

**AValiação DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE UM COMPLEXO BIOPOLIMERO-  
MAGNÉTICO-QUIMIOTERÁPICO PÓS ADSORÇÃO****Franciane Batista Nunes<sup>1</sup>; Franciele da Silva Bruckmann<sup>2</sup>, Ivana Zanella<sup>3</sup>,  
Cristiano Rodrigo Bohn Rhoden<sup>4\*</sup>****RESUMO**

O metotrexato é amplamente empregado como agente quimioterápico no tratamento do câncer. Todavia sua elevada excreção na forma inalterada colabora para a sua liberação exacerbada no meio ambiente, promovendo em última análise a contaminação aquática. A adsorção de contaminantes por meio do uso de quitosana magnética (CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) é uma alternativa que atende as demandas à remoção de poluentes de recursos hídricos. Em razão dos excelentes resultados obtidos para adsorção de MTX em CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade biológica *in vitro* do complexo MTX/CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por meio dos ensaios do MTT, e LDH em células tumorais de melanoma humano e células de fibroblastos de camundongos. De acordo com os resultados obtidos o complexo apresenta maior biocompatibilidade que o MTX livre. Em relação a atividade antitumoral, evidenciou-se que o complexo é mais citotóxico que o MTX livre, possibilitando que estudos futuros explorem essa atividade frente outras linhagens.

**Palavras-chave:** quimioterápicos, nanoadsorventes magnéticos, contaminação aquática.

**Eixo Temático:** Tecnologia, Inovação e desenvolvimento Sustentável (TIDS).

<sup>1</sup> Universidade Franciscana [batistanunesfranciane@gmail.com](mailto:batistanunesfranciane@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria [francielebruckmann2@gmail.com](mailto:francielebruckmann2@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Franciscana [ivanazanella@gmail.com](mailto:ivanazanella@gmail.com)

<sup>4\*</sup> Universidade Franciscana [cristianorbr@gmail.com](mailto:cristianorbr@gmail.com)

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos recursos hídricos, em decorrência da ampla utilização de compostos classificados como contaminantes de preocupação emergente, são um problema ambiental, atualmente. Dentre as substâncias contempladas nessa classe estão os medicamentos, pesticidas, metais pesados e compostos orgânicos aromáticos (ŠKUFCA *et al.*, 2021). A exposição a estes contaminantes pode desencadear problemas fisiológicos ao ser humano como mutações gênicas, distúrbios no sistema reprodutor, resistência a terapias antimicrobianas, câncer e inflamações (FAVRE *et al.*, 2022; De VIDALES *et al.*, 2022).

Um dos medicamentos encontrados no ambiente aquático é o metotrexato (MTX), o qual possui uma estrutura análoga a vitamina B9 ou ácido fólico. Ele apresenta a capacidade de inibir a enzima dihidrofolato redutase, o que causa uma redução de tetrahydrofolato, e que conseqüentemente gera a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas (DENG *et al.*, 2020).

Diante de suas propriedades citotóxicas e mutagênicas, este fármaco, é empregado para o tratamento de diversas neoplasias como, leucemia linfocítica aguda, osteossarcoma, câncer de pulmão e câncer de mama. Além disso, em doses reduzidas ele também é utilizado no tratamento de artrite reumatoide. No entanto, ele apresenta toxicidade às células renais e hepáticas, além de causar danos à medula óssea e em alguns casos inflamação pulmonar (LANGEROUDI *et al.*, 2018).

Não obstante, sua baixa solubilidade aquosa afeta a sua biodisponibilidade na corrente sanguínea e resulta na sua excreção elevada na forma inalterada (WANG, YAN *et al.*, 2017). Dessa forma, a sua remoção se faz necessária para que este não cause danos ao ambiente e aos organismos vivos.

A adsorção de contaminantes por meio do uso de quitosana é uma alternativa que atende as demandas à remoção de poluentes de recursos hídricos. Este biopolímero apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade e grupos funcionais em sua estrutura química que permitem sua interação com outras substâncias, como as nanopartículas magnéticas (NUNES *et al.*, 2022).

Dentre as possíveis funcionalizações estruturais da CS, a incorporação de nanopartículas magnéticas, como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), vem sendo amplamente

estudadas em nosso grupo de pesquisa (BRUCKMANN *et al.*, 2022). Esse comportamento permite a reutilização do nanoadsorvente, evitando etapas de filtração/centrifugação necessárias para adsorventes convencionais possibilitando uma fácil separação do complexo adsorvente/adsorbato pela aproximação de um campo magnético externo (RHODEN *et al.*, 2021).

Além disso, estudos reportam a atividade citotóxica da magnetita por meio da indução da ferroptose, decorrente do estresse oxidativo proveniente de sua internalização celular. Não obstante, tais nanopartículas também podem ser utilizadas para hipertermia magnética, fornecendo outras possibilidades para o tratamento do câncer. Tendo em vista as excelentes propriedades dos nanomateriais mencionados este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade biológica do complexo MTX/CS·Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Cultura celular

Neste estudo foram utilizadas células tumorais de melanoma humano (A375) e células de fibroblastos de camundongos (L929). As células foram incubadas com diferentes tratamentos. Em CS pura, CS·Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:1, CS·Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:5 e CS·Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:10 (proporção massa:massa de quitosana para o reagente de partida para obtenção de CS magnética, FeCl<sub>2</sub>) em concentrações que variaram de 1-30 µg mL<sup>-1</sup> durante 24 horas. As células foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina. Para os ensaios de citotoxicidade as células foram semeadas em placa de 96 poços, em uma concentração de 1x10<sup>-4</sup> por poço em ambiente com atmosfera controlada (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa). A citotoxicidade dos complexos foi avaliada pelos ensaios de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), e ensaio da lactato desidrogenase (LDH) (MOSMANN *et al.* 1983; BORENFREUND and PUERNER, 1985).

## 2.2 Ensaio de MTT

O efeito citotóxico das nanopartículas foram investigadas por meio do ensaio MTT utilizando a metodologia proposta por Mosmann et al (1983). Após 24 horas de incubação, uma solução de 5 mg mL<sup>-1</sup> diluída em 1x de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Prolab®) e posteriormente adicionou-se 20 µL por poço nas placas de 96 poços mantidas a 37 °C sob atmosfera de CO<sub>2</sub> durante 4 horas. O sobrenadante foi então removido e adicionou-se 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth®) para solubilizar os cristais formados. Por fim, a absorbância foi medida em comprimento de onda de 570 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax® i3x – Molecular Devices).

## 2.2 Ensaio de LDH

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio extracelular foi medida utilizando o ensaio colorimétrico não radioativo CyToTox96 de acordo com as instruções do fabricante. Para o ensaio LDH, um volume de 100 µL de sobrenadante + 100 µL de substrato foram transferidos para outra placa de 96 poços. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 490 nm em leitor de microplacas (SpectraMax® i3x – Molecular Devices).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 Ensaio de MTT

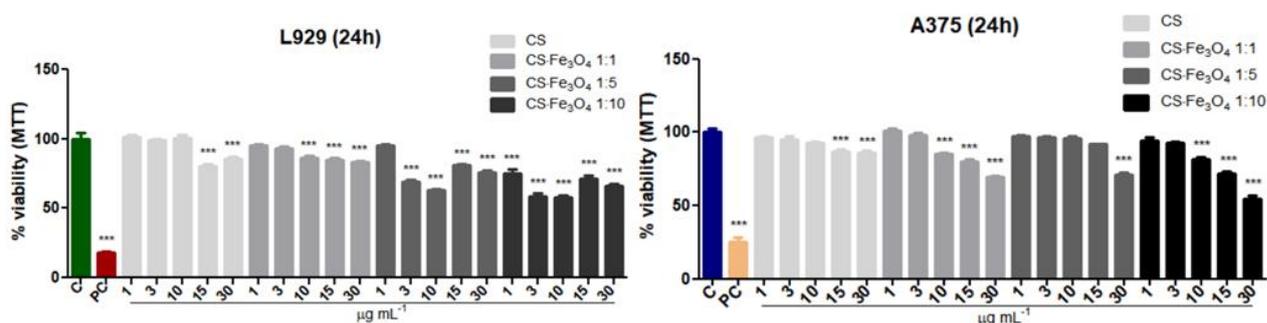
O ensaio de MTT é comumente utilizado para investigar a atividade citotóxica de novos compostos (RODRIGUES *et al.* 2012). A figura 1 e 2 evidencia os resultados deste teste após um período de 24 horas de tratamento para as linhagens celulares L929 e A375. Estas células foram tratadas com diferentes concentrações de CS e CS·Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> com diferentes proporções de magnetita incorporada.

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que na faixa de 1, 3, 10, 15 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  todos os compostos causaram uma diminuição na viabilidade celular para a linhagem L929. Cabe destacar que a quitosana pura apresentou toxicidade significativa apenas nas maiores concentrações utilizadas (15 e 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Em contrapartida os materiais magnéticos apresentaram uma capacidade maior de diminuir a viabilidade celular, visto que, a partir das concentrações 10 e 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  efeitos tóxicos já poderiam ser observados.

Em relação a linhagem tumoral, foi possível verificar que a quitosana magnética apresentou maior atividade citotóxica para as células de melanoma em comparação com a quitosana pura. Sendo que, este efeito foi mais pronunciado para a CS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  1:10, evidenciando a significativa influencia da magnetita para os efeitos antitumorais. A diminuição da viabilidade celular para a CS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  1:10 ficou em torno de 50% na concentração de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os resultados obtidos evidenciaram que maiores proporções de magnetita incorporada causam maiores danos celulares, tal resultado pode ser decorrente da indução do estresse oxidativo pelas nanopartículas de óxido de ferro.

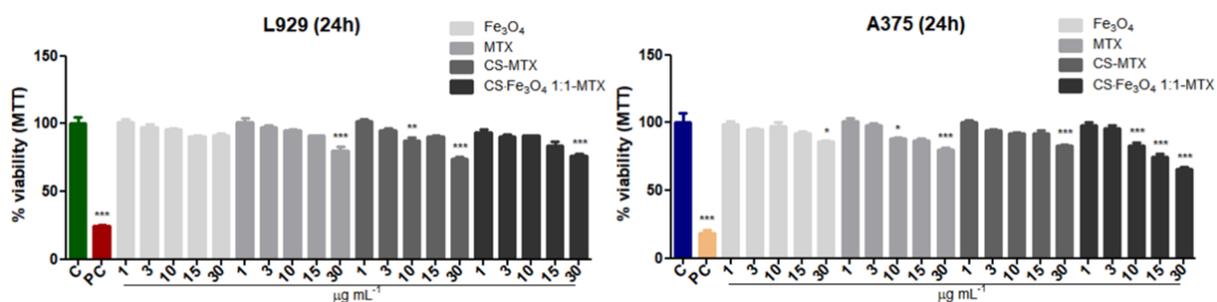
**Figura 1:** ensaio MTT para CS e CS com diferentes quantidades de magnetita incorporada



Visando investigar e comparar a citotoxicidade dos nanoadsorventes após a adsorção do MTX, o mesmo ensaio *in vitro* nas mesmas condições experimentais e linhagens celulares foi realizado. Além disso, considerando a confiabilidade do estudo, os efeitos tóxicos do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pura e do metotrexato livre também foram

avaliados. A Figura 2 mostra a toxicidade do adsorbato/adsorvente (CS/MTX e CS·Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:1/MTX) após adsorção, além da citotoxicidade do MTX livre e da Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pura.

**Figura 2:** ensaio MTT para as amostras CS-MTX, CS·Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:1-MTX, MTX livre e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pura



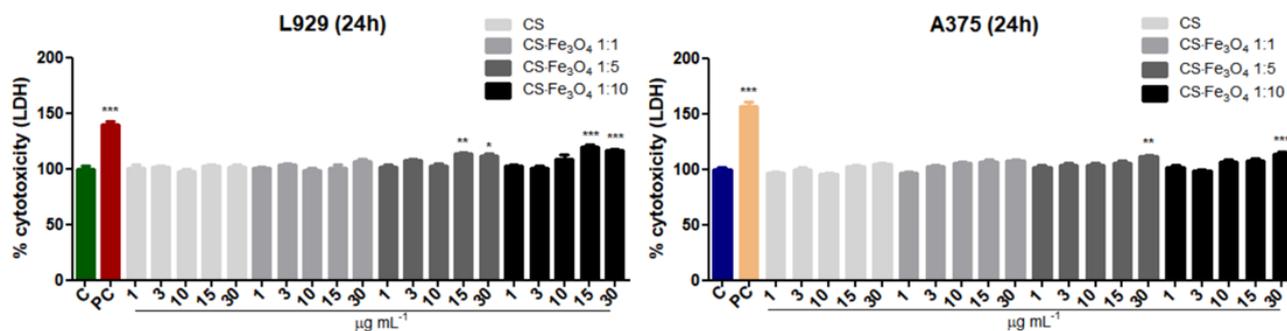
Conforme a Figura 2, é possível observar que a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pura não causa uma diminuição significativa na viabilidade celular. O complexo pós-adsorção e o MTX livre, apresentaram efeitos tóxicos somente nas maiores concentrações utilizadas para a celular da linhagem L929. Uma vez que a porcentagem de células viáveis ficou em torno de 79% para todos os compostos, exceto nas maiores diluições utilizadas ( $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,001^{***}$ ).

Em relação à linhagem celular A375, o efeito mais pronunciado foi evidenciado para CS·Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:1-MTX. Visto que, a partir da concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup>, a taxa de viabilidade celular diminui significativamente de forma dose-dependente ( $p < 0,001^{***}$ ). O decréscimo na viabilidade celular observada nas maiores concentrações empregadas pode ser decorrente do estresse causado pelo bloqueio da entrada de substâncias intrínsecas para o crescimento celular. Cabe salientar que estas nanopartículas magnéticas apresentaram um perfil de toxicidade similar em outros estudos retróados (BRUCKMANN *et al.*, 2020; NGUYEN *et al.*, 2020).

### 3.2 Ensaio LDH

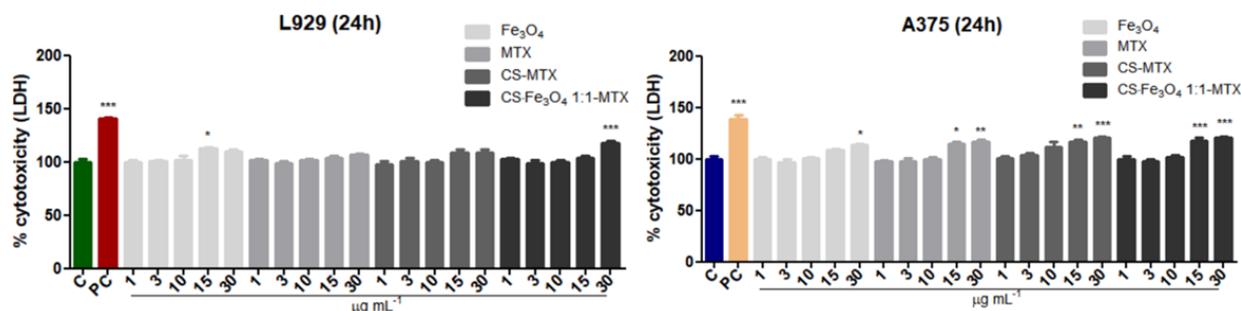
O ensaio LDH é um teste amplamente utilizado para determinar a liberação da enzima lactato desidrogenase das células após a ruptura da membrana celular (BRUCKMANN *et al.*, 2022). Segundo o ensaio realizado a linhagem celular L929 apenas as maiores concentrações de CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:5 e CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:10 induziram a liberação da enzima lactato desidrogenase ( $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ). Para a linhagem A375, é possível verificar que os tratamentos apresentaram baixa citotoxicidade, visto que a integridade celular permaneceu semelhante ao controle positivo, com significância estatística apenas na concentração de 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos compostos CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:5 e CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:10.

**Figura 3:** ensaio LDH para CS e CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> com diferentes proporções de magnetita incorporada



Os efeitos citotóxicos da magnetita, MTX e do adsorvente após adsorção (CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:1-MTX) sobre as linhagens celulares L929 e A375 também foram investigados por meio do ensaio LDH, conforme mostrado na Figura 4.

**Figura 4:** ensaio LDH para as amostras separadas e para o complexo pós adsorção



Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com MTX e CS-MTX livre não foi capaz de induzir a liberação da enzima LDH na linhagem celular L929 (RODRIGUES *et al.* 2012). Em contraste, os compostos Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:1-MTX tiveram a capacidade de induzir esta resposta nas concentrações de 15 e 30 µg mL<sup>-1</sup> (p<0,05\* ep<0,001\*\*\*, respectivamente) (BRUCKMANN *et al.*, 2022).

Para as células de melanoma humano, uma liberação significativa de LDH é observada após 24 horas de tempo de contato nas maiores concentrações utilizadas. Sabe-se que células tumorais apresentam um maior número de cargas negativas em comparação às células normais.

Dessa forma, as forças de atração entre os grupos amino protonados da quitosana são favorecidas, podendo resultar na ruptura da membrana celular e na liberação de citocinas inflamatórias (Zhang *et al.*, 2010). Em relação às nanopartículas magnéticas, diversos mecanismos são descritos, como geração de espécies reativas, danos ao material genético e ferroptose (JACOB *et al.*, 2016; REVIA e ZHANG, 2016).

#### 4. CONCLUSÃO

De acordo com o estudo biológico *in vitro* realizado neste estudo foi possível evidenciar que o complexo adsorvente/adsorbato era citotóxico contra a linhagem celular A375. Além disso, a sinergia entre quitosana magnética e metotrexato conferiu uma maior biocompatibilidade ao complexo CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1:1-MTX em comparação a todos os outros compostos testados. Os resultados obtidos demonstraram que além da elevada capacidade de adsorção do nanoadsorvente utilizado, o complexo formado é capaz de reduzir a toxicidade do MTX livre. Em

relação a atividade antitumoral, evidenciou-se que o complexo apresenta maior atividade citotóxica que o MTX livre possibilitando dessa forma estudos futuros que explorem essa atividade frente outras linhagens.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao LaMMaN, CNPq, FAPERGS, PPGNano e a Universidade Franciscana pelo apoio e bolsas de pesquisas concedidas.

## 6. REFERÊNCIAS

DA SILVA BRUCKMANN, F *et al.* Influence of magnetite incorporation into chitosan on the adsorption of the methotrexate and in vitro cytotoxicity. **Environmental science and pollution research international**.

DENG, Ziwen *et al.* Electrochemical detection of methotrexate in serum sample based on the modified acetylene black sensor. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105058, 2020.

DE VIDALES, M. J. M. *et al.* New compact multi option photo reactor for the removal of Contaminants of Emerging Concern from wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, p. 107700, 2022.

FAVRE, F. *et al.* Real wastewater micropollutant removal by wood waste biomass biochars: A mechanistic interpretation related to various biochar physico-chemical properties. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100966, 2022.

JACOB, J. A.; SALMANI, J. M. M.; CHEN, B. Magnetic nanoparticles: mechanistic studies on the cancer cell interaction. **Nanotechnology Reviews**, v. 5, n. 5, p. 481-488, 2016.

LANGEROUDI, M. P.; BINAELIAN, E. Tannin-APTES modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as a carrier of Methotrexate drug: kinetic, isotherm and thermodynamic studies. **Materials Chemistry and Physics**, v. 218, p. 210-217, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NUNES, F. B. *et al.* Study of phenobarbital removal from the aqueous solutions employing magnetite-functionalized chitosan. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-14, 2022.

REVIA, Richard A.; ZHANG, M. Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances. **Materials Today**, v. 19, n. 3, p. 157-168, 2016.

RHODEN, C. R. B. *et al.* Study from the influence of magnetite onto removal of hydrochlorothiazide from aqueous solutions applying magnetic graphene oxide. **Journal of Water Process Engineering**, v. 43, p. 102262, 2021.

RODRIGUES, S. *et al.* Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. **Journal of functional biomaterials**, v. 3, n. 3, p. 615-641, 2012.

ŠKUFGA, D., *et al.* Phycoremediation of municipal wastewater: Removal of nutrients and contaminants of emerging concern. **Science of The Total Environment**, v. 782, p. 146949, 2021.

ZHANG, Jiali *et al.* Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. **Marine drugs**, v. 8, n. 7, p. 1962-1987, 2010.

YAN, Han *et al.* Influence of the surface structure of graphene oxide on the adsorption of aromatic organic compounds from water. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 12, p. 6690-6697, 2015.

WANG, X.; YAN, H. Methotrexate-loaded porous polymeric adsorbents as oral sustained release formulations. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 598-602, 2017.