente

CEMIB: Centro multidisciplinar para a investigação biológica.

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

CVD: Deposição química a partir da fase vapor (Chemical Vapor Deposition).

FESEM: microscopia eletrônica de varredura (field emission scanning electron microscope).

GRDs: Gânglios das Raízes Dorsais

HFCVD: Deposição química a partir da fase vapor assistida por filamento quente.

HMN: Nanopartículas com alto magnetismo (high magnetism nanoparticles).

HRTEM: microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (high-resolution transmission electron microscopy).

i.pl.: via de administração intraplantar.

i.t.: via de administração intratecal.

JXPs: Juxtapanódulos

K_v: potássio voltagem-dependente

LMN: Nanopartículas com baixo magnetismo (low magnetism nanoparticles).

MPMS5: (“Magnetic Properties Measurements System”).

MWCNT: Nanotubos de carbono de parede múltipla (multi wall).

Na_v: sódio voltagem-dependente

NF: Nanofibras de carbono.

NMDA: N-metil-D-aspartato

NT: Nanotubos de carbono.

s.c.: via de administração subcutânea.

SI: Sistema Internacional.

SNC: Sistema Nervoso Central.

SQUID: magnetômetro (Superconducting Quantum Interference Devices).

SWCNT: Nanotubos de carbono de parede simples (single wall).

LISTA DE SÍMBOLOS

\vec{H} : campo magnético externo.

\vec{M} : magnetização (momento magnético por unidade de volume).

\vec{B} : indução magnética.

μ_0 : permeabilidade no vácuo igual a $4\pi \cdot 10^{-7} \text{ N/A}^2$ (SI).

χ_m : suscetibilidade magnética.

μ : permeabilidade do material.

\vec{M}_s : magnetização de saturação.

T_c : temperatura de Curie.

$\vec{\nabla}$: divergente.

$\vec{\nabla} \times$: rotacional.

\vec{E} : campo elétrico.

ρ : representa a densidade das cargas elétricas.

ϵ_0 : significa constante de permissividade no vácuo, $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ Nm}^2/\text{C}^2$ (SI)

j : densidade de corrente elétrica.

F : força eletrostática.

Q, q : carga elétrica.

d, r : distância.

Φ : fluxo de campo.

\vec{A} : vetor superfície.

V : diferença de potencial elétrico (ddp), voltagem ou tensão elétrica.

W : trabalho potencial.

C : capacitância

R : resistência.

i : corrente elétrica.

v : velocidade.

\vec{F}_B : força magnética.

\mathcal{E} : força eletromotriz induzida.

Φ_B : fluxo magnético.

Φ_E : fluxo elétrico.

SUMÁRIO

Resumo	ix
Abstract	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	xiv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	28
3.1. Nanopartículas de Carbono	28
3.2. Avaliação das Propriedades Magnéticas de Nanopartículas de Carbono	32
3.3. Animais e Grupos Experimentais	36
3.4. Administração das Nanopartículas	36
3.4.1. Administração Intratecal (i.t.) das Nanopartículas	37
3.4.2. Administração local Intraplantar (i.pl.) das Nanopartículas	37
3.5. Administração de Dexametasona	37
3.5.1. Administração Subcutânea (s.c.) de Dexametasona	38
3.6. Testes do limiar nociceptivo mecânico	38
3.7. Análise Estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Caracterização das Nanopartículas de Carbono	40
4.1.1. Nanotubos de Carbono	40
4.1.2. Nanofibras de Carbono	42
4.2. Avaliação das Propriedades Magnéticas de Nanopartículas de Carbono	44
4.2.1. Nanotubos de Carbono	44
4.2.2. Nanofibras de Carbono	46
4.3. Avaliação do limiar de Resposta Comportamental ao Estímulo Mecânico após Administração Intratecal (i.t.) das Nanopartículas	48
4.4. Avaliação do limiar de Resposta Comportamental ao Estímulo Mecânico após Administração intraplantar das Nanopartículas	50
4.5. Avaliação do limiar de Resposta Comportamental ao Estímulo Mecânico após Administração subcutânea de Dexametasona e intratecal das Nanopartículas	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
8. ANEXOS	71
8.1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	71
8.2. Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	72

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

De um modo geral, estímulos são fatores internos ou externos que induzem uma resposta do organismo. Estímulos nociceptivos, especificamente induzem uma resposta aversiva e podem ser físicos ou químicos. São detectados por estruturas denominadas de nociceptores, os quais transduzem estes estímulos em resposta elétricas neuronais que são transmitidas até o sistema nervoso central (SNC) através de fibras aferentes primárias (Bonica, 1990).

Estas fibras aferentes retransmitem a informação recebida para os neurônios secundários, os quais são responsáveis por conduzir o estímulo detectado até os Centros Superiores do encéfalo (Milne et al., 1981; revisado por Besson; Chaouch, 1987; Millan, 1999; Prado, 1999).

Conceitualmente o impulso nervoso é um impulso elétrico que se origina das alterações nas cargas elétricas (íons) das superfícies interna e externa da membrana celular de um neurônio. Este impulso elétrico quando ocorre na fibra neuronal é denominado de Potencial de Ação. (Julius; Basbaum, 2001; Nickel et al., 2011).

Fisicamente, o impulso nervoso pode ser interpretado através de equações matemáticas (Halliday et al., 1996; Griffiths, 1999). Durante muito tempo, considerou-se que o impulso nervoso seria composto por um fluxo de íons através de uma célula nervosa, semelhantemente ao fluxo de elétrons em um condutor metálico (fio, por exemplo). No entanto, as propriedades elétricas dos neurônios apresentam-se distintas daquelas verificadas em um condutor metálico, de maneira que uma condução nervosa ocorre de forma muito mais lenta, regular e sem mudanças de intensidade (Malmivuo; Plonsey, 1995)

O neurônio pode ser concebido como um circuito elétrico, os resistores representam canais iônicos de membrana, divididos em resistores variáveis, que seriam representados por canais voltagem dependentes e resistores fixos, os quais seriam os canais de vazamento de íons. Enquanto um capacitor representa a membrana lipídica. A diferença de potencial eletroquímico dos íons são baterias, conhecido como força eletromotriz (Malmivuo; Plonsey, 1995). Este modelamento

físico-matemático da propagação do impulso nervoso foi proposto por Hodking e Huxley (1952).

Resistores são condutores que apresentam uma característica denominada de resistência (R), a qual possui a propriedade de dificultar a passagem de cargas elétricas (corrente elétrica representada pelo símbolo i). A corrente elétrica que flui através de um dispositivo é diretamente proporcional à voltagem (diferença de potencial, representada pelo símbolo ΔV) aplicada a este componente. Esta relação é descrita matematicamente como:

$$\Delta V = Ri \quad (1)$$

A resistência é uma característica variável do condutor, dependente do material e das dimensões do dispositivo. Os resistores fixos são aqueles que possuem um único valor de resistência que permanece constante sob condições normais. Resistores variáveis são usados para variar ou mudar a quantidade de resistência de um circuito. Na prática, os resistores limitam a intensidade de corrente elétrica que passa através dele. A partir desta definição, os canais vazamento iônicos, possuem sempre uma resistência fixa a passagem dos íons, enquanto os canais voltagem dependentes responde de maneira variável a passagem dos íons (Bucher; Goillard, 2011).

Um capacitor é um dispositivo utilizado para armazenar energia, na forma de energia potencial, contida em campos elétricos. Os capacitores têm várias aplicações além de servirem como armazenadores de energia. São componentes elétricos que, embora não conduzam corrente elétrica entre seus terminais, são capazes de armazenar certa corrente, que será "descarregada", assim que não houver resistência entre seus terminais, é formado por duas placas condutoras, separadas por um material isolante chamado dielétrico, ligados a estas placas condutoras estão os terminais para conexão deste com outros componentes de um circuito elétrico (O'Rahilly, 1965).

A capacidade de acumulação de cargas elétricas no capacitor é determinada por uma propriedade denominada de capacitância (C), esta é determinada pelas dimensões das placas e pela distância de uma em relação à outra, ou seja, é diretamente proporcional à área e inversamente proporcional à

espessura do dielétrico. Quando um capacitor é carregado, suas placas adquirem cargas iguais, mas de sinais opostos. Entretanto, refere-se à carga do capacitor como sendo meramente Q , o valor absoluto das cargas sobre as placas. Uma vez que as placas são condutoras, elas constituem superfícies equipotenciais. Além disso, existe uma diferença de potencial entre as duas placas, representada por ΔV . A carga armazenada em um capacitor esta relacionada na equação:

$$Q = C.\Delta V \quad (2)$$

A diferença de potencial gera a força eletromotriz (\mathcal{E}). Esta grandeza também é conhecida como tensão (ou voltagem), sendo que a diferença entre dois potenciais elétricos é denominada de diferença de potencial elétrico (ou, simplesmente, diferença de potencial ou ddp). Na realidade, são as diferenças de potencial mais comumente utilizadas para os cálculos, como mostrado anteriormente nas equações (1) e (2) (Maxwell, 1965).

Biologicamente, a diferença de potencial é gerada pelos gradientes eletroquímicos: A concentração do íon potássio (K^+) no interior da membrana é alta, enquanto no exterior é muito baixa. Devido a essa diferença de gradiente de K^+ , há forte tendência para que os K^+ se difundam para o exterior. Inversamente, a concentração dos íons sódio (Na^+) é maior no exterior do que no interior da célula, desta maneira, os Na^+ tendem a se difundirem para o interior da célula. Através da diferença de concentração desses íons entre duas faces da membrana seletivamente permeável se estabelece um potencial elétrico de membrana (van Egeraat; Wiksw, 1993).

As permeabilidades dos canais de potássio e sódio passam por variações rápidas durante a transmissão de um impulso nervoso, enquanto a permeabilidade dos canais de cloro não varia muito durante esse processo. Portanto, as variações nas permeabilidades dos K^+ e Na^+ são as principais responsáveis pela condução dos sinais nos neurônios (Kurbel, 2011).

Uma vez que o potencial de ação tenha sido produzido em qualquer ponto da membrana da fibra nervosa, o processo de despolarização trafega por toda a membrana, se as condições forem adequadas, ou não o fará se estas forem inadequadas. Isso é chamado de princípio do “tudo ou nada” e se aplica a todo

tecido excitável normal em termos de propagação do impulso nervoso ao longo da célula (Pinto et. al, 2009).

A informação que trafega através do neurônio como potencial de ação é passada unidirecionalmente de um neurônio para outro através da sinapse, a qual pode ser elétrica ou química. Nas sinapses químicas a membrana pré-sináptica do axônio libera substâncias químicas chamadas neurotransmissores, que se ligam aos receptores químicos da membrana pós-sináptica do neurônio seguinte e promove mudanças excitatórias ou inibitórias nesta membrana (Ju et al., 1987; Battaglia; Rustioni, 1988; Tracey et al., 1991; Smith et al., 1993; Foust et. al, 2011).

A membrana celular que reveste as terminações pré-sinápticas também possui canais de voltagem dependentes, no entanto, são de Ca^{2+} (cálcio voltagem-dependente, Ca_v), e não de potássio e sódio como em outras áreas do neurônio descrito anteriormente (Lai;Jan,2006). Quando o potencial de ação despolariza esta região, estes canais se abrem, possibilitando, que íons de cálcio flua para dentro da terminação, estes se fixam em moléculas que estão aderidas a superfície interna da membrana, denominadas de sítio de liberação. Esta adesão permite que vesículas sinápticas se fundam com os sítios de liberação fazendo com que estas liberem o seu conteúdo (neurotransmissor) para o exterior, por exocitose. (Lai;Jan,2006; Pizzarelli; Cherubini, 2011).

O neurotransmissor se difunde para a célula alvo, onde se liga a uma proteína receptora na superfície externa da membrana celular. Após um breve período o transmissor se dissocia do receptor. A substância liberada, ou é reabsorvida, ou destruído pela ação catabólica de uma enzima, ou removida da fenda sináptica pela circulação local. (Pizzarelli; Cherubini, 2011)

Fisicamente, os íons responsáveis pelos potenciais de ação, são cargas elétricas (Q), para definir esta grandeza física é necessário conhecer a estrutura básica de átomo; em seu núcleo estão os prótons e os nêutrons, e girando em torno deste núcleo estão os elétrons. Um próton em presença de outro próton se repele, o mesmo ocorre com os elétrons, mas entre um próton e um elétron existe uma força de atração. Desta maneira, atribuímos ao próton e ao elétron uma

propriedade física denominada carga elétrica elementar que possui o valor de $1,6 \times 10^{-19} \text{C}$ (Coulomb). Portanto, para determinar a carga elétrica de um corpo, basta multiplicar o valor da carga elementar pelo número de elétrons em falta ou em excesso. Se o corpo estiver com elétrons em excesso o valor da carga elétrica será negativo, em contrapartida, se houver escassez de elétrons o valor da carga elétrica será positivo. (Calkin, 1979).

A intensidade da força eletrostática (F) entre duas cargas elétricas (Q_1, Q_2) é diretamente proporcional ao produto das cargas e inversamente proporcional ao quadrado da distância (d) que as separa, esta afirmação é chamada de Lei de Coulomb, sendo expressa matematicamente pela equação abaixo:

$$F = \frac{Q_1 \cdot Q_2}{4\pi\epsilon_0 d^2} \quad (3)$$

Onde: ϵ_0 significa constante de permissividade no vácuo, o seu valor é $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ Nm}^2/\text{C}^2$.

O conceito de campo elétrico (\vec{E}) surgiu da necessidade de explicar a ação de forças quanto à distância. Uma carga elétrica (Q) modifica o espaço ao seu redor, esta mudança é o campo elétrico, ao colocarmos uma carga elétrica nessa região; esta carga que denominamos carga de prova (q) é submetida a uma força elétrica (\vec{F}). Obedecendo a equação abaixo:

$$\vec{E} = \frac{\vec{F}}{q} \quad (4)$$

Assim como \vec{F} , \vec{E} também é uma grandeza vetorial. Desta forma, de acordo com a equação (4), a direção e o sentido de \vec{E} são idênticos aos de \vec{F} . Pode-se reescrever a equação (4), ao substituir nesta a equação (3), obtendo a equação abaixo:

$$\vec{E} = \frac{Q}{4\pi\epsilon_0 d^2} \quad (5)$$

O campo elétrico (\vec{E}) é uma grandeza vetorial, assim é importante mencionar a sua orientação sendo da carga elétrica positiva em direção a carga negativa, no entanto, está relacionado a uma grandeza escalar, o potencial

elétrico, denotado por V ou força eletromotriz (ε), como mencionado anteriormente. A ddp entre dois pontos A e B de uma região que possui \vec{E} é definida como sendo: o trabalho (W) necessário para deslocar uma carga elétrica (q) de A até B, representando esta frase matematicamente obtém-se a equação abaixo:

$$\Delta V = (V_B - V_A) = \frac{W_{AB}}{q} \quad (6)$$

A diferença de potencial elétrico é, simplesmente, a energia potencial elétrica por unidade de carga adquirida por esta quando deslocada de um ponto a outro num campo elétrico e independe da trajetória. Para se obter o conceito de potencial em um ponto, é necessário supor que o outro ponto esteja no infinito, e arbitrariamente atribuir valor zero ao potencial no infinito. Assim, o potencial elétrico, será igual ao trabalho necessário para deslocar uma carga desde o infinito até o ponto considerado no campo elétrico. O vetor intensidade de campo elétrico \vec{E} é definido de acordo com a equação (4) e sabendo que trabalho é o produto escalar da força pelo deslocamento, representado na equação ($W = \vec{F} \cdot \vec{d}$). Pode-se unir a equação (4) com a equação (6) utilizando o conceito de trabalho, obtém-se a equação que expressa à relação existente entre a diferença de potencial elétrico e campo elétrico:

$$\Delta V = (V_A - V_B) = -\int_A^B \vec{E} \cdot d\vec{s} \quad (7)$$

No entanto, as cargas elétricas (íons) se movimentam através do fluxo e influxo dos canais da membrana plasmática para a propagação do impulso nervoso. Importante, carga elétrica cria um campo elétrico, quer esteja em repouso, quer em movimento. Entretanto uma carga elétrica em movimento cria um campo magnético, mas a existência deste campo é raramente mencionada durante a propagação de um impulso nervoso.

Muitas técnicas estão disponíveis para mensurar a natureza elétrica da propagação de um impulso nervoso como patch-clamp, registros de potenciais de ação (histograma pós-estímulo, PSH), entre outros métodos eletrofisiológicos.

(Parada et. al, 1997; Geiger; Jonas, 2000; Bischofberger et.al, 2006; Shu et. al, 2006). Porém a mensuração do campo magnético ainda é uma técnica difícil. Experimentalmente a natureza magnética da propagação de um impulso nervoso pode ser medida pela técnica conhecida como sonda de corrente neuromagnética (neuromagnetic current probe; Wijesinghe, 2010). Por definição a existência de um campo magnético durante a propagação do impulso nervoso é um fato, mesmo que tenha sido poucas vezes mensurado. A técnica de estimulação magnética transcraniana (Keiser, 2011) utilizada em humanos também tem sugerido uma importância do campo magnético nas atividades neuronais.

O campo magnético (\vec{B}) pode ser escrito matematicamente de forma análoga ao campo elétrico (\vec{E}), exceto pelo fato da carga elétrica (q) precisar estar em movimento para gerá-lo, portanto é introduzida a variável velocidade (v), sendo a força magnética (\vec{F}_B) o produto vetorial da velocidade pelo campo magnético, como descrita pela equação abaixo:

$$\vec{F}_B = q\vec{v} \times \vec{B} \quad (8)$$

O físico francês André-Marie Ampère (1775-1836), no século XIX, formalizou a relação entre corrente elétrica e campo magnético por meio de uma lei que ficou associada ao seu nome. Essa lei diz que cargas elétricas em movimento estão associadas a campos magnéticos ao seu redor e relaciona quantitativamente correntes elétricas e campos magnéticos em determinada região do espaço a uma distância (r) de um condutor retilíneo (considerado de comprimento infinito), percorrido por uma corrente elétrica contínua de intensidade i através da expressão (Semon, 1996):

$$B = \frac{\mu_0 i}{2\pi r} \quad (9)$$

Onde: μ_0 é a permeabilidade no vácuo igual a $4\pi \cdot 10^{-7} \text{ N/A}^2$.

A intensidade do vetor campo magnético total em uma determinada região pode ser calculada somando-se as contribuições dos campos magnéticos associados a vários trechos de um fio que apresente corrente elétrica. Essa lei recebeu o nome dos físicos franceses Jean Batpiste Biot (1774-1862) e Felix

Savart (1791-1841). Desta maneira, a intensidade do vetor campo magnético total pode ser obtida através da seguinte relação:

$$\vec{B} = \frac{\mu_0 i}{4\pi} \int \frac{d\vec{s} \times \vec{d}}{d^3} \quad (10)$$

Em 1820, o físico dinamarquês Hans Christian Oersted (1777-1851), utilizando uma fonte galvânica ligada a um fio e uma agulha magnética capaz de girar livremente em torno de seu centro, observou em seus experimentos uma interação entre o fio e a agulha magnética. Ao repetir este protocolo experimental em diferentes orientações da agulha e do fio, ele constatou que a agulha sempre se posicionava aproximadamente perpendicular ao fio. A conclusão de Oersted em relação este novo fenômeno é que havia algo gerado pelo fio que exercia algum tipo de interação com a agulha, fazendo com que ela defletisse (Darrigol, 2000)

Assim, esta observação conduziu ao estudo de um fenômeno chamado eletromagnetismo que é a combinação de fenômenos elétricos e magnéticos. Este estudo foi, posteriormente, desenvolvida por muitos outros pesquisadores, entre eles, Michael Faraday (1791-1867). Por volta de 1821, atraído pela experiência do físico dinamarquês Oersted, Faraday verificou, invertendo a experiência, que os magnetos exercem ação mecânica sobre os condutores percorridos por corrente elétrica. Para chegar a essa conclusão, Faraday colocou um ímã em posição vertical sobre um banho de mercúrio, de modo que uma de suas extremidades ficasse imersa no líquido. Ao ligar um fio condutor ao mercúrio, fechando o circuito, observou que, quando o fio se movia em torno de seu ponto de suspensão, descrevia círculos em volta do ímã. Se, pelo contrário, o fio fosse mantido fixo e o ímã deixado livre, este girava em torno do fio. Com essa experiência, fundamental para o desenvolvimento tecnológico posterior, Faraday criou o primeiro motor eletromagnético. Em 29 de agosto de 1831 descobriu a indução eletromagnética, fenômeno, já entrevisto por Arago (1786-1853) e por Ampère (1775-1836), que somente foi cientificamente explicado por Faraday. Com a experiência de Faraday, obtêm-se algumas constatações: a eletricidade

variando no tempo, se propaga de alguma maneira gerando magnetismo, e este, por sua vez, variando com o tempo, se propaga, gerando eletricidade. Isso é o que foi chamado de “indução”. Suas idéias sobre os campos elétricos e os magnéticos, e a natureza dos campos em geral, inspiraram trabalhos posteriores nessa área, como as equações de Maxwell. (MAXWELL, 1856).

James Clerk Maxwell (1831-1879) formalizou a teoria moderna do eletromagnetismo, que une a eletricidade, o magnetismo e a óptica. Esta é a teoria que surge das equações de Maxwell, assim chamadas em sua homenagem e porque ele foi o primeiro a descrevê-las juntando a Lei de Ampère, a lei de Gauss, e a lei de Indução de Faraday.

Maxwell demonstrou que os campos elétricos e magnéticos se propagam com a velocidade da luz. Demonstrou em 1864 que as forças elétricas e magnéticas têm a mesma natureza: uma força elétrica em determinado referencial pode tornar-se magnética se analisada em outro, sendo tudo uma questão de referencial. As quatro equações de Maxwell que descrevem as propriedades do fenômeno eletromagnético são (Maxwell, 1954):

$$\text{Lei de Gauss da Eletricidade: } \vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\epsilon_0} \quad (11)$$

$$\text{Lei de Gauss do Magnetismo: } \vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (12)$$

$$\text{Lei da Indução de Faraday: } \vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{d\vec{B}}{dt} \quad (13)$$

$$\text{Lei de Ampère-Maxwell: } \vec{\nabla} \times \vec{B} = \mu_0 j + \mu_0 \epsilon_0 \frac{d\vec{E}}{dt} \quad (14)$$

As variáveis \vec{B} (indução magnética) e μ_0 (permeabilidade no vácuo) já foram discutidas nas seções anteriores. \vec{E} corresponde ao campo elétrico, ρ representa a densidade das cargas elétricas, ϵ_0 significa constante de permissividade no vácuo, o seu valor é $8,85 \cdot 10^{-12} \text{ Nm}^2/\text{C}^2$ e j é a densidade de corrente elétrica. Analisando as equações a (11) define que quanto maior for a densidade de carga (maior quantidade de elétrons num determinado espaço, por exemplo), mais forte será o campo elétrico. Enquanto que a equação (12) enuncia

que pólos magnéticos isolados não existem, pois, se cortarmos um ímã pela metade não haverá um pólo “norte” isolado ou um pólo “sul” isolado; cada parte terá agora seus pólos “norte” e “sul”, respectivamente. A equação (13) mostra como um campo magnético variável induz um campo elétrico e finalmente a equação (14) descreve como um campo elétrico variável (ou uma corrente elétrica) induz um campo magnético.

Como demonstrado pelo experimento de Orested, a eletricidade e magnetismo são fenômenos dependentes e que forças elétricas e magnéticas são diferentes manifestações de um único campo: o campo eletromagnético, como demonstrado pelas equações de Maxwell (13) e (14).

Portanto, esta interdependência dos campos elétricos e magnéticos deve ser discutida a partir de como que um campo elétrico pode ser gerado por um campo magnético variável. Portanto, um campo magnético variável dá origem a um campo elétrico, este fenômeno é denominado de indução eletromagnética, o processo inverso também é verdadeiro, ou seja, a produção de um campo magnético por um campo elétrico variável. O estudo deste assunto começa em termos de força eletromotriz induzida (\mathcal{E}) e o fluxo magnético (Φ_B). Faraday, um físico inglês do século XIX, observou experimentalmente que fazendo variar o fluxo magnético através de uma espira fechada (união das extremidades de um fio condutor) surgia uma corrente elétrica na espira, portanto, uma corrente era induzida na espira. A equação que descreve esse fenômeno é (Maxwell, 1856):

$$\mathcal{E} = -\frac{d\Phi_B}{dt} \quad (15)$$

Interpretando, esta Lei da Indução de Faraday tem-se que a força eletromotriz induzida é igual à taxa de variação temporal do fluxo magnético. Apesar da nomenclatura, força eletromotriz, é uma diferença de potencial, assim sendo pode-se usar a definição da equação (7), obtendo-se uma nova expressão da Lei de Faraday (veja em Mendoza; Muñoz, 2010):

$$\oint \vec{E} \cdot d\vec{s} = -\frac{d\Phi_B}{dt} \quad (16)$$

O sinal negativo que aparece nessas expressões refere-se ao sentido da força eletromotriz induzida que sempre se opõe à variação do fluxo. Portanto, o sentido da corrente induzida tende sempre a se opor à variação da grandeza que a produziu. Esse resultado é conhecido como Lei de Lenz (Maxwell, 1856).

Aplicando o teorema do rotacional (Stokes):

$$\int (\vec{\nabla} \times \vec{E}) d\vec{A} = \oint \vec{E} \cdot d\vec{s} \text{ na equação (16) resulta na equação (17):}$$

$$\int (\vec{\nabla} \times \vec{E}) d\vec{A} = -\frac{d\Phi_E}{dt} \quad (17)$$

Resolvendo a integral obtêm-se a terceira equação de Maxwell: a Lei de da Indução de Faraday (equação 13).

Desta maneira, como já mencionado anteriormente pode-se obter uma equação simétrica à equação (16) para o campo magnético, uma vez que um campo elétrico variável também produz um campo magnético. Assim sendo, reajustando a equação (16) e adequando esta dimensionalmente, resulta

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{s} = \mu_0 \epsilon_0 \frac{d\Phi_E}{dt} \quad (18)$$

Unindo a equação (18) com a Lei de Ampère: $\oint \vec{B} \cdot d\vec{s} = \mu_0 i$, uma vez que o campo magnético também pode ser produzido por uma corrente (foco do trabalho), têm-se a nova equação:

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{s} = \mu_0 \epsilon_0 \frac{d\Phi_E}{dt} + \mu_0 i \quad (19)$$

Aplicando novamente o teorema do rotacional (Stokes): $\int (\vec{\nabla} \times \vec{B}) d\vec{A} = \oint \vec{B} \cdot d\vec{s}$ na equação (19) resulta na equação (20):

$$\int (\vec{\nabla} \times \vec{B}) d\vec{A} = \mu_0 \epsilon_0 \frac{d\Phi_E}{dt} + \mu_0 i \quad (20)$$

Resolvendo a integral obtêm-se a quarta equação de Maxwell: a Lei de Ampère-Maxwell (equação 14).

As equações de Maxwell demonstram matematicamente a existência de um campo eletromagnético. No entanto, a aplicação destas equações não fica restrita ao escopo da física, uma vez que a propagação de um impulso nervoso, relacionada íons em movimento, assim o fenômeno envolvido é de natureza eletromagnética (Wijesinghe, 2010).

Tendo em vista o exposto, se torna evidente a interligação entre os fenômenos físicos e biológicos, sendo que a física pode ser aplicada na compreensão dos fenômenos biológicos da propagação da informação nervosa ao longo dos neurônios para desencadear a resposta a um determinado estímulo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Considerando o exposto acima a hipótese deste trabalho é que o componente magnético do campo eletromagnético formado na fibra neuronal exerce importante influência na transmissão do impulso nervoso. Portanto o objetivo deste trabalho é verificar se administração no espaço subaracnóide de nanopartículas com propriedades magnéticas altera a resposta comportamental a estímulos mecânicos aplicados em patas de ratos e interpretar o resultado à luz dos fenômenos eletromagnéticos.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar as nanopartículas pelo espectro de Raman, bem como avaliar o seu comportamento magnético através da medida da curva de histerese magnética.
- Analisar alterações no limiar da resposta comportamental ao estímulo mecânico aplicado na pata de ratos após administração intratecal ou local no tecido periférico de nanopartículas magnéticas.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. Nanopartículas de Carbono

Nanotecnologia é a ciência que utiliza dos recursos disponíveis da engenharia para a manipulação de átomos e moléculas com a finalidade de formar novos produtos e dispositivos que concedam aos já existentes novas funções ou a criação de estruturas, em escala dimensionada em nanômetros (Patlolla et al., 2009). Os contínuos avanços em nanotecnologia estão intrinsecamente interligados a uma variedade de nanomateriais que permitem um grande controle e com propriedades físicas e químicas, essenciais para elucidar sua homogeneidade, estabilidade, reatividade, durabilidade em meios biológicos, que os torna aplicáveis em muitas áreas como alimentícia, química, tecnologia da informação e principalmente a médica, o que vislumbra a possibilidade da utilização destas nanoestruturas para a prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças (Reisner, 2009; Peralta-Videa et al., 2010).

Dentre as nanopartículas, existente pode-se destacar os nanotubos (NT) e nanofibras (NF) de carbono. Os nanotubos de carbono são nanoestruturas únicas com propriedades mecânicas e eletrônicas notáveis, despertando aplicações exclusivas na nanotecnologia (Bianco et al., 2005a; Balasubramanian; Burghard, 2005; Souza Filho; Fagan, 2007; Liu et al., 2008; Tran et al, 2009).

Em 1991, o microcopista Sumio Iijima da NEC Corporation-Japão, estudava o material depositado no catodo durante a evaporação voltaica para a síntese de fulerenos, quando este constatou que na região central do depósito do catodo continha uma variedade de estruturas gráficas fechadas, incluindo nanotubos que não haviam sido observados anteriormente (Iijima, 1991). Posteriormente, dois outros cientistas Thomas Ebbesen e Pulickel Ajayam, do mesmo laboratório, demonstraram como os nanotubos poderiam ser obtidos em grandes quantidades simplesmente pela variação das condições de evaporação do arco voltaico (Ebbesen;Ajayam,1992). Esta descoberta fez com que houvesse inúmeras pesquisas em relação às propriedades físico-químicas de nanotubos de carbono

em todos os laboratórios mundiais. Os NT são estruturas cilíndricas com diâmetro da ordem de poucos nanômetros e comprimento da ordem de microns, sendo constituído exclusivamente por átomos de carbono dispostos em uma série de anéis benzeno condensados em uma estrutura tubular, com ligações covalentes carbono-carbono, com uma hibridização nominal sp^2 . (Ebbsen; Ajayan, 1992, Balasubramanian; Burghard, 2005, Souza Filho; Fagan, 2007, Tran et.al, 2009).

Os NT podem ser classificados em duas categorias, de acordo com a sua estrutura: parede simples (*single wall*, SWCNT), que são constituídos de uma camada simples de grafite (*grafeno*) que se enrola produzindo um cilindro, e parede múltipla (*multi wall*, MWCNT), constituídos por duas ou mais camadas simples de cilindros coaxiais (obtidos ao enrolar uma folha de grafite), espaçados de 0,34 nm – 0,36 nm, um do outro, este espaçamento é um pouco maior que a distância interplanar do grafite. Esses cilindros concêntricos podem ser encontrados com seus extremos fechados ou abertos. (Iijima, 1991; Balasubramanian; Burghard, 2005; Reilly, 2007; Saito et al., 2009). Os SWCNT têm diâmetros entre 0,4 a 2,0 nm e comprimentos na faixa de 20 -1000 nm, enquanto MWCNT são maiores, com diâmetros na ordem de 1,4 a 100 nm e comprimentos de 1 a vários micrômetros. (Dresselhaus et al., 1998; Bianco et al., 2005b; Tran et al, 2009).

As Nanofibras de Carbono (*Carbon Nanofibers* - NF) podem ser consideradas como pertencentes a uma terceira classe de carbono nanoestruturado, além dos fulerenos e nanotubos. No entanto não se trata de uma estrutura bem definida. Muitas vezes são classificadas como MWCNTs com estrutura tipo bambu (*bamboo-like*), do tipo esqueleto de peixe (*herringbone*), ou tipo empilhamento de copos (*stacked-cup*) (Melechko et al., 2007). No entanto, tanto nanotubos (NT) quanto nanofibras de carbono (NF) são filamentos com uma das dimensões na faixa de 1-100nm baseados em carbonos hibridizados do tipo sp^2 e, em alguns casos, é difícil classificar uma estrutura como MWCNT ou NF. A grande diferença entre NFs e MWCNTs é a desordem na estrutura cristalina ao longo do filamento. As NFs não se apresentam como um conjunto de SWCNTs concêntricos e possuem muitas ligações pendentes (*dangling bonds*) em sua

superfície que possivelmente são preenchidas com hidrogênio. Essa classe de materiais, à primeira vista menos nobre, possui vasta aplicação, visto que possuem algumas vantagens estruturais e de síntese em relação aos MWCNTs: temperatura de deposição menor, maior controle de deposição, maior capacidade de funcionalização. (Dai, 2002; Melechko et al., 2007).

As propriedades físicas, quantidade, qualidade e o tipo de NT sintetizados dependem do método utilizado para a sua fabricação. Os métodos de preparação mais utilizados na obtenção de NT são descarga por arco elétrico, ablação por laser e deposição química por vapor (CVD), utilizando catalisadores com ferro, cobalto e níquel. (Iijima, 1991; Dai, 2002, Balasubramanian; Burghard, 2005; Reilly, 2007; Saito et al., 2009). Este último método também é aplicado na síntese das NF. (Melechko et al., 2007; Tran et al., 2009).

Na técnica de descarga por arco elétrico e ablação por laser são baseados na condensação de átomos de carbonos gerados pela evaporação (sublimação) de carbono a partir de um precursor sólido, geralmente, grafite de alta pureza. No procedimento de descarga por arco elétrico, um plasma é gerado através de eletrodos de carbono, resultando na deposição de nanotubos de carbono sobre um substrato. Já no método de ablação por laser utiliza-se um feixe de laser para vaporizar um alvo de grafite combinado com um catalisador de metal de transição, a adição de um laser secundário melhora a qualidade dos NT através da otimização da vaporização do alvo, minimizando a quantidade de carbono amorfo. Entre as limitações destas técnicas estão à incapacidade de produzir SWCNTs ou MWCNTs distintamente e a presença de impurezas, sendo necessário, tratamento químico e térmico para a purificação. (Foldvari; Bagonluri, 2008, Tran et al, 2009).

O método de deposição química na fase vapor (*Chemical Vapour Deposition* - CVD) é conhecido desde o final da década de 60 (Walker et al., 1959) e, ao longo dos últimos 30 anos, se tornou técnica chave na deposição de filmes finos na indústria de semicondutores. A partir de 1993, Yacamán et al., mostraram que o crescimento NT e NF por CVD era o mais adequado para aplicações comerciais, principalmente em micro-eletrônica, pois é o método que pode utilizar

todo o aparato já existente na indústria de semicondutores. O método CVD possui muitas variações e está intimamente ligado aos processos de micro-fabricação.

De forma geral, o processo de crescimento de NT e NF por CVD baseia-se na dissociação de um hidrocarboneto sobre um substrato de carbono e hidrogênio na presença de metais catalisadores. O metal catalisador pode ser previamente depositado sobre o substrato ou ser proveniente da pirólise de algum organometálico na forma gasosa. Os hidrocarbonetos utilizados como precursores podem variar bastante e algumas técnicas necessitam de um gás auxiliar reativo sendo que NH_3 ou H_2 são bastante comuns.

Em comparação com outros métodos o CVD, se mostra eficaz por não gerar estruturas amorfas de carbono juntamente com os NT e NF sintetizados, consequência do maior controle que se tem sobre as variáveis do processo de CVD, tais como temperatura do gás e do substrato e concentração do precursor. Os nanoestruturados obtidos por CVD apresentam baixa quantidade de impurezas e tamanho mais homogêneo, no entanto, algumas vezes ainda se faz necessário a remoção destas impurezas. (Yacamán et al., 1993; Kong et al., 1998; Zhang et al., 2000; Foldvari; Bagonluri et al., 2008).

As nanopartículas de carbono, os nanotubos (NT) de parede múltipla (MWCNT) e as nanofibras (NF) utilizadas neste estudo foram sintetizadas no Laboratório de Nanoengenharia e Diamante (NanoEng), do Departamento de Semicondutores, Instrumentos e Fotônica da Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação da UNICAMP pelo professor Helder José Ceragioli.

Os NT foram sintetizados através do método de deposição química a partir da fase vapor assistida por um filamento quente (HFCVD), crescido em substrato de cobre, recoberto com filme de polianilina e catalisado com nitrato de níquel. Os hidrocarbonetos utilizados como fonte de carbono foram a cânfora e a acetona, os crescimentos dos nanotubos se deram na atmosfera de nitrogênio (Ceragioli et al., 2008).

As NF foram sintetizadas de forma análoga aos NT, a diferença é que não houve a presença do catalisador, mudando a atmosfera de crescimento do gás nitrogênio para o gás argônio.

Depois da descoberta dos nanotubos, muitos esforços foram realizados no sentido de conhecer tais nanoestruturas. A caracterização é uma etapa importante para o desenvolvimento da área da nanotecnologia, uma vez que tais nanopartículas apresentam características estruturais singulares que podem influenciar nas propriedades eletrônicas, ópticas e magnéticas (relação estrutura-propriedade). Amostras comerciais de NT, normalmente são acompanhadas de caracterização por meio de espectros de Raman, análise elementar de dados e microscopias eletrônicas de varredura ou transmissão (Foldvari; Bagonluri et al., 2008).

A espectrometria Raman se baseia na luz, monocromática, de determinada frequência, dispersada ao incidir sobre o material a ser estudado. Quando um feixe de luz monocromática atinge um meio material, uma fração muito pequena dessa luz sofre uma mudança na sua frequência (espalhamento inelástico) e o conjunto dessas frequências modificadas constitui o que se chama de espectro Raman (Popov, 2004). Segundo Ryder (2005), a espectrometria Raman é uma ferramenta sensível na detecção de pequenas alterações estruturais e químicas, pois fornecem informações em nível molecular, permitindo a investigação de grupos funcionais, os tipos de ligações e conformações moleculares.

Portanto, as nanopartículas utilizadas no trabalho foram caracterizadas por espectroscopia de Raman, microscopia eletrônica de varredura (FESEM – field emission scanning electron microscope) e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM - high-resolution transmission electron microscopy).

3.2. Avaliação das Propriedades Magnéticas de Nanopartículas de Carbono

As nanopartículas de carbono podem possuir propriedades físico-químicas notáveis, uma delas o ferromagnetismo.

O nanomagnetismo é a área de pesquisa em física que trata dos fenômenos magnéticos especialmente presentes em estruturas com dimensões nanométricas (Salem et al., 2003). Desta forma, muitos pesquisadores de diversos

campos da ciência que estudam os materiais magnéticos, como a Física, a Engenharia de Materiais e Elétrica, entre outras áreas, tem se interessado nas propriedades físico-químicas desta nova classe de materiais (Wu et al., 2010).

O magnetismo é uma das áreas mais complexa da física do Estado Sólido. Embora, seja um dos campos de estudo mais antigos da ciência, sendo o seu nome relacionado a uma cidade denominada Magnésia, sito na região da antiga Turquia, a qual era rica em minério de ferro, somente no início do século XX, com o surgimento da Mecânica Quântica, que os fenômenos microscópicos do magnetismo foram finalmente compreendidos. O magnetismo é um ramo da física que estuda propriedades de sistemas magnéticos, e está associado também com o fenômeno interação dos materiais relacionados às forças de atração e repulsão (Rezende, 1996; Oliveira; Jesus, 2005).

Os materiais quando expostos a um campo magnético, fornecem respostas distintas, este comportamento se origina nas minúsculas correntes elétricas associadas ou a elétrons em órbitas atômicas ou a spins de elétrons. Portanto, quaisquer fenômenos magnéticos são devido à carga elétrica em movimento, conseqüentemente, a corrente elétrica (Huang, 2003). No entanto, em escala macroscópica, estas correntes geradas no interior do material, são tão pequenas que podem ser tratadas como dipolos magnéticos (Oliveira; Jesus, 2005).

Quando um campo magnético externo, denotado por \vec{H} , é aplicado a um material, ocorre uma mudança nos dipolos magnéticos deste, dando origem a uma resposta macroscópica que é a magnetização, \vec{M} (momento magnético por unidade de volume). A indução magnética, \vec{B} , é o campo proveniente da própria magnetização do material e do campo externo aplicado. A relação, no Sistema Internacional (SI), entre os três campos (\vec{B} , \vec{H} e \vec{M}) é dada pela equação (21), onde μ_0 é a permeabilidade no vácuo igual a $4\pi \cdot 10^{-7} \text{ N/A}^2$:

$$\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \vec{M}) \quad (21)$$

Os materiais podem ser classificados de acordo com a orientação de seus momentos magnéticos em relação ao campo magnético externo aplicado (\vec{H}). Portanto, temos as seguintes classes: diamagnetismo, paramagnetismo,

ferromagnetismo, ferrimagnetismo e antiferromagnetismo (Ashcroft, 1976; Landau, 1960; Oliveira; Jesus, 2005).

Temos que χ_m é a suscetibilidade magnética. Desta forma, podemos substituir a equação (22) na equação (21), obtendo a equação (23):

$$\vec{M} = \chi_m \vec{H} \quad (22)$$

$$\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \chi_m \vec{H}) \quad (23)$$

Rearranjando a equação (23) resulta a equação (24). Usualmente denomina-se $\mu = \mu_0(1 + \chi_m)$ que a permeabilidade do material, sendo assim, tem-se, finalmente, a equação (5):

$$\vec{B} = \mu_0(1 + \chi_m)\vec{H} \quad (24)$$

$$\vec{B} = \mu\vec{H} \quad (25)$$

Desta forma, \vec{B} também é proporcional a \vec{H} . Neste trabalho, são utilizados nanopartículas com propriedades ferromagnéticas e que possuem $\chi_m \gg 1$. Conseqüentemente estes materiais apresentam uma característica marcante conhecida como magnetização espontânea, ou seja, eles apresentam uma magnetização não nula, mesmo na ausência de um campo magnético externo, porque os dipolos magnéticos já estão alinhados. No entanto, ao se aplicar um campo magnético externo estes se orientam em relação ao campo magnético aplicado (Oliveira; Jesus, 2005).

Um material ferromagnético encontra-se na máxima magnetização, denominada de magnetização de saturação (\vec{M}_s), quando todos os dipolos magnéticos estão alinhados com o campo externo. Os metais de transição como o ferro, o cobalto, níquel e alguns dos metais terras raras, como o gadolínio exibem o ferromagnetismo. (Maignan et al., 2006).

Quando o material atinge uma determinada temperatura, denominado temperatura de Curie (T_c), temperatura esta descoberta por Pierre Curie, esse alinhamento é destruído, fazendo com que o material se comporte como um paramagnético (Mendeleev et al., 2007; Todaka et al., 2008). A magnetização diminui à medida que a temperatura aumenta até um valor chamado de

temperatura crítica. Depois de atingir esta temperatura, o maior movimento térmico dos átomos tende a tornar as direções dos dipolos randômicas, tornando a magnetização nula (Cullity, 1972; Spaldin, 2003; Todoka et al., 2008).

É possível medir a variação da magnetização (\vec{M}) em função do campo externo \vec{H} , através da curva de histerese magnética.

O gráfico da variação de magnetização (\vec{M}) de um material em função do campo externo aplicado \vec{H} denomina-se curva ou ciclo de histerese. A figura 1 representa a forma de um ciclo de histerese típico de um material numa fase ferromagnética. Quando se aplica um campo magnético em um material inicialmente desmagnetizado, este tende a atingir um patamar constante denominado de magnetização de saturação (\vec{M}_s) conforme esquematizado na figura 1 (Sinnecker, 2000). Quando há uma diminuição do campo magnético aplicado a partir deste valor de saturação, o valor da magnetização também diminui até um valor conhecido como valor residual da magnetização, quando não há aplicação de um campo magnético externo, mas mesmo assim, há a existência de uma magnetização remanescente. Invertendo o sentido do campo magnético aplicado, a magnetização atinge valores cada vez menores até outro ponto de saturação, desta maneira, repete-se o ciclo no sentido inverso, obtendo-se uma curva fechada, denominada ciclo de histerese (Wlodarski, 2007).

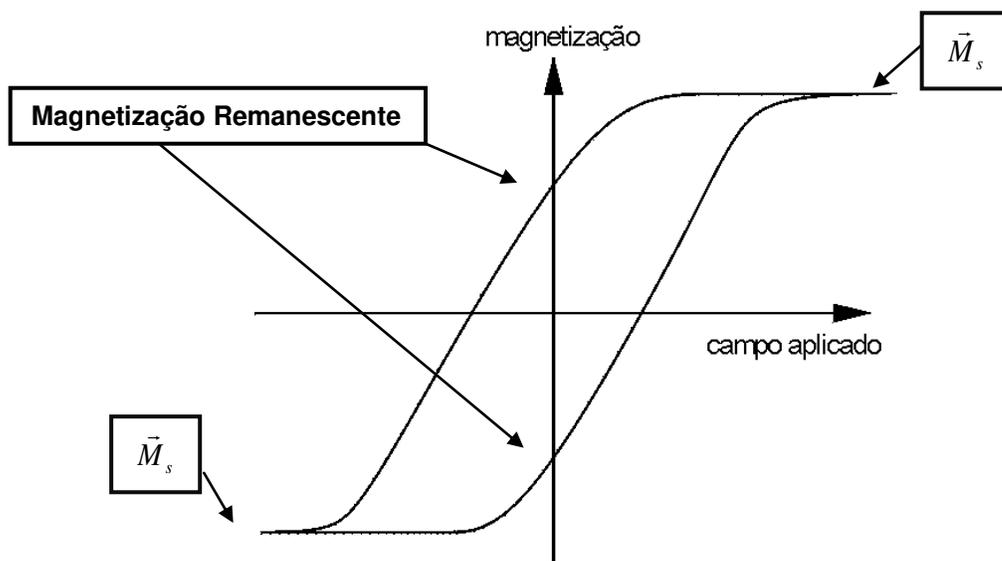


Figura 1: Curva de magnetização onde há processos irreversíveis caracterizando a formação de uma histerese. (SINNECKER, 2000).

Portanto, as propriedades magnéticas das nanopartículas podem ser caracterizadas através de curvas de histerese, e através desta propriedade pode ocorrer uma interação com um campo eletromagnético.

Para a avaliação das propriedades magnéticas utilizou-se um magnetômetro SQUID (Superconducting Quantum Interference Devices), um equipamento comercial fabricado pela Quantum Design, modelo MPMS5 (“Magnetic Properties Measurements System”) de 5T (tesla) de campo máximo (Laboratório de Materiais e Dispositivos do Instituto de Física Gleb Wataghin (IFGW) da UNICAMP coordenado pelo Prof. Dr. Iakov Kopelevitch). Este equipamento fornece a curva de magnetização em função do campo magnético aplicado (curva de histerese magnética).

3.3. Animais e Grupos Experimentais

Foram empregados para este estudo ratos Wistar machos com 7 a 8 semanas de idade, com massas entre 220 a 250 gramas, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp (CEMIB). Os animais foram mantidos sob condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro) e temperatura (21°C). Os animais foram separados randomicamente nos grupos de estudo.

Os procedimentos de manipulação experimental dos animais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA) e aprovadas pelo comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biologia da Unicamp (Proc.2292/1).

3.4. Administração das Nanopartículas

Nos testes comportamentais, as nanopartículas foram administradas por duas vias diferentes: via intratecal (i.t) ou via intraplantar (i.pl.).

3.4.1. Administração Intratecal (i.t.) das Nanopartículas

A metodologia de administração intratecal direta descrita por Papir-Kricheli et al. (Papir-Kricheli et al., 1987) foi ligeiramente modificada, de acordo com trabalho publicado por Mestre et al. (Mestre et al., 1994). Após tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas, os animais eram anestesiados, por via inalatória, induzida por isoflurano (Forane, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.) e posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, para que sua região lombar ficasse hiperfletida. Em seguida, uma agulha para insulina BD *Ultra-Fine® 30U* (29G) contendo nanopartículas de carbono ou veículo (propilenoglicol, Quemis Indústria Química do Brasil Ltda) era inserida no espaço subaracnóide, perfurando a região medial entre as vértebras L4-L5 (± 1) em ângulo de aproximadamente 45°. O volume administrado foi de 20 μ l. A correta localização da punção no espaço subaracnóide pôde ser verificada pela observação de um reflexo na cauda do animal. Após a injeção, a agulha era mantida por alguns segundos em posição antes de sua cuidadosa retirada, para evitar o refluxo da solução injetada.

3.4.2. Administração local Intraplantar (i.pl.) das Nanopartículas

As nanopartículas de carbono foram injetadas na pata traseira direita (PD) dos ratos por meio de uma seringa de insulina (BD *Ultra-Fine® 30U*, agulha 29G) e inseridas no tecido subcutâneo meio da pata, entre as cinco calosidades distais, no mesmo local de aplicação do estímulo mecânico e o veículo (propilenoglicol, Quemis Indústria Química do Brasil Ltda) na pata traseira esquerda (PE) utilizando o mesmo procedimento de aplicação para a PD. Volumes 50 μ L foram administrados (Parada et al., 2003), em uma única dose, sob leve anestesia, por via inalatória, induzida por isoflurano (Forane, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda).

3.5. **Administração de Dexametasona**

Em alguns grupos de animais, 1 hora antes da administração das nanopartículas via intratecal (i.t) foi administrada a droga dexametasona (Dexamethasone, Sigma Aldrich) subcutânea (s.c.).

3.5.1. Administração Subcutânea (s.c.) de Dexametasona

A dexametasona foi injetada no dorso dos ratos por meio de uma agulha hipodérmica 26G, conectada a uma seringa na concentração de 1 mg/mL/kg.

3.6. Testes do limiar nociceptivo mecânico

O uso de filamentos de von Frey (von Frey, 1896) é um método utilizado rotineiramente em procedimentos experimentais para avaliar nocicepção. Esse método foi adaptado para um equipamento eletrônico usado inicialmente em humanos (Jensen et al., 1986) e posteriormente adaptado para ratos (Vivancos et al., 2004). No presente trabalho, os experimentos foram realizados com um analgesímetro eletrônico (EFF 301 Analgesímetro Digital, Insight, Brasil), que consiste em um transdutor de força conectado a um contador digital que expressa força em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,5 gf e este está calibrado para registrar uma força máxima de 150 gf, mantendo a precisão de 0,5 gf até a força de 80 gf. O contato do transdutor de força com a pata é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5mm de diâmetro adaptada ao transdutor. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, medindo 12x20x17 cm cujo assoalho consiste de uma rede de malha igual a 5 mm², constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura. Os ratos permaneceram nas caixas durante 15 minutos para habituação antes do início do teste comportamental. Espelhos ficam posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais.

O experimentador aplica, por entre as malhas da rede, uma força linearmente crescente no centro da superfície plantar da pata do rato até que o animal retirasse reflexamente a pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral, até que o animal apresentasse 3 medidas consecutivas similares.

O limiar mecânico de retirada da pata expresso em gramas (grama-força) foi medido no tempo 0 hora (antes da administração das nanopartículas ou veículos, o que se denominou de resposta basal) e em cinco tempos diferentes

após a administração das nanopartículas ou veículos: 15, 30, 60, 180 minutos e 72 horas.

3.7. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa *Graph Pad Prism 4.0* e os resultados foram representados como a média \pm erro padrão da média em grupos de 5 a 10 ratos Wistar. As diferenças entre os grupos experimentais foram comparadas utilizando-se a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*) e duas vias (*two-way ANOVA*). Em seguida, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Bonferroni para se obter comparações pareadas. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das Nanopartículas de Carbono

4.1.1. Nanotubos de Carbono

Como mostrado na figura 2, os nanotubos apresentaram um espectro de Raman típico. O espectro pode ser dividido em regiões de frequência de primeira e segunda ordem. Na região de primeira ordem aparecem dois picos intensos em 1325 cm^{-1} e 1591 cm^{-1} , correspondentes ao pico de desordem sp^2 (linha D) e ao pico de grafite altamente orientada E_{2g} (linha G). Na região de segunda ordem, há um pico intenso em 2648 cm^{-1} que corresponde a segunda ordem da linha D ($2 \times D$), um pequeno pico em torno de 2915 cm^{-1} , que corresponde a soma das frequências das linhas D e G ($D + G$), e outro pico de menor intensidade em torno de 3215 cm^{-1} , que corresponde a segunda ordem da linha G ($2 \times G$). A intensidade do pico D é maior quando comparada à intensidade do pico G correspondente, o que não indica um alto grau de ordem C-C sp^2 , correspondendo aos espectros Raman de nanotubos de carbono desordenados de paredes múltiplas.

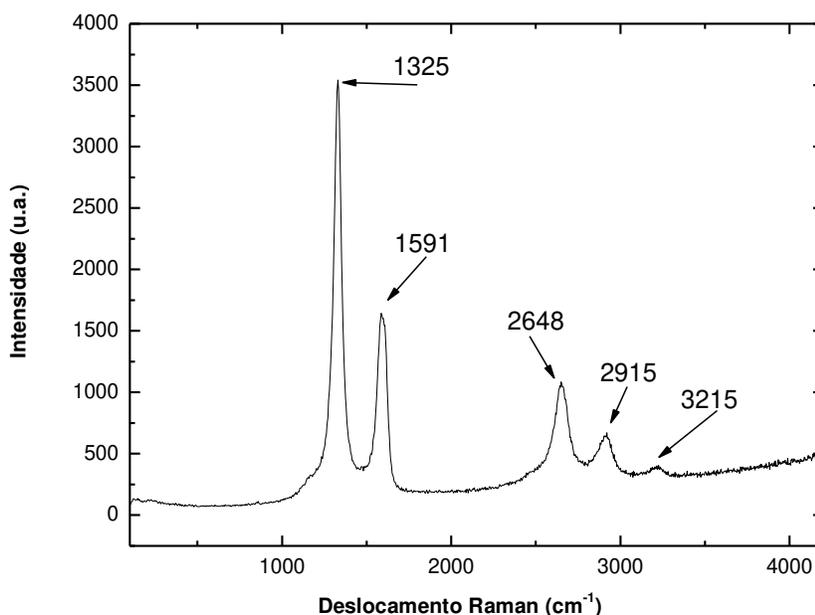


Figura 2: Espectro de Raman dos Nanotubos (NT).

Na figura 3, é apresentada uma imagem de microscopia eletrônica de varredura (FESEM – field emission scanning electron microscope) e na figura 4 uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM - high-resolution transmission electron microscopy) das amostras de NT.

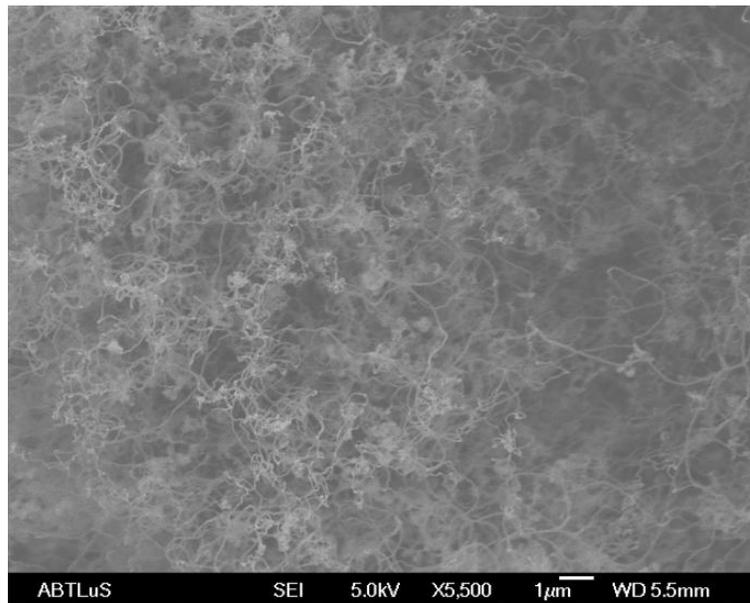


Figura 3: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (FESEM) dos Nanotubos (NT).

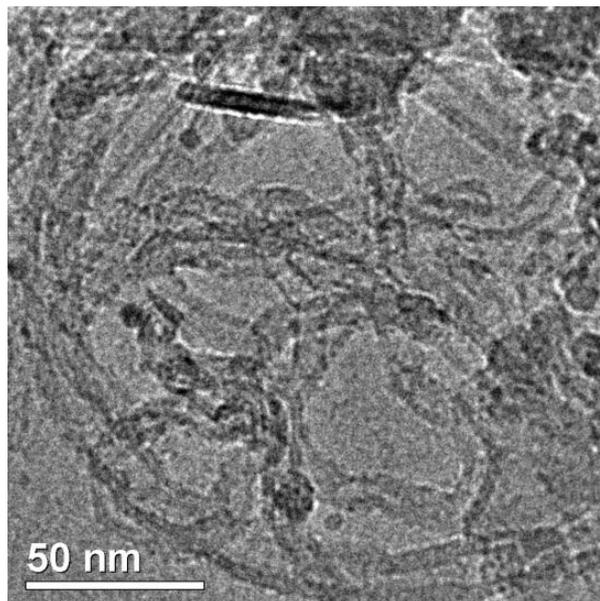


Figura 4: Imagem microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) dos Nanotubos (NT).

Observando as imagens 3 e 4, é possível analisar que as amostras consistem de estruturas tubulares não-alinhadas com aglomerações emaranhadas que cobrem a superfície do substrato, sendo imagens típicas de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT). A ocorrência das linhas paralelas escuras nas imagens de HRTEM se deve à interação perpendicular do feixe de elétrons com o MWCNT.

4.1.2. Nanofibras de Carbono

Como demonstrado na figura 5 as nanofibras (NF) apresentaram um espectro de Raman típico. Analisando o espectro de Raman para os NT (figura 2) pode se constatar que esses se assemelham ao espectro de Raman para as NF nos picos de primeira ordem, tendo em vista que para as NF os dois picos mais intensos aparecem em 1326 cm^{-1} e 1586 cm^{-1} , demonstrando que se tratam dos mesmos hidrocarbonetos (cânfora e a acetona). Cumpre salientar que os espectros Raman de todos os materiais carbonosos exibem picos característicos na região entre 1000 e 1800 cm^{-1} . (Lobo et al., 2005).

Na região de segunda ordem, também existe uma semelhança dos espectros de Raman dos NT e das NF, para as NF há um pico intenso em 2650 cm^{-1} e um pequeno pico em torno de 2894 cm^{-1} , portanto, apresentando somente a segunda ordem da linha D e a soma das frequências das linhas D e G (D + G), respectivamente. Devido, ao eixo das abscissas mostrarem somente até o valor de 3000 cm^{-1} , o terceiro pico de menor intensidade que corresponderia à segunda ordem da linha G, não pode ser visualizado. No entanto, o espectro Raman visualizado na figura 5 corresponde a um espectro típico de nanofibras de carbono.

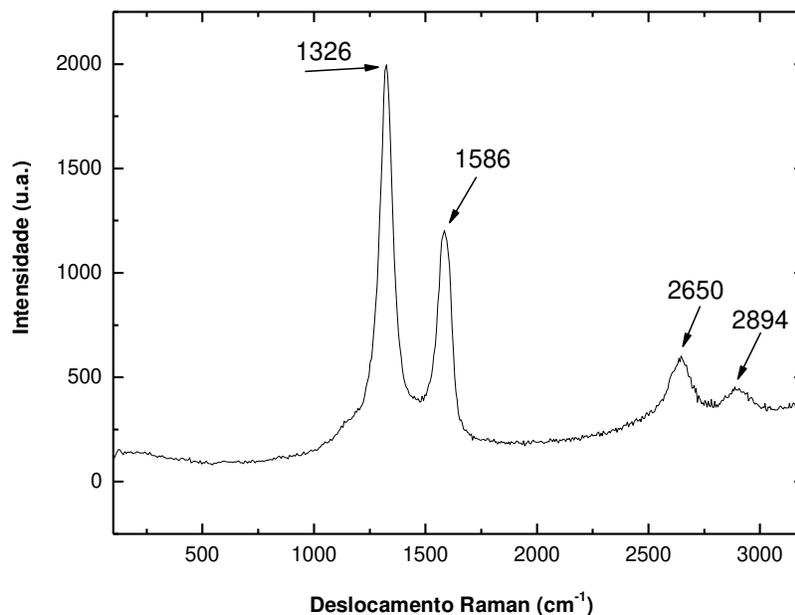


Figura 5: Espectro de Raman da Nanofibras (NF).

Na figura 6, é apresentada uma imagem de microscopia eletrônica de varredura (FESEM – field emission scanning electron microscope) e na figura 7 uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM - high-resolution transmission electron microscopy) das amostras de NF.

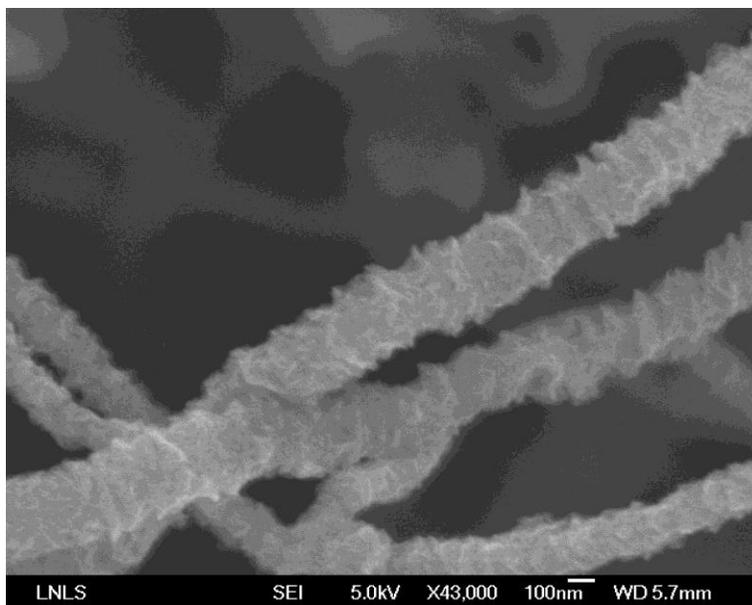


Figura 6: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (FESEM) da Nanofibras (NF).

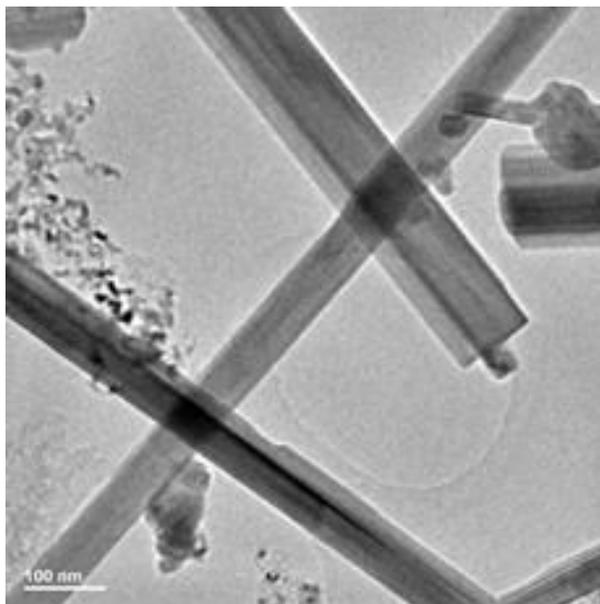


Figura 7: Imagem microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) das Nanofibras (NF).

Observando as imagens 6 e 7, é possível analisar que as amostras consistem de estruturas tubulares de uma única camada, numa estrutura cristalina e crescem formando fibras. Diferindo da estrutura dos nanotubos visualizados nas figuras 3 e 4, que se tratam de estruturas tubulares concêntricas de múltiplas camadas (paredes).

4.2. Avaliação das Propriedades Magnéticas de Nanopartículas de Carbono

4.2.1. Nanotubos de Carbono

As medidas de magnetização (\vec{M}) em função do campo magnético externo aplicado (\vec{H}) e da temperatura (T), foram realizadas nas amostras de nanotubos de carbono, na temperatura $T = 300 K$ e campo magnético aplicado de 5 T (tesla), utilizando o magnetômetro comercial SQUID MPMS5 da Quantum Design.

A figura 8 mostra a curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para a amostra de nanotubo (NT).

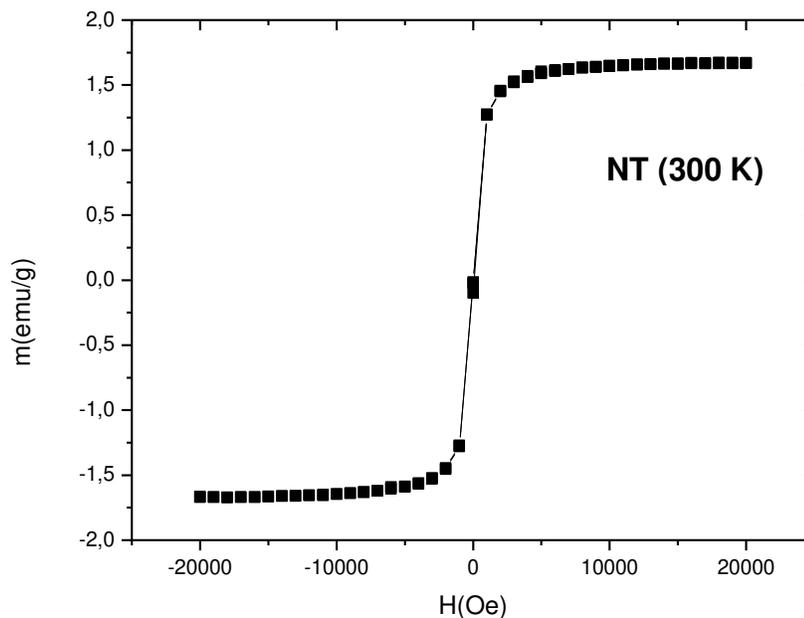


Figura 8: Ciclo de histerese magnética para a amostra de NT para $T = 300K$, onde claramente se observa o comportamento ferromagnético com grande magnitude da amostra de NT.

Desta figura observa-se de forma evidente um comportamento ferromagnético para $T = 300K$ e $H = 20000Oe$, uma magnetização extremamente alta, aproximadamente de 1.75 emu/g .

Da análise do gráfico, observa-se que o comportamento ferromagnético está presente na temperatura $T = 300K$, portanto, concluí-se que a ponto de Curie (T_c) é maior que a temperatura ambiente, que normalmente está em torno de $25^\circ C$, ou seja, aproximadamente $298K$. Considerando, a temperatura corporal de um rato em torno de $37^\circ C$ ($310K$), pois os nanotubos de carbono foram administrados intratecal e intraplantar nestes animais, têm-se que estes nanotubos ainda apresentarão um comportamento ferromagnético, de forma muito próxima a magnetização observada para $T = 300K$.

4.2.2. Nanofibras de Carbono

Foram também realizadas medidas de magnetização (\vec{M}) em função do campo magnético externo aplicado (\vec{H}) e da temperatura (T), nas amostras de nanofibras de carbono, em $T = 300 K$ e campo magnético aplicado de 5 T (tesla), utilizando o magnetômetro comercial SQUID MPMS5 da Quantum Design.

A temperatura de $T = 300 K$ foi escolhida uma vez, que se encontra próxima da temperatura ambiente ($T = 298 K$) e da corporal dos animais foco deste estudo que esta em torno de $T = 310 K$, portanto, o comportamento fornecido pela curva de magnetização em função do campo magnético aplicado para a amostra de nanofibra (NF), observado na figura 9, se aproxima do comportamento magnético que ocorrerá em torno da temperatura ambiente e da corporal dos animais estudados.

Como observado na figura 9, as NF não apresentam um comportamento ferromagnético de forma tão evidente para $T = 300K$ como o obtido para a amostra de NT (figura 8), pois a magnitude da magnetização foi aproximadamente de 0.125 emu/g no ponto onde $H = -20000e$, menor que a observada para a amostra de NT. A curva apresentada na figura 9, não é característica para materiais que apresentam comportamentos ferromagnéticos típicos. Comparando a figura 9 com a figura 8, observa-se um formato distinto entre as curvas.

Assim sendo, as NF estudadas neste trabalho apresentam uma magnitude do comportamento ferromagnético menor do que a observada para as amostras NT, apesar de possuírem a mesma estrutura molecular, como demonstrado pelo espectro de Raman (figuras 2 e 5), uma vez que os hidrocarbonetos utilizados como substrato foram os mesmos (cânfora e a acetona). No entanto, é importante salientar que os NT foram catalisados por Ni , um material ferromagnético (Maignan et al., 2006), diferentemente das NF que não foram catalisadas.

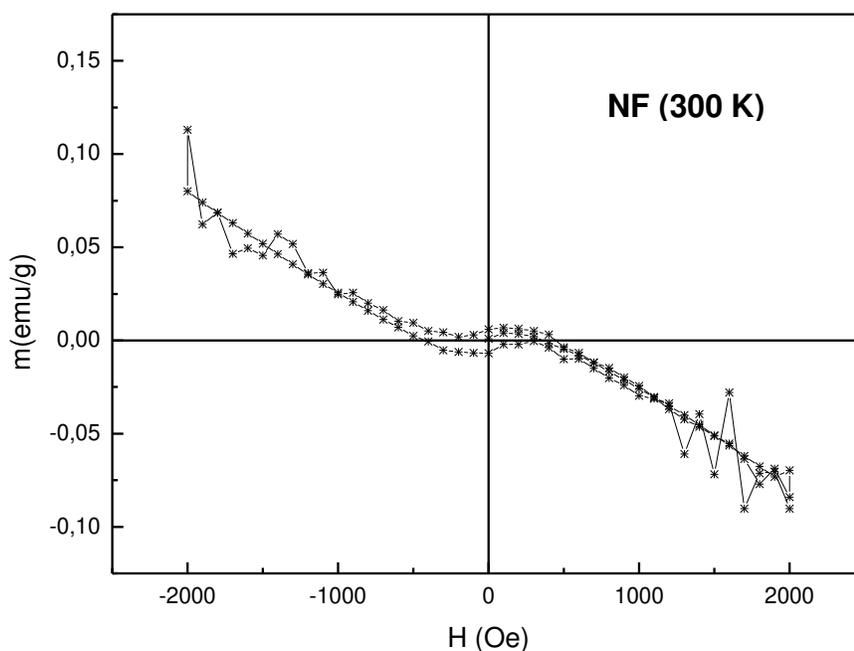


Figura 9: Ciclo de histerese magnética para a amostra de NF para T = 300K, onde o comportamento ferromagnético não se mostra tão evidente quanto que para a amostra de NT.

Tendo em vista os resultados apresentados através das curvas de histerese que caracterizaram o comportamento magnético das nanopartículas, estas podem ser classificadas em: alto magnetismo (HMN – *high magnetic nanoparticles*) e baixo magnetismo (LMN – *low magnetic nanoparticles*), sendo estes comportamentos, respectivamente, encontrado nos nanotubos e nanofibras utilizadas neste trabalho.

Desta maneira, nas próximas seções, serão empregados estes termos HMN e LMN para distinguir as nanopartículas, uma vez, que é a propriedade magnética que as difere.

4.3. Avaliação do limiar de Resposta Comportamental ao Estímulo Mecânico após Administração Intratecal (i.t.) das Nanopartículas

Como demonstrado na figura 10 painel A, a administração intratecal de nanopartículas com alto magnetismo (HMN – *high magnetic nanoparticles*), nas doses de 5, 20 e 80 µg, diminui o limiar de resposta de retirada da pata ao estímulo mecânico, verificado 15 minutos após a administração. Embora a dose de 20 µg e de 5 µg diferissem quanto ao efeito, aparentemente não existe uma relação entre a diminuição do limiar mecânico e a dose de nanopartículas administradas. A administração do veículo (propilenoglicol, 20 µL) não induziu diminuição do limiar mecânico de retirada permanecendo igual à resposta basal (dados não mostrados).

Ao contrário das HMN, a administração intratecal de nanopartículas com baixo magnetismo (LMN – *low magnetic nanoparticles*), nas doses de 5, 20 e 80 µg não alterou o limiar mecânico, quando comparado com a administração do seu veículo (propilenoglicol), analisado no tempo 15 minutos após administração (figura 10 painel B).

Como demonstrado na figura 11, a administração intratecal de 20 µg de HMN reduziu o limiar mecânico de retirada da pata nos tempos de 15, 30 e 60 minutos após a administração, retornando ao seu valor basal 3 horas (180 minutos) após a administração. Em 72 horas, a resposta ao estímulo mecânico de retirada da pata foi novamente medida sendo que os grupos HMN e LMN não diferiam do veículo, os quais não apresentaram diferença com a resposta basal.

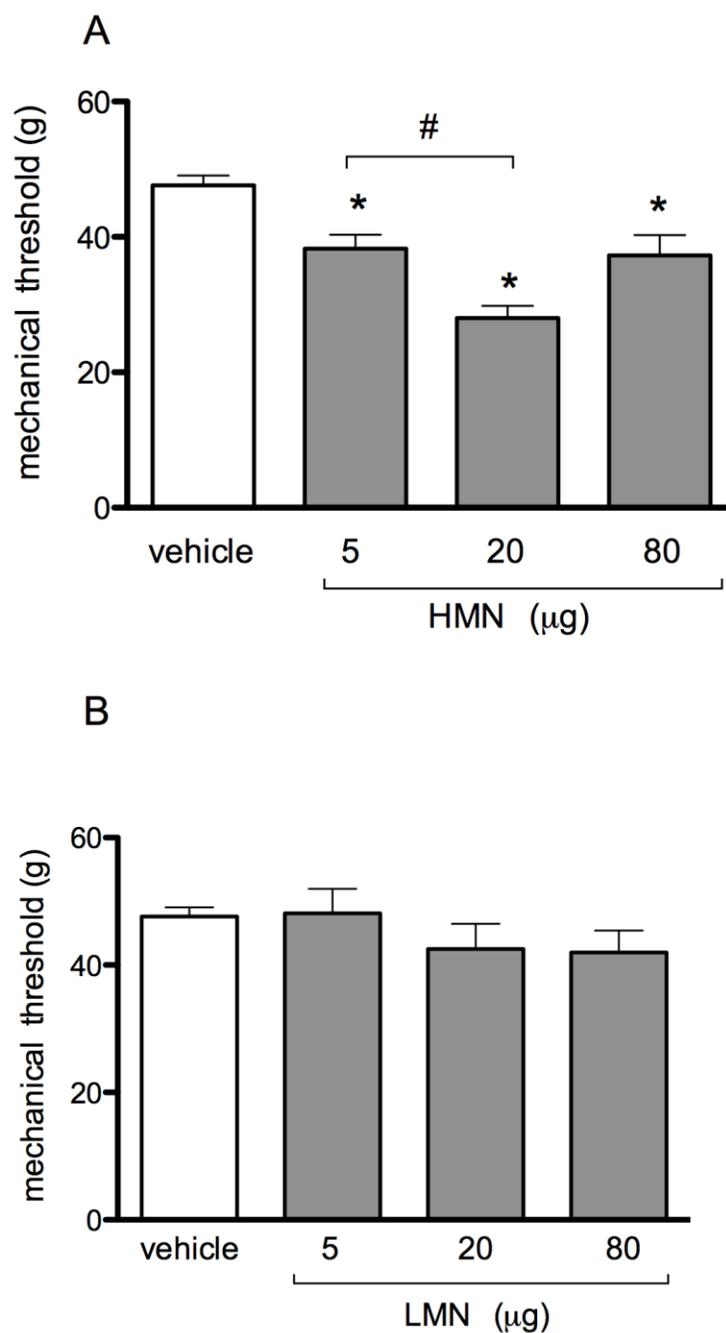


Figura 10: Limiar de resposta de retirada da pata ao estímulo mecânico em função da administração intratecal de high magnetic nanoparticles (HMN; painel A) ou low magnetic nanoparticles (LMN; painel B). A resposta de retirada da pata ao estímulo mecânico foi avaliada 15 minutos após as administrações. As barras representam a média \pm epm. * indicam $p < 0,05$ em relação ao veículo (20 μ L) e # indica $p < 0,05$ entre os grupos de 20 μ g 5 μ g (ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni; n = 5 - 8).

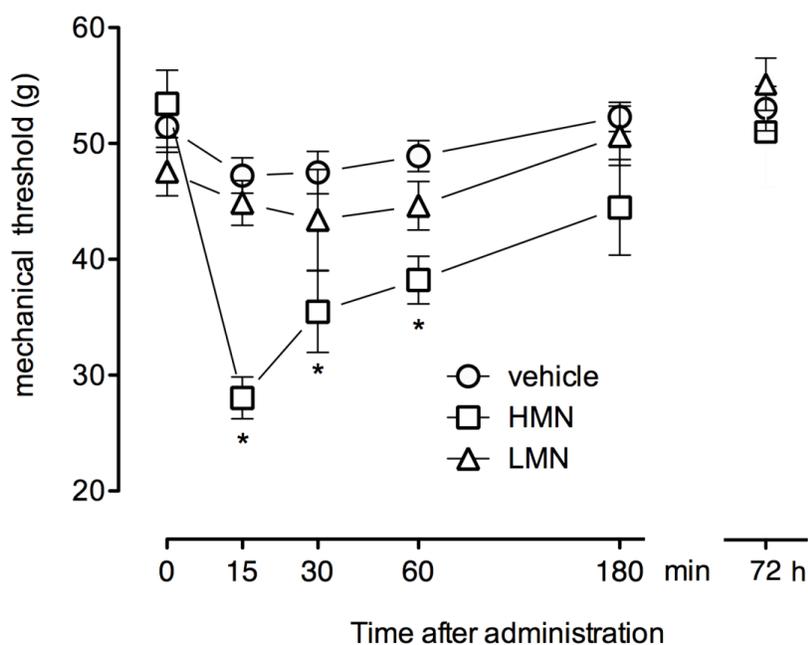


Figura 11: Limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico em função do tempo, após a administração intratecal de HMN (20 μ g), LMN (20 μ g) ou veículo (20 μ L). Os valores estão apresentados em média \pm epm. * indicam $p < 0,05$ em relação ao tempo 0 e ao veículo cujas variáveis se interagem. (ANOVA two-Way, Bonferroni; $n = 5 - 8$).

4.4. Avaliação do limiar de Resposta Comportamental ao Estímulo Mecânico após Administração intraplantar das Nanopartículas

Como mostrado na figura 12, a administração de nanopartículas (20 μ g) no tecido periférico local onde os estímulos mecânicos foram aplicados não induziu alteração do limiar mecânico de retirada em função do tempo (ANOVA two-Way) e quando comparado com a administração do veículo (propilenoglicol, 50 μ L; ANOVA two-Way).

As medidas foram realizadas nos tempos de 15, 30, 60, 180 minutos e 72 horas após a administração intraplantar (i.pl.) das nanopartículas.

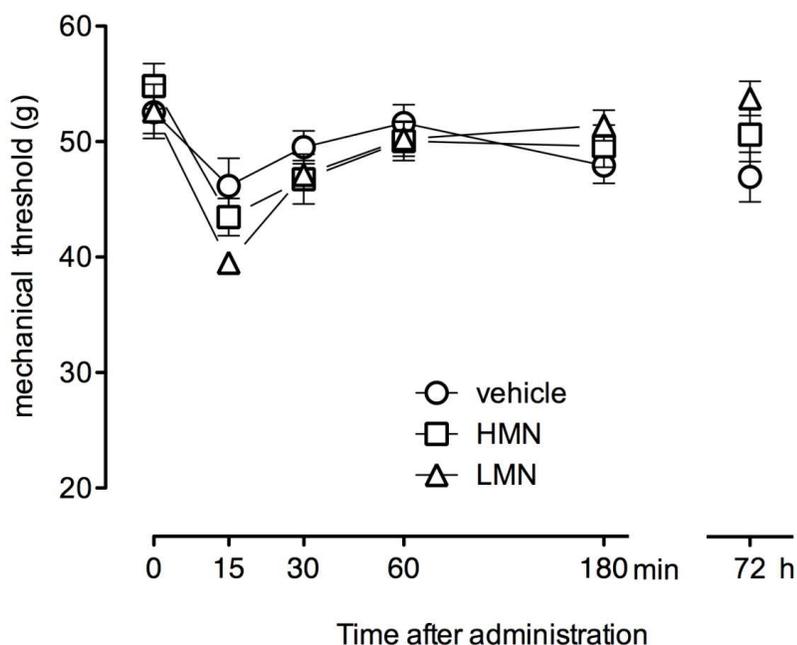


Figura 12: Limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico em função do tempo, após a administração intraplantar de HMN (20 μ g), LMN (20 μ g) ou veículo (50 μ L). Os valores estão apresentados em média \pm epm. Não houve interação entre as variáveis nem diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA two-Way; n = 5 - 8).

4.5. Avaliação do limiar de Resposta Comportamental ao Estímulo Mecânico após Administração subcutânea de Dexametasona e intratecal das Nanopartículas

A figura 13 mostra que a administração subcutânea de dexametasona (DEXA) 1 (uma) hora antes da administração intratecal de 20 μ g de HMN não houve alteração do limiar mecânico de retirada em função do tempo (ANOVA two-Way) quando comparado com a administração do veículo (salina, administração subcutânea 1 (uma) hora antes da administração intratecal de 20 μ g de HMN; ANOVA two-Way). As medidas foram realizadas nos tempos de 15, 30, 60, 180 minutos após a administração intratecal (i.t.) de HMN.

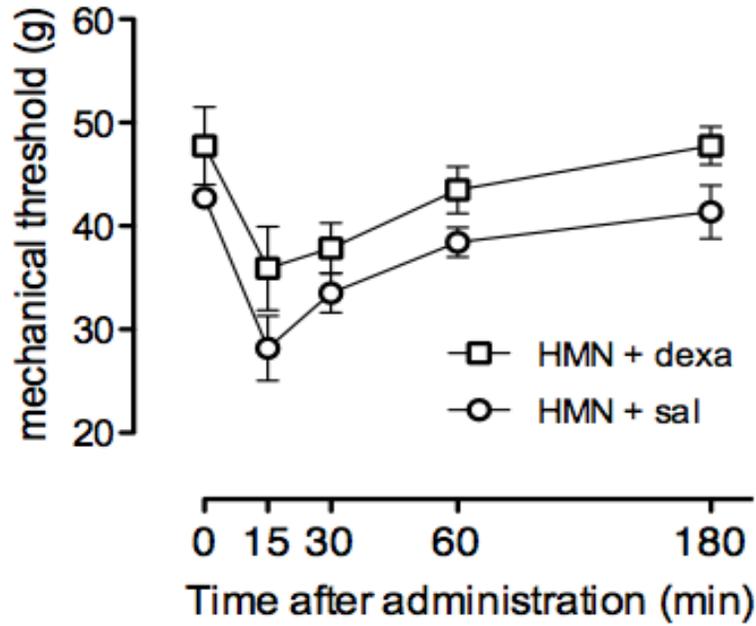


Figura 13: Limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico em função do tempo, após a administração intratecal de HMN (20 μ g) com a administração anterior subcutânea (DEXA ou Salina). Os valores estão apresentados em média \pm epm. Não houve interação entre as variáveis nem diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA two-Way; n = 5 - 8).

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo sugerem fortemente que o componente magnético do campo eletromagnético formado durante a transmissão neuronal provoca uma influência na própria transmissão neuronal, seja no axônio ou na sinapse. Estes dados são reforçados pelo fato da administração local no tecido periférico de nanopartículas magnéticas não exercerem alterações na resposta neuronal frente a estímulos mecânicos. De fato, os dados deste trabalho deixam claro que a administração de nanopartículas de alto magnetismo no espaço subaracnóide diminui o limiar mecânico de retirada da pata.

Os dados deste estudo também explicam os efeitos observados durante a estimulação transcraniana magnética (Cavallo, 2011). No entanto, este tipo de estimulação mostra a atuação de um campo magnético externo na propagação do impulso, e os nossos resultados demonstram pela primeira vez, a interferência na propagação de um impulso nervoso de um campo magnético interno, através da administração de nanopartículas de alto magnetismo

Neste estudo foram utilizados dois tipos de nanopartículas, os nanotubos de carbono (NT) e as nanofibras (NF). As informações químicas e estruturais destas substâncias foram fornecidas pelo espectro de Raman, devido a semelhança dos seus espectros nos primeiros picos (veja figuras 2 e 5), pode-se concluir que são compostas pelas mesmos elementos químicos, pois as fontes para o crescimento destas nanopartículas são os mesmos, ou seja, cânfora e acetona (Ceragioli et al.,2008).

No entanto, nos demais picos restantes do espectro de Raman não são observados uma coincidência como a obtida para os picos de maior magnitude, o que demonstra que a agregação dos elementos químicos constituintes destas substâncias ocorre de maneira distinta. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (FESEM) e transmissão de alta resolução (HRTEM) demonstram que os nanotubos e as nanofibras se agregam de modo distinto. Os nanotubos se agregam de modo a formar túbulos concêntricos de parede múltipla (multi wall, MWCNT), constituídos por duas ou mais camadas simples de cilindros coaxiais.

Enquanto que as nanofibras se associam de modo a formar nanofilamentos. Ainda, a análise pelo espectro de Raman, permitiu concluir que não há grupos funcionais distintos entre as nanopartículas, estas são constituídas pelos mesmos elementos químicos, alterando somente sua estrutura para a formação em nanotubos ou nanofilamentos. Portanto é muito improvável que as alterações no limiar mecânico observadas neste estudo, devam-se à configuração estrutural das nanopartículas. Desta maneira, parece plausível concluir que a propriedade ferromagnética é a principal diferença entre as nanopartículas utilizadas neste estudo.

Para avaliar o comportamento magnético dos nanotubos e das nanofibras foi utilizada a curva de histerese magnética. A histerese apresentada pelo nanotubo foi tipicamente de um material ferromagnético, com uma magnetização alta de aproximadamente de 1.75 emu/g para $T = 300\text{K}$ e $H = 20000\text{Oe}$. (Asano et.al, 2010). Por outro lado, as nanofibras embora não apresentassem um comportamento ferromagnético nulo, estas possuíam uma magnetização muito inferior aos nanotubos, ao redor de 0.125 emu/g para $T = 300\text{K}$ e $H = -20000\text{Oe}$.

A diferença no comportamento magnético entre estas duas nanopartículas provavelmente ocorre devido à forma em que são produzidas. Os nanotubos são catalisados por níquel que é um notável material ferromagnético, enquanto as nanofibras não são catalisadas por nenhum organometálico.

Baseado nos dados da histerese pode-se dizer que os nanotubos usados neste estudo possuem uma magnetização mais característica ferromagnética quando comparado com as nanofibras usadas neste estudo, pois uma pequena variação no campo magnético é possível causar uma grande variação na magnetização dos nanotubos, diferentemente do observado nas nanofibras, em que na curva de histerese sua inclinação é menor, denotando que é necessária uma grande variação no campo magnético para se obter uma pequena variação na magnetização. Portanto, devido às diferenças das nanopartículas em relação ao comportamento ferromagnético, estas foram classificadas em alto magnetismo (HMN – *high magnetic nanoparticles*) e baixo magnetismo (LMN – *low magnetic nanoparticles*), sendo estes comportamentos, respectivamente, encontrado nos

nanotubos e nanofibras. É importante salientar ainda que, independente da importância de se estudar o comportamento biológico das nanopartículas, neste estudo estas foram utilizadas como uma ferramenta por apresentarem comportamentos ferromagnéticos distintos.

É importante ressaltar também que as medidas do comportamento magnético levaram em conta a temperatura corporal média de ratos.

Neste estudo não foi realizado testes de biocompatibilidade das nanopartículas utilizadas, no entanto, o fato do limiar mecânico das patas de ratos tratados com nanopartículas retomarem os mesmos valores basais 72 horas após a administração, sugere que as nanopartículas não produziram nenhum efeito tóxico que pudesse refletir na resposta neuronal.

Muitos trabalhos têm sido realizados com relação à biocompatibilidade das nanopartículas de carbono (Mitchell et al., 2007; Smart et al., 2006; Zhou et al., 2009). Estes estudos, porém, divergem quanto à sua toxicidade. Vários fatores podem influenciar diretamente na resposta do organismo frente à nanopartículas, como o tamanho, a solubilidade, a via de administração, concentração e a dose (Foldvari; Bagonluri, 2008; Zolnik et al., 2010). Como estes estudos geralmente divergem em relação aos parâmetros citados, é difícil a comparação dos resultados.

A instilação traqueal de nanotubos de carbono parece induzir aumento de citocinas pró-inflamatórias e de células B um dia após a administração (Park et al, 2009). Também foi demonstrado um aumento da proliferação dos linfócitos T após a administração *in vivo* de nanotubos (Grecco et al., 2009). Por outro lado, foi demonstrado que o efeito cumulativo de nanotubos de carbono em células epiteliais pulmonares não induzem morte celular, mesmo depois da exposição às altas doses (Thurnherr et al., 2010). Outros trabalhos demonstraram que nanotubos de carbonos podem ser fagocitados sem induzirem a produção de citocinas (Kateb et al. 2007). Também em células apresentadoras de antígeno, tais como macrófagos e células dendríticas, nanopartículas de carbono não apresentam nenhum comportamento tóxico significativo (Palomaki et al. 2010). Por não haver um efeito inflamatório evidente das nanoestruturas de carbono, a

maioria dos autores aposta em um potencial para serem utilizadas como carreadoras de substâncias nos sistemas biológicos (Bianco et al., 2005a; Liu et al., 2008; Chaudhuri et al., 2010).

É importante salientar que as nanopartículas utilizadas neste trabalho não são comerciais e sim produzidas com fins experimentais, em particular os nanotubos de carbono ferromagnético, o qual foi produzido para este estudo. Embora a toxicidade destas nanopartículas ainda seja um assunto controverso, estudos realizados com as mesmas nanopartículas utilizadas neste trabalho demonstraram que mesmo após 48 horas de exposição dos macrófagos aos nanotubos não foi detectada apoptose (dados ainda não publicados). Além destes dados, o fato da administração destas nanopartículas no tecido periférico não alterarem o limiar mecânico de resposta de retirada da pata indica que não ocorreu neste tecido nenhum processo inflamatório, pois se assim fosse ocorreria uma diminuição do limiar mecânico (Parada et al., 2003). Contudo, deverão ser realizados ainda experimentos para demonstrar que a diminuição do limiar mecânico de retirada da pata observado após a administração intratecal de nanopartículas com alto magnetismo não se deve a uma sensibilização dos nociceptores devido à liberação de mediadores inflamatórios no tecido neuronal (Parada et al., 2003).

Ainda é importante esclarecer que embora o comportamento de retirada da pata ao estímulo mecânico observado para a administração via intratecal de HMN (*high magnetic nanoparticles*) seja tipicamente nociceptivo, os dados deste trabalho não nos permitem afirmar que a diminuição do limiar mecânico de retirada da pata envolva apenas a via nociceptiva.

Os resultados mostram que o comportamento magnético apresentado pelas nanopartículas interfere na resposta da retirada da pata ao estímulo mecânico, nos tempos de 15, 30 e 60 minutos após a sua administração. Uma vez que este efeito não é decorrente da liberação de mediadores inflamatórios, pois o experimento com a droga Dexametasona, administrada 1 hora antes da administração intratecal de HMN demonstrou que o efeito das HMN permanece,

pois não houve alteração do limiar de retirada de pata quando comparada com a administração de salina 1 hora antes da administração intratecal de HMN.

Outro efeito pouco provável seria um efeito neuropático das nanopartículas ferromagnéticas, pois este provavelmente não seria um efeito exclusivo do comportamento magnético das nanopartículas, uma vez que as nanopartículas com pouco ferromagnetismo não produziram nenhuma alteração no limiar mecânico da pata de ratos.

Embora a diminuição do limiar mecânico não seja resultado de uma sensibilização de origem inflamatória e seja improvável ser de origem neuropática, como já mencionado anteriormente, a diminuição do limiar mecânico determinando um estado de hiperalgesia é uma característica dos estados inflamatórios. Porém, dois dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória poderiam, de certa forma, estar envolvidos na ação magnética das nanopartículas: **1.** Aumento da excitabilidade neuronal, no caso da hiperalgesia inflamatória devido aumento da expressão dos canais de sódio dependente de voltagem $Na_v1.8$ (Parada et al., 2003; Villarreal et al., 2009) e **2.** Aumento da liberação do neurotransmissor glutamato pelo neurônio sensorial primário e conseqüente ativação dos receptores de NMDA (Parada et al., 2003). Sendo assim, baseado nos dados obtidos neste estudo, a hipótese mais provável é que o campo magnético dinâmico formado com a administração de nanopartículas ferromagnéticas e a corrente iônica durante a transmissão neuronal interfere com a atividade dos canais iônicos dependentes de voltagem, sobretudo os canais de sódio $Na_v1.8$ e os canais de cálcio nas sinapses. Estes últimos responsáveis pelo influxo de cálcio e liberação de glutamato (Choi et. al, 2011; Tumati et.al, 2011). A facilitação na abertura destes canais leva a um aumento da excitabilidade neuronal e conseqüentemente a uma diminuição do limiar mecânico de retirada da pata que corresponde clinicamente ao sinal de hiperalgesia. Embora este estudo verifique a resposta a estímulos mecânicos nociceptivos, é provável que a resposta a outros estímulos como térmico e químico também estejam alteradas (Bucher; Goillard, 2011). A percepção mecânica não nociceptiva também poderia sofrer alterações e desconforto, porém

o processo de adaptação dos receptores mecânicos provavelmente não foi alterada (assunto revisado por Riedel; Neeck, 2001; Miranda et al. 2011).

Estudos eletrofisiológicos deverão ser realizados para a melhor compreensão deste fenômeno. Porém deveremos ainda realizar experimentos para demonstrarmos a participação dos receptores de NMDA nesta hiperalgesia induzida por nanopartículas magnéticas e experimentos medindo o influxo de cálcio em cultura de neurônios do GRD despolarizados com administração de potássio no meio.

É importante também ressaltar que não foi observado neste estudo um comportamento nociceptivo evidente após a administração de nanopartículas, demonstrando que estas não estimulam as vias nociceptivas, ou seja, não induzem abertura de canais de sódio, de forma direta. Este dado é compatível com o fato das nanopartículas ferromagnéticas não induzirem a formação de um campo magnético dinâmico sem que haja corrente iônica. Portanto o efeito das nanopartículas ferromagnéticas apenas seria evidente ao ser aplicado um estímulo neuronal, no caso mecânico, que deflagrasse um potencial de ação na fibra neuronal. Sendo assim, o fenômeno observado foi uma diminuição do limiar mecânico (Parada et. al, 2003).

Em outras palavras, os resultados apresentados materializam o fato de que a presença das nanopartículas com alto magnetismo (HMN) no espaço subaracnóide interfere agudamente no comportamento de retirada da pata ao estímulo mecânico, caracterizado eletrofisiologicamente pela diminuição temporária do limiar de excitabilidade da via de condução deste estímulo mecânico, desta forma havendo a facilitação, não necessariamente somente ou exclusivamente pela via nociceptiva.

Esta diminuição do limiar de excitabilidade ocorre de forma temporária, nos primeiros 60 minutos, pois após este período, dados na literatura demonstram que ocorre uma internalização das nanopartículas por macrófagos e células dendríticas (Yang et. al, 2006; Podesta et. al, 2009;. Thurnherr et.al, 2010).

Teoricamente as nanopartículas com alto magnetismo (HMN) administradas no local próximo à propagação de um determinado impulso nervoso (espaço

subaracnóide da medula espinal), podem modificar a disposição de cargas elétricas dos canais voltagens dependentes, inclusive de sódio e cálcio, facilitando a mudança conformacional destes canais voltagens dependentes de sódio (ao longo do axônio) e cálcio (nos terminais pré-sinápticos), permitindo que estes sejam abertos mais facilmente permitindo um maior influxo dos respectivos íons e conseqüentemente uma diminuição do limiar de excitabilidade da membrana nervosa seja ao longo do neurônio ou nos terminais pré-sinápticos, facilitando a liberação do neurotransmissor, assim, caracterizado pela diminuição do limiar mecânico de retirada da pata.

A hipótese da interferência das nanopartículas com alto magnetismo nos canais voltagem dependente se torna plausível do ponto de vista físico, uma vez que potencial de repouso da membrana não é um potencial estático e sim dinâmico, pois é decorrente de vazamento iônicos por canais iônicos que não dependem de voltagem e da atividade constante da bomba de sódio-potássio. Portanto, por definição existe um campo eletromagnético, embora de baixa magnitude, constantemente formado na membrana das células, uma vez que se têm movimentos de cargas elétricas. Este campo eletromagnético se torna mais evidente em células excitáveis, uma vez que os movimentos de cargas elétricas é muito mais intenso devido à formação dos potenciais de ação. Na presença do campo eletromagnético estabelecido pela membrana plasmática as nanopartículas com alto magnetismo, podem interferir nos canais voltagem dependente, uma vez que existe uma relação entre a corrente elétrica e o campo magnético.

Os dados deste estudo sugerem que a propagação do impulso nervoso é um fenômeno eletromagnético, é não apenas elétrico como suposto até então. De certa forma demonstrou-se neste estudo que o componente magnético possui interferência direta transmissão do impulso nervoso, provavelmente porque os canais iônicos voltagem dependentes, na realidade, se abrem devido um campo eletromagnético e não apenas elétrico.

Desta maneira, em resumo, o trabalho aponta que:

- As nanopartículas magnéticas utilizadas no trabalho: nanotubos e nanofibras possuem espectros de Raman muitos parecidos uma vez que são constituídas basicamente pelos mesmos elementos químicos, no entanto, possuem propriedades magnéticas distintas caracterizadas pela curva de histerese magnética, permitindo-o classificá-las em alto magnetismo (*high magnetism nanoparticles* – HMN) e baixo magnetismo (*low magnetism nanoparticles* – LMN), respectivamente, nanotubos e nanofibras;
- A administração intratecal de nanopartículas com alto magnetismo reduz o limiar mecânico de retirada da pata em ratos wistar avaliado pelo método de von Frey eletrônico independente da quantidade administrada;
- A administração intratecal de nanopartículas com baixo magnetismo não alterou o limiar mecânico de retirada da pata em ratos wistar avaliado pelo método de von Frey eletrônico independente da quantidade administrada;
- A administração intraplantar de nanopartículas alto magnetismo ou baixo magnetismo não alterou o limiar mecânico de retirada da pata em ratos wistar avaliado pelo método de von Frey eletrônico;

6. CONCLUSÃO

Os dados deste estudo sugerem a importância do componente magnético do campo eletromagnético na propagação e transmissão do impulso nervoso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASANO H., MURAKI S., ENDO H., BANDOW S., IJIMA S., Strong magnetism observed in carbon nanoparticles produced by the laser vaporization of a carbon pellet in hydrogen-containing Ar balance gas. *J Phys Condens Matter*. Aug 25;22(33):334209. (2010).

ASHCROFT, N. W., MERMIN, N. D., *Solid State Physics*, Saunders College Publishing, Florida (1976).

BALASUBRAMANIAN K, BURGHARD M., Chemically functionalized carbon nanotubes. *Small*. Feb; 1(2):180-92 (2005).

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI A., Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol*, v. 277, p. 302-12, Nov 8, (1988).

BERNE R. M., LEVY M. N., *Physiology*, 3rd ed., 1091 pp. C. V. Mosby, St. Louis. (1993).

BESSON, J. M.; CHAOUCH A., Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*, v. 67, p. 67-186, Jan, (1987).

BIANCO A., KOSTARELOS K., PARTIDOS C. D., PRATO M., Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes. *Chem Commun*. 5:571-577 (2005) b.

BIANCO A., KOSTARELOS K., PRATO M., Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 9:674-679 (2005) a.

BISCHOFBERGER J., ENGEL D., LI L., GEIGER J. R., JONAS P. Patch-clamp recording from mossy fiber terminals in hippocampal slices. *Nat Protoc*.;1(4):2075-81. (2006).

BONICA J. J. Evolution and current status of pain programs. *J Pain Symptom Manage*. (1990)

BUCHER D., GOAILLARD J. M. Beyond faithful conduction: short-term dynamics, neuromodulation, and long-term regulation of spike propagation in the axon. *Prog Neurobiol*. 1;94(4):307-46. (2011)

CALKIN, M. G. Coments on what the eletromagnetic vector potential describes, *American Journal of Physics*, v;47 (1979).

CAVALLO A., BECCHIO C., SARTORI L., BUCCHIONI G., CASTIELLO U. Grasping with Tools: Corticospinal Excitability Reflects Observed Hand Movements. *Cereb Cortex*. (2011).

CERAGIOLI H.J., PETERLEVITZ A.C., QUISPE J.C.R., BARANAUKAS V.,

Synthesis and characterization of boron-doped carbon nanotubes. *Journal of Physics: Conference Series* 100. DOI 10.1088/1742-6596/100/5/052029, (2008).

CHAUDHURI P., SONI S., SENGUPTA S., Single-walled carbon nanotube-conjugated chemotherapy exhibits increased therapeutic index in melanoma. *Nanotechnology*, (2010).

CHOI I. S., CHO J. H., JANG I. S. A receptors inhibit glutamate release in rat medullary dorsal horn neurons. *Neuroreport*. Oct 5;22(14):711-5. (2011)

CULLITY, B. D., *Introduction to Magnetic Materials*, Addison-Wesley Publishing Company (1972).

CURY Y, PICOLO G, GUTIERREZ VP, FERREIRA SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide*. (2011).

DAI H. Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties, *Acc. Chem. Res.* 35 1035–1044 (2002).

DARRIGOL, O., *Electrodynamics from Ampere to Einstein*. Oxford University Press. (2000).

DRESSELHAUS M., DRESSELHAUS G., EKLUND P., SAITO R., Carbon nanotubes. *Phys World*. 33-38, (1998).

EBBSEN T. W., AJAYAN P. M., Large-Scale Synthesis of Carbon Nanotubes. *Nature*, 358, pp. 220-222, (1992).

FERRARI, L.F., Neurônio aferente primário: uma unidade funcional integrando a periferia e a medula espinal. 2004. 113 ff. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós- Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia da Dor e Inflamação) -146. Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (2004).

FOLDVARI M., BAGONLURI M., Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. pharmaceutical properties. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. (4): 173-182 (2008).

FOUST A. J., YU Y., POPOVIC M., ZECEVIC D., MCCORMICK D. A. Somatic membrane potential and kv1 channels control spike repolarization in cortical axon collaterals and presynaptic boutons. *J Neurosci*. Oct 26;31(43):15490-8. (2011)

GANONG W. F., *Review of Medical Physiology*, 15th ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. (1991).

GEIGER J. R., JONAS P. Dynamic control of presynaptic Ca(2+) inflow by fast-inactivating K(+) channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*. Dec;28(3):927-39 (2000).

GEISER M., Update on Macrophage Clearance of Inhaled Micro and

Nanoparticles. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*. 23 (2010).

GRECCO, A. C. P., Administração in vivo de Nanotubos de carbono não funcionalizados na resposta de linfócitos T e B. (Dissertação de Mestrado), Campinas. UNICAMP, (2009).

GRIFFITHS, D.J., Introduction to Electrodynamics, 3ª edição, Editora Prentice-Hall, Inc., New Jersey (1999).

HALLIDAY D., RESNICK R., WALKER J., Fundamentos de Física 3: Eletromagnetismo, 4ª Edição, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., (1996).

HODGKIN A. L., HUXLEY A. F., A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *Journal of Physiology*, no. 117, pp.500-544, (1952).

HOWARTH F. C., JACOBSON M., SHAFIULLAH M., JUBISAVLJEVIC M., ADEGHATE E., Heart Rate, Body Temperature and Physical Activity Are Variously Affected During Insulin Treatment in Alloxan-Induced Type Diabetic. *Rat Physiol. Res*. 60: 65-73, (2011).

HUANG, J., ZHUANG, H., LI, W., Synthesis and Characterization of Nano Crystallite BaFe₁₂O₁₉ Powders by Low Temperature Combustion, *Materials Research Bulletin*, v.38, pp. 149 -159, (2003).

IJIMA S., Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*.354: 56-58 (1991).

JENSEN, K., ANDERSEN H. O., OLESEN J., LINDBLOM U., Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. *Pain*, v. 25, p. 313-23, Jun, (1986).

JU, G., HOKFELT T., BRODIN E.; FAHRENKRUG J., FISCHER J. A., FREY P., ELDE R. P., BROWN J. C, Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin generelated peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res*, v. 247, p. 417-31, Feb, (1987).

JULIUS, D.; BASBAUM A. I.. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203-10, Sep 13. n. 6852., (2001).

KAM NW, DAI H. Carbon Nanotubes as intracellular protein transporters: generativity and biological functionality. *J Am Chem Soc*. 127:6021-6026 (2005).

KAM NW, O'CONNELL M, WISDOM JA, DAI H. Carbon nanotubos as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:11600-5 (2005).

KATEB B., VAN HANDEL M., ZHANG L.,BRONIKOWSKI M. J., MANOHARA H., BADIE B., Internalization of MWCNTs by

microglia: Possible application in immunotherapy of brain tumors. *NeuroImage* 37S9-S17 (2007).

KEESER D., MEINDL T., BOR J., PALM U., POGARELL O., MULERT C., BRUNELIN J., MÖLLERH J., REISER M., PADBERG F. Prefrontal Transcranial Direct Current Stimulation Changes Connectivity of Resting-State Networks during fMRI. *J Neurosci.* Oct 26;31(43):15284-93. (2011).

KONG J., CASSELL A. M., DAI H., Chemical vapor deposition of methane for single-walled carbon Nanotubes. *Chemical Physics Letters*, 292: 567-574 (1998).

KOPELEVICH Y., DA SILVA, R. R., TORRES J. H. S., PENICAUD A.; Local Ferromagnetism in Microporous Carbon with the Structural Regularity of Zeolite Y, *Physical Review B* (2003).

KURBEL S. Donnan effect on chloride ion distribution as a determinant of body fluid composition that allows action potentials to spread via fast sodium channels. *Theor Biol Med Model.* May 30;8:16. (2011)

LAI, H. C., JAN, L. Y. The Distribution and Targeting of Neuronal Voltage-Gated Ion Channels, *Nature Neuroscience*, Vol. 7, pp 548-562. (2006)

LANDAU, L. D., LIFSHITZ, E. M., *Electrodynamics of Continuous Media*, Pergamon London (1960).

LIU Z., CHEN K., DAVIS C., SHERLOCK S., CAO Q., CHEN X., DAI H., Drug Delivery with Carbon Nanotubes for In vivo Cancer Treatment. *Cancer Res.* August; 68 (16) (2008).

LOBO A. O., MARTIN A. A., ANTUNES E. F., TRAVA-AIROLDI V. J., CORAT E. J., Caracterização de materiais carbonosos por Espectroscopia Raman. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*, v. 24, n. 2, 98-103, (2005).

MAIGNAN, A., HEBERT, S., NGUYEN, N., PRALONG, V., PELLOQUIN, D., CAIGNAERT, V., The SrCo_{1-y}MnyO_{3-d} oxygen deficient perovskite: Competition between ferro and antiferromagnetism, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol.303 197-203. (2006).

MALMIVUO, J., PLONSEY, R., *Bioelectromagnetism: Principles and applications of bioelectric and biomagnetic Fields.* Oxford University Press, (1995).

MAXWELL, J. C. *A treatise on electricity and magnetism.* New York: Dover, (1954).

MAXWELL, J. C. On Faraday's lines of force. *Cambridge Philosophical Transactions.* V.10. p.27-83 (1956).

MELECHKO AV, KLEIN K L, FOWLKES J D, HENSLEY DK, MERKULOV, IA, KNIGHT TE, RACK PD, HORTON JA, SIMPSON, ML. Control of carbon nanostructure: From

nanofiber toward nanotube and back. *J. Appl. Phys.* 102, 074314 (2007).

MENDELEEV, D. I., KOROLEVA, L. I., KHAPAEVA, T. M., Superconductivity, antiferromagnetism and ferromagnetism in periodic table of, *Physics Letter A* 371, 165-171 (2007).

MENDOZA M., MUÑOZ J. D. Three-dimensional lattice Boltzmann model for electrostatics. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* Nov;82(5 Pt 2):056708. Epub 2010 Nov 9. (2010).

MESTRE, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, v.32, n.4, p.197-200, (1994).

MICHAEL, G.J. et al. Nerve growth factor treatment increases Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J Neurosci*, v.17, n.21, p.8476-90, (1997).

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, v. 57, p. 1-164, Jan, (1999).

MILNE, R. J., FOREMAN R. D., GIESLER G. J. JR, WILLIS. W. D., Convergence of cutaneous and pelvic visceral nociceptive inputs onto primate spinothalamic neurons. *Pain*, v. 11, p. 163-83, Oct, (1981).

MIRANDA H. F., NORIEGA V., OLAVARRIA L., ZEPEDA R. J., SIERRALTA F., PRIETO J. C. Antinociception and Anti-Inflammation Induced by Simvastatin in Algesiometric Assays in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00746.x. Jun 23 (2011).

MITCHELL L.A., GAO J., WAL R. V., GIGLIOTTI A., BURCHIEL S. W., MCDONALD J. D., Pulmonary and Systemic Immune Response to Inhaled Multiwalled Carbon Nanotubes. *Toxicological Sciences.* 100 (1): 203-214 (2007).

NICKEL F. T., SEIFERT F., LANZ S., CHRISTIAN MAIHÖFNER. REVIEW Mechanisms of neuropathic pain, *European Neuropsychopharmacology* (2011).

OLIVEIRA I.S., JESUS V.L.B., *Introdução à Física do Estado Sólido*, Editora Livraria da Física, São Paulo (2005).

PALOMAKI J., KARISOLA P., PYLKKANENA L., SAVOLAINENB K, ALENIUSA H., Engineered nanomaterials cause cytotoxicity an activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology.* Jan; 267 (1-3):125-31 (2010).

PAPIR-KRICHELI, D. et al. Behavioural effects of receptor-specific substance P agonists. *Pain*, v.31, n.2, p.263-76, (1987).

PARADA C. A., LUCCARINI P., WODA A. Effect of an NMDA receptor antagonist on the wind-up of neurons in the trigeminal oralis subnucleus. *Brain Res.*;761(2):313-20. (1997)

PARADA C. A., VIVANCOS G. G., TAMBELI C. H., CUNHA F. Q., FERREIRA S. H., Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA* v.100, n.5, p.2923-8, (2003).

PARK E., CHO W., JEONG J., YI J., CHOI K., PARK K., Pro-inflammatory and potential allergic responses resulting from B cell activation in mice treated with multi-walled carbon nanotubes by intratracheal instillation. *Toxicology* 259: 113-121 (2009).

PATLOLLA A, PATLOLLA B, TCHOUNWOU P. Evaluation of cell viability, DNA damage, and cell death in normal human dermal fibroblast cells induced by functionalized multiwalled carbon nanotube. *Mol Cell Biochem.* doi 10.1007/s11010-009-0356-2. December; (2009).

PATTON H. D., FUCHS A. F., HILLE B., SCHER A. M., STEINER R. *Textbook of Physiology*, 21st ed., 1596 pp. W. B. Saunders, Philadelphia. (1989).

PERALTA-VIDEA JR., ZHAO L., LOPEZ-MORENO M.L., ROSA G., HONG J., GARDEA-TORRESDEY J. L., *Nanomaterials and the environment: A review for biennium 2008-2010.* *J. Hazard. Mater.* Doi10.1016/j.jhazmat.2010.11.020. (2010).

PINTO F. M., RAVINA C. G., FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ M., GALLARDO-CASTRO M., CEJUDO-ROMÁN A., CANDENAS L.

Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channels in human sperm. *Reprod Biol Endocrinol.* Jul 16;7:71. (2009)

PIZZARELLI R, CHERUBINI E. Alterations of GABAergic Signaling in Autism Spectrum Disorders. *Hindawi Publishing Corporation Neural Plasticity Volume Review Article ID 297153, DOI:10.1155/2011/297153.* (2011).

PODESTA J. E., AL-JAMAL K. T., HERRERO M. A., TIAN B., ALI-BOUCETTA H., HEGDE V., BIANCO A., PRATO M., KOSTARELOS K. Antitumor activity and prolonged survival by carbon-nanotube-mediated therapeutic siRNA silencing in a human lung xenograft model. *Small.* May;5(10):1176-85 (2009)

POPOV V. N., Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering R.* (43):61-102, (2004).

PRADO, W.A. Medicamentos analgésicos de ação central. In: Graeff, F.G. e Guimarães, F.S. *Fundamentos de Psicofarmacologia.* São Paulo: Atheneu, p. 175-195, (1999).

PRATO M, KOSTARELOS K, BIANCO A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc Chem Res* 41 (1): 60-8 (2008).

O'RAHILLY, A. *Eletromagnetic theory: a critical examination of fundamentals.* New York: Dover Publications, 1965.

- REILLY R. M., Carbon Nanotubes: Potencial Benefits and Risks of Nanotechnology in Nuclear Medicine. *The Journal of Nuclear Medicine*. 48:1039-1042 (2007).
- REISNER E. D. Bionanotecnology Global Prospects. (p. 289-298). Editora CRC Press Taylor & Francis (2009).
- REZENDE S. M., A Física de Materiais e Dispositivos Eletrônicos, Editora da Universidade Federal de Pernambuco, Recife (1996).
- RIEDEL, W.; G. NEECK. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. *Z Rheumatol*, v. 60, p. 404-15, Dec, (2001).
- RUCH T. C., PATTON H. D., Physiology and Biophysics, 20th ed., 1242 pp. W. B. Saunders, Philadelphia. (1982).
- RYDER A. G., Surface enhanced Raman scattering for narcotic detection and applications to chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology*. 9:489-493 (2005).
- SAITO N. et. al, Carbon nanotubes: biomaterial applications. *Chem. Soc. Rev.* 38: 1897-1903. (2009).
- SALEM AK, SEARSON PC, LEONG KW. Multifunctional nanorods for gene delivery. *Nature Mater*, 2: 668-6671 (2003).
- SEMON, M. D; TAYLOR, J. R. Thoughts on the magnetic vector potential. *American Journal of Physics*, (1996)
- SHU Y. Neuronal signaling in central nervous system. *Sheng Li Xue Bao* (2011).
- SHU Y., HASENSTAUB A., DUQUE A., YU Y., MCCORMICK D. A. Modulation of intracortical synaptic potentials by presynaptic somatic membrane potential. *Nature*. Jun 8;441(7094):761-5. (2006).
- SINNECKER, J.P., Materiais Magnéticos Doces e Materiais Ferromagnéticos Amorfos, *Revista Brasileira de Ensino de Física*, vol. 22, nº 3, Setembro, (2000).
- SMART S. K., CASSADY A. I., LU G. Q., MARTIN D. J., The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*. 44: 1034-1047 (2006).
- SMITH, G. D., SECKL J. R., HARMAR A. J., Distribution of neuropeptides in dorsal root ganglia of the rat; substance P, somatostatin and calcitonin gene-related peptide. *Neurosci Lett*, v. 153, p. 5-8, Apr 16, (1993).
- SOUZA FILHO A. G., FAGAN S. B., Funcionalização de nanotubos de carbono. *Quim. Nova*. 30 (7):1695-1703. (2007).
- SPALDIN, N. A., *Magnetic Materials: fundamentals and device applications*. Cambridge University Press. (2003).
- THURNHERR T. et. al, A comparison of acute and long-term effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human lung

and immune cells in vitro. *Toxicol. Lett.* doi 10.1016/j.toxlet.2010.11.012. (2010).

TODAKA, T., KISHINO, T., ENOKIZONO, M., Low Curie temperature material for induction heating self-temperature controlling system, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* vol. 320, e702-e707. (2008).

TRACEY, D. J.; DE BIASI S., PHEND K., RUSTIONI A., Aspartate-like immunoreactivity in primary afferent neurons. *Neuroscience*, v. 40, p. 673-86, (1991).

TRAN PA, ZHANG L, WEBSTER TJ. Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. August; (2009).

TUMATI S., ROESKE W. R., LARGENT-MILNES T. M., VANDERAH T. W., VARGA E. V., Intrathecal PKA-selective siRNA treatment blocks sustained morphine-mediated pain sensitization and antinociceptive tolerance in rats. *J Neurosci Methods*. Jul 15;199(1):62-8 (2011).

VAN EGERAAT J. M., WIKSWO J. P. JR. A model for axonal propagation incorporating both radial and axial ionic transport. *Biophys J*. Apr;64(4):1287-98. (1993)

VILLARREAL C. F., FUNEZ M. I., FIGUEIREDO F., CUNHA F. Q., PARADA C. A., FERREIRA S. H., Acute and persistent nociceptive paw sensitisation in mice: The involvement of distinct signalling pathways. *Revista Life Scienci* (2009).

VIVANCOS G. G., VERRI W. A. JR, CUNHA T. M., SCHIVO I. R., PARADA C. A., CUNHA F. Q., FERREIRA S. H., An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Mar; 37 (3):391-9. (2004).

VON FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. *Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften*, v.23, p.175-266, (1896).

WALKER PL, RAKCSAWSK JF, IMPERIAL, GR. "Carbon formation from carbon monoxide-hydrogen mixtures over iron catalysts. I. properties of carbon formed." *J. Phys. Chem.* 63, 133 (1959).

WIJESINGHE R. S. Magnetic measurements of peripheral nerve function using a neuromagnetic current probe. *Exp Biol Med* (Maywood). Feb;235(2):159-69. Review. (2010).

WLODARSKI, Z., Extraction of hysteresis loops from main magnetization curves, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 15-19. *Modelo Stoner-Wohlfarth-Histerese*, vol.308, 15-19, (2007).

WU W, XIAO XH, ZHANG SF, PENG TC, ZHOU J, REN F, JIANG CZ. Synthesis and Magnetic Properties of Maghemite (γ -Fe₂O₃) Short-Nanotubes. *Nanoscale Res Lett* 5:1474–1479 DOI 10.1007/s11671-010-9664-4. (2010).

YACAMÁN MJ, YOSHIDA MM, RENDÓN L, SANTIESTEBAN JG. Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure. *Appl. Phys. Lett.* 62, 202–204 (1993).

YANG, R. et. al, Single-walled carbon nanotubes-mediated in vivo and in vitro delivery of siRNA into antigen-presenting cells. *Gene Therapy.*13: 1714-1723. (2006).

ZHANG Z. J, WEI B. Q., RAMANATH G., AJAYAN P. M., Substrate-site selective growth of aligned carbon nanotubes. *Appl. Phys. Lett* 77:3764-3766. (2000).

ZHOU J.,DING T., PAN W., ZHU L. Y., LI L., ZHENG L., Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int. J. Cancer.* 125(7): 1640-1648 (2009).

ZOLNIK B. S., GONZÁLEZ-FERNÁNDES A., SADRIEH N., DOBROVOLSKAIA M. A., Minireview: Nanoparticles and Immune System. *Endocrinology.* February; 151 (2) (2010).

8. ANEXOS

8.1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

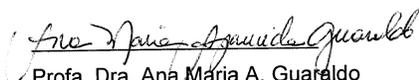
CERTIFICADO

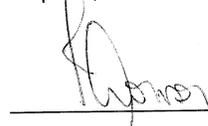
Certificamos que o Protocolo nº 2292-1, sobre "Efeitos Biológicos de Nanotubos Paramagnéticos na Via Nociceptiva em ratos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada / Priscila Amaral Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 08 de novembro de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2292-1, entitled "_____", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on November 8, 2010.

Campinas, 08 de novembro de 2010.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

8.2. Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada **INTERFERÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ADMINISTRADAS NA MEDULA ESPINAL NA RESPOSTA COMPORTAMENTAL A UM ESTÍMULO MECÂNICO**

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

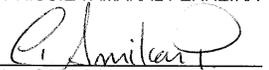
() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. **2292-1**, Instituição:
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: PRISCILA AMARAL FERREIRA


Orientador: CARLOS AMILCAR PARADA

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
(X) Deferido () Indeferido


Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP