



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RAIMUNDO RAFAEL DE ALMEIDA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS
MULTIFUNCIONAIS CONTENDO MAGNETITA E ONCOCALIXONA-A**

Em cooperação:



International Iberian Nanotechnology Laboratory
Braga, Portugal

FORTALEZA

2016

RAIMUNDO RAFAEL DE ALMEIDA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS
MULTIFUNCIONAIS CONTENDO MAGNETITA E ONCOCALIXONA-A**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química
Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo
Co-orientador: Dr. Manuel Bañobre-López

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A45s Almeida, Raimundo Rafael de.

Síntese e caracterização de nanocarreadores lipídicos multifuncionais contendo magnetita e onocalixona-a / Raimundo Rafael de Almeida. – 2016.
114 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

Coorientação: Prof. Dr. Manuel Bañobre-López.

1. Nanocarreadores lipídicos. 2. Magnetita. 3. Hipertermia magnética. 4. Liberação controlada. 5. Oncocalixona-A. I. Título.

CDD 540

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

Raimundo Rafael de Almeida

Tese aprovada em: **28/11/2016.**

Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo
(Orientadora-UFC)

Dr. César Liberato Petzhold
(UFRGS)

Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro
(UFC)

Dra. Sandra de Aguiar Soares
(UFC)

Dra. Tamara Gonçalves Araújo
(UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por me proporcionar todas as chances que tive e, principalmente, por me apontar sempre o caminho correto a seguir.

A todos os meus familiares, pela amizade e apoio.

À minha querida noiva Aiêrta, por todo o ensinamento, paciência e apoio ao longo dessa jornada.

À Prof^a. Dr^a. Nágila Ricardo, pela amizade, oportunidades oferecidas e por toda a orientação dedicada.

À Prof^a. Dr^a. Tamara Gonçalves, pelo apoio desde a época do mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Otília Deusdênia, pela concessão do bioativo utilizado neste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Luzia Kalyne, pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite e pelas contribuições ofertadas para a melhoria deste trabalho.

Ao Laboratório Ibérico Internacional de Nanotecnologia (INL), na pessoa do Dr. Manoel Bañobre-López, pela cooperação e cessão da infraestrutura para a realização deste trabalho.

Ao Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologia (SisNANO).

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará (UFCE) pelo espaço, oportunidade e experiência.

A todos os integrantes do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LABPIM).

À Capes (Processo No. 0075/14-0) pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma torcem para o meu sucesso.

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e caracterização de Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSM) para aplicação em hipertermia magnética e na liberação controlada de oncolixona-A. Através do método de coprecipitação dos sais de Fe (II) e Fe (III) em meio alcalino, obteve-se um ferrofluido, cuja natureza (magnetita- Fe_3O_4) foi confirmada através da análise de difração de raio-X (DRX). Para a otimização dos sistemas, foi necessário o desenvolvimento de formulações utilizando os lipídeos trilaurina, tricaprina, tricaprilina, ácido oleico e cera de carnaúba. Foi possível identificar os melhores sistemas através das técnicas de difração de raio-X, análise termogravimétrica (TG), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os sistemas magnéticos NLSM3 e NLSM4, constituídos respectivamente pelas misturas de trilaurina-tricaprina e trilaurina-tricaprilina foram obtidos com êxito através do método de emulsificação-evaporação do solvente. Já o sistema NLSM5, contendo cera de carnaúba como matriz lipídica, foi obtido pelo método de fusão-emulsificação. O diâmetro médio ($176,3 \pm 8$ nm para NLSM3, $177,8 \pm 9$ nm para NLSM4 e $217,5 \pm 5$ nm para NLSM5) e o índice de polidispersão ($0,237 \pm 0,1$ para NLSM3, $0,180 \pm 0,13$ para NLSM4 e $0,148 \pm 0,12$ para NLSM5) foram obtidos por DLS. As micrografias MEV permitiram fazer uma análise morfológica do material, revelando uma forma irregular adquirida pelas nanopartículas de NLSM3 e NLSM4. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e MEV também permitiram avaliar a forma adquirida pelas nanopartículas de NLSM5, as quais apresentaram uma morfologia predominantemente esférica. Nas medidas de magnetômetro de amostras vibrantes (VSM), os valores de magnetização de saturação foram de 70 emu/g para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$, 2,2 e 2,8 emu/g para os sistemas NLSM3 e NLSM4, respectivamente. As NLSM's desenvolvidas foram submetidas a estudos de hipertermia magnética e mostraram potencial aplicação para essa finalidade. Os estudos de hipertermia magnética foram realizados em um campo fixo de 200 Oe para todas as amostras e, para NLSM3 e NLSM4, aplicou-se duas frequências: 688 KHz (onde NLSM3, NLSM4 e NLSM5 alcançaram, respectivamente, um acréscimo de temperatura de 13, 14,4 e 8,72 °C) e 869 KHz (onde NLSM3, NLSM4 e NLSM5 atingiram, respectivamente, um acréscimo de temperatura de 19,3, 22 e 13,05 °C). Os ensaios *in vitro*, na ausência do campo magnético, mostraram que as formulações de NLSM foram capazes de modificar o perfil de liberação, retardando a liberação do ativo em função do tempo, onde as taxas de liberação após 72h de ensaio foram de 73% (NLSM3), 55% (NLSM4) e 49% (NLSM5). Além disso, NLSM3 e NLSM4 apresentaram baixa citotoxicidade *in vitro* frente a neutrófilos humanos. Desta forma, as nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas abrem novas perspectivas para aplicações biomédicas através do sinergismo entre a ação terapêutica dos compostos bioativos e as propriedades magnéticas das nanopartículas de óxido de ferro.

Palavras-chaves: Nanocarreadores lipídicos, magnetita, hipertermia magnética, liberação controlada, oncolixona-A.

ABSTRACT

This work describes the development and characterization of Magnetic Solid Lipid Nanoparticles (MSLN) for application in magnetic hyperthermia and controlled release of oncocalyxone A. Ferrofluid was obtained by coprecipitation method of the salts Fe (II) and Fe (III) in alkaline medium, whose nature (magnetite- Fe_3O_4) was confirmed by X-ray Diffraction (XRD). For the optimization of systems, was necessary the development of formulations with use of lipids trilaurin, tricaprín, tricaprílin, oleic acid and carnauba wax. It was possible to identify the best systems through the techniques of X-ray diffraction, Thermogravimetric Analysis (TGA), Dynamic Light Scattering (DLS) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The magnetic systems MSLN3 and MSLN4, respectively constituted by mixtures of trilaurin-tricaprin and trilaurin-tricaprylin, have been successfully obtained by emulsion solvent evaporation method. Since the MSLN5 system containing carnauba wax as lipid matrix was obtained by the melt emulsification method. The average diameter (176.3 ± 8 nm for MSLN3, 177.8 ± 9 nm for MSLN4 and 217.5 ± 5 nm for MSLN5) and polydispersity index (0.237 ± 0.1 to MSLN3, 0.180 ± 0.13 to MSLN4 and 0.148 ± 0.12 to MSLN5) were obtained by DLS. SEM micrographs allowed a morphological analysis of the material, revealing an irregularly acquired by nanoparticles MSLN3 and MSLN4. The Transmission Electron Microscopy (TEM) images and SEM also allowed to evaluate the acquired form the nanoparticle MSLN5, which had a predominantly spherical morphology. The values for the saturation magnetization obtained from Vibrating Sample Magnetometer (VSM) were 70 emu/g ($\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$), 2.2 emu/g (MSLN3) and 2.8 emu/g (MSLN4). The MSLN's developed were subjected to magnetic hyperthermia studies and show a potential application for this purpose. Magnetic hyperthermia studies were performed in a fixed field (200 Oe) for all samples and for MSLN3, MSLN4 and MSLN5, applied two frequencies: 688 KHz (where MSLN3 and MSLN4 reached a temperature increase of 13, 14.4 and 8.72 °C respectively) and 869 KHz (where MSLN3, MSLN4 and MSLN5 reached a temperature increase of 19.3, 22 and 13.05 °C respectively). *In vitro* assays in the absence of the magnetic field showed that the formulations MSLN were able to modify the release profile, delaying the release of the active function of time, where the rate of release after 72h testing were 73% (MSLN3), 55% (MSLN4) and 49% (MSLN5). In addition, MSLN3 and MSLN4 showed low cytotoxicity *in vitro* against human neutrophils. Thus, the magnetic solid lipid nanoparticles open new perspectives for biomedical applications through the synergism between the therapeutic action of bioactive compounds and hyperthermia properties from iron oxide nanoparticles.

Keywords: Lipid nanocarriers, magnetite, magnetic hyperthermia, controlled release, oncocalyxone-A.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Imagem ilustrativa dos tipos de materiais magnéticos	17
Figura 2-	Configurações dos dipolos magnéticos em um material ferromagnético: (a) na ausência do campo magnético e (b) na presença do campo magnético.	18
Figura 3-	Curva de histerese de um material ferromagnético	19
Figura 4-	Estrutura cúbica de face centrada do espinélio de $MgAl_2O_4$	20
Figura 5-	Ilustração dos arranjos dos dipolos para o fenômeno de superparamagnetismo	21
Figura 6-	Comportamento de superparamagnetismo frente a um campo magnético	22
Figura 7-	Potencial de aplicação de nanopartículas magnéticas	22
Figura 8-	Sistema magnético em processo de hipertermia magnética	24
Figura 9-	Esquema do processo de obtenção de $Fe_3O_4@AO$	26
Figura 10-	Esquema do processo de remoção do excesso de ácido oleico das $Fe_3O_4@AO$	27
Figura 11-	Característica macroscópica do ferrofluido $Fe_3O_4@AO$	29
Figura 12-	Curvas de TG/DTG para o ferrofluido $Fe_3O_4@AO$ em clorofórmio	30
Figura 13-	Curvas de TG/DTG para amostra seca de $Fe_3O_4@AO$ (em pó)	30
Figura 14-	Curvas de TG/DTG para amostra ácido oleico	31
Figura 15-	Difratograma da amostra $Fe_3O_4@AO$	31
Figura 16-	(a) Micrografia TEM da amostra $Fe_3O_4@AO$, (b) Histograma de distribuição de tamanho	32
Figura 17-	Curva de magnetização de saturação de $Fe_3O_4@AO$	33
Figura 18-	Ilustração de uma Nanopartícula Lipídica Sólida (NLS)	41
Figura 19-	Proposta das estruturas polimórficas de uma NLS	43
Figura 20-	Ilustração das classificações dos CLN	44
Figura 21-	Estrutura química da trilaurina	46
Figura 22-	Estrutura química da tricaprina	46
Figura 23-	Estrutura química da tricaprilina	47
Figura 24-	Estrutura química do ácido oleico	47
Figura 25-	Estrutura química da cera de carnaúba	48

Figura 26-	Esquema do processo de obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) pelo método de fusão-emulsificação	52
Figura 27-	Característica macroscópica da formulação NLS1	55
Figura 28-	Imagens obtidas por MEV das partículas de NLS1	56
Figura 29-	Difratograma de Raio-X da amostra NLS1	57
Figura 30-	Curva de distribuição de diâmetro das partículas de NLS1	57
Figura 31-	Imagens obtidas por MEV para a amostra NLS2	59
Figura 32-	Difratograma de Raio-X das amostras NLS1 e NLS2	59
Figura 33-	Curva de distribuição de diâmetro das partículas de NLS2	59
Figura 34-	Termogramas de DSC da trilaurina e suas respectivas misturas físicas com tricaprilina e tricaprina	60
Figura 35-	Imagens obtidas por MEV: (a) NLS3 e (b) NLS4	61
Figura 36-	Imagens obtidas por (a) MET e (b) MEV para a amostra NLS5	62
Figura 37-	Curva de distribuição de diâmetro das partículas de NLS5	62
Figura 38-	Termogramas de DSC da cera de carnaúba Tipo 1	63
Figura 39-	Representação de um sistema de liberação de fármaco baseada na vetorização magnética	71
Figura 40-	Imagem do equipamento de hipertermia magnética clínica	72
Figura 41-	Liberação de fármaco em nanocarreadores com matriz lipídica sólida por hipertermia magnética	74
Figura 42-	Estrutura da onocalixona-A	75
Figura 43-	Esquema do processo de formação das NLSM pelo método de emulsificação- evaporação do solvente	80
Figura 44-	Esquema do processo de obtenção das NLSM pelo método de fusão-emulsificação	81
Figura 45-	Ilustração esquemática do sistema de NLSM contendo o bioativo onocalixona-A	82
Figura 46-	Ilustração esquemática da determinação do teor de onocalixona-A não encapsulada	83
Figura 47-	Representação esquemática do sistema utilizado para realização dos ensaios de liberação	84
Figura 48-	Imagem do equipamento utilizado nos ensaios de hipertermia	87
Figura 49-	Separação magnética das nanopartículas de NLSM1	91

Figura 50- Características macroscópicas das formulações NLS1 e NLSM1, respectivamente, frente a um campo magnético externo	91
Figura 51- Curvas de TG/DTG para a amostra NLSM1	92
Figura 52- Imagens obtidas por MEV das partículas de NLSM1	92
Figura 53- Curva de distribuição de diâmetro das partículas de NLSM1	93
Figura 54- Curvas de TG/DTG para as amostras NLSM3 e NLSM4	94
Figura 55- Curvas de distribuição de diâmetro das partículas e de potencial zeta: (a) e (b) de NLSM3; (c) e (d) de NLSM4, respectivamente	95
Figura 56- Imagens obtidas por MEV das partículas: (a) NLSM3 e (b) NLSM4	95
Figura 57- Difractogramas para as amostras Fe ₃ O ₄ @AO, NLSM3 e NLSM4	96
Figura 58- Termogramas de DSC das amostras liofilizadas (NLSM3 e NLSM4) e de suas respectivas misturas-físicas	97
Figura 59- Imagens obtidas por MET das partículas de NLSM5	98
Figura 60- Termogramas de DSC da cera de carnaúba Tipo 1 e de NLSM5 liofilizada	99
Figura 61- Difractogramas para as amostras Fe ₃ O ₄ @AO e NLSM5	100
Figura 62- Medida de magnetização em função do campo magnético aplicado para NLSM3 e NLSM4	101
Figura 63- Curvas de aquecimento obtidas dos ensaios de hipertermia magnética de NLSM1	102
Figura 64- Curvas de aquecimento obtidas dos ensaios de hipertermia magnética de NLSM3 e NLSM4	103
Figura 65- Curvas de aquecimento obtidas dos ensaios de hipertermia magnética de NLSM5	104
Figura 66- Imagens dos sistemas de NLSM após separação magnética	105
Figura 67 – Perfis de liberação da oncolixona-A em pH 7,4	106
Figura 68- Avaliação da citotoxicidade da NLSM em neutrófilo humano: determinação da atividade da lactato desidrogenase	109

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Valores de ponto de fusão para as misturas de trilaurina e ácido oleico	58
Gráfico 2-	Valores de diâmetro médio (tamanho) para as partículas de NLS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Lipídeos utilizados nas formulações de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)	51
Tabela 2- Composição lipídica das formulações de NLS obtidas pelo método de fusão-emulsificação	52
Tabela 3- Levantamento bibliográfico sobre NLSM	76
Tabela 4- Características dos lipídeos utilizados nas formulações de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)	79
Tabela 5- Composição das formulações de NLSM obtidas pelo método de emulsificação-evaporação do solvente	80
Tabela 6- Dados de DSC de NLSM3 e NLSM4 e de suas respectivas misturas-físicas	97
Tabela 7- Valores de constantes de liberação (k), expoente de liberação (n), coeficiente de correlação (r) obtido das curvas das cinéticas de liberação de oncocoxona-A associada às NLSM	108

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: NANOPARTÍCULAS HIDROFÓBICAS DE MAGNETITA (Fe₃O₄@AO)	
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Propriedades magnéticas	16
1.2 Nanopartículas de óxido de ferro	19
1.3 Aplicações das nanopartículas magnéticas	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Síntese de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas (Fe ₃ O ₄ @AO)	26
3.2 Microscopia de Eletrônica de Transmissão (MET)	28
3.3 Medidas Magnéticas	28
3.4 Análise Térmica	28
3.5 Difração de Raios-X	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Síntese e caracterização do ferrofluido Fe ₃ O ₄ @AO	29
5 Conclusão	34
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS)	
1 INTRODUÇÃO	39
1.1 Sistemas nanoestruturados para a liberação controlada de bioativos	39
1.2 Nanocarreadores lipídicos	40
1.2.1 <i>Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)</i>	41
1.2.2 <i>Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN)</i>	43
1.2.3 <i>Métodos de obtenção das nanopartículas lipídicas</i>	44
1.3 Lipídeos utilizados na obtenção de NLS e CLN	46
1.3.1 <i>Trilaurina</i>	46
1.3.2 <i>Tricaprina</i>	46
1.3.3 <i>Tricaprilina</i>	47
1.3.4 <i>Ácido oleico</i>	47

1.3.5 <i>Cera de carnaúba</i>	47
2 OBJETIVOS	50
2.1 Geral	50
2.2 Específicos	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1 Materiais	51
3.2 Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)	51
3.2.1 <i>Método fusão-emulsificação</i>	51
3.3 Análise térmica (DSC)	53
3.4 Difração de Raios-X	53
3.5 Tamanho de Partícula	53
3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	53
3.7 Microscopia de Eletrônica de Transmissão (MET)	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Nanopartículas lipídicas sólidas de trilaurina	55
4.2 Nanopartículas lipídicas sólidas obtidas a partir de misturas de lipídeos	57
4.3 Nanopartículas lipídicas sólidas de cera de carnaúba	62
5 Conclusão	64
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 3: NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS MAGNÉTICAS (NLSM)	
1 INTRODUÇÃO	70
1.1 Nanocarreadores magnéticos	70
1.1.1 <i>Nanopartículas lipídicas sólidas magnéticas</i>	74
1.2 Oncocalixona-A	75
1.3 Motivação	76
2 OBJETIVOS	78
2.1 Geral	78
2.2 Específicos	78
3 MATERIAIS E MÉTODOS	79
3.1 Materiais	79
3.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas Magnéticas (NLSM)	79
3.2.1 <i>Método de emulsificação-evaporação do solvente</i>	79

3.2.2 Método fusão-emulsificação	81
3.3 Incorporação de onocalixona-A às NLSM	82
3.4 Eficiência de encapsulação de onocalixona-A	82
3.5 Estudo de liberação <i>in vitro</i> de onocalixona-A	83
3.6 Mecanismo da cinética de liberação	84
3.7 Tamanho de Partícula	85
3.8 Potencial Zeta	85
3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	86
3.10 Microscopia de Eletrônica de Transmissão (MET)	86
3.11 Análise Termogravimétrica (TGA)	86
3.12 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	86
3.13 Hipertermia magnética	86
3.14 Medidas magnéticas	87
3.15 Difração de Raios-X	87
3.16 Teste de citotoxicidade em neutrófilo humano	88
3.16.1 Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH)	88
3.16.1.1 Análises estatísticas	88
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.1 Estudo da estabilidade de Fe₃O₄@AO nas NLSM de trilaurina	90
4.2 NLSM obtidas a partir de misturas de lipídeos	93
4.3 NLSM de cera de carnaúba (NLSM5)	98
4.4 Caracterização magnética	100
4.5 Ensaio de hipertermia magnética	101
4.6 Eficiência de encapsulação	105
4.7 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> de onocalixona-A	105
4.8 Teste de citotoxicidade em neutrófilo humano	108
5 Conclusão	109
REFERÊNCIAS	110