

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Preparação e Caracterização de Magnetolipossomas para Aplicações em Processos de Adsorção por Afinidade

Autora: Fernanda Martins

Orientadora: Maria Helena Andrade Santana

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Outubro de 1998.



99.09840

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	37508
PROC.	229199
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/04/99
N.º CPD	

CM-00122766-1

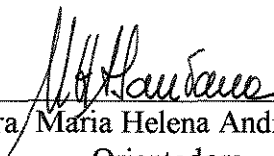
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

M366p Martins, Fernanda
Preparação e caracterização de magnetolipossomas para aplicações em processos de adsorção por afinidade. / Fernanda Martins.--Campinas, SP: [s.n.], 1998.

Orientadora: Maria Helena Andrade Santana
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Adsorção. 2. Lipossomos. 3. Campos magnéticos. I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Dissertação defendida e aprovada em 1º de outubro de 1998 pela banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Orientadora



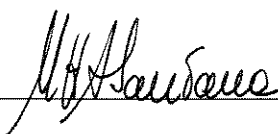
Prof. Dra. Maria de Fátima Da Silva (titular)



Prof. Dr. Leandro Rusovski Tessler (titular)

Prof. Dra. Ângela Maria de Moraes (suplente)

Esta versão corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida pela engenheira Fernanda Martins e aprovada pela Comissão Julgadora em 1º de outubro de 1998.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. H. Santana', is positioned above a horizontal line.

Profª Dra. Maria Helena Andrade Santana
Orientadora

Dedico este trabalho
aos meus pais, Sérgio e Ana Rosa,
às minhas irmãs, Paula e Virgínia,
e ao meu noivo, Walker.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª Dra. Maria Helena Andrade Santana, pela dedicação e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^ª Iris Torriani, pela ajuda fundamental nas medidas e análises feitas por SAXS.

Ao Prof^º Leandro Tessler, pela realização do projeto do reator magnético, essencial à realização dos experimentos.

Às Prof^ª Ângela Maria Moraes e Maria do Carmo Gonçalves por toda a colaboração.

À Leide Passos Cavalcanti pela análise das medidas de raios-X a baixos ângulos.

À Sônia Campos por toda a ajuda prestada.

Aos meus colegas de laboratório, e à todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão do projeto.

E agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	página
ABREVIATURAS	viii
NOMENCLATURAS	x
RESUMO	1
“ABSTRACT”	2
INTRODUÇÃO	3
OBJETIVOS	6
1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
1.1 - Fluidos Magnéticos	8
1.1.1 - Estabilidade Química	9
1.2 - Preparação de Partículas Magnéticas Coloidais	9
1.2.1 - Co-Precipitação Química	9
1.3 - Dispersão das Partículas no Meio Líquido	10
1.4 - Caracterização das Partículas Magnéticas	15
1.5 - Conceitos Básicos sobre Magnetismo	16
1.5.1 - Classificação dos Materiais Magnéticos	19
1.5.2 - Propriedades dos Materiais Ferromagnéticos	20

1.5.3 – Propriedades Magnéticas dos Fluidos Magnéticos	22
1.5.3.1 – Relaxação Browniana e de Néel	23
1.6 - Estabilidade Coloidal dos Fluidos Magnéticos	25
1.7 - Sistemas Magnéticos Multifásicos	25
1.8 - Aplicações dos Sistemas Magnéticos Vesiculares	26
1.8.1 - Suporte e Direcionamento de Drogas	27
1.8.2 - Classificação e Separação de Células	28
1.8.3 - Processos de Purificação de Biomoléculas	29
1.8.4 - Imobilização de Enzimas e Proteínas	30
1.8.5 - Estudo da Deformação de Membranas	31
1.8.6 - Processos de Hipertermia	31
1.9 - Lipossomas	33
1.9.1 - Estrutura	33
1.9.2 - Fases do Sistema	35
1.9.3 - Métodos de Preparação de Lipossomas Convencionais	37
1.9.3.1 - Método da Hidratação do Filme	37
1.9.3.2 - Método do Esgotamento do Detergente	37
1.9.3.3 - Métodos de Injeção	38
1.9.3.4 - Métodos de Emulsificação	39
1.9.3.5 - Homogeneização do Tamanho dos Lipossomas	39
a) Extrusão	39
b) Sonicação	40
1.9.4 - Aplicações de Lipossomas em Processos de Purificação de Biomoléculas por Afinidade	40
1.9.4.1 - Ultrafiltração de Afinidade	40
1.9.4.2 - Processos de Cromatografia	43

1.10 - Magnetolipossomas	45
1.10.1 - Preparação e Características Estruturais	45
1.10.2 - Aspectos do Mecanismo de Adsorção	47
1.11 - Adsorção sobre Superfície Sólida	49
1.11.1 - Características Gerais	49
1.11.2 - Isotermas de Adsorção	51
1.11.2.1 - Isoterma de Adsorção de Gibbs	54
1.11.2.2 - Isoterma de Langmuir	56
1.11.3 - Adsorção por Afinidade	57
2 - MATERIAL	59
3 - MÉTODOS	61
3.1 - Síntese e Estabilização da Magnetita Coloidal	61
3.2 - Caracterização da Magnetita Coloidal	62
3.2.1 - Dosagem de Ferro	62
3.3 - Preparação dos Lipossomas	64
3.3.1 - Método da Hidratação do Filme Seco	64
3.3.2 - Obtenção de Vesículas Unilamelares - Homogeneização dos Tamanhos	64
3.4 - Caracterização dos Lipossomas	65
3.4.1 - Dosagem de Fosfolípidios	65
3.4.2 - Dosagem do Teor de DMPE	66
3.5 - Preparação dos Magnetolipossomas	67

3.5.1 - Separação dos Fosfolipídios não Adsorvidos	69
3.5.1.1 - Sistema de Magnetoforese	69
3.6 - Caracterização dos Magnetolipossomas	70
3.6.1 - Experimentos para a Construção dos Perfis de Adsorção	70
3.6.1.1 - Cinética de Adsorção	70
3.6.1.2 - Isoterma de Adsorção	73
3.6.2 - Identificação da Formação da Bicamada Lipídica	73
3.6.3 - Determinação do Tamanho das Partículas Formadas	74
3.6.3.1 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	74
3.6.3.2 - SAXS: Raio-X a Baixos Ângulos	75
3.6.3.3 - Estabilidade da Bicamada Lipídica	75
7 - Influência do Tratamento Inicial dos Lipossomas na Adsorção dos Fosfolipídios sobre a Magnetita	76
3.8 - Estabilidade dos Magnetolipossomas no Processo de Magnetoforese	77
3.9 - Caracterização da Operação do Sistema de Magnetoforese	77
3.9.1 - Vazões de Operação (Retenção e Liberação)	77
3.9.2 - Saturação da Lã Magnética	77
3.9.3 - Aquecimento do Sistema	78
3.9.4 - Capacidade de Retenção dos Magnetolipossomas	78
3.9.4.1 - Intensidade da Corrente	78
3.9.4.2 - Influência da Posição da Lã Magnética	78
3.10 - Avaliação da Aplicação dos Magnetolipossomas em Processos de Adsorção por Afinidade	79
3.10.1 - Modificação da Superfície dos Magnetolipossomas	79

3.10.1.1 - Preparação dos PAB – ML's	79
a) Etapa I: Acoplamento de Espaçador às Vesículas	79
b) Etapa II: Acoplamento do PAB	80
c) Etapa III: Derivatização dos Grupos Ácido Carboxílico Não Reagidos	80
3.10.2 - Caracterização da Adsorção da Tripsina	82
3.10.2.1 - Determinação da Concentração de PAB na Superfície dos Magnetolipossomas	82
3.10.2.2 - Análise da Atividade da Tripsina	82
3.10.2.3 - Cinética de Inibição da Tripsina pelos PAB – ML's	82
3.10.2.4 - Análise da Benzamidina	83
3.10.2.5 - Dosagem de Proteína	83
3.10.3 - Retenção da Atividade da Tripsina aos PAB – ML's	84
3.10.4 - Perfis de Adsorção e Dessorção da Tripsina	84
 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	 86
 4.1 - Síntese e Caracterização da Magnetita Coloidal	 86
 4.2 - Dosagem de Ferro	 86
4.2.1 - Influência da Concentração da Água Régia na Conversão dos Óxidos de Ferro em Sais de Ferro	86
 4.3 - Caracterização dos Lipossomas	 87
4.3.1 - Teor Total de Fosfolipídios	87
4.3.2 - Teor Total de DMPE	87
 4.4 - Preparação dos Magnetolipossomas	 88
4.4.1 - Influência do Colesterol	88
4.4.2 - Cinética de Adsorção de Fosfolipídios sobre Magnetita Estabilizada com Ácido Láurico	88

4.4.3 - Relação entre DMPC / DMPE Adsorvidos	91
4.4.4 - Isoterma de Adsorção	92
4.4.5 - Identificação da Formação da Bicamada Lipídica	95
 4.5 - Determinação do Tamanho das Partículas Formadas	 97
4.5.1 - Microscopia Eletrônica de Transmissão Eletrônica (MET)	97
4.5.2 - Raios-X a Baixos Ângulos	99
4.5.3 – Estimativa Teórica da Formação da Bicamada Lipídica	100
4.5.4 – Estabilidade da Bicamada Lipídica em Presença de Tensoativo	101
 4.6 - Influência do Tratamento Inicial dos Lipossomas na Adsorção dos Fosfolípidios sobre a Magnetita	 104
 4.7 - Estabilidade dos Magnetolipossomas no Processo de Magnetoforese	 105
 4.8 - Caracterização da Operação do Sistema de Magnetoforese	 106
4.8.1 - Vazões de Operação (Retenção e Liberação)	106
4.8.2 - Saturação da Lã Magnética	108
4.8.3 - Aquecimento do Sistema	108
4.8.4 - Capacidade de Retenção dos Magnetolipossomas	109
4.8.4.1 - Intensidade da Corrente	109
4.8.4.2 - Influência da Posição da Lã Magnética	110
 4.9 - Avaliação da Aplicação dos Magnetolipossomas em Processos de Adsorção por Afinidade	 111
4.9.1 - Modificação da Superfície dos Magnetolipossomas	112
4.9.1.1 - Concentração de PAB na Superfície dos Magnetolipossomas	112
4.9.1.2 – Estimativa da Eficiência de Acoplamento do PAB nos ML's	114
4.9.2 - Retenção da Atividade da Tripsina	116
4.9.3 - Perfis de Adsorção e Dessorção da Tripsina nos PAB-ML's	117

5 - CONCLUSÕES	119
6 - SUGESTÕES	121
7 - REFERÊNCIAS DA LITERATURA	122

ABREVIATURAS

c.m.c: concentração micelar crítica
Col: colesterol
DL-BAPNA: *N*-benzoil-DL-arginina *p*-nitroanilida
DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina
DMPE: dimiristoilfosfatidiletanolamina
DMPG: dimiristoilfosfatidilglicerol
DMPG - ML: magnetolipossoma de dimiristoilfosfatidilglicerol
DOPC: dioleilfosfatidilcolina
DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina
DSPC: diesteroilfosfatidilcolina
Fe₃O₄: magnetita
γ Fe₂O₃: maghemita
MAG: magnetoforese de alto gradiente
CIH: cromatografia de interações hidrofóbicas
BHL: balanço hidrofílico-lipofílico
CLAP: cromatografia líquida de alta performance
MAI: membrana artificial imobilizada
LB: Langmuir-Blodgett
VOL: vesícula oligolamelar
VUG: vesícula unilamelar grande
ML's: magnetolipossomas
VML: vesícula multilamelar
SFSM: suporte de fase sólida magnética
LMV: lipossoma multivesicular
PAB: *p*-aminobenzamidina
PAB-ML's: magnetolipossomas com PAB acoplados à superfície
ML-PC: magnetolipossoma de fosfatidilcolina
PC: fosfatidilcolina
PE: fosfatidiletanolamina

PEG: polietilenoglicol

PG: fosfatidilglicerol

PL: fosfolípido

PS: fosfatidilserina

VUP: vesícula unilamelar pequena

Tiron: 1,3 ácido benzenossulfônico - 4,5 - dihidróxi

TNBS: ácido trinitrobenzenossulfônico

5FU: 5-fluorouracil

NOMENCLATURAS

A: energia livre de Helmholtz

a_o : área superficial ótima

B: indução magnética ($T = Vs/m^2$)

E_i : energia de interação entre as partículas

F: força magnética ($A.V.s$)

G: energia livre de Gibbs

H: campo magnético (A/m)

H: entalpia

H_c : coercividade

i: corrente elétrica (A)

K : constante de equilíbrio

K_a : constante elástica de curvatura

$k_B T$: energia térmica de flutuação

K_c : constante elástica extensional

k_1 : constante da taxa de pseudo-primeira ordem (h^{-1})

l_c : comprimento crítico da cadeia ou cadeias de hidrocarboneto

m: momento de dipolo magnético (Am^2)

M: magnetização (A/m)

M_0 : magnetização saturada (A/m)

S: entropia

$t_{1/2}$: tempo de meia vida (h)

T_C : temperatura crítica da transição de fase ($^{\circ}C$)

U: energia interna

μ : permeabilidade do meio ($Vs/Am = H/m$)

μ : potencial químico

χ : susceptibilidade magnética

τ : torque sobre dipolo magnético ($A.V.s$)

Γ : quantidade de PL adsorvidos / g de partículas magnéticas (mmol/g)

π : expansão da pressão bidimensional

ϕ : expansão da pressão tridimensional

RESUMO

Magnetolipossomas são vesículas formadas pela adsorção de fosfolípidios na superfície de partículas de um fluido magnético coloidal, tal como a magnetita. Essas vesículas apresentam uma estrutura na qual os fosfolípidios, agregados na forma de bicamada, encapsulam o ferrofluido no seu interior. Os lipossomas assim constituídos preservam as propriedades da sua bicamada lipídica, além disso podem ser capturados da solução ou direcionados para sítios específicos pela ação de um alto gradiente de campo magnético.

Atualmente, as pesquisas no campo de partículas magnéticas vêm se intensificando pela importância de suas aplicações em várias áreas da ciência. A literatura sobre magnetolipossomas, porém, ainda é escassa. Os trabalhos concentram-se na preparação e caracterização de vesículas constituídas de um único componente lipídico, sem modificações químicas na superfície. As principais aplicações estudadas foram na área médica, mais especificamente na liberação controlada de medicamentos.

Neste trabalho, magnetolipossomas foram preparados e caracterizados para aplicações em processos de adsorção por afinidade. Essas aplicações contemplam a utilização de lipossomas em terapia extracorpórea, como biossensores, em diagnóstico, além de veículos para encapsulamento e liberação controlada de medicamentos. A potencialidade do sistema foi analisada na adsorção da tripsina utilizando *p*-aminobenzamidina, PAB, como ligante de afinidade.

Os magnetolipossomas foram preparados por adsorção dos fosfolípidios dimiristoil fosfatidil etanolamina, DMPE, e dimiristoil fosfatidil colina, DMPC, na superfície de magnetita coloidal, previamente sintetizada a partir de cloretos de ferro e estabilizada com ácido láurico. Essas vesículas foram capturadas da solução através de um sistema de magnetoforese de alto gradiente. A superfície dos magnetolipossomas foi modificada através da ligação covalente de PAB, um inibidor da tripsina. As vesículas foram caracterizadas quanto ao diâmetro, estabilidade na presença de tensoativo, teor de fosfolípidios, magnetita, e PAB ligado à superfície.

Os resultados obtidos mostraram que a relação de saturação dos fosfolípidios adsorvidos sobre a magnetita foi de $1,29 \pm 0,04$ mmol de fosfolípidios/g de magnetita, obtida em aproximadamente 40 horas de diálise. A concentração de fosfolípidios na monocamada foi de 0,4 mmol de fosfolípidios/g de magnetita. A constante de associação, calculada pelo ajuste dos dados à Equação de Langmuir foi de $11,3 \text{ mM}^{-1}$. Os dados da cinética de adsorção obedeceram a um modelo de pseudo primeira ordem, com uma constante da taxa de reação de $0,066 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$, e um tempo de $10,5 \pm 0,3$ horas para se atingir 50% da saturação. A retenção das partículas pelo sistema de magnetoforese foi de 100% e o suporte mostrou boa estabilidade e capacidade para reutilização. Para uma concentração de PAB na superfície das vesículas de 8,9 nmol/ml, obteve-se uma adsorção de 13% de tripsina, quantificada pela sua atividade.

Essas características demonstram que há uma grande potencialidade para aplicações dos magnetolipossomas em vários processos que utilizam adsorção por afinidade.

“ABSTRACT”

Magnetoliposomes are vesicles which are made by adsorption of phospholipids in the surface of particles of the colloidal magnetic fluid, like magnetite. These particles have structures formed by phospholipids in bilayer which encapsule magnetite inside of them. These liposomes preserve almost all properties of lipidic bilayer, besides to be captured from solution or take to specific sites, by action of high gradient magnetic field.

Nowadays, the research in the field of magnetic particles increases because their applications are important in various areas of science. However, the literature about magnetoliposomes is still not long. The studies are mainly about the preparation and characterization of the vesicles made by one lipidic component only, without chemical modifications in the surface. The main applications of the magnetoliposomes are in the medical area, as vehicles to the encapsulating of therapeutic drugs and their control release.

In this work, magnetoliposomes were prepared and characterized for applications in process of adsorption by affinity. These applications lead to the use of liposomes in extrabody therapy, as biosensor, in diagnostic, and to the encapsulating and controlled release of drugs. The potenciality of the system was analyzed in the adsorption of the trypsin by the use of *p*-aminobenzamidine, PAB, like affinity ligand.

The magnetoliposomes were prepared using dimyristoil phosphatidyl ethanolamine, DMPE, and dimyristoil phosphatidyl choline, DMPC phospholipids, on the surface of colloidal magnetite, which are made from iron chlorides and stabilized by lauric acid. These vesicles were captured from the medium through a high gradient magnetophoresis system. The affinity magnetoliposomes were prepared by covalently attaching PAB, a trypsin inhibitor, to the surface of vesicles. Vesicles were characterized by diameter measurements phospholipids, magnetite, and PAB concentrations, and by their stability in the presence of surfactant.

The obtained results showed that the relation of saturation of the adsorbed phospholipids on the magnetite was $1,29 \pm 0,04$ mmol of phospholipids/g of magnetite, obtained in about 40 hours of dialysis. The concentration of the phospholipids in the monolayer was 0,4 mmol of phospholipids/g of magnetite. The association constant, obtained by adjustment of the results to the Langmuir Equation was $11,3 \text{ mM}^{-1}$. The results of the kinetic of adsorption obeyed to the model of pseudo first order, with a reaction rate of $0,066 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$, and a time of $10,5 \pm 0,3$ hours to reaches 50% of the saturation. The retention of the particles by the system of magnetophoresis was 100% and the magnetoliposomes showed good stability and ability to reutilization. A adsorption of 13% of the trypsin, which was quantified by its activity, was obtained to a concentration of 8,9 nmol/ml of the PAB in the surface of vesicles.

These characteristics show that there is a large potenciality to applications of the magnetoliposomes in several processes which use adsorption by affinity.

INTRODUÇÃO

Magnetolipossomas são vesículas formadas pela adsorção de fosfolípidios na superfície de partículas sólidas de magnetita coloidal. A cobertura lipídica formada possui estrutura de bicamada, que associada à magnetita dá origem a partículas capazes de serem separadas do meio de dispersão através de um campo magnético de alto gradiente, em um processo designado por magnetoforese.

Os magnetolipossomas fazem parte dos sistemas complexos coloidais que utilizam fluidos magnéticos. Esses sistemas compreendem principalmente as microcápsulas, emulsões, nanopartículas e vesículas. O vasto campo de aplicações destes sistemas tem conduzido à intensificação dos trabalhos de pesquisa na última década, que se concentram em sua maioria nas microcápsulas e nanopartículas. Embora com poucos trabalhos na literatura, os magnetolipossomas apresentam-se como sistemas muito promissores especialmente para aplicações na área médica.

Devido à resistência à oxidação, os colóides magnéticos mais utilizados comercialmente são preparados com os óxidos de ferro: magnetita, maghemita e bertholita. Em geral as partículas são estabilizadas no meio líquido por ácidos graxos, como o ácido láurico e o ácido oléico, que proporcionam um impedimento estérico interpartículas, dificultando a sua agregação e floculação provocadas pelas interações eletrostáticas e de Van der Waals (Berkovski, 1996).

A preparação e caracterização de nanopartículas magnéticas de maghemita, com estabilidade química maior que da magnetita, foram estudadas nos trabalhos de Da Silva et al. (1997), bem como as suas aplicações na seleção de células e caracterização de membranas celulares *in vitro* (Halbreich et al., 1997), além de seu uso na termólise de células (Bacri et al., 1997).

A adsorção de fosfolípidios sobre a magnetita foi estudada por De Cuyper e Joniau (1988) usando tipos diferentes de fosfatidilgliceróis como fosfolípidios modelo. O processo de adsorção é composto de duas etapas: a primeira envolve o comportamento de alta afinidade, com a formação da monocamada interna. Nessa monocamada os fosfolípidios são adsorvidos muito rapidamente, com suas cabeças polares orientadas na direção da superfície da magnetita. O caráter de alta afinidade da ligação foi refletido nas isotermas de dessorção, através da resistência à extração quando exposta à altas concentrações do tensoativo Tween 20. A

segunda etapa corresponde à formação da camada externa e representa a etapa limitante do processo. As isotermas de adsorção para essa camada são do tipo Langmuir, as constantes de afinidade aumentam com a natureza hidrofóbica dos fosfatidilgliceróis (De Cuyper e Joniau, 1988).

As propriedades magnéticas conferidas aos lipossomas potencializam importantes aplicações em processos biotecnológicos tais como o uso em suporte para imobilização de enzimas de membrana e utilização em processos contínuos (De Cuyper e Joniau, 1990, 1993); no estudo de membranas biológicas (Menager e Cabuil, 1995; Bacri et al., 1995); nos processos de separação seletiva de células com acoplamento de anticorpos na sua superfície (Margolis et al., 1983); como veículos para o encapsulamento e liberação controlada de drogas terapêuticas (Kiwada et al., 1986; Ishii et al., 1990), e em processos de adsorção de biomoléculas por afinidade, cuja factibilidade utilizando lipossomas convencionais foi demonstrada por Powers et al. (1990), na purificação da tripsina.

As vantagens da aplicação de lipossomas em processos de purificação de biomoléculas estão no pequeno tamanho, na capacidade de acoplamento de ligantes à superfície e na grande área superficial das vesículas, de aproximadamente $100\text{m}^2/\text{ml}$ para lipossomas compostos de DMPC/Col/DMPE (razão molar - 1:1:0,5) com raio de 300 \AA , tendo-se aproximadamente 60% das moléculas de fosfolípidios na camada externa. Essas características fazem com que não haja limitações difusionais durante o processo de adsorção e dessorção, além de tornar específica a ligação das biomoléculas.

O processo proposto por Powers et. al. (1990) para a purificação da tripsina, utiliza ultrafiltração para a separação dos lipossomas do meio. Apesar dos bons resultados obtidos na purificação, verificou-se que as altas pressões envolvidas na ultrafiltração prejudicam a estabilidade dos lipossomas diminuindo o rendimento do processo. Por outro lado, a quantidade de água utilizada na operação de ultrafiltração dilui substancialmente as frações coletadas.

Dentro desse contexto, as condições brandas da separação magnética dos magnetolipossomas do meio, apresentam-se como uma alternativa muito promissora para aplicações em processos que utilizam adsorção por afinidade. Outras vantagens da aplicação dos magnetolipossomas nesse processo, estão na simplicidade do método de captura das partículas do meio e na sua posterior liberação por retirada do campo magnético. Além disso, partículas dessa natureza não apresentam magnetização residual, dispensando a necessidade de desmagnetização ou pressão mecânica.

Um novo processo utilizando lipossomas, teria portanto as vantagens do sistema lipossomal para a adsorção de biomoléculas, associadas às vantagens da separação magnética dos lipossomas do meio e à possibilidade de operação contínua. Estas características motivaram o desenvolvimento deste trabalho.

Na primeira parte, foi feita a preparação e caracterização de magnetolipossomas ($d \cong 16\text{nm}$) constituídos de magnetita ($d \cong 9\text{ nm}$) e da mistura dos fosfolipídios dimiristoil fosfatidil colina (DMPC) e dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPE), na proporção molar de 4:1, respectivamente. A fosfatidil colina é geralmente usada na preparação de vesículas estáveis projetadas para várias aplicações. A presença de moléculas de DMPE possibilita o acoplamento de ligantes de afinidade na superfície das partículas. Lipossomas com essa composição são adequados para aplicações em processos de separação por afinidade, dentre outros.

A captura dos magnetolipossomas do meio foi feita por magnetoforese de alto gradiente, cujo campo magnético foi provido por um eletroímã de pólo dividido projetado para induzir um campo magnético de 1,8T. Imerso no campo magnético foi colocado um tubo de vidro de 2,5 mm de diâmetro interno recheado com lã magnética, cuja função é gerar inomogeneidades no campo causando um gradiente, fundamental para a captura dos magnetolipossomas. A construção do sistema de magnetoforese e as condições operacionais usadas na captura das partículas são apresentadas neste trabalho.

O estudo da adsorção de fosfolipídios nas partículas de magnetita coloidal foi feito a partir de dados experimentais obtidos de análises do teor total de fosfolipídios e de magnetita na solução original, e nas frações retidas e eluídas nas lavagens. Além disso, os magnetolipossomas foram caracterizados quanto ao diâmetro, estabilidade na presença de tensoativo, teor de fosfolipídios, magnetita e PAB ligado à superfície.

Na segunda parte, foi realizada a caracterização da operação do sistema de magnetoforese em relação à capacidade de retenção das vesículas em função da intensidade do campo magnético, da vazão de alimentação, concentração de fosfolipídios para a saturação da lã magnética e do posicionamento da lã magnética no tubo.

Finalmente, na última parte do trabalho, foi analisada a potencialidade da utilização dos magnetolipossomas em processos de adsorção por afinidade. A análise foi feita usando a tripsina como enzima modelo e a *p*-aminobenzamidina como ligante de afinidade.

A metodologia utilizada e os resultados obtidos são apresentados neste trabalho.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo da preparação e caracterização dos magnetolipossomas, e a análise da sua potencialidade para aplicações em processos de adsorção de biomoléculas por afinidade.

O desenvolvimento do trabalho envolve os seguintes objetivos específicos:

- síntese da magnetita e estabilização do fluido magnético com ácido láurico;
- preparação de lipossomas unilamelares pela hidratação do filme seco de lipídios e extrusão em membrana de policarbonato;
- preparação dos magnetolipossomas por processo de diálise;
- determinação das condições de operação do sistema de magnetoforese;
- avaliação da eficiência do processo de captura dos magnetolipossomas do meio;
- obtenção dos perfis da cinética de adsorção do DMPC/DMPE sobre a magnetita, da isoterma de adsorção à 37°C e de extração dos fosfolipídios adsorvidos com tensoativo Triton X-100;
- caracterização do tamanho dos magnetolipossomas por raios-X a baixos ângulos e a sua estabilidade em presença de tensoativo;
- avaliação da estabilidade dos magnetolipossomas no processo de magnetoforese;
- imobilização do ligante de afinidade *p*-aminobenzamidina (PAB) na superfície dos magnetolipossomas;
- análise do desempenho do sistema magnético no processo de adsorção da enzima tripsina.

1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os fluidos magnéticos representam uma nova classe de materiais usados em engenharia. As primeiras tentativas de se obter um ferrofluido foram realizadas em 1779 por Gowan Knight, porém os fluidos magnéticos tiveram seus estudos científicos intensificados somente há cerca de 30 anos atrás. Atualmente esses materiais têm se tornado muito úteis do ponto de vista tecnológico, com muitas aplicações de engenharia nas mais diversificadas indústrias, como a de semicondutores, audios, amortecedores, de produtos médicos e de instrumentação. A versatilidade desses materiais torna o escopo das suas aplicações muito amplo, e se prevê um crescimento rápido tanto na pesquisa básica como em produtos comerciais.

Além das várias aplicações, os fluidos magnéticos podem também ser usados para produzir outros sistemas magnéticos tais como filmes, microesferas, e géis. Na sua forma estável, esses fluidos são monofásicos e podem constituir uma das fases de sistemas polifásicos tais como microemulsões magnéticas e cápsulas, fases magnéticas ordenadas, e vesículas magnéticas, dentre outros. Misturados a outros colóides, eles formam compósitos com propriedades específicas. Esses sistemas complexos possuem um vasto campo de aplicações.

Os magnetolipossomas fazem parte dos sistemas polifásicos que se apresentam na forma de vesículas magnéticas de fosfolipídios. Sua preparação envolve inicialmente a síntese e estabilização de um fluido magnético em meio aquoso, seguida do envolvimento das partículas com fosfolipídios agregados na forma de bicamada. A estrutura resultante é a de um lipossoma encapsulando o fluido magnético.

A preparação dos magnetolipossomas envolve os aspectos ligados à preparação e estabilização de fluidos magnéticos coloidais, a preparação de lipossomas, e a formação do sistema polifásico resultante da interação dos lipossomas com o fluido magnético.

O estudo dos fluidos magnéticos e dos sistemas derivados desses fluidos é essencialmente interdisciplinar e abrange um amplo campo da ciência, que vai desde a físico-química e o comportamento termodinâmico desses fluidos até a dinâmica da magnetização de colóides. No entanto, a revisão bibliográfica, aqui apresentada, será restrita aos aspectos pertinentes ao escopo deste trabalho. Nesse contexto, a abordagem dos sistemas magnéticos complexos se concentrará nos aspectos envolvidos na preparação e caracterização dos magnetolipossomas, e nas suas aplicações biotecnológicas.

1.1 - Fluidos Magnéticos

Os fluidos magnéticos, ou colóides magnéticos, são compostos por partículas ferromagnéticas ($\sim 100\text{\AA}$), em geral, suspensas num líquido carreador (água, querosene, fluocarbonos, ésteres). Estas suspensões, que são ultra-estáveis, possuem a fluidez de uma solução homogênea, comportam-se como líquidos isotrópicos e possuem alta susceptibilidade magnética.

Quando aplicamos um campo magnético sobre esse fluido, as partículas se orientam paralelamente ao mesmo, sendo que ao desligarmos o campo elas retornam ao seu estado inicial, com orientação magnética arbitrária de suas partículas, devido à ação da energia térmica. Esse fenômeno é denominado superparamagnetismo extrínscico.

Para que produzam uma substância estável, as partículas ferromagnéticas têm que ser pequenas o suficiente para permanecerem suspensas no líquido carreador através de agitação térmica. Esta, por sua vez, deve ter maior importância do que a interação magnética atrativa de longo alcance, interação dipolar, para evitar a aglomeração de partículas e consequente destruição do fluido magnético; além disso, essas partículas devem possuir uma repulsão de curto alcance que previna a aglomeração devido à interação atrativa do tipo Van der Waals.

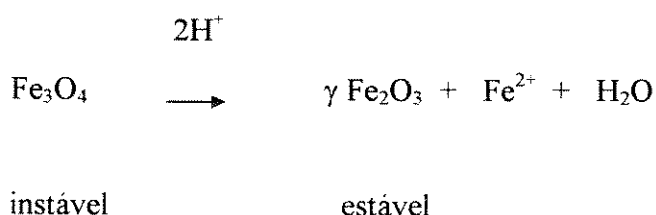
As partículas usadas nos colóides magnéticos são geralmente as ferritas, óxidos de ferro tais como a magnetita, bertholida e maghemita. Essas partículas são adequadas devido à sua resistência à oxidação, embora possuam níveis menores de saturação magnética que os metais de transição. Quando as partículas são cobertas com tensoativos formam dispersões em meios aquosos ou não, e devido às suas dimensões o movimento Browniano é suficiente para mantê-las estáveis na dispersão.

Os colóides magnéticos têm sido usados comercialmente em vários equipamentos tais como selos, aparelhos para surdez, etc. Numerosas patentes e artigos científicos foram publicados relacionados à preparação, propriedades e suas aplicações. Uma extensa revisão sobre o estado da arte de fluidos magnéticos foi editada por Berkovski (1996) de cuja referência provêm os conceitos e definições apresentados acima.

1.1.1 - Estabilidade Química

Embora a maioria dos óxidos seja inerte ao oxigênio, a magnetita pode ser oxidada para maghemita, $\gamma \text{Fe}_2\text{O}_3$. A oxidação em presença de ar é lenta, porém é muito rápida para a magnetita obtida por co-precipitação. Aproximadamente 40% do ferro ferroso é oxidado a ferro férrico em 1 hora após a co-precipitação.

A magnetita é estável em meio alcalino, porém em meio ácido é decomposta em maghemita, que é a forma mais estável, segundo a reação:



Em geral, os fluidos magnéticos necessitam de uma forte proteção contra a oxidação. Os óxidos de ferrita são estáveis em solventes orgânicos, porém em soluções aquosas para manter a sua estabilidade deve-se prevenir a presença de complexantes ou agentes redutores e o pH ácido.

1.2 - Preparação de Partículas Magnéticas Coloidais

Partículas magnéticas de dimensões coloidais podem ser preparadas por moagem úmida de ferritas. O método, usa um moinho de bolas e tensoativo como aditivo para a separação das partículas no líquido suporte. O processo apesar de simples é muito lento (cerca de 1000 horas), comparado com a precipitação química, que é o processo mais usado para a produção dessas partículas.

1.2.1 - Co-Precipitação Química

Esse método envolve a co-precipitação de íons férrico e ferroso (Fe^{++} e Fe^{+++}) e outros íons, usando excesso de base, resultando na formação de óxidos de ferro. Além do menor tempo de processo, esse método apresenta outras vantagens tais como a flexibilidade da

variação da composição das partículas pela incorporação de diferentes íons metálicos, e da variação do diâmetro das partículas pelo uso de diferentes álcalis. A distribuição de tamanho das partículas obtida com esse método é mais estreita do que a obtida com a moagem úmida.

Para produzir magnetita por co-precipitação, a razão entre os sais de Fe^{+++} e Fe^{++} na mistura deve ser teoricamente 2. Estudos feitos por Reimers e Khalafalla (1976), mostraram que a máxima saturação na magnetização ocorre quando essa razão é de aproximadamente 1,75. Entretanto, a maior parte dos trabalhos incluindo os mais recentes, usam a razão 2 para a mistura de sais. Isso é atribuído à maior susceptibilidade do Fe^{++} à oxidação pelo ar em meio aquoso, resultando na formação de uma mistura de óxidos de ferro (bertholida). A preparação de maghemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, é obtida quando as partículas são totalmente oxidadas por fervura com nitrato de ferro aquoso. A maghemita possui magnetização mais baixa que a magnetita, mas é quimicamente estável na maioria das condições. Para que a saturação seja atingida com as ferritas, é requerida uma intensidade de campo de aproximadamente 20 T, ao invés de aproximadamente 1 T, como é o campo de referência usual (Berkovski, 1996).

1.3 - Dispersão das Partículas no Meio Líquido

As partículas ferromagnéticas são sólidos cristalinos, e não possuem afinidade por líquidos. Portanto, agentes dispersantes devem ser usados para a sua formulação em meio líquido. A descrição e discussão dos métodos aqui apresentados referenciam-se à revisão sobre fluidos magnéticos editada por Berkovski (1996).

Na maioria das formulações comerciais, o meio líquido é apolar, constituído de solventes orgânicos, e as partículas magnéticas são dispersas, estabilizadas, através da interação com moléculas de tensoativos. Esses compostos são constituídos de uma cabeça polar, hidrofílica, e uma cauda não polar, lipofílica. As moléculas de tensoativo são adsorvidas sobre a superfície das partículas pela sua extremidade polar, e a partícula resultante torna-se lipofílica, tal como mostrada na Figura 1.

A camada de tensoativo adsorvida aumenta a estabilidade coloidal através da repulsão estérica, impedindo a agregação das partículas, que é induzida pelas forças de atração de Van der Waals e pelas interações de dipolos magnéticos. Assim, as moléculas de tensoativo sobre a superfície das partículas formam uma camada protetora, aumentando a distância mínima entre as partículas.

Os tensoativos mais usados para esse tipo de estabilização de colóides são os ácidos graxos láurico e oléico, ou estearilamina e/ou álcool estearil. A adsorção dos tensoativos na superfície das partículas pode ser descrita através de dois mecanismos: interação eletrostática e formação de complexo. A Figura 1 ilustra esses mecanismos.

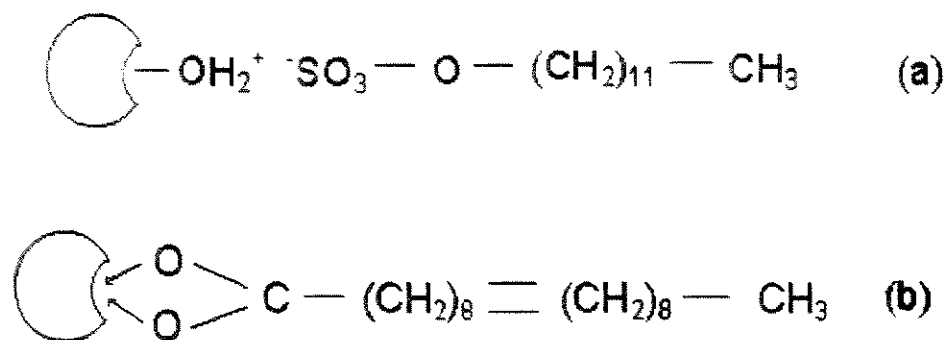


Figura 1: Fluidos magnéticos em ciclohexano. Exemplos de recobrimento da superfície das partículas com o tensoativo. (a): via interação eletrostática (dodecil sulfato de sódio); (b): via complexação superficial (ácido oléico). (Adaptado de Berkovski, 1996).

O mecanismo de interação eletrostática envolve as cargas da superfície das partículas e da cabeça polar das moléculas do tensoativo. Para os óxidos de ferro, as cargas da superfície são devidas aos átomos de oxigênio, e o sinal da carga depende do pH do meio. O grupo polar do tensoativo liga-se à superfície da partícula pela atração eletrostática e efeito de compensação de cargas. As moléculas são deslocadas quando a carga da superfície é revertida ou anulada. Esse mecanismo aplica-se a tensoativos aniônicos e catiônicos.

O mecanismo da formação de complexo envolve uma interação química entre o tensoativo e a superfície das partículas. Embora a ligação covalente não seja observada, os átomos de metal da superfície podem ser ligados com grupos polares por meio de uma ligação de coordenação. Nesse modelo, o grupo polar é considerado como ligante. Grupos carboxílicos, COO^- , são considerados bons ligantes para átomos de metais de transição. Portanto, ácidos graxos são facilmente adsorvidos sobre a superfície dos óxidos de ferrita ou partículas metálicas. A ligação por esse mecanismo, não depende do sinal da carga da superfície das partículas nem do pH do meio.

Para ambos os mecanismos, um bom tensoativo deve conter um grupo polar de alta afinidade pela superfície da partícula, e uma cauda lipofílica que seja muito solúvel no meio

líquido. Essas características no entanto não podem ser analisadas isoladamente, mas através do balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) do tensoativo, o qual é definido pela Equação 1 (Schick,1987). Segundo Massart (1996) uma boa estratégia para a escolha do tensoativo é ajustar o seu BHL para o do meio apolar no qual as partículas devem ser dispersas.

$$HLB = \frac{\%E_y}{5} = \frac{20.mH}{mH + mL} \tag{1}$$

onde: E_y é a porcentagem do peso molecular da porção hidrofílica (polioxietileno), mH é a massa molecular da porção hidrofílica da molécula de tensoativo e mL a massa da porção lipofílica da molécula de tensoativo.

A cobertura, ou a quantidade de moléculas de tensoativos na superfície, depende da concentração do tensoativo no meio. Concentrações muito baixas induzem a dessorção do tensoativo da superfície, de modo a manter o equilíbrio entre adsorção e dessorção. Por outro lado, altas concentrações de tensoativo produzem uma superfície hidrofílica devido à formação de uma segunda camada de tensoativo adsorvido (Massart, 1996). Na Figura 2 é ilustrado o efeito da concentração de tensoativo sobre a cobertura da superfície das partículas.

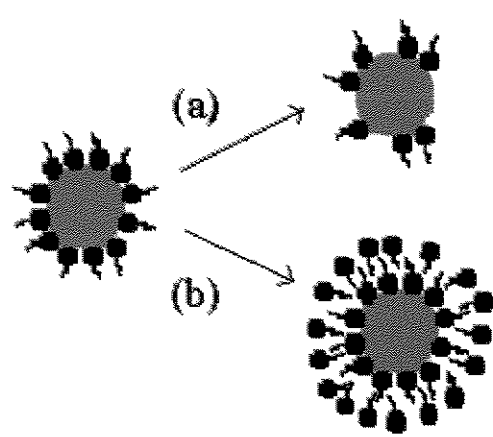


Figura 2: Influência da concentração de tensoativo livre: (a) dessorção de tensoativo por diminuição da concentração de tensoativo livre; (b) formação de uma bicamada hidrofílica por aumento de tensoativo livre. (Adaptado de Berkovski, 1996).

Em aplicações biomédicas, a água é o meio líquido no qual as partículas magnéticas devem ser dispersas. Em meio polar, a superfície das partículas deve ser carregada ou ter

caráter hidrofílico. Nesse meio, a estabilização das partículas é feita por dois métodos: formação de uma bicamada de tensoativo ou pela presença de íons sobre a superfície das partículas.

Em ambos os casos, os ácidos graxos são os principais tensoativos usados. Através da adsorção da primeira camada de tensoativo a superfície torna-se hidrofóbica. Com a continuidade da adsorção há a formação da bicamada e a carga da superfície é revertida ou torna-se neutra. Em ambos os casos, a formação da bicamada expõe as cabeças polares do tensoativo ao meio líquido, tornando hidrofílica a superfície das partículas. Na Figura 3 é apresentado um esquema da estabilização das partículas por esse método.

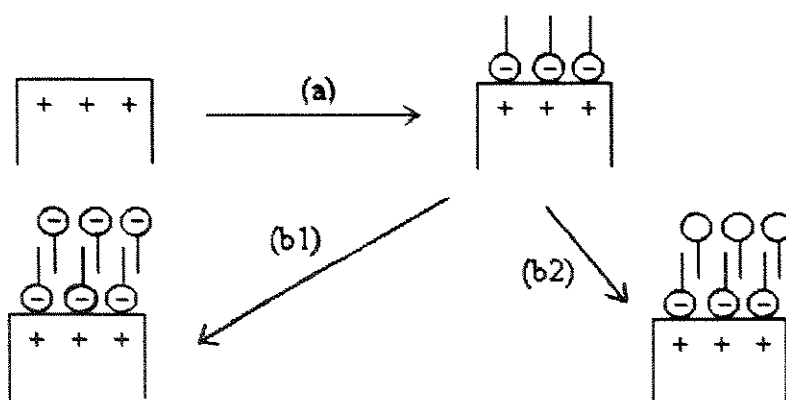


Figura 3: Formação da bicamada hidrofílica: (a) camada monomolecular com tensoativo aniônico (superfície com carga positiva); (b) camada bimolecular; (b1) carregada negativamente pela adição de um segundo tensoativo aniônico; (b2) neutra por adição de um tensoativo não iônico. (Adaptado de Berkovski, 1996).

A estabilização obtida por esse processo é devida à repulsão das partículas causada pelo impedimento estérico produzido pelas cadeias de tensoativo, ou pelos grupos carregados orientados na direção do meio aquoso.

De Cuyper e Joniau (1988) e Sinkai et al. (1994) observaram que o ácido láurico é o ácido graxo mais efetivo para a estabilização de partículas de magnetita. Shimoizaka (1996) estudou a estabilização de partículas de ferrita. O processo foi eficiente com a cobertura da primeira camada feita com oleato, e a segunda camada com tensoativo aniônico com 8 a 30 átomos de carbono ou não-iônico com 8 a 20 átomos de carbono. Além disso, os BHL's dos

tensoativos devem ser maiores que 12. A estabilidade do fluido magnético depende também do pH e da força iônica do meio (Morais et al., 1995).

Além dos ácidos graxos, as partículas magnéticas podem ser estabilizadas por mecanismos semelhantes através do recobrimento com polímeros hidrofílicos tais como as dextranas contendo grupos OH. Esse tipo de estabilização é usado nas aplicações das partículas magnéticas como contrastes de imagens médicas (Oksendal et al., 1993).

Nesse processo, as cargas são geradas por pequenos íons ligados quimicamente à superfície dos óxidos. Esses íons são produzidos por reações ácido-base. Assim, sobre a superfície das partículas de óxido de ferro, os átomos de ferro são ligados na forma de ponte por grupos OH. Esse grupo tem caráter anfotérico e torna-se catiônico, OH_2^+ , em meio ácido, e O^- em meio alcalino. Uma outra fonte de cargas sobre a superfície é através da complexação de ligantes aos átomos da superfície. Um exemplo é a adsorção específica do íon citrato através da ligação aos átomos de ferro pelo seu grupo carboxílico. Em aplicações médicas, a presença de cargas é usada para se associar drogas diretamente à superfície das partículas. Um esquema desse tipo de estabilização é apresentado na Figura 4.

Através do equilíbrio ácido - base, a densidade superficial das cargas das partículas (Σ) pode ser progressivamente e reversivelmente modificado: se $|\Sigma|$ for suficientemente grande, partículas do fluido magnético estarão em uma solução (SOL). Ao redor do ponto de carga zero (PZC), onde $\Sigma = 0$, a repulsão eletrostática interpartículas é muito pequena e as partículas são levadas à floculação (FLOC). O valor de PZC é relacionado a natureza química das cargas superficiais.

O número (1), do lado esquerdo da Figura referida mostra um esquema relativo à um fluido magnético citratado, em que partículas magnéticas são cobertas com ligantes citrato ($-\text{LH}$). O número (2) que se encontra do lado direito é referente a um fluido magnético precursor, em que partículas magnéticas são cobertas com ligantes $-\text{OH}$.

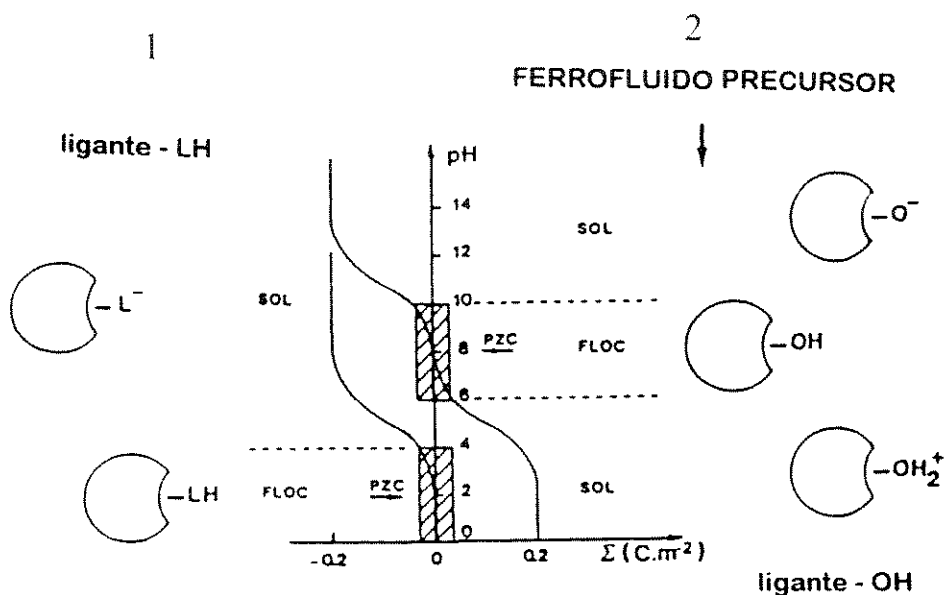


Figura 4: Faixa de estabilidade de fluidos magnéticos iônicos. Σ , densidade superficial das cargas das partículas, que é uma função do pH do meio.

1.4 - Caracterização das Partículas Magnéticas

As partículas magnéticas dispersas no meio líquido são caracterizadas pelo teor de ferro e pelo seu tamanho. O teor de ferro pode ser medido por absorção atômica usando o reagente o-phenanthrolina (Kiwada et al., 1986), ou através de método colorimétrico usando o reagente Tiron (De Cuyper e Joniau, 1988).

A determinação do tamanho das partículas em fluidos magnéticos envolve as técnicas usuais de análise de colóides, tais como: microscopia eletrônica de transmissão, difração de raios-X, espalhamento de nêutrons ou de luz. Entretanto, outras técnicas mais específicas para partículas magnéticas podem ser usadas, tais como medidas da magnetização, espalhamento polarizado de nêutrons, medidas óticas (birrefringência, dicroísmo e potência rotatória), etc.

Os métodos de determinação do tamanho das partículas podem ser classificados em dois grupos: estáticos e dinâmicos. Os primeiros geralmente consideram médias termodinâmicas durante tempos que são longos comparados às flutuações do sistema. Esses métodos conduzem à determinação do tamanho estático das partículas (espalhamento estático de luz, raios-X de pequeno ângulo ou espalhamento de nêutrons). Os métodos dinâmicos conduzem à determinação do raio hidrodinâmico das partículas, uma vez que consideram o atrito das partículas coloidais contra as moléculas de solvente, através do coeficiente de difusão translacional ou rotacional. Esses métodos determinam a dependência temporal do espalhamento (espalhamento quase elástico de luz), ou a intensidade de luz transmitida (birrefringência transiente), ou determinam uma quantidade hidrodinâmica tal como a viscosidade. Uma descrição didática desses métodos é apresentada por Berkovski (1996).

1.5- Conceitos Básicos sobre Magnetismo

Os conceitos aqui apresentados foram extraídos da referência Jiles (1991).

Uma das idéias fundamentais em magnetismo é o conceito de campo magnético. Um campo magnético é produzido onde há carga elétrica em movimento. Isso pode ser devido a uma corrente elétrica num condutor, por exemplo. Um campo magnético é também produzido por um magneto permanente. Nesse caso não há corrente convencional mas existem movimentos orbitais e spins de elétrons (corrente Amperiana) dentro do material do magneto permanente, que leva à magnetização dentro do material e a um campo magnético externo. O campo magnético exerce uma força tanto no condutor de corrente quanto nos magnetos permanentes.

Quando um campo magnético (**H**) é gerado num meio por uma corrente, de acordo com a lei de Ampère, a resposta do meio é sua indução magnética (**B**), também chamada de densidade de fluxo. Todo meio responderá com alguma indução, e a relação entre indução magnética e campo magnético é uma propriedade chamada de permeabilidade do meio (μ). O espaço livre também é considerado um meio devido à indução magnética também ser produzida em espaço livre pela presença de campo magnético.

A indução magnética é relacionada ao campo magnético pela Equação 2:

$$\mathbf{B} = \mu \cdot \mathbf{H} \quad (2)$$

sendo: \mathbf{B} em $T = Vs/m^2$

\mathbf{H} em A/m

μ em $Vs/Am = H/m$

Em muitos meios \mathbf{B} é uma função linear de \mathbf{H} , em particular no espaço livre, em que a permeabilidade magnética (μ_0) é uma constante universal, sendo igual a $4 \pi \cdot 10^{-7} T.m/A$. Porém em outros meios, particularmente ferromagnetos e ferrimagnetos, \mathbf{B} não é função linear de \mathbf{H} , sendo que μ não é necessariamente uma constante. Em materiais paramagnético e diamagnéticos μ é constante numa faixa considerável de valores de \mathbf{H} , porém em ferromagnéticos a permeabilidade varia rapidamente com \mathbf{H} .

O efeito que um material magnético tem sobre a indução magnética quando submetido a um campo é representado pela magnetização. A intensidade desse efeito em relação à indução que pode ser observada no espaço livre depende da sua permeabilidade. Assim, os materiais podem aumentar a indução magnética como é o caso dos paramagnéticos e dos ferromagnéticos, ou diminuí-la como em diamagnetos.

Quando considera-se materiais magnéticos, primeiramente deve-se definir quantidades que representem a resposta destes materiais ao campo. Essas quantidades são o momento magnético e a magnetização. Após tais quantidades deve-se considerar a susceptibilidade, que está bastante relacionada a permeabilidade.

O circuito mais simples que pode gerar um campo magnético é o de um “loop” circular de corrente elétrica num condutor. Assim, um “loop” de corrente pode ser considerado a mais elementar unidade de magnetismo.

Se um “loop” tem área A e carrega uma corrente i , então seu momento de dipolo magnético (\mathbf{m}) é $\mathbf{m} = iA$, que tem como unidade Am^2 . O torque sobre o dipolo magnético de momento \mathbf{m} numa indução magnética \mathbf{B} é então:

$$\boldsymbol{\tau} = \mathbf{m} \times \mathbf{B} \quad (3)$$

e no espaço livre

$$\boldsymbol{\tau} = \mu_0 \mathbf{m} \mathbf{H} \quad (4)$$

Isso significa que a indução magnética \mathbf{B} tenta alinhar o dipolo, e assim, o momento \mathbf{m} encontra-se paralelo à indução. Alternativamente, considera-se que \mathbf{B} tenta alinhar o “loop” da corrente de maneira que o campo produzido por um “loop” de corrente seja paralelo a ele. A Figura 5 representa o torque no “loop” da corrente num campo magnético externo.

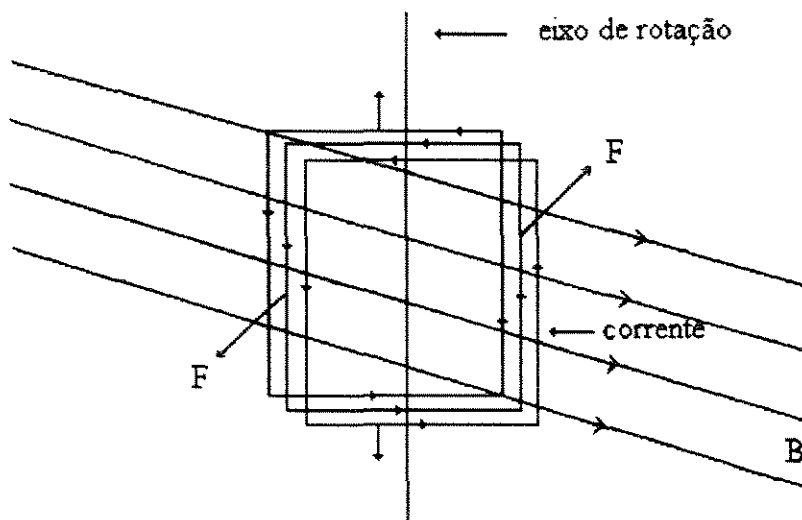


Figura 5: Torque num “loop” de corrente em um campo magnético externo.

A magnetização (\mathbf{M}), é definida como o momento magnético por unidade de volume de um sólido.

$$\mathbf{M} = \mathbf{m}/V \quad (5)$$

A outra quantidade que representa a resposta do material magnético ao campo é a susceptibilidade χ , que é definida como:

$$\chi = \mathbf{M}/\mathbf{H} \quad (6)$$

Como \mathbf{B} e \mathbf{M} podem ou não ser funções lineares de \mathbf{H} , dependendo do tipo de material ou meio, pode-se notar que a permeabilidade e susceptibilidade podem ou não ser constantes.

Quando a indução magnética é definida em termos de força exercida sobre a corrente no condutor, a expressão é representada por:

$$\mathbf{F} = \mathbf{m} \cdot \mathbf{B} \quad (7)$$

e no espaço livre:

$$\mathbf{F} = \mu_0 \mathbf{m} \cdot \mathbf{H} \quad (8)$$

Derivando a Equação 8 em termos do eixo x e substituindo \mathbf{m} , pela Equação 5 e \mathbf{M} pela Equação 6, tem-se a seguinte expressão da força sobre uma espécie de volume V, em termos das variáveis já definidas anteriormente.

$$\mathbf{F}_x = -\mu_0 \chi V \mathbf{H} \frac{d\mathbf{H}}{dx} \quad (9)$$

1.5.1 - Classificação dos Materiais Magnéticos

Os vários tipos de materiais magnéticos podem ser classificados de acordo com sua susceptibilidade (χ). O primeiro grupo desses materiais são os em que χ é pequena e negativa, $\chi \approx -10^{-5}$. Esses materiais são chamados de diamagnéticos, suas respostas magnéticas se opõem ao campo aplicado. Exemplos de diamagnetos são o cobre, a prata, o ouro, o bismuto e o berílio. Supercondutores formam outro grupo de diamagnetos em que $\chi \approx -1$.

O segundo grupo em que χ é pequeno e positivo, e normalmente entre 10^{-3} e 10^{-5} são os paramagnetos. A magnetização desses materiais é fraca mas alinhada em paralelo com a direção do campo magnético. Exemplos desses materiais são o alumínio, a platina, e o manganês.

Os mais amplamente reconhecidos materiais magnéticos são os ferromagnetos, com χ positiva e bem maior do que 1, tendo valores tipicamente entre 50 e 10000. Exemplos típicos são o ferro, o cobalto e o níquel (Jiles, 1991).

Os materiais magnéticos podem também ser classificados em relação ao seu momento magnético médio, sendo: paramagnéticos os que possuem uma distribuição randômica de spins, que resulta em momento magnético médio nulo ($\uparrow\downarrow\uparrow\downarrow\downarrow\uparrow\downarrow$); ferromagnéticos os que possuem todos os spins alinhados paralelamente num mesmo domínio, portanto com o maior momento magnético ($\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$); antiferromagnéticos, com spins vizinhos antiparalelos, e portanto com valor médio do momento magnético nulo ($\uparrow\downarrow\uparrow\downarrow$); ferrimagnéticos os que possuem vizinhos antiparalelos de magnitudes diferentes, e assim com momento magnético não nulo ($\uparrow\downarrow\uparrow\downarrow\downarrow$); e superparamagnéticos com momento magnético total maior do que os materiais paramagnéticos e menor do que os ferromagnéticos.

1.5.2 - Propriedades dos Materiais Ferromagnéticos

Os materiais ferromagnéticos possuem permeabilidade relativa alta, que usualmente situa-se entre 10 e 10^5 . Além disso, os ferromagnetos podem ser magnetizados, ou seja, uma vez expostos a um campo magnético eles retêm sua magnetização mesmo quando o campo é removido, o que não ocorre com os paramagnetos.

Outra propriedade dos ferromagnetos é possuírem histerese, que significa um atraso e é notada plotando-se a indução magnética \mathbf{B} pela força do campo \mathbf{H} .

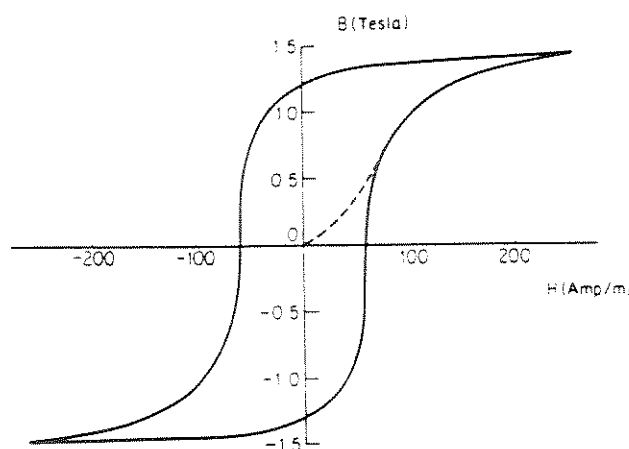


Figura 6: "Loop" típico de histerese (Adaptado de Jiles, 1991).

Através do gráfico de histerese pode-se ver que os ferromagnetos em seu estado inicial não estão magnetizados. A aplicação de um campo \mathbf{H} causa a indução magnética que cresce na direção do campo. Se \mathbf{H} cresce indefinidamente a magnetização eventualmente alcança a

saturação, no valor designado de \mathbf{M}_0 . Isso representa a condição onde todos os dipolos magnéticos dentro do material estão alinhados na direção do campo magnético \mathbf{H} . A saturação da magnetização é dependente somente da magnitude do momento magnético atômico \mathbf{m} e do número de átomos / unidade de volume n .

$$\mathbf{M}_0 = n \mathbf{m} \quad (10)$$

Para o ferro, a saturação da magnetização ocorre a 1,71T. \mathbf{M}_0 só depende do material presente e não é sensível a sua estrutura.

Para que a indução magnética seja reduzida a zero pode-se aplicar um campo magnético reverso de força \mathbf{H}_c , que é conhecida como coercividade. Essa força depende das condições da amostra, sendo afetada por fatores como tratamento térmico ou deformação.

Para se entender a organização dos momentos magnéticos dentro de ferromagnetos surgem duas questões: os momentos magnéticos são permanentes ou induzidos pelo campo, e eles são alinhados aleatoriamente ou em ordem ?

Pela teoria de domínio de Weiss, existem domínios magnéticos em ferromagnetos, nos quais os momentos magnéticos atômicos são alinhados paralelamente em grandes volumes de sólidos. Nesses domínios grande número de momentos atômicos 10^{12} a 10^{18} , são alinhados paralelamente e então a magnetização é quase saturada. Porém, a direção de alinhamento varia de domínio para domínio de uma maneira mais ou menos aleatória. Existem certos eixos cristalográficos que são preferidos pelos momentos magnéticos, o que os leva, na ausência do campo, ao alinhamento ao longo desses eixos denominados de eixos magnéticos fáceis.

As consequências imediatas disso são: a) momentos magnéticos atômicos em existência permanente, b) momentos atômicos ordenados (alinhados) mesmo no estado desmagnetizado, c) domínios alinhados apenas aleatoriamente no estado desmagnetizado, d) processo de magnetização consistir da reorientação de domínios e então mais domínios são alinhados com o campo, ou volumes de domínios alinhados com o campo serem bem maiores do que volumes de domínios alinhados contra o campo.

Há regiões de transição nos domínios, em que os momentos magnéticos se reorientam, com propriedades magnéticas locais devido à proximidade dos limites dos domínios, e que são denominadas de paredes de domínio ou paredes de Bloch. A maioria das mudanças magnéticas sob a ação de campo magnéticos fraco e moderado ocorrem nessas paredes de domínio (Jiles, 1991).

1.5.3 – Propriedades Magnéticas dos Fluidos Magnéticos

As propriedades magnéticas dos ferrofluidos dependem das propriedades magnéticas dos sólidos que os constituem. Assim, as ferritas possuem estrutura do tipo mineral espinélio, sendo que os espinélios representam um exemplo clássico de estrutura de cristal que permite um tipo especial de ordem magnética chamada de ferrimagnetismo.

A estrutura de espinélio é uma das mais frequentes encontradas nos compostos MM'_2X_4 , nos quais o X representa o oxigênio ou algum ânion bivalente calcogênico (S^{2-} , Se^{2-} , Te^{2-}), que pode ser parcialmente substituído por ânions monovalentes (F^- , I^- , Br^-), e M, M' são íons metálicos, ou uma combinação deles, cujas valências têm que cumprir o requerimento de eletroneutralidade. Devido à grande eletronegatividade do oxigênio as ligações do tipo iônico prevalecem em quase todos os óxidos de espinélio.

A estrutura de espinélio é formada por um arranjo fcc de ânions com espaços parcialmente preenchidos com cátions. Há 2 tipos de espaços diferindo na coordenação: o tetraédrico ou A e o octaédrico ou B. De todos estes sítios disponíveis em cubo elementar contendo 32 ânions, somente são ocupados por cátions 8 do tipo A e 16 do tipo B. A geometria dos interstícios ocupados pode ser vista na Figura 7, em que a célula primitiva contendo 2 unidades da fórmula MM'_2X_4 é mostrada. A simetria é cúbica e corresponde ao espaço do grupo O_h^7 ($Fd3m$).

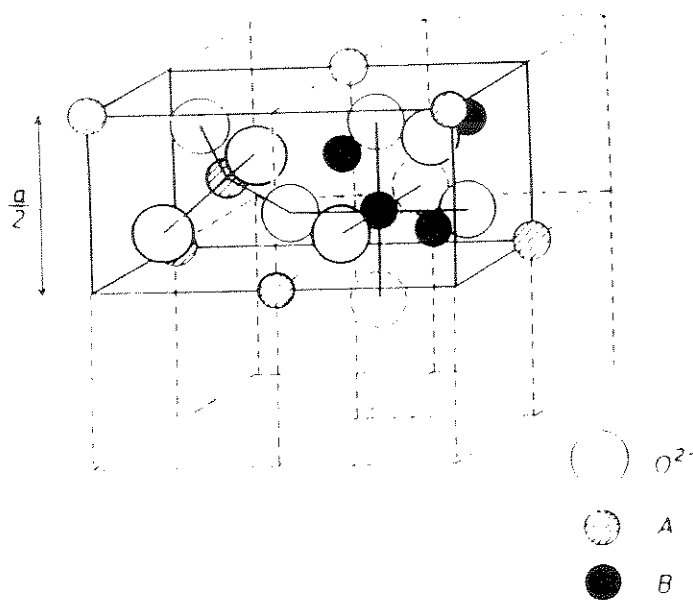


Figura 7: Célula primitiva da estrutura do espinélio.

Nesta estrutura os cátions são mutuamente separados por ânions maiores, os íons de oxigênio, que praticamente excluem um contato direto entre os orbitais de cátions, fazendo qualquer troca direta muito fraca. Ao contrário disso, aparecem interações de super troca, como a troca indireta via orbital p do ânion, que pode ser forte o suficiente para ordenar os momentos magnéticos. Sabe-se que, independentemente das estruturas eletrônicas dos cátions, este tipo de interação depende bastante da geometria do arranjo de interações dos 2 cátions e do ânion interveniente, sendo que tanto a distância quanto os ângulos de interação são relevantes. Normalmente, somente as interações na primeira coordenação da esfera (ambos os cátions em contato o ânion) são consideradas importantes, sendo as outras frequentemente desconsideradas (Krupicka e Novák, 1982).

1.5.3.1 - Relaxação Browniana e de Néel

O material ser ou não magnético é uma característica da presença de momento magnético, o qual possui uma orientação mais favorecida energeticamente, que é o eixo de anisotropia. Esse eixo indica a direção de menor energia para a orientação do momento magnético podendo estar paralelo ou anti-paralelo ao mesmo.

Dependendo da razão entre energia anisotrópica magnética (E_a) e energia térmica ($k_B T$), as partículas podem ser ferromagnéticas ou superparamagnéticas. A agitação térmica, relacionada à energia de anisotropia, também se relaciona aos processos de relaxação do momento magnético, sendo a sua rotação dependente de uma barreira de energia interna anisotrópica, rotação de Néel, e o tempo de relaxação:

$$\tau = \tau_0 \exp(E_a / k_B T) \quad (11)$$

sendo o tempo característico de difusão orientacional: $\tau_0 = 1$ ns.

Se $E_a / k_B T \gg 1$, tem-se a relaxação Browniana, sendo que as partículas são ferromagnéticas, e seus momentos magnéticos seguem o eixo magnético fácil ou de anisotropia. O processo de relaxação ocorre com o momento magnético fixo na partícula, que gira com esta na presença de um campo magnético, relaxação extrínseca. O tempo de relaxação é então representado pela equação seguinte:

$$\tau_B = 3 V \eta / k_B T \quad (12)$$

onde V é o volume da partícula e η é a viscosidade do líquido carreador.

Se $E_a / k_B T \ll 1$, tem-se a relaxação de Néel, sendo que as partículas são superparamagnéticas, e seus momentos magnéticos, não estando preso ao eixo de anisotropia, podem sofrer rotação livremente no interior dos grãos na presença de um campo magnético, sem haver necessariamente o movimento da partícula, relaxação intrínseca (Halbreich et al., 1998). O tempo de relaxação é representado por:

$$\tau_N = \tau_0 \exp E_a / k_B T \quad (13)$$

Dependendo da faixa de temperatura o material pode apresentar dois tipos de relaxação:

$$\tau^{-1} = \tau_B^{-1} + \tau_N^{-1} \quad (14)$$

Quando a fração do volume ϕ das partículas não é grande: $\phi < 8\%$, devido ao movimento Browniano, a magnetização do fluido magnético segue a lei de Langevin:

$$M(\xi) = \phi M_s L(\xi) \quad (15)$$

onde M_s é a magnetização no volume de material. $L(\xi)$ é a função de Langevin e é definida por:

$$L(\xi) = \coth \xi - (1/\xi) \quad (16)$$

onde ξ é o parâmetro de Langevin:

$$\xi = m \mathbf{B} / k_B T \quad (17)$$

sendo $m = M_s V$ (Bacri et al., 1997).

1.6 - Estabilidade Coloidal dos Fluidos Magnéticos

Um dos problemas chave para o uso industrial de ferrofluidos é sua estabilidade coloidal. A separação de fases em dois líquidos de concentração diferente de partículas é bastante comum. Muitos fatores são capazes de induzir a separação de fases, como a diminuição da temperatura; algumas variações na concentração do tensoativo livre para partículas estabilizadas estericamente, e um aumento na força iônica, para partículas estabilizadas eletrostaticamente.

O balanço entre as várias interações interpartículas é que assegura a estabilidade do líquido magnético. Estas interações são: interação dipolo-dipolo; interação Van der Waals, interação dipolo-campo magnético, e também repulsão estérica via solvente para partículas cobertas com tensoativo, ou repulsão eletrostática por parte de partículas iônicas.

1.7 - Sistemas Magnéticos Multifásicos

Os fluidos magnéticos podem formar sistemas multifásicos tais como microemulsões magnéticas, fases lamelares e hexagonais, vesículas, emulsões e cápsulas, ou formar compósitos magnéticos.

Fases lamelares são constituídas pelo arranjo periódico de camadas alternadas de óleo e água. Nas fases magnéticas lamelares, partículas sólidas são introduzidas nas fases líquidas lamelares sem destruírem a sua ordem. Partículas magnéticas foram introduzidas em baixas concentrações (aproximadamente 10^9 partículas/cm³), em fases nemáticas liotrópicas, misturando um fluido magnético a um suporte líquido cristalino. Esses sistemas, denominados de ferronemáticos, foram preparados com o objetivo de orientar e estudar fases nemáticas liotrópicas. Um esquema desses sistemas é apresentado na Figura 8.

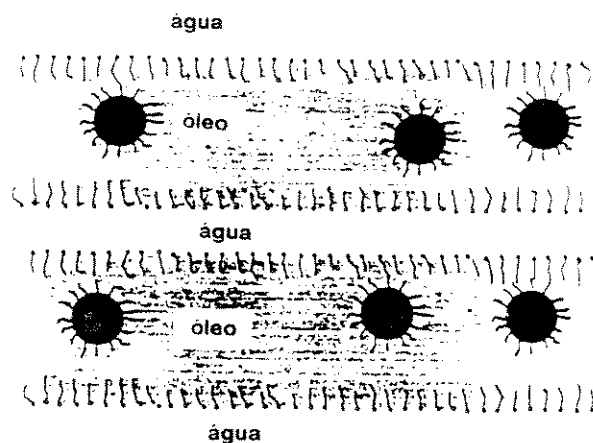


Figura 8: Esquema de fases lamelares magnéticas (Adaptado de Berbovski, 1996).

Heve et al. (1984) incorporaram partículas magnéticas em vesículas preparadas com cloreto de diocatadecildimetilamonio, para estudar os efeitos magnéticos da fotólise da benzofenona.

De Cuyper e Joniau (1988) prepararam vesículas de fosfolipídios, lipossomas, contendo magnetita, que foi anteriormente estabilizada com ácido láurico, em meio aquoso no seu interior. Essas vesículas foram preparadas por diálise e designadas como magnetolipossomas. Uma descrição detalhada sobre a preparação dessas vesículas com tamanhos da ordem de nanômetros, será apresentada no item referente a preparação dos magnetolipossomas.

Kiwada et al. (1986) prepararam magnetolipossomas pelo método da hidratação do filme lipídico. Nesse método os fosfolipídios são misturados às partículas magnéticas e pela evaporação do solvente é formado um filme lipídico, que é posteriormente hidratado formando os magnetolipossomas. O diâmetro médio dos lipossomas formados por este método é de aproximadamente $1,54 \mu\text{m}$.

Menager e Cabuil (1995) misturaram os fosfolipídios às partículas magnéticas utilizando o método da emulsão múltipla, obtendo assim magnetolipossomas gigantes, de diâmetro de 10 a $40 \mu\text{m}$.

1.8- Aplicações dos Sistemas Magnéticos Vesiculares

Sistemas magnéticos vesiculares têm sido usados em várias aplicações de processos biotecnológicos, algumas dessas aplicações são descritas a seguir.

1.8.1 - Suporte e Direcionamento de Drogas

Lipossomas têm sido usados como veículos para o encapsulamento e liberação controlada de drogas, por serem de composição semelhante à da membrana celular, biodegradáveis, relativamente não-imunogênicos e não tóxicos.

Os lipossomas tradicionais injetados intravenosamente em animais, tiveram o direcionamento preferencial para órgãos do sistema imunológico tais como o fígado e o baço. Assim, para que se conseguisse um direcionamento em sítios específicos, Ishii et al.(1990), prepararam lipossomas com magnetita e drogas terapêuticas (ML's), e conseguiram direcioná-los por força magnética externa, com um campo magnético inofensivo ao sistema biológico em qualquer parte do corpo.

Kiwada et al. (1986), encapsularam lipossomas de PC com magnetita e ^3H -inulina acoplada à superfície, e analisaram suas características de transporte *in vitro* e *in vivo*. *In vivo*, os ML's com drogas, quando submetidos a um campo magnético, liberaram mais radioatividade nos tecidos do tumor do que lipossomas sem magnetos, apesar dos resultados terem sido inferiores aos obtidos *in vitro*. Praticamente 30 % da radioatividade injetada não foi recuperada em tecidos ou órgãos, devido a degradação dos ML's na circulação e excreção da inulina pela urina, diferentemente de quando se usa lipossomas convencionais que acumula a inulina nos tecidos.

Ishii et al. (1990), prepararam ML's com o agente anticâncer 5-fluorouracil (5FU) e estudaram sua viscosidade e capacidade de retenção em sítios específicos. Os ML's se comportaram como esferas rígidas, apesar das membranas destas vesículas serem flexíveis como os glóbulos vermelhos do sangue. *In vitro*, as quantidades de 5FU liberadas dos ML's aumentaram com o tempo no sítio submetido ao campo magnético, enquanto que a quantidade de 5FU liberada de lipossomas sem magnetita permaneceu inalterada com o tempo.

In vivo, os ML's com 5FU foram aplicados intravascularmente na orelha de coelhos, que foi submetida à campo magnético de 4000G. Mais de 80 % dos ML's injetados foram retidos no local, além disso, os magnetolipossomas se mantiveram no local de campo magnético por mais de uma hora, representando uma eficiência quanto a liberação do medicamento, já que este tinha 75 % da sua liberação realizada na primeira hora.

Tais experimentos evidenciam que vesículas lipídicas contendo magnetos podem ser usadas como um sistema novo para veiculação de medicamentos.

1.8.2 - Classificação e Separação de Células

A idéia de separação magnética de uma população de células das outras não é nova. Há muitos anos, uma maneira rotineira de isolar células fagocíticas das não fagocíticas era fazer com que elas ingerissem ferro magnético. Outra tentativa de separação magnética de células foi o uso de ferro como carga celular.

Atualmente, a separação magnética em alto gradiente de campo é usada para separação física de células fracamente magnéticas, como por exemplo, glóbulos vermelhos do sangue que contêm hemoglobina no estado paramagnético (deoxihemoglobina ou metaemoglobina). Esta técnica permite a purificação de linfócitos que são ligados aos eritrócitos de metaemoglobina.

As partículas magnéticas têm sido usadas para otimizar a separação das células. O princípio da classificação magnética é o seguinte: um antígeno específico para um dado anticorpo a ser separado é fixado na superfície das partículas magnéticas e introduzido na mistura. A associação antígeno - anticorpo induz o acoplamento específico entre as partículas e as células. As células classificadas podem ser separadas do meio por um simples gradiente de campo magnético. O mesmo princípio pode ser aplicado para sistemas veiculadores de drogas.

Anticorpos acoplados à magnetolipossomas, ML's, foram propostos como uma nova maneira de se realizar a seleção das células, e designados como imunomagnetolipossomas. Foram preparados ML's de DSPC ou DPPC suportando imunoglobulinas anti-fibronectinas específicas capazes de se ligar à superfície das células. Após a ligação, as células magneto sensíveis foram expostas ao campo magnético, e se concentraram no local do centro magnético, podendo ser removidas com o uso de uma pipeta, após o desligamento do campo. As vesículas foram depois removidas das células por tratamento com tripsina (Margolis et al., 1983).

Hancock e Kemshead (1993) prepararam colóides imunomagnéticos, com tamanho de aproximadamente 50 a 70 nm, cobertas com imunoglobulinas. O material não sofreu agregação e nem perdeu a biorreatividade no período de um ano.

Por possuírem propriedades de solução este tipo de colóide pode oferecer vantagens distintas quanto à sua capacidade de se ligar às células quando comparado à microesferas magnéticas maiores. Conseguiu-se isolar células B e células T com alto grau de pureza após incubação com anticorpos monoclonais e o ferrofluido de imunoglobulinas. Para isso, foi usado um separador de alto gradiente magnético para capturar as células e depois libertá-las. Foi observado que as ligações não específicas que ocorreram foram poucas, e que a separação

das células se completava em 30 minutos. Assim, células separadas por este método podem permanecer altamente viáveis além de serem recuperáveis.

1.8.3 - Processos de Purificação de Biomoléculas

Partículas magnéticas foram consideradas também como suporte de fase sólida magnética (SFSM) em estudos de processos de adsorção e eluição, como a cromatografia de afinidade. Para a purificação de ácidos nucleicos, partículas magnéticas de óxido de ferro, foram incorporadas à matriz de afinidade, agarose (Pyle, 1994).

Desta forma, foi formado o SFSM - agarose, no qual foram feitas ligações covalentes cruzadas para que a matriz tivesse maior estabilidade química e térmica. Após a adsorção do substrato, o SFSM foi retido magneticamente e o sobrenadante removido, obtendo-se assim uma fácil separação.

O SFSM mostrou-se funcional para vários tipos de ligantes de ácidos nucleicos, entre eles os grupos dietilaminoetil (DEAE), epíclorohidrina / trietanolamina (ECTEOLA), epíclorohidrina / 2-hidroxietilpiperazina (EHEP), dentre outros, os quais possuem superfície carregada positivamente pelo grupo amino protonado, que confere afinidade com os ácidos nucleicos em solução, que possuem cauda com grupo fosfato carregado negativamente.

Estes derivados de SFSM são não-específicos na captura de ácidos nucleicos e oligonucleotídeos, mas podem ser usados especificamente para a separação de diferentes formas de ácidos nucleicos. Usando-se SFSM - DEAE, pode-se ter a separação de misturas de DNA e RNA pela aplicação de diferentes concentrações de solução eluente.

Os procedimentos estudados levaram a bons resultados para o SFSM - DEAE na purificação de DNA de plasmídeo, tanto em escala reduzida quanto em larga escala. Além disso, o SFSM pode ser utilizado com propósitos analíticos ou preparativos.

Futuras aplicações para este tipo de suporte em separações de ácido nucleico inclui estudos da purificação do RNA mensageiro e isolamento de sequência específica de genes por captura com sonda de SFSM ligado a oligonucleotídeo.

A versatilidade do SFSM - agarose é tanta que a purificação de muitos outros tipos de importantes moléculas biológicas também poderá ser possível (Pyle, 1994).

1.8.4 - Imobilização de Enzimas e Proteínas

A utilização de suportes magnéticos para a imobilização de enzimas tem como vantagem a facilidade de separação de materiais insolúveis do meio, o que não é possível nos suportes convencionais que têm como restrição o uso de substratos solúveis.

Com a ajuda de um dispositivo magnético que retém o suporte no meio da reação, consegue-se uma fácil separação, sendo o sobrenadante decantado. Desta forma, além de possibilitar a preparação da enzima na presença de outros componentes insolúveis, também facilita a sua recuperação.

Além dessa facilidade, as enzimas imobilizadas em material magnético, como a magnetita, podem apresentar melhor estabilidade térmica e serem mais ativas a altas temperaturas que as não imobilizadas, provavelmente devido a redução da autólise promovida pela imobilização (Van Leemputten e Horisberger, 1974).

De Cuyper e Joniau incorporaram a enzima de membrana citocromo c-oxidase aos ML-PC's, que foram previamente sonicados para facilitar a incorporação. Com o ambiente da bicamada ocorre a indução da reativação da enzima, sendo que a citocromo c-oxidase sem ambiente lipídico tem taxa de atividade de $0,03 \text{ min}^{-1}$ e com os ML's esta é de $0,15 \text{ min}^{-1}$. Além disso, as moléculas lipídicas são também responsáveis pela firme fixação da enzima no complexo sólido-bicamada (De Cuyper e Joniau, 1990; 1993).

Foi também observado um aumento na atividade da enzima de um fator de aproximadamente 5 com relação a enzima em mistura com poucos lipídios.

Após o primeiro fracionamento magnetizado 67 % da atividade permaneceu nos ML's retido, sendo que parte dela foi perdida pela relutância das moléculas de enzima em se incorporarem firmemente e também a recuperação incompleta feita pelo filtro magnético. Além disso, a estabilidade térmica também foi aumentada com os ML's, e foi dependente do comprimento da cadeia acil do lipídio.

A capacidade das proteínas de membrana de se inserirem espontaneamente na bicamada lipídica dos ML's e o alto rendimento na atividade da enzima imobilizada, fazem dos ML's suportes de enzima de membrana interessantes no uso em biorreatores controlados magneticamente e em cromatografia de afinidade.

1.8.5 - Estudo da Deformação de Membranas

Magnetolipossomas grandes foram preparados como sistema modelo para a realização de estudos das propriedades elásticas das membranas celulares pelo efeito de um campo magnético externo.

Estas vesículas magnéticas, com fosfolípido DOPC, foram sintetizadas pelo processo da emulsão múltipla, em que o fluido magnético é incorporado dentro das vesículas. Estas vesículas aparecem como esferas com diâmetro na faixa de 10 a 40 μm . Quando submetidas à campo magnético de baixa intensidade, 0,01 T, se alinham ao longo da direção do campo. Isoladas umas das outras as vesículas maiores flutuam em campo zero, e exibem uma deformação em sua forma sob campo constante, assumindo a forma elipsóide e permitindo a determinação de constantes viscoelásticas da membrana. Tem-se que quanto maior o campo maior será o alongamento da vesícula.

Há duas constantes que determinam as propriedades da bicamada externa: a constante elástica de curvatura, K_c , contabilizando a curvatura local da membrana, e a elástica extensional, K_a , que mede o estiramento da membrana no regime inflado. Sem o campo a forma da vesícula depende da competição entre a energia térmica de flutuação ($k_B T$) e energia elástica.

O fluido magnético, neste caso, é disperso na água e tem sua superfície negativa devido ao citrato adsorvido sobre as partículas, que estabiliza a solução coloidal pelas repulsões eletrostáticas, sem o uso de tensoativos. Nesse método de preparo, a fração de volume das partículas magnéticas estáveis na solução coloidal é de aproximadamente 20%, enquanto que a fração dos lipossomas incorporados à elas pode não ser maior que 6 %.

Os estudos destas vesículas gigantes artificiais são importantes para se obter medidas da sensibilidade das células biológicas à agentes externos como anticorpos, proteínas e algumas drogas que poderiam atacar as membranas das células, mesmo que não reflitam as propriedades exatas das membranas biológicas reais (Menager e Cabuil, 1995; Bacri et al., 1995).

1.8.6 - Processos de Hipertermia

Hipertermia é uma terapia para tratamento de câncer, baseada no fato de células tumorais serem mais sensíveis à temperaturas na faixa de 42-45°C que as células de tecidos

normais. Comparada com as terapias convencionais, a hipertermia possui poucos efeitos colaterais.

Partículas magnéticas podem gerar calor sendo uma das causas a perda de histerese sob campo magnético de alta frequência, como 500 kHz. Além disso, para a aplicação da técnica de hipertermia uma das melhores estratégias é o direcionamento da droga. Desta forma, tem sido estudada a aplicação de partículas magnéticas para tratamento de hipertermia localizado, observando-se elevações locais de temperatura (Bacri et al., 1995; Jordan et al., 1993).

Shinkai et al. (1994) prepararam magnetolipossomas usando os fosfolípidios DMPC e DMPE e imobilizaram o anticorpo monoclonal sobre eles. Foi encontrada uma composição ótima para dispersibilidade na razão mássica de 2:1 (DMPC/DMPE). O tamanho médio dos magnetolipossomas, contendo magnetita de 10nm, foi de quase 80nm e o conteúdo de DMPE na camada interna foi maior do que na externa, devido à diferença na configuração de PC e PE, sendo PC cônico e o PE cilíndrico.

Os magnetolipossomas foram cobertos com hidrazida para estabilizar as cápsulas de fosfolípidios e fornecer uma âncora para a imobilização dos anticorpos. Com a incubação dos magnetolipossomas conjugados com anticorpos e células de câncer, conseguiu-se a adsorção na superfície das células. Através de medidas da evolução das taxas de calor dos magnetolipossomas, concluiu-se que o aquecimento depende do tamanho das partículas de magnetita usadas, e que 40nm é o tamanho ótimo para tratamento de hipertermia.

Os magnetolipossomas desenvolvidos tiveram excelentes propriedades de dispersibilidade, afinidade e geração de calor, e de acordo com uma simulação aqueceriam as células cancerosas acima de 42°C enquanto que as saudáveis ao redor não seriam aquecidas a temperaturas maiores do que esta.

Viroonchatapan et al. (1996) desenvolveram um magnetolipossoma termossensível utilizando magnetita de dextrana como partícula magnética e DPPC como fosfolípido. A magnetita de dextrana é utilizada devido à sua alta dispersibilidade em água ou em solvente orgânico. De acordo com os experimentos *in vivo*, que utilizaram 16 grupos de camundongos (n=3), os magnetolipossomas termossensíveis foram capturados pelo fígado com a ajuda de um magneto extracorporal.

Os benefícios apontados para esses sistemas com relação ao direcionamento à órgãos específicos são: a retenção adicional ajuda numa efetiva hipertermia, a toxicidade de drogas pode ser minimizada pela redução da quantidade de ML's termossensível que chega a outros órgãos, a passagem mais lenta dos ML's pelo campo magnético pode facilitar a endocitose do

lipossoma pelas células endoteliais provocando um direcionamento celular e subcelular às células do tumor. Os ML's termosensíveis também podem ser usados em sistemas de imagem de ressonância magnética (MRI), ou em direcionamento à outros órgãos do corpo.

1.9 - Lipossomas

1.9.1 - Estrutura

Os lipossomas são vesículas lamelares formadas por bicamadas de fosfolípidios. Os fosfolípidios são moléculas anfifílicas, ou seja, que possuem uma parte hidrofílica, a cabeça polar de grupo fosfato, e outra hidrofóbica, as caudas apolares de ácidos graxos. Os lipossomas podem ser preparados a partir da mistura de diferentes fosfolípidios, como fosfatidilcolina (PC), alguns carregados eletricamente, como a fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) e lípidios como o colesterol.

Quando em meio aquoso, estas moléculas anfifílicas tendem a se orientar de forma a se encontrarem num estado de menor energia, em que as forças repulsivas entre o meio polar e as partes apolares das moléculas sejam minimizadas. Assim, as cadeias de hidrocarbonetos se arranjam paralelamente umas as outras, para que se tenha uma melhor agregação. Os agregados começam a ser formados a partir de uma certa concentração de monômeros na solução, que é chamada de concentração micelar crítica (cmc), acima da qual há um equilíbrio entre os agregados e os monômeros, que sempre estarão na solução a uma concentração próxima à cmc.

O tipo do agregado formado depende da concentração das moléculas, do tipo de molécula anfifílica, número de cadeias de ácido graxo e seus comprimentos. Israelachvili et al. (1994) propuseram que o tipo de morfologia das estruturas formadas por moléculas de lípidios e outros componentes anfifílicos em soluções aquosas pode ser predito a partir de suas propriedades geométricas de empacotamento. Tais propriedades podem ser convenientemente representadas pelo parâmetro p , de acordo com a seguinte equação:

$$p = v / (a_0 \cdot l_c) \quad (18)$$

onde v é o volume molecular da porção hidrofóbica, a_0 é a área superficial ótima, (definida como a área ocupada pela porção hidrofílica quando a energia de interação entre os lipídios é mínima) e l_c é o comprimento crítico da cadeia ou cadeias de hidrocarboneto, não podendo ultrapassar o comprimento máximo efetivo que as cadeias podem assumir quando completamente dispendidas. As relações entre o tipo de organização do agregado e a geometria da molécula se apresentam na Figura 9.

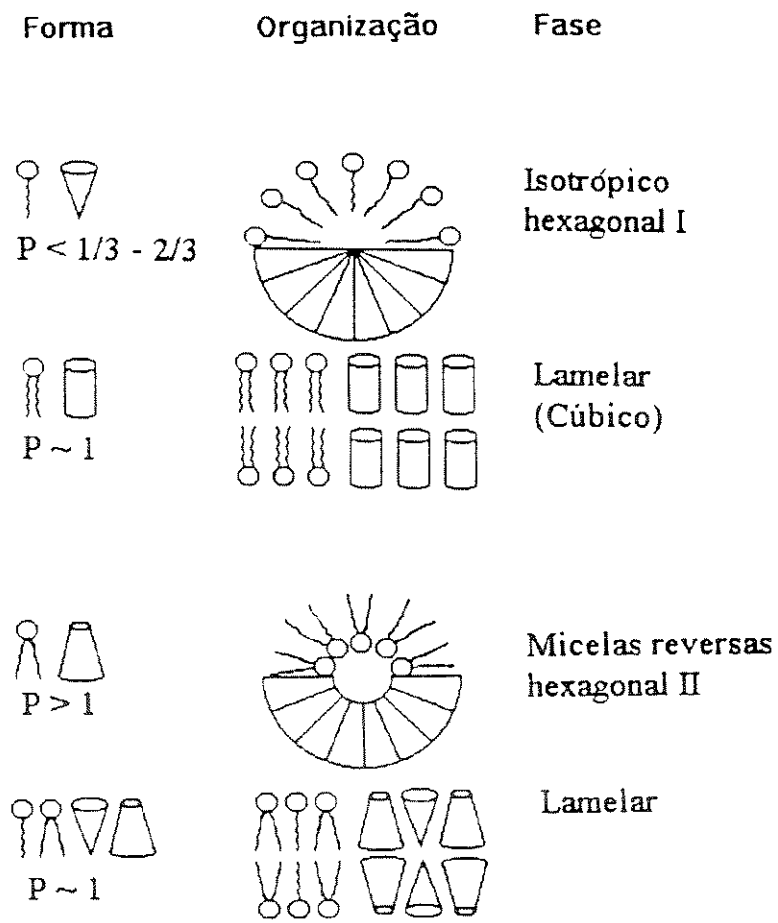


Figura 9: Modelo de empacotamento geométrico de moléculas anfifílicas baseado no parâmetro p . (Adaptado de Israelachvili et al., 1994).

No caso dos lipossomas, as estruturas com dupla cadeia de hidrocarboneto podem se agregar em forma de bicamada. Como os agregados planos são instáveis termodinamicamente, devido o contato das bordas laterais de hidrocarbonetos com a solução polar, estes se curvam formando estruturas esféricas fechadas, e neste processo englobam parte do meio aquoso e substâncias hidrofílicas contidas nele. Desta forma, a cabeça polar estará exposta à superfície e as cadeias apolares isoladas em seu interior.

A curvatura pode ser forçada pela adição de agentes que aumentam a área da monocamada externa em relação a interna, ou pelo aumento do tamanho das cabeças dos lipídios externos, como no caso da hidratação pela ionização da camada externa, que provoca a atração da água que se liga à cabeça aumentando o seu tamanho.

A altas concentrações de água, a fase lamelar é estável e composta de bicamadas alternadas de moléculas lipídicas e camadas de água. A baixas concentrações de água podem ocorrer fases inversas estáveis, tendo-se micelas reversas, que têm as caudas orientadas à superfície e as cabeças para centro.

Dependendo da concentração dos lipídios pode-se ter diferentes geometrias dos agregados, tendo-se a mais altas concentrações agregados em fases diferentes, que podem ser hexagonal, lamelar cúbica ou hexagonal reversa. Além disso, a baixas concentrações podem estar presentes no sistema vesículas multilamelares (VML's), vesículas unilamelares grandes (VUG's) ou vesículas unilamelares pequenas (VUP's), dependendo da forma de preparação. Com o aumento da concentração lipídica as vesículas unilamelares têm transformação progressiva em di- tri- e multilamelas.

A estabilidade do sistema pode ser aumentada pela inclusão de moléculas carregadas na membrana, devido à forças eletrostáticas que evitam o contato e aglutinação das vesículas (Lasic, 1992; 1993).

1.9.2 - Fases do Sistema

O sistema de lipossomas é do tipo anfotrópico, ou seja, aquele com ordem e mobilidade determinados pelo solvente e temperatura (Ringsdorf, 1988). Quando as mudanças de fase do sistema forem função somente da temperatura, ele será classificado como termotrópico, quando forem função da concentração ou tipo de solvente e da temperatura será liotrópico.

As fases deste sistema são classificadas como de cristais líquidos. Os cristais líquidos termotrópicos exibem simultaneamente, a certas temperaturas, propriedades do estado líquido como baixa viscosidade e tendência a formar gotículas, e propriedades do estado sólido, como anisotropia das propriedades mecânicas, ópticas, elétricas e magnéticas. De acordo com os diferentes arranjos moleculares, podem ser subdivididos em nemáticos, esméticos ou colestéricos.

Nos cristais líquidos do tipo nemático, o eixo longitudinal das moléculas é paralelo à direção do vetor (n), com seus centros de gravidade distribuídos aleatoriamente, o que caracteriza um ordenamento orientacional e um desordenamento posicional. Os do tipo esmético são caracterizados pelo ordenamento orientacional e posicional, com as moléculas dispostas perpendicularmente ao plano das camadas. Nos cristais líquidos termotrópicos do tipo colestérico, as moléculas apresentam-se também dispostas em camadas, porém orientadas paralelamente ao plano destas e com seus eixos longitudinais deslocados de camada em camada, seguindo um padrão helicoidal.

Os sistemas cristalinos liotrópicos apresentam ainda maior polimorfismo estrutural que os termotrópicos, com a coexistência de mais de uma fase sob determinadas condições. A grande diversidade estrutural dos cristais líquidos liotrópicos está diretamente relacionada à existência de moléculas anfifílicas com diferentes geometrias moleculares e propriedades de solubilidade. Os liotrópicos, em geral, são caracterizados por ordem orientacional e desordem posicional. Além da concentração e temperatura, as fases do deste sistema podem ser influenciadas também pelo pH e força iônica do meio quando as moléculas anfifílicas apresentarem grupos ionizáveis, como no caso dos tensoativos iônicos.

A mudança de fase dos sistemas de gel, sólida, para a de líquido cristalino ocorre numa temperatura denominada de temperatura crítica de transição de fase (T_C). O parâmetro de ordem do sistema depende da temperatura e do tipo de molécula lipídica presente, e pode ser modificado pela presença de colesterol em concentrações molares de até 1:1 com o lipídio, acima da qual há desestabilização do sistema por saturação devido à formação de um complexo que se forma entre o lipídio da bicamada e o colesterol.

O colesterol aumenta a ordem na fase líquido cristalino e diminui na fase gel. Isso ocorre devido o arranjo estrutural se acomodar melhor na fase líquido com esta molécula de uma só cadeia. Já na fase gel, ocorre uma maior desordenação devido à menor fluidez da membrana, ocorrendo portanto dificuldade de acomodação destas moléculas na membrana formada (Lasic, 1993).

1.9.3 - Métodos de Preparação de Lipossomas Convencionais

Dependendo da maneira como os lipossomas são preparados, apresentam características estruturais diferentes, além de diferenças nas propriedades como eficiência de encapsulamento, permeabilidade e estabilidade da bicamada.

1.9.3.1 - Método da Hidratação do Filme

O método da hidratação do filme consiste da preparação de vesículas multilamelares pelo depósito de uma camada fina de lipídios nas paredes de um balão, que são formadas pela evaporação do solvente orgânico, no qual estão dissolvidos. Após a formação do filme, excesso de fase aquosa é adicionado e a solução é constantemente agitada em temperatura maior que a T_C , temperatura de transição dos fosfolipídios, fazendo com que os lipídios se desprendam do balão e se agregem em lipossomas enquanto encapsulam parte da solução, ocorrendo assim a hidratação do filme. Este método normalmente resulta em lipossomas multilamelares, com várias bicamadas lipídicas.

Para a formação de lipossomas menores e soluções mais homogêneas pode-se utilizar lipídios carregados, o que faz com que haja melhor dispersão da solução pela repulsão eletrostática, ou pode-se usar uma agitação mais rigorosa e por mais tempo, que resulta em frações maiores de estruturas menores e unilamelares. Outra maneira de diminuir o tamanho dos lipossomas é pela repetição do congelamento e descongelamento das vesículas, o que leva à menor rigidez da membrana das VML's, que podem ser facilmente extrudadas.

Caso seja necessário se produzir lipossomas com camada simples e com distribuição mais homogênea, são utilizados procedimentos posteriores a esta preparação, como a sonicação e extrusão (Lasic, 1993).

1.9.3.2 - Método do Esgotamento do Detergente

O método do esgotamento do detergente baseia-se em mudanças assimétricas das áreas superficiais de ambas as monocamadas, que assim podem causar a indução da vesiculação. Para isso, aumenta-se a área superficial relativa da monocamada externa pela inserção de moléculas anfífilas. Os detergentes mais usados neste método são o cholato de sódio, octil glucosídeo e o alquil oxi polietileno.

A solução inicial do método é uma solução coloidal de micelas mistas de detergentes e fosfolipídios. Na maioria dos casos a razão molar entre detergente / fosfolipídio é de aproximadamente 10. O método consiste da dissolução da dispersão de VML's em solução de detergente em fase orgânica.

Diferentes detergentes conduzem à diferentes distribuições de tamanhos das vesículas formadas, no caso, o cholato leva à VUP's e o octil glucosídeo à VUG's. A cinética de remoção e formação das vesículas também pode prever o tamanho dos lipossomas, por exemplo, taxas mais rápidas de esgotamento produzem estruturas menores.

Além do detergente pode-se utilizar como co-solubilizador anfifílico outros co-solventes como o ácido acético ou íons caotrópicos (Lasic, 1993).

1.9.3.3 - Métodos de Injeção

Em métodos de injeção os lipídios são dissolvidos em etanol ou éter, e injetados em fase aquosa, na qual serão produzidas as vesículas. Como é considerado um método brando, é recomendado nos casos em que há incorporação de proteínas sensíveis no lipossoma, que podem se desnaturar ou se inativar durante a preparação. Utilizando-se etanol ocorre a produção de solução homogênea de VUP's e com o éter de VUG's.

No caso da injeção de éter, solvente imiscível em fase aquosa, a taxa de injeção deve ser mais lenta que a de etanol e a temperatura da fase aquosa deve ser maior para que ocorra a evaporação do éter logo após a injeção.

Neste método o tamanho dos lipossomas aumenta com a concentração de lipídios e são produzidas vesículas em baixa concentração.

Outros solventes também podem ser usados neste método. Os solventes miscíveis em água são normalmente removidos por diálise, cromatografia em gel ou osmose reversa, e os imiscíveis por um processo de extração (Lasic, 1993).

1.9.3.4 - Métodos de Emulsificação

Nos métodos de emulsificação, como o da evaporação da fase reversa e da emulsão dupla, os lipídios são introduzidos na fase aquosa a partir da fase orgânica, a qual é removida lentamente formando sistemas multifases simples, água / óleo (a / o) e dupla, água/ óleo/ água (a / o / a).

As moléculas lipídicas em emulsão simples ou dupla se orientam em monocamadas em torno de porções de água, com as cabeças orientadas para dentro da estrutura, e com o esgotamento da fase orgânica estas micelas invertidas se agregam formando lipossomas.

No método da fase reversa, por adição subsequente de fosfolípido, após formação do lipossoma, pode-se criar membranas com composições diferentes de lipídios em cada camada.

Os lipossomas resultantes podem ser VML's, VOL's (vesículas oligolamelares grandes) e LMV's (lipossomas multivesiculares). A eficiência do encapsulamento pode alcançar 100% (Lasic, 1993).

1.9.3.5 - Homogeneização do Tamanho dos Lipossomas

a) Extrusão

A extrusão é utilizada para homogeneização das vesículas e transformação de VML's em VUP's. O método é baseado na dispersão forçada de VML's em filtros com poros de tamanhos bem definidos, com várias células de alta pressão. Além disso o processo deve também ocorrer em temperaturas maiores que a T_c .

Para que o tamanho médio dos lipossomas obtidos seja aproximadamente igual ao dos poros, é preciso fazer várias extrusões. A literatura indica um número mínimo de 10 extrusões para a obtenção de VUP's de tamanho homogêneo.

Para membranas de poros grandes, maiores que 0,4 μm , o tamanho das vesículas depende da concentração e composição dos lipídios, não ocorrendo o mesmo para membranas com poros menores que 0,2 μm . Outros fatores experimentais que podem facilitar o processo são a utilização de bicamadas carregadas e a adição de pequenas quantidades de etanol.

As últimas porções que saem do extrusor são acompanhadas de espuma e grande área superficial e com muitas monocamadas que podem levar a formação de estruturas lamelares oligo ou simples, gigantes ou grandes.

Outro processo que utiliza o mesmo princípio que a extrusão é a prensa francesa, no qual a pressão que força a solução no cilindro é feita por um pistão, através de orifício ajustável e pequeno com pressão maior que 25000 psi e que produz uma distribuição de tamanhos não muito bem definida. Há também o método da microfluidização, que é um processo contínuo conectado à prensa francesa, o qual pode operar a altas concentrações e em condições estéreis,

e alcançar eficiência de encapsulamento de 70% do volume aquoso. Além disso, vesículas menores que 100 nm podem ser formadas com poucas passagens (Lasic, 1993).

b) Sonicação

Este método também é usado para a obtenção de vesículas unilamelares pequenas a partir de VML's. Envolve a adição de altas energias que podem ser aplicadas a VML's direta ou indiretamente. Pode ser aplicado de duas maneiras: com imersão do sonicador na dispersão do lipossomas ou por colocação da amostra em banho sonicador, sem contato direto com as ondas de ultra-som. Devido à alta densidade de energia há produção de vesículas unilamelares pequenas e homogêneas. Nesta última maneira de aplicação, a posição da amostra no banho é importante para definir as características das vesículas.

Como há grande dissipação de energia, ocasionando o aumento de temperatura, é utilizado um sistema de resfriamento. Além disso, ao contrário dos outros métodos, podem ser utilizadas temperaturas abaixo de T_C dos lipídios usados, porém os lipossomas produzidos não são estáveis e podem sofrer fusão.

O método com contato entre amostra e sonicador tem a desvantagem de haver contaminação por partículas metálicas que devem ser posteriormente removidas (Lasic, 1993).

1.9.4 - Aplicações de Lipossomas em Processos de Purificação de Biomoléculas por Afinidade

1.9.4.1 - Ultrafiltração de Afinidade

A maioria dos métodos de purificação de produtos biotecnológicos requer vários passos, acabam por representar grande parte dos custos totais do processo, devido à muitos desses compostos serem bastante sensíveis à condições extremas de temperatura, pH, solvente orgânico, entre outros contaminantes biológicos.

Desta forma, para o desenvolvimento de um processo de purificação mais econômico e eficiente, Powers et al. (1990) desenvolveram um sistema de ultrafiltração de afinidade, em que utilizaram lipossomas unilamelares pequenos com área superficial de alta especificidade. Neste sistema, ligantes de afinidade capazes de fazer ligações seletivas e reversíveis às proteínas,

foram covalentemente ligados à superfície dos lipossomas unilamelares (diâmetro = 25 - 70 nm) para o processo de purificação. A proteína desejada, quando adsorvida especificamente aos lipossomas modificados de afinidade, foi retida na membrana de ultrafiltração com peso molecular de corte maior que dos compostos não ligados e muito menor que dos lipossomas, como mostra a Figura 10.

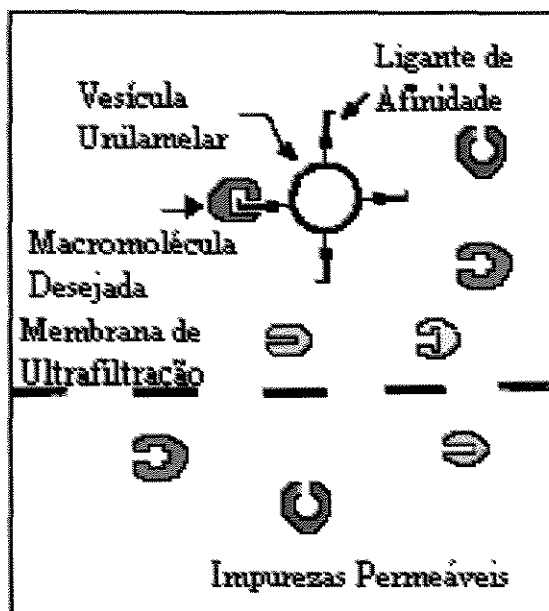


Figura 10: Esquema idealizado da purificação de macromoléculas bioativas por lipossomas modificados (Adaptada de Powers et al.,1990).

Após a remoção das impurezas a proteína alvo foi desorvida do macroligante pela mudança nas condições de solvente em favor da dissociação, tais como: mudança de pH e força iônica, ou adição de ligante livre em excesso.

Há vários métodos para a ligação covalente de proteínas e ligantes pequenos à superfície de lipossomas unilamelares. Num deles o ligante é ligado covalentemente ao fosfolípido reativo numa solução orgânica apropriada. O fosfolípido derivatizado é então misturado em solução aquosa ao fosfolípido não modificado, e a dispersão é sonicada para formar lipossomas modificados com ligante de afinidade.

Na segunda estratégia de preparo o ligante é acoplado aos lipossomas pré-formados que possuem grupo funcional reativo apropriado na superfície externa. Em ambos os casos um

braço espaçador pode ser incorporado para compensar o ligante da superfície do lipossoma e desta forma reduzir efeitos de impedimento estérico associados ao ligante de afinidade. Além disso, a capacidade de ligação aumenta inicialmente com o aumento da concentração do ligante na superfície até atingir um “plateau” em que os ligantes se tornam inacessíveis estericamente para a ligação da proteína.

Lipossomas como ligante de afinidade oferecem diversas vantagens. Uma delas é a grande área superficial do macroligante, por exemplo, lipossomas com raio de 300 Å possuem área superficial específica de 100 m² / ml de lipossoma. Em termos de área / volume de carregador é aproximadamente o mesmo valor encontrado na sílica porosa.

Devido ao seu pequeno tamanho e ao ligante estar na superfície externa do lipossoma, não há limitações difusionais durante a adsorção e dessorção da proteína, além da vesícula permanecer em suspensão na solução pelo movimento browniano. Isso ajuda a prevenir a polarização da membrana e entupimento durante a filtração necessária para a remoção do material não ligado. Além disso, pelo fato da superfície do lipossoma ser hidrofílica, a adsorção não específica de impurezas indesejadas é mínima. Outra vantagem do lipossoma é que a densidade de ligante em sua superfície pode ser controlada variando-se a quantidade de fosfolipídios derivatizados na preparação das vesículas.

Como as VUP's são estáveis em ampla faixa de pH e força iônica, mudanças no tampão podem ser usadas para a dessorção de proteínas ligadas especificamente à superfície do lipossoma.

Powers et al. (1989, 1990) estudaram o sistema de lipossomas para a separação por afinidade utilizando avidina como biomolécula modelo e como ligante de afinidade a biotina. Para a eluição da avidina do lipossoma biotinilado foi usado o hidrócloro de guanidínio, sem indicação de agregação dos lipossomas. Neste caso, a capacidade de ligação dos lipossomas biotinilados foi comparável ao empacotamento cromatográfico convencional da agarose ou de contas acrílicas, e a constante de ligação indicou um complexo extremamente estável. O número de sítios de ligação disponíveis foi avaliado pela titulação dos lipossomas biotinilados com soluções de avidina padrão e a cinética de ligação foi determinada pela concentração de avidina livre em solução como função do tempo após a adição dos lipossomas biotinilados.

As interações antígeno - anticorpo também possuem constante de ligação bastante altas, assim pode-se esperar purificações similares de anticorpos utilizando lipossomas modificados com antígeno.

Powers et al. (1990) também usaram tais lipossomas para a purificação da tripsina, uma enzima proteolítica, importante comercialmente, encontrada no pâncreas de mamíferos, que foi inibida pela p-aminobenzamidina (PAB), utilizando lipossomas modificados com PAB num sistema de ultrafiltração. Os resultados obtidos tendo lipossomas como carregadores (mais de 39 μmol PAB / ml lipossomas) foram comparáveis aos de géis PAB - sepharose (0,9 - 30 μmol PAB / ml gel). Os experimentos indicaram um carregamento ótimo de PAB a 15 μmol PAB / ml lipossomas. Além disso, os PAB - lipossomas mantiveram sua capacidade de ligação à tripsina após 5 ciclos de ligação em um período de 30 dias. Os lipossomas não se agregaram nem fundiram, também não foi observado escape de PAB das vesículas. Uma das possibilidades de se aumentar o tempo da integridade de sua estrutura e capacidade de ligação é pelo uso de lipossomas polimerizados, que são mais estáveis na presença de surfactantes e impurezas hidrofóbicas e exibem vida útil por vários meses.

A purificação da tripsina do extrato pancreático requer uma separação de afinidade devido a presença da quimotripsina, uma enzima estruturalmente similar. Recentemente, diversos métodos cromatográficos de afinidade têm sido desenvolvidos para a purificação desta enzima usando tanto ligantes de peso molecular pequeno como o PAB, como inibidores proteináceos maiores. Os ligantes têm sido imobilizados em matrizes insolúveis como poliacrilamida, poliestireno, agarose, e derivados de celulose.

Os autores concluíram que os lipossomas modificados com ligantes de afinidade podem ser uma alternativa viável à cromatografia de afinidade tradicional.

1.9.4.2 - Processos de Cromatografia

Suportes sólidos cobertos com membranas celulares artificiais têm sido desenvolvidos para possibilitar sua utilização em processos de cromatografia para a purificação de biomoléculas como proteínas, peptídeos pequenos e deoxinucleotídeos.

Membranas artificiais imobilizadas (MAI) consistem de monocamadas de moléculas lipídicas que se ligam covalentemente às partículas de sílica, suporte sólido, através da cadeia lipídio-alquil. Estas membranas tentam imitar o ambiente físico-químico das membranas biológicas, porém nestas últimas os peptídeos são embebidos através da bicamada completa da membrana.

Pidgeon e Venkataram (1989) sintetizaram membranas imobilizadas de nucleosil-lecitina e mostraram que a densidade da superfície de lecitina nestas membranas é igual a densidade de lecitina nas membranas biológicas. Além disso, constataram que o colesterol pode mudar a superfície de cromatografia da membrana imobilizada assim como outros lipídios adsorvidos à ela, que poderão influenciar no comportamento do soluto. Outra propriedade notada foi de que peptídeos mais hidrofílicos, como aqueles que portam cisteína, se ligam mais fortemente à membrana imobilizada.

Em processos de CLAP de membranas imobilizadas, as colunas com bioafinidade não limitam o sítio de ligação, ao contrário das cromatografias de afinidade tradicionais, nas quais a purificação da proteína é baseada em sequências de aminoácidos bem definidas e necessitam de alta especificidade da ligação entre o soluto e partes da membrana. A ligação não específica é baseada na dissolução do composto no ambiente de hidrocarbonetos da bicamada. Isto faz com que a purificação de proteínas possa ocorrer com poucos aminoácidos sendo o sítio de ligação, ou um lado inteiro como sítio. Neste processo, as cabeças dos lipídios da membrana são o primeiro sítio de contato entre as biomoléculas e a superfície de cromatografia. Estas cabeças também irão interagir com o soluto, atuando como barreira para alguns, barreira temporária para outros e ainda como sítio de ligação para outros.

No processo, as membranas ligam cátions e ânions aos grupos cabeça formando a interface da membrana, então as membranas dissolvem as moléculas no meio de hidrocarbonetos da bicamada, usando interações nos peptídeos tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Assim, a purificação irá depender de como as moléculas interagem com a membrana artificial ou celular, podendo ocorrer em sítio pequeno ou grande, além de ser efetiva em solutos bastante diluídos.

MAI utilizando como membrana a dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) tem sido desenvolvida. A cabeça desse fosfolípido exibe seletividade com proteínas como a citocromo P450, porém a seletividade pode ser mínima com outras e assim, a utilização de outros lipídios pode ser requerida.

Dentre os tipos de cromatografia há as que realizam a separação por forças polares entre soluto, adsorvente e fase móvel e as que utilizam a variação da carga líquida dos solutos. Porém a cromatografia de seletividade explora também as fracas forças de Van der Waals entre regiões não polares do soluto e hidrofóbicas do suporte, e é assim chamada de cromatografia de interação hidrofóbica (CIH), que é recomendada para solutos com regiões de grande hidrofobicidade, como as proteínas de membrana.

A maioria das cromatografias de fase móvel, requer a eluição dos solutos em solventes orgânicos, grandes mudanças de pH, polaridade, e força iônica, ou detergentes fortes. Porém essas condições normalmente desnaturam as proteínas, resultando em perda da estrutura terciária e funções enzimáticas ou receptoras.

Comparando-se com a cromatografia CIH tradicional, a MAI * PC CLAP oferece vantagens quanto a velocidade e eficiência, e ainda mantém o ambiente físico-químico tanto na fase estacionária quanto na móvel, permitindo a retenção da conformação nativa da proteína além de grande fração de sua atividade catalítica. A MAI * PC também oferece a vantagem de ser reutilizável. Com algumas precauções, pode-se fazer mais de 100 separações na coluna, sem deteriorização na performance, enquanto que os suportes convencionais sobre géis podem ser utilizados para duas ou três separações antes de se tornar inefetivo.

Ainda com relação a cromatografia MAI * PC, notou-se que o glicerol ou o etilenoglicol quando adicionados à fase móvel reduziram a magnitude das interações hidrofóbicas entre a proteína e a superfície adsorvente e também minimizaram as interações proteína-proteína na fase aquosa. Este fato contribui para a recuperação de proteínas funcionais devido a redução da agregação e desnaturação das proteínas (Pidgion e Venkataram, 1989; Pidgion et al., 1991).

1.10 - Magnetolipossomas

1.10.1 - Preparação e Características Estruturais

Os fosfolípidios quando expostos à campos magnéticos de alta intensidade tendem a ser repelidos. Isso ocorre por causa de suas cadeias de ácido graxo, que conferem-lhes propriedades diamagnéticas fracas, ou seja, sob campo magnético as cadeias de hidrocarbonetos são induzidas a se orientar perpendicularmente ao vetor do campo.

Para ser possível a remoção de vesículas de fosfolípidios da solução sob ação de um campo magnético, sistemas complexos envolvendo fluidos magnéticos devem ser formados. As forças de atração ferromagnéticas devem portanto exceder as de repulsão fosfolipídicas. Os magnetolipossomas possuem na sua estrutura partículas magnéticas na sua parte central, revestida por fosfolípidios agregados em estrutura de bicamada.

De Cuyper e Joniau (1988) prepararam magnetolipossomas através da incubação e diálise de fluido magnético na presença de vesículas fosfolipídicas pré-formadas, à temperatura

de 37°C com 4 trocas de tampão. Os magnetolipossomas foram capturados da solução com alta eficiência por magnetoforese de alto gradiente (MAG), com campo magnético de aproximadamente 1,7 T.

Menager e Cabuil (1995) e Bacri et al. (1995) prepararam magnetolipossomas com DOPC, pelo método da emulsão múltipla. Kiwada et al. (1986) prepararam estes pelo método da hidratação do filme lipídico.

A força pela qual os magnetolipossomas são atraídos sob ação do campo magnético é expressa pela Equação 9, apresentada no item 1.5.

Na prática, partículas com diâmetros menores do que 50 nm, chamadas de subdomínios, são capturadas apenas em MAG. As vantagens do uso de partículas de subdomínios, como a magnetita, é que as forças gravitacionais são superadas pela agitação térmica Browniana. Após a retirada do campo, os colóides não apresentam magnetismo residual, sendo facilmente liberados sem necessidade de desmagnetização ou pressão mecânica, como a sonicação.

De acordo com De Cuyper e Joniau (1988), a associação dos fosfolipídios e partículas magnéticas provavelmente é aumentada pelas interações laterais inter-cadeias, o que faz com que os fosfolipídios desloquem moléculas anteriormente associadas às partículas magnéticas para estabilização do colóide, como é o caso do deslocamento do ácido láurico.

Experimentos realizados pelos mesmos autores, usando fosfatidilglicerol (PG) e a magnetita (Fe_3O_4) com diâmetro 14 nm, resultaram em bicamada com 3,5 nm de espessura, com 992 moléculas de fosfolipídio na monocamada interna e 2233 moléculas na externa. A soma das duas camadas está de acordo com o número encontrado em vesículas unilamelares pequenas de dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). Assumindo-se a densidade de 5,1 g/cm³ para Fe_3O_4 , a razão em mmol DMPG / g Fe_3O_4 encontrada para bicamada é de 0,73.

O processo de adsorção dos fosfolipídios consiste de duas etapas. A primeira envolve o comportamento de alta afinidade, com concentrações maiores de fosfolipídio e é seguida pela adsorção do tipo Langmuir, quando utilizado o PG. A zona de alta afinidade acaba com aproximadamente 1/3 do valor achado na saturação para a adsorção de DMPG sobre a magnetita, e acredita-se que corresponde a formação da monocamada interna. A camada externa, quando comparada com a interna, geralmente é mais difícil de ser formada, já que a maioria das forças envolvidas são as hidrofóbicas de Van der Waals. Experimentos de extração com o Tween 20, em DMPG -ML's, confirmaram que a ligação da camada interna com a magnetita é muito mais forte que a associação da externa.

A isoterma de Langmuir é válida somente para situações ideais, em que não há interações soluto-soluto ou soluto-solvente. Attwood e Florence (1983) mencionam entretanto que o comportamento de tensoativos iônicos sobre superfícies hidrofóbicas pode ser satisfatoriamente descrito pela Equação de Langmuir. Baseado nesse fato, De Cuyper e Joniau (1988) interpretaram a adsorção de lipídios considerando que muito provavelmente durante a adsorção os lipídios mudam o seu modo de orientação em relação à partícula magnética, de uma orientação plana para perpendicular. Alguns fosfolipídios, tais como o lisofosfatidilglicerol, no entanto não obedecem rigorosamente a isoterma de Langmuir na adsorção.

1.10.2 - Aspectos do Mecanismo de Adsorção

Alguns aspectos do mecanismo da adsorção dos fosfolipídios de fosfatidilgliceróis (PG's), sobre os nanocolóides de magnetita estabilizados com ácido láurico foram estudados por De Cuyper e Joniau (1991) através do comportamento cinético no processo de ligação.

Há um consenso em sistemas diluídos, em que a cinética da transferência lipídica espontânea entre diferentes vesículas está de acordo com o mecanismo que envolve a taxa de transferência limitante de monômeros das superfícies doadoras, seguidas pela rápida difusão através da fase aquosa e captura pelas partículas receptoras. Isto implica em que as cadeias hidrofóbicas das moléculas fosfolipídicas entrem em contato, pelo menos temporariamente, com a fase aquosa, o que leva ao comprimento destas cadeias influenciarem no processo. De acordo com este mecanismo proposto, foi observado um decréscimo de 5 a 10 vezes na taxa de adsorção com o aumento de um grupo $-CH_2-$ no comprimento da cauda apolar do fosfolipídio. Além disso, a taxa global de transferência foi limitada pela taxa de dessorção dos fosfolipídios da vesícula doadora.

A cinética da associação, entre os fosfolipídios e Fe_3O_4 seguiu o comportamento de primeira ordem (Equação 18) à baixas razões de fosfolipídio/magnetita, até o limite correspondente à 30% da adsorção, com uma razão de saturação de aproximadamente 0,8 mmol de fosfolipídio/g de magnetita.

Em grandes proporções entre PL/ Fe_3O_4 , após o comportamento inicial de primeira ordem, ocorre um desvio drástico da linearidade, provavelmente devido à camada externa da vesícula ligada ao sólido ser adsorvida com menor força ao complexo PL - Fe_3O_4 que a interna.

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_1 \Gamma \quad (18)$$

A integração da Equação 18 entre os limites de tempo 0 ao de saturação e do tempo t ao de saturação (∞), fornece a relação linear entre o logaritmo da fração adsorvida e o tempo, expressa pela Equação 19:

$$\ln\left(\frac{\Gamma_t - \Gamma_\infty}{\Gamma_0 - \Gamma_\infty}\right) = -k_1 t \quad (19)$$

onde: Γ : quantidade de PL's adsorvidos / g de partículas magnéticas (mmol/g)

índices t : no tempo, 0 : no início, e ∞ : na saturação.

k_1 : constante da taxa de pseudo-primeira ordem (h^{-1})

t : tempo em horas

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do processo de adsorção, definido como o tempo para se atingir metade da quantidade de saturação, é calculado pela Equação 20.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1} \quad (20)$$

A etapa limitante do processo de adsorção é o deslocamento dos lipídios das vesículas pré-preparadas para a superfície da magnetita. Porém moléculas como o DMSO, um solvente orgânico solúvel em água, podem acelerar a adsorção. Elas estimulam a taxa de deslocamento dos lipídios pelo enfraquecimento do contato entre lipídio-lipídio das vesículas doadoras e aumentam a solubilidade aquosa das moléculas fosfolipídicas pelo rompimento das estruturas da água.

Embora o mecanismo responsável pela formação dos magnetolipossomas não seja explícito na literatura, De Cuyper e Joniau (1991) consideram a hipótese de formação da camada interna de fosfolipídios dos magnetolipossomas consistir da adsorção das cadeias acil graxas dos fosfolipídios na interface do colóide magnético e subsequentemente desprendimento das cabeças polares de ácido láurico da cobertura e assim, forte quimissorção sobre a superfície de óxido de ferro pelo deslocamento das moléculas de ácido láurico. No caso da

camada externa, é importante se considerar as forças atrativas de Van der Waals e a relação entre o comprimento das cadeias e as constantes de ligação (De Cuyper e Joniau, 1991).

1.11 - Adsorção sobre Superfície Sólida

1.11.1 - Características Gerais

Os conceitos apresentados abaixo foram retirados da referência Cardoso (1987).

Nos sistemas de estado condensado, ou seja, líquidos e sólidos, as partículas que se encontram na superfície ou na interface com outro sistema estão numa situação diferente das que se encontram no interior do sistema: enquanto as partículas do interior estão sujeitas à forças em todas as direções, dando como resultante uma força nula, as partículas da superfície possuem forças oriundas só das partículas do interior, como representado a Figura 11. A resultante \mathbf{R} é uma força no sentido do interior do sistema, como se estivesse puxando a partículas para o interior. O que impede o seu deslocamento da superfície é que a interação entre as partículas subjacentes é maior que a resultante da superfície. Por isso, as partículas da superfície possuem um excesso de energia superficial, E_s . Esta energia é responsável pela tensão superficial dos líquidos e pela adsorção de um fluido sobre um sólido, como mostra a Figura 12.

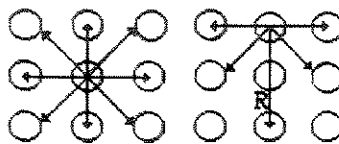


Figura 11: Interação entre as moléculas de um sistema condensado (líquido ou sólido),
(Cardoso, 1987).

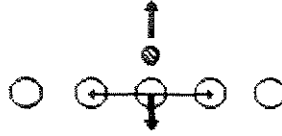


Figura 12: Interação entre moléculas de um fluido (gás ou líquido) com a superfície de um sólido (Cardoso, 1987).

A adsorção de um fluido sobre a superfície é portanto um fenômeno espontâneo e termodinamicamente significa que a variação da energia livre de Gibbs do sistema final (dG) em relação ao inicial é negativa. Por outro lado, a entropia (S) do sistema final também diminui já que ela mede o grau de desordem, e este é menor quando a molécula está adsorvida, logo $dS < 0$.

Portanto, podemos estimar o que ocorre com a entalpia na adsorção. Sendo:

$$dH = dG + TdS \quad (21)$$

e como tanto a variação da energia livre quanto a da entropia são negativas, também dH será negativo, ou seja, a adsorção deve ser um processo exotérmico, o que realmente se observa na maioria dos casos. Além disso, pelo princípio de Le Chatelier pode-se prever que um aumento de temperatura, diminuiria a quantidade de material adsorvido.

Dependendo da força de adsorção das ligações que ocorrem entre as moléculas que estão sendo adsorvidas (adsorbato) e o adsorvente, pode-se ter dois tipos principais de adsorção: a adsorção física e a química.

A adsorção física é causada por forças de interação molecular que envolvem dipolos permanentes, dipolo induzido ou atração quadripolar, forças da mesma ordem de grandeza que as de Van der Waals, existentes entre as moléculas de líquido. Por esse motivo, o tipo de interação existente na interface gás-sólido poderá ser semelhante à interação gás-gás, existente entre a molécula adsorvida diretamente sobre a superfície e outra adsorvida sobre ela. Esse processo poderá se estender a outras moléculas mais afastadas da superfície, formando uma multicamada semelhante a uma película de líquido sobre a superfície do sólido. Como mostra a Figura 13.

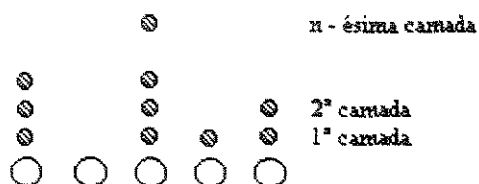


Figura 13: Fisissorção de um gás sobre um sólido (Cardoso, 1987).

A fisissorção ocorre a temperaturas baixas e é mais pronunciada quanto mais próxima estiver da temperatura de condensação do gás. Devido à inexistência de uma energia de ativação para que a adsorção ocorra, a fisissorção atinge rapidamente o equilíbrio, sendo por isso classificada como reversível (Cardoso, 1987).

A adsorção química envolve rearranjo dos elétrons do material que interage com o sólido, tendo-se formação de ligações químicas, e é restrita à primeira camada superficial do adsorvente (Ciola, 1981). A quimissorção, ao contrário da fisissorção, ocorre a temperaturas bem maiores que a do ponto de ebulição do gás adsorvido. A existência de uma energia de ativação, E_a , que representa a repulsão da maior aproximação do gás à superfície, e o alto valor da entalpia, fazem com que a dessorção da molécula quimissorvida seja lenta, ou que ocorra transformação química. Por isso, a quimissorção é classificada como irreversível (Cardoso, 1987).

Quando se tem mais de um soluto e principalmente se um deles for uma macromolécula, poderá haver competição pelos mesmos sítios de adsorção. Assim, solutos que são adsorvidos fortemente sobre vários sítios podem ser inibidos estericamente, e macromoléculas podem ser excluídas de poros pequenos. Com isso, a adsorção de misturas geralmente não apresenta um comportamento padrão (Belter, 1988).

1.11.2 - Isotermas de Adsorção

O desenvolvimento da equação diferencial fundamental até chegar às isotermas de adsorção de Gibbs e de Langmuir foram extraídas de Ruthven (1984), sendo que a principal diferença entre as duas isotermas é que a isoterma de Gibbs é encontrada considerando que a equação de estado para a fase adsorvida corresponde a lei dos gases ideais e a de Langmuir utilizada outra relação, como será mostrado no desenvolvimento a seguir.

Em termodinâmica, a equação diferencial fundamental que sumariza a primeira e segunda leis pode ser expressa por:

$$dU = TdS - PdV + \sum \mu_i dn_i \quad (22)$$

sendo: U a energia interna, n número de moles do componente i e μ é o potencial químico do componente i .

Se considerarmos a fase adsorvida como uma solução de n_s moles de adsorbato e n_a moles de adsorvente não volátil, então a Equação 22 pode ser escrita como:

$$dU = TdS - PdV + \mu_a dn_a + \mu_s dn_s \quad (23)$$

A equação também pode ser escrita para o adsorvente (a) na ausência de adsorbato (s):

$$dU_{0a} = TdS_{0a} - PdV_{0a} + \mu_{0a} dn_a + \mu_s dn_s \quad (24)$$

subtraindo, tem-se:

$$dU_s = TdS_s - PdV - \Phi dn_a + \mu_s dn_s \quad (25)$$

$$U_s \equiv U - U_{0a}$$

$$V_s \equiv V - V_{0a}$$

onde: $S \equiv S - S_{0a}$

$$-\Phi = \mu_a - \mu_{0a}$$

Se adotarmos a visão de Gibbs e considerarmos n_a moles de adsorvente ser termodinamicamente inerte, essas quantidades, definidas por diferenças, tornam-se propriedades termodinâmicas da fase adsorvida, uma vez que qualquer contribuição do adsorvente é eliminada na subtração. Por exemplo, U_s agora refere-se a energia interna de n_s moles de adsorbato no campo potencial do adsorvente.

O significado da variável Φ requer a consideração adicional:

$$\Phi \equiv \mu_{0a} - \mu_a = \left(\frac{\partial U_{0a}}{\partial n_a} \right)_{S_{0a}, V_{0a}} - \left(\frac{\partial U}{\partial n_a} \right)_{S, V, n_s} = - \left(\frac{\partial U_s}{\partial n_a} \right)_{S_s, V_s, n_s} \quad (26)$$

É evidente que Φ representa a variação na energia interna por unidade de adsorvente devido a difusão do adsorbato sobre a superfície ou através do volume do microporo do adsorvente. Para adsorção numa superfície bidimensional, a área da superfície (\mathcal{A}) é diretamente proporcional à n_a , enquanto para adsorção tridimensional no microporo adsorvente, o volume (\mathcal{V}) é proporcional a n_a . Pode-se então escrever:

$$\Phi dn_a = \pi d\mathcal{A} = \phi d\mathcal{V} \quad (27)$$

onde: π e ϕ são respectivamente a expansão da pressão bidimensional e tridimensional definidas como:

$$\pi = - \left(\frac{\partial U_s}{\partial \mathcal{A}} \right)_{S_s, V_s, n_s}, \quad \phi = - \left(\frac{\partial U_s}{\partial \mathcal{V}} \right)_{S_s, V_s, n_s} \quad (28)$$

Definido dessa maneira, π corresponde à diferença na tensão superficial entre uma superfície limpa e uma coberta com adsorbato.

De forma análoga, as equações fundamentais da termodinâmica representadas pela combinação da primeira e segunda leis, podem ser escritas de 4 maneiras equivalentes em termos de energia interna, entalpia, energia livre de Helmholtz (\mathcal{A}), ou energia livre de Gibbs. Para uma fase adsorvida:

$$\Phi \equiv \mu_{0a} - \mu_a = \left(\frac{\partial U_{0a}}{\partial n_a} \right)_{S_{0a}, V_{0a}} - \left(\frac{\partial U}{\partial n_a} \right)_{S, V, n_s} = - \left(\frac{\partial U_s}{\partial n_a} \right)_{S_s, V_s, n_s} \quad (29)$$

Sendo o volume da fase adsorvida desprezível em comparação com o volume da fase vapor, o termo PdV_s pode ser desprezado. Essas equações quando integradas com todas as variáveis intensivas constantes resultam nas expressões a seguir:

$$\begin{aligned}
U_s &= TS_s - \Phi n_a + \pi_s n_s \\
H_s &= TS_s - \Phi n_a + \pi_s n_s \\
A_s &= -\Phi dn_a + \pi_s n_s \\
G_s &= -\Phi dn_a + \pi_s n_s
\end{aligned} \tag{30}$$

As quatro definições equivalente de Φ e μ_s são:

$$\begin{aligned}
U_s &\equiv U - U_{0a} \\
V_s &\equiv V - V_{0a} \\
S &\equiv S - S_{0a} \\
-\Phi &= \mu_a - \mu_{0a}
\end{aligned} \tag{31}$$

A partir das expressões mostradas acima pode-se chegar a diferentes isotermas de adsorção.

1.11.2.1 - Isoterma de Adsorção de Gibbs

Utilizando a Equação 29 em relação a expressão que representa a energia livre de Helmholtz, e considerando temperatura constante e desprezando o termo PdV_s , obtem-se:

$$dA_s = -\Phi dn_a + \mu_s dn_s = -\pi dA + \mu_s dn_s \tag{32}$$

e pela diferenciação da Equação 29 em relação à mesma expressão, tem-se:

$$dA_s = -\Phi dn_a - n_a d\Phi + \mu_s dn_s + n_s d\mu_s \tag{33}$$

subtraindo a Equação 33:

$$n_a d\Phi = A d\pi = V d\phi = n_s d\mu_s \tag{34}$$

Considerando o equilíbrio entre a fase adsorvida e a fase vapor ideal, tem-se a Equação 35, que assume equilíbrio se os potenciais químicos das espécies adsorvidas nas diferentes fases são iguais:

$$\mu_s = \mu_g = \mu_g^0 + RT \ln \left(\frac{P}{P^0} \right) \quad (35)$$

onde: μ_s é o potencial químico na fase sólida, μ_g potencial químico na fase gasosa, e μ_g^0 é o potencial químico padrão da fase vapor que é o potencial químico na pressão de referência P^0 .

Pela diferenciação da Equação 35 tem-se a Equação 36:

$$d\mu_s = \frac{RTdp}{P} \quad (36)$$

substituindo-se a Equação 34 na 36, obtem-se a expressão:

$$n_a \left(\frac{\partial \Phi}{\partial P} \right)_T = \frac{RT}{P} n_s \approx A \left(\frac{\partial \pi}{\partial P} \right)_T = \frac{RT}{P} n_s \quad (37)$$

que é a isoterma de adsorção de Gibbs.

A isoterma de adsorção de Gibbs expressa uma relação geral entre pressão expandida (ou energia) e concentração da fase adsorvida. Porém, nem a pressão expandida nem a energia Φ_s são adequadas à medidas experimentais diretas e, do ponto de vista prático, há maior interesse na relação entre concentração da fase adsorvida e pressão de vapor de equilíbrio. Para um sistema de fase vapor de componente único a concentração é determinada pela temperatura e pressão. Similarmente, na fase adsorvida de um único componente, a concentração é determinada pela temperatura e pressão expandida. Como um sistema de fase vapor pode ser caracterizado por uma equação de estado $V(P,T)$, então a fase adsorvida pode ser caracterizada pela equação de estado numa pressão expandida $A(\pi,T)$ ou $V(\phi,T)$.

Se a equação de estado para a fase adsorvida corresponde a lei dos gases ideais (lei de Henry), então:

$$\pi A = n_s RT \quad (38)$$

substituindo na isoterma de Gibbs, Equação 37:

$$\left(\frac{\partial \pi}{\partial p} \right)_T = \frac{\pi}{p} \quad (39)$$

integrando:

$$\pi = K' p \quad (40)$$

$$q = \frac{n_s}{A} = \frac{K' p}{RT} = Kc \quad (41)$$

Então uma relação linear entre pressão e concentração da fase adsorvida é equivalente à uma equação de estado do tipo gás ideal para uma camada adsorvida em termos de pressão expandida.

1.11.2.2 - Isoterma de Langmuir

A concentrações mais altas pode-se usar uma equação de estado na forma:

$$\pi(A - \beta) = n_s RT \quad (42)$$

em analogia com $P(V-b)=nRT$:

$$\left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T = \frac{n_s RT}{(A - \beta)^2} \quad (43)$$

e com a isoterma de Gibbs, Equação 37:

$$\frac{dp}{p} = \frac{A dA}{(A - \beta)^2} \quad (44)$$

Assumindo $\beta \ll 2A$, que razoável a baixas concentrações, e desprezando o termo em β^2 no denominador da Equação 44, essa expressão integrada resulta em:

$$bp = \frac{2\beta / A}{1 - 2\beta / A} = \left(\frac{\Theta}{1 - \Theta} \right) \quad (45)$$

que vem a ser igual a isoterma de Langmuir, sendo $\Theta = 2\beta/A$ (Ruthven, 1984). Outra maneira de se expressar essa isoterma é na forma da Equação 46 apresentada a seguir para a adsorção de um único componente:

$$q = \frac{q_0 y}{K + y} \quad (46)$$

onde: K é a constante de associação, q_0 é o número de sítios ativos no adsorvente, e q é o número de sítios ocupados.

A primeira dedução da isotema de Langmuir foi cinética. Para se chegar ao modelo da equação, Langmuir partiu das seguintes hipóteses: as moléculas são adsorvidas e aderem na superfície do adsorvente em sítios definidos e localizados; cada sítio pode acomodar uma, e somente uma, entidade adsorvida; a energia da entidade adsorvida é a mesma em todos os sítios da superfície e não depende da presença ou ausência de outras entidades adsorvidas nos sítios vizinhos (Ciola, 1981).

1.11.3 - Adsorção por Afinidade

A adsorção por afinidade depende de interações químicas específicas entre soluto e adsorvente, mais do que das forças London - Van der Waals responsáveis pela adsorção física convencional ou de interações eletrostáticas de troca iônica.

A adsorção por afinidade é muito mais específica. O adsorvente consiste de um suporte na superfície do qual é acoplado um ligante, por ligação covalente ou iônica. Na adsorção, o

ligante interage especificamente com o soluto. Como exemplo de sistemas de adsorção por afinidade citam-se: substrato análogo ligando enzimas, antígenos para absorver anticorpo, sequência específica ligando ácido nucléico e proteínas para capturar um hormônio particular (Belter, 1988).

Quanto a orientação das moléculas na adsorção, o mais provável é que durante a adsorção dos lipídios haja mudança gradual do modo de orientação, do plano para o perpendicular (De Cuyper e Joniau, 1988).

2 - MATERIAL

O material utilizado nos experimentos compreende reagentes para a síntese da magnetita, preparação e caracterização de magnetolipossomas, além do material usado para o acoplamento do PAB aos ML's e reagentes de caracterização da enzima.

Para a síntese e estabilização da magnetita coloidal foram usados os seguintes reagentes:

- cloreto de ferro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), P.M. 270,3 g/mol;
- cloreto de ferro II tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), P.M. 198,81 g/mol;
- hidróxido de amônio, obtidos da Merck;
- ácido láurico ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$), P.M. 200,32 g/mol, obtido da Sigma.

Os lipossomas foram preparados utilizando os seguintes lipídios, solventes e tampão:

- colesterol (COL), P.M. 402,7 g/mol;
- diesteroil fosfatidil colina (DSPC), P.M. 790,2 g/mol;
- dimiristoil fosfatidil colina (DMPC), P.M. 677,9 g/mol;
- dimiristoil fosfatidil etanolamina (DMPE), P.M. 635,9 g/mol, obtidos da Sigma;
- tampão N-[2-hidroxietil] piperazina -N'-[2-ácido etanosulfônico] (HEPES), P.M. 238,3 g/mol obtido da Sigma que foi usado para a preparação das soluções;
- clorofórmio (CHCl_3), P.M. 119,38 g/mol;
- metanol (CH_3OH), P.M. 32,04 g/mol, obtidos da Merck.

Para as análises quantitativas dos fosfolipídios e da magnetita foram usados os reagentes:

- ácido 2,4,6 - trinitro benzenosulfônico hidratado (TNBS);
- ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno dissulfônico ($\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_8\text{S}_2\text{Na}_2$), P.M.314,2g/mol (Tiron);
- *t*-octilfenoxi polietoxi etanol (Triton X-100), obtidos da Sigma;
- hidróxido de potássio (KOH), P.M. 56,11 g/mol;
- ácido sulfúrico (H_2SO_4), P.M. 98,8 g/mol;
- ácido nítrico (HNO_3), P.M. 63,01 g/mol;
- ácido clorídrico (HCl), P.M. 36,46 g/mol;
- peróxido de hidrogênio (H_2O_2), P.M. 34,01 g/mol;
- ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), P.M. 176,13 g/mol, da Merck;
- molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), P.M. 1235,86 g/mol, obtido da Ecibra;

- sódio fosfato bibásico heptahidratado p.a. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), obtido da Reagentes Analíticos Ecibra.

Para a determinação do tamanho das partículas foram usados os reagentes a seguir:

Na microscopia, para preparação da amostra usou-se:

- molibdato de amônio, da Merck e
- bacitracina, obtida em farmácia de manipulação.

No raio-X, o teste de estabilidade utilizou o seguinte tensoativo:

- polioxietileno 5 lauril éter (C_{12}E_5), P.M. 406,6 g/mol, obtido da Sigma.

Para o acoplamento do PAB aos ML's foram usados os seguintes reagentes:

- cloreto de sódio (NaCl), obtido da Merck;
- ácido diglicólico, P.M. 116,07 g/mol, obtido da Aldrich Chemical Company Inc.;
- *p*-aminobenzamídina dihidroclorídrico (PAB), P.M. 208,1 g/mol;
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), P.M. 191,7 g/mol;
- 2-etanolamina, P.M. 61,08 g/mol, obtidos da Sigma;
- dimetilsulfóxido (CH_3)₂SO, P.M. 78,13 g/mol, obtido do Grupo Química.

Para a adsorção, dessorção e caracterização da enzima tripsina foram utilizados os reagentes a seguir:

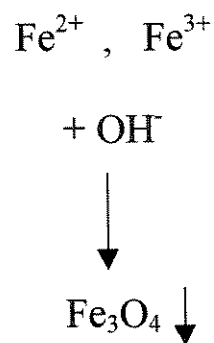
- tripsina, P.M. 23000 g/mol, obtida da Biobrás;
- benzamídina, P.M. 156,6 g/mol;
- *N*-benzoil -L- arginina etil éster (BAEE), P.M. 342,8 g/mol;
- *N*-benzoil -DL- arginina *p*- nitroanilida (BAPNA), P.M. 434,9 g/mol;
- 4,4' - dicarboxi - 2,2' - biquinolina (BCA), P.M. 344,3 g/mol, obtidos da Sigma;
- sulfato de cobre (CuSO_4);
- carbonato de sódio (Na_2CO_3);
- hidróxido de sódio (NaOH), obtidos da Merck, e
- tartarato de sódio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), obtido da Synth Produtos para Laboratório Ltda.

3 - MÉTODOS

3.1 - Síntese e Estabilização da Magnetita Coloidal

O método utilizado para a síntese da magnetita coloidal foi baseado no trabalho de Reimers e Khalafalla (1976). O método consiste da preparação da magnetita coloidal pela co-precipitação dos cloretos de ferro e oxidação do ferro II, seguida da lavagem das impurezas e solubilização ou estabilização da magnetita formada com ácido láurico. A Figura 14 apresenta o esquema da rota de síntese e estabilização da magnetita coloidal com ácido láurico.

ETAPA 1: Co-precipitação dos cloretos de ferro



ETAPA 2: Solubilização com ácido láurico

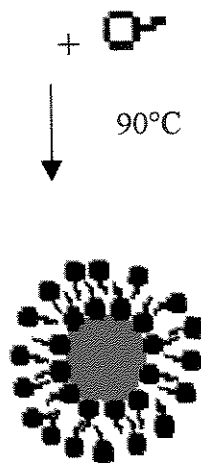


Figura 14: Esquema da rota de síntese e estabilização da magnetita coloidal com o ácido láurico.

Segundo a metodologia de Reimers e Khalafalla (1976), para a obtenção da magnetita, dissolve-se inicialmente 3 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 6g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 25 ml de água destilada e em seguida adiciona-se 12,5 ml de amônia concentrada para a precipitação dos compostos. Lava-se o precipitado, 2 vezes, com 50 ml de mistura de amônia / água (5/95 - v/v) para retirar as impurezas. Adiciona-se 1 g de ácido láurico durante o aquecimento da mistura à 90°C por 4 minutos, para solubilização do ácido láurico. Dilui-se a solução resultante em água até 100 ml, e estoca-se à 4°C .

3.2 - Caracterização da Magnetita Coloidal

3.2.1- Dosagem de Ferro

Após a preparação do colóide magnético, sua concentração na solução foi quantificada através da dosagem do ferro, feita segundo metodologia proposta por De Cuyper e Joniau (1992) e Yoe e Jones (1944).

As amostras de óxido de ferro foram primeiramente convertidas em sais de ferro, que são solúveis em água, pela reação com a água régia (HCl/HNO_3 - 3/1 em volume). Dessa forma, o ferro III pode reagir com o Tiron formando um complexo de cor vermelha em meio básico, que é mostrado na Figura 15 e permite que o ferro seja quantificado por colorimetria.

Para garantir a conversão total dos óxidos de ferro em sais, foram feitos ensaios variando a concentração de água régia e o tempo de reação. Na Tabela 1, são apresentadas as concentrações dos ácidos usados na preparação da água régia para os vários ensaios, na proporção de normalidade de 3:1 entre HCl e HNO_3 .

Tabela 1: Concentrações de Ácidos na Água Régia

Concentração de HCl (N)	Concentração de HNO_3 (N)
0,75	0,28
1,5	0,56
5	1,87

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE FERRO

Para a preparação da solução padrão de ferro, dissolve-se o $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em água destilada para se obter uma solução final de 100 p.p.m (mg/l) de Fe III. Em seguida faz-se

diluições a várias concentrações de ferro, de 5 a 100 p.p.m., para se obter a curva de calibração do ensaio.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Converte-se o óxido de ferro em sais de ferro adicionando-se, à 500 µl de amostra convenientemente diluída, 200 µl de água régia (HCl / HNO₃ a 5M de HCl).

As partículas de magnetita cobertas com a bicamada de fosfolipídios são aquecidas, se necessário, à 60°C para melhor solubilização, após a adição de 100 µl de Triton X-100 para a desestabilização das vesículas, tornando a solução límpida para que não haja interferência dos fosfolipídios na análise.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

A 0,5 ml da amostra oxidada, com no máximo 120 µg Fe / ml, adiciona-se 100 µl de solução de Tiron a 0,25M. Em seguida, adiciona-se 0,5 ml de KOH a 4N, que além de aumentar o pH para favorecer a formação do complexo vermelho, oxida o Fe II na solução para Fe III. Após o hidróxido é adicionado 1 ml de tampão fosfato a 0,2M, pH 10. A intensidade de absorção é medida em espectrofotômetro, logo em seguida, à 480nm.

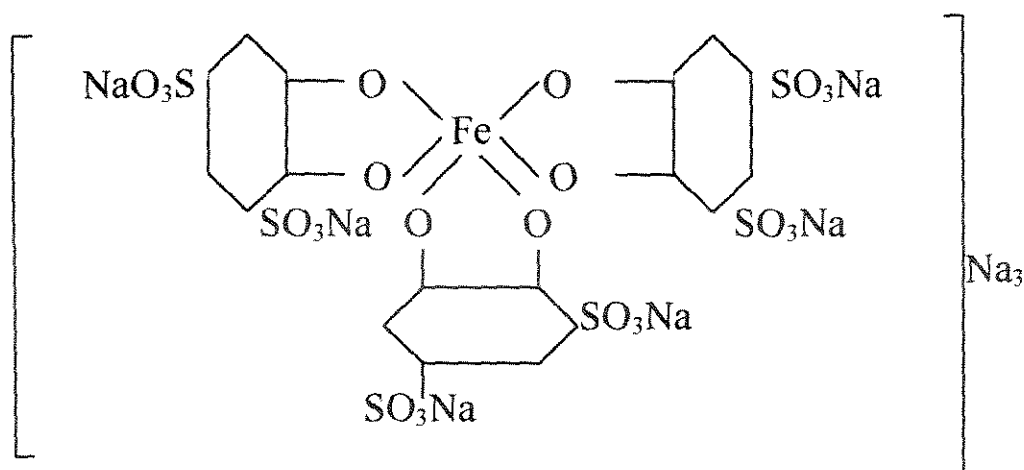


Figura 15: Fórmula estrutural do complexo vermelho formado pela reação do ferro III com o Tiron, o catecato sulfonado de sódio.

A curva de calibração obtida para a quantificação do teor de ferro se encontra apresentada no Anexo I, Figura I.1.

3.3 - Preparação dos Lipossomas

A preparação dos lipossomas foi realizada pelo método da hidratação do filme seco de lipídios com posterior extrusão em membranas de polycarbonato, para a homogeneização do tamanho das vesículas (Lasic, 1993). A composição utilizada na preparação das vesículas encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2: Composição das Vesículas Preparadas

Fosfolipídio	Fração Molar %	Fração Molar %
DSPC	60	-
Colesterol	40	-
DMPE	-	20
DMPC	-	80

3.3.1 - Método da Hidratação do Filme Seco

Os fosfolipídios foram dissolvidos em 10ml de mistura de clorofórmio/metanol (9/1, v/v) para se obter uma solução final de 7,5 mM em 10 ml de tampão. Coloca-se a solução em evaporador rotatório por 5 minutos para se obter a homogeneização da mistura. Em seguida liga-se o vácuo e evapora-se o solvente à temperatura ambiente por 15 minutos e depois a 65 - 70°C por mais 15 minutos. Com isto, obtém-se um filme seco de lipídios sobre o fundo do balão, que é hidratado com 10 ml de solução tampão HEPES (10 mM, pH 7,4). O tampão é preparado com dissolução em água Milli - Q, obtida em equipamento de ultrapurificação Milli - Q plus da Millipore. A solução permanece em rotação à temperatura de 65 - 70°C, maior do que a T_c do fosfolipídio por mais 30 minutos. Dessa forma são obtidas vesículas multilamelares de diversos tamanhos. Para que se consiga obter vesículas unilamelares homogêneas em relação ao diâmetro faz-se a extrusão da solução preparada.

3.3.2 - Obtenção de Vesículas Unilamelares - Homogeneização dos Tamanhos

A amostra obtida no método da hidratação do filme é deixada em repouso por 30 minutos para atingir o equilíbrio, antes de se fazer a extrusão. A extrusão é realizada com a utilização de 2 membranas de polycarbonatos (100 nm de diâmetro) sobrepostas e colocadas

em cima de um disco dreno. A extrusão é feita em equipamento de aço inox de 10 ml de volume, com camisa térmica para circulação de água, modelo T.001 da Lipex Biomembranes Inc., ao qual é incorporado um redutor / regulador de pressão e um cilindro de nitrogênio. A pressão utilizada é ajustada à 10 kgf/cm² e o banho térmico de circulação à 75°C. À extrusora são adicionados 5 ml de solução das vesículas pré-formadas, que permanecem pelo menos 3,5 minutos na extrusora antes de cada passagem, para que a amostra atinja o equilíbrio térmico. Para que se atinja a homogeneização da solução esta é passada na extrusora por 15 vezes (Ribas, 1997).

3.4 - Caracterização dos Lipossomas

3.4.1 - Dosagem de Fosfolipídios

Os lipossomas foram caracterizados em relação a sua concentração molar de fosfolipídios quantificada através do fosfato (PO_4^{3-}) em solução, já que cada fosfolipídio possui um grupo fosfato. O ensaio baseia-se no método desenvolvido por Chen et al. (1956), no qual primeiramente é feita a oxidação das cadeias de ácido graxo com o ácido sulfúrico, que resulta em carbonos elementares. Em seguida é adicionado peróxido de hidrogênio livre de fosfato para garantir a oxidação total dos carbonos em dióxido de carbono (CO_2). O fósforo é então transformado em ortofosfato pelo molibdato de amônio, o qual é reduzido pelo ácido ascórbico resultando num complexo de coloração azul.

PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Prepara-se uma solução de fosfato de 2,68 mM, dissolvendo o sódio fosfato bibásico em tampão HEPES. Faz-se diluições em concentrações de 1,07, 0,54 e 0,27 mM. Prepara-se também solução de fosfolipídio a 1,95 mM de concentração, dissolvendo-o em HEPES e sonicando-o em banho de Ultrasonicador Branson 2200. Então faz-se diluições em concentrações de 0,78, 0,39 mM, obtendo-se os padrões para a curva de calibração do ensaio fosfato.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

Toda a vidraria é lavada com detergente livre de fosfato para que não haja interferências na análise. São colocadas 2 pérolas de vidro em cada tubo de ensaio para melhorar a

distribuição de calor e em seguida é adicionado 100 µl de solução padrão ou amostra adequadamente diluída. Adiciona-se 500 µl de ácido sulfúrico (10 N) e deixa-se em aquecimento à 200°C durante 30 minutos, em placa de aquecimento Fisatom. Retira-se os tubos da placa, após atingirem a temperatura ambiente adiciona-se 165 µl de água oxigenada e coloca-se por mais 30 minutos à temperatura de 200°C. Novamente espera-se esfriar e adiciona-se 4 ml de água deionizada. Coloca-se 500 µl do molibdato de amônio (0,02 g/ml) e 500 µl de ácido ascórbico (0,1 g/ml), diluídos em HEPES. Aquece-se por até 7 minutos em água fervente, tempo em que ocorrerá a formação de um complexo azul do qual será lida a intensidade de absorbância à 830 nm (Ribas, 1997).

Para garantir a precisão dos resultados, uma curva de calibração é sempre construída em paralelo com as análises das amostras. Uma curva de calibração típica do ensaio é apresentada no Anexo I, Figura I.2.

3.4.2 - Dosagem do Teor de DMPE

Os lipossomas foram caracterizados em relação à concentração de DMPE nas vesículas pela quantificação da amina (NH_3^+) primária em solução, visto que cada DMPE possui um grupo amina em sua estrutura. A estrutura do DMPE é mostrada na Figura 16 abaixo. O método consiste em se romper as vesículas da solução com o tensoativo Triton X-100, para se quantificar a amina total, e em seguida reagir-la com o TNBS em meio básico, que forma um composto amarelo, parando-se a reação com a adição de ácido clorídrico, que diminui o pH do meio (New, 1990).

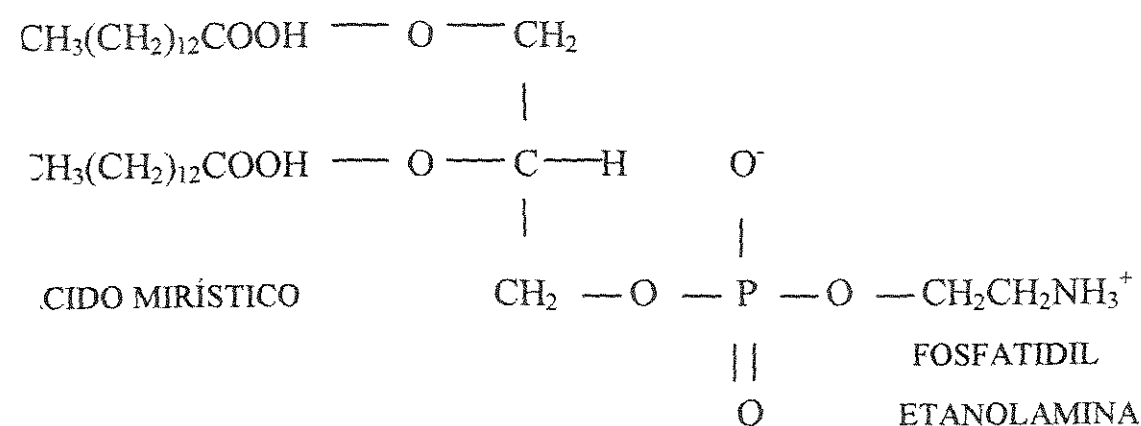


Figura 16: Estrutura do DMPE.

PREPARAÇÃO DA CURVA PADRÃO DE AMINA PRIMÁRIA

Dissolve-se DMPE em tampão HEPES a concentração de 0,36 mM em banho de ultrasonicação Branson 2200 por 20 minutos, para melhor solubilização do fosfolípido. Faz-se diluições a 0,27, 0,19, 0,10 e 0,02 mM obtendo-se a curva de calibração do ensaio.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

Adiciona-se 300 µl de Triton X-100 (100 mM) à 300 µl de amostra com adequada diluição. Incuba-se por 2 horas para rompimento das vesículas e adiciona-se 225 µl de solução bicarbonato de sódio (NaHCO_3 a 0,8 M, pH 8,5) para se ter um pH adequado para a reação. Coloca-se então 120 µl de TNBS (2,5 mg / ml) e agita-se. Após a agitação os tubos são incubados por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. A reação é interrompida por adição de 450 µl de HCl (1,5 N). Mede-se a absorbância à 410 nm em no máximo 1 hora do término da reação, tempo em que o cromóforo formado é estável.

Para garantir a precisão dos resultados, uma curva de calibração é sempre construída em paralelo com as análises das amostras. Uma curva de calibração típica dessa análise é mostrada no Anexo I, Figura I.3.

3.5 - Preparação dos Magnetolipossomas

Os magnetolipossomas foram preparados pelo método da adsorção de lipídios sobre superfície sólida em diálise, com posterior separação dos fosfolípidios não adsorvidos em magnetoforese de alto gradiente, método proposto por De Cuyper e Joniau (1988, 1990).

Para a adsorção dos fosfolípidios sobre a superfície sólida da magnetita, mistura-se as vesículas pré-formadas com as partículas magnéticas estabilizadas, na relação PL / Fe_3O_4 aproximadamente de 4,5 mmol/g, relação estimada para a saturação das partículas, ou seja, formação da bicamada lipídica. Incuba-se essa solução e dialisa-se por 48 horas em sacos de diálise Inlab de peso molecular de corte 10000 Da, utilizando tampão HEPES em volume de 500ml, que é trocado 4 vezes em intervalos regulares de tempo. Mantem-se o sistema de diálise à 37°C em banho termostático.

Nesse processo o ácido láurico é deslocado da magnetita pelos fosfolípidios que são adsorvidos na superfície até que se atinja o equilíbrio de transferência de massa entre os fosfolípidios nos lipossomas e magnetolipossomas. Após a diálise as partículas que precipitaram foram separadas da solução através de decantação. Um esquema representativo do mecanismo de adsorção dos lipídios sobre a magnetita é mostrado na Figura 17.

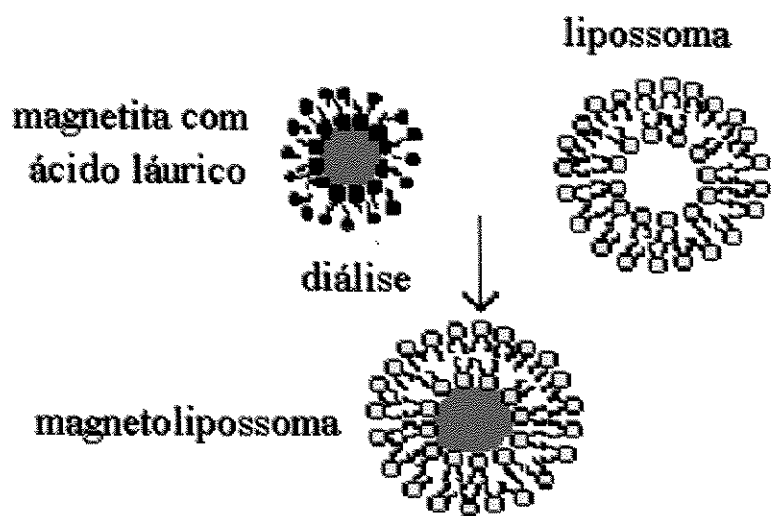


Figura 17: Esquema do mecanismo de adsorção dos fosfolipídios sobre a magnetita.

Usando esse procedimento, foram feitos experimentos para a verificação da influência, na adsorção dos fosfolipídios na superfície da magnetita, da natureza dos fosfolipídios e do tipo de tratamento após a formação das vesículas.

Para a análise da influência da natureza dos lipídios nas preparações foram usados DMPC, dimiristoilfosfatidilcolina e DMPE, dimiristoilfosfatidiletanolamina, na razão molar de 4:1 (DMPC/DMPE), e DSPC, diesteroilfosfatidilcolina, e colesterol, Col, na razão molar 3:2 (DSPC/Col). Na Tabela 3 são apresentadas as concentrações usadas na diálise, em ambos os ensaios.

Tabela 3: Composição Final das Soluções de Diálise

Lipossoma	Conc. PL (mM)	Conc. Magnetita (g/l)	PL/Magnetita (mmol / g)
DSPC/Col	3,8	0,9	4,2
DMPC/DMPE	3,5	1,3	4,6

3.5.1 - Separação dos Fosfolipídios não Adsorvidos

3.5.1.1 - Sistema de Magnetoforese

As partículas de Fe_3O_4 cobertas com fosfolipídio foram separadas dos fosfolipídios não adsorvidos por magnetoforese de alto gradiente (MAG). O sistema de magnetoforese foi constituído de um eletroímã convencional de pólo dividido projetado para induzir um campo magnético de 1,8T (maior que a saturação da magnetização do ferro) através de uma fonte de tensão estabilizada (5 A, ~60 V). O menor diâmetro do pólo tem 40 mm e a distância entre eles é de 3,5 mm. Imerso no campo magnético foi colocado um tubo de vidro de 2,5 mm de diâmetro interno recheado com lã magnética. A função da lã magnética é gerar inhomogeneidades no campo causando um gradiente. A força magnética utilizada na separação é proporcional ao gradiente multiplicado pelo campo magnético. O eletroímã utilizado foi projetado e construído no Instituto de Física da UNICAMP para esse trabalho de cooperação interdisciplinar. O esquema do equipamento de magnetoforese está representado na Figura 18.

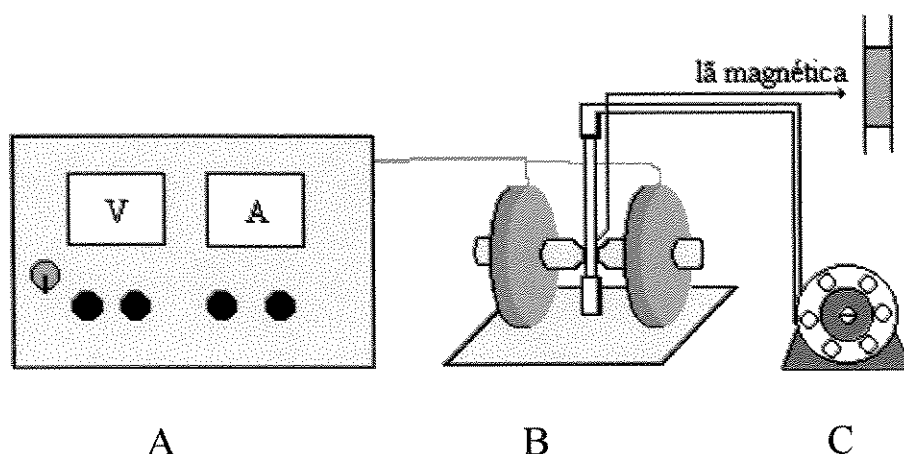


Figura 18: Esquema do equipamento da magnetoforese. A: fonte de tensão, B: eletroímã com tubo de vidro, C: bomba peristáltica.

O sistema de magnetoforese utiliza uma bomba peristáltica Masterflex com tubo Silastic Mecial Grade Tubing (da Dow) de diâmetro interno de 1,98 mm para a alimentação da dispersão contendo os magnetolipossomas.

PROCEDIMENTO DOS ENSAIOS

A dispersão resultante da diálise foi submetida à magnetoforese de alto gradiente, MAG, para a separação dos fosfolípidios (PL) não adsorvidos. Os magnetolipossomas resultantes da diálise foram bombeados em porções de 0,5 a 1 ml através do tubo com lâmina magnética, colocado entre os 2 pólos eletromagnéticos. A vazão usada na separação esteve entre 5 e 20 ml / hora. Após a separação dos PL não adsorvidos o campo magnético foi desligado. Posteriormente os magnetolipossomas foram eluídos do sistema à vazão entre 400 e 1000 ml/h, utilizando o mesmo volume de solução tampão usado na solução inicial. Esta eluição representa a amostra retida no sistema e utilizada nas análises para quantificação dos fosfolípidios e magnetita contidos nos magnetolipossomas. A lâmina magnética foi posteriormente lavada várias vezes para remoção de resíduos de magnetita e fosfolípidios do sistema.

3.6 - Caracterização dos Magnetolipossomas

Os magnetolipossomas foram caracterizados através das quantidades de ferro e fosfolípidios total para as frações eluídas e retidas na magnetoforese. A quantificação do DMPE foi feita apenas nas frações de lavagem, devido à interferência significativa da magnetita no método de TNBS. Os métodos usados são os mesmos já descritos anteriormente nos itens 3.2.1, 3.4.1 e 3.4.2.

3.6.1 - Experimentos para a Construção dos Perfis de Adsorção

Foram feitos estudos da adsorção dos fosfolípidios sobre a superfície da magnetita em relação a cinética e a isoterma de adsorção. Os fosfolípidios usados foram o DMPC e DMPE na proporção molar de 4:1.

3.6.1.1 - Cinética de Adsorção

A cinética de adsorção foi obtida variando-se o tempo de diálise e realizando-se a magnetoforese logo após a retirada das amostras incubadas na diálise. As amostras foram dialisadas na relação fixa fosfolípidio (PL) / magnetita próxima de 4,5. A metodologia usada baseou-se nos trabalhos de De Cuyper e Joniau (1988).

Devido às dimensões do banho termostático usado na diálise, não foi possível incubar

simultaneamente todas as amostras, conduzindo-se os experimentos em várias bateladas.

A instabilidade da solução de magnetita não permitiu que, durante a estocagem, a concentração de magnetita em suspensão, estabilizada com ácido láurico, fosse mantida. Por esse motivo, tinha-se uma concentração de magnetita diferente à cada batelada de preparação embora fosse mantida a relação PL/magnetita.

Na Tabela 4 são apresentadas as concentrações iniciais de PL e magnetita usadas nestes ensaios.

Tabela 4: Concentrações Iniciais de PL e Magnetita Usadas na Diálise

Tempo de Diálise (horas)	V total (ml)	Concentração Total de PL (mM) = n_i	Concentração Total de Magnetita (g/l) = m_i	n_i / m_i (mmol/g)
0,5	2,5	6,3	1,39	4,5
3,0	2,5	3,7	0,83	4,5
3,5	2,8	3,5	0,73	4,5
15,0	2,5	3,7	0,76	4,9
20,0	2,5	3,7	0,76	4,9
24,3	2,5	6,3	1,39	4,5
30,0	2,8	3,5	0,77	4,5
40,0	2,5	3,7	0,76	4,9
65,0	2,5	6,3	1,39	4,5
70,8	3,0	6,4	1,36	4,7

Nesses ensaios as principais fontes de erros experimentais foram na obtenção da razão PL/magnetita variando ambas as concentrações nas várias bateladas de ensaios, e na determinação do teor de fosfolípidios e magnetita. No primeiro caso esse erros não puderam ser quantificados, enquanto que para as dosagens de fosfolípidios e magnetita o erro médio foi de 10% e 5%, respectivamente.

O erro global médio referente à associação dos erros nas análises citadas foram calculados através da Equação 47 (Mickley et al.,1957) e são apresentados como barras de erro na Figura 22.

$$\Delta \left(\frac{C_{PL}}{C_{mag.}} \right) = \frac{1}{C_{mag.}} \cdot \Delta C_{PL} + \frac{C_{PL}}{C_{mag.}^2} \cdot \Delta C_{mag} \quad (47)$$

onde C_{PL} é a concentração média de fosfolípidios calculada pela média aritmética das duplicatas obtidas no ensaio fosfato, $C_{mag.}$ é a concentração média de magnetita, e ΔC_{PL} e ΔC_{mag} são a metade da diferença entre os valores obtidos nas duplicatas das análises.

Na Figura 23 o erro global de cada ponto foi obtido através do cálculo do maior e menor valor do primeiro termo da Equação 19 para cada ponto, considerando os resultados das duplicatas das análises de fosfolípido total e de magnetita.

Os dados cinéticos foram analisados através de um modelo de pseudo primeira ordem, $d\Gamma/dt = -k_1(t-t_\infty)$, que integrando entre os tempos $t=0$ e $t=t$ resulta na Equação 19:

$$\ln \left(\frac{\Gamma_t - \Gamma_\infty}{\Gamma_0 - \Gamma_\infty} \right) = -k_1 \cdot t \quad (19)$$

onde: Γ_∞ é a razão PL/magnetita na saturação, e Γ_0 e Γ_t a mesma razão nos tempos zero e a um tempo qualquer t

e pelo tempo para se atingir metade da quantidade de saturação, representado pela Equação 15, que foi obtida através da Equação 20:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_1} \quad (20)$$

A análise dos erros do item 4.4.3 foi feita de maneira análoga à utilizada nas figuras do estudo da adsorção dos fosfolípidios sobre a magnetita, usando a Equação 48:

$$\Delta \left(\frac{C_{PL} - C_{DMPE}}{C_{DMPE}} \right) = \frac{1}{C_{DMPE}} \cdot \Delta C_{PL} + \frac{C_{PL}}{C_{DMPE}^2} \cdot \Delta C_{DMPE} \quad (48)$$

3.6.1.2 - Isoterma de Adsorção

A isoterma de adsorção foi construída a partir de dados experimentais obtidos pela variação da relação fosfolipídio / magnetita nas amostras colocadas nas diálises. A relação variou de 0,35 a 5,0 mmol / g. A metodologia usada baseou-se nos trabalhos de De Cuyper e Joniau (1988).

Os ensaios de adsorção foram conduzidos à temperatura de 37°C, utilizando amostras com quantidades iniciais de diálise mostradas na Tabela 5. O tempo de diálise de cada amostra foi de aproximadamente 48 horas. O erro médio no ensaio fosfato para as amostras do retido foi de 9%. Para a colorimetria do ferro esse erro médio foi de 11%.

Tabela 5: Concentrações de PL e de Magnetita Usadas na Diálise

Amostras	V total (ml)	C Total de PL (mM) = n_i	C Total de Magnetita (g/l)= m_i	n_i/m_i (mmol/g)
A	2,5	0,7	1,87	0,4
B	2,5	1,3	1,87	0,7
C	2,5	2,0	1,87	1,1
D	2,5	2,7	1,87	1,4
E	2,5	3,4	1,49	2,3
F	2,5	4,1	1,53	2,7
G	2,5	5,7	1,53	3,7
H	2,5	3,2	0,65	5,0
I	3,0	6,4	1,36	4,7
J	2,5	1,2	1,36	0,9
K	2,5	2,7	1,36	2,0
L	2,5	4,8	1,36	3,5
M	2,5	3,7	0,76	4,9

3.6.2 - Identificação da Formação da Bicamada Lipídica

A identificação da formação da mono e bicamada de fosfolipídios sobre a magnetita foi

feita com o tensoativo Triton X-100. Após a diálise dos magnetolipossomas, foram adicionadas a iguais massas de amostra, diferentes porcentagens mássicas de tensoativo Triton X-100, calculadas de acordo com a Equação 49. Os magnetolipossomas foram então expostos à ação do tensoativo por 2 horas e em seguida foi feita a magnetoforese das soluções.

A quantidade de fosfolipídios adsorvida na monocamada foi determinada pela intersecção das regressões lineares feitas no perfil de solubilização das vesículas, utilizando os resultados obtidos para concentrações mássicas de Triton X-100 entre 0 e 0,2%, e entre 0,3 e 2,5%.

$$\%T = \frac{m_T}{m_T + m_{ML} + m_{\text{água}}} \quad (49)$$

onde o índice T representa o tensoativo, ML os magnetolipossomas, e m é a massa em gramas.

3.6.3 - Determinação do Tamanho das Partículas Formadas

A determinação do diâmetro médio e a visualização das estruturas das partículas da magnetita coloidal e dos magnetolipossomas preparados foram feitas através de SAXS: espalhamento de raios-X a baixos ângulos e microscopia eletrônica de transmissão.

3.6.3.1 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A metodologia de preparação das amostras para a realização da microscopia eletrônica é descrita por New (1990).

De acordo com o método, as amostras são colocadas em uma grade de carbono coberta com um filme hidrofóbico, filme de mancha negativa. A grade é inicialmente preparada com uma gota de solução aquosa de bacitracina na concentração de 0,1mg/ml, para torná-la hidrofílica. Após um minuto, seca-se a gota tocando perpendicularmente a borda da grade com a borda de um pedaço de papel de filtro (Whatman nº1). Adiciona-se uma gota de

amostra à concentração entre 1 e 5 mg/ml e aguarda-se de 1-2 minutos para que o filme possa aderir à grade, secando-se em seguida a amostra com o papel de filtro da mesma maneira já descrita acima. Antes que o filme remanescente na grade seque completamente, adiciona-se uma gota do corante negativo, o molibdato de amônio (1%, pH 7,0 em água destilada). Após um minuto, seca-se a gota de corante e espera-se a secagem total da grade antes de se fazer a microscopia.

3.6.3.2 - SAXS: Espalhamento de Raios-X a Baixos Ângulos

As medidas do diâmetro das partículas preparadas foram feitas por raios-X a baixos ângulos. O método utilizado se baseia na teoria inicialmente desenvolvida por Guinier (1955).

Nas experiências realizadas foi utilizada a estação experimental de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O monocromador foi sintonizado para escolher um comprimento de onda $\lambda = 1,77 \text{ \AA}$ (7,005 KeV) cuja energia é menor que a da borda de absorção do Fe (7,112 KeV), para evitar efeitos de fluorescência, que poderiam afetar as curvas de espalhamento das partículas de magnetita. A distância amostra-detector igual a 1811 mm foi escolhida para poder registrar valores do vetor de espalhamento q mínimos iguais a aproximadamente $0,001 \text{ \AA}^{-1}$. As amostras foram colocadas em porta-amostras especiais para líquidos, com janelas de “mylar”. Os tempos de exposição foram de 30 minutos.

A intensidade espalhada foi registrada com um detector sensível à posição unidimensional. As curvas obtidas foram corrigidas por efeitos de inhomogeneidade do detector, absorção da amostra, espalhamento parasita devido às janelas de “mylar” do porta-amostra, radiação de fundo devida à instrumentação e espalhamento devido ao solvente.

O raio das partículas preparadas foi medido em amostras de magnetolipossomas por raios-X a baixos ângulos.

Foram também obtidas medidas, à três temperaturas diferentes (30, 39 e 70°C), de lipossomas convencionais extrudados de DMPC/DMPE (4:1 M) para avaliação da influência na estrutura das vesículas.

3.6.3.3 - Estabilidade da Bicamada Lipídica

A estabilidade da bicamada lipídica foi avaliada em presença de tensoativo não iônico

polioxietileno 5 lauril éter ($C_{12}E_5$). A penetração de moléculas de tensoativo na bicamada lipídica produz instabilidades que podem ser caracterizadas por um aumento de tamanho, seguido de fusão das partículas e colapso em micelas. Sendo a ação dos tensoativos da série $CxEy$ mais branda do que a do Triton X-100, torna-se possível avaliar a integridade da bicamada lipídica através do seu perfil de estabilidade expresso pelo tamanho das partículas em função da concentração de tensoativo. Nesses ensaios foram usadas concentrações mássicas de tensoativo de 20, 60, 80 e 96%. A medida do raio das partículas após exposição à ação do tensoativo foi feita através de raios-X a baixos ângulos.

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TENSOATIVO

A solução mãe do tensoativo foi preparada dissolvendo-se em banho de ultra-som 0,2033g de $C_{12}E_5$ em 10 ml de tampão HEPES (10mM, pH7,4), para obtenção de uma solução de 0,05M. Desta solução foram feitas diluições para obtenção das várias concentrações mássicas do tensoativo.

ENSAIOS DE ESTABILIDADE

Magnetolipossomas frescos, retirados imediatamente da diálise, foram submetidos à ação das várias concentrações do tensoativo $C_{12}E_5$ durante 90 minutos. A concentração total de fosfolípidios nas soluções foi de 3,5 M. Após o tempo de exposição ao tensoativo, foram retiradas amostras da mistura e colocadas no suporte para a determinação do diâmetro das vesículas através de raios-X a baixos ângulos, pelo método descrito no item 3.6.3.2.

3.7 - Influência do Tratamento Inicial dos Lipossomas na Adsorção dos Fosfolípidios sobre a Magnetita

A influência do tratamento inicial dos lipossomas na formação dos ML's foi avaliada utilizando lipossomas multilamelares, submetidos à sonicação e extrudados em membranas, no processo de incubação e diálise, descrito no item 3.5.

Nesses ensaios, a diálise foi feita em condições de saturação da adsorção, com concentrações de magnetita e fosfolípidios de 1,27g/l e 5,8mM, respectivamente. A relação molar DMPC/DMPE foi de 4:1.

Após a diálise, os magnetolipossomas formados foram separados por magnetoforese, item 3.5.1.1, e analisados segundo métodos descritos nos itens 3.2.1, 3.4.1 e 3.4.2.

3.8- Estabilidade dos Magnetolipossomas no Processo de Magnetoforese

A estabilidade dos ML's foi determinada submetendo a mesma amostra à três magnetoforeses consecutivas, de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.1.1. Embora com concentrações diferentes, as amostras usadas nos ensaios estavam nas condições de saturação da adsorção. A estabilidade dos magnetolipossomas foi analisada em relação à quantidade de fosfolipídios que se mantiveram adsorvidos após as magnetoforeses.

3.9 - Caracterização da Operação do Sistema de Magnetoforese

A caracterização do sistema de magnetoforese foi feita em relação à diversas variáveis de operação. A amostra utilizada nos testes tinha concentração de fosfolipídios total de 0,176mM e 0,138 g/l de magnetita, estando no estado de saturação da adsorção. O sistema de magnetoforese continha 11 mg de lã magnética, distribuídas num comprimento de 32 mm.

3.9.1 - Vazões de Operação (Retenção e Liberação)

A vazão máxima de operação do sistema para a obtenção de uma eficiência de 100% na retenção dos magnetolipossomas foi determinada aumentando-se a vazão pela bomba peristáltica e quantificando-se a magnetita e os fosfolipídios nas frações de eluição, de acordo com os itens 3.2.1 e 3.4.1.

A vazão máxima para a total liberação dos magnetolipossomas do sistema foi determinada usando os mesmos procedimentos.

Os ensaios foram conduzidos com uma corrente de 5A (~45V), produzindo um campo magnético de aproximadamente 1,8T.

3.9.2 - Saturação da Lã Magnética

A saturação da lã magnética foi avaliada inserindo-se volumes crescentes de amostras de ML's ao sistema de magnetoforese até que fosse observado visualmente, através da coloração escura, o total preenchimento da lã magnética com magnetolipossomas. Posteriormente foi feita a liberação da amostra do sistema e as quantidades de fosfolipídios e magnetita foram medidas pelos métodos descritos nos itens 3.2.1 e 3.4.1.

3.9.3 - Aquecimento do Sistema

O aquecimento do sistema foi medido através de um termopar em contato com o pólo magnético. O aumento da temperatura foi medido em relação ao tempo de aplicação do campo magnético.

3.9.4 - Capacidade de Retenção dos Magnetolipossomas

A capacidade de retenção dos magnetolipossomas foi avaliada em função da intensidade do campo magnético produzido, e da posição da lâ magnética em relação ao tubo de vidro.

3.9.4.1 - Intensidade da Corrente

A capacidade de retenção dos ML's foi caracterizada para diferentes intensidades de corrente gerada na fonte de tensão estabilizada. Foram realizadas magnetoforeses utilizando correntes de 1,5, 2,5, 3,5 e 5A para uma mesma amostra. A diminuição da intensidade da corrente foi feita durante a retenção da amostra no sistema, sem eluição, sendo que para cada corrente o sistema foi desligado e re-ligado à intensidades mais baixas. Os valores de gradiente de campo magnético nestes condições foram obtidos por calibração da intensidade de campo magnético em relação à intensidade da corrente. A vazão de solução tampão usada nos ensaios foi de 90 ml/h durante a retenção dos ML's no sistema.

3.9.4.2 - Influência da Posição da Lâ Magnética

A influência da posição da lâ magnética no sistema de magnetoforese foi avaliada colocando-a em duas posições: no interior e envolvendo a superfície externa do tubo de vidro. Para os ensaios foram usadas amostras de ML's nas condições de saturação da adsorção, sem separação prévia dos PL não adsorvidos. A concentração de fosfolipídios foi de 2,94 mM e a de magnetita de 0,325 g/l. A vazão média usada durante a retenção dos compostos foi de 15ml/h e a de liberação foi de 650 ml/h.

3.10 - Avaliação da Aplicação dos Magnetolipossomas em Processos de Adsorção por Afinidade

A avaliação da aplicação de magnetolipossomas em processos de adsorção por afinidade foi realizada com a utilização da enzima tripsina.

A adsorção da tripsina na superfície dos magnetolipossomas foi feita através de um ligante de afinidade, o *p*-aminobenzamidina (PAB), acoplado covalentemente às vesículas através de um espaçador, o ácido diglicólico, que tem como função diminuir o impedimento estérico à adsorção. O método utilizado foi o desenvolvido por Powers et al. (1990) que é realizado em várias etapas. Nesse trabalho, a separação das impurezas foi feita através de magnetoforese ao invés de ultrafiltração.

3.10.1 - Modificação da Superfície dos Magnetolipossomas

Nesses ensaios foi usada uma amostra de magnetolipossomas contendo 6,35 ml, de 0,589 mM de fosfolípidios e 0,349 g/l de magnetita. Para as modificações utilizou-se na primeira etapa (etapa I) 34,8 mg de ácido diglicólico, na segunda (etapa II) 51,5 mg de PAB e 6,0 mg de EDC e na última etapa (etapa III) 4,3 mg de EDC e 10,83 µl de 2-etanolamina.

3.10.1.1 - Preparação dos PAB - ML's

A preparação dos PAB - ML's foi feita em várias etapas que compreendem o acoplamento do ácido diglicólico e do PAB. O esquema representativo das etapas encontra-se na Figura 19.

a) Etapa I: Acoplamento de Espaçador às Vesículas

O ácido diglicólico foi acoplado aos grupos amina do DMPE do magnetolipossoma como braço espaçador para o ligante de afinidade.

PROCEDIMENTO

Ácido diglicólico em excesso molar de 400 vezes foi adicionado à amostra de magnetolipossoma mantendo-se o pH em 6,0 com NaOH (1N) por 2 horas, para que se

completasse a reação. Terminada a reação foi realizada uma magnetoforese na solução resultante para que fosse retirado o excesso de ácido diglicólico. A amostra foi eluída da MAG com HEPES contendo NaCl a 0,5 M.

b) Etapa II: Acoplamento do PAB

O PAB foi ligado aos magnetolipossomas pela ativação do grupo carboxílico do ácido diglicólico que foi derivatizado pela reação com a carbodiimida (EDC).

Esta etapa da preparação dos PAB-ML's foi realizada em solução contendo NaCl para reduzir as interações eletrostáticas entre o PAB imobilizado, que é carregado positivamente, e o grupo não derivatizado do ácido diglicólico, carregado negativamente.

PROCEDIMENTO

Adicionou-se simultaneamente aos ML's com espaçador, o EDC (50 vezes molar) e o PAB (400 vezes molar). O pH foi mantido em 4,75 com HCl (1N) durante 12 horas, tempo de reação, que ocorre à temperatura ambiente. Após a reação foi realizada uma magnetoforese para a lavagem dos excessos de EDC e PAB e produtos de reações paralelas.

c) Etapa III: Derivatização dos Grupos Ácido Carboxílico Não Reagidos

Os ácidos carboxílicos não reagidos na etapa anterior foram bloqueados pela repetição da reação anterior com o EDC usando-se 2-etanolamina em substituição ao PAB, que é um nucleófilo muito melhor que o PAB. Esta reação converte os grupos de ácido carboxílico carregados negativamente sobre a superfície dos ML's em grupos hidroxil não carregados, o que ajuda a minimizar a adsorção não específica de proteínas.

PROCEDIMENTO

Adicionou-se simultaneamente, ao retido da segunda magnetoforese, EDC (50 vezes molar) e 2-etanolamina (400 vezes molar) e repetiu-se a reação do item anterior. Ao final, realizou-se uma magnetoforese na solução para retirada dos excessos de reagentes e liberou-se os PAB - ML's em tampão HEPES (pH 7,4, 10 mM) (Powers et al., 1990).

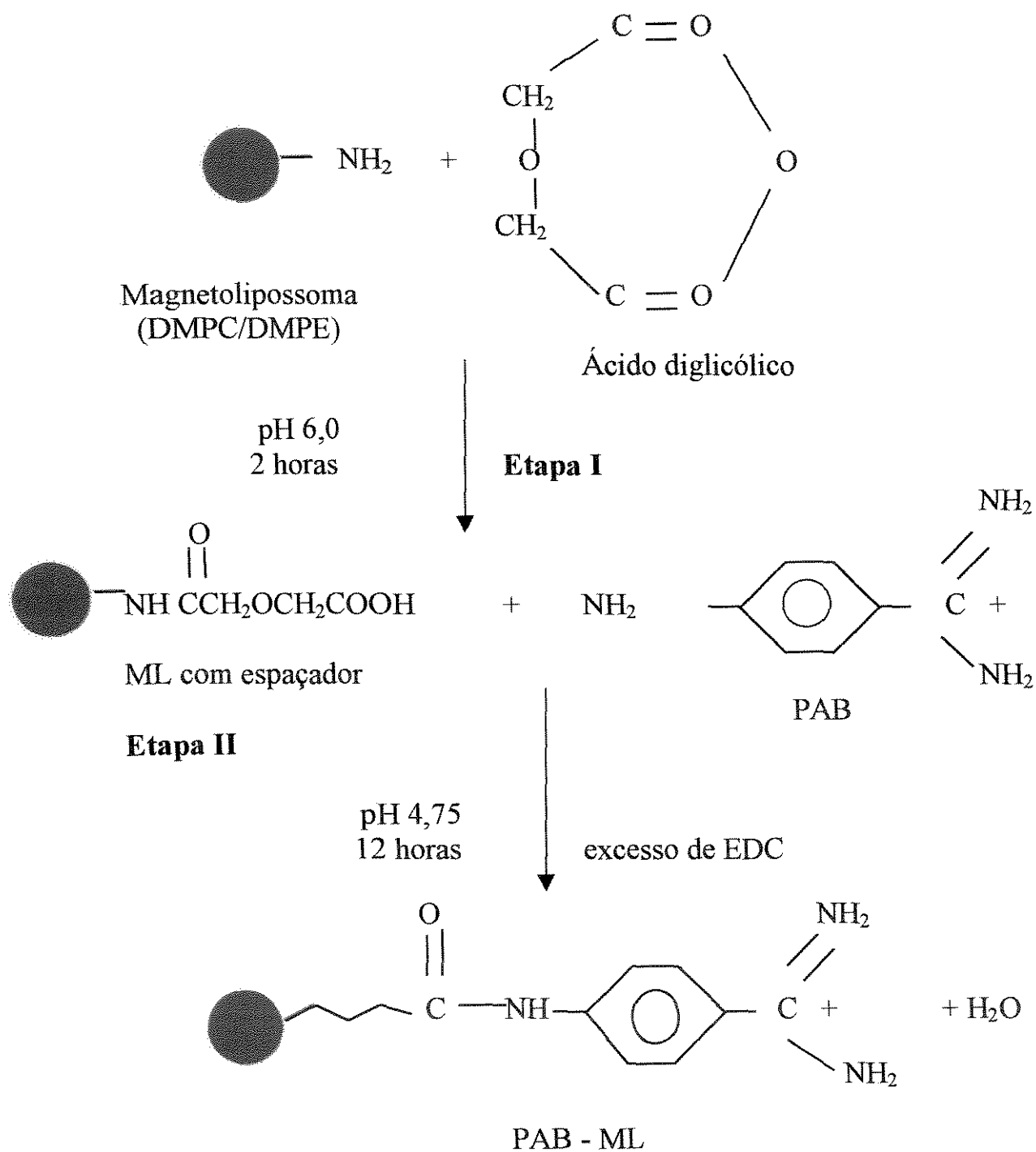


Figura 19: Esquema do acoplamento covalente da *p*-aminobenzamidina ao magnetolipossoma via braço espaçador hidrofílico ácido diglicólico. (Adaptado de Powers et al., 1990).

3.10.2 - Caracterização da Adsorção da Tripsina

3.10.2.1 - Determinação da Concentração de PAB na Superfície dos Magnetolipossomas

O PAB imobilizado nos ML's foi quantificado indiretamente pela cinética de inibição da tripsina utilizando o substrato cromogênico *N*-benzoil-DL-arginina *p*-nitroanilida (BAPNA). Considerou-se que o PAB imobilizado e o PAB livre produzem a mesma inibição na tripsina por não haver limitação difusional nos PAB-ML's. O procedimento de análise foi descrito no subitem 3.10.2.3, no qual foi feita uma curva padrão de inibição utilizando o PAB livre, de concentração de 0 a 20 μM , em substituição aos PAB-ML's.

A quantificação indireta do PAB deveu-se às interferências da magnetita nas medidas de absorvância em espectroscopia.

3.10.2.2 - Análise da Atividade da Tripsina

A tripsina foi analisada quanto a sua atividade pela velocidade de mudança na absorvância com a adição do substrato *N*-benzoil-L-arginina etil éster (BAEE). Para a preparação da solução padrão de tripsina, dissolveu-se uma quantidade conhecida de tripsina em solução HCl (1 mM).

Adicionou-se 0,933 ml de BAEE (0,5 mM), dissolvido em tampão HEPES, a 66,6 μl de solução de enzima em cubeta de quartzo. Mediu-se a absorvância à 25°C por 2-3 minutos à 254 nm.

3.10.2.3 - Cinética de Inibição da Tripsina pelos PAB - ML's

A cinética de inibição da enzima pelos PAB - ML's foi avaliada usando-se o substrato cromogênico *N*-benzoil-DL-arginina *p*-nitroanilida (BAPNA), que também foi analisada pela variação da absorvância com o tempo. O PAB age como um inibidor competitivo reversível da tripsina em presença do substrato BAPNA.

O BAPNA foi primeiramente dissolvido em dimetilsulfóxido em volume igual a 1% do volume final em que foi diluído em tampão HEPES.

Colocou-se em cubetas de quartzo alíquotas de 66,6 μl de tripsina a 10^{-5} M dissolvida

em solução de HCl (1 mM). Em seguida adicionou-se 0,6 ml de PAB - ML's em tampão e deixou-se em incubação por 2 minutos. Após os PAB-ML's foi adicionado 0,33 ml de BAPNA (0,3 mM) à mistura e a absorbância foi lida à 25°C por 2-3 minutos a 410 nm (Erlanger et al., 1961).

3.10.2.4 - Análise da Benzamidina

A análise da benzamidina foi feita através de uma curva padrão de concentração entre 0,05 e 1,5 mM de benzamidina diluída em HEPES. A medida da absorbância foi feita à 259 nm, que é o comprimento de onda do coeficiente de extinção máximo deste composto (Powers et al., 1990).

3.10.2.5 - Dosagem de Proteína

A concentração da tripsina na solução foi quantificada utilizando o reagente ácido bicinchrônico (BCA) que dosa a concentração de proteína em solução por colorimetria.

PREPARAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Preparou-se uma solução de tripsina de 10^{-5} M, dissolvendo-se em HEPES. Foram feitas diluições de concentrações entre $2,2 \cdot 10^{-8}$ M e $4 \cdot 10^{-7}$ M.

Preparou-se uma solução de tripsina, às mesmas concentrações citadas acima, porém dissolvendo-a e diluindo-a em benzamidina, nas mesmas condições da usada na dessorção da tripsina.

Foi preparado também um gradiente de benzamidina de 1 a 0,01mM, diluindo-a em HEPES.

Foram utilizadas soluções frescas de todos os padrões para se garantir que estivessem nas mesmas condições das amostras de eluição da magnetoforese.

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

Foram preparadas 3 soluções nas seguintes porcentagens mássicas: uma com 8% de carbonato de sódio, 1,6% de hidróxido de sódio e 1,5% de tartarato de sódio (solução A), que teve seu pH ajustado para 11,25 com bicarbonato de sódio, outra de 2% de ácido bicinchrônico (solução B), e a terceira de 4% de sulfato de cobre (solução C). As soluções foram feitas em água deionizada, podendo ser pré-preparadas.

A 9,615 ml de solução B adicionou-se 0,385 ml de solução C. Após a mistura que resulta numa coloração verde clara, colocou-se 10 ml de solução A, obtendo-se uma solução reagente final de coloração púrpura. A mistura deve estar fresca.

Adicionou-se 0,5 ml da solução reagente a 0,5 ml de solução padrão de proteína ou de amostras das eluições da magnetoforese em concentração de $2,2 \cdot 10^{-8}$ M a $4 \cdot 10^{-7}$ M. Os ensaios foram mantidos por 60 minutos à temperatura de 60°C. Após este tempo os ensaios foram resfriados até a temperatura ambiente e a intensidade de absorbância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 562 nm.

O procedimento foi o mesmo para as amostras em HEPES ou benzamidina, sendo que foram feitas curvas de calibração de ambos os solventes. Além disso, o ensaio também foi feito para os gradientes de benzamidina, para que as interferências das amostras de lavagem do sistema após a dessorção da tripsina, fossem descontadas das absorbâncias obtidas. As curvas de calibração foram obtidas para cada ensaio realizado, pelas quais foram determinadas as absorbâncias iniciais em solução, a partir das concentrações conhecidas da enzima. Curvas de calibração típicas da análise feita por este método, nos vários solvente, são apresentadas no Anexo I, Figura I.4 a I.6.

3.10.3 - Retenção da Atividade da Tripsina Ligada aos PAB - ML's

A avaliação da adsorção da tripsina aos PAB-ML's foi feita misturando-se uma quantidade conhecida de tripsina à uma solução de PAB-ML's. A mistura foi submetida à magnetoforese de alto gradiente e foram coletadas 3 frações durante a retenção do composto, com eluição do tampão HEPES (pH 7,4, 10 mM) em igual volume ao da amostra alimentada no sistema. Posteriormente, com a retirada do campo magnético, eluiu-se uma fração de igual volume das anteriores com a amostra de PAB-ML's e a tripsina adsorvida. As atividades foram medidas com o substrato BAEE (método descrito no item 3.10.2.2) antes da MAG e depois, tanto nas frações de eluição quanto na retida. O procedimento foi feito à temperatura ambiente.

3.10.4 - Perfis de Adsorção e Dessorção da Tripsina

Os perfis de adsorção e dessorção da tripsina dos PAB-ML's foram construídos de maneira semelhante à descrita no item anterior 3.10.3. Porém, após as eluições com HEPES, a tripsina foi dessorvida dos PAB-ML's pela adição do inibidor benzamidina (50 mM),

dissolvida em HEPES, antes de sua eluição do sistema e portanto liberada durante a retenção magnética dos PAB-ML's no sistema de magnetoforese.

As concentrações de fosfolipídios total nas amostras usadas são apresentadas na Tabela 6 a seguir, a concentração final da tripsina em todas as amostras foi de 1 μM .

Tabela 6: Concentrações Usadas na Adsorção e Dessorção da Tripsina

Amostra	C _{PL} Total (mM)	C _{PAB} (μM)
A	0,2	5,0
B	0,2	5,5
C	0,1	2,8

Foram feitas eluições com HEPES em 3 frações de volume de 2ml para separação da tripsina não adsorvida aos PAB-ML's. Subsequentemente foram feitas mais 3 eluições com solução de benzamidina para a dessorção da enzima do suporte, após a dessorção foram feitas mais 3 eluições com HEPES para a lavagem da benzamidina e recuperação dos suportes PAB-ML's, sendo todas as eluições em volumes iguais. Após a retirada do campo magnético, foram liberados os PAB-ML's também com o tampão HEPES. Todas as frações foram analisadas com relação à quantidade de proteína pelo ensaio do BCA, descrito no subitem 3.10.2.5.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Síntese e Caracterização da Magnetita Coloidal

A magnetita coloidal estabilizada com ácido láurico foi obtida de acordo com a metodologia descrita no item 3.1. Observou-se que a adição do ácido láurico promoveu a dispersão da maior parte das partículas. No entanto as preparações não se mantiveram estáveis durante a estocagem, havendo precipitação da magnetita formada devido à agregação das partículas causada provavelmente pelas diferenças de concentração do ácido láurico na solução.

A instabilidade das preparações não permitiu a quantificação do rendimento da síntese, porém, a observação da coloração das águas de lavagem sugeriu um bom rendimento do processo.

4.2 - Dosagem de Ferro

4.2.1 - Influência da Concentração da Água Régia na Conversão dos Óxidos de Ferro em Sais de Ferro

A concentração de água régia foi um fator determinante na reação de conversão dos óxidos de ferro em sais de ferro. Na Figura 20 são apresentados os perfis cinéticos dessa reação. Os resultados mostraram que para adição de concentrações de 5N de HCl e 1,87N de HNO₃, a reação é praticamente completada em 1 hora, o que nos levou a adotar essa concentração e um tempo total de incubação de pelo menos 2,5 horas para garantir a transformação total dos óxidos de ferro e a reprodutibilidade dos resultados.

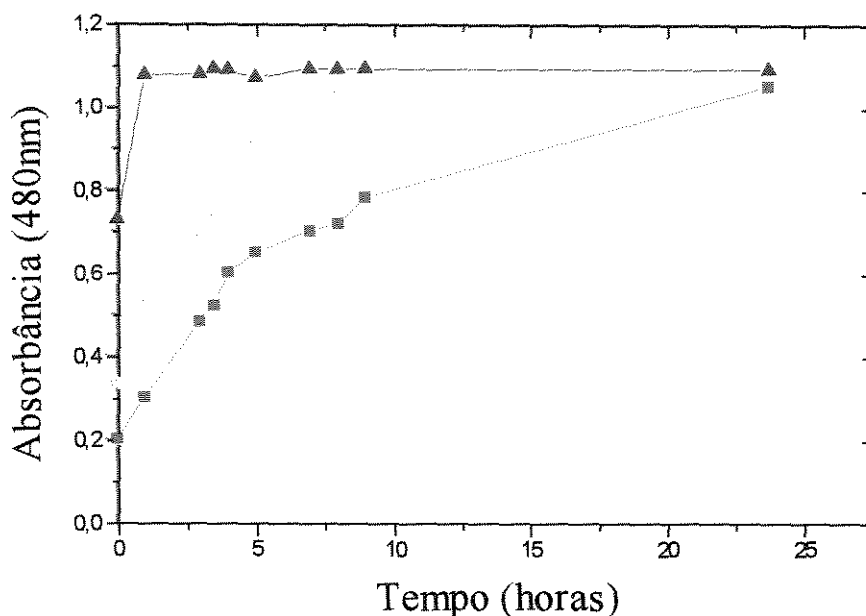


Figura 20: Influência da concentração dos ácidos na água régia para a conversão dos óxidos de ferro a sais. Concentrações de HCl/HNO₃: ■-, 0,75 / 0,28 N; ●, 1,5 / 0,56 N; ▲-, 5,0 / 1,87 N.

4.3 - Caracterização dos Lipossomas

4.3.1 - Teor Total de Fosfolipídios

Os lipossomas preparados pelo método da hidratação do filme seco e extrudados tiveram rendimentos em torno de 98%, que foram verificados pela quantificação do teor de fosfolipídios nas amostras. As pequenas perdas ocorridas de PL foram devido às dificuldades relativas ao desprendimento do filme lipídico formado na parede do balão.

4.3.2 - Teor Total de DMPE

A mesma proporção usada na preparação dos lipossomas, ou seja, de 20% de DMPE em

relação à concentração total de fosfolipídios, foi mantida nas vesículas resultantes após a hidratação do filme o tratamento com extrusão.

4.4 - Preparação dos Magnetolipossomas

Os magnetolipossomas foram preparados de forma satisfatória pelos procedimentos descritos no item 3.5. Durante a diálise, foi observada a precipitação de parte da magnetita. Isto provavelmente ocorreu devido ao rápido deslocamento do ácido láurico, em relação à adsorção dos fosfolipídios na superfície da magnetita, conforme também observado nos experimentos de De Cuyper e Joniau (1988). O tamanho das moléculas dos fosfolipídios em relação à de ácido láurico, bem como a forte ligação que é estabelecida com o óxido de ferro, resultante da afinidade destas moléculas, são fatores que contribuem para a diferença de velocidades de deslocamento observada.

4.4.1 - Influência do Colesterol

Os resultados experimentais mostraram que o deslocamento dos fosfolipídios dos lipossomas convencionais, durante a incubação, é a etapa limitante do processo de formação dos magnetolipossomas por adsorção. A presença de colesterol torna as vesículas mais estáveis devido ao melhor empacotamento da bicamada lipídica. Nessas condições, observou-se precipitação total da magnetita, sem a substituição do ácido láurico pelas moléculas de lipídios na superfície da magnetita.

4.4.2 - Cinética de Adsorção de Fosfolipídios sobre Magnetita Estabilizada com Ácido Láurico

O perfil obtido para a cinética de adsorção dos fosfolipídios na superfície da magnetita é apresentado na Figura 21.

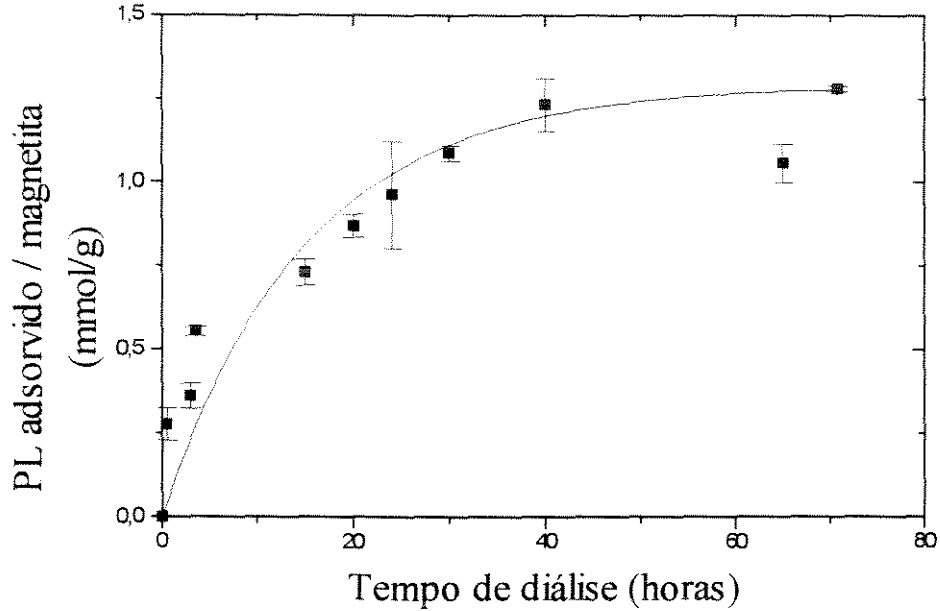


Figura 21: Cinética de adsorção dos fosfolípidios (DMPC/DMPE) sobre magnetita, onde Γ é a razão entre PL adsorvido / magnetita.

Observa-se, na Figura 21, que a adsorção de 30 a 35% dos fosfolípidios ocorre nas primeiras 3,5 horas de diálise, enquanto que a saturação é atingida em aproximadamente 40 horas. Nessa saturação, a quantidade total adsorvida é de aproximadamente 1,3 mmol PL / g magnetita.

Os dados experimentais foram analisados através do modelo cinético de pseudo primeira ordem, descrito no item 1.10.2:

$$\frac{d\Gamma}{dt} = k_1 \cdot \Gamma \quad (18)$$

As barras de erro apresentadas foram calculadas pelo procedimento descrito no item 3.6.1.1.

A Figura 22 representa o ajuste dos dados linearizados conforme a Equação 19, do item 3.6.1.1. A regressão linear da curva não incluiu os pontos superiores à 30 horas devido à ampliação dos erros na proximidade da saturação pelo uso da referida Equação, que é exemplificada pelas barras de erro da figura.

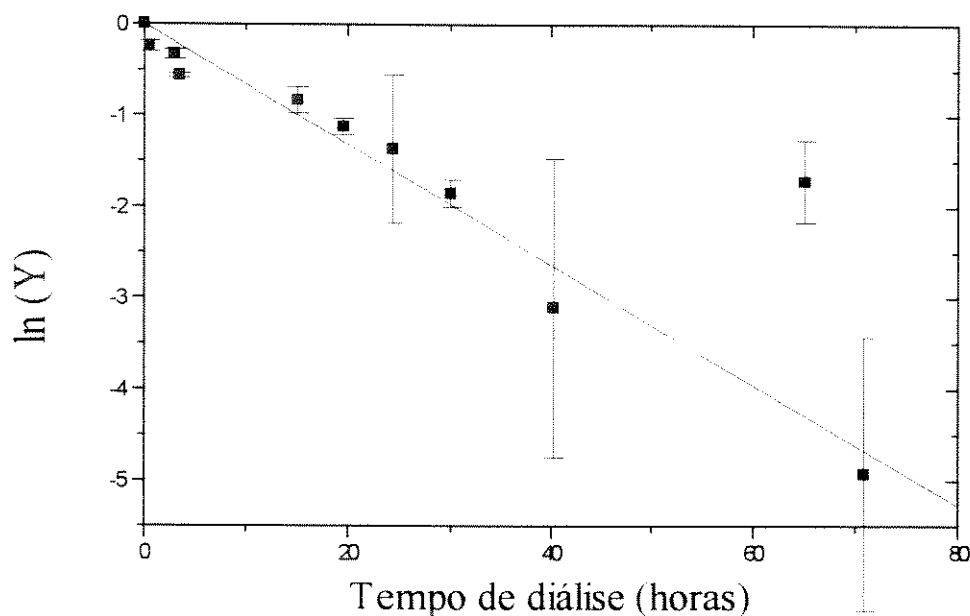


Figura 22: Ajuste dos dados da cinética de adsorção, onde $Y = (\Gamma_t - \Gamma_\infty)/(\Gamma_0 - \Gamma_\infty)$.

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos foram $0,066 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ para a constante da taxa de pseudo-primeira ordem k_1 , e $10,5 \pm 0,3$ horas (630 minutos) para o tempo necessário para se atingir metade da quantidade de saturação, $t_{1/2}$.

De Cuyper e Joniau (1991), construíram perfis da cinética de adsorção de fosfolípidios sobre a magnetita, com o DMPG e o DC_{15}PG separadamente, para os quais obtiveram tempos para 50% da saturação de 11 e 116 minutos, respectivamente. Os autores obtiveram esses valores pela regressão linear da Equação 19 até o limite de 30% da adsorção, para que o coeficiente de correlação da curva fosse melhor que 0,95. Comparando-se com os resultados obtidos neste trabalho, observou-se que esse tempo para a mistura DMPC/DMPE foi consideravelmente maior do que os de PG's isoladamente, ou seja, a adsorção é bem mais lenta, provavelmente devido à maior estabilidade dos lipossomas.

Os balanços de massa dos fosfolípidios totais e da magnetita das amostras utilizadas na cinética de adsorção são apresentados no Anexo II, Tabelas II.1 e II.2.

4.4.3 - Relação entre DMPC / DMPE Adsorvidos

Os resultados das análises da concentração total de fosfolípidios e de DMPE nas frações de eluição mostraram que, dentro dos limites dos erros experimentais, a relação molar entre DMPC / DMPE adsorvida é aproximadamente igual à inicial em solução (4:1), como mostram as Tabelas 7 e 8.

Tabela 7: Razão DMPC / DMPE para as Amostras da Cinética de Adsorção

Tempo de Diálise das Amostras (h)	Concentração Total de PL (mM)	DMPE (mM)	Razão (DMPC/DMPE)
0,5	2,3	0,80	2
3,0	1,5	0,32	4
3,5	1,3	0,50	2
15,0	1,3	0,25	4
20,0	1,5	0,26	5
24,3	1,9	0,51	3
30,0	1,1	0,34	2
40,0	1,3	0,23	4
65,1	2,0	0,41	4
70,8	1,3	0,30	3

Nesses ensaios, o erro médio foi de aproximadamente 20% para a quantificação do DMPE e de 10% para a determinação do PL total, o que resulta num valor médio, da relação DMPC/DMPE, de $4 \pm 1,5$ conforme calculado pela Equação 48 do item 3.6.1.1 referente ao desvio.

Tabela 8: Razão DMPC / DMPE para as Amostras da Isoterma de Adsorção

Amostras	Concentração Total de PL (mM)	DMPE (mM)	Razão DMPC/DMPE
A	0,01	0,02	0
B	0,01	0,01	0
C	0,3	0,07	4
D	0,4	0,11	3
E	0,4	0,11	2
F	1,0	0,18	4
G	1,8	0,43	3
H	1,0	0,18	4
I	1,3	0,30	3
J	0,1	0,04	4
K	0,6	0,17	3
L	1,6	0,42	3
M	1,3	0,23	4

A manutenção dessa relação, em uma grande parte das frações, indica que não há competição e a velocidade de adsorção é praticamente a mesma para ambos os fosfolipídios. Esse resultado está em concordância com os obtidos por De Cuyper e Joniau (1988), para fosfatidilgliceróis, os quais mostram que a velocidade de transferência de massa na adsorção é uma função do tamanho das cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios. O tempo para se atingir a saturação aumenta com o tamanho dessas cadeias. No caso da mistura DMPC / DMPE, o ácido mirístico é o constituinte comum para ambos os fosfolipídios, o que justifica a ausência de competição na adsorção.

4.4.4 - Isoterma de Adsorção

A isoterma obtida para a adsorção dos fosfolipídios DMPC e DMPE na superfície da magnetita é apresentada na Figura 23.

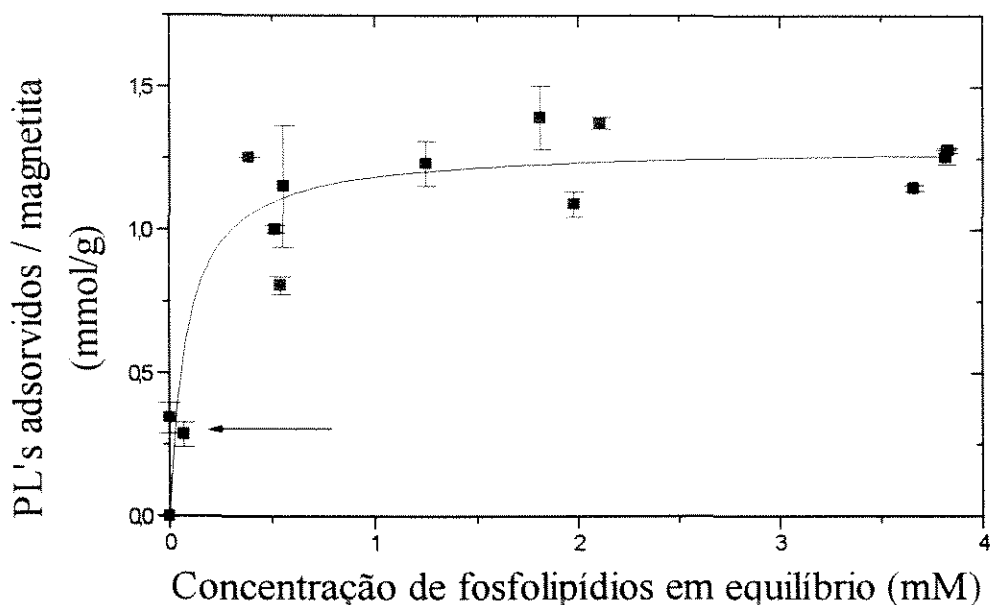


Figura 23: Isoterma de adsorção de DMPC/DMPE (4/1 M) sobre magnetita à 37°C. A seta indica a região linear de alta afinidade.

A região inicial da isoterma, aproximadamente linear, pode ser associada ao comportamento de adsorção de alta afinidade, na qual virtualmente todas as moléculas são adsorvidas. A região com mais altas concentrações de PL, cuja forma é não linear e aproxima-se de um valor constante igual à 1,3 mmol de PL / g magnetita, é considerada correspondente à saturação da adsorção, ou seja, a completa formação da camada externa.

Considerando-se que a adsorção dos dois fosfolipídios na mistura não é competitiva, a adsorção da mistura pode ser tratada como a adsorção de um só componente. Nesse caso, os dados da segunda região de adsorção podem ser ajustados ao modelo de Langmuir, expresso pela Equação 50:

$$\frac{C}{\Gamma_L} = \frac{1}{\Gamma_L^0} \left(C + \frac{1}{K_L} \right) \quad (50)$$

onde: Γ_L^0 é a quantidade de fosfolipídios adsorvida na saturação por g de magnetita e K_L é a

constante de associação, C é a concentração de fosfolipídios em equilíbrio com os magnetolipossomas e Γ_L é a quantidade de fosfolipídios adsorvida.

A dispersão dos pontos em relação à curva deve-se provavelmente à não idealidade das soluções causada pelas interações entre os fosfolipídios, uma vez que a isoterma de Langmuir foi deduzida para soluções sem interações soluto-soluto ou soluto-solvente.

Pela regressão dos dados da Figura 24 obtêm-se os valores de $1,29 \pm 0,04$ mmol/g para o valor de saturação da adsorção, Γ_L^0 , e de $11,3 \text{ mM}^{-1}$ para a constante de associação. Comparando-se esses valores com os obtidos por De Cuyper e Joniau (1990), para a adsorção do DMPC isoladamente, observa-se que o valor de saturação da mistura, obtido neste trabalho, é maior que o obtido para o DMPC isoladamente, de $0,9 \text{ mmol DMPC / g Fe}_3\text{O}_4$. Isso provavelmente se deve à maior área superficial da magnetita, com menor diâmetro que as partículas de magnetita obtidas por De Cuyper e Joniau (1988), que tinham 14 nm. Os resultados do tamanho das partículas preparadas é apresentado no item 4.5.2. Em consequência disso, a constante de associação obtida nesse trabalho para o DMPC na mistura, $11,3 \text{ mM}^{-1}$ é maior do que para a adsorção do DMPC isolado, $1,3 \text{ mM}^{-1}$, obtida por De Cuyper e Joniau (1990).

Apesar dos erros envolvidos, os dados experimentais apresentam um bom ajuste ao modelo, com um coeficiente de correlação de 0,99 para a relação linear, como mostra a Figura 24.

Os balanços de massa para os fosfolipídios totais e da magnetita são apresentados no Anexo II, Tabelas II.3 e II.4.

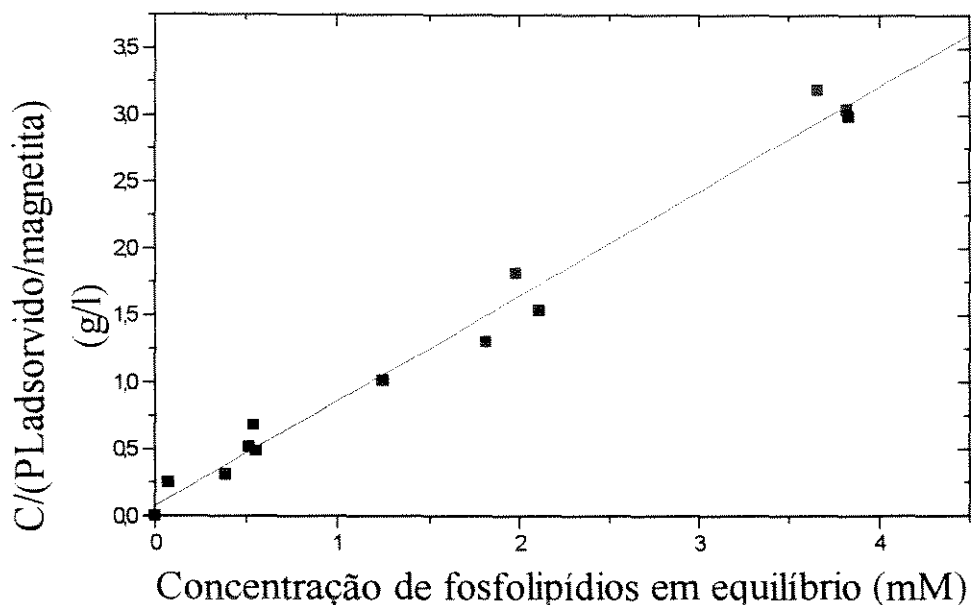


Figura 24: Dados ajustados ao modelo da isoterma de Langmuir (Equação 50).

4.4.5 - Identificação da Formação da Bicamada Lipídica

O perfil de solubilização dos fosfolípidios pelo tensoativo Triton X-100 é apresentado na Figura 25. Observa-se que à baixas concentrações de tensoativo (0-0,2%) há um rápido decréscimo da concentração de fosfolípidios adsorvidos, indicando a remoção de fosfolípidios ligados por interações fracas, situados na monocamada mais externa dos magnetolipossomas. Para concentrações maiores que 0,25% de tensoativo, praticamente não há remoção, indicando fortes interações dos fosfolípidios com a magnetita, características da monocamada interna.

A presença dessas duas regiões no perfil de solubilização dos fosfolípidios identifica claramente a formação da bicamada lipídica nos magnetolipossomas obtidos por diálise.

Aos dados experimentais foram ajustadas retas que representam os perfis de extração dos PL situados na camada externa, reta azul, e na monocamada interna em contato com a magnetita, reta vermelha. A interseção entre as retas representa a razão entre PL e Fe_3O_4 correspondente à monocamada adsorvida. Para a adsorção do DMPC / DMPE, o valor obtido

para a concentração de fosfolípidios na monocamada foi de aproximadamente 0,4 mmol de PL / g de Fe_3O_4 . A reta amarela se ajusta à regressão dos pontos de 0 a 0,2% de Triton X-100, enquanto que a vermelha está relacionada aos pontos maiores do que 0,25%.

Comparando esse valor com o obtido por De Cuyper e Joniau (1988) para a adsorção do DMPG sobre a magnetita, 0,2 mmol de PL / g de Fe_3O_4 , na monocamada, pode-se atribuir à maior concentração obtida neste trabalho, à maior área superficial devido ao menor diâmetro das partículas. Esses resultados são portanto consistentes com os obtidos para a isoterma de adsorção.

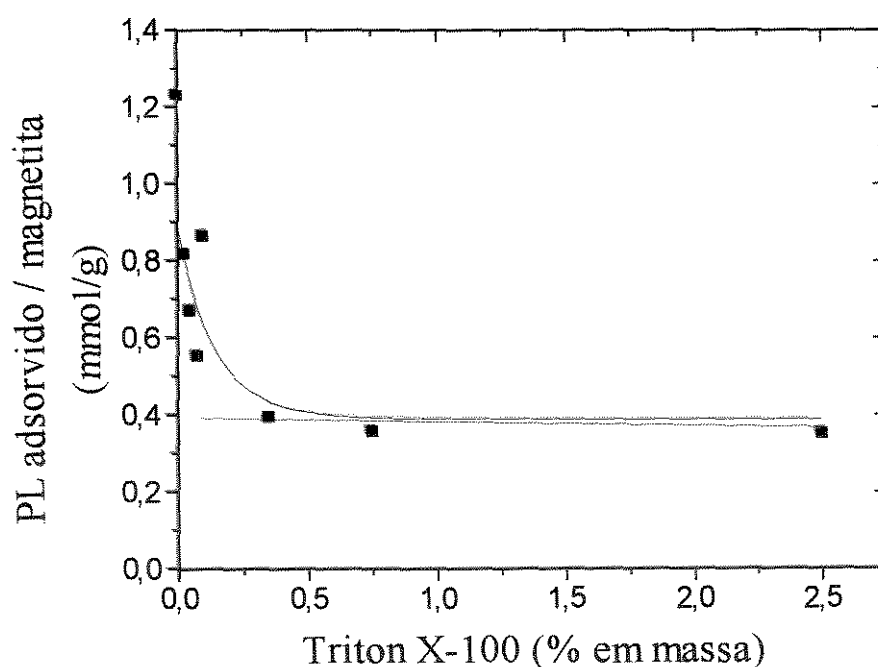


Figura 25: Perfil de solubilização dos fosfolípidios DMPC e DMPE pelo tensoativo triton X-100. A interseção das retas indica a razão PL/magnetita correspondente à monocamada.

4.5– Determinação do Tamanho das Partículas Formadas

4.5.1 - Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Nas Figuras 26 e 27 são apresentadas as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, da magnetita coloidal e dos magnetolipossomas.

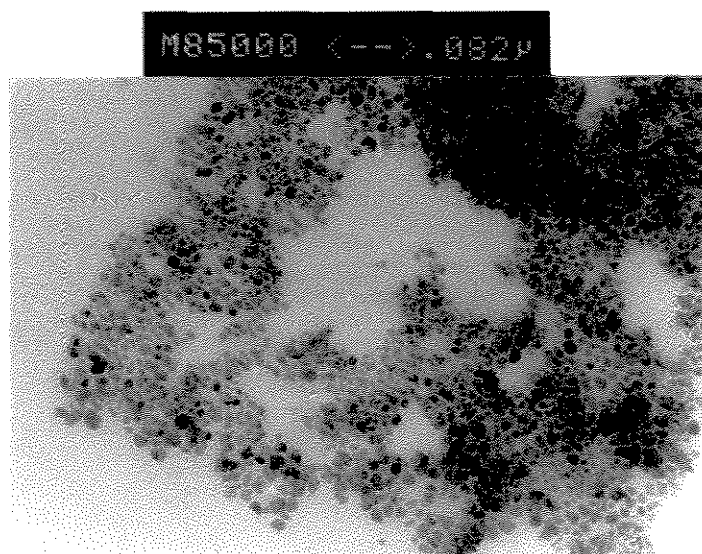


Figura 26: Micrografia da magnetita coloidal obtida em microscopia eletrônica de transmissão. Aumento de 85000 vezes.

Na micrografia da Figura 26, pode-se observar um espalhamento de tamanhos das partículas de óxido de ferro estabilizadas com ácido láurico, o que provavelmente é devido ao método de preparação por precipitação. O tamanho médio do óxido de ferro obtido dessa micrografia foi de 7,7 nm aproximadamente.

A aglomeração das partículas não permitiu uma visualização clara da bicamada lipídica dos magnetolipossomas na fotografia da Figura 27. Considerando a região da direita mais diluída, pode-se observar uma distribuição de tamanhos das partículas de óxido de ferro na faixa entre 7,5 e 10 nm, com um diâmetro médio de 8,75 nm.

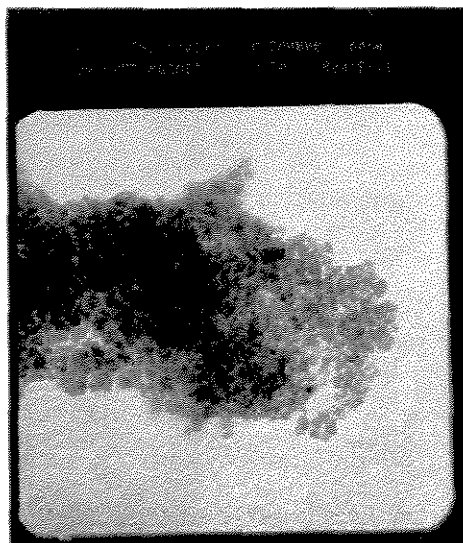


Figura 27: Micrografia dos magnetolipossomas obtida por microscopia eletrônica de transmissão. Aumento de 200000 vezes.

Embora não haja uma grande diferença entre os valores dos diâmetros determinados pelas micrografias das Figuras 26 e 27, devido a limitações de estabilidade da solução de magnetita, considerou-se como mais representativo o valor de 8,8 nm, correspondente à amostra medida na mesma época da construção das curvas da cinética e da isoterma de adsorção.

4.5.2 - Raios-X a Baixos Ângulos

Os resultados da análise de raios-X a baixos ângulos para amostras de magnetolipossomas foram obtidos de acordo com o método do item 3.6.3.2.

A análise dos dados revela duas populações de partículas: uma com raio médio de aproximadamente 5,2 nm e a outra com raio máximo de 35,2 nm. De acordo com as características da amostra, acredita-se que a primeira corresponda às partículas de óxido de ferro, e a segunda população aos lipossomas unilamelares em equilíbrio com os magnetolipossomas.

Os resultados da avaliação da influência da temperatura na estrutura dos lipossomas extrudados, para as temperaturas abaixo da temperatura de transição de fase dos lípidios não tiveram espalhamento significativo de raios-X. Isso provavelmente ocorreu devido às estruturas das vesículas unilamelares formadas terem dimensões acima do limite de detecção dos comprimentos de onda de raios-X, de aproximadamente 100 nm. Para 70°C, notou-se um espalhamento bem definido que pode ser atribuído às vesículas com raio máximo de 38,0 nm, e uma evidente polidispersidade, constatada no gráfico de Guinier sem uma linearidade definida para toda a curva (Anexo III, Figura III.1). Esta mudança estrutural dos lipossomas extrudados poderia ser explicada pela influência da temperatura na estabilidade das vesículas unilamelares de tamanho grande. A unilamellaridade das vesículas foi constatada pela ausência de picos a uma distância de correlação típica de sistemas multilamelares. A curva de intensidade de espalhamento pelo vetor de espalhamento é apresentada na Figura 28. O gráfico de Guinier correspondente é apresentado no Anexo III, Figura III.1.

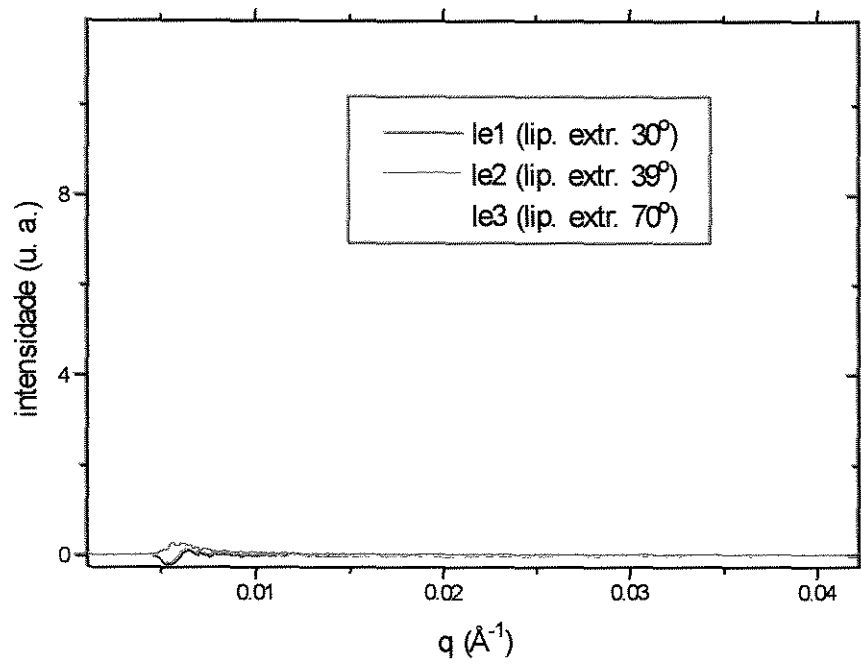


Figura 28: Intensidade de espalhamento de raios-X por lipossomas.

4.5.3 – Estimativa Teórica da Formação da Bicamada Lipídica

A Tabela 9 apresenta a comparação dos valores do tamanho das partículas de magnetita medidos por espalhamento de raios-X a baixos ângulos e microscopia eletrônica de transmissão.

Tabela 9: Tamanho das Partículas de Magnetita

Método da Medida	Figura	Diâmetro Médio (nm)
microscopia eletrônica de transmissão	26	7,7
	27	8,8
espalhamento de raios-X a baixos ângulos	-	5,2

A discrepância entre os valores obtidos deve-se à diferença de idade das amostras. Por esta razão foi considerado, para os cálculos, um raio de 4,7 nm para as partículas de óxido de ferro, que representa a média entre os valores dos raios obtidos pelas medidas de raios-X, e

pela micrografia (Figura 27) nas amostras de magnetolipossomas. A partir do raio das partículas de óxido de ferro, pode-se estimar o número de moléculas de fosfolipídios adsorvidas em sua superfície.

Calculando-se uma área média da seção transversal da cabeça dos fosfolipídios DMPC/DMPE (4:1 M), de $0,65 \text{ nm}^2$, de acordo com os valores individuais de PC e PE iguais a 71 nm e 41 nm (Israelachvili e Mitchel, 1975), respectivamente, tem-se um raio médio de 0,455 nm através do qual chega-se ao valor de $\sim 0,4 \text{ nm}^3$ para o volume médio ocupado pela cabeça de cada molécula. Utilizando o valor de volume das cadeias hidrofóbicas de dimiriltoil (DM), apresentado por De Cuyper e Joniau (1988), de $0,754 \text{ nm}^3$, tem-se um volume total médio ocupado por molécula de fosfolipídio de $\sim 1,2 \text{ nm}^3$, que é a soma dos volumes da cabeça com o das cadeias hidrofóbicas.

Estimando-se a espessura da bicamada através da diferença dos raios das cabeças de PG e (PC-PE), e utilizando o valor da espessura da bicamada lipídica de DMPG, de 3,5 nm, chega-se à espessura de $\sim 3,6 \text{ nm}$ para a bicamada lipídica de DMPC/DMPE. O raio externo da bicamada é então calculado adicionando-se o valor da espessura ao raio medido do óxido de ferro, de aproximadamente 4,7 nm, chegando-se a um valor de $\sim 8 \text{ nm}$. Subtraindo o volume externo da bicamada do interno, tem-se o volume da bicamada, de $\sim 2000 \text{ nm}^3$, e desta forma calcula-se que o número de moléculas de fosfolipídios por bicamada seja igual a 2000 ou $\sim 3 \cdot 10^{-18} \text{ mmol / vesícula}$.

Como a magnetita possui uma densidade de $5,1 \cdot 10^{-21} \text{ g / nm}^3$ (De Cuyper e Joniau, 1988), calcula-se $\sim 2 \cdot 10^{-18} \text{ g}$ de magnetita / vesícula. Com isso, tem-se uma razão de aproximadamente $1,3 \pm 0,1 \text{ mmol}$ de fosfolipídios adsorvidos por grama de magnetita.

O número de moléculas da monocamada é calculado de forma análoga, utilizando nos cálculos metade do valor da espessura. Assim, chega-se ao valor estimado de $\sim 0,5 \pm 0,1 \text{ mmol}$ de PL/ g magnetita para a monocamada interna.

Esses resultados confirmam a consistência dos dados experimentais obtidos tanto para a concentração total de PL adsorvido ($1,3 \text{ mmol}$ de PL/ g de magnetita), como a concentração de PL na monocamada interna ($0,4 \text{ mmol}$ de PL/ g de magnetita), nos itens 4.4.4 e 4.4.5.

4.5.4 - Estabilidade da Bicamada Lipídica em Presença de Tensoativo

Os resultados do teste de estabilidade dos magnetolipossomas com o tensoativo C_{12}E_5 apresentados nas Figuras 29 e 30 mostraram a presença de dois perfis, característicos das duas

populações de partículas observadas.

A Figura 29 mostra o perfil de estabilidade para a população de maior tamanho. Essa população corresponde aos lipossomas unilamelares, usados na incubação, em equilíbrio com os magnetolipossomas, uma vez que seu raio inicial é próximo ao raio das vesículas medido no item 4.5.2. Observa-se o comportamento típico da interação de lipossomas extrudados com tensoativo: uma região inicial, até aproximadamente 25% de tensoativo, em que as partículas praticamente não sofrem alterações de tamanho. À concentração de 60% de tensoativo as partículas aumentam cerca de 3% do seu tamanho original, seguindo-se o colapso em micelas a maiores concentrações de tensoativo.

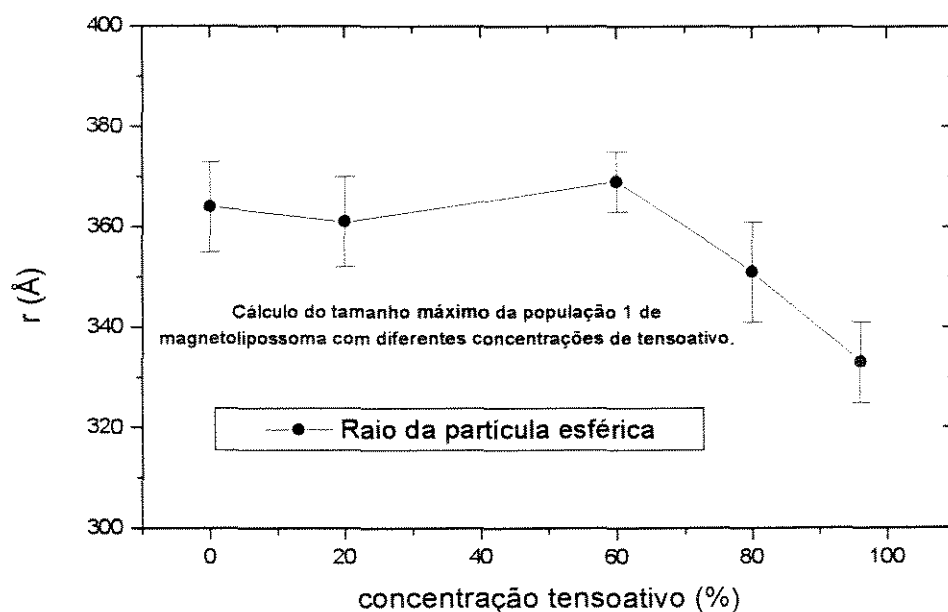


Figura 29: Perfil da estabilidade da bicamada lipídica dos lipossomas na presença do tensoativo $C_{12}E_5$.

Esses resultados mostram que a bicamada lipídica desses lipossomas apresenta uma boa integridade, e um empacotamento que pode ser considerado estável nas condições de trabalho, sendo rompido somente à altas concentrações de tensoativo. Essa estabilidade pode ser a razão do atraso do deslocamento desses lipídios em relação ao ácido láurico, ocasionando a precipitação da magnetita durante a preparação dos magnetolipossomas.

A população de menor tamanho, cujo perfil de estabilidade é mostrado na Figura 30, corresponde praticamente às partículas de magnetita, com raio inicial de 41 Å, aproximadamente igual ao raio determinado na Figura 26 do item 4.5.1, que mediu a amostra de magnetita da mesma preparação. Acredita-se que na realidade, essa população represente os magnetolipossomas presentes na amostra, e que a intensidade de espalhamento dos raios resultantes pode estar representando em maior proporção o espalhamento devido à magnetita do que à bicamada lipídica adsorvida em sua superfície.

Essa pode ser a razão do perfil praticamente constante, mesmo a concentrações elevadas de tensoativo, apresentado na Figura 30. O pequeno aumento inicial de raio das partículas, deve-se provavelmente à presença de micelas do tensoativo em solução.

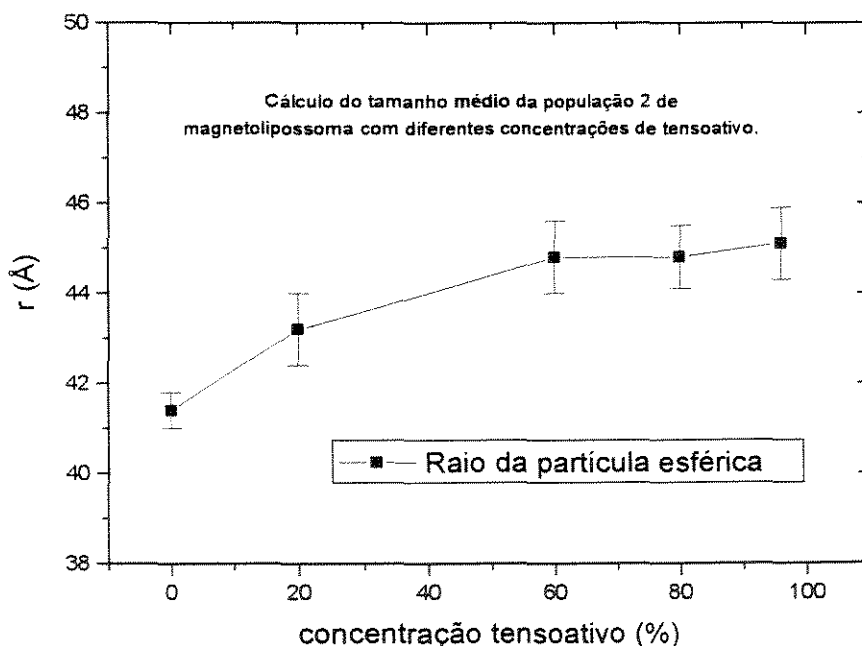


Figura 30: Perfil de estabilidade da bicamada lipídica dos magnetolipossomas em presença do tensoativo $C_{12}E_5$.

A barra de erro nas Figuras 29 e 30 representa o erro devido ao ajuste das retas nas regiões mostradas na Figura III.3, do Anexo III. Estas barras de erro são pequenas (aproximadamente 3% do valor medido) porque a região do ajuste é pequena e bastante linear.

Para estimar se este erro reflete o erro experimental do valor do raio das partículas é

preciso levar em conta os critérios físicos do ajuste e da teoria de SAXS comentados a seguir:

1. Os gráficos de Guinier obtidos das experiências correspondem a sistemas polidispersos, pois não são lineares em toda a sua extensão. Nestes casos não se pode encontrar um único valor médio do raio de giro das partículas pois existe uma distribuição de tamanhos podendo esta ser bimodal. O tratamento matemático das curvas permite o cálculo dessa função de distribuição. Entretanto, os dados experimentais permitiram um tratamento mais simples do problema.
2. Foi observado que as curvas apresentavam duas regiões lineares, mostradas na Figuras III.2, do Anexo III (para valores de q menores que 0,010 e para valores maiores que 0,015). Assumiu-se que cada região linear representava uma população diferente de partículas espalhadoras, cada uma com um tamanho médio característico. A primeira região (q menores que 0,01) corresponde às partículas maiores e vice-versa.
3. Desta maneira foram calculados tamanhos médios (máximo e mínimo) a partir das retas ajustadas a estas duas regiões lineares. Evidentemente, o ajuste resulta melhor no caso de uma maior linearidade da curva. Portanto, considera-se válido estimar o erro do raio das partículas através do erro no ajuste das retas correspondentes, tal como está mostrado nas Figuras 29 e 30.

4.6 - Influência do Tratamento Inicial dos Lipossomas na Adsorção dos Fosfolipídios sobre a Magnetita

Os resultados da adsorção dos diferentes tipos de lipossomas preparados sobre a magnetita são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Adsorção dos Fosfolipídios sobre a Magnetita para Diferentes Tratamentos Iniciais nos Lipossomas

Tipo de Lipossoma	PL / magnetita (mmol/g)	Relação DMPC / DMPE nas Frações de Lavagem
Multilamelar	3,2	2,9
Sonicados	7,3	2,8
Extrudados	1,3	3,8

De acordo com estes resultados, pode-se observar que as quantidades adsorvidas de fosfolípidios sobre a magnetita são consideravelmente maiores com a utilização de lipossomas multilamelares ou com os sonicados do que com os unilamelares extrudados. As diferenças nos valores obtidos podem ser devidas tanto ao número de lamelas formadas (multilamelares e unilamelares), quanto, no caso dos sonicados, à diferença na taxa de adsorção dos fosfolípidios sobre a magnetita. Isso, deve-se a presença de lipossomas tanto multi como unilamelares, havendo uma maior facilidade de transferência dos fosfolípidios possivelmente em decorrência de uma maior mobilidade dos fosfolípidios nessas vesículas.

Em todas as situações a relação DMPC/DMPE, das frações de lavagem dos fosfolípidios foi aproximadamente a mesma, dentro do erro médio apresentado no item 4.4.3.

Para o caso dos lipossomas multilamelares, após a diálise, foi observada uma separação de fases nas amostras de ML's obtidas, que provavelmente ocorreu devido à agregação das vesículas. Esta agregação deixou de ocorrer após a passagem das vesículas através do sistema de magnetoforese devido, provavelmente, ao efeito de separação dos agregados pela lâmina magnética. Os ML's preparados a partir de lipossomas sonicados e extrudados não apresentaram separação de fase. Esses resultados indicam que o trabalho com vesículas extrudadas garante à preparações mais estáveis e reprodutíveis.

4.7 - Estabilidade dos Magnetolipossomas no Processo de Magnetoforese

A avaliação da estabilidade dos magnetolipossomas no processo de magnetoforese constitui-se em um parâmetro operacional importante na reutilização dessas vesículas em sucessivos processos de adsorção e dessorção de biomoléculas.

Os resultados obtidos em decorrência da passagem das amostras por três magnetoforeses sucessivas são apresentados na Tabela 11, em função da razão fosfolípido por magnetita, retidos em cada passagem através do campo magnético, em três amostras diferentes designadas por A, B, e C.

A amostra B foi estocada por 75 dias antes da realização do teste da estabilidade, o que demonstra também a estabilidade dos magnetolipossomas com o decorrer do tempo.

Tabela 11: Estabilidade dos Magnetolipossomas por Magnetoforese.

	Retido na Magnetoforese: Razão PL - Magnetita (mmol / g)		
Amostra	1ª Magnetoforese	2ª Magnetoforese	3ª Magnetoforese
A	1,28	1,82	1,84
B	1,76	1,83	1,83
C	1,39	1,11	1,73

Como pode ser observado na Tabela 11, os resultados mostram resíduos positivos e negativos em relação à um valor médio, o que deve-se provavelmente aos erros nas análises e à diluição das amostras. Não há uma tendência de decréscimo da concentração de fosfolipídios adsorvidos em decorrência das várias magnetoforeses.

Em face deste comportamento, pode-se considerar que as vesículas permaneceram praticamente íntegras durante as várias passagens pelo sistema, mantendo a associação PL / Fe₃O₄ com as várias magnetoforeses. No entanto, o rendimento obtido nas várias magnetoforeses realizadas foi em média 75%, em relação à magnetita presente na amostra de eluição dos ML's.

4.8 - Caracterização da Operação do Sistema de Magnetoforese

4.8.1 - Vazões de Operação (Retenção e Liberação)

As vazões de operação testadas em relação a retenção da magnetita na magnetoforese são apresentadas na Tabela 12 a seguir, sendo que as concentrações foram determinadas nas amostras eluídas durante a retenção na MAG.

Tabela 12: Eficiência de Retenção na Magnetoforese de Alto Gradiente

Vazão (ml/h)	Conc. Magnetita (g/l)	Conc. Fosfolipídios (mM)
50	0,000	0,03
85	0,000	0,02
250	0,000	0,01
530	0,000	0,00
850	0,000	0,00
1090	0,000	0,00
1400	0,004	0,03
2450	0,004	0,00

Pode-se notar que até aproximadamente 1100 ml/h houve uma retenção de 100% da magnetita, sendo que a 1400 ml/h a retenção diminuiu para 97%. Em relação a integridade das vesículas, considerando-se os erros na análise do fosfato, as maiores vazões não alteraram de forma significativa a adsorção dos fosfolipídios sobre a magnetita.

Na Tabela 13 são mostradas as vazões de operação testadas na liberação das amostras do sistema e os resultados obtidos em relação as quantidades liberadas após a retirada do campo magnético.

Tabela 13: Rendimentos na Liberação dos ML's do Sistema de Magnetoforese

Vazões (ml/h)	Conc. Magnetita (g/l)	Conc. Fosfolipídios (mM)	Rendimento (%)
680	0,066	0,11	63
1590	0,061	0,11	63
2290	0,075	0,13	73

Pode-se observar um aumento de aproximadamente 10 % no rendimento dos fosfolipídios na amostra liberada à vazão máxima do sistema, que é de 2290 ml/h, em relação a vazão de 680 ml/h.

De acordo com os resultados da Tabela 13, pode-se concluir que para se obter a melhor

eficiência de retenção o sistema deve ser operado a vazões menores do que 1100 ml/h, e para os melhores rendimentos deve-se utilizar as maiores vazões na liberação dos ML's do sistema.

4.8.2 - Saturação da Lã Magnética

A saturação da lã magnética contida no tubo de vidro do sistema de magnetoforese, determinada nas condições descritas no item 3.9, foi de 0,8 μmol de fosfolipídios e 0,63 mg de magnetita.

4.8.3 - Aquecimento do Sistema

Os resultados da variação de temperatura em função do tempo de funcionamento do reator magnético nas correntes de 5A e 1,5A são mostrados nas Figuras 31 e 32, respectivamente.

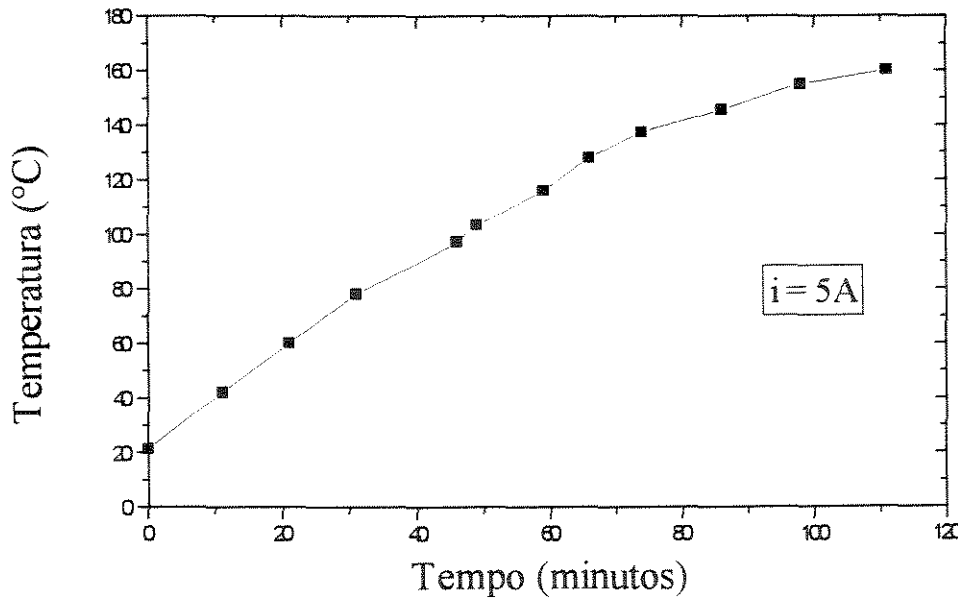


Figura 31: Perfil de aquecimento do sistema de magnetoforese à 5A.

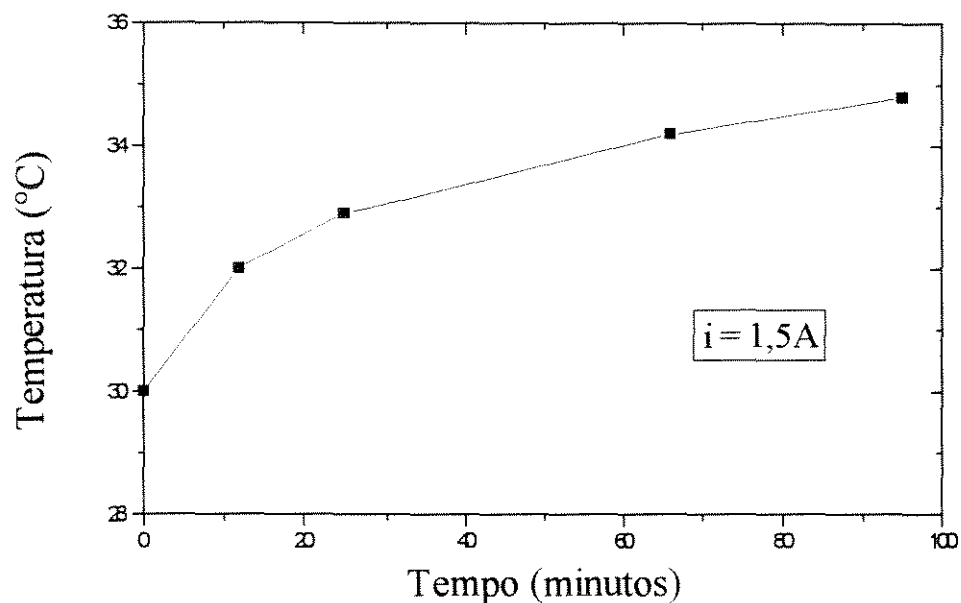


Figura 32: Perfil de aquecimento do sistema de magnetoforese à 1,5A.

Pode-se notar, como já era esperado, que o aquecimento do sistema é muito mais pronunciado quando a operação do sistema ocorre à corrente de 5A, com uma variação de aproximadamente 125°C em 90 minutos, enquanto que para a corrente de 1,5A, essa variação é de apenas 5°C.

4.8.4 - Capacidade de Retenção dos Magnetolipossomas

4.8.4.1 - Intensidade de Corrente

Os resultados obtidos na avaliação da retenção dos ML's em diferentes intensidades de corrente elétrica apresentam-se na Tabela 14.

Tabela 14: Retenção dos ML's a Diversas Intensidades de Corrente

Corrente (A)	Voltagem (V)	Conc. Magnetita não Retida (g/l)
5	46	0
3,5	36	0
2,5	26	0
1,5	16	0

Os resultados mostram que mesmo para correntes menores, intensidade de campo magnético menores do que a de saturação de magnetização do ferro, há uma retenção de 100% dos magnetolipossomas no sistema. Isso pode ser devido à condução do ensaio, no qual a amostra foi primeiramente submetida à intensidade de saturação, levando à retenção da magnetização mesmo após o campo ter sido retirado, o que está de acordo com as propriedades dos materiais ferromagnéticos.

Esse resultado sinaliza que o sistema pode ser operado a intensidades de campo mais baixas após a submissão da amostra inicialmente à 1,7 T. A utilização de campos mais baixos tem as vantagens de menor aquecimento do sistema e menor consumo de energia para a geração do campo.

4.8.4.2 - Influência da Posição da Lã Magnética

Para a avaliação da influência da lã magnética na retenção dos magnetolipossomas durante a magnetoforese, a lã magnética foi colocada em duas posições: no interior e envolvendo a superfície externa dos tubos, de acordo com o procedimento do item 3.9.4.2. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Influência do Posicionamento da Lã Magnética na Retenção dos Magnetolipossomas.

Posição da Lã Magnética no Tubo	Passagens	Volume (ml)	Conc. de PL Retidos (mM)	Conc. Magnetita (g/l) retida	Razão PL/magn. (mmol/g)	Eficiência de Retenção (%)
na superfície	A	0,5	0,340	0,190	1,79	88
	B	0,2	0,598	0,200	2,99	79
	C	0,4	0,217	0,075	2,88	23
no interior	D	0,8	0,236	0,172	1,3	100

Os dados experimentais mostram uma retenção de 100% obtida com a lã magnética posicionada no interior do tubo. Nessa situação, as vesículas não somente sofrem os efeitos do campo magnético, mas também os efeitos mecânicos de interação com a lã magnética. A presença da lã no interior do tubo impede a agregação e auxilia na retenção das vesículas. No entanto, há uma maior dificuldade de liberação das vesículas do sistema e de resíduos deixados durante a magnetoforese, principalmente de magnetita.

O posicionamento da lã magnética na superfície externa do tubo apresenta as vantagens de liberação total das amostras do sistema sem deixar resíduos, e de não expor a amostra eluída em contato com a lã magnética. Porém, a retenção é muito prejudicada, como pode ser visto para a amostra C, e as vesículas ficam propensas à agregação por perturbações no processo, como foi o caso das amostras A e B, cujo bombeamento de ar no sistema durante a magnetoforese provavelmente favoreceu a agregação das vesículas.

4.9 - Avaliação da Aplicação dos Magnetolipossomas em Processos de Adsorção por Afinidade

A avaliação da aplicação dos magnetolipossomas, em processos de adsorção por afinidade, foi feita através da quantificação dos rendimentos das etapas intermediárias de modificação da superfície dos magnetolipossomas com o ligante de afinidade, e das etapas finais de adsorção e dessorção da tripsina.

4.9.1 - Modificação da Superfície dos Magnetolipossomas

A modificação da superfície dos magnetolipossomas foi feita pela ligação covalente do inibidor da tripsina, PAB, na superfície dos magnetolipossomas. De acordo com o procedimento apresentado no item 3.10.1, o processo global foi feito em 3 etapas, sendo a primeira a ligação do ácido diglicólico, para atuar como braço espaçador entre a superfície do magnetolipossoma e o PAB. A segunda etapa, envolve a ligação do PAB, e a terceira, a derivatização dos grupos ácidos carboxílicos para bloqueá-los e minimizar a adsorção não específica de proteínas.

Os rendimentos obtidos, expressos em função da quantidade de magnetolipossomas, são apresentados na Tabela 16, onde as etapas do processo são designadas por I, II e III.

Tabela 16: Rendimentos das Etapas de Modificação da Superfície dos ML's com PAB.

	Quantidade de PL (μ mol)*	Quantidade de Magnetita (mg)*	Rendimento (%)**
inicial	3,74	2,22	-
Etapa I	3,09	1,92	82,6
Etapa II	2,21	1,62	71,6
Etapa III	2,12	1,44	96,1
Total	-	-	56,8

* : quantidades finais de cada etapa.

** : rendimento calculado em relação as quantidade iniciais de fosfolípidios utilizada na etapa e a quantidade final. ou seja, após a MAG de separação dos excessos de reagentes e das impurezas formadas.

Os resultados mostram que o rendimento global nos processos de reação e separação dos magnetolipossomas do material não reagido é da ordem de 56,8%, sendo a maior perda verificada no acoplamento do PAB, etapa II.

4.9.1.1 - Concentração de PAB na Superfície dos Magnetolipossomas

A determinação indireta da concentração de PAB na superfície dos magnetolipossomas foi obtida segundo procedimento descrito no item 3.10.2.1.

Na Figura 33 é apresentada a curva de inibição da tripsina pelo PAB, ambos livres em solução, na reação com 0,3 mM de DL-BAPNA. A velocidade de reação é inversamente proporcional à concentração de PAB, caracterizando a inibição. A reta obtida por regressão linear apresenta coeficientes angular e linear iguais a $1,09 \pm 0,04$ e $1,18 \pm 0,04$ respectivamente, e coeficiente de correlação 0,999 considerado de bom ajuste.

Dados de inibição da tripsina pelo PAB ligado à superfície dos magnetolipossomas apresentaram os seguintes resultados:

Tabela 17: Inibição da Tripsina pelo PAB Ligado aos Magnetolipossomas

Diluição	V (Abs/s)	$1/V \cdot 10^{-3}$ (1/(Abs/s))	C (μM)
1:2	0,00064	1,56	7,02
1:4	0,00073	1,37	6,96

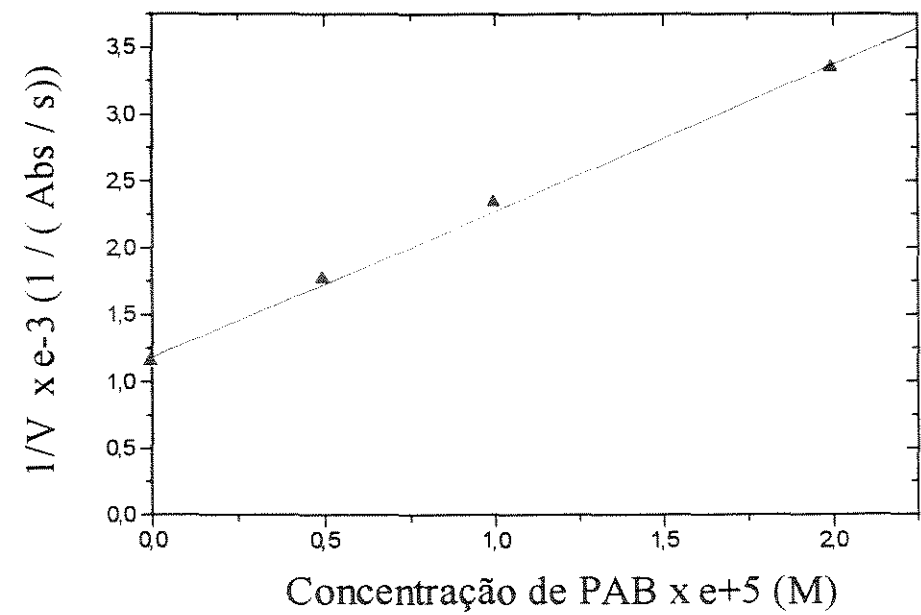


Figura 33: Curva de inibição da tripsina pelo PAB livre.

Admitindo-se que o efeito da inibição da tripsina é uma função somente da concentração do PAB, a partir dos valores dos inversos das velocidades de reação da Tabela 17 e através da curva da Figura 33, determinou-se o valor médio de 6,99 μM para a concentração de PAB na superfície dos magnetolipossomas.

4.9.1.2 – Estimativa da Eficiência de Acoplamento do PAB nos ML's

O número de moléculas de PAB acoplado por magnetolipossoma pode ser obtido a partir da Equação 51:

$$(PAB)_{ML} = \left(\frac{A_{ML}}{A_{PL}} \right) \times (f_{DMPE}) \times (Ef) \quad (51)$$

onde f_{DMPE} é a fração molar de DMPE, Ef é a eficiência de acoplamento do PAB, A_{ML} é a área superficial dos ML's, e A_{PL} é a área superficial da bicamada por molécula de fosfolípido (Powers et al., 1990), expressos respectivamente pelas Equações 52 e 53.

$$A_{ML} = \pi r^2 \quad (52)$$

$$A_{PL} = A_{PC} \cdot f_{DMPC} + A_{PE} \cdot f_{DMPE} \quad (53)$$

onde: A_{PC} e A_{PE} são as áreas da seção transversal das moléculas de DMPC e DMPE respectivamente e r o raio do magnetolipossoma.

Nos cálculos foram considerados os seguintes valores:

$r = 83,2 \text{ \AA}$ (obtido no item 4.5.3), então pela Equação 52:

$$A_{ML} = 2,17 \cdot 10^4 \text{ \AA}^2$$

$$A_{PC} = 71 \text{ \AA}^2$$

$$A_{PE} = 41 \text{ \AA}^2 \text{ (Israelachvili e Mitchel, 1975)}$$

Pela Equação 53, obtem-se:

$$A_{PL} = 65 \text{ \AA}^2 / \text{molécula de fosfolípido}$$

$$f_{DMPE} = 0,2 \text{ (DMPC/DMPE} = 4:1\text{M)}$$

$$C_{PAB} = 6,99 \text{ } \mu\text{M, resultado do item 4.9.1.1}$$

superfície dos magnetolipossomas com 60% do total de fosfolipídios

Com esses dados, obteve-se a seguinte eficiência de acoplamento:

$$Ef = 0,197 \text{ ou } 19,7\%$$

Substituindo os valores acima na Equação 51, tem-se:

$$(PAB)_{ML} = 13,2 \text{ moléculas de PAB acopladas por magnetolipossoma}$$

A área superficial por molécula de PAB acoplado covalentemente é calculada pela Equação 54:

$$\frac{\text{área}}{PAB} = \frac{A_{ML}}{(PAB)_{ML}} \quad (54)$$

$$\text{área/PAB} = 1650 \text{ } \text{\AA}^2$$

O carregamento de PAB é então calculado pela Equação 55:

$$PAB_C = \frac{(PAB)_{ML}}{V_{ML}} \quad (55)$$

onde:

$$V_{ML} = \frac{4\pi r^3}{3} \quad (56)$$

$$V_{ML} = 2,4 \cdot 10^{-15} \text{ ml}$$

$$PAB_C = 9,0 \text{ nmol/ml}$$

A eficiência obtida por Powers et al. (1990) para experimentos de acoplamento do PAB

aos lipossomas foi de 40%, tendo tido melhor aproveitamento das aminas do DMPE na superfície das vesículas do que o obtido neste trabalho. A perda na eficiência provavelmente ocorreu devido ao efeito estérico das moléculas covalentemente ligadas à superfície de magnetolipossomas de menor diâmetro.

4.9.2 -Retenção da Atividade da Tripsina

O método usado para este estudo apresenta-se descrito no item 3.10.3. A concentração de fosfolípidios da solução de PAB-ML's utilizada era de 0,295 mM e de PAB de 6,99 μM , com um carregamento de PAB de 9,0 nmol/ml, como calculado no item anterior. A Figura 34 mostra a curva de calibração da atividade da tripsina livre em relação à concentração. A Tabela 18 apresenta os valores obtidos na eluição da tripsina do sistema de magnetoforese.

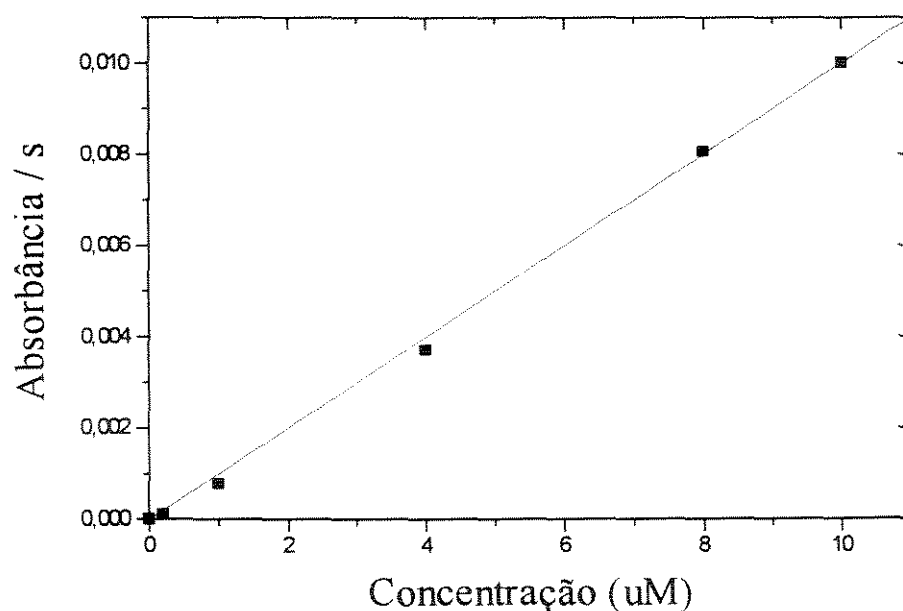


Figura 34: Curva de calibração da atividade da tripsina.

O ajuste dos dados à curva de regressão linear resulta em um coeficiente angular de 0,001 ($\pm 0,00001$) e um coeficiente linear de 0 ($\pm 0,00008$), tendo uma correlação de aproximadamente 1.

Tabela 18: Atividades da Tripsina na Adsorção na Superfície dos Magnetolipossomas.

Frações de Eluição	Atividade .10 ⁴ (Abs/s)	Concentração de Tripsina (µM)	Número de Moléculas de Tripsina (.10 ⁻¹⁷)
Inicial	6,16	0,616	3,708
1	0,81	0,081	0,488
2	0,00	0,000	0,000
3	0,00	0,000	0,000
Retido	0,82	0,082	0,494

A quantidade de tripsina recuperada nas frações de eluição representa 13,15% da inicial e a recuperada na fração retida 13,31%, tendo-se portanto uma fração de ligação aos PAB-ML's de 0,133.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 18, foi constatada a perda total de 73,54% da atividade. Essa perda provavelmente deve-se à alta reatividade da tripsina em pH 7,4 e à temperatura ambiente, levando a um alto grau de autólise que pode ainda ter sido intensificado pela pressão mecânica e aquecimento do sistema de magnetoforese. Provavelmente as maiores perdas ocorreram na eluição da tripsina no estado livre, já que a imobilização aumenta sua estabilidade.

Essas instabilidades no sistema podem também ser observadas através do número de moléculas de tripsina adsorvidas, apresentado na Tabela 18. Calculou-se uma razão de 85 vezes o número de moléculas de PAB (4.10¹⁷) em relação às moléculas de tripsina que consegue adsorver.

4.9.3 - Perfis de Adsorção e Dessorção da Tripsina nos PAB-ML's

Com a autólise da enzima, não foi possível se fazer um balanço de massa da tripsina através da quantificação da proteína. Desta forma, foi feita uma análise da tripsina nas frações eluídas através dos valores das absorbâncias relativas obtidas no ensaio do BCA, item 3.10.2.5, dividindo-se a absorbância medida pela inicial em solução. Para isso foi considerado o solvente de cada fração eluída, HEPES ou benzamidina e a variação da concentração de

benzamidina nas frações de lavagem. A concentração de benzamidina nestas frações foi determinada de acordo com o subitem 3.10.2.4.

Observou-se que a benzamidina interfere na análise do BCA. Devido à isto, as absorbâncias consideradas na dessorção, já levam em conta essas interferências, determinadas através de curvas de calibração para o BCA em tampão, e em benzamidina, apresentadas no Anexo I.

Os perfis foram construídos para três amostras de tripsina (Figura 40) cuja adsorção e dessorção foram feitas a vazões diferentes.

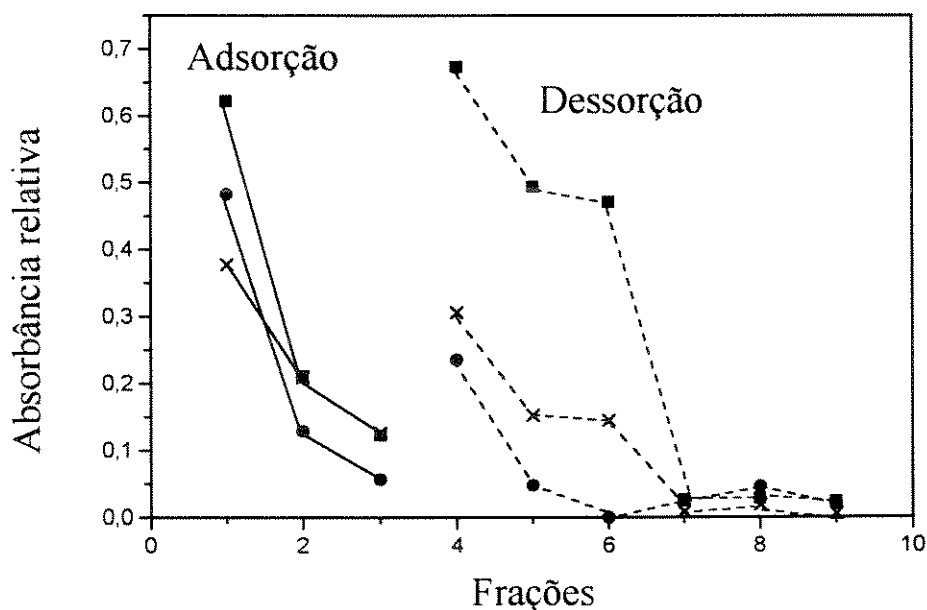


Figura 35: Perfis de eluição da adsorção e dessorção da tripsina a diferentes vazões. ■- 20 ml/h (adsorção de dessorção) ●- 40 ml/h (adsorção) e 70 ml/h (dessorção) X - 20 ml/h (adsorção) e 60 ml/h (dessorção).

Em todas as condições, a tripsina não adsorvida foi eluída nas frações 1 a 3. A tripsina total adsorvida foi eluída nas frações subsequentes 4 a 7. Estes resultados mostram que a capacidade do adsorvente foi mantida durante os vários ciclos de adsorção e dessorção a diferentes vazões.

5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permite-nos tirar as seguintes conclusões:

- a preparação da magnetita coloidal pelo método da precipitação dos cloretos e estabilização com o ácido láurico, não produz soluções estáveis durante a estocagem;
- magnetolipossomas podem ser preparados a partir de uma mistura de fosfolipídios DMPC e DMPE de mesmo tamanho de cadeia de ácido graxos, através dos processos simultâneos de adsorção e diálise. A presença do DMPE na superfície, permite o acoplamento de ligantes de afinidade aos magnetolipossomas;
- os fosfolipídios foram adsorvidos na superfície da magnetita sem competição, apresentando uma concentração total na saturação de 1,3 mmol de PL / g de magnetita, após aproximadamente 40 horas;
- os dados experimentais apresentaram um bom ajuste ao modelo da isoterma de Langmuir, apresentando uma constante de associação de $11,3 \text{ mM}^{-1}$ para a mistura de fosfolipídios;
- os fosfolipídios foram adsorvidos na superfície da magnetita na forma de bicamada lipídica, tendo a monocamada interna uma concentração de 0,4 mmol de PL / g de magnetita;
- apesar dos erros significativos apresentados nas análises, os resultados experimentais obtidos para a concentração dos fosfolipídios na saturação e na monocamada foram consistentes com as estimativas teóricas;
- a captura dos magnetolipossomas da solução foi de 100%, para o sistema de magnetoforese operando com uma corrente de 5A ($\sim 45\text{V}$), e produzindo um campo de 1,8T. A retenção é total até uma vazão de operação de 1100 ml/h. A liberação dos magnetolipossomas do sistema deve ser feita à altas vazões, maiores do que 1600 ml/h, embora resíduos de magnetita ainda permaneçam retidos na lã magnética;
- os magnetolipossomas apresentaram-se estáveis durante magnetoforeses sucessivas, a eficiência de aproveitamento das vesículas foi de 75% por magnetoforese. Os magnetolipossomas formaram-se com diâmetro médio de $\sim 16 \text{ nm}$;
- os métodos de microscopia eletrônica de transmissão e raios-X a baixos ângulos foram eficientes na determinação do diâmetro das partículas de magnetita e dos magnetolipossomas;

- a modificação da superfície dos magnetolipossomas com o ligante de afinidade PAB, apresentou um rendimento global de 56,8%, sendo a maior perda verificada na etapa de acoplamento do PAB;
- a adsorção da tripsina ao PAB verificou-se com uma eficiência de aproximadamente 20%;
- esses resultados mostram que os magnetolipossomas apresentam boa potencialidade para aplicações na adsorção de biomoléculas por afinidade. As limitações observadas podem ser contornadas com a otimização do processo nas suas várias etapas.

6 - SUGESTÕES

A repetição da síntese da magnetita não foi reprodutiva em todas as suas características, como por exemplo o tamanho médio das partículas formadas, sendo desta forma interessante um estudo mais detalhado do procedimento para a obtenção do colóide magnético.

Para que a taxa transferência de fosfolípidios seja aumentada quando utilizadas vesículas contendo colesterol é sugerido o uso de DMSO durante a diálise, já que a menor taxa de transferência desse tipo de vesícula é devido à maior estabilidade.

Como o sistema demonstrou-se capaz de realizar a adsorção por afinidade porém com uma perda significativa da atividade da proteína devido à autólise, sugere-se que seja testado outros tipos de enzima com maior estabilidade.

O uso de lipossomas polimerizados com uma bicamada mais resistente certamente aumentará o rendimento em magnetoforeses sucessivas.

7 - REFERÊNCIAS DA LITERATURA

- ATTWOOD, D. e FLORENCE, A. T. **Surfactant Systems: their Chemistry, Pharmacy and Biology.** London, New York: Chapman and Hall, 1983. p.22.
- BACRI, J. C. et al. Magnetic Vesicles. **Materials Science and Engineering: C 2**, p.197-203, 1995.
- BACRI, J. C. et al. **Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers.** New York: Plenum Press, 1997. Use of magnetic Nanoparticles for Thermolysis of Cells in a Ferrofluid, p. 597-606.
- BARENHOLZ et al. A Simple Method for the Preparation of Homogeneous Phospholipid Vesicles. **Biochemistry**, v.16, n.12, p.2806-2810, 1977.
- BELTER, P.A. et al. **Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology.** New York: John Wiley & Sons Inc., 1988. Cap.6: Adsorption, p.145-177.
- BERKOVSKI, B. **Magnetic Fluids and Applications Handbook.** Paris: UNESCO, 1996.
- CARDOSO, D. **Introdução à Catálise Heterogênea.** São Carlos: UFSCar, 1987. Cap. 5, p.43-56.
- CHEN, P.S. et al. Microdetermination of Phosphorus. **Analytical Chemistry**, v.28, p.1756-1758, 1956.
- CIOLA, R. **Fundamentos da Catálise.** São Paulo: Ed. Moderna, 1981. Cap.4: Adsorção, p.29-62.
- DA SILVA, M.F. et al. **Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers.** New York: Plenum Press, 1997. Quantification of Maghemite Nanoparticles in Biological

- Media by Ferromagnetic Resonance and its Alteration by Conjugation with Biological Substances, 171-176.
- DE CUYPER, M., JONIAU, M. Magnetoliposomes: Formation and Characterization. **Eur. Biophys. J.**, v.15, p.311-319, 1988.
- DE CUYPER, M., JONIAU, M. Immobilization of Membrane Enzymes into Magnetizable, Phospholipid Bilayer-Coated, Inorganic Colloids. **Progress in Colloid & Polymer Science**, v.82, p.353-359, 1990.
- DE CUYPER, M., JONIAU, M. Mechanistic Aspects of the Adsorption Phospholipids onto Lauric Acid Stabilized Fe_3O_4 Nanocolloids. **Langmuir**, v.7, n.4, p.647-652, 1991.
- DE CUYPER, M., JONIAU, M. Binding Characteristics and Thermal Behaviour of Cytochrome-C Oxidase, Inserted into Phospholipid- Coated, Magnetic Nanoparticles. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.16, p.201-210, 1992.
- DE CUYPER, M., JONIAU, M. Magnetoproteoliposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.122, p.340-342, 1993.
- ERLANGER, B.F. et al. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.95, p.271-278, 1961.
- GUINIER, A. **Small - Angle Scattering of X-Rays**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1955.
- HALBREICH, A. et al. **Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers**. New York: Plenum Press, 1997. Magnetic Maghemite Nanoparticle: their Preparation, Properties and Application in Cell Sorting and Characterization of Cellular Membranes *In Vitro*, p.399-415.

- HALBREICH, A. et al. Biomedical Applications of Maghemite Ferrofluid. **Biochimie**, v.80, n.0-0, p.1-12, 1998.
- HANCOCK, J.P., KEMSHEAD, J.T. A rapid and Highly Selective Approach to Cell Separations Using an Immunomagnetic Colloid. **Journal of Immunological Methods**, v.164, p.51-60, 1993.
- HERVE, P. et al. Magnetic Effects on Chemical reactions in the Absence of Magnets. Effects of Surfactant Vesicle Entrapped Magnetite Particles on Benzophenone Photochemistry. **Journal of American Chemical Society**, v.106, p. 8291-8292, 1984.
- ISHII, F. et al. Preparation and Characterization of Lipid Vesicles Containing Magnetite and Anticancer Drug. **Journal Dispersion Science and Technology**, v.11, n.6, p.581-592, 1990.
- ISRAELACHVILI, J. e MITCHEL, A Model for the Packing of Lipids in Bilayer Membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.389, p.13-19, 1975.
- ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular & Surface Forces - 2ª edição**, San Diego, 1994.
- JILES, D. **Introduction to Magnetism and Magnetic Materials**. New York: Chapman & Hall, 1991.
- KIWADA, H. et al. Feasibility of Magnetic Liposomes as a Targeting Device for Drugs. **Chemistry Pharmacology Bulletin**, v.34, n.10, p.4253-4258, 1986.
- KRUPICKA, S. e NOVÁK, P. **Ferromagnetic Materials**, v.3. Prague: North-Holland Publishing Company, 1982. Edited by E. P. Wohlfarth. Cap. 4: Oxide Spinels, p. 189-224.
- LASIC, D. Synthetic Lipid Microspheres Serve as Multipurpose Vehicles for the Delivery of Drugs, Genetic Material and Cosmetics. **American Scientist**, v.80, p.20-31, 1992.

- LASIC, D. **Liposomes: from Physics to Applications.** Amsterdam: Elsevier Scientia Publish B. V., 1993.
- MARGOLIS, L.B. et al. Magnetoliposomes: Another Principle of Cell Sorting. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.735, p.193-195, 1983.
- MASSART, R. Dispersion of the Particles in The Base Liquid.
In: BERKOVSKI, B. **Magnetic Fluids and Applications Handbook.** Paris: UNESCO, 1996.
- MENAGER, C., CABUIL, V. Syntesis of Magnetic Liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.169, p.251-253, 1995.
- MICKLEY, H. S. et al. **Applied Mathematics in Chemical Engineering.** New York: McGraw-Hill, 1957, p.1-42.
- NEW, R.R.C. **Liposomes a Practical Approach.** New York: IRL Press, 1990. Cap.3: Characterization of Liposomes. p. 105 - 160.
- MORAIS, P. C. et al. Ionic Strength Effect on Magnetic Fluids: A Resonance Study. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 149, n.1-2, p. 19-21, 1995.
- PIDGEON, C., VENKATARAM, U.V. Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Suports Composed of Membrane Lipids. **Analytical Biochemistry**, v.176, p.36-47, 1989.
- PIDGEON, C. et al. Immobilized Artificial Membrane Chromatography: Rapid Purification of Functional Membrane Proteins. **Analytical Biochemistry**, v.194, p.163-173, 1991.
- POWERS, J.D. et al. Protein Purification by Affinity Binding to Unilamellar Vesicles. **Biotechnology and Bioengineering**, v.33, p.173-182, 1989.

- POWERS, J.D. et al. Trypsin Purification by Affinity Binding to Small Unilamellar Liposomes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.36, p.506-519, 1990.
- PYLE, D. L. **Separations for Biotechnology 3**. Reading: SCI, Magnetic Solid Phase Supports for Purification of Nucleic Acids. p.154-158.
- REIMERS, G.W., KHALAFALLA, S.E. **Magnetic Fluids**. Br Patent 1,439,031, 1976.
- RIBAS, A.M. **Estudo da Estabilidade de Bicamadas Lipídicas em Presença de Tensoativos**. Campinas: FEQ, UNICAMP, 1997. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997. p.44-48.
- RINGSDORF, H. et al. Molecular Architecture and Function of Polymeric Oriented Systems: Models for the Study of Organization, Surface Recognition, and Dynamics of Biomembranes. **Angewandte Chemie: International Edition in English**, v.27, n.1, p.113-158, 1988.
- RUTHVEN, D. M. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. New York: John Wiley & Sons, 1984. p.64-70.
- SCHICK, M. J. ed. Nonionic Surfactants Physical Chemistry. **Surfactant Science Series**. Marcel Dekker, Inc 23, 1987.
- SHIMOIZAKA, J. In: BERKOVSKI, B. **Magnetic Fluids and Applications Handbook**. Paris: UNESCO, 1996.
- SHINKAI, M. et al. Antibody - Conjugated Magnetoliposomes for Targeting Cancer Cells and their Application in Hyperthermia. **Biotechnology Application Biochemistry**, v.21, p.125-137, 1994.
- VAN LEEMPUTTEN, E., HORISBERGER, M. Immobilization of Enzymes. on Magnetic Particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v.16, p.385-396, 1974.

VIROONCHATAPAN, E. et al. Magnetic Targeting of Magnetoliposomes to Mouse Livers in an *In Situ* On-Line Perfusion System. **Life Sciences**, v.58, n.24, p.2251-2261, 1996.

YOE, J. H., JONES, A. L. Colorimetric Determination of Iron with Disodium-1,2-dihydroxybenzeno-3,5-disulfonate. **Industrial and Engineering Chemistry**, v.16, n.2, p.111-115, 1944.

ANEXO I

No Anexo I são apresentadas as curvas de calibração utilizadas nas quantificações feitas neste trabalho em relação ao ferro, fosfato, DMPE e tripsina.

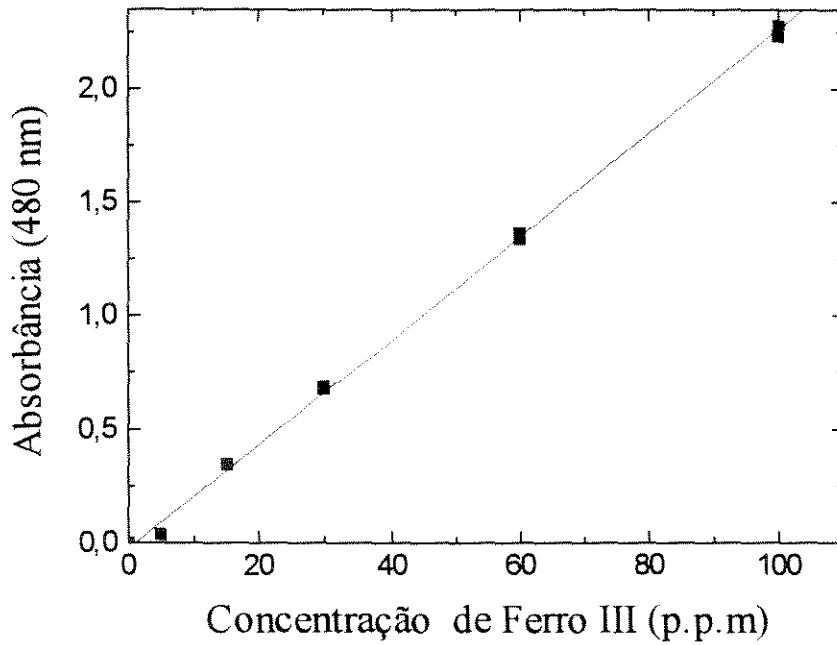


Figura I.1: Curva de calibração da análise do ferro (coeficiente angular = 0,023, coeficiente linear = 0,011 e coeficiente de correlação da reta = 0,999)

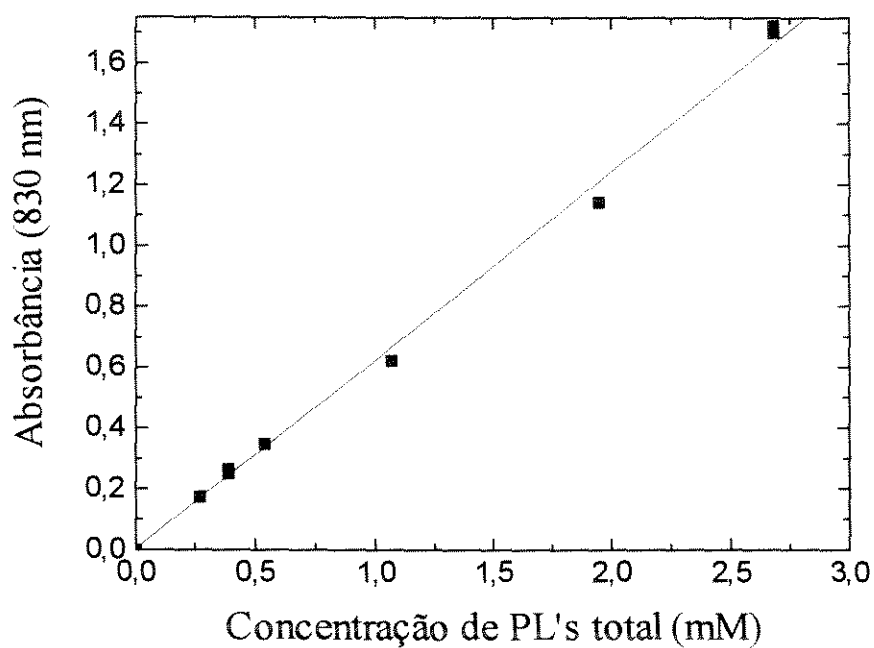


Figura I.2: Curva de calibração da análise do fosfolipídio total. (coeficiente angular = 0,618, coeficiente linear = 0,006 e coeficiente de correlação da reta = 0,999)

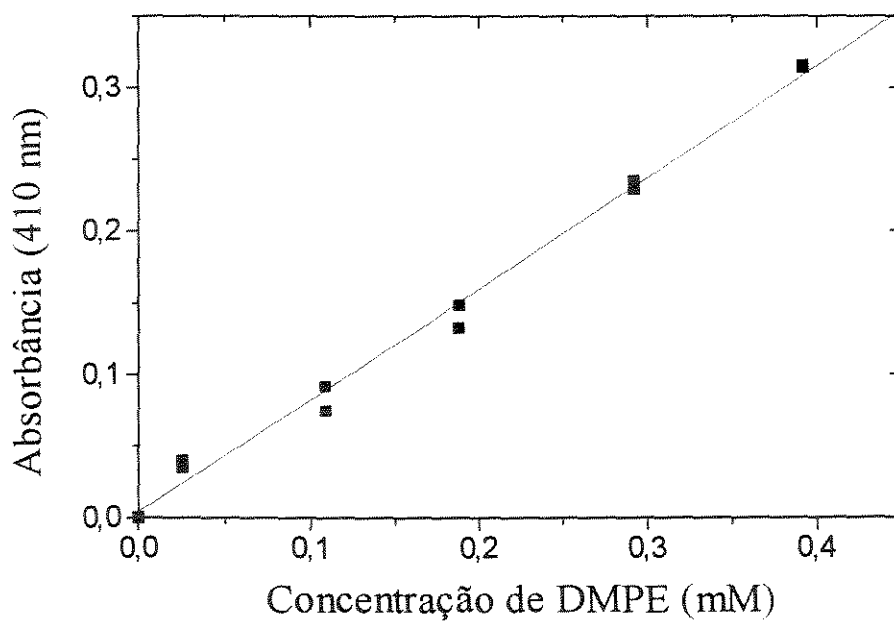


Figura I.3: Curva de calibração da análise do DMPE. (coeficiente angular = 0,707, coeficiente linear = - 0,011 e coeficiente de correlação da reta = 0,997)

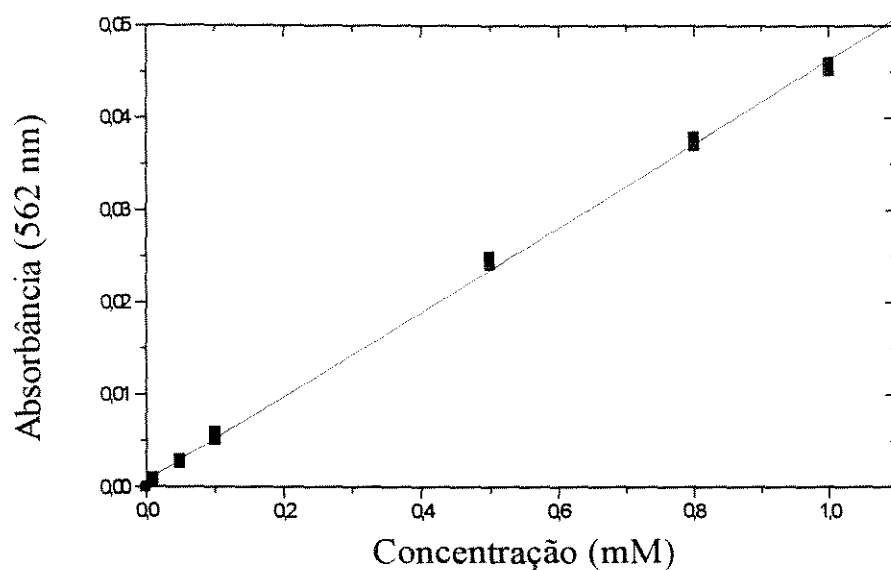


Figura I.4: Curva de calibração da interferência da benzamidina na análise da tripsina pelo método do BCA. (coeficiente angular = 0,045, coeficiente linear = 0,001 e coeficiente de correlação da reta = 0,999)

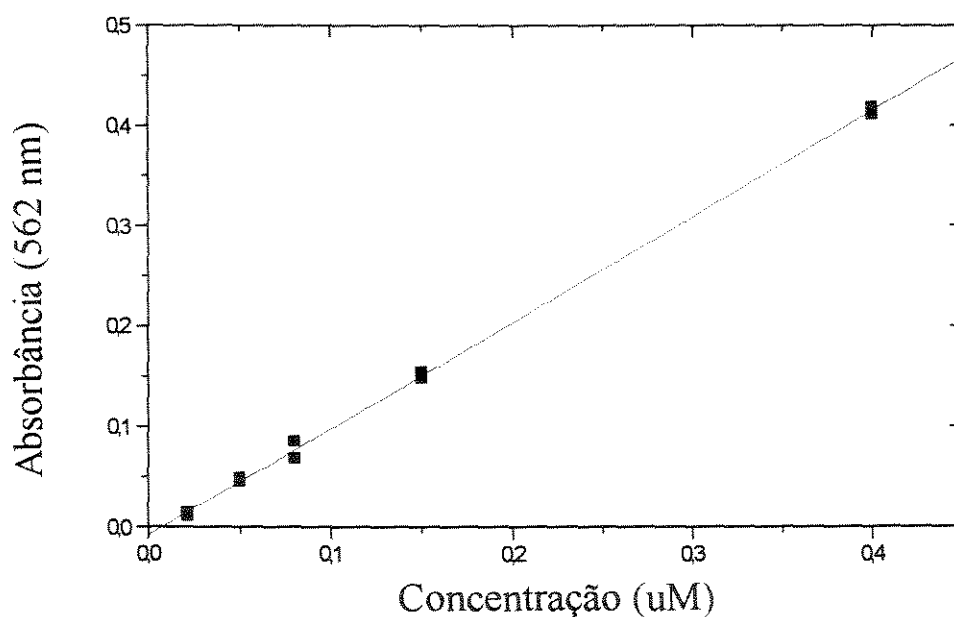


Figura I.5: Curva de calibração da análise da tripsina em HEPES pelo método do BCA. (coeficiente angular = 1,057, coeficiente linear = 0,008 e coeficiente de correlação da reta = 0,999)

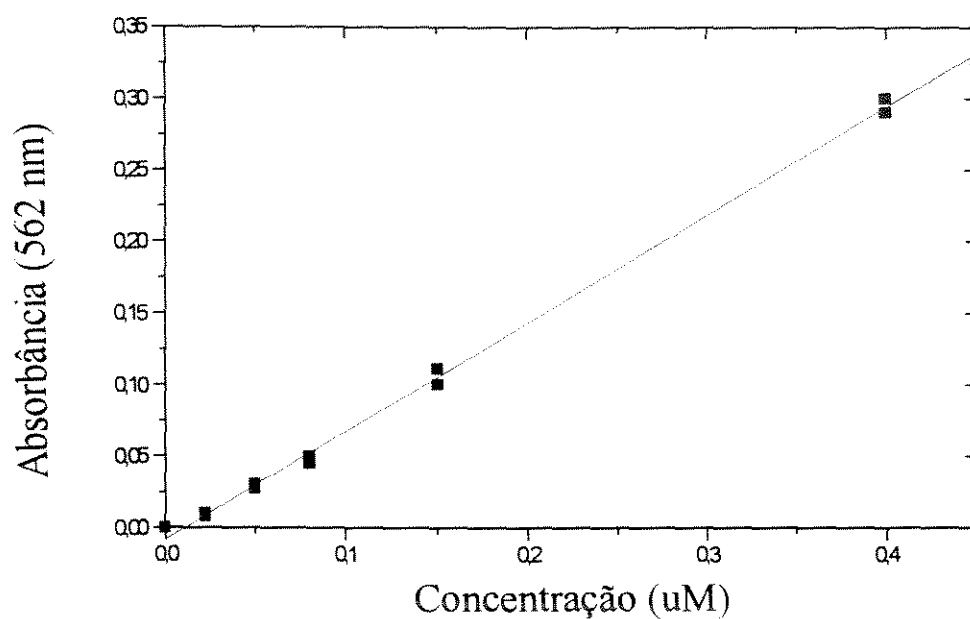


Figura I.6: Curva de calibração da análise da tripsina em benzamidina pelo método do BCA.
(coeficiente angular = 0,755, coeficiente linear = - 0,008 e coeficiente de correlação da reta = 0,998)

ANEXO II

No Anexo II são apresentados os balanços de massa de magnetita e fosfolipídios totais, feitos para as amostras utilizadas na obtenção das curvas de cinética e isoterma de adsorção.

Tabela II.1: Balanço de Massa da Magnetita Total para a Cinética de Adsorção.

Amostra	Massa de entrada (mg)	Massa de saída (mg)	diferença (%)
A	0,47	0,32	31,56
B	0,20	0,16	20,79
C	0,28	0,29	4,24
D	0,80	1,00	19,73
E	0,37	0,33	13,08
F	0,32	0,40	24,48
G	0,20	0,23	17,00
H	0,89	0,75	15,70
I	0,30	0,30	0,52
J	0,69	0,57	17,08

Tabela II.2: Balanço de Massa dos Fosfolipídios Totais para a Cinética de Adsorção.

Amostra	número de moles de entrada (μmol)	número de moles de saída (μmol)	diferença (%)
A	6,2	6,4	3,22
B	3,9	4,0	1,35
C	7,7	8,1	5,73
D	4,7	4,6	2,05
E	3,6	3,4	8,51
F	3,6	3,5	4,00
G	2,1	2,1	3,41
H	4,9	4,8	1,25
I	2,9	2,9	1,16
J	4,9	4,5	8,99

Tabela II.3: Balanço de Massa da Magnetita Total para a Isoterma de Adsorção.

Amostra	Massa de entrada (mg)	Massa de saída (mg)	diferença (%)
A	0,57	0,68	17,89
B	0,26	0,30	15,72
C	0,92	0,85	-8,11
D	1,14	0,30	14,04
E	1,05	1,10	4,54
F	0,54	0,60	9,97
G	0,39	0,42	7,53
H	0,21	0,24	12,47
I	0,69	0,57	17,08
J	1,60	1,17	-26,83
K	1,29	0,83	-35,73
L	1,64	1,32	-19,49
M	0,20	0,23	17,00

Tabela II.4: Balanço de Massa dos Total de Fosfolípidios para as Amostras da Isoterma de Adsorção.

Amostra	número de moles de entrada (μmol)	número de moles de saída (μmol)	diferença (%)
A	0,23	0,29	28,26
B	0,14	0,18	28,43
C	1,58	1,99	25,93
D	2,72	3,08	13,21
E	2,60	2,35	-9,45
F	2,87	2,94	2,49
G	3,39	3,31	-2,25
H	2,35	2,36	0,69
I	4,89	4,45	8,99
J	1,97	1,72	-12,87
K	3,94	3,41	-13,62
L	7,35	6,48	-11,89
M	2,09	2,11	3,41

ANEXO III

No Anexo III são apresentadas as curvas de intensidade de espalhamento em função do vetor de espalhamento e as de Guinier obtidas por raios-X a baixos ângulos para a determinação do tamanho das partículas preparadas.

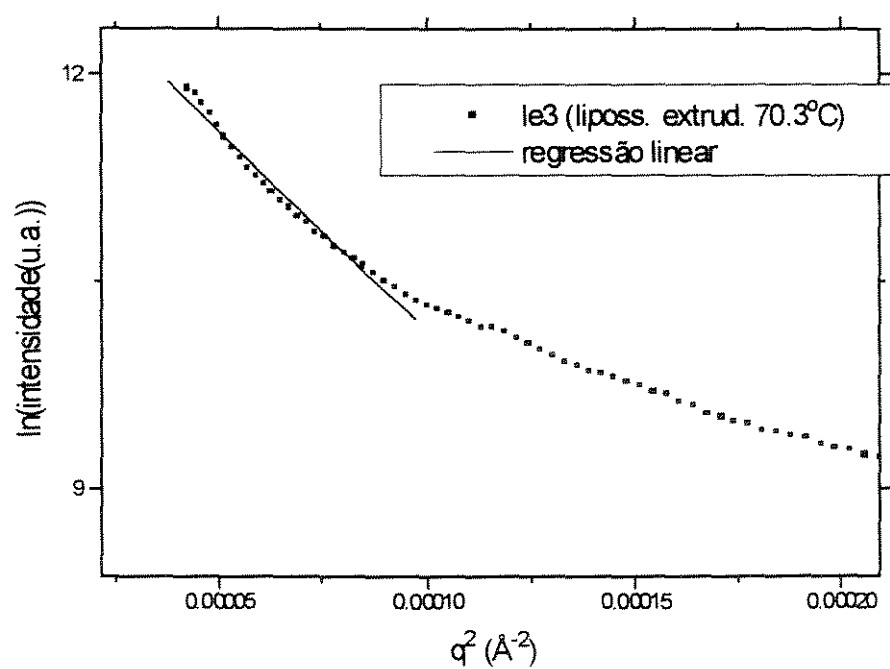


Figura III.1: Curva de Guinier para os lipossomas à temperatura de 70°C.

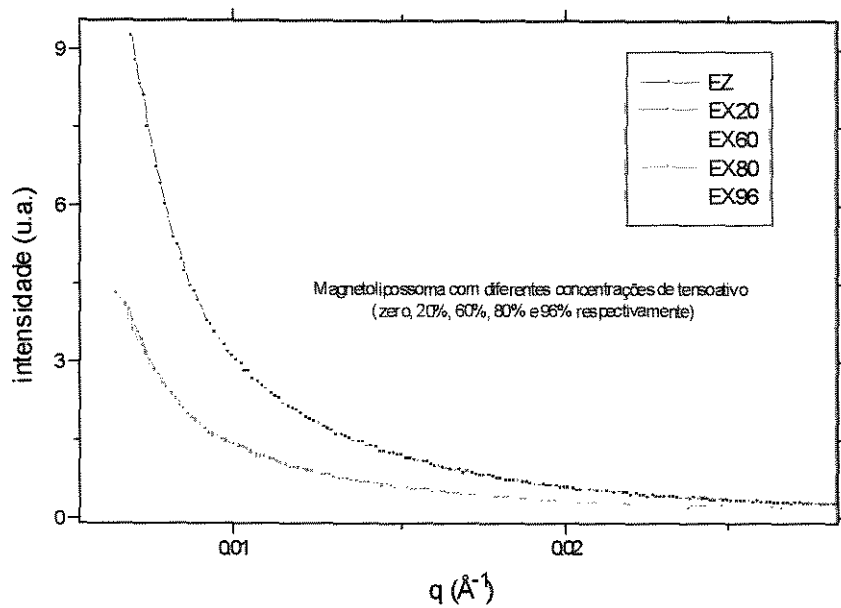


Figura III.2: Intensidade de espalhamento de raios-X das amostras de magnetolipossomas na presença do tensoativo $C_{12}E_5$.

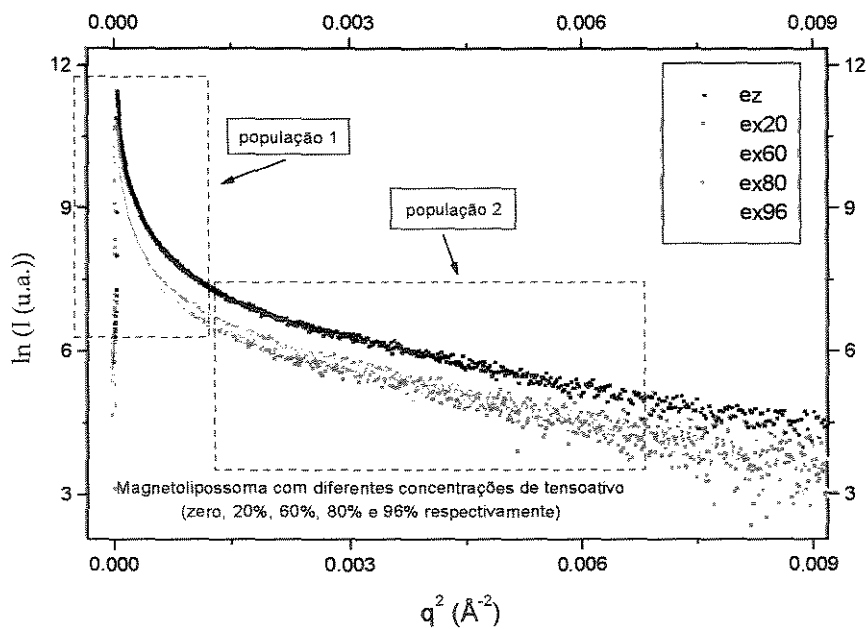


Figura III.3: Curva de Guinier dos magnetolipossomas na presença do tensoativo $C_{12}E_5$.