

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS COM
BICAMADAS DE LAURATO/LAURATO E LAURATO/PLURONIC:
ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO COM ANFOTERICINA B**

JOEL ROCHA DA SILVA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Emília Celma de Oliveira Lima

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Goiânia
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS COM
BICAMADAS DE LAURATO/LAURATO E LAURATO/PLURONIC:
ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO COM ANFOTERICINA B**

JOEL ROCHA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal de
Goiás como exigência parcial, para
obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Emília Celma de Oliveira Lima

Goiânia
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Silva, Joel Rocha da.

S5861n

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamadas de laurato/laurato e laurato/pluronic: estudo da associação com anfotericina b / Joel Rocha da Silva. - Goiânia : Universidade Federal de Goiás, 2008.

106 f. ; 31,5 cm

Orientador: Professora.Dr^a. Emília Celma de Oliveira Lima.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, Mestrado em Química, 2008.

Referências: f. 80-88.

1. Nanopartículas de magnetita - métodos de preparação. 2. Nanopartículas de magnetita - aplicações biológicas. 3. Anfotericina. 4. Química - dissertação. I. Lima, Emília Celma de Oliveira Lima. II. Universidade Federal de Goiás. III. Título.

CDU 54

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Química,
apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, em
2007.

Comissão Julgadora:

Prof^ª. Dr^ª. Emília Celma de Oliveira Lima – IQ/UFG

Prof. Dr. José Maciel Rodrigues Júnior - Nanocore

Prof. Dr^a Patrícia Pommé Confessori Sartoratto - IQ/UFG

**A minha esposa Elci e meus filhos Rafael,
Gabriel e Clarissa.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Emília Celma de Oliveira Lima do Instituto de Química da UFG pela orientação, pela dedicação ao trabalho e pela incansável paciência.

A todos os professores do Instituto de Química da UFG pela formação durante o mestrado.

Ao Dr. Norbert Buske (Magnetic Fluids) pela metodologia e orientação nos procedimentos da síntese das nanopartículas.

Ao Dr. José Maciel Rodrigues Júnior (Nanocore Biotecnologia S.A.) pela colaboração no fornecimento do reagente para este trabalho.

A Dra. Luciana Rebelo Guilherme pela colaboração no fornecimento de um fluido magnético para este trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro por meio da Rede Brasileira de Nanobiomagnetismo, coordenada pelo Prof. Dr. Paulo César de Moraes do IF-UnB.

Aos meus pais e irmãos que mesmo distantes sempre me deram muito apoio.

Aos colegas de laboratório pela amizade, apoio e colaboração nos momentos de dificuldade.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** – (a) O campo magnético H gerado por uma bobina cilíndrica depende da corrente I , do número de volta N e do comprimento l . A densidade de fluxo magnético B_0 na presença do vácuo é igual a $\mu_0 H$, onde μ_0 é a permeabilidade de um vácuo, $4\pi \times 10^{-7} \text{ Hm}^{-1}$. (b) A densidade de fluxo magnético, B , dentro de um material sólido é igual a μH , onde μ é a permeabilidade do material sólido (CALLISTER, 1996). 19
- Figura 2** – Esquema do movimento de um elétron em uma órbita em torno do núcleo que será o momento magnético atômico (SMITH, 1998). 20
- Figura 3** – Configuração para um material diamagnético. a) $H = 0$ representa ausência de campo magnético externo. b) $H \rightarrow$ representa presença de campo magnético externo (CALLISTER, 1996). 21
- Figura 4** – Configuração para um material paramagnético. a) $H = 0$ representa ausência de campo magnético externo. b) $H \rightarrow$ representa presença de campo magnético externo (CALLISTER, 1996). 21
- Figura 5** – Representação esquemática do alinhamento dos momentos magnéticos. a) ferromagnetismo: momentos magnéticos alinhados mesmo na ausência de campo externo. b) antiferromagnetismo: alinhamento em sentidos opostos de momentos magnéticos para o óxido de manganês (CALLISTER, 1996). 23
- Figura 6** – Representação esquemática mostrando a configuração de momentos magnéticos em ferrita.(CALLISTER, 1996). 23
- Figura 7** – Representação esquemática da densidade do fluxo, B , versus a força do campo magnético, H , para materiais diamagnéticos, paramagnéticos, e ferromagnéticos (CALLISTER, 1996). 24

Figura 8 – Representação da estrutura dos domínios magnéticos de materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos. a) material magnetizado. b) material desmagnetizado (CALLISTER, 1996)..... 24

Figura 9. a) O comportamento B versus H para um material ferromagnético ou ferrimagnético que era inicialmente desmagnetizado. Configurações de domínio durante vários estágios de magnetização estão representadas. Densidade de fluxo de saturação B_s , magnetização M_s e permeabilidade inicial μ_i estão também indicadas. b) Densidade de fluxo magnético versus força do campo magnético para um material ferromagnético para saturação direta e reversa (pontos S e S'). O ciclo de histerese está representado pela curva cheia; a linha tracejada indica a magnetização inicial (CALLISTER, 1996). 25

Figura 10 – Representação esquemática do superparamagnetismo. a) momento magnético total, “supermomento” de uma nanopartícula magnética. b) mudança de direção do momento magnético promovida pela agitação magnética. c) Curva de magnetização (M) versus força do campo magnético (H) para um material superparamagnético (CALLISTER, 1996; KNOBEL, 2000). 27

Figura 11 – Representação das condições em uma superfície negativa com uma camada de íons positivos adsorvidos na camada de Stern. O número de íons negativos aumenta e o de positivos diminuiu (ver parte superior do diagrama) quando se afasta da superfície, tornando-se zero o potencial elétrico quando as concentrações são iguais. São apresentados o potencial de superfície Ψ_0 e o potencial na camada de Stern Ψ_δ . Como a partícula se move, a superfície efetiva é definida como superfície do cisalhamento, que é um pouco mais distante da camada de Stern e dependente da rugosidade da superfície, das macromoléculas adsorvidas etc. Na superfície do cisalhamento é localizado o potencial zeta, ζ . A espessura da dupla camada é dada por $1/k$. (FLORENCE, 2003)..... 31

Figura 12 – Representação esquemática da teoria DLVO (THOMAS et al., 1999). 32

Figura 13 – Perfis de liberação de drogas em função do tempo: convencional x controlada. (ANSEL et al., 2005; ALLEN et al., 2004).	38
Figura 14 – Estrutura química da anfotericina B (FILIPPIN, 2006).	41
Figura 15 – Formação de pontes de hidrogênio entre AB, esteróis e água.	45
Figura 16 - Modelo genérico de nanopartículas funcionalizadas com monocamadas e bicamadas em meio aquoso. a) Unidade com monocamada; b) Unidade com bicamada (XU et al., 2004).	52
Figura 17 - Fotografia do sistema de separação magnética com a lâmina metálica. a) Fluido magnético antes da separação magnética com a lâmina metálica. b) Fluido magnético 48h após a separação magnética.	54
Figura 18 - Espectro de absorção de anfotericina B dissolvida em DMSO/metanol (proporção 1:1). Concentrações de 1×10^{-6} mol.L ⁻¹ 3×10^{-6} mol.L ⁻¹ ; 5×10^{-6} mol.L ⁻¹ ; 7×10^{-6} mol.L ⁻¹	55
Figura 19 - Curva padrão de anfotericina B em DMSO/etanol (1:1), obtida por espectrofotometria em 411nm. $r = 0,99857$	56
Figura 20 - Difractogramas de raios-X dos pós de amostras de magnetita e de maguemitita.	61
Figura 21. Espectros no infravermelho. a) Ácido láurico puro; b) Nanopartículas de maguemitita funcionalizadas com monocamada de laurato; c) Nanopartículas funcionalizadas com bicamada de laurato.	65
Figura 22 - Espectros no infravermelho. a) Pluronic. b) Nanopartículas de maguemitita funcionalizadas com monocamada de laurato. c) Nanopartículas de maguemitita funcionalizada com bicamada de laurato/Pluronic.	66
Figura 23 - Representação genérica da possibilidade da agregação das partículas antes da funcionalização com a monocamada.	68

Figura 24 - Representação genérica da agregação. a) Interação entre os grupos carboxilatos / b) Formação de agregados entre as unidades de bicamada (XU, et al, 2004).....	69
Figura 25 - Curva de variação de potencial zeta (ζ) e de raio hidrodinâmico em função do.....	70
Figura 26 - Gráfico de associação da AB, quantidade em mol adicionada versus quantidade em mol adsorvida.....	75
Figura 27 - Espectro de absorção da anfotericina B associada às nanopartículas de maguemitas funcionalizadas com bicamada de laurato.	77
Figura 28 - Titulação pH versus potencial zeta ζ de nanopartículas de maguemitas funcionalizadas com bicamada de laurato/laurato. a) fluido com anfotericina incorporada. b) fluido puro.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Permeabilidade e susceptibilidade magnéticas para vários materiais.....	22
Tabela 2 - Diâmetros médios (Drx) e parâmetros de rede das amostras de maguemitita e magnetita.....	62
Tabela 3 - Diâmetros hidrodinâmicos das amostras de maguemitita e magnetita funcionalizadas com bicamadas de laurato e de laurato/Pluronic avaliados nos fluidos magnéticos.....	68
Tabela 4 - Variação do potencial zeta (ζ /mV) do diâmetro hidrodinâmico (Dh / nm) das nanopartículas de maguemitita funcionalizadas com bicamada de laurato após adição do meio de cultura de células.....	71
Tabela 5 - Variação do potencial zeta (ζ /mV) e diâmetro hidrodinâmico(Dh / nm) da nanopartículas de maguemitita e de magnetita funcionalizadas com bicamada de laurato/Pluronic após adição do meio de cultura de células.	73
Tabela 6 - Grau de associação de anfotericina B incorporada nas bicamadas de laurato funcionalizada em nanopartículas de maguemitita.	76

ABREVIATURAS OU SIGLAS

AB	anfotericina B
B	valores de largura à meia altura
B	magnitude da força de campo interno
B_s	fluxo de saturação
D	diâmetro da partícula
DMSO	dimetil sulfóxido
DRX	difratometria de raios X
D_H	diâmetro hidrodinâmico
FTIR	espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier
Fe_3O_4	magnetita
$\gamma - Fe_2O_3$	maguemitita
K	Kelvin
K	constante de Boltzmann
λ	comprimento de onda
h	constante de Planck
H	intensidade do campo magnético
μ	permeabilidade magnética
μ_r	permeabilidade magnética relativa
χ	susceptibilidade magnética
M	magnetização
M_s	magnetização de saturação
θ_B	ângulo de Bragg
T	temperatura

η	viscosidade
ζ	potencial zeta
u.a.	unidades arbitrárias
Γ	função do coeficiente de difusão translacional
τ	diferenças nos tempos de medidas intensidade de luz espalhada no tempo t
q =	fator de espalhamento de luz

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
 Capítulo I	18
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Materiais Magnéticos	18
1.1.1 Tipos de Magnetismo.....	19
1.1.2 Ciclo de Histerese.....	25
1.1.3 Superparamagnetismo.....	26
1.2 Métodos de Preparação de nanopartículas magnéticas	28
1.3 Fluidos Magnéticos	29
1.3.1 Mecanismos de estabilização coloidal.....	30
1.4 Exemplos de pesquisa empregando nanopartículas magnéticas para aplicações biológicas	35
1.5 Sistemas de Liberação Controlada de Drogas	37
1.6 Drogas hidrofóbicas	39
1.6.1 Anfotericina.....	39
1.6.2 Formulações da anfotericina B	41
1.6.3 Uso terapêutico da anfotericina B	43
1.6.4 Mecanismos de ação da anfotericina B	44
1.6.5 Efeitos colaterais da anfotericina B.....	45
ANTECEDENTES DO TRABALHO.....	47
OBJETIVOS	48

Capítulo II	49
2 Procedimento Experimental	49
2.1 Materiais e Reagentes	49
2.2 Síntese das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)	49
2.3 Síntese das nanopartículas de maguemitita ($\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$).....	50
2.4 Funcionalização das nanopartículas de maguemitita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) com monocamada de laurato (ML)	50
2.5 Associação da segunda camada de laurato às nanopartículas de maguemitita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e formação do fluido magnético (FMBL)	51
2.6 Associação de Pluronic às nanopartículas de magnetita funcionalizadas com laurato e formação do fluido magnético (FMBP).....	51
2.7 Estudo da estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos sob gravidade.....	53
2.8 Avaliação da estabilidade coloidal dos fluidos de nanopartículas de maguemitita com bicamada laurato/laurato em um meio de cultura de células	53
2.9 Determinação do ponto isoelétrico dos fluidos de nanopartículas de maguemitita com bicamada laurato/laurato.....	53
2.10 Associação da anfotericina B às nanopartículas de maguemitita funcionalizadas com bicamada laurato/laurato.....	54
2.11 Curva padrão para a análise da anfotericina B por espectrofotometria no UV-Visível	55
2.12 Análise por espectrofotometria no UV-visível da anfotericina B (AB) associada às nanopartículas de maguemitita com bicamada de laurato/laurato	56
2.13 Determinação do ponto isoelétrico dos fluidos magnéticos de nanopartículas de maguemitita com bicamada laurato/laurato anfotericina B associada	57
2.14 Caracterizações dos materiais obtidos.....	57
2.14.1 Análises do teor de Ferro	57
2.14.2 Difractometria de raios X (DRX)	57

2.14.3 Espectroscopia na região do infravermelho	58
2.14.4 Medidas de diâmetro hidrodinâmico (d_h) e de potencial zeta (ζ) por espalhamento de luz.	58
Capítulo III	60
3 Resultados e Discussões.....	60
3.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas por difratometria de raios X (DRX)	60
3.2 Caracterização dos fluidos magnéticos obtidos	63
3.2.1 Análise do teor de Ferro	63
3.2.2 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho.....	64
3.3 Estudo de estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos.....	66
3.4 Associação da anfotericina B ao fluido magnético de maguemita funcionalizado com bicamada laurato/laurato	74
4 Conclusão.....	79
5 Referências Bibliográficas	80
ANEXOS	89
Anexo 1.....	90
Anexo 2.....	98
Anexo 3.....	102
Anexo 4.....	104

CAPÍTULO II

2 Procedimento Experimental

2.1 Materiais e Reagentes

Ácido clorídrico concentrado (Chemco);
Ácido láurico (ácido dodecanóico) (Vetec);
Anfotericina B 80 % HPLC (Sigma);
Cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), (Merck);
Cloreto de ferro(II) tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), (Merck);
Estreptomicina (Gibco);
 HNO_3 concentrado (Chemco);
Lã metálica fornecida pelo Dr. Marcel P. Cuyper.
Meio de cultura MEM (Cutilab)
Membrana de celulose semipermeável (Inlab);
Nitrato de ferro (III) ($\text{FeNO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (Sigma);
Pluronic® F-127 (poloxamer 407) (BASF), referido neste texto apenas como Pluronic, fornecido pelo Dr. José Maciel Rodrigues Júnior;
Solução aquosa concentrada de amônia (NH_3) a 25%, (Fmaia);
Soro fetal bovino (Cutilab).

2.2 Síntese das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

A síntese de nanopartículas de magnetita foi realizada seguindo-se a metodologia fornecida pelo Dr. Norbert Buske (MagneticFluids, Berlim), durante a visita do mesmo ao IQ-UFG, em novembro de 2005. As etapas descritas posteriormente de tratamento das nanopartículas para a obtenção de fluidos magnéticos contendo nanopartículas funcionalizadas com bicamada de ácido láurico também foram realizadas seguindo a metodologia ensinada pelo Dr. Buske ou, fazendo-se adaptações da mesma (BUSKE, 1993).

Foram preparadas 100 mL de duas soluções contendo 9,94 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 27,03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, soluções $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente. As soluções foram misturadas, sob agitação mecânica, e foi adicionado 100 mL de solução aquosa NH_3 a 25%. Um precipitado preto foi instantaneamente formado. O sistema continuou sob agitação a temperatura ambiente por 20 minutos. Após o referido período as partículas foram sedimentadas com o auxílio de um ímã e o sobrenadante removido. Em seguida foram adicionados 50 mL de água destilada às partículas, e novamente foi efetuada a sedimentação com o auxílio de um ímã, procedimento repetido por mais quatro vezes. Este procedimento foi utilizado com o objetivo da remoção dos contra-íons.

2.3 Síntese das nanopartículas de maguemita (γ - Fe_2O_3)

As partículas de Fe_3O_4 produzidas pelo método descrito anteriormente, foram oxidadas à γ - Fe_2O_3 . A estas partículas de magnetita foram adicionados 80 mL de uma solução aquosa de HNO_3 $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e 120 mL de uma solução aquosa de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ $0,35 \text{ mol.L}^{-1}$. Em seguida, a mistura foi aquecida até a 96°C por 2 h. Por vezes, foi adicionada água destilada para evitar a secura do sistema. Após o referido período houve a mudança da coloração negra das partículas de magnetita para coloração marrom, evidenciando-se a oxidação. As partículas então foram sedimentadas com o auxílio de um ímã e o sobrenadante removido. Com o objetivo de se efetuar a remoção dos contra-íons com maior eficiência, vários testes, em diversas concentrações de ácido clorídrico foram efetuados. As partículas lavadas com uma solução de HCl 1 mol.L^{-1} apresentaram a melhor condição para a retirada dos contra-íons. Nesta condição as partículas sedimentaram deixando o sobrenadante incolor, demonstrando ser a concentração adequada para que as partículas não fossem dissolvidas.

2.4 Funcionalização das nanopartículas de maguemita (γ - Fe_2O_3) com monocamada de laurato (ML)

As partículas de maguemita, produzidas pelo método anterior foram dispersas em água e o sistema foi aquecido até atingir temperatura aproximada de 60°C , sob agitação mecânica ininterrupta. Ainda nestas condições 1,8 g de ácido láurico foi adicionado. O pH foi ajustado para oito, com algumas gotas da solução aquosa concentrada de amônia. A temperatura foi aumentada para 75°C e mantida neste

patamar por 30 minutos. Ao término deste período, as partículas funcionalizadas passaram a ter caráter hidrofóbico, devido à funcionalização da monocamada de laurato nas nanopartículas. Esta propriedade pode ser observada visualmente pela separação de fases no meio aquoso e com um teste de dispersão das partículas em um meio orgânico (o teste efetuado com tolueno resultou em dispersão das partículas). Em seguida as partículas foram lavadas por cinco vezes, com água destilada, para a remoção dos contra-íons e do excesso de ácido láurico.

2.5 Associação da segunda camada de laurato às nanopartículas de maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e formação do fluido magnético (FMBL)

Procedimento semelhante ao adotado para a formação da monocamada foi empregado. As nanopartículas funcionalizadas com monocamada de laurato foram adicionadas a água em um béquer. As nanopartículas não se dispersam em água devido ao caráter hidrofóbico proveniente da funcionalização com a monocamada de laurato. O sistema foi aquecido até atingir temperatura aproximada de 60 °C, sob agitação mecânica ininterrupta. Ainda nestas condições 1,8 g de ácido láurico foi adicionado. O pH foi ajustado para oito, com algumas gotas da solução aquosa concentrada de amônia. A temperatura foi aumentada para 75 °C e mantida neste patamar por 30 minutos. Ao término deste período, as partículas se dispersaram espontaneamente na fase aquosa evidenciando o caráter hidrofílico, devido à associação de mais uma camada de laurato nas nanopartículas funcionalizada com monocamada de laurato. O fluido contendo as nanopartículas funcionalizadas com a bicamada foi dialisado em membrana semipermeável em água deionizada para remoção do excesso de ácido láurico. A preparação das nanopartículas de magnetita funcionalizadas com monocamada e com bicamada de ácido láurico seguiu o procedimento idêntico ao usado na funcionalização das nanopartículas de maguemita.

2.6 Associação de Pluronic às nanopartículas de magnetita funcionalizadas com laurato e formação do fluido magnético (FMBP)

O procedimento usado para a associação de Pluronic às nanopartículas funcionalizadas com a monocamada de laurato foi adaptado de procedimento descrito por Jain *et al.* (2005). O experimento foi feito à temperatura de 4°C, e as proporções mássicas utilizadas foram 85% m/m de partículas funcionalizadas com

o laurato e 15% m/m de Pluronic. As nanopartículas de magnetita funcionalizadas com monocamada de ácido láurico foram adicionadas a água e submetidas a ultra-som e, nessa condição, o Pluronic sólido foi adicionado lentamente. Após esse período nota-se a dispersão das nanopartículas na fase aquosa, evidenciando a formação da camada de Pluronic sobre a camada de laurato formando um sistema bicamada laurato/Pluronic.

A funcionalização das nanopartículas de maguemita com a bicamada laurato/Pluronic foi feita seguindo um procedimento idêntico ao utilizado na funcionalização das nanopartículas de magnetita, descrito acima.

Neste trabalho as nanopartículas funcionalizadas com monocamada de laurato serão referidas como unidade com monocamada (Figura 16a). As nanopartículas funcionalizadas com bicamada laurato/laurato e laurato/Pluronic serão referidas como unidades com bicamada (Figura 16b). Estes termos serão utilizados para facilitar a leitura do texto. Estes são modelos genéricos de possibilidades ideais, no decorrer deste trabalho serão discutidas outras possibilidades.

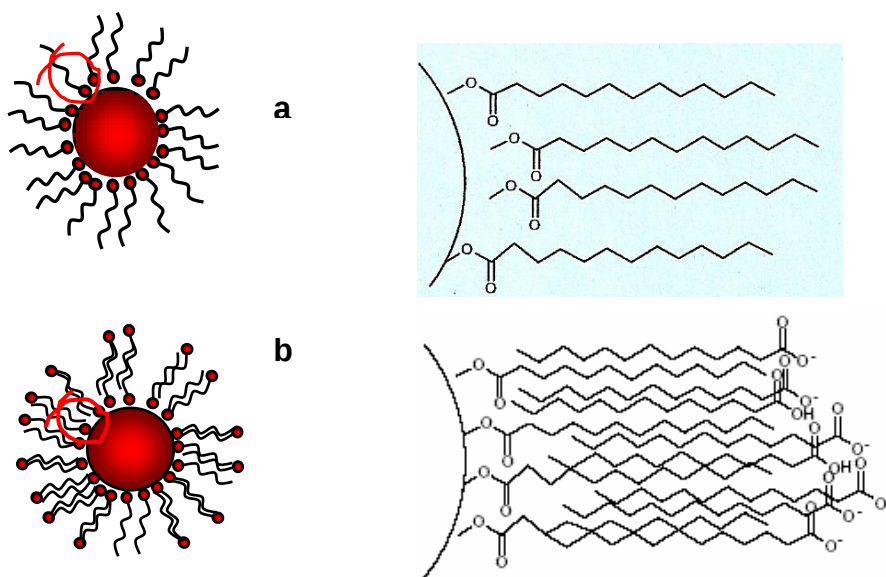


Figura 16 - Modelo genérico de nanopartículas funcionalizadas com monocamadas e bicamadas em meio aquoso. a) Unidade com monocamada; b) Unidade com bicamada (XU et al., 2004).

2.7 Estudo da estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos sob gravidade

A estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos estocados foi avaliada determinando-se os teores de ferro no topo de uma coluna dos fluidos. As alíquotas coletadas foram tratadas e utilizadas para a determinação de ferro total, conforme descrito posteriormente.

2.8 Avaliação da estabilidade coloidal dos fluidos de nanopartículas de maguemitita com bicamada laurato/laurato em um meio de cultura de células

Alíquotas do fluido magnético a base de nanopartículas de maguemitita funcionalizadas com bicamada de laurato nas quantidades de 2,5 μ L; 5,0 μ L; 10 μ L; 15 μ L; 25 μ L; 35 μ L e 50 μ L foram adicionadas a 1500 μ L de meio de cultura. O meio empregado foi o Meio Mínimo Essencial, MEM, suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino e 100 μ L/mL de estreptomicina. Após a adição do fluido ao meio, o frasco foi rapidamente agitado manualmente e as análises de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico realizadas em seguida.

2.9 Determinação do ponto isoelétrico dos fluidos de nanopartículas de maguemitita com bicamada laurato/laurato

A determinação do ponto isoelétrico das nanopartículas de maguemitita funcionalizadas com bicamada laurato/laurato foi realizada através da determinação do potencial zeta em função do pH. Investigou-se ainda o comportamento do diâmetro hidrodinâmico em função da variação do pH.

Uma alíquota de 38 μ L do fluido foi diluído em 7 mL de água deionizada. O valor do pH deste fluido diluído foi de 5,8 e então foram medidos o potencial zeta e o diâmetro hidrodinâmico. O volume de 38 μ L foi utilizado, pois o equipamento só permite a leitura de soluções muito diluídas e o pH de 5,8 praticamente corresponde ao pH da água utilizada na diluição. O mesmo foi mantido sob agitação e o pH foi ajustado e novamente efetuada a medida de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico. Foi utilizada uma faixa de pH entre 2 a 11, sendo o mesmo ajustado com HCl diluído ou NaOH diluído.

2.10 Associação da anfotericina B às nanopartículas de maguemita funcionalizadas com bicamada laurato/laurato

O experimento para investigar a associação da anfotericina B nas bicamadas foi realizado tomando-se alíquotas de 37, 48, 55, 110 e 140 μL de soluções de anfotericina B dissolvidas em DMSO nas concentrações $2,0 \times 10^{-5}$ a $1,70 \times 10^{-3}$ mol.L^{-1} . A cada alíquota foram adicionadas 2 mL de fluido magnético contendo as nanopartículas de maguemita funcionalizadas com bicamada de laurato. O sistema anfotericina B/ fluido magnético foi colocado sob agitação mecânica por 48h, e este procedimento foi chamado de incubação. Após este período o sistema foi submetido à separação magnética, conforme descrito a seguir.

O sistema de separação foi constituído por uma cubeta na qual foi imersa uma lã metálica, e do lado externo foi colocado um ímã de 4000 Gauss. O sistema anfotericina B/fluido magnético foi colocado dentro da cubeta. As partículas foram atraídas para a lã metálica localizadas na parede da cubeta, separando-se da fase líquida conforme figura 17. Esta fase líquida foi chamada de sobrenadante. Um período de 24h foi necessário para separação do sobrenadante, após este período as partículas foram retiradas e o sobrenadante foi colocado novamente dentro da cubeta para nova separação magnética por mais 24h, para a coleta do sobrenadante a ser analisado. Ao final deste período os sobrenadantes de todos os experimentos foram analisados quanto ao teor de anfotericina B por espectrofotometria no visível com base em curva padrão previamente obtida.

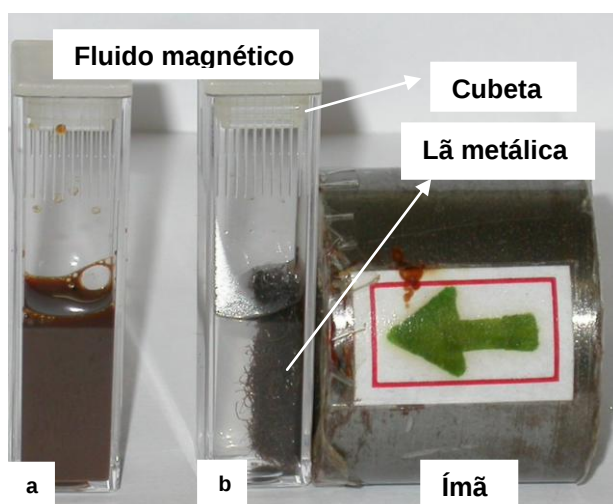


Figura 17. Fotografia do sistema de separação magnética com a lã metálica. a) Fluido magnético antes da separação magnética com a lã metálica. b) Fluido magnético 48h após a separação magnética.

2.11 Curva padrão para a análise da anfotericina B por espectrofotometria no UV-Visível

Inicialmente foram realizados experimentos preliminares para determinar o solvente e as concentrações adequadas para a obtenção da curva padrão. Conforme está bem discutido na literatura (CARMONA, 2001, FILIPPIN et al, 2006; LARABI, 2004), um bom solvente no qual as moléculas de anfotericina se dissolvem na forma monomérica é uma solução DMSO:metanol 1:1. Foram obtidos espectros de soluções de anfotericina nesse solvente nas concentrações de $1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $7 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, na região de 320 a 450 nm, que estão apresentados na figura 18. O espectro apresenta 4 bandas entre 340 a 420 nm (sendo a banda de maior intensidade em 411 nm), o que está de acordo com os resultados descritos por Carmona et. al. para as espécies monoméricas de anfotericina.

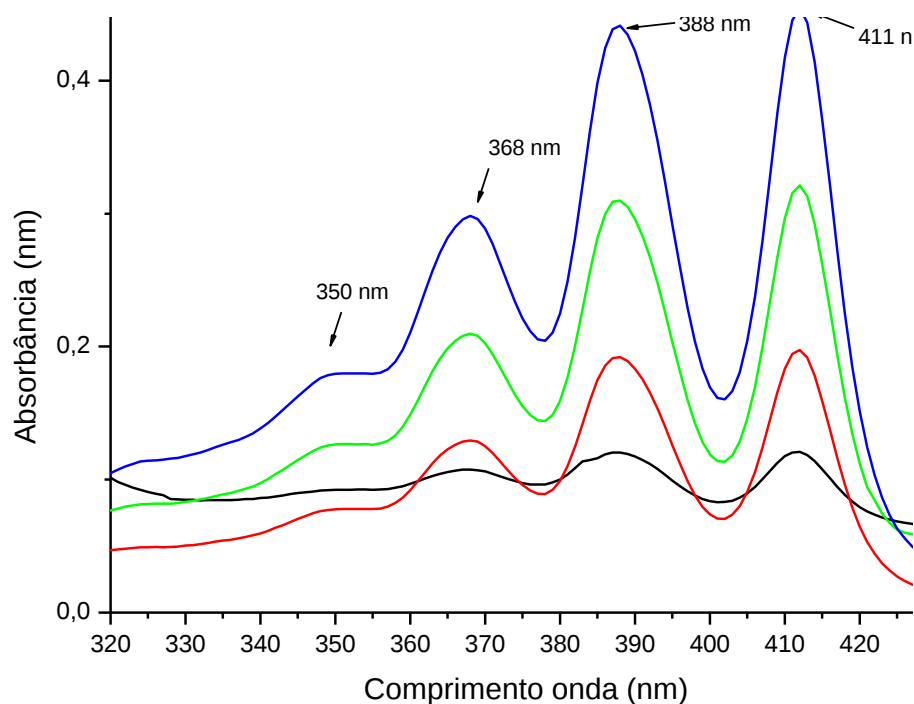


Figura 18 - Espectro de absorção de anfotericina B dissolvida em DMSO/metanol (proporção 1:1). Concentrações de $1 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (preto); $3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (vermelho); $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (verde); $7 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (azul).

Para construção do gráfico da curva padrão (figura 19), a anfotericina B foi dissolvida inicialmente em DMSO, posteriormente a AB foi diluída no sistema metanol:DMSO (1:1). A curva padrão da AB foi obtida com concentrações de AB de $1,2 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; a $1,2 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, fazendo-se as leituras de absorção em 411 nm.

As diluições foram obtidas a partir de solução estoque (SE) de $2,66 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ AB/DMSO.

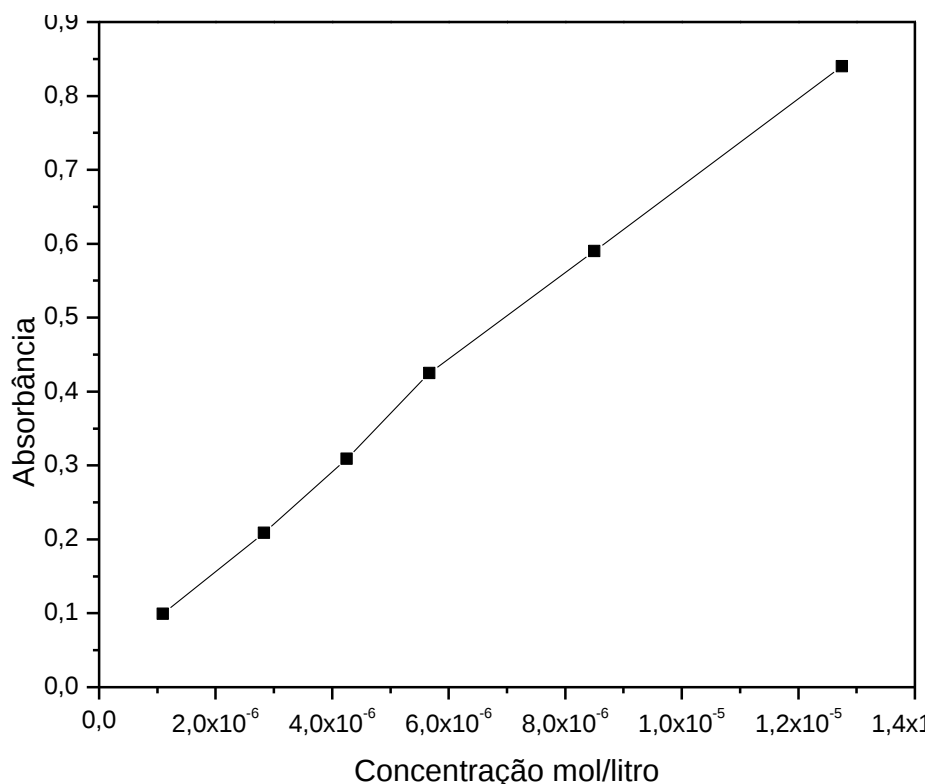


Figura 19. Curva padrão de anfotericina B em DMSO/etanol (1:1), obtida por espectrofotometria em 411nm. $r = 0,99857$

2.12 Análise por espectrofotometria no UV-visível da anfotericina B (AB) associada às nanopartículas de maguemita com bicamada de laurato/laurato

As partículas com anfotericina associada e fluido puro foram analisados por espectrofotometria na faixa de 380 a 500 nm. Após a separação magnética, foi calculado o teor de ferro total das amostras, então foram tomadas alíquotas dos fluidos de forma que todas contivessem a mesma quantidade de ferro total. Para a análise foram tomadas alíquotas de 40 μL dos fluidos com anfotericina B associada e 60 μL do fluido puro, ambas foram diluídas em 5mL de água destilada.

2.13 Determinação do ponto isoelétrico dos fluidos magnéticos de nanopartículas de maguemita com bicamada laurato/laurato anfotericina B associada

O procedimento para determinação do ponto isoelétrico do fluido com nanopartículas de maguemita funcionalizadas com bicamada laurato/laurato e associadas à anfotericina B foi realizado de maneira idêntica como descrito no item 2.9. Alíquotas com o mesmo volume 38 μL do fluido com anfotericina associada foram tomadas. O ajuste de pH, as medidas de potencial zeta e de diâmetro hidrodinâmico seguiram procedimento idêntico ao item citado.

2.14 Caracterizações dos materiais obtidos

2.14.1 Análises do teor de Ferro

O teor de ferro total nos fluidos magnéticos foi determinado por espectroscopia de absorção atômica. As medidas foram realizadas no laboratório de análise do Fundo de Fomento à Mineração de Goiás (FUNMINERAL) em um equipamento Perkim Elmer 5000. Para a análise foram colocados 50 μL de fluido magnético em um béquer e as partículas dissolvidas com HCl concentrado a quente. Após transferiu-se a solução resultante para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado.

O teor de Fe^{2+} e Fe^{3+} nas amostras de maguemita e de magnetita foi determinado utilizando-se o método colorimétrico da ortofenantrolina (JEFFREY et al, 1992).

2.14.2 Difratometria de raios X (DRX)

As partículas sintetizadas de magnetita e maguemita foram analisadas por DRX para a caracterização da estrutura cristalina e para a estimativa do tamanho de partículas. A caracterização foi feita por difratometria empregando-se o método do pó. Os difratogramas foram obtidos utilizando o equipamento Schimadzu, modelo XRD 6000, utilizando radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) 40KV e 30 mA. As informações contidas nos difratogramas e a equação de Scherrer foram utilizadas para o cálculo estimado dos tamanhos médios dos domínios cristalinos das

amostras de magnetita e maguemita (CULLITY, 1978). Também foram calculados os parâmetros de rede das referidas amostras. Os dados foram refinados com o programa Basic Process, fornecido pela Schimadzu, para a determinação das distâncias interplanares. Utilizou-se o programa UnitCell, disponibilizado no site da União Internacional de Cristalografia, para os cálculos dos parâmetros de rede.

2.14.3 Espectroscopia na região do infravermelho

As nanopartículas puras e funcionalizadas foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Os espectros foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro FTIR Bomem, série MB 100, com acessório de refletância difusa tipo coletor, com diluição das amostras em KBr 1%, usando 128 varreduras, com resolução de 4 cm^{-1} , radiação de fundo com KBr e microsuporte de 3mm de diâmetro. Os fluidos foram colocados em estufa a 80°C por 24h, para obtenção dos pós para as referidas análises.

2.14.4 Medidas de diâmetro hidrodinâmico (d_h) e de potencial zeta (ζ) por espalhamento de luz.

As medidas de diâmetro hidrodinâmico e de potencial zeta foram realizadas no equipamento Zetasier Nano ZS90 da marca Malvern Instruments. Este equipamento utiliza a técnica de espalhamento dinâmico da luz, também conhecida como espectroscopia de fotocorrelação (PCS) e Quase-Elastic Light Scattering, para a determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas em dispersões. Através da medida de flutuações na intensidade de luz espalhada pela amostra em função do tempo, o programa que acompanha o equipamento da Malvern, calcula a função de autocorrelação ($G(\tau) = A[1 + B\exp(-2\Gamma\tau)]$), que relaciona as flutuações da intensidade de luz espalhada no tempo t , com aquelas num tempo $t + \delta t$, onde τ é igual às diferenças nos tempos de medidas. Os parâmetros A , B e Γ são calculados, sendo Γ por sua vez, função do coeficiente de difusão translacional, segundo a equação 5.

Equação 8

$$\Gamma = D q^2$$

Para a qual, o fator de espalhamento de luz, (q) é dado por $q = (4\pi n/\lambda_o)\sin(\theta/2)$, sendo n = índice de refração do líquido dispersor; λ_o = comprimento de onda do Laser, e θ = ângulo de espalhamento.

Uma vez que o coeficiente de difusão foi determinado a partir da medida de espalhamento de luz, o programa utiliza a equação de Einstein-Stokes (equação 6), para a determinação do diâmetro hidrodinâmico d_H . Sendo, D = coeficiente de difusão das partículas; k_B = constante de Boltzmann ($1,3807 \times 10^{-23} \text{ NmK}^{-1}$); T = temperatura absoluta, η = viscosidade do solvente ; d_H = diâmetro hidrodinâmico.

Equação 9

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_H}$$

A medida de potencial zeta é realizada a partir da medida de mobilidade eletroforética para a qual, o equipamento da Malvern utiliza a tecnologia do Velocímetro Laser Doppler.

Quando uma suspensão coloidal é submetida a uma variação de potencial, as partículas carregadas em suspensão são atraídas para o eletrodo de carga oposta. A velocidade de migração sob efeito do campo elétrico é definida como mobilidade eletroforética. O potencial zeta (ζ) é relacionado com a mobilidade eletroforética através da equação de Henry (equação 7), que utiliza os seguintes parâmetros:

U_E = mobilidade eletroforética, ζ = potencial zeta, ϵ = constante dielétrica do meio dispersor, η = viscosidade do meio dispersor, $f(Ka)$ = função de Henry.

Equação 10

$$U_E = \frac{2 \epsilon \zeta f(Ka)}{3\eta}$$