

## PREPARAÇÃO DE FLUIDOS MAGNÉTICOS ESTABILIZADOS POR COMPLEXAÇÃO COM DMSA E ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO COM FÁRMACOS PARA TUBERCULOSE E PBMICOSE

NUNES, Eloiza da Silva<sup>1</sup>; LIMA, Emília Celma de Oliveira<sup>2</sup>

Palavras-chave: Maguemita, Isoniazida, DMSA, Fluido magnético

### 1. INTRODUÇÃO (justificativa e objetivos)

O estudo de fluidos magnéticos biocompatíveis (FMB) tem sido um campo de bastante interesse devido às potencialidades desses materiais para diversas aplicações biomédicas, como exemplo, vetorização de biomoléculas e liberação controlada de fármacos [1]. Para aplicações *in vivo*, os FMB devem apresentar nanopartículas magnéticas de tamanhos menores que 15 nm, alta estabilidade coloidal e serem estáveis em pH fisiológico. Trabalhos recentes mostram que fluidos preparados com partículas complexadas com moléculas pequenas, portadoras de grupos funcionais simples, podem demonstrar alguma especificidade celular [2]. Fluidos constituídos por partículas de magnetita e maguemita recobertas com o ácido 2,3-dimercaptossuccínico (DMSA) têm-se demonstrado promissores para aplicações biomédicas como carreadores magnéticos. Os grupos sulfidrilas disponibilizados nas superfícies das nanopartículas podem ser usados para se acoplarem a moléculas bioativas, como anticorpos e proteínas, formando, assim, um complexo com elevada especificidade patológica. Além disso, o DMSA se complexa bem às superfícies metálicas e não é tóxico [3]. Em estudos recentes, testes de biocompatibilidade e biodistribuição de fluidos com DMSA, *in vivo*, revelaram níveis extremamente baixos de toxicidade e ainda que a maior parte das partículas injetadas por via endovenosa é rapidamente retida pelos pulmões [1]. Neste trabalho, propomos uma metodologia para preparação de fluidos magnéticos formados por nanopartículas de maguemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) complexadas com DMSA (FMB-DMSA) e a realização de estudos preliminares das interações entre o FMB-DMSA e os fármacos rifampicina e isoniazida, usados para tratar tuberculose, anfotericina B e itraconazol, para o tratamento de Pbmicose.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 – Síntese das nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

Foram preparadas 100 mL de duas soluções contendo 9,94 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 27,03 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . A cada uma foi adicionado 0,5 mL de HCl concentrado para evitar a hidrólise dos sais. As soluções foram unidas e, sob agitação mecânica de 2000 rpm, foram adicionados lentamente a elas 100 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 25%. Um precipitado preto de nanopartículas de magnetita foi instantaneamente formado. O sistema continuou sob agitação vigorosa por 0,5 h. Às partículas de magnetita produzidas, foram adicionados 100 mL de uma solução de  $\text{HNO}_3$  a  $2,0 \text{ molL}^{-1}$  e 100 mL de uma solução de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  a 0,5 M. Em seguida, a mistura foi aquecida até ebulição por 2 h. Após o término da reação as partículas foram decantadas magneticamente para a remoção do sobrenadante, lavadas cinco vezes com uma solução de HCl  $1,5 \text{ molL}^{-1}$  e três vezes com etanol absoluto. Posteriormente as partículas foram secas sob leve fluxo de nitrogênio e dispersas em água para a obtenção de fluido magnético iônico.

#### 2.2 - Preparação dos fluidos magnéticos complexados com DMSA

A três alíquotas de 20 mL do fluido iônico precursor foram adicionados volumes definidos de uma solução de DMSA  $0,3 \text{ molL}^{-1}$ , de forma que a concentração final do ligante em cada amostra fosse 0,05, 0,075 e  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ . Os pH's das misturas resultantes foram ajustados para três e estas foram agitadas por 12 h. Em seguida, os pH's das amostras foram novamente ajustados para três a fim de uma completa sedimentação das nanopartículas, as quais foram lavadas com água deionizada por três vezes para retirar o excesso de ligante. Posteriormente, o volume de cada amostra foi completado para 20 mL com água deionizada e, ajustando o pH = 7,4, as partículas foram redispersadas. O fluido obtido foi centrifugado para retirar as partículas não peptizadas. O fluido sobrenadante foi rotulado como FM-DMSA.

### 2.3 – Estudo da interação dos fármacos com os FMDMSA.

Alíquotas de soluções estoque aquosas de cada fármaco (anfotericina, isoniazida, itraconazol e rifanpicina) com concentração igual a  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  foram adicionadas a volumes de FMDMSA de modo que a proporção fosse 3:50 (v/v).

### 2.4 - Caracterização das nanopartículas

A caracterização estrutural das nanopartículas foi realizada por difratometria de raios-x com pó. Os difratogramas foram obtidos em um equipamento Shimadzu modelo XRD 600, utilizando-se radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=1,54056$ ), 40 kV e 30mA. As amostras, pulverizadas, foram suportadas em lâminas de vidro e a varredura realizada no modo contínuo.

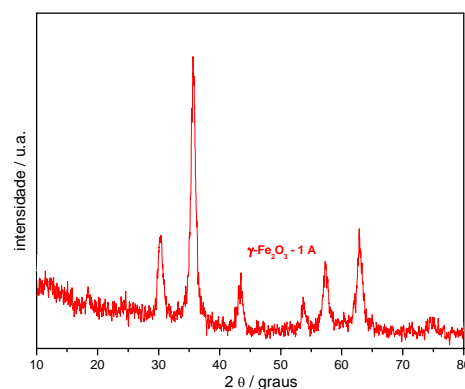
### 2.5 - Caracterização dos complexos superficiais

A elucidação da cobertura complexada na superfície das nanopartículas foi realizada por espectroscopia no infravermelho, por medidas de diâmetro hidrodinâmico efetivo e o teor de DMSA complexado determinado por análise elementar de enxofre. O teor de ferro nos fluidos foi determinado por absorção atômica e a proporção molar  $\text{Fe}^{2+}:\text{Fe}^{3+}$  nas nanopartículas foi determinada pelo método da ortofenantrolina.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 - Fase cristalina das nanopartículas

As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas estruturalmente por difratometria de raios-X e comparadas com os padrões descritos na literatura (JCPDF, carta nº 391346). Os difratogramas obtidos experimentalmente estão apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Difratograma de maguemita obtida pelo método de síntese descrito.

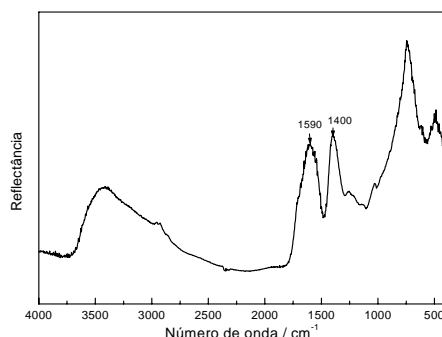
Através da figura 1 podem ser observados que os ângulos de difração e as intensidades dos picos de difração são consistentes com o padrão literário da  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , que é uma ferrita

cúbica, do tipo espinélio [4]. O alargamento na base dos picos é uma característica dos materiais de dimensões nanométricas, resultado dos defeitos de superfícies dos mesmos, uma vez que são tão pequenos que não estão bem formados. As nanopartículas obtidas apresentaram diâmetro médio de 8 nm.

### 3.2 – Caracterização dos complexos superficiais

Os fluidos complexados com DMSA obtidos apresentaram concentração da ordem de  $10^{16}$  partículas por  $\text{cm}^{-3}$  o correspondente a  $0,4 \text{ molL}^{-1}$  em ferro. Os FM-DMSA com concentração de ligante adicionado de  $0,05 \text{ molL}^{-1}$  foram submetidos à análise elementar de C, H, N e S para determinação dos teores de DMSA. A concentração do ligante na superfície das nanopartículas foi de  $0,2 \text{ mmol}$  por grama de partícula.

A figura 2 apresenta um espectro do complexo com DMSA. O duplete em  $1590 \text{ cm}^{-1}$  e  $1400 \text{ cm}^{-1}$  foi atribuído às vibrações dos grupos  $\text{COO}^-$ .



**Figura 2.** Espectro de IV por refletância difusa das nanopartículas complexadas com DMSA.

### 3.3 – Estabilidade coloidal dos FMDMSA.

Foram obtidos FM-DMSA nos quais as concentrações do ligante adicionado foram  $0,05$ ,  $0,075$  e  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ . A Tabela 2 mostra que os teores de DMSA nas superfícies nanopartículas constituintes dos fluidos FM-DMSA  $0,05$ ;  $0,075$  e  $0,100$  demonstram linearidade com o aumento da concentração da solução de ligante adicionada e, ainda, que o teor do ligante nas nanopartículas que constituem o fluido FM-DMSA  $0,05$  é 35 % menor que no fluido FM-DMSA  $0,100 \text{ molL}^{-1}$ .

**Tabela 1.** Teores de DMSA valores dos diâmetros hidrodinâmicos médios  $\langle 2R \rangle$  nos FM-DMSA.

Amostra FM-DMSA	DMSA mmol/g	$[\text{Fe}]_{\text{total}} / \text{molL}^{-1}$	$[\text{DMSA}]_{\text{no fluido}} / \text{mmolL}^{-1}$	$\langle 2R \rangle / \text{nm}$
0,05	0,13	0,30	3,27	130
0,75	0,18	0,25	3,58	64
0,100	0,20	0,23	2,60	77

Comparando os valores de  $\langle 2R \rangle$  verifica-se que a cobertura de DMSA menor nas nano $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  do fluido FM-DMSA  $0,05 \text{ molL}^{-1}$  permitiu que ocorresse maior agregação das mesmas que no FM-DMSA  $0,100 \text{ molL}^{-1}$ , uma vez que o valor de  $\langle 2R \rangle$  deste fluido é aproximadamente o dobro do valor medido para os demais [5]. Contudo, a agregação no fluido FM-DMSA  $0,05 \text{ molL}^{-1}$  não foi relevante a ponto de comprometer a estabilidade coloidal do mesmo.

### 3.4 - Estudos preliminares das interações dos fármacos com os FM-DMSA

A Tabela 2 mostra as medidas dos raios hidrodinâmicos para as misturas feitas com o FM-DMSA. Como pode-se observar, somente a isoniazida mostrou algum tipo de interação com as partículas elevando seus diâmetro hidrodinâmicos para 670 nm. Uma hipótese para este evento pode ser o fato de que a isoniazida é uma molécula menor e menos complexa que as outras e possui um anel piridínico o qual pode interagir com os sítios ácidos nas superfícies das nanopartículas.

**Tabela 2.** Medidas de diâmetro hidrodinâmico dos FM-DMSA – fármaco

Amostra	$\langle 2R \rangle / \text{nm}$
FM-DMSA	133
FM-DMSA-ANFB	141
FM-DMSA-ITR	139
FM-DMSA-ISO	670
FM-DMSA-RIF	134

### 4. CONCLUSÃO

Em linhas gerais pode-se concluir: i) É possível obter fluidos magnéticos biocompatíveis à base de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  complexadas com DMSA estáveis em pH 7,4 por tempo superior a um ano. ii) Foi possível obter um conjugado formado pela isoniazida e as nanopartículas complexadas com DMSA que pode ser usado em testes sistemas biológicos. iii) Interações entre os demais fármacos não puderam ser promovidas por esta rota.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] LACAVA L.M.; et al. Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. **J. Magn. Magn. Mater**, v.252, p. 367-369, 2002.
- [2] Weissleder, R.; Kelly, K.; Sun, E. Y.; Shtatland, T.; Josephson, L. *Nature biotechnology*. **2005**, 23, 1418.
- [3] FAUCONIER, N.; PONS, J. N.; ROGER, J.; BEE, A. Thiolation of maghemite nanoparticle by dimercaptosuccinic acid. **J. Coll. Inter. Sci**, v. 194, p. 427-433, 1997.
- [4] CULLITY, B.D. **Elements of X-Ray Diffraction**, Second edition, Addison-Wesley 1774, Canada, 1972, p. 99-102.
- [5] AUFFAN, M.; et al. *In vitro* interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cyto-genotoxic study. **Environ. Sci. Technol.** v. 40, p. 4367-4373, 2006.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC - FINEP-CTPETRO-ANAPETRO

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Instituto de Química - Laboratório de Materiais e Interfaces, [eloiza\\_nunes@hotmail.com](mailto:eloiza_nunes@hotmail.com)

<sup>2</sup> Orientador/Instituto de Química/UFG, [elima@quimica.ufg.br](mailto:elima@quimica.ufg.br)