

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
BIOTECNOLÓGICOS

**Detecção de autoanticorpos antifosfolípidos por
adsorção de afinidade utilizando
magnetolipossomas.**

Samantha Cristina de Pinho
Aluna de Mestrado

Prof^aDr^a Maria Helena Andrade Santana
Orientadora

Prof. Dr Ricardo de Lima Zollner
Co-orientador

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química
da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos básicos
para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

Campinas-São Paulo
Julho de 2000



199510007e

UNIDADE	3c
N.º CHAMADA:	F/Unicamp P655d
V.	Ex.
TOMBO BC/	42403
PROC.	161278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/10/00
N.º CPD	

CM-001442B2-1

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

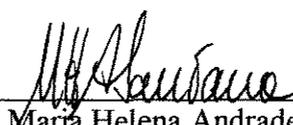
P655d Pinho, Samantha Cristina de
 Detecção de autoanticorpos antifosfolípidos por
 adsorção de afinidade utilizando magnetolipossomas. /
 Samantha Cristina de Pinho.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana, Ricardo
 de Lima Zollner

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipossomos. 2. Imunodiagnóstico. 3. Auto-
 anticorpos. 4. Cardiolipinas. I. Santana, Maria Helena
 Andrade. II. Zollner, Ricardo de Lima. III. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química.
 IV. Título.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À REDAÇÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado em Engenharia Química defendida por Samantha Cristina de Pinho e aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de Julho de 2000.



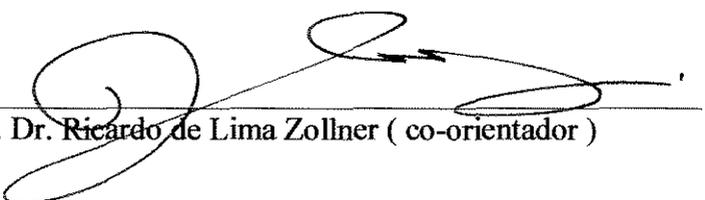
Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Dissertação de Mestrado e aprovada em 26 de julho de 2000 pela Banca Examinadora constituída pelos Doutores:



Prof.ª Dr.ª Maria Helena Andrade Santana (orientadora)

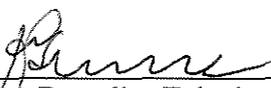


Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner (co-orientador)



Dr.ª Maria Inês Ré – IPT / SP

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine – IQ / Unicamp



Prof.ª Dr.ª Ângela Maria Moraes (suplente) – FEQ/Unicamp

*Aos meus pais, João e Sônia, por todo amor que há nesta vida
e pelo apoio incondicional.*

*Ao Rogers, amor da minha vida,
permanente companheiro e inspiração.*

*Ao meu querido irmão Allan,
por me lembrar sempre de ser criança.*

*“O homem de ciência reconhece que a única realidade para si é ele próprio,
e o único mundo real o mundo como a sua sensação lhe dá.
Por isso, em lugar de seguir o falso caminho de procurar ajustar
as suas sensações às dos outros, fazendo ciência objetiva,
procura, antes, conhecer perfeitamente o seu mundo
e a sua personalidade.
Nada mais objetivo que seus sonhos.
Nada mais seu que a consciência de si.
Sobre estas duas realidades requinta ele a sua ciência.”*

(Bernardo Soares [heterônimo de Fernando Pessoa])

*“Uma coisa que aprendi numa longa vida: que toda a nossa ciência,
confrontada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é o que
temos de mais precioso.”*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Maria Helena Andrade Santana, pela orientação, amizade, dedicação, incentivo e compreensão nos momentos difíceis - e principalmente por me ajudar a encontrar o meu caminho na vida profissional. Não existem palavras que possam expressar toda a minha gratidão por estes cinco anos de aprendizado.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner pela co-orientação.

Às minhas companheiras de vida, Ana Cristina e Paula.

Aos amigos Elaine, Maria Helena Zanin e Heron.

Aos companheiros de caminhada do DPB: Carla, Giuliana, Líbia, Fernanda, Salah, Paulo, Oselys, Victor, Elcimar, Luciana, Mirela, Cristiane Farinas, Christiane Saraiva, Rosana, Ana Carolina, Vinícius, Terezinha e tantos outros que tive o prazer de conhecer e conviver ao menos um pouco.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana pela utilização dos seus laboratórios.

À Prof^a Dr^a Eneida de Paula (Laboratório de Biomembranas – IB/UNICAMP) pelo uso do sonicador e à Conceição (Laboratório de Imunologia Clínica – FCM/Unicamp) pela grande ajuda na seleção dos soros autoimunes.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1. Lipossomas	6
3.1.1. Fases das bicamadas lipídicas	8
3.1.2. Estrutura dos agregados anfífilicos	11
3.2. Físico-química dos fluidos magnéticos: preparação e propriedades	14
3.2.1. Composição dos colóides magnéticos	14
3.2.2. Dispersão das partículas em meio líquido	16
3.2.3. Estabilidade coloidal dos fluidos magnéticos	20
3.2.4. Sistemas magnéticos complexos derivados dos fluidos magnéticos	21
3.2.5. Magnetolipossomas	23
3.3. Utilização de fluidos magnéticos em estudos biológicos e biomédicos	27
3.3.1. Suporte, direcionamento e liberação controlada de medicamentos	28
3.3.2. Classificação e separação de células e biomoléculas	29
3.3.3. Imobilização de enzimas e proteínas	29
3.3.4. Processos de hipertermia	30
3.3.5. Estudos sobre transferência de fosfolipídios entre membranas	31
3.4. Conceitos básicos sobre antígenos e anticorpos	32
3.4.1. Antígenos	32
3.4.2. Células do sistema imune	32
3.4.3. Anticorpos	33
3.4.4. Considerações sobre autoimunidade e doenças autoimunes	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. Materiais	46
4.2. Métodos	47
4.2.1. Síntese e estabilização da magnetita coloidal	47
4.2.2. Caracterização do fluido magnético	49
4.2.3. Preparação dos lipossomas de afinidade	49
4.2.4. Caracterização dos lipossomas de afinidade	51

4.2.6. Diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula	52
4.2.7. Preparação dos magnetolipossomas de afinidade	54
4.2.8. Caracterização dos magnetolipossomas	56
4.2.9. Separação dos fosfolípidios não-adsorvidos	56
4.2.10. Quantificação de IgG por nefelometria	57
4.2.11. Identificação dos “pools” de soros contendo anticorpos antifosfolípidos	58
4.2.12. Quantificação de anticorpos anticardiolipina nos “pools” de soros autoimunes	58
4.2.13. Ensaios de adsorção dos autoanticorpos nos magnetolipossomas de afinidade	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Síntese da magnetita coloidal	62
5.2. Preparação e caracterização dos lipossomas de afinidade	62
5.2.1. Rendimento do processo	62
5.2.2. Incorporação dos ligantes de afinidade DMPE e DPPS	63
5.2.3. Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas	63
5.3. Preparação e caracterização dos magnetolipossomas	64
5.3.1. Desempenho dos sistema de magnetoforese	64
5.3.2. Magnetolipossomas contendo DMPE/DMPC	64
5.3.3. Magnetolipossomas contendo DPPS/DMPC	71
5.3.4. Magnetolipossomas contendo cardiolipina	75
5.3.5. Estabilidade dos magnetolipossomas	79
5.4. Estudo da adsorção de autoanticorpos	
5.4.1. Análise da adsorção em batelada	81
5.4.2. Análise frontal da adsorção em coluna	89
6. CONCLUSÕES	95
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
Anexo I – Curvas de calibração	105
Anexo II – Balanços de massa	107
Anexo III – Memória de cálculo da determinação do número de sítios de ligação disponíveis nos magnetolipossomas	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral de uma molécula de fosfolipídio	6
Figura 2: Interação de vários tipos diferentes de moléculas com lipossomas unilamelares	8
Figura 3: Conformação esquemática da fosfatidilcolina na região da ponte de glicerol	9
Figura 4: Disposição das cadeias de hidrocarboneto em uma molécula de fosfolipídio	10
Figura 5: Representação esquemática das transições de fase da membrana lipídica	10
Figura 6: Geometria de agregados de moléculas anfifílicas em meio aquoso	12
Figura 7: Partículas de fluido magnético em ciclo-hexano	18
Figura 8: Influência da concentração de tensoativo livre	19
Figura 9: Formação da bicamada hidrofílica	19
Figura 10: Esquema de um magnetolipossoma	22
Figura 11: Esquema básico de uma imunoglobulina, mostrando a divisão em cadeias leves e pesadas	33

Figura 12: Esquema básico de uma imunoglobulina, mostrando a divisão em domínios constantes e variáveis	34
Figura 13: Classificação geral dos anticorpos antifosfolípides	39
Figura 14: Classificação dos imunoenaios utilizando lipossomas	43
Figura 15: Esquema da rota de síntese e estabilização da magnetita coloidal com ácido láurico	48
Figura 16: Esquema do equipamento para medidas do tamanho de partícula por espalhamento de luz	53
Figura 17: Esquema da rota de síntese e estabilização da magnetita coloidal com ácido láurico	55
Figura 18: Esquema do sistema de magnetoforese de alto gradiente	57
Figura 19: Perfil cinético obtido para a adsorção dos fosfolipídios DMPE/DMPC (razão molar 3:1)	65
Figura 20: Regressão linear dos pontos experimentais do perfil cinético para os fosfolipídios DMPE/DMPC (razão molar 3:1)	66
Figura 21: Isoterma de adsorção para os fosfolipídios DMPE/DMPC (razão molar 3:1)	68
Figura 22: Regressão linear dos pontos experimentais da isoterma de adsorção para os fosfolipídios DMPE/DMPC (razão molar 3:1)	69

Figura 23: Microscopia eletrônica de transmissão obtida para solução de magnetolipossomas DMPE/DMPC (razão molar 3:1)	70
Figura 24: Perfil cinético obtido para a adsorção dos fosfolipídios DPPS/DMPC (razão molar 1:4)	72
Figura 25: Regressão linear dos pontos experimentais do perfil cinético para os fosfolipídios DPPS/DMPC (razão molar 1:4)	73
Figura 26: Isoterma de adsorção para os fosfolipídios DPPS/DMPC (razão molar 1:4)	74
Figura 27: Regressão linear dos pontos experimentais da isoterma de adsorção para os fosfolipídios DPPS/DMPC (razão molar 1:4)	75
Figura 28: Variação dos espectros de absorção entre 410 e 470 nm em relação ao volume de soro de referência adicionado, para o sistema contendo CL (0.2 mM) livre	82
Figura 29: Variação dos espectros de absorção entre 200 e 400 nm em relação ao volume de soro de referência adicionado, para o sistema contendo CL (0.2 mM) livre.	83
Figura 30: Curvas de titulação da CL livre pelos anticorpos aCL	84
Figura 31: Varredura espectrofotométrica da adição de magnetolipossomas ao soro sadio; (a) intervalo 400-800 nm; (b) intervalo 200-400 nm	85
Figura 32: Varredura espectrofotométrica da adição de magnetolipossomas ao soro autoimune: (a) intervalo 400-800 nm; (b) intervalo 200-400 nm	87

Figura 33: Espectros de absorção dos soros sadio e autoimune em presença de magnetolipossomas de afinidade	88
Figura 34: Perfis de adsorção utilizando magnetolipossomas contendo cardiopina	89
Figura 35: Perfis de adsorção utilizando magnetolipossomas contendo serina	90
Figura 36: Perfis de adsorção utilizando magnetolipossomas contendo etanolamina	91
Figura 37: Comparação entre os níveis de adsorção de IgG presente em soro sadio	92
Figura 38: Comparação entre os níveis de adsorção de IgG presente em soro autoimune	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Modelos de empacotamento geométricos de várias moléculas anfífilas em agregados coloidais	13
Tabela 2: Forças não-covalentes que mantêm unidas os complexos antígeno-anticorpo	35
Tabela 3: Diâmetro das vesículas de afinidade contendo DMPE e DPPS	63
Tabela 4: Influência das concentrações iniciais de fosfolipídio e magnetita nos magnetolipossomas contendo cardiolipina	78
Tabela 5: Dados de estabilidade de magnetolipossomas contendo DPPS:DMPC (razão molar 1:4)	79
Tabela 6: Dados de estabilidade de magnetolipossomas contendo DMPE:DMPC (razão molar 3:1)	80
Tabela 7: Dados de estabilidade de magnetolipossomas contendo CL:DMPC (razão molar 1:1)	81
Tabela 8: Comparação dos níveis de adsorção nos três tipos de magnetolipossomas	93

ABREVIATURAS

- aCL – anticorpo anticardiolipina
aPL – autoanticorpo antifosfolípide
 β_2 GP I - β_2 -glicoproteína I
CL - cardiolipina
DMPC – dimiristoilfosfatidilcolina
DMPE – dimiristoilfosfatidiletanolamina
DMPG - dimiristoilfosfatidilglicerol
DPPS – dipalmitoilfosfatidilserina
DSPG - distearoilfosfatidilglicerol
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
LES – lupus eritematoso sistêmico
MAG – magnetoforese de alto gradiente
MET – microscopia eletrônica de transmissão
SAF – síndrome antifosfolípide
TNBS – ácido trinitrobenzenosulfônico

SÍMBOLOS

LETRAS ROMANAS

C – concentração de fosfolipídios em equilíbrio

K_L – constante de associação

T_c – temperatura de transição

T_c^* – temperatura de pré-transição

$t_{1/2}$ – tempo de meia saturação

LETRAS GREGAS

Γ_0 – mols de fosfolipídio adsorvidos por grama de ferro no tempo zero

Γ_t – mols de fosfolipídio adsorvidos por grama de ferro no tempo t

Γ_∞ – mols de fosfolipídio adsorvidos por grama de ferro na saturação (cinética)

Γ_L – mols de fosfolipídio adsorvidos por grama de ferro (isoterma)

Γ_L^0 – mols de fosfolipídio adsorvidos por grama de ferro na saturação (isoterma)

RESUMO

O encapsulamento de ferrofluidos no núcleo de lipossomas origina vesículas denominadas magnetolipossomas, que podem ser eficientemente separadas da solução quando sob a ação de um campo magnético de alto gradiente. Essa propriedade possibilita a aplicação dos magnetolipossomas como adsorventes específicos em processos de separação de estruturas como células e biomoléculas. A maior vantagem desta abordagem é a simplicidade e eficiência. Anticorpos antifosfolípides constituem uma importante classe de biomoléculas, para a qual fosfolípidios específicos podem ser usados como ligantes de afinidade. A incorporação desses fosfolípidios na matriz estrutural dos lipossomas produz suportes coloidais de elevada área específica, com sítios de afinidade sobre a superfície, que são úteis para aplicação em processos de separação e detecção dessa classe de anticorpos. Os autoanticorpos estão presentes no soro de pacientes portadores de doenças autoimunes e a sua detecção apresenta dificuldades no que diz respeito à reprodutibilidade e à variabilidade dos suportes usados em kits comercialmente disponíveis. A adsorção específica de autoanticorpos na superfície dos magnetolipossomas e o desenvolvimento de sinal magnético resultante da ligação constitui técnica alternativa promissora para o diagnóstico de autoanticorpos. As vantagens do novo método seriam a reprodutibilidade, versatilidade do suporte e a condução do ensaio em etapa única.

O objetivo deste trabalho foi o estudo da preparação e caracterização de magnetolipossomas de afinidade, além da avaliação do desempenho desses suportes na ligação dos autoanticorpos. Na preparação dos magnetolipossomas, foi usada magnetita coloidal como ferrofluido, cardiolipina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina como lipídios de afinidade e fosfatidilcolina como lipídio estrutural. A adsorção dos anticorpos na superfície dos magnetolipossomas foi estudada em mistura e de modo frontal em coluna capilar. Como resultado da preparação das partículas obteve-se associação adequada entre a magnetita e os fosfolípidios, reprodutibilidade e boa estabilidade. Em relação à adsorção dos anticorpos observou-se que há especificidade, demonstrando a potencialidade de utilização dos magnetolipossomas no desenvolvimento de uma nova técnica de detecção de autoanticorpos antifosfolípides.

ABSTRACT

The entrapment of ferrofluids into the core of liposomes provides vesicles called magnetoliposomes, which can be efficiently captured from a solution under the action of a high gradient magnetic field. Due to this property, it is possible the application of magnetoliposomes as specific adsorbents in separation processes of structures like cells and biomolecules. The main advantage of this approach is its simplicity and efficiency. Antiphospholipid antibodies are an important class of biomolecules, to whom specific phospholipids can be used as affinity ligands. The aggregation of these phospholipids in the structural matrix of the liposomes produces colloidal supports with high specific surface area, with affinity sites on the surface, which are useful for applications in separation processes and detection of this antibody class. They are present in the sera of patients with autoimmune diseases, and their detection presents difficulties in respect to the reproductibility of results, due to the heterogeneity of the molecules in this group. In addition, there is the multi-step characteristic of the ELISA assay, the most commonly used, and the variability of the supports in the available commercial kits. The specific antibody adsorption on the surface of magnetoliposomes and the development of a magnetic signal due to the linking is an alternative technique for the autoantibody diagnostic. The advantages of the new method would be the reproductibility, versatility of the supports and a single-step assay.

The aim of this work was the preparation and characterization of affinity magnetoliposomes, and the evaluation of their performance in the interaction with autoantibodies. In their preparation colloidal magnetite was used as ferrofluid, cardiolipin, serine and ethanolamine as affinity lipids and choline as the structural one. The antibody adsorption was studied in batch and plug-flow mode in capilar column. As a result of the preparation, we obtained reproductibility, and as for the adsorption, we observed that there is a good potentiality to use magnetoliposomes in the development of a detection technique of antiphospholipid antibodies.

1. INTRODUÇÃO

Magnetolipossoma é a denominação usada para vesículas lipídicas formadas pela adsorção de fosfolípidios na superfície de partículas magnéticas coloidais, tal como a magnetita. A cobertura lipídica possui forma de bicamada que associada à magnetita origina vesículas capazes de serem separadas do meio de dispersão através de um campo magnético de alto gradiente, processo denominado magnetoforese de alto gradiente. As propriedades magnéticas conferidas aos lipossomas potencializam aplicações importantes em processos biotecnológicos tais como o uso como suporte para imobilização de enzimas de membrana, utilização em processos contínuos de separação de biomoléculas, separação de células e liberação controlada de drogas.

As aplicações de lipossomas em diagnóstico têm sido objeto de várias pesquisas, devido às vantagens do uso desse tipo de estrutura como suporte de moléculas marcadoras e ligantes. No caso particular das aplicações em imunodiagnóstico, os lipossomas têm sido estudados em vários tipos de ensaios homogêneos e heterogêneos. Diversos trabalhos têm sido reportados e os resultados discutidos em trabalhos de revisão como o de Singh e Carbonell (1995).

As principais vantagens dos lipossomas nas aplicações em diagnóstico são: a grande área superficial das vesículas, possibilitando a associação externa de grande número de anticorpos ou antígenos; devido às suas pequenas dimensões, as resistências difusionais estão ausentes nos processos de adsorção e dessorção; essas estruturas podem ser produzidas com boa eficiência e reprodutibilidade, o que conduziria à obtenção de resultados reprodutíveis.

No processo de desenvolvimento de sistemas heterogêneos para aplicações em diagnóstico laboratorial, os aspectos principais são: o suporte e o sinal. O suporte deve ser um meio estável, capaz de carrear ligantes, ou moléculas de reconhecimento do composto desejado para a detecção. O sinal, desenvolvido em resposta à ligação de interesse, pode ser desenvolvido a partir de moléculas associadas ao suporte, ou de modificações produzidas nas propriedades do meio em consequência da

ligação. Nos estudos de aplicações de lipossomas em imunodiagnóstico, o sinal desenvolvido é em geral colorimétrico ou fluorimétrico.

Atualmente o método mais usado em imunodiagnóstico é o ensaio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Nesse ensaio, o sinal resultante da associação antígeno-anticorpo é gerado a partir da ligação entre um cromóforo e um substrato, cujo desenvolvimento de cor é resultante da reação entre o cromóforo e substrato, catalisada por enzimas. Portanto, o desenvolvimento de sinal não é direto, uma vez que envolve várias etapas de reação. Por outro lado, o antígeno, normalmente encontra-se ligado em suportes sólidos, em geral por adsorção. A eficiência do processo e sua reprodutibilidade, dependem do desempenho de cada etapa da análise, além da qualidade e reprodutibilidade da associação do antígeno aos suportes sólidos. Todos esses fatores, concorrem para a variabilidade observada nesses ensaios, quando kits comerciais são usados.

As limitações impostas pelas técnicas usuais dos imunoensaios motivaram as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de ensaios alternativos envolvendo um número menor de etapas de reação e de desenvolvimento de sinal. O uso de lipossomas nesses novos métodos tem conduzido a bons resultados.

Dentro desse contexto, a aplicação de magnetolipossomas em imunoensaios apresenta-se muito promissora, uma vez que combina as vantagens já conhecidas dos lipossomas convencionais, principalmente quanto à reprodutibilidade e flexibilidade de associação de antígenos, ao desenvolvimento direto de sinal resultante da ligação antígeno anticorpo, através das alterações produzidas na susceptibilidade magnética do meio.

As características acima citadas, motivaram a proposição deste trabalho, o qual compreende o desenvolvimento de suporte constituído de lipossomas com propriedades magnéticas, contendo ligantes de afinidade associados à sua estrutura. Os anticorpos selecionados para o estudo, foram do tipo autoanticorpos, em particular da classe antifosfolípides, e os ligantes usados foram os fosfolípídios cardiolipina, fosfatidilcolina e fosfatidilserina, diretamente incorporados na matriz lipídica dos lipossomas. Em todos os casos, o material magnético associado às estruturas foi a magnetita coloidal.

A relevância do desenvolvimento de sistemas para diagnóstico de autoanticorpos está na heterogeneidade dos anticorpos envolvidos e sua importância como diagnóstico auxiliar das doenças autoimunes.

O trabalho envolveu o estudo dos processos de produção dos três tipos de magnetolipossomas de afinidade citados, bem como a sua caracterização em termos de capacidade, eficiência da associação lipídio- material magnético, e da incorporação dos ligantes de afinidade na estrutura. O comportamento dos magnetolipossomas na ligação com os anticorpos de interesse, foi estudada com sistemas reais, constituídos de soros de pacientes portadores de doenças autoimunes, em ensaios conduzidos em batelada e de modo frontal em coluna capilar.

A descrição detalhada dos sistemas, as técnicas experimentais usadas e os resultados obtidos são descritos e discutidos nos capítulos subsequentes deste trabalho.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo qualitativo e quantitativo da detecção de anticorpos antifosfolípidos contidos no soro de pacientes portadores de doenças autoimunes através da adsorção por afinidade utilizando magnetolipossomas. Para que este objetivo geral fosse atingido, os seguintes objetivos específicos foram envolvidos:

- Implementação de metodologias reprodutíveis de quantificação dos lipídios alvo-específicos;
- Preparação e caracterização de lipossomas convencionais contendo os lipídios alvo-específicos etanolamina e serina;
- Determinação da concentração dos lipídios alvo-específicos sobre a superfície dos lipossomas;
- Preparação e caracterização de magnetolipossomas contendo os lipídios alvo-específicos.
- Determinação da cinética e isoterma de adsorção para as misturas dos fosfolípidos alvo-específicos na superfície das partículas de magnetita coloidal;
- Avaliação do comportamento do sistema na detecção de anticorpos antifosfolípidos com sistemas reais (soros de pacientes com doenças autoimunes e de indivíduos saudáveis).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. LIPOSSOMAS

Lipossomas, ou vesículas de lipídios, são estruturas esféricas compostas por bicamadas lipídicas que encapsulam em seu interior parte do meio em que se encontram. Podem ser constituídos por uma ou várias membranas concêntricas; seu tamanho pode variar de 20 nm a vários micrômetros, enquanto que a espessura de cada bicamada está em torno de 4 nm. São formadas predominantemente por moléculas anfifílicas, insolúveis em água que, quando em ambientes aquosos, formam dispersões coloidais (Lasic, 1993). Uma molécula típica constituinte dos lipossomas é a fosfatidilcolina (lecitina), do grupo dos fosfolipídios, os quais, em geral, possuem duas caudas de hidrocarboneto, também denominadas caudas hidrofóbicas ou não-polares, e um grupo hidrofílico, geralmente chamado de cabeça polar (Figura 1).

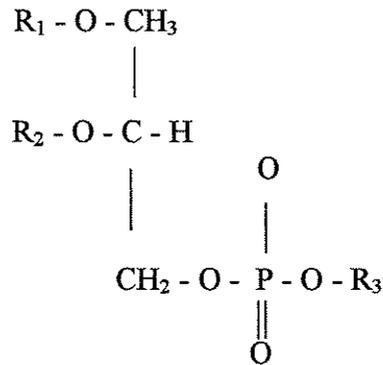


Figura 1: Esquema geral da fórmula estrutural de um fosfolipídio.

Devido às suas propriedades de solubilidade, em solução aquosa as moléculas de fosfolipídios ordenam-se em agregados, com as caudas hidrofóbicas no seu interior e as cabeças hidrofílicas expostas à água. Uma das estruturas agregadas mais frequentemente encontrada é a bicamada lipídica. Na superfície de cada monocamada situam-se as cabeças polares, que protegem as caudas hidrofóbicas

do contato com o meio. Para diminuir as interações desfavoráveis, as bicamadas formadas fecham-se sobre si mesmas, formando as vesículas ou lipossomas.

Quanto ao tamanho, os lipossomas são classificados como grandes ou pequenos, podendo ser compostos por uma ou até centenas de bicamadas concêntricas. Baseado no tamanho e número de lamelas pode-se distinguir as vesículas multilamelares (VMG ou MLV - "multilamellar large vesicles", com diâmetros variando de 100 a 1000 nm), vesículas unilamelares grandes (VUG ou LUV - "large unilamellar vesicles", com diâmetro em torno de 1000 nm), vesículas unilamelares intermediárias (VUI ou IUV - "intermediate unilamellar vesicles", com diâmetros variando entre 250 e 1000 nm) e vesículas unilamelares pequenas (VUP ou SUV - "small unilamellar vesicles", com diâmetros entre 50 e 250 nm).

Todas essas estruturas possuem propriedades físicas e químicas importantes, como atividade osmótica, permeabilidade, solubilidade, interação com solutos hidrofílicos e hidrofóbicos, comportamento de agregação e características de superfície, as quais dependem basicamente da composição química das vesículas. A estrutura vesicular formada por bicamadas fluidas é consistente com a maior parte dos papéis desempenhados pelas membranas biológicas, as quais definem o tamanho e a forma de uma célula ou organela, estabelece a permeabilidade da barreira e oferece uma matriz bidimensional em que as proteínas são suportadas e exercem diferentes funções.

Devido às suas características estruturais, os lipossomas podem encapsular ou suportar substâncias polares e apolares, são capazes de atravessar diferentes barreiras hidrofílicas e liberar substâncias encapsuladas no meio ou através de outras membranas. Estas propriedades únicas têm levado à descoberta e desenvolvimento de inúmeras aplicações para esses agregados anfífilos, em diversos campos da ciência e tecnologia, desde estudos básicos sobre forma de células, mecanismos de membrana e função de proteínas de membrana, até catálise, suporte para liberação controlada de medicamentos, diagnóstico, entre outros.

A Figura 2 mostra a interação de vários tipos de moléculas com a estrutura de lipossomas unilamelares:

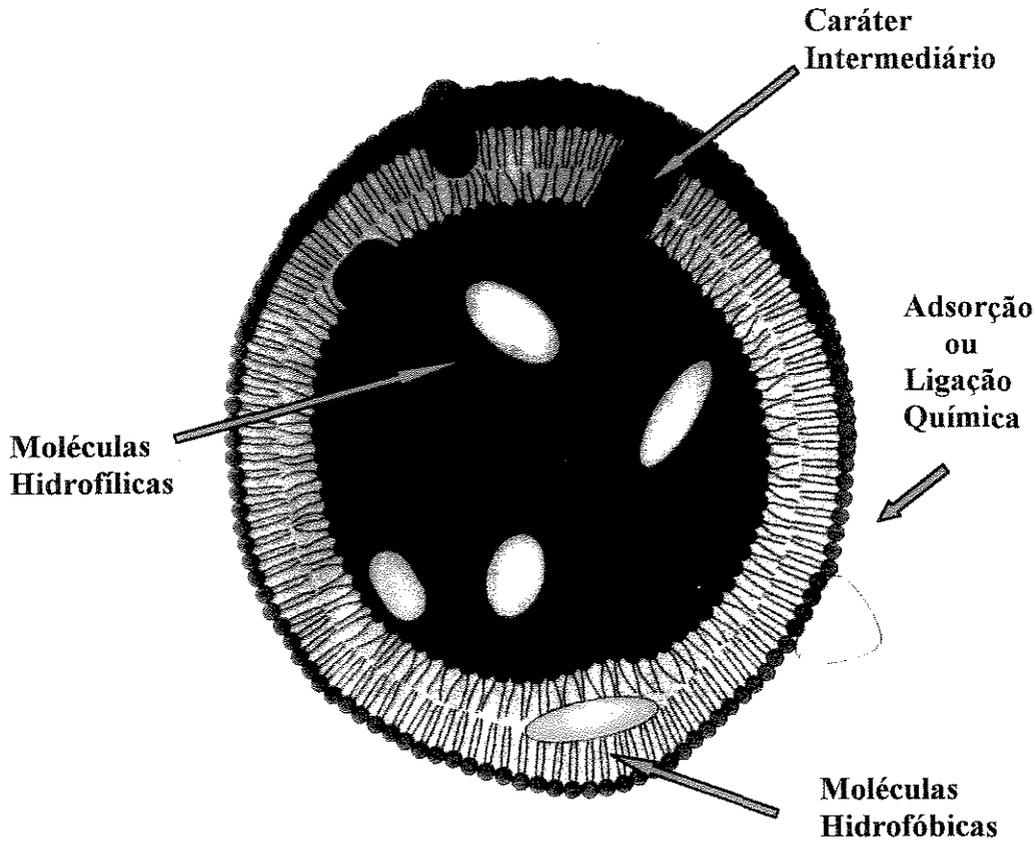


Figura 2: Interação de vários tipos diferentes de moléculas com lipossomas unilamelares. Moléculas solúveis em água são encapsuladas ou ligadas à superfície da vesícula. Moléculas anfifílicas orientam-se nas bicamadas e as hidrofóbicas solubilizam-se no seu interior. Macromoléculas complexas e proteínas arranjam-se na bicamada ou podem ser adsorvidas na superfície das vesículas (adaptado de Lasic, 1993).

3.1.1. FASES DAS BICAMADAS LIPÍDICAS

Moléculas anfífilas, quando agregadas na forma de bicamada, podem ser arranjadas em estado gel (ou sólido) ou de cristal líquido. Quando na fase gel, as moléculas parecem se alinhar com a ponte de glicerol perpendicular ao plano da membrana e a cabeça polar paralela à sua superfície, como mostrado na Figura 3. Supõe-se que esta conformação reduza a distância entre cargas negativas e positivas na molécula de fosfolípido.

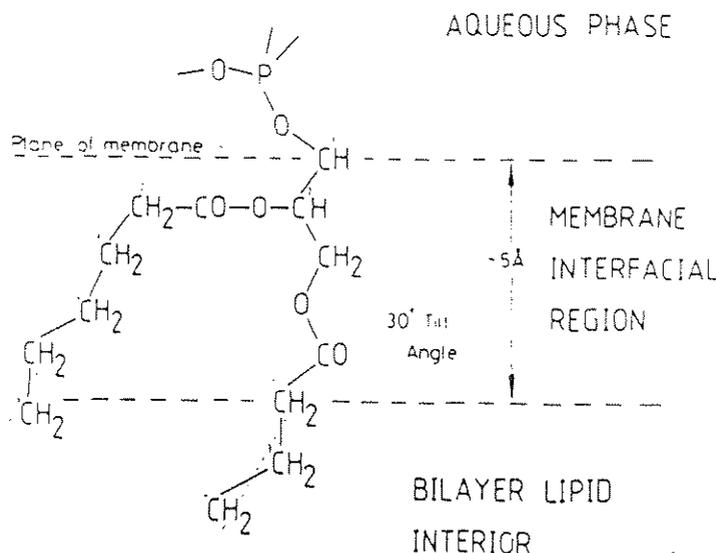


Figura 3: Conformação esquemática da fosfatidilcolina na região da ponte de glicerol na fase gel, configuração *trans* (New, 1990).

Conforme a temperatura aumenta, as cadeias de hidrocarboneto tendem a adquirir uma conformação diferente da configuração *trans*, e adotam a conformação *gauche* mostrada na Figura 4. Nessas condições ocorre o aumento da área ocupada pelas cadeias, ao mesmo tempo em que há diminuição da espessura da bicamada com a transição da fase gel para cristal líquido. Em alguns tipos de fosfolípidios, a transição de fases ocorre em duas etapas - uma pré-transição e a transição principal (Figura 5).

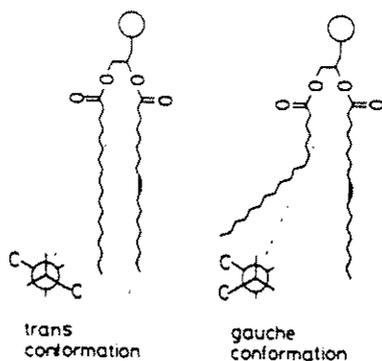


Figura 4: Configurações das cadeias de hidrocarboneto em uma molécula de fosfolipídio (New, 1990).

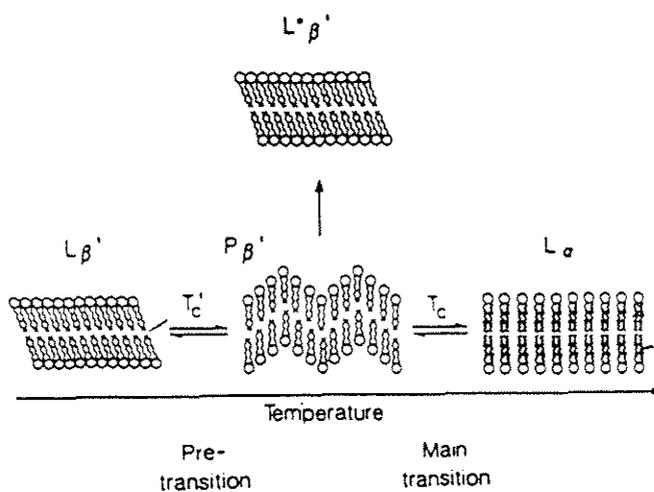


Figura 5: Representação esquemática das transições de fase da membrana lipídica. A T_c' o subgel ordenado se transforma em gel (a denominada pré-transição) e à T_c as cadeias de hidrocarboneto se tornam mais fluidas e a membrana passa para a fase de cristal líquido (Lasic, 1993).

Na fase gel, as caudas de hidrocarboneto exibem um bom empacotamento e não possuem grande mobilidade, e na fase cristalina (ou fluida) as cadeias se apresentam mais desordenadas e têm maior mobilidade. A temperatura de transição (T_c) é uma característica física importante das membranas, e em condições isobáricas, uma função da composição química, força iônica e pH e da presença de vários íons e moléculas no meio.

3.1.2. ESTRUTURA DOS AGREGADOS ANFIFÍLICOS

Segundo Lasic (1993), os lipossomas pertencem a uma classe especial de cristais líquidos. Estes materiais exibem simultaneamente, a certas temperaturas, algumas propriedades inerentes ao estado líquido (como a tendência à formação de gotas e baixa viscosidade) e outras ao estado sólido (como anisotropia de propriedades mecânicas, óticas, elétricas e magnéticas). Podem ser formados por um só componente ou por misturas de tensoativos e solventes. No caso de um só componente, as mudanças de fase ocorrem somente devido a mudanças de temperatura e os materiais são denominados *cristais líquidos termotrópicos*; no caso de misturas, a separação de fases também é função da concentração. Estes são denominados *cristais líquidos liotrópicos*.

O polimorfismo estrutural é muito rico nos sistemas liotrópicos. Normalmente, eles são compostos por moléculas anfifílicas em solventes polares como a água. Devido à grande variedade de geometrias das moléculas existentes e das suas propriedades de solubilidade, há a formação de muitas estruturas diferentes em meio aquoso. As fases dependem predominantemente da concentração de moléculas no meio, da forma molecular, temperatura, pH e força iônica. Além da variedade de estruturas, estes sistemas são conhecidos por exibirem a coexistência de fases diferentes, em certas composições.

Em soluções muito diluídas, podem existir monômeros e dímeros ou oligômeros de vida curta . A agregação só se inicia na denominada *concentração micelar crítica (CMC)*, que é a concentração na qual os primeiros agregados começam a aparecer. Na CMC, tensoativos com uma cadeia de hidrocarboneto se agregam na forma de micelas. Acima da CMC há equilíbrio entre agregados e monômeros, que estão sempre presentes em solução em concentrações iguais ou ligeiramente menores

que a CMC, caso outras moléculas anfifílicas estejam presentes no sistema. Com o aumento da concentração, as micelas também crescem em tamanho ou em número. Devido ao fato de uma de suas dimensões ser fixada pelo comprimento das cadeias de hidrocarboneto, as micelas podem crescer na forma de esfera ou disco. No caso de tensoativos, elas crescem em forma de esferas, que a concentrações mais altas empacotam-se em retículos hexagonais e formam a denominada *fase hexagonal (I)*. À concentrações ainda mais altas a *fase lamelar*, composta por camadas alternadas de lípidios e água, é a mais estável. Com o aumento da concentração de lípidio, a espessura da camada de água decresce e em concentrações muito baixas de água a *fase inversa* pode surgir e ser estável, formando micelas reversas ou em *fase hexagonal inversa (II)*. A Figura 6 ilustra as várias geometrias dos agregados anfifílicos em água:

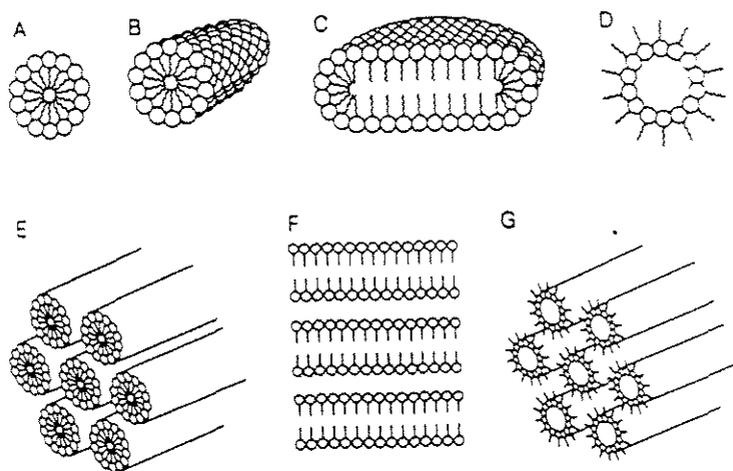


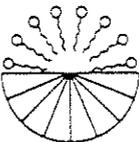
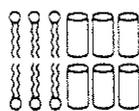
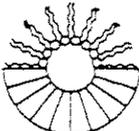
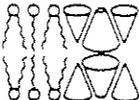
Figura 6: Geometria de agregados de moléculas anfifílicas em meio aquoso. A: micela esférica; B: micela cilíndrica; C: micela em forma de disco; D: micela inversa; E: fase hexagonal I - conjunto de cilindros infinitos; F: fase lamelar; G: fase hexagonal II ou reversa/inversa. As fases micelares A a D são isotrópicas (e na maioria dos casos muito viscosas); as fases E a G são cristais líquidos e anisotrópicos (Lasic, 1993).

Um parâmetro útil, apesar de grosseiro, para se predizer a forma de agregados é o parâmetro de empacotamento P . Ele considera que a forma do agregado se baseia somente nos parâmetros de empacotamento que refletem sua geometria, e é definido como:

$$P = v / (a.l)$$

onde v é o volume da molécula, a é a área da cabeça polar e l é o comprimento da cadeia de hidrocarboneto. Dependendo do valor de P , as moléculas se agregam em diferentes geometrias, conforme explicitado na Tabela 1:

Tabela I: Modelos de empacotamento geométricos de várias moléculas anfifílicas em agregados coloidais (Lasic, 1993).

Lipids	Shape	Organization	Phase
Soaps Detergents Lysophospholipids	 Inverted cone $P < 1/3 - 2/3$	 Micelles	Isotropic hexagonal I
Phosphatidyl- choline - serine - inositol Sphingomyelin Dicalyphosphate DODAC	 Cylinder $P \sim 1$	 Bilayer	Lamellar (Cubic)
Phosphatidyl- ethanolamine Phosphatidic acid Cholesterol Cardiolipin Lipid A	 $P > 1$		Reverse micelles hexagonal II
Mixtures Lysophosphatidyl- choline and Phosphatidyl- ethanolamine	 $P \sim 1$		Lamellar

3.2. FÍSICO-QUÍMICA DE FLUIDOS MAGNÉTICOS: PREPARAÇÃO E PROPRIEDADES

Berkovski e Bashtovoy (1996) definiram *colóides magnéticos* (ou *fluidos magnéticos*) como uma dispersão muito estável de partículas ultrafinas (de cerca de 10 nm de diâmetro) compostas por materiais ferro e ferrimagnéticos, que estão suspensas em líquidos como hidrocarbonetos, ésteres, etc. Estes fluidos se comportam como líquido ferromagnético, ou seja, movem-se como um todo na direção do campo magnético mais alto e retêm suas propriedades de líquido mesmo na presença de campos magnéticos intensos.

Devido à resistência à oxidação, as partículas mais usadas nas aplicações comerciais dos fluidos magnéticos são os óxidos de ferro (magnetita, bertolita e maghemita). Em dispersões não-aquosas, as partículas são geralmente recobertas por tensoativos, de modo a anular as forças de atração de Van der Waals, que poderiam levá-las à agregação. Estas partículas são pequenas o suficiente para permanecerem estáveis em suspensão através do movimento Browniano.

Os colóides magnéticos têm sido utilizados comercialmente há alguns anos em numerosas aplicações, como selos, semicondutores, ânodos de equipamentos de raio-X, produção de fibras óticas, fabricação de lâmpadas, caixas de som, entre outros.

3.2.1. COMPOSIÇÃO DOS COLÓIDES MAGNÉTICOS

Alguns dos materiais ferro e ferrimagnéticos tipicamente utilizados nos fluidos magnéticos são as ferritas (Fe_3O_4 (magnetita), $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita), $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Fe}_3\text{O}_4$ (bertolita)) Mg, Mn, Fe, Cu, Co, Ni, Ni, Gd, Fe (α), Co (α) e $\text{Ba}_{0.6}\text{Fe}_2\text{O}_3$. O material mais usado atualmente como base dos colóides magnéticos é o óxido de ferro (magnetita, maghemita ou bertolita, que é magnetita parcialmente oxidada), sendo que, na maioria dos casos, diz-se que o componente principal é a magnetita, embora seja sabido que sempre ocorre oxidação posterior. A transição da magnetita para $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ não conduz a

uma redução significativa da magnetização de saturação.

A grande vantagem na utilização de ferritas é que se tratam de óxidos e, desde que a temperatura de operação não seja excessivamente alta ($> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$), elas permanecem fortemente magnéticas durante o tempo de vida útil do equipamento no qual estarão sendo usadas. Entretanto, a grande desvantagem é a sua relativamente baixa magnetização de saturação.

3.2.1.1 Ferritas

Métodos de obtenção

As ferritas podem ser preparadas, basicamente, por dois métodos: moagem úmida e precipitação química. O primeiro é um método lento, e que consiste na moagem de pequenas partículas de ferrita na presença de um tensoativo adequado e de um líquido carreador.

No entanto, a moagem não é um método eficiente. Por este motivo, utiliza-se a precipitação química como método alternativo de preparação de ferritas. Esta metodologia envolve a precipitação de íons férrico, ferroso e outros íons, dependendo da composição da ferrita requerida, na presença de excesso de base. O método não tem somente a vantagem de possibilitar a variação na composição, através da incorporação de diferentes íons metálicos, mas também outras duas vantagens importantes: a primeira delas é que através do uso de diferentes bases pode-se controlar o tamanho médio da partícula formada (de 4 a 10 nm), e a segunda vantagem é uma distribuição de tamanho de partícula mais uniforme.

Para se produzir partículas de magnetita (Fe_3O_4), a razão $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ deveria ser, teoricamente, igual a 2. Estudos feitos por Rheimers e Khalafalla (1976), entretanto, mostraram que para se obter partículas com a máxima magnetização de saturação, a razão entre os sais de ferro deve ser aproximadamente 1.75. Isto se deve à alta susceptibilidade à oxidação do Fe^{2+} na presença do ar em meio aquoso, resultando na formação de bertolita. Em outras preparações, como a descrita por Cabuil (1987), as partículas de magnetita são deliberadamente oxidadas através de ebulição em presença de

nitrato férrico e deste modo totalmente convertidas em maghemita.

Estabilidade química

Óxidos são substâncias inertes na presença de oxigênio produz partículas com tamanho heterogêneo. Entretanto, a magnetita é um óxido diferente, pois pode ser ainda oxidado a maghemita (Fe_2O_3). A velocidade de oxidação depende do método pelo qual as partículas foram obtidas: no caso da moagem úmida, a oxidação é mais lenta e no caso da coprecipitação, ela ocorre rapidamente, sendo que 1 hora após a precipitação, cerca de 40% do ferro ferroso é convertido a férrico.

A instabilidade dos óxidos de ferrita também pode ocorrer especialmente em meios ácidos. Como exemplo, pode-se citar o caso de magnetita coloidal obtida através da adição de base em solução aquosa de sais férricos e ferrosos, de acordo com a reação esquemática:



A adição de íons H^+ à magnetita estável em meio básico, conduz à reversão da reação e a volta à solução inicial. A taxa de dissociação do óxido depende da acidez da solução, tamanho de partícula e idade do material. Alguns tratamentos de superfície são usados por proporcionarem a estabilização das partículas através da formação de uma camada de proteção.

3.2.2. DISPERSÃO DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM MEIO LÍQUIDO

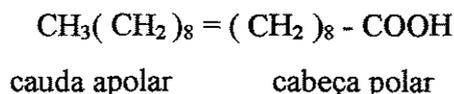
Os solventes orgânicos são os carreadores de partículas mais utilizados em aplicações comerciais de fluidos magnéticos, sendo as partículas magnéticas normalmente estabilizadas com tensoativos. O requerimento usual é que os solventes sejam inertes quimicamente e estáveis em uma larga faixa de temperaturas. Além disso, de acordo com a finalidade do fluido, outras propriedades podem ser especificadas como ótimas (viscosidade, capacidade calorífica, entre outras). Por outro lado, a água

é o solvente mais utilizado em aplicações biomédicas e, neste caso, condições específicas podem ser desejadas (por exemplo, pH, força iônica , etc.) (Berkovski e Bashtovoy, 1996).

3.2.2.1. Compatibilidade das partículas com o solvente

O ferromagnetismo é um fenômeno cooperativo entre átomos contendo momentos magnéticos. Isto depende da estrutura cristalina das partículas. Estas partículas magnéticas são sólidas e não têm afinidade por líquidos, por isso agentes dispersantes devem ser utilizados na formulação sólido-líquido (Berkovski e Bashtovoy, 1996).

Meios apolares: em meios não-polares, os agentes dispersantes mais comumente utilizados são os tensoativos. Estas substâncias são compostas por uma “cabeça” polar (hidrofílica) e uma “cauda” apolar (hidrofóbica). Um tensoativo típico é o ácido oleico:



O tensoativo é adsorvido na superfície da partícula através da sua cabeça polar, tornando as partículas lipofílicas. Na Figura 8 são apresentados exemplos de interações entre tensoativos e fluido magnético, as quais produzem a sua estabilização em ambientes orgânicos.

Além disso, a camada adsorvida aumenta a estabilidade coloidal através do impedimento estérico, que previne a floculação devido à aglomeração das partículas. Esta aglomeração pode ser induzida por forças de Van der Waals e interações dipolo-dipolo.

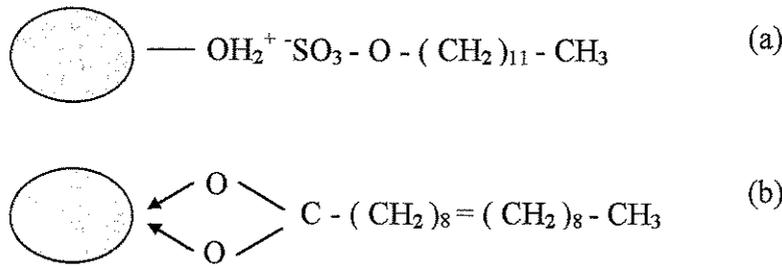


Figura 7: Partículas de fluido magnético em ciclo-hexano. Exemplos de recobrimento da superfície com tensoativos: (a) via interação eletrostática (dodecil sulfato de sódio); (b) complexação superficial (ácido oleico) [adaptado de Berkovski e Bashtovoy (1996)].

Meios polares: em um meio polar (água é o exemplo típico), a superfície da partícula deve estar carregada ou ser hidrofílica. São usados dois métodos principais:

- *Bicamada hidrofílica de tensoativos:* uma vez que a superfície sólida se torna hidrofóbica devido à adsorção de uma primeira camada de tensoativos, é possível fazer com que a adsorção continue. Quando este fenômeno ocorre, a polaridade da superfície geralmente se inverte. Um esquema destes tipos de recobrimentos são apresentados nas Figuras 8 e 9. Nestes processos, ocorrem dois tipos de repulsão: estérica devido à camada de tensoativo e repulsão eletrostática devido ao grupo carregado orientado em direção ao meio aquoso. Além disso, a estabilidade destes líquidos magnéticos aquosos dependem de outros parâmetros, tais como pH e força iônica.

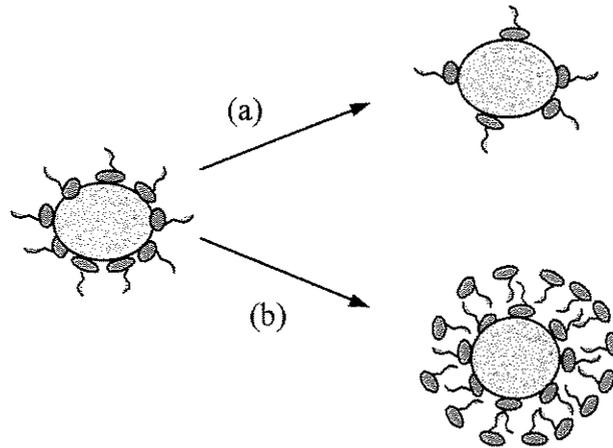


Figura 8: Influência da concentração de tensoativo livre: (a) dessorção do tensoativo por diminuição da sua concentração livre em solução; (b) formação de uma bicamada hidrofílica devido ao aumento concentração de tensoativo livre em solução [adaptado de Berkovski e Bashtovoy (1996)].

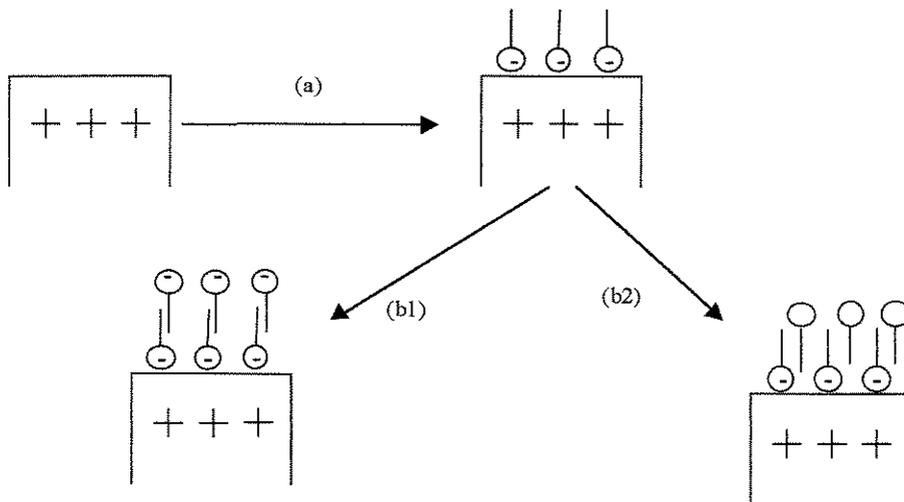


Figura 9: Formação da bicamada hidrofílica: (a) monocamada hidrofóbica de tensoativo aniônico (em superfície positivamente carregada); (b) bicamada hidrofílica; (b1) negativamente carregada pela adição de um segundo tensoativo aniônico; (b2) neutra pela adição de tensoativo não-iônico [adaptado de Berkovski e Bashtovoy (1996)].

- *Cargas superficiais como íons adsorvidos*: especialmente no caso de óxidos, as cargas superficiais são geradas por pequenos íons quimicamente ligados à superfície. Existem, segundo Berkovski e Bashotovoy (1996), dois tipos principais de íons: (a) íons de superfície,

que são produzidos a partir de grupos superficiais através de reações ácido-base; (b) íons de adsorção específica, que são agentes complexantes de átomos da superfície.

3.2.3. ESTABILIDADE COLOIDAL DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS

Um dos problemas cruciais no uso industrial de fluidos magnéticos é a sua estabilidade coloidal. Vários estudos indicam falhas de estabilidade em líquidos magnéticos, levando à separação de fases em dois líquidos contendo diferentes concentrações de partículas. Na presença de um campo magnético externo, alguns padrões microscópicos neste meio bifásico são freqüentemente observados. De modo geral, a separação de fases traz complicações, pois industrialmente é interessante que os produtos que as contenham sejam estáveis com o tempo e em uma determinada faixa de temperatura.

Para contrabalançar as forças de Van der Waals e interações dipolo-dipolo, a estabilidade coloidal de líquidos magnéticos requer uma repulsão adicional entre as partículas. Basicamente, isto pode ser feito de duas maneiras:

- Impedimento estérico, através do recobrimento das partículas com cadeias de tensoativos;
- Repulsão eletrostática, transformando as partículas magnéticas em “macroíons”, todos com o mesmo sinal.

De qualquer modo, qualquer que seja a natureza das repulsões interpartícula, a separação de fases não pode ser totalmente evitada. Muitos fatores induzem a separação de fases e entre eles pode-se citar:

- Abaixamento da temperatura;
- Variações na concentração de tensoativos, para partículas estericamente estabilizadas;
- Aumento da força iônica, para partículas eletrostaticamente estabilizadas.

Estes fenômenos são difíceis de serem identificados separadamente, mas podem, em muitos casos, levar a observações experimentais interessantes, como aumento da viscosidade, propagação de ondas

sonoras no meio ou alterações nos padrões de espalhamento da luz, feitas por microscopia e espectroscopia (Berkovski e Bashtovoy, 1996).

3.2.4. SISTEMAS MAGNÉTICOS COMPLEXOS DERIVADOS DOS FLUIDOS MAGNÉTICOS

Os fluidos magnéticos possuem muitas aplicações diretas, e também são usados para produzir outros sistemas magnéticos, como sistemas poliméricos (filmes magnéticos, microesferas ou géis), sistemas multifásicos, compósitos, substâncias especiais para marcar e selecionar células e agentes contrastantes para RMN (Ressonância Magnética Nuclear).

3.2.4.1. Sistemas magnéticos multifásicos

Um fluido magnético estável é monofásico e pode ser usado como uma das fases de um sistema multifásico. Por exemplo, se considerarmos o sistema ciclohexano-água-SDS-pentanol, e substituímos o ciclohexano por um fluido magnético, obter-se-ia uma microemulsão magnética, fases lamelares ou hexagonais. Outros exemplos são as vesículas magnéticas, emulsões e cápsulas.

Fases lamelares magnéticas: são definidas como um empacotamento de camadas alternadas de água e óleo. Tais fases são observadas, por exemplo, em um sistema composto por ciclohexano, água, SDS como tensoativo e 1-pentanol como co-tensoativo. A interface entre a camada de ciclohexano e água é composta tanto por moléculas de SDS quanto por de 1-pentanol. Quando ciclohexano é substituído por um fluido magnético tendo ciclohexano como carreador, tal estrutura lamelar se conserva e as partículas magnéticas são confinadas na camada de ciclohexano, desde que esta seja grande o suficiente.

As lamelas magnéticas provam que é possível introduzir uma quantidade significativa de partículas sólidas em fases líquidas ordenadas sem desordená-las. Estudos sobre estes sistemas têm sido

feitos através da introdução de pequenas quantidades de partículas magnéticas em fases nemáticas.

Emulsões magnéticas e cápsulas: Denomina-se deste modo estruturas formadas pelo encapsulamento de fluidos magnéticos em cápsulas poliméricas (com tamanhos da ordem de micrômetros).

Vesículas magnéticas: Partículas magnéticas podem ser incorporadas em agregados vesiculares de moléculas anfifílicas. Cuyper e Joniau (1988) prepararam vesículas magnéticas através da incubação de um fluido magnético aquoso (partículas de magnetita recobertas com ácido láurico) na presença de vesículas de fosfolipídios. O ácido láurico foi deslocado pelos fosfolipídios (DMPG - dimiristoilfosfatidilglicerol), que se arranjaram em torno do núcleo de ferro em configuração de bicamada, originando os *magnetolipossomas*. As potencialidades das aplicações destas vesículas magnéticas têm sido estudadas para liberação controlada de medicamentos (Ishii, 1990), imobilização de enzimas (Cuyper e Joniau, 1996), separação de células (Margolis et al., 1983) e estudos sobre a transferência aquosa de fosfolipídios (Cuyper e Joniau, 1990b) e como adsorventes de afinidade (Martins, 1998)

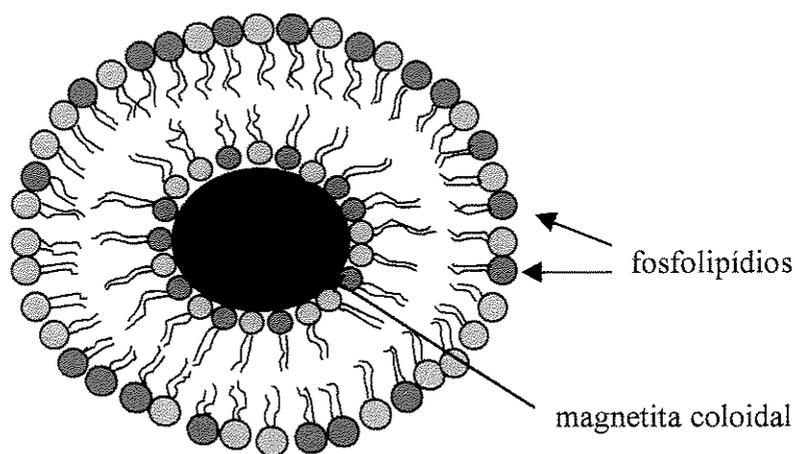


Figura 10: Esquema de um magnetolipossoma, mostrando o encapsulamento do fluido magnético no núcleo aquoso da vesícula, recoberto por uma bicamada de fosfolipídios.

3.2.5. MAGNETOLIPOSSOMAS

Segundo Cuyper e Joniau (1988), contribuições importantes têm sido dadas ao conhecimento da estrutura e dinâmica de membranas biológicas através da observação do comportamento de membranas fosfolipídicas artificiais em campos gravitacionais, gradientes de velocidade hidrodinâmica e campos elétricos e magnéticos. No entanto, contrariamente às forças operantes na eletroforese e centrifugação, as forças magnéticas não têm sido muito exploradas em processos de separação. A razão para isso é que os fosfolipídios demonstram fracas propriedades diamagnéticas, que poderiam, em primeira análise, expulsá-los das zonas de campo magnético. Entretanto, mesmo em agregados de fosfolipídios, nos quais a anisotropia é maior, o efeito do campo magnético se limita à alongação das vesículas esféricas em elipsóides. Estudos revelaram também que os fosfolipídios tendem a orientar suas cadeias perpendicularmente ao vetor do campo e, portanto, o plano da bicamada se alinha paralelamente ao mesmo.

Como a atração ferromagnética excede as forças de repulsão magnética em muitas ordens de grandeza, uma alternativa para a remoção de vesículas lipídicas de uma suspensão usando-se forças magnéticas pode ser feita através da formação de complexos com partículas ferromagnéticas. Cuyper e Joniau (1988, 1990a, 1990b, 1991, 1993) usaram um fluido magnético composto por magnetita ultramicroscópica estabilizada (Fe_3O_4), e o incubaram com lipossomas sonificados. Verificou-se que durante a incubação os fosfolipídios se arranjaram em torno do núcleo de ferro em configuração de bicamada, produzindo os então denominados *magnetolipossomas*.

A magnetita coloidal utilizada por Cuyper e Joniau (1988) possuía partículas com diâmetros da ordem de 14 nm, sendo o colóide estabilizado com ácido láurico. Os autores observaram que estas partículas não eram capturadas mesmo na presença de campos magnéticos altos ($> 2 T$). A presença de um filtro magnético, entretanto, permitiu uma retenção eficiente (98 - 99%).

3.2.5.1. Adsorção dos fosfolipídios na superfície das partículas de magnetita

A adsorção de fosfolipídios em Fe_3O_4 foi estudada através da construção de curvas cinéticas e de isotermas de adsorção (Cuyper e Joniau (1988, 1991) e Martins (1998)). No caso do estudo cinético, verificou-se que os pontos iniciais das curvas cinéticas obtidas poderiam ser ajustados por uma reta, de acordo com uma cinética de pseudo-primeira ordem, de modo a ser possível obter os tempos de meia saturação ($t_{1/2}$) e, assim, caracterizar o processo de adsorção em relação ao tempo.

As isotermas de adsorção expressam a quantidade de fosfolipídio adsorvido por grama de Fe_3O_4 como função da concentração de equilíbrio de fosfolipídio livre (isto é, a quantidade de fosfolipídio que permanece livre em solução depois da adsorção ter alcançado o estado estacionário). De acordo com os estudos feitos com fosfolipídios diacil (difosfatidilglicerol), as isotermas de adsorção obedecem à equação de Langmuir, considerando-se adsorção não-dissociativa (Cuyper e Joniau (1988, 1991)). Martins (1998) estudou a adsorção de dois componentes, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina de mesmo comprimento de cadeia, na superfície da magnetita e verificou a ausência de competitividade significativa entre esses componentes. Nessas condições, a equação de Langmuir foi usada em termos de lipídios totais:

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

onde Γ_L é o número de mols de lipídio adsorvido / grama de Fe_3O_4 na zona de Langmuir; Γ_L^0 é o valor de saturação; c é a concentração de fosfolipídios de equilíbrio e K_L é a constante de associação. Estudos posteriores feitos por Van der Meeren (1989) a respeito da adsorção de fosfolipídios (colina) na superfície de goetita coloidal (outro tipo de óxido de ferro) também demonstraram que o fenômeno poderia ser descrito por isotermas de Langmuir (neste caso, Langmuir para dois componentes).

Cuyper e Joniau (1991) realizaram estudos com o objetivo de esclarecer o mecanismo através do qual os fosfolipídios adsorvem na superfície das partículas coloidais de magnetita, originalmente estabilizadas com ácido láurico. Quatro hipóteses foram inicialmente consideradas:

- 1) adesão das vesículas inteiras na superfície da magnetita;
- 2) adsorção das vesículas inteiras seguida de um “espalhamento” dos componentes vesiculares na superfície;
- 3) transferência espontânea das moléculas de fosfolipídio através do meio aquoso;
- 4) formação de um intermediário resultante de colisão, em que haja percolação de moléculas individuais de fosfolipídio.

De acordo com os resultados experimentais obtidos, os mecanismos 1 e 2 foram descartados, porque num meio contendo vesículas mistas (formadas por DSPG e DMPG, no caso), a proporção entre os diferentes fosfolipídios na bicamada dos magnetolipossomas deveria ser a mesma da bicamada dos lipossomas originais, o que não ocorreu.

Por outro lado, a hipótese 3 implica que a velocidade de migração dos fosfolipídios no meio aquoso é função do tamanho das caudas hidrofóbicas das moléculas. Esse fato, foi observado experimentalmente, pois houve um decréscimo de 10 vezes na taxa de adsorção conforme se adicionou um grupo $-CH_2$ às caudas apolares. Além disso, a taxa de transferência de acordo com este modelo deveria ser regulada também pela taxa de dessorção dos fosfolipídios das vesículas doadoras. A influência de ambos os aspectos foi amplamente estudada em trabalhos referentes à transferência em solução aquosa de fosfolipídios entre biomembranas (Nichols e Pagano, 1981, 1982; Nichols, 1985; Cuyper et al., 1984; Cuyper e Joniau, 1985; Gardam et al., 1989), e corroboram os resultados obtidos no caso dos estudos de caracterização da formação de magnetolipossomas.

O mecanismo 4 foi descartado, pois uma vez que a taxa de colisão não foi fator determinante na adsorção, ou seja, aumentando-se a concentração de vesículas, a taxa de adsorção deveria sofrer alteração.

Os autores também concluíram que uma característica inerente ao modelo da transferência aquosa é que a taxa de adsorção, em relação à concentração de fosfolipídios, é de primeira ordem. De fato, isto ocorre a baixas concentrações de fosfolipídio, durante quase todo o processo que

se desenvolve em condições de formação de monocamada. A concentrações mais altas, o comportamento de primeira ordem se estabelece no início do perfil cinético e na isoterma de adsorção no entanto, desviando-se da linearidade com o tempo. Uma explicação possível para tal comportamento é a possibilidade de ocorrência de fluxo reverso de fosfolipídios, cuja contribuição aumenta com o tempo.

A hipótese de Cuyper e Joniau (1991) considera que a monocamada interna começa a ser formada porque as moléculas de fosfolipídio conseguem ser quimicamente adsorvidas de forma mais eficiente que as moléculas de ácido láurico originalmente presentes na superfície das partículas de magnetita coloidal, favorecendo o seu deslocamento. Este comportamento de alta afinidade pode ser comprovado pelas isotermas de adsorção e também pela dificuldade de extração dos fosfolipídios da monocamada interna através da ação de detergentes. Com respeito à monocamada externa, a sua formação deve-se a atrações de Van der Waals e hidrofóbicas entre as caudas de hidrocarboneto dos fosfolipídios quimissorvidos no núcleo de ferro e os fosfolipídios em solução. Em concordância com o modelo da transferência em solução aquosa, é importante notar que a *taxa* na qual as moléculas da camada externa são adsorvidas, controlada pela sua capacidade de liberação dos lipídios das vesículas doadoras , é inversamente relacionada com a *constante de associação*.

3.3. APLICAÇÕES DE FLUIDOS MAGNÉTICOS EM ESTUDOS BIOLÓGICOS E BIOMÉDICOS

Tanto livres como na forma de partículas, os fluidos magnéticos têm sido empregados em estudos na área biológica e biomédica, principalmente na década de 90, especialmente em trabalhos relacionados com os seguintes aspectos:

- melhoramento de imagens de diagnóstico (Roath, 1993);
- separação e purificação de biomoléculas (Pyle, 1994);
- direcionamento e liberação controlada de drogas (Kiwada et al., 1986; Ishii et al., 1990; Ruuge e Rusetski, 1993);
- imobilização de proteínas (Leemputem e Horisberger, 1974; Leão et al., 1991; Cuyper e Joniau, 1990a, 1993, 1996; Martins, 1998);
- separação de células (Margolis et al., 1983; Plavins e Lauva, 1993);
- processos de hipertermia (Shinkai et al., 1994, 1996; Masuko et al., 1995; Viroonchatapan et al., 1996; Mitsumori et al., 1996; Yanase et al., 1997);
- transferência aquosa de fosfolípidios entre biomembranas (Cuyper e Joniau, 1990b);
- identificação de organismos, células ou material genético (Vladirmisky et al., 1993; Ndhlovu et al., 1995; Lim et al., 1998; Schoepf et al., 1998).

Nos itens subseqüentes, serão descritos somente os trabalhos encontrados na literatura utilizando sistemas magnéticos vesiculares, enfoque do presente trabalho de pesquisa.

3.3.1. SUPORTE, DIRECIONAMENTO E LIBERAÇÃO CONTROLADA DE MEDICAMENTOS

Os lipossomas têm sido muito utilizados como veículos de encapsulamento, direcionamento e liberação controlada de drogas, devido ao fato de terem composição semelhante à das membranas celulares, serem biodegradáveis, não-tóxicos e relativamente não-imunogênicos.

No entanto, quando injetados em animais por via intravenosa, têm como direcionamento preferencial órgãos como o fígado e o baço, importantes no sistema imunológico. Para que se dirijam a outras partes do corpo, torna-se necessário modificar sua superfície ou adicionar alguma substância que permita direcioná-los através de artifícios externos, como um campo magnético, por exemplo.

Kiwada et al. (1986) prepararam magnetita ultrafina e a encapsularam em lipossomas de fosfatidilcolina, para estudar a influência do campo magnético no direcionamento das vesículas. Nos experimentos *in vitro*, cerca de 35% dos magnetolipossomas injetados permaneceram na região afetada pelo campo magnético. Já nos experimentos *in vivo*, feitos com ratos portadores de sarcoma de Yoshida, os resultados foram inferiores aos obtidos *in vitro* para a mesma intensidade de campo magnético aplicado. Os autores concluíram que aumentando-se a intensidade do campo magnético os resultados poderiam ser mais satisfatórios.

Ishii et al. (1990) prepararam magnetolipossomas encapsulando o agente anticâncer 5-fluororacil (5FU) e estudaram o sistema quanto à sua viscosidade e capacidade de retenção em sítios específicos no organismo de animais, conseguindo direcioná-los através da aplicação de campo magnético externo, inofensivo a sistemas biológicos. Os ensaios *in vitro* demonstraram que a quantidade de 5FU liberada aumentou com o tempo no sítio submetido ao campo, enquanto que a quantidade de 5FU liberada de lipossomas convencionais permaneceu inalterada. Esses magnetolipossomas foram injetados por via subcutânea na orelha de coelhos, submetidos a campos magnéticos de 4000 gauss. Mais de 80% dos magnetolipossomas foram retidos no local e 75% da liberação do medicamento foi verificada durante a primeira hora.

3.3.2. CLASSIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DE CÉLULAS E BIOMOLÉCULAS

A seleção de células é um procedimento largamente utilizado para separar células que possuem determinados antígenos em sua superfície. Através da modificação de sua superfície com anticorpos, as partículas magnéticas podem ser usadas para melhorar este processo (Berkovski e Bashtovoy, 1996). A associação antígeno-anticorpo induz ao acoplamento das partículas magnéticas com as células marcadas, as quais podem ser separadas das não-marcadas através da aplicação de um campo magnético externo. O mesmo princípio pode ser utilizado para síntese de suportes de drogas.

Neste contexto, Margolis et al. (1983) construíram lipossomas suportando anticorpos anti-fibronectina e os associaram a partículas magnéticas acopladas a fibroblastos de embrião de rato, conseguindo, assim, classificar e separar estas células através da aplicação de um campo magnético externo.

Martins (1998) imobilizou PAB (p-aminobenzamida) na superfície de magnetolipossomas sintetizados com DMPE (dimiristoilfosfatidiletanolamina) e DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina), e usou essas vesículas magnéticas para a separação de tripsina. Os resultados experimentais mostraram a potencialidade das aplicações dos magnetolipossomas em processos de adsorção por afinidade.

3.3.3. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS E PROTEÍNAS

O uso de enzimas imobilizadas em suportes convencionais está geralmente restrito a enzimas solúveis em meio aquoso. Magnetolipossomas têm a capacidade de encapsular enzimas lipofílicas ou enzimas de membrana, com a vantagem adicional de que essas enzimas podem ser facilmente separadas de outros tipos de material insolúvel usando-se dispositivos magnéticos (Leemputtem e Horisberger, 1974).

Cuyper e Joniau (1990, 1993, 1996) incorporaram citocromo-c oxidase em magnetolipossomas formados por DMPC e DMPC/DMPG, e observaram que tanto a atividade quanto a estabilidade catalítica da enzima melhoraram, em testes realizados em mini-reatores de leito fixo.

3.3.4. PROCESSOS DE HIPERTERMIA

Atualmente, muitos estudos sobre o tratamento de alguns tipos de câncer utilizando-se hipertemia têm sido feitos. A hipertemia baseia-se no princípio de que as células tumorais são mais sensíveis do que as células normais a temperaturas na faixa de 42 a 45°C. Comparativamente às terapias convencionais, a hipertermia produz poucos efeitos colaterais.

Masuko et al. (1995) estudaram a possibilidade de lipossomas com dextrana-magnetita incorporada (denominados magnetolipossomas termosensíveis, ou MT) serem usados como agentes hipertérmicos. Os autores conseguiram demonstrar a viabilidade do sistema, pois conseguiu-se aquecer suspensões de MT e tumores cancerígenos até cerca de 42° C, através da aplicação de campos magnéticos externos.

Viroonchatapan et al. (1996) incorporaram dextrana-magnetita em lipossomas, os quais foram também denominados magnetolipossomas termosensíveis (MT). O objetivo do estudo era determinar se estes lipossomas poderiam ser direcionados ao fígado de ratos com o auxílio de um campo magnético extracorpóreo. Foi constatado (através de fluorescência) que na presença do campo magnético a retenção dos MT no fígado foi de cerca de 73 - 80% e, na ausência, de 26 a 45%. Os resultados sugeriram que os MT poderiam ser usados em tratamentos de câncer por hipertermia, combinada com a liberação controlada de medicamentos.

Mitsumori et al. (1996) estudaram a hipertermia em células tumorais do fígado de coelhos. Desenvolveu-se uma emulsão contendo dextrana-magnetita, que foi injetada no fígado dos animais, que por sua vez sofreram a ação de campo magnético. Observou-se o acúmulo de dextrana-magnetita na

região hipervascular do tumor, geralmente difícil de ser aquecida por meios externos. Entretanto, observou-se, também, o acúmulo de dextrana-magnetita em parte do tecido normal.

Shinkai et al. (1996) estudaram a hipertermia intracelular, que afeta os tecidos adjacentes num grau menor que a hipertermia convencional. Foram desenvolvidos magnetolipossomas catiônicos, com a habilidade de atingir e aquecer as células cancerosas intracelularmente. Foram usadas células de glioma de ratos, e os resultados mostraram que os magnetolipossomas podem aquecer um volume de cerca de 80 μ L a temperaturas acima de 42°C, sendo que as células cancerosas morreram após 40 minutos de aplicação de um campo magnético externo de alta frequência (118 kHz, 384 Oe).

Yanase et al. (1997) continuaram o estudo anterior, testando o sistema desenvolvido em ratos, ao nível *ex vivo* (tumores implantados sob a pele). Os ratos tiveram os tumores eliminados por hipertermia após 3 aplicações de 60 minutos cada, a intervalos de 12 horas.

3.3.5. ESTUDOS SOBRE A TRANSFERÊNCIA DE FOSFOLIPÍDIOS ENTRE MEMBRANAS

Cuyper e Joniau (1990b) sintetizaram magnetolipossomas contendo DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol) e DSPG (distearoilfosfatidilglicerol) objetivando utilizar o processo de diálise para estudar a transferência em solução aquosa espontânea destes fosfolipídios entre biomembranas, e demonstrar a sua potencialidade como modelo biomimético.

3.4. CONCEITOS BÁSICOS SOBRE ANTÍGENOS E ANTICORPOS

Neste capítulo são referenciados algumas definições e alguns conceitos básicos sobre antígenos e anticorpos, necessários para o desenvolvimento do presente estudo.

3.4.1. ANTÍGENOS

Segundo Klein (1990), designa-se como *antígeno* qualquer estrutura (solúvel, celular ou particulada) que possua as seguintes propriedades:

- **Imunogenicidade:** capacidade de induzir uma resposta imune específica.
- **Antigenicidade:** capacidade de interagir com os anticorpos ou linfócitos T sensibilizados.

Todas as substâncias imunogênicas são antigênicas, embora a recíproca não seja necessariamente verdadeira (Ex.: haptenos, que interagem com os anticorpos existentes na corrente sangüínea, mas não produzem resposta imune específica).

3.4.2. CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

A atividade imune depende da existência de células linfóides sensíveis ao antígeno, que provêm de células indiferenciadas produzidas na medula óssea, e que são denominadas *linfócitos*. Em um conceito geral, podemos classificá-los nos tipos T e B. A diferença entre eles é o modo de reconhecimento antigênico. Os linfócitos T são geralmente as primeiras células a entrar em contato com os agentes estranhos, reconhecendo-o, fenômeno que depende da presença de estruturas protéicas presentes na membrana celular. Por sua vez, o reconhecimento antigênico realizado pelos linfócitos B depende exclusivamente da presença de glicoproteínas específicas localizadas na superfície celular, denominadas *imunoglobulinas*. Além disso, segundo Klein (1990), dependem de um sinal das células T ativadas para, por sua vez, serem ativadas, mesmo depois de terem se ligado ao antígeno.

3.4.3. ANTICORPOS

Os anticorpos são produtos antígeno-específicos das células B, e a produção de anticorpos na resposta contra a infecção é a principal contribuição dos linfócitos B para a imunidade adaptativa. Coletivamente, os anticorpos formam uma família de proteínas plasmáticas, denominadas *imunoglobulinas*.

Todos os anticorpos são constituídos da mesma maneira, a partir de quatro cadeias polipeptídicas, sendo usado o termo genérico *imunoglobulina* (Ig) para designá-los. São moléculas protéicas grandes, com peso molecular aproximadamente igual a 150 kDa. Quando tratados com agentes capazes de clivar as ligações de enxofre, permitem a distinção de duas subunidades: uma delas é uma cadeia peptídica de aproximadamente 50 kDa, é chamada de *cadeia pesada* ou *cadeia H*; a outra, de 25 kDa, recebe a designação de *cadeia leve* ou *cadeia L*. As duas cadeias estão presentes em razão equimolar, e cada molécula intacta de Ig contém duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, totalizando 150 kDa. As duas cadeias pesadas são unidas por pontes dissulfídicas, e cada cadeia pesada, por sua vez, é ligada a uma cadeia leve também por uma ligação dissulfeto. Em cada uma das moléculas de imunoglobulina as duas cadeias pesadas e as duas cadeias leves são idênticas, de modo que a molécula possui um eixo de simetria em dupla prega, conforme ilustrado pela Figura 11:

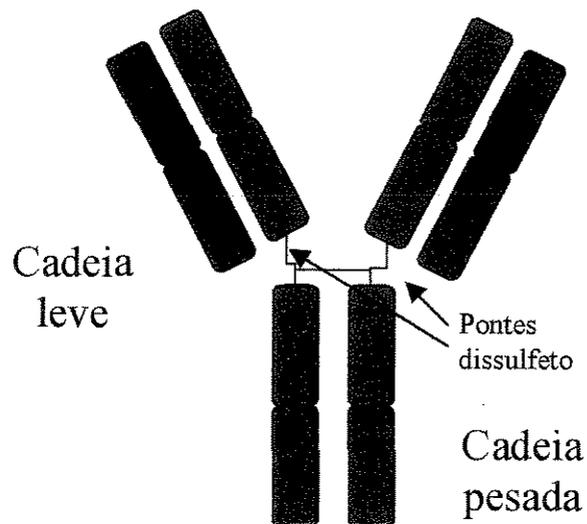


Figura 11: Esquema básico de uma imunoglobulina, mostrando a divisão em cadeias leves e pesadas [adaptado de Janeway e Travers (1997)].

A molécula de anticorpo possui duas funções distintas: ligar-se especificamente ao agente patogênico que provocou a resposta imune e induzir outras células e moléculas, de modo a destruir os patógenos (Janeway e Travers, 1997). Estas funções são estruturalmente separadas na molécula do anticorpo, uma parte da qual reconhece especificamente o antígeno, enquanto a outra engaja os mecanismos efetores que dele irão dispor. A região de ligação do antígeno varia amplamente entre as moléculas dos anticorpos, sendo conhecida como *região variável* ou *região V*. A variabilidade das moléculas de anticorpo permite que cada molécula reconheça um determinado antígeno. Por sua vez, a região molecular que participa das funções efetoras do sistema imunológico não varia do mesmo modo, sendo conhecida como a *região constante* ou *região C* (Janeway e Travers, 1997). Esta estrutura está ilustrada na Figura 12:

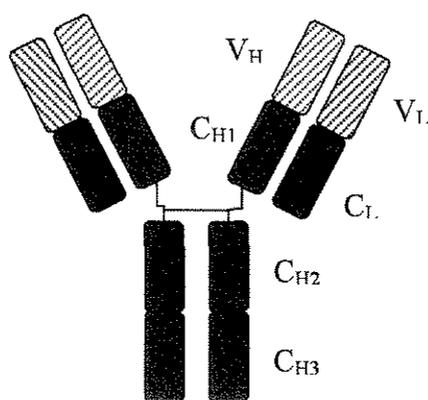


Figura 12: Esquema básico de uma imunoglobulina, mostrando a divisão em domínios constantes e variáveis (C = constante; V = variável; H = pesada; L = leve) [adaptado de Janeway e Travers (1997)].

A região constante apresenta, de fato, cinco formas principais, ou *isótipos*, que se especializam na ativação de diferentes mecanismos efetores imunes. Podem ser distingüidas, bioquímica e funcionalmente, cinco *classes* ou *isótipos* de anticorpos – *IgG* (mais abundante no plasma sanguíneo), *IgM*, *IgA*, *IgD* e *IgE* - enquanto diferenças mais sutis, confinadas à região variável, caracterizam a especificidade de ligação com o antígeno.

3.4.3.1. Aspectos básicos sobre a interação antígeno-anticorpo

As regiões moleculares do antígeno especificamente reconhecidas pelos anticorpos são chamadas *determinantes antigênicos* ou *epítomos*, provavelmente compostas por aminoácidos de diferentes partes da seqüência que foram aproximados pelo pregueamento protéico.

A interação entre um anticorpo e seu antígeno pode ser rompida por altas concentrações salinas, variações drásticas de pH e por detergentes. A ligação é, portanto, não-covalente. As forças envolvidas nas interações são resumidas na Tabela 2, sendo todas utilizadas pelos anticorpos, em maior ou menor extensão. Em geral, as forças não-covalentes na ligação antígeno-anticorpo envolvem interações eletrostáticas, seja entre cadeias laterais de aminoácidos carregados, pontes salinas, ou entre dipolos elétricos, como nas pontes de hidrogênio e nas forças de Van der Waals. Altas concentrações de sais e pH extremos enfraquecem as interações eletrostáticas, podendo romper a ligação antígeno-anticorpo.

Tabela 2: Forças não-covalentes que mantêm unidos os complexos antígeno-anticorpo. As cargas parciais encontradas nos dipolos elétricos são mostradas como δ^+ ou δ^- [adaptado de Janeway e Travers (1997)].

Tipo de força não-covalente	Origem	
Eletrostática	Atração entre cargas opostas	$-\text{NH}_3^+ \quad ^- \text{OOC}$
Ponte de hidrogênio	Hidrogênio compartilhado entre átomos eletronegativos (N, O)	$-\text{N} - \text{H} \cdots \text{O} = \text{C}$ $\delta^- \quad \delta^+ \quad \delta^-$
Van der Waals	Flutuações na densidade eletrônica em torno de moléculas polarizam de maneira oposta átomos vizinhos	$\delta^+ \leftrightarrow \delta^-$ $\delta^- \leftrightarrow \delta^+$
Hidrofóbica	Grupos hidrofóbicos interagem desfavoravelmente com a água e tendem a se agrupar para a exclusão de moléculas de água. Envolve também forças de Van der Waals.	

3.4.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE AUTOANTICORPOS

As *doenças autoimunes* ocorrem quando são produzidas respostas imunes adaptativas específicas contra as células ou tecidos dos próprios indivíduos após a quebra da imuno-homeostasia e os anticorpos produzidos neste tipo de patologia são denominados *autoanticorpos* (Roitt, 1996).

Os autoanticorpos podem ser classificados em duas categorias principais. A primeira, caracterizada pela reatividade com os constituintes nucleares ou citoplasmáticos, não demonstram especificidade por nenhum órgão ou tecido. Exemplos típicos desses autoanticorpos incluem os antinucleares (ANA), fator reumatóide (RF), anticorpos antineutrófilos citoplasmáticos (ANCA) e anticorpos antifosfolípidos (aPL). A segunda categoria demonstra especificidade por determinados tecidos, como os órgãos endócrinos, músculos, células gástricas e certos receptores presentes em superfícies celulares.

Deste modo, as patologias autoimunes são determinadas pelo antígeno ou grupo de antígenos específicos, alvos contra os quais é dirigida a resposta inflamatória autoimune. As doenças autoimunes podem ser vistas, portanto, na forma de um espectro, sendo que em um extremo estão localizadas as doenças órgão-específicas (por exemplo, Tireoidite de Hashimoto, mixedema primário) e no outro as doenças sistêmicas (ou órgão não-específicas, como escleroderma e o lupus eritematoso sistêmico) (Roitt, 1996).

3.4.5. ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES

Os anticorpos antifosfolípides (aPL) são encontrados no soro de pacientes portadores de determinadas doenças autoimunes, como o lupus eritematoso sistêmico (LES) e a síndrome antifosfolípide (SAF), bem como no soro de portadores de algumas doenças infecciosas (sífilis, por exemplo) e em pessoas idosas. O isótipo e a concentração dos aPL variam consideravelmente de acordo com o distúrbio analisado.

Devido ao fato de a cardiolipina ser o antígeno mais usado na detecção de aPL, os anticorpos reativos com fosfolípidios aniônicos têm recebido mais atenção do ponto de vista clínico. A maioria dos aPL anticardiolipina (aCL) reage com outros fosfolípidios aniônicos, mas alguns deles também podem reagir com fosfolípidios zwitteriônicos. Esta reatividade pode estar relacionada com o isótipo do anticorpo. Geralmente, anticorpos dirigidos contra fosfolípidios aniônicos são IgG ou IgM, enquanto para fosfolípidios zwitteriônicos são IgM, na sua maioria. Além disso, alguns tipos de aPL podem requerer um cofator (por exemplo, β_2 -glicoproteína I, ou β_2 GP I, e protrombina), o que geralmente ocorre quando são produzidos devido a doenças autoimunes e não devido a processos infecciosos. Alarcón-Segovia e Cabral (1992) apresentaram uma classificação dos vários tipos de aPL de acordo com sua reatividade, isótipo e requerimento de cofator, que é mostrada a seguir.

- Anticorpos contra fosfolípidios aniônicos reativos com cardiolipina: são os mais estudados, pois são mais comumente encontrados em pacientes portadores de LES, e podem ser IgG, IgM ou IgA, sendo que estes anticorpos freqüentemente reagem também outros fosfolípidios aniônicos.

A maior parte dos anticorpos IgG presente no plasma de pacientes com SAF e LES requer a presença de β_2 GP I para se ligar à cardiolipina, fato que não ocorre em pacientes sífilíticos. No entanto, não é sabido se a β_2 GP I é um cofator requerido para ligação da IgM à cardiolipina.

- Anticorpos contra fosfolipídios aniônicos com atividade lupus anticoagulante (LA): anticorpos para fosfolipídios aniônicos do tipo IgG e IgM também podem ser detectados por testes de coagulação, pois causam prolongamento do tempo parcial de protrombina ativada. Este fato indica a presença de um inibidor (lupus anticoagulante, ou LA, que Branch et al. (1987) definem como sendo um aPL identificado através prolongamento de testes de coagulação *in vitro* que utilizam fosfolipídios), sendo que alguns LA reagem com cardiolipina em testes ELISA. Algumas IgGs com atividade LA podem requerer protrombina como cofator, ao invés de β_2 GP I.

- Anticorpos contra fosfolipídios zwitteriônicos: os anticorpos que reagem com fosfolipídios zwitteriônicos são, basicamente, e em alguns casos exclusivamente, IgM, sendo encontrados em pacientes com anemia hemolítica autoimune. Em pacientes com sífilis, os aPL do tipo IgG também se ligam a fosfolipídios zwitteriônicos.

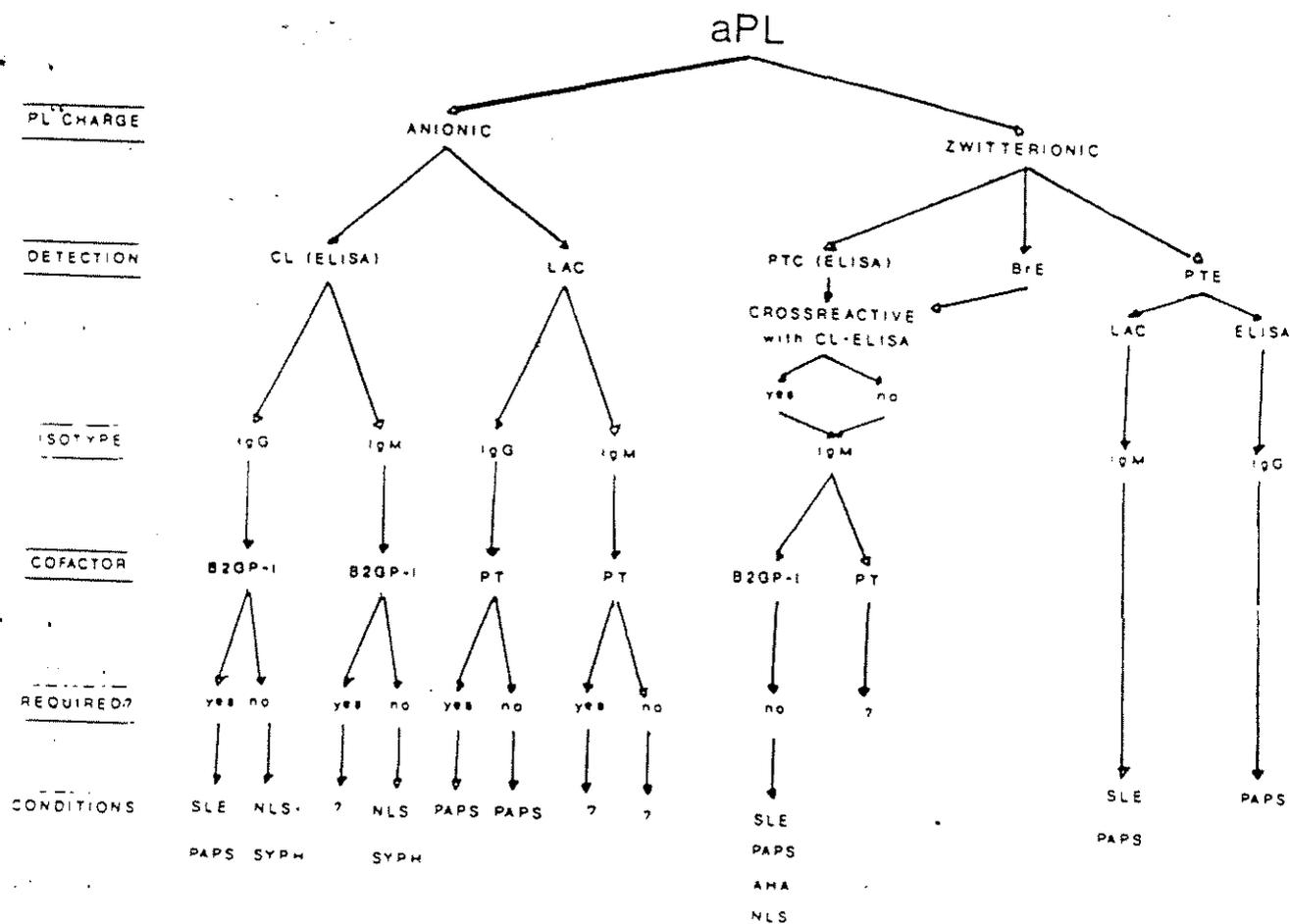


Figura 13: Classificação geral dos anticorpos antifosfolípidos. Abreviaturas: PL = fosfolípido; CL = cardiolipina; LAC = lupus anticoagulante; PTC = fosfatidilcolina; PTE = fosfatidiletanolamina; β₂GP-I = β₂-glicoproteína I; BrE = eritrócitos tratados com bromelina; PT = protrombina; SLE = lupus eritematoso sistêmico; SYPH = sífilis; NLS = normal; PAPS = síndrome antifosfolípide primária; AHA = anemia hemolítica autoimune; * = não-relacionado com SLE ou PAPS [adaptado de Alarcón-Segovia e Cabral, 1992).

Portanto, em se tratando de aPL, alguns pontos podem ser destacados (Alarcón-Segovia e Cabral, 1992):

- Os aPL constituem uma família de anticorpos;
- Um único aPL pode reagir com vários fosfolípidios, bem como com outros antígenos (ex: DNA);
- O soro de um paciente pode conter misturas de vários tipos de aPL com diferentes características imunológicas e propriedades biológicas.

3.4.5.1. Detecção de anticorpos antifosfolípidos

Segundo Roubey et al. (1996) e Kandiah e Krilis (1996), os aPL podem ser detectados laboratorialmente através de diferentes ensaios, incluindo VDRL falso-positivo (teste para sífilis), ensaios para detecção de lupus anticoagulante e ELISA com cardiolipina (ELISA aCL). Existem anticorpos que são detectados exclusivamente por um deles, enquanto outros podem ser identificados por mais de um teste, pois muitos pacientes possuem soro com misturas policlonais de aPL. Em algumas destas misturas pode haver anticorpos reativos com cardiolipina e outros que reajam com outros fosfolípidios.

Apesar de extensivamente utilizada, a detecção de aPL através do ensaio ELISA não constitui ainda um procedimento plenamente padronizado e confiável. Os ensaios ELISA aCL, que são os mais utilizados, podem em muitos casos detectar vários subconjuntos de aPL - tanto aqueles que se ligam diretamente à cardiolipina quanto aqueles que necessitam de β_2 GP I como intermediário desta ligação. Este fato pode levar a erros de diagnóstico, e posteriores indicações de tratamentos inadequados, uma vez que há diferenças entre os quadros clínicos apresentados pelos pacientes que possuem diferentes tipos de aPL no plasma. Diversos trabalhos (Capel et al. (1997), Kandiah e Krilis (1996), Roubey et al. (1996), Emlen (1996), Arvieux et al. (1995), Reber et al. (1995) e Peaceman et al. (1992))

mostram que há uma grande variabilidade dos resultados obtidos quando se usa kits comerciais para detecção de aPL.

Capel et al. (1997) realizaram um estudo no qual 26 amostras de plasma de doentes portadores de patologias autoimunes foram enviados para 11 laboratórios diferentes, nos quais realizaram-se testes de coagulação e imunológicos para detecção de aPL. O estudo mostrou grande variação nos resultados, sendo que a concordância entre os testes imunológicos foi de 54.9% e entre os de coagulação 77.5%. Reber et al. (1995) analisaram nove kits normalmente utilizados para medição dos níveis de aPL no plasma sanguíneo e comparou os resultados. Foram encontradas grandes diferenças entre as positivities dos kits, na faixa de 31 a 60% para IgG e 6 a 50% para IgM. As inclinações das retas de calibração mostraram grandes discrepâncias, estando entre 0.159 e 0.931 para IgG e 0.236 e 0.836 para IgM. Peaceman et al. (1992) estudaram a detecção de aPL no soro de 20 pacientes vítimas de múltiplos abortos, feita por 10 laboratórios diferentes. Os resultados mostraram que cada laboratório possuía significativas diferenças nos métodos, padronização e unidades. Concordância total entre os laboratórios só ocorreu em 25% dos casos analisados.

Kandiah e Krilis (1996) discutiram a padronização dos ensaios para anticorpos anticardiolipina e lupus anticoagulante, concluindo que estes ensaios apresentam muitas dificuldades, apesar das tentativas feitas pelos comitês de “workshops” internacionais com o intuito de padronizá-los. As dificuldades encontradas residem nos seguintes aspectos:

- A heterogeneidade dos anticorpos antifosfolípidos, fazendo-se necessário que mais de um ensaio seja usado para que o diagnóstico seja confiável. Necessita-se, portanto, que os antígenos ou ligantes-alvo sejam mais precisos e claramente definidos e caracterizados, para que os ensaios em fase sólida permitam medidas quantitativas mais precisas dos níveis de anticorpos e ocorra uma padronização internacional.

- Necessidade de um melhor controle da densidade dos ligantes alvo-específicos sobre os suportes usados, a fim de que as placas fornecidas com os kits apresentem mínima variabilidade, garantindo assim a reprodutibilidade dos resultados.

Estudos mais recentes mostram que os fosfolipídios aniônicos, tais como o fosfatidilinositol (PI), a fosfatidilserina (PS) e o zwitteriônico fosfatidiletalona (PE), apresentam um bom potencial para detecção de aPL. A especificidade de alguns aPL é de particular interesse porque PE é requerido para a expressão da atividade anticoagulante, e a inibição deste mecanismo contribui para o aumento da trombose (Smirnov et al., 1995). Além disso, a cardiolipina não pode ser considerada como o único alvo específico dos aPL. Esses resultados conduziram alguns autores a propor o uso de outros fosfolipídios para recobrimento de placas ELISA (Falcón et al. (1990) e Alarcón-Segovia e Cabral (1992)).

Laroche et al. (1996) apresentaram contribuição importante para a pesquisa neste campo, usando ELISA com múltiplos fosfolipídios como complexo antisérico para detecção de aPL. Foram estudados os perfis de reatividade do soro de uma grande população de pacientes portadores de doenças autoimunes, usando tanto os fosfolipídios individualmente quanto em mistura no recobrimento de placas ELISA. Os fosfolipídios usados foram: cardiolipina, fosfatidilserina, fosfatidiletalona e fosfatidilinositol. Os resultados mostraram que a maior parte da detecção foi poliespecífica, embora em alguns casos fosse monoespecífica. O multialvo ELISA, constituído de uma mistura de fosfolipídios, mostrou as mesmas características de especificidade (98.5% para IgG e 100% para IgM) e sensibilidade (100% para IgG e IgM), do mesmo modo que os resultados obtidos para cobertura individual dos fosfolipídios. No entanto, a mistura oferece, em um único teste, a detecção de uma variedade de aPL em termos de seus antígenos-alvo, e a reatividade com vários fosfolipídios e, desse modo, reconhece também pacientes cujos aPL não são dirigidos contra o antígeno usual, que é a cardiolipina. Esses resultados sugerem que o uso de misturas de fosfolipídios aniônicos e zwitteriônicos para recobrimento das placas ELISA resultaria numa melhor detecção dos aPL envolvidos nas patologias autoimunes, aumentando-se a habilidade de identificação de pacientes com estes aPL no plasma, e não só pacientes possuidores de anticorpos aCL.

3.4.5.2. Lipossomas em imunodiagnóstico

Segundo Singh e Carbonell (1995), quando utilizados em imunoensaios, os lipossomas geralmente carregam anticorpos ou antígenos adsorvidos em sua superfície ou incorporados em sua bicamada. Além disso, podem encapsular em seu núcleo aquoso moléculas denominadas *marcadores*, que são liberadas quando os lipossomas sofrem alguma modificação (lise, mudança de fase, p. ex.) em sua estrutura. Esta liberação pode ocorrer devido à ligação de antígenos ou anticorpos na superfície do lipossoma, gerando um sinal proporcional à concentração destes no material analisado. Este é o princípio básico utilizado nos imunoensaios tradicionais que utilizam lipossomas, os quais podem ser classificados de acordo com o seguinte esquema:

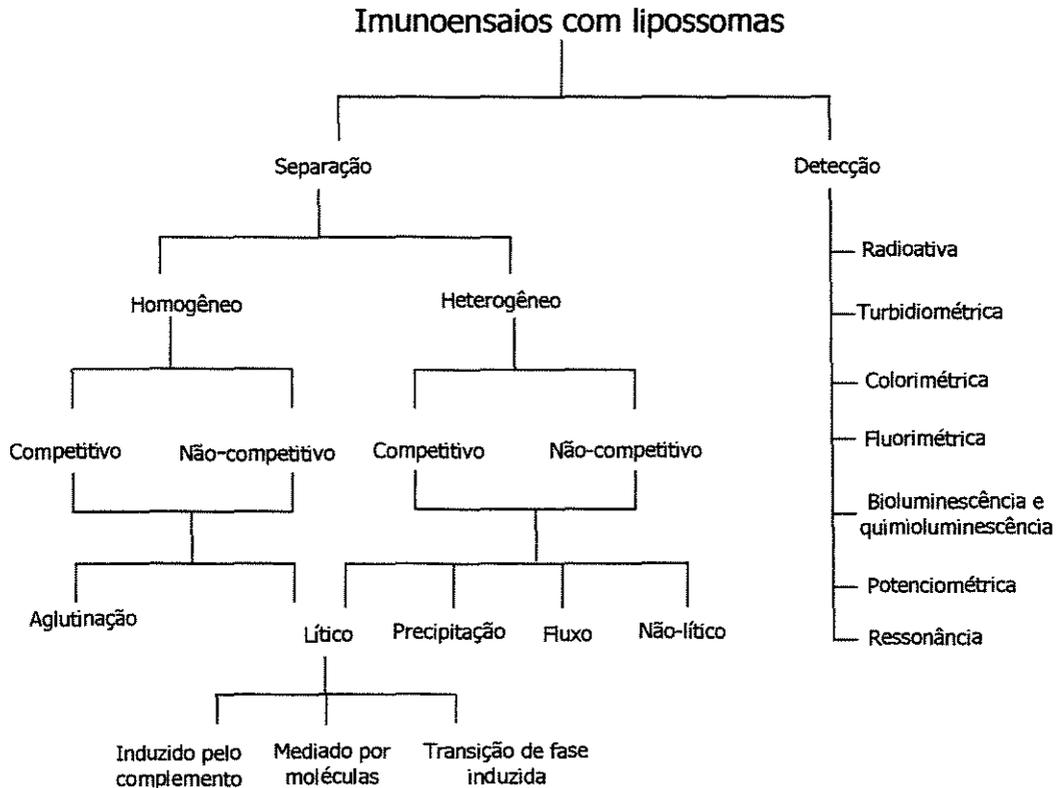


Figura 14: Classificação dos imunoensaios utilizando lipossomas [adaptado de Singh e Carbonell (1995)].

A primeira grande classificação divide os imunoenaios em homogêneos e heterogêneos. Ensaio heterogêneo são aqueles em que há necessidade de lavagem para separação das moléculas marcadoras não-ligadas, antes da quantificação, o que não ocorre em ensaios homogêneos. Um ponto importante que deve ser notado é que esta distinção é baseada somente na necessidade de uma etapa de lavagem, e que a presença ou ausência de um suporte sólido não é relevante. Ensaio heterogêneo são geralmente mais demorados, mas oferecem maior sensibilidade e acuracidade, bem como têm maior gama de aplicações.

Os ensaios homogêneos e heterogêneos podem ainda ser subdivididos em competitivos (inibição) e não -competitivos (diretos). No primeiro caso, a quantidade anticorpos presentes na solução do ensaio (formato homogêneo) ou adsorvido em fase sólida (heterogêneo) é insuficiente para ocasionar a ligação de todas as moléculas de antígeno. Uma concentração conhecida de lipossomas sensibilizados com antígeno é adicionada à amostra contendo antígeno livre, cuja concentração deve ser determinada. Esta mistura é incubada com os anticorpos (imobilizados ou em solução), permitindo que haja competição entre antígenos livres e imobilizados na ligação com os anticorpos. Os lipossomas também contém moléculas de marcadores, e a extensão da ligação é determinada através da quantificação das moléculas marcadoras. Além disso, no caso deste tipo de ensaio as moléculas de antígeno estão presentes em excesso, e o sinal resultante é inversamente proporcional à concentração de analito na amostra. No segundo caso - ensaios não-competitivos - o sinal é diretamente proporcional à concentração de antígeno presente na amostra, uma vez que, neste caso, os anticorpos é que estão presentes em excesso.

Os ensaios homogêneos podem ainda ser subdivididos em líticos (mediado por complemento, cito-lisinas ou detergentes, devido à transição de fase, p.ex.) e de aglutinação. Os heterogêneos, por sua vez, podem ser sub-classificados em líticos, não-líticos, por precipitação, de fluxo e imunomigração.

Dentro deste contexto, os lipossomas oferecem algumas vantagens ao serem utilizados em imunodiagnóstico, evidenciadas pela grande quantidade de estudos citados por Singh e Carbonell (1995), tais como:

- grande área superficial, possibilitando que um grande número de anticorpos ou antígenos sejam ligados à superfície externa das vesículas;
- boa reprodutibilidade na síntese das vesículas, o que levaria à consequente reprodutibilidade nos resultados dos imunoenaios;
- estabilidade do sistema em grandes faixas de pH, temperatura e força iônica, o que permite que as moléculas adsorvidas na superfície sejam desorvidas facilmente sem danificar as vesículas;
- podem ser preparados com fosfolípidios presentes nas membranas celulares, originando vesículas capazes de acomodar na sua superfície os alvos específicos dos anticorpos antifosfolípidos;
- devido ao seu pequeno tamanho, as interações com proteínas são cineticamente controladas, de modo que resistências difusionais estão ausentes nos processos de adsorção e desorção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Síntese e estabilização da magnetita coloidal: cloreto de ferro(III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloreto de ferro(II) tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e ácido láurico ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$) obtidos da Sigma Co. (St. Louis, MO, EUA); hidróxido de amônio (NH_4OH) obtido da Merck. Todos estes reagentes foram de grau analítico.

Preparação dos lipossomas convencionais e magnetolipossomas: dimiristoilfosfatidilcolina (1,2-ditetradecanoil-sn-glicerol-5-fosfocolina, DMPC, mínimo 99% de pureza), dipalmitoilfosfatidilserina (1,2-dihexadecanoil-rac-glicerol-3-fosfo-L-serina, DPPS, mínimo 99% de pureza) dimiristoilfosfatidiletalonamina (1,2- ditetradecanoil-sn-glicerol-5-fosfoetanolamina, DMPE, mínimo 99% de pureza), cardiolipina (difosfatidilglicerol, CL, aproximadamente 98% de pureza) e tampão HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazina -N-2-[ácido etanosulfônico]) obtidos da Sigma Co. (St. Louis, Mo, EUA); clorofórmio e metanol obtidos da Merck, ambos de grau analítico; membrana de policarbonato (poros de 100 nm, 25 mm de diâmetro) e disco dreno de poliéster (25 nm) obtidos da Poretics Products (EUA); sacos de diálise, com peso molecular de corte de 12000-16000, porosidade 25 angstroms, obtidos da Inlab (Brasil).

Análises quantitativas para quantificação dos fosfolípidios e da magnetita: ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzenodissulfônico (Tiron) e *t*-octilfenoxi polietoxietanol (Triton X-100) obtidos da Sigma Co. (St. Louis, MO, EUA); hidróxido de potássio (KOH), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), peróxido de hidrogênio sem fosfato (H_2O_2) e ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) obtidos da Merck; molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de sódio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) obtidos da Ecibra (Brasil). Todos estes reagentes foram de grau analítico.

Adsorção de imunoglobulinas em magnetolipossomas: Imunoglobulina G não-específica em solução salina (NaCl 0.9%) obtida da Sandoz; soro de indivíduo sadio (doado por Samantha Cristina de Pinho, 25 anos); soro autoimune composto por uma mistura de soros de indivíduos portadores de doenças autoimunes (designado como “pool 11”) obtido do banco de soros do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas (UNICAMP); fosfato dibásico anidro (Na_2HPO_4) e fosfato monobásico anidro (NaH_2PO_4) obtidos da Synth (Brasil); reagente para IgG e solução para calibração de IgG para nefelometria obtidos da Beckman (EUA); kit Kallestad anti-cardiolipina obtido da Sanofi Diagnostic Pasteur (EUA); soro de referência, composto de proteínas do soro humano, obtido do kit anti-cardiolipina anteriormente citado; monolaurato de polioxietileno (20) sorbitan (Tween-20) obtido da Aldrich (EUA).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. SÍNTESE E ESTABILIZAÇÃO DA MAGNETITA COLOIDAL

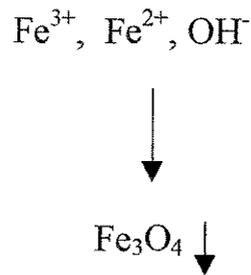
O fluido magnético coloidal, ou ferrofluido, usado na preparação dos magnetolipossomas, foi composto de partículas de magnetita estabilizadas em dispersão coloidal. Esse ferrofluido foi produzido pelo método originalmente proposto por Rheimers e Khalafalla (1976), com modificações introduzidas por Martins (1998). A metodologia consiste de duas etapas principais: síntese da magnetita e dispersão das partículas em meio aquoso.

Para a síntese da magnetita, inicialmente dissolveu-se 3 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 6 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 25 mL de água destilada. A seguir adicionou-se 12.5 mL de amônia concentrada para precipitar os cloretos. O precipitado obtido foi então lavado 2 vezes com 50 mL de uma mistura amônia/água (5/95, v/v) para retirada das impurezas.. A estabilização da magnetita no meio aquoso foi feita através do recobrimento das partículas com ácido láurico. Para isso adicionou-se ao precipitado de óxido de

ferro 1g de ácido láurico, aquecendo-se a mistura por 90 ° C durante 4 minutos com agitação contínua. A dispersão coloidal obtida foi diluída a 100 mL e estocada à temperatura ambiente

Nas condições usadas, meio apolar e excesso de ácido láurico, a ligação eletrostática originando a monocamada interna, seguida de posterior interação entre as cadeias hidrofóbicas do ácido com formação da monocamada externa, constitui o mecanismo mais provável de associação entre o ácido e a magnetita, conforme descrito no item 3.2.2.1. A estabilização das partículas no meio aquoso é obtida através da barreira estérica, produzida pela bicamada de ácido na superfície das partículas, impedindo a sua agregação e precipitação. A Figura 15 mostra esquematicamente a rota de síntese e estabilização da magnetita para a produção do fluido magnético coloidal.

Etapa 1: Co-precipitação dos cloretos de ferro



Etapa 2: Estabilização com ácido láurico

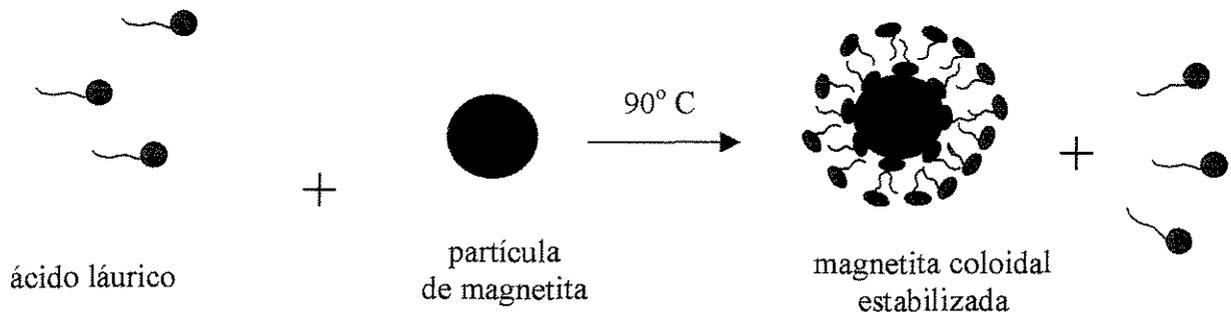


Figura 15: Esquema da rota de síntese e estabilização da magnetita coloidal com ácido láurico.

4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO MAGNÉTICO

A caracterização do fluido magnético coloidal foi feita através da dosagem do teor de ferro nas dispersões, diâmetro médio e distribuição de tamanhos de partícula.

4.2.2.1. Dosagem do teor de ferro

A dosagem do teor de ferro no fluido magnético foi feita de acordo com metodologia descrita por Yoe e Jones (1944), com adaptações introduzidas por Martins (1988). Baseia-se na conversão inicial dos óxidos de ferro em sais de ferro, solúveis em água, através de reação com água régia e formação de complexo de cor vermelha constituído de catecato sulfonato de sódio, com o reagente Tiron.

Para a realização do ensaio, foi preparada inicialmente a solução de água régia, composta de HCl/HNO₃ na proporção volumétrica 3/1, a 5M de HCl. A conversão do óxido de ferro em sais de ferro foi feita com a adição de 200 µL de água régia a 500 µL da dispersão coloidal de magnetita, e incubação por 2.5 horas. Em seguida, adicionou-se 100 µL de solução 0.25 M de Tiron a 0.5 mL de amostra contendo os sais de ferro e 0.5 mL de KOH 4N, para aumentar o pH do meio e favorecer a formação do complexo. À solução colorida, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato 0.2M, pH10, medindo-se imediatamente a absorbância a 480 nm. O mesmo tratamento com o reagente Tiron foi dado a soluções de FeCl₃ .6H₂O, com concentrações na faixa de 5 a 100ppm, usadas na obtenção da curva de calibração para a quantificação do teor de ferro nas amostras.

4.2.3. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE AFINIDADE

Os lipossomas de afinidade foram compostos do fosfolípido estrutural DMPC e dos fosfolípidos de afinidade DMPE e DPPS. A preparação dos lipossomas convencionais foi feita através do método da hidratação do filme seco de lípidios, seguida de extrusão em membranas de policarbonato com poros

de 100 nm, objetivando a homogeneização do tamanho das vesículas, conforme procedimento descrito por New (1990). Esses lipossomas foram compostos por DMPE/DMPC e DPPS/DMPC nas proporções molares 3/1 e 1/4 respectivamente.

4.2.3.1. Método da hidratação do filme seco de lipídios

Os fosfolipídios estocados a 0°C foram inicialmente trazidos à temperatura ambiente, pesados de acordo com a composição pretendida nas vesículas, colocados num balão de fundo redondo, e solubilizados com 10 mL de uma solução 9:1 (v/v) de clorofórmio/metanol ao balão. Os solventes foram evaporados em evaporador rotatório por 5 minutos, à temperatura ambiente, para homogeneização da mistura, e sob vácuo por 15 minutos à temperatura ambiente e depois a 65° C por mais 15 minutos. O filme seco sobre o fundo do balão foi hidratado com 10 mL de água deionizada, durante 30 minutos a 65° C (acima da temperatura de transição de fases dos lipídios), de modo que todo o filme se desprendesse das paredes do balão. Finalmente, a dispersão obtida contendo lipossomas multilamelares foi deixada em repouso por 30 minutos para assegurar o estado de pseudo-equilíbrio da agregação.

4.2.3.2. Homogeneização do tamanho das vesículas

A homogeneização do tamanho das vesículas e obtenção de vesículas unilamelares foi feita por extrusão em membranas de policarbonato (poros de 100 nm). No procedimento foram usadas 2 membranas de policarbonato sobrepostas, colocadas sobre um disco dreno. A extrusão foi feita em equipamento de aço inox com tambor de 10 ml de volume e camisa térmica para circulação de água (modelo T.001, Lipex Biomembranes Inc.) sob pressão de nitrogênio (10 kgf/cm²). A água de circulação a 65° C era suprida por um banho termostático (PolyScience Series 8000). À extrusora foram adicionados 10 ml de solução das vesículas pré-formadas, que permaneceram 60 segundos no seu interior antes de cada passagem, para equilíbrio da temperatura. As amostras foram extrudadas por 15 vezes para garantir a homogeneidade de tamanho das vesículas (Ribas, 1997).

4.2.4. CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE AFINIDADE

4.2.4.1. Dosagem do teor total de fosfolipídios

A concentração total de fosfolipídios na dispersão de lipossomas foi determinada pelo método de Chen et al. (1956) com modificações introduzidas por Ribas (1997). O método baseia-se na oxidação total dos lipídios com liberação do fósforo inorgânico, o qual é transformado em ortofosfato pela adição de molibdato de amônio e reduzido com ácido ascórbico para a formação de um complexo de coloração azul, cuja concentração é proporcional ao teor de fosfato na amostra.

No procedimento adotado, colocou-se em cada tubo de ensaio 2 esferas de vidro, e a seguir adicionou-se 500 µL de solução 10 N de H₂SO₄ a 100 µl de cada amostra ou solução padrão. Aqueceu-se as amostras por 30 minutos a 200°C em placa de aquecimento (Fisatom), sendo a seguir os tubos removidos do aquecimento e resfriados até a temperatura ambiente. Após resfriados, adicionou-se 165 µL de H₂O₂ livre de fosfato a cada tubo, que foram recolocados no aquecimento por mais 30 minutos, em capela. Os tubos foram então retirados do aquecimento e resfriados até a temperatura ambiente. Adicionou-se, então, 500 µL de solução de molibdato de amônio (2% em massa) e 500 µl de solução de ácido ascórbico (8% em massa), bem como 4 mL de solução tampão a cada um dos tubos. A seguir, em água fervente, as amostras foram aquecidas por 7 minutos, sendo a seguir resfriadas em água. Finalmente, foram lidas as absorbâncias das soluções a 830 nm, em espectrofômetro Hitachi U-2001. A concentração de fosfolipídios foi determinada através de curva de calibração previamente construída com soluções padrão de fosfato básico de sódio heptahidratado e soluções padrão de DMPC.

4.2.4.2. Determinação da concentração de DMPE e DPPS

A concentração dos ligantes de afinidade DMPE e DPPS foi determinada através da dosagem da amina primária presente nas suas estruturas, segundo método descrito por New (1990). O método

baseia-se na reação de complexação de aminas primárias com o reagente TNBS, para a formação de um complexo de cor amarela, cuja concentração é proporcional ao teor de grupos amina no meio.

Inicialmente os lipossomas foram rompidos pela ação do tensoativo Triton X-100 (100mM), adicionado à amostra na proporção volumétrica 1:1, incubando-se as soluções por duas horas à temperatura ambiente, para liberação dos compostos contendo amina. Adicionou-se então 225 μL de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3 0.8 M, pH 8.5), para se obter o pH adequado para reação, e 120 μL de TNBS (2.5 mg/ml). Os tubos de ensaio foram agitados e a seguir incubados por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 450 μl de HCl 1.5 N. As absorbâncias das amostras foram medidas a 410 nm, em espectrofotômetro Hitachi U-2001 em, no máximo, 1h após a formação do cromóforo.

4.2.6. DIÂMETRO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DAS VESÍCULAS

O tamanho médio de vesícula foi determinado por espalhamento quasi-elástico de luz, conforme descrito por New (1990). O método baseia-se na determinação do coeficiente de difusão, devido ao movimento Browniano das partículas no meio, o qual é relacionado com o tamanho das vesículas através da equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (2)$$

onde k = constante de Boltzmann, T = temperatura absoluta, R = raio da partícula e η = viscosidade da solução dispersante.

A técnica consiste no monitoramento do espalhamento de luz produzido pela incidência de um feixe de laser de alta potência através de uma dispersão de lipossomas. A intensidade de espalhamento de luz

é essencialmente uma distribuição Gaussiana, quantificada através de uma função autocorrelação $G(\tau)$, que varia exponencialmente com o tempo τ , de acordo com a expressão:

$$G(\tau) \propto \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_e}\right) \quad (3)$$

onde $\tau_e = 1/2DK^2$, sendo K = vetor espalhamento e D = coeficiente de difusão. Através de medidas sucessivas da função de autocorrelação determina-se o coeficiente de difusão D das partículas no meio. Um esquema simplificado do aparato experimental pode ser visto na Figura 16:

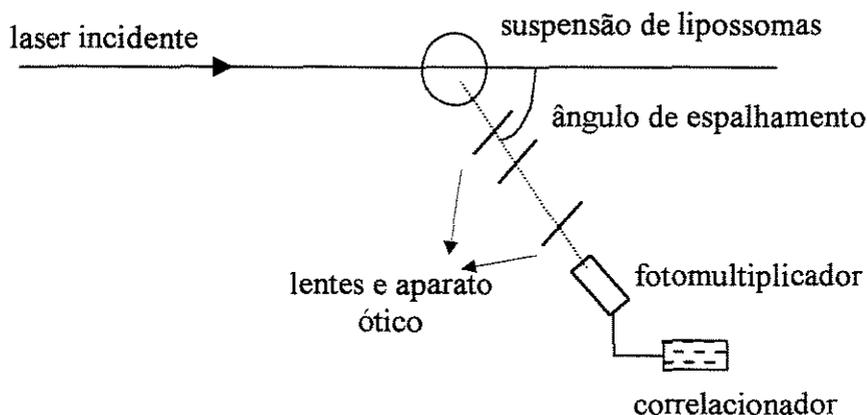


Figura 16: Esquema do equipamento para determinação de medidas de tamanho de partícula por espalhamento de luz [adaptado de Ostrowsky (1993)].

O equipamento usado nestes experimentos foi um Autosizer 4700 , fabricado pela Malvern Instruments Ltd. acoplado a um sistema de aquisição de dados e a análise dos dados feita através do software PCS 4700. As medidas foram feitas a um ângulo de 90° em relação ao feixe de luz incidente. As amostras foram diluídas com tampão Hepes (10 mM e pH 7,4), de modo a reduzir ao máximo a turbidez das soluções.

4.2.7. PREPARAÇÃO DOS MAGNETOLIPOSSOMAS DE AFINIDADE

4.2.7.1. Magnetolipossomas contendo DMPE e DPPS

Os magnetolipossomas contendo os ligantes de afinidade DMPE e DPPS foram preparados através do método da adsorção dos fosfolípidios na superfície das partículas de magnetita coloidal através de diálise, segundo método proposto por Cuyper e Joniau (1988).

O processo de adsorção foi conduzido em sacos de diálise de peso molecular de corte de 12000-14000 Da, para remoção do ácido láurico deslocado. Os lipossomas convencionais foram misturados com determinado volume de solução coloidal de magnetita (diluída ou não), de modo a se obter a relação fosfolípido/magnetita desejada e incubadas a 37° C. A diálise foi feita com tampão Hepes (10 mM, pH 7.4), trocado em intervalos regulares de tempo (8 h).

Um esquema simplificado do mecanismo de formação dos magnetolipossomas através de diálise é apresentado na Figura 17:

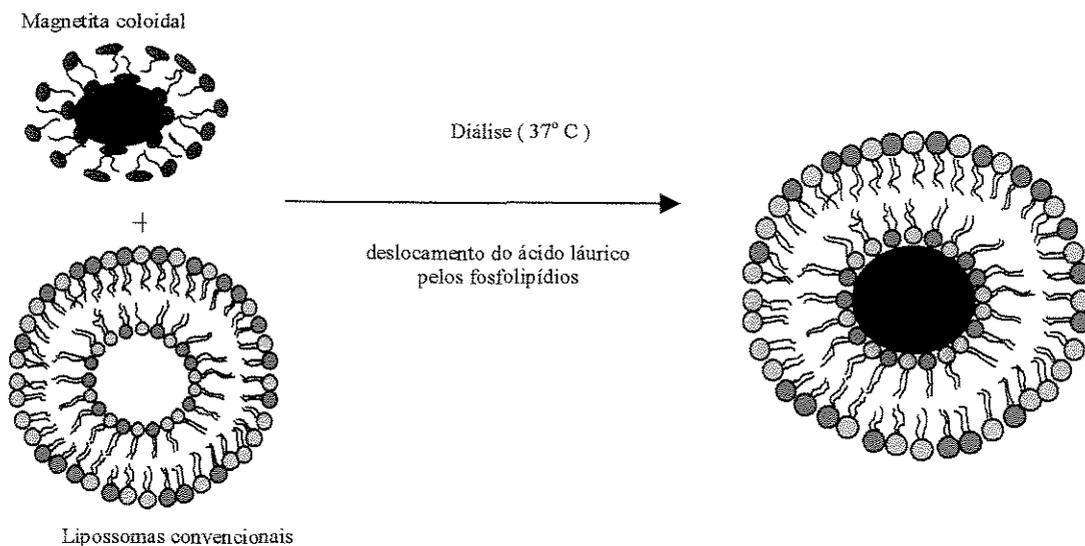


Figura 17: Esquema do mecanismo de formação dos magnetolipossomas. A incubação da magnetita coloidal com lipossomas convencionais, no processo de diálise, resulta no deslocamento do ácido láurico e formação de uma bicamada lipídica em torno das partículas de magnetita.

4.2.7.2. Magnetolipossomas contendo cardiolipina

Os magnetolipossomas contendo cardiolipina como ligante de afinidade foram preparados na razão molar CL:DMPC 1:1 pelo método da hidratação do filme seco de lipídios. Neste caso, o fluido de hidratação utilizado foi a magnetita coloidal diluída na concentração desejada. Após hidratados, os magnetolipossomas foram submetidos à sonicação de tip (sonicador Vibra Cell, Sonics & Materials), por tempos determinados (em ciclos de 30 s), para homogeneização do tamanho das vesículas e melhorar a incorporação da magnetita nas vesículas.

4.2.8. CARACTERIZAÇÃO DOS MAGNETOLIPOSSOMAS

Os magnetolipossomas foram caracterizados através do teor de ferro e lipídio total, diâmetro médio e distribuição de tamanhos de vesícula, empregando-se as metodologias descritas nos itens 4.2.2.1 e 4.2.4. A presença do recobrimento lipídico foi identificada através de microscopia eletrônica de transmissão.

4.2.8.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para identificação da bicamada lipídica nos magnetolipossomas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi usado o método do corante negativo (“negative staining”) conforme descrito por New (1990). A amostra foi colocada em uma grade preparada com platódio e carbono evaporado. Para a análise, colocou-se uma gota de amostra e aguardou-se 2 minutos para que aderisse à grade, tempo após o qual foi seca com papel de filtro (Whatman nº 1). Antes que o filme remanescente na grade secasse totalmente, adicionou-se uma gota de corante negativo (molibdato de amônio 1%, em água destilada). Após um minuto, secou-se a gota de corante e aguardou-se a secagem total da grade antes de se proceder a microscopia.

4.2.9. SEPARAÇÃO DOS FOSFOLIPÍDIOS NÃO-ADSORVIDOS

As dispersões resultantes da diálise e sonicação foram submetidas à magnetoforese de alto gradiente (MÁG) para separação dos fosfolipídios não-adsorvidos. O sistema de magnetoforese é constituído de um eletroímã convencional de polo dividido projetado para induzir um campo magnético de cerca de 1.8 T (maior que a saturação de magnetização do ferro) e alimentado por uma fonte de tensão estabilizada (5 A, 60 V). O pólo de menor diâmetro tem 40 mm e a distância entre eles é 3.5 mm. Imerso no campo magnético foi colocado um capilar de vidro de 3 mm de diâmetro interno, recheado com cerca de 60 mg de lã magnética, a qual tem a função de gerar inhomogeneidades e um gradiente de campo magnético. Esse eletroímã foi projetado e construído no

Instituto de Física da Unicamp e usado no desenvolvimento do trabalho de Martins (1998). O esquema do equipamento de magnetoforese está representado na Figura 18:

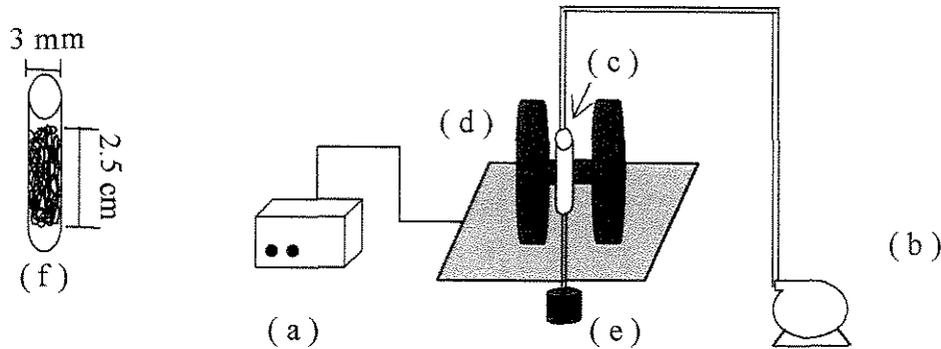


Figura 18: Esquema do sistema de magnetoforese de alto gradiente: (a) fonte de tensão; (b) bomba peristáltica; (c) capilar contendo lã magnética; (d) eletroimã; (e) frasco contendo eluído; (f) destaque do interior do capilar recheado a lã magnética.

O procedimento de magnetoforese consistiu no bombeamento de frações de 0.5 a 1 mL através do tubo capilar para retenção dos magnetolipossomas e separação dos fosfolipídios não-adsorvidos. A faixa de vazão necessária para a maior eficiência de retenção dos magnetolipossomas foi entre 10 e 20 ml/h, conforme determinada anteriormente por Martins (1998). Após a separação dos fosfolipídios não-adsorvidos, o campo magnético foi desligado e em seguida os magnetolipossomas foram eluídos do sistema com água deionizada à vazão entre 400 e 1000 mL/h.

4.2.10. QUANTIFICAÇÃO DE IgG POR NEFELOMETRIA

A determinação da concentração de imunoglobulina G (IgG) nos soros utilizados neste trabalho foram feitas de forma automatizada em nefelômetro Beckman (Array Protein System), de acordo com as instruções contidas no manual do equipamento.

4.2.11. IDENTIFICAÇÃO DOS “POOLS” DE SOROS CONTENDO ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES

A identificação dos “pools” de soro contendo anticorpos antifosfolípides foi feita com o objetivo de selecionar os soros a serem usados nos ensaios posteriores de adsorção de anticorpos. O ensaio qualitativo foi realizado segundo procedimento descrito por Fernandes et al. (1990). Em uma placa de poliestireno (96 poços) colocou-se 100 μL de solução 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cardiolipina, sendo a seguir a placa incubada a 4°C por uma noite. A seguir a placa foi lavada com 200 μL de tampão fosfato+Tween 20 (0.5% v/v). Adicionou-se então 200 μL de tampão fosfato+Tween 20+soro fetal bovino a cada poço, incubando-se por 60 minutos à temperatura ambiente, e ao final deste tempo procedeu-se novamente a lavagem com tampão fosfato+Tween 20. Em cada poço colocou-se 100 μL dos “pools” de soro a várias diluições, incubando-se novamente a 4°C por uma noite. A placa foi novamente lavada conforme descrito anteriormente, por 3 vezes. Para a detecção dos anticorpos fixados na placa, adicionou-se 100 μL de anticorpos conjugados com peroxidase, incubou-se novamente por 30 minutos, lavando-se a seguir por 3 vezes com tampão fosfato+Tween 20. Para a revelação da reação foram adicionados 100 μL de ácido sulfúrico 1N. Dos “pools” testados, somente dois, designados por “pool” 3 e “pool” 11, deram resultados positivos.

4.2.12. QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA NOS “POOLS” DE SOROS AUTOIMUNE

A quantificação de autoanticorpos antifosfolípide nos “pools” de soros foi feita utilizando-se o kit Kallestad obtido da Sanofi Diagnostic Pasteur, seguindo procedimento padrão recomendado pelo fabricante.

4.2.13. ENSAIOS DE ADSORÇÃO DOS AUTOANTICORPOS NOS MAGNETOLIPOSSOMAS DE AFINIDADE

Os ensaios de adsorção dos autoanticorpos nos magnetolipossomas de afinidade foram feitos com o objetivo de caracterizar a ligação e a capacidade do suporte em processos conduzidos em batelada, e de modo frontal em coluna capilar imersa em campo magnético.

4.2.13.1. Ensaios em Batelada

Ligação dos autoanticorpos com cardiolipina livre

Em geral, a formação do complexo antígeno-anticorpo causa perturbações nas características espectrais de absorção da luz de um dos reagentes em solução (Winzor e Sawyer, 1995). Esse experimento foi projetado para identificação do comprimento de onda de máxima absorção do complexo, para ser usado nos ensaios posteriores para detecção da adsorção dos autoanticorpos na superfície dos magnetolipossomas.

O ensaio foi conduzido em cubeta de quartzo de 3 mL, usando espectrofotômetro Hitachi U-2001. Às cubetas de análise e de referência foram adicionados inicialmente 2 mL de solução de cardiolipina 0.2M, em tampão fosfato 25 mM, pH 7,0, preparada por sonicação em banho à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se volumes definidos de soro de referência na cubeta de análise, e o mesmo volume de solução tampão na cubeta de referência, agitando as cubetas antes da análise. Verificou-se que após a adição de soro a absorbância das soluções não variou significativamente com o tempo, indicando a ocorrência de reação praticamente instantânea. Foram feitas então varreduras na faixa de comprimentos de onda de 190 a 800 nm. O ensaio prosseguiu até que os espectros obtidos entre adições sucessivas permanecessem inalterados, indicando a saturação da cardiolipina presente na solução.

Avaliação da ligação dos autoanticorpos aos magnetolipossomas

A avaliação da ligação dos autoanticorpos nos sítios de cardioplipina presentes na superfície dos magnetolipossomas, foi feita usando soro de indivíduo sadio e soro autoimune, pertencente ao "pool" 11, cuja concentração de autoanticorpos foi maior. Inicialmente adicionou-se 2 mL de soro, diluído com tampão fosfato (25mM, pH 7.0) na proporção 1:20, à cubetas de análise e solução tampão fosfato 25mM, pH 7,0, à cubeta de referência. Em seguida adicionou-se em cada cubeta, 200µL da dispersão de magnetolipossomas contendo cardioplipina, de concentração total de fosfolipídios 0.005 mM. Após cada adição e estabilização das absorbâncias, foram feitas varreduras na faixa de 190 a 800 nm, para confirmação da ocorrência da reação no comprimento de onda determinado anteriormente. O ensaio prosseguiu até que os espectros obtidos entre adições sucessivas permanecessem inalterados, indicando a máxima utilização dos sítios de cardioplipina na superfície dos magnetolipossomas.

4.2.13.2. Ensaio de adsorção em coluna capilar

Os ensaios de adsorção em coluna capilar foram feitos com magnetolipossomas contendo os ligantes de afinidade cardioplipina, DMPE e DPPS. Inicialmente, a lã magnética contida no tubo capilar foi saturada com solução de IgG não específica. A saturação foi feita imergindo-se as colunas em solução de IgG (30 mg/mL), em tampão fosfato, durante uma noite, com agitação lenta. O capilar contendo a lã magnética saturada, foi colocado entre os polos do imã, no equipamento de magnetoforese, e alimentado com solução de magnetolipossomas, à vazão de 0,23 mL/min, até a saturação do sistema, previamente determinada (1mL no caso de magnetolipossomas com DPPS e DMPE e 200 µL de lipossomas contendo cardioplipina). Em seguida, alimentou-se o capilar com soro sadio ou autoimune, à baixa vazão (0.17 mL/min), recolhendo-se na saída, em intervalos de tempos regulares, frações contendo soro não adsorvido. As frações foram analisadas por nefelometria, em termos de IgG total. Considerou-se que no escoamento empistonado a relação IgG específica/IgG total manteve-se constante nos vários estágios da coluna (Doran, 1997).

As quantidades de anticorpos específicos adsorvidos em cada sistema usando soros sadio e autoimune foram calculadas através da integração numérica das funções representativas das curvas de “breakthrough”. Admitindo-se a ausência de volume morto no sistema, a quantidade de anticorpos adsorvida foi calculada pela diferença entre a área total e a área sob a curva (Doran, 1997).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SÍNTESE DA MAGNETITA COLOIDAL

A magnetita coloidal foi sintetizada exatamente de acordo com o procedimento desenvolvido por Martins (1998), que reportou problemas de estabilidade do fluido magnético. Observou-se que, contrariamente à temperatura de estocagem utilizada por Martins (1998), 4° C, à temperatura ambiente o fluido coloidal se mantinha estável por aproximadamente 4 meses.

5.2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS DE AFINIDADE

5.2.1. RENDIMENTO DO PROCESSO

O rendimento do processo de produção de lipossomas de afinidade pelo método da hidratação do filme seco de lipídios e posterior extrusão foi cerca de 98% para todas as composições, calculado pela quantificação do teor de fosfolipídios através do método descrito no item 4.2.4. De acordo com a literatura (Litzinger e Huang, 1992; Lasic, 1993), verificou-se que lipossomas convencionais contendo DMPE podem ser sintetizados nas mesmas condições desejadas neste estudo (pH fisiológico, concentração 7.5 mM) quando um outro fosfolipídio estrutural (colina, serina, inositol ou glicerol, p.ex.) está presente em quantidades maiores ou igual a 20% molar. A estabilidade de vesículas contendo a proporção 20/80 (%molar) DMPC/DMPE foi constatada no experimento de estabilidade da bicamada lipídica em presença de tensoativo C₁₂E₅.

5.2.2. INCOPORAÇÃO DOS LIGANTES DE AFINIDADE DMPE E DPPS

A quantificação do teor de DMPE e DPPS conforme metodologia do item 4.2.4.2 em amostras de lipossomas preparadas pelo procedimento do item 4.2.3.1 apresentaram valores de 65% para o DMPE e 18% para o DPPS. Estes valores fosfolípidios representaram uma incorporação de 80% para o DMPE e 90% para o DPPS nos lipossomas de afinidade.

5.2.3. DIÂMETRO MÉDIO E DISTRIBUIÇÃO DAS VESÍCULAS

Os ensaios para determinação do diâmetro médio das vesículas convencionais compostas por DMPE/ DMPC e DPPS/DMPC forneceram os resultados apresentados na Tabela 3:

Tabela 3: Diâmetro das vesículas de afinidade contendo DMPE/DMPC (razão molar 3/1) e DPPS/DMPC (razão molar 1/4).

Tipo de lipossoma	Diâmetro médio (nm)	Polidispersidade
DPPS:DMPC (1:4)	115	0.15
DMPE:DMPC (3:1)	145	0.35

Em ambos os casos, as medidas indicaram a existência de uma única população. Em relação às vesículas compostas por DMPE/DMPC, pode-se perceber que a polidispersidade apresentou um valor elevado, provavelmente devido a um certo grau de agregação ocorrido durante a estocagem, uma vez que a presença de altas porcentagens de DMPE tende a desestabilizar os lipossomas. No entanto, pode-se considerar o valor do diâmetro em torno de 145 nm como adequado.

No caso das vesículas contendo DPPS/DMPC, o valor de 115 nm obtido para o diâmetro médio pode ser considerado ótimo (uma vez que foram utilizadas membranas com poros de 100 nm na extrusão), bem como a baixa polidispersidade mostra uma população bem homogênea.

5.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MAGNETOLIPOSSOMAS

5.3.1. DESEMPENHO DO SISTEMA DE MAGNETOFORESE

A operação do sistema de magnetoforese de alto gradiente foi realizada observando-se os seguintes cuidados: (i) rigoroso controle das velocidades de retenção e eluição dos magnetolipossomas; (ii) a concentração de Fe_3O_4 foi, quando possível, mantida abaixo de 1000 ppm; (iii) quantidade de lã magnética constante, em torno de 60 mg. Nestas condições a retenção dos magnetolipossomas foi, na maioria dos casos, maior que 95%.

5.3.2. MAGNETOLIPOSSOMAS CONTENDO DMPE/DMPC

5.3.2.1. Cinética de adsorção

O perfil obtido para a cinética de adsorção dos fosfolipídios DMPE/DMPC na razão molar 3/1 é apresentado na Figura 19. A dispersão dos pontos (que ocorre também nas outras curvas apresentadas) deve-se, provavelmente, às limitações dos métodos analíticos.

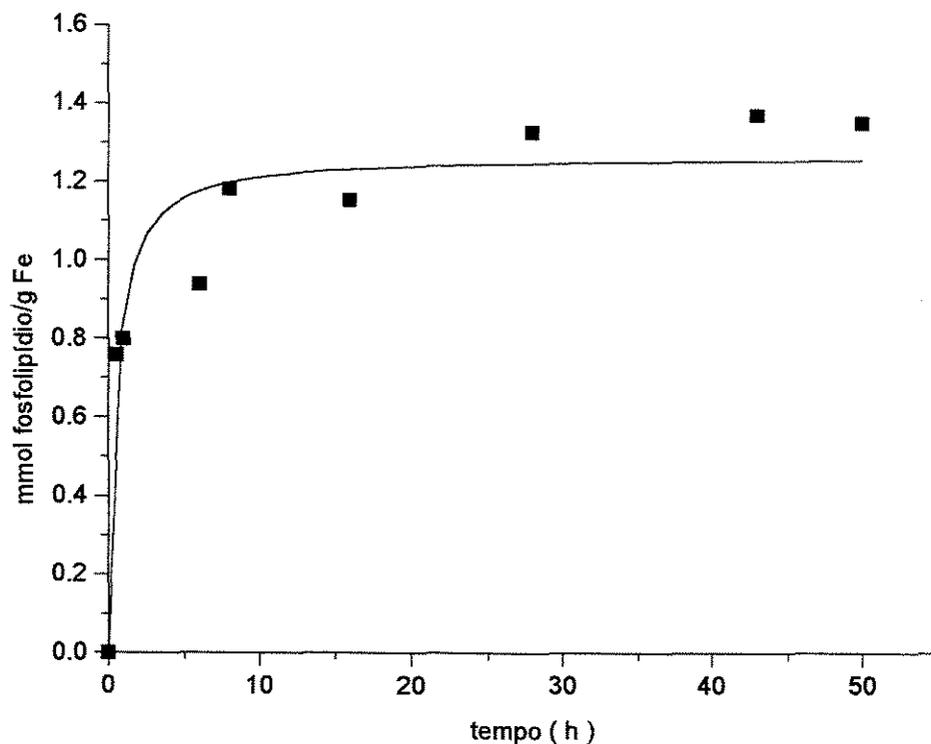


Figura 19: Perfil cinético obtido para a adsorção dos fosfolípidios DMPE/DMPC (razão molar 3:1).

Analisando-se o perfil obtido, observa-se que a saturação é assegurada em aproximadamente 15 horas. Nesta situação, a quantidade total adsorvida é aproximadamente 1,3 mmol fosfolípido / g Fe. Pode-se notar também a existência de uma zona de alta afinidade em tempos menores que 3 horas, período durante o qual cerca de 50% dos fosfolípidios foram adsorvidos.

Os dados experimentais obtidos até 20 horas foram ajustados através do modelo cinético de pseudo-primeira ordem proposto por Cuyper e Joniau (1991, 1988) e adotado também por Martins (1998):

$$\frac{\Gamma_t - \Gamma_\infty}{\Gamma_0 - \Gamma_\infty} = \exp(-k_1 t) \quad (4)$$

O tempo para que ocorra adsorção de 50% das moléculas originalmente em solução ($t_{1/2}$) é dado pela equação:

$$t_{1/2} = \frac{0.69}{k_1} \quad (5)$$

A Figura 20 mostra o ajuste feito por regressão linear (coeficiente = 0.866) para o cálculo do valor de k_1 , sendo

$$Y = \ln\left(\frac{\Gamma_t - \Gamma_\infty}{\Gamma_0 - \Gamma_\infty}\right) \quad (6)$$

onde Γ_t representa a quantidade de fosfolípido (em mmol) adsorvida por grama de Fe no tempo t ; Γ_∞ é a razão mmol fosfolípido / g Fe adsorvido na saturação e Γ_0 a razão mmol fosfolípido / g Fe adsorvido em $t = 0$.

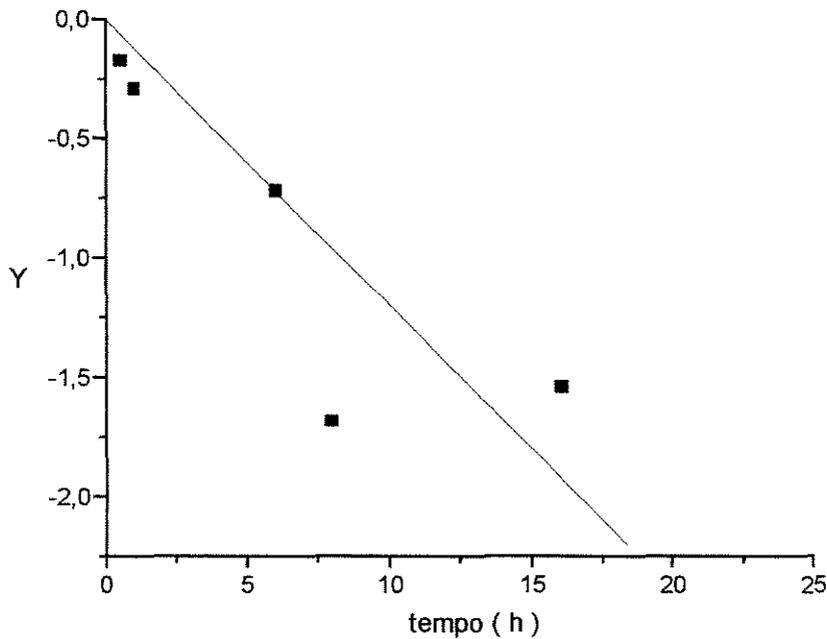


Figura 20: Regressão linear dos pontos experimentais do perfil cinético para os fosfolípidos DMPE/DMPC (razão molar 3:1).

O baixo coeficiente de correlação obtido deve-se aos desvios da cinética de 1ª ordem, observados na Figura 19 nos pontos obtidos acima de 5 horas. Os valores determinados para o parâmetro cinético k_1 foi igual a 0.207 h^{-1} , e para o tempo de meia saturação, $t_{1/2}$, foi de 3.3 h (aproximadamente 200 minutos).

Comparando-se o valor do tempo de meia saturação deste trabalho (3.3 horas) com o obtido por Martins para magnetolipossomas compostos por de DMPE/DMPC (razão molar 1/4), 10.5 horas (aproximadamente 630 minutos), justifica-se o menor tempo pela maior facilidade de migração dos lipídios da estrutura vesicular menos estável contendo 75% de DMPE

5.3.2.2. Isoterma de adsorção

A isoterma obtida para a adsorção dos fosfolipídios DMPE/DMPC na superfície das partículas de magnetita é apresentada na Figura 22. O ajuste dos pontos experimentais foi realizado utilizando-se a equação de Langmuir para adsorção não-competitiva e não-dissociativa, conforme os trabalhos anteriores (Martins, 1998; Cuyper e Joniau, 1993, 1991, 1990, 1988):

$$\frac{C}{\Gamma_L} = \frac{1}{\Gamma_L^0} \left(C + \frac{1}{K_L} \right) \quad (7)$$

onde Γ_L representa o número de mols de fosfolipídios adsorvidos por grama de Fe_3O_4 ; Γ_L^0 representa este valor na saturação; C é a concentração de fosfolipídios em equilíbrio (em solução) e K_L é a constante de associação. Da mesma maneira que nos trabalhos de Martins (1998), a não-competitividade entre os lipídios DMPE e DMPC foi observada pela manutenção da razão molar inicial nas frações não-adsorvidas.

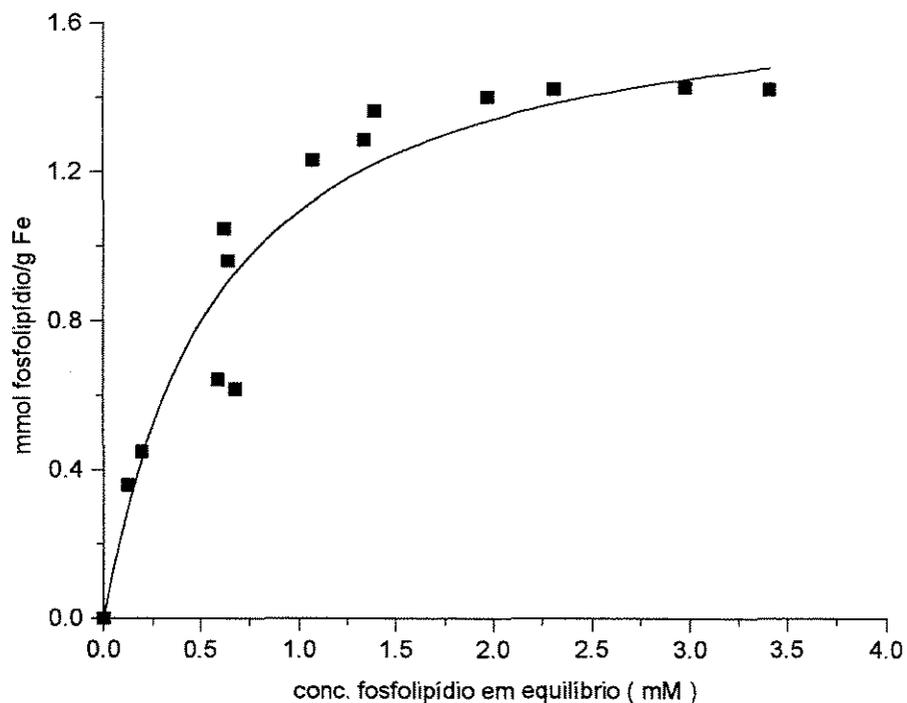


Figura 21: Isoterma de adsorção para os fosfolípidios DMPE/DMPC (razão molar 3:1).

A regressão linear (coeficiente = 0.995) da expressão para a isoterma de Langmuir (equação 8) resultou no gráfico mostrado na Figura 22. É interessante notar o bom ajuste dos pontos dentro de todo o intervalo de concentrações de equilíbrio.

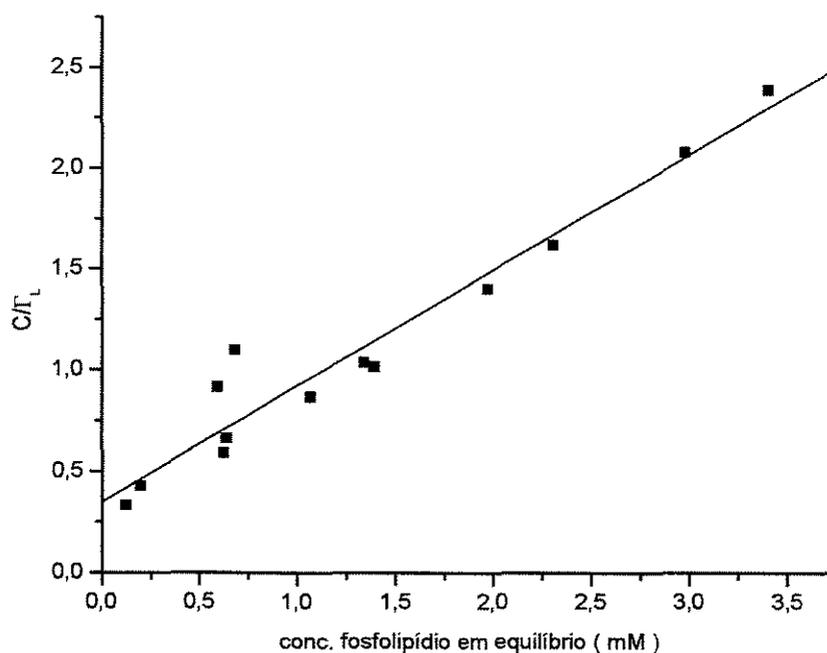


Figura 22: Regressão linear dos pontos experimentais da isoterma de adsorção para os fosfolípidos DMPE/DMPC (razão molar 3:1).

Os valores calculados para Γ_L^0 e K_L foram 1.75 mmol fosfolípido / g Fe e 1.64 mM, respectivamente. Estes valores podem ser considerados adequados, pois concordam com a previsão teórica feita por Martins (1998), que calculou o valor de saturação como 1.4 mmol fosfolípido / g Fe. Considerando-se que neste caso tem-se uma maior percentagem de DMPE e que este ocupa uma menor área por molécula, o valor de 1.75 mmol fosfolípido / g Fe é plenamente satisfatório.

5.3.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os resultados das análises feitas por MET podem ser observados na Figura 23:

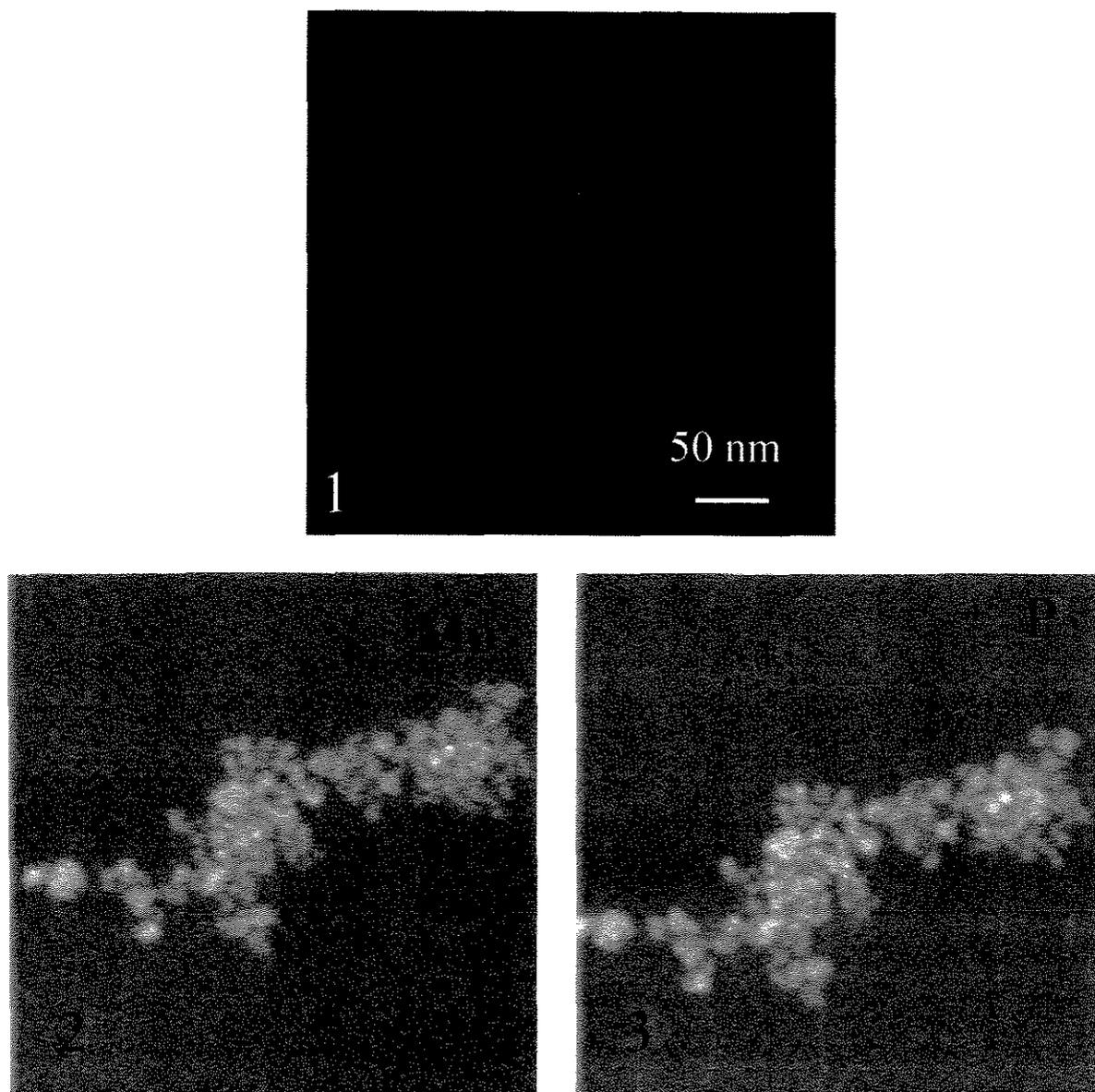


Figura 23: Microscopia eletrônica de transmissão obtida para solução de magnetolipossomas DMPE/DMPC (razão molar 3/1). Aumento: 140 000 vezes.

A fotografia 1 não mostra claramente a bicamada lipídica envolvendo as partículas de magnetita (devido ao grande contraste existente entre a fina bicamada e a magnetita); no entanto, pode-se observar o diâmetro das partículas de magnetita em torno de 15 a 20 nm, valor que pode ser tomado como adequado de acordo com a literatura (Cuyper e Joniau, 1991, 1990, 1988). A foto 2 mostra o sinal captado para o molibdênio, presente no corante que se liga ao grupo fosfato dos fosfolipídios, cujo sinal do fósforo foi captado e mostrado na foto 3. Ao comparar-se as fotos 1, 2 e 3, pode-se perceber pela sobreposição das imagens que as partículas de magnetita aparecem totalmente recobertas pelo corante e pelos fosfolipídios, o que demonstra a presença do recobrimento lipídico em torno das partículas de magnetita.

5.3.3. MAGNETOLIPOSSOMAS CONTENDO DPPS E DMPC

5.3.3.1. Cinética de adsorção

O perfil obtido para a cinética de adsorção dos fosfolipídios DPPS/DMPC na razão molar 1/4 é apresentado na Figura 24:

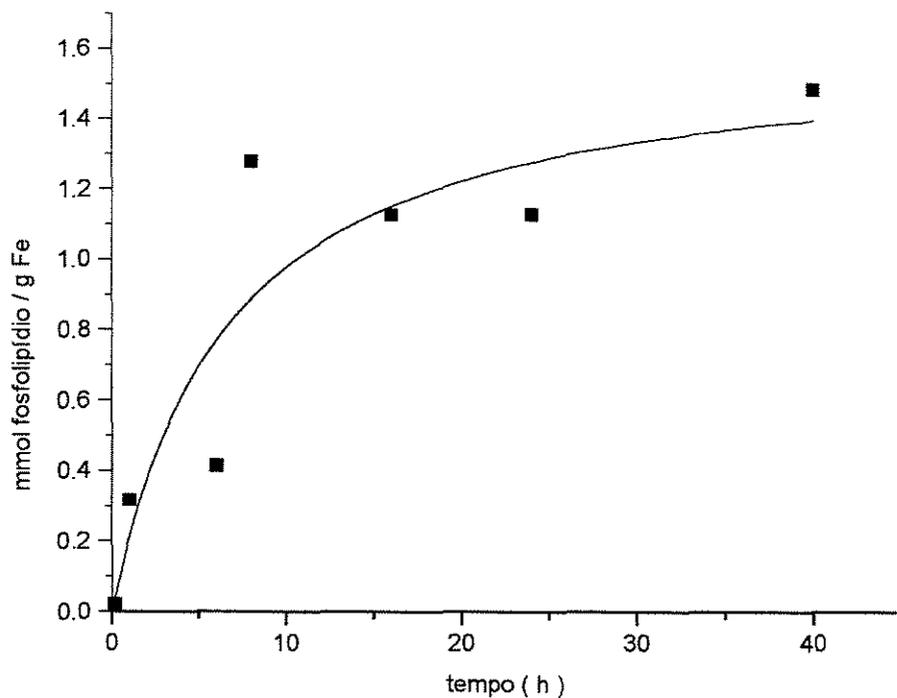


Figura 24: Perfil cinético obtido para a adsorção dos fosfolipídios DPPS/DMPC (razão molar 1:4).

Analisando-se o perfil obtido, observa-se que a saturação é atingida em aproximadamente 30 horas. Nesta situação, a quantidade total adsorvida é aproximadamente 1.4 mmol fosfolipídio / g Fe. Além disso, pode-se notar que a curva fornece o valor de cerca de 35% dos fosfolipídios adsorvidos nas primeiras 4 horas de diálise. A regressão linear (coeficiente = 0.994), em termos de $\ln Y$ vs tempo, sendo Y definido pela equação (6), é apresentada na Figura 25:

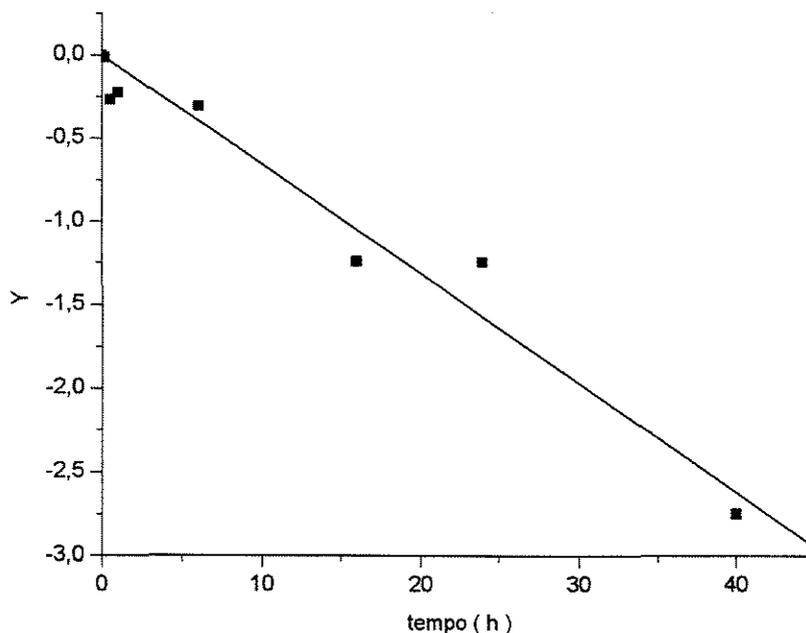


Figura 25: Regressão linear dos pontos experimentais do perfil cinético para os fosfolipídios DPPS/DMPC (razão molar 1:4).

Neste caso, o valor de k_1 foi 0.066 h^{-1} , e do tempo de meia saturação, $t_{1/2}$, 10.5 h (630 minutos). Embora o DPPS tenha um comprimento de cadeia maior, comparado ao DMPE ou DMPC, o seu $t_{1/2}$ foi igual ao obtido por Martins (1998) para o sistema DMPE/DMPC na mesma proporção molar. Segundo a literatura (Gardam et al., 1989; Cuyper e Joniau, 1985), o deslocamento de fosfolipídios aniônicos em meio aquoso ocorre mais rapidamente do que o deslocamento de lipídios contendo PE. No entanto, o DPPS contém um grupo metila a mais na cadeia apolar do que o DMPE, o que, de acordo com a literatura (Cuyper e Joniau, 1988, 1991; Gardam et al., 1989; Nichols e Pagano, 1981; Nichols, 1985) produz um retardamento na transferência aquosa dos fosfolipídios. Essas observações justificam o valor de $t_{1/2}$ para o sistema DPPS/DMPC obtido neste trabalho.

5.3.3.2. Isoterma de adsorção

A isoterma obtida para a adsorção dos fosfolipídios DPPS/DMPC na superfície das partículas de magnetita é apresentada na Figura 26. Neste caso, há a presença mais evidente da zona de alta afinidade, a baixas concentrações de fosfolipídio, em que praticamente 70% dos mesmos são adsorvidos:

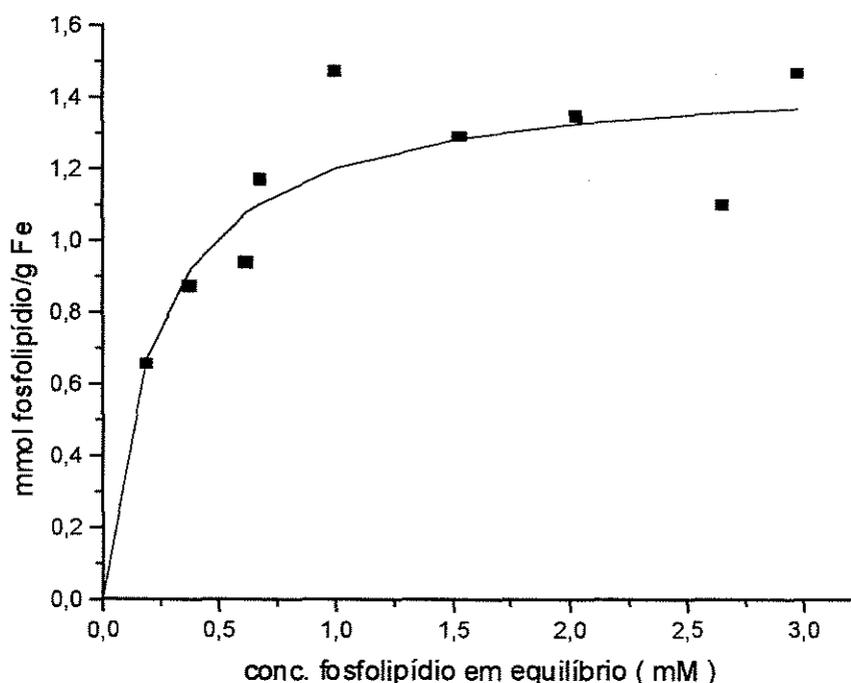


Figura 26: Isoterma de adsorção para os fosfolipídios DPPS/DMPC (razão molar 1:4).

Analogamente à metodologia empregada para a adsorção de DMPE/DMPC, o ajuste dos dados experimentais foi feito em termos de concentração total de fosfolipídio, usando-se a equação da isoterma de Langmuir para um componente. A regressão linear (coeficiente = 0.995) resultou no gráfico mostrado na Figura 27. Da mesma forma que para a análise da isoterma de formação dos magnetolipossomas contendo DMPE/DMPC, os pontos mantiveram-se bem ajustados à reta dentro de todo o intervalo de concentrações.

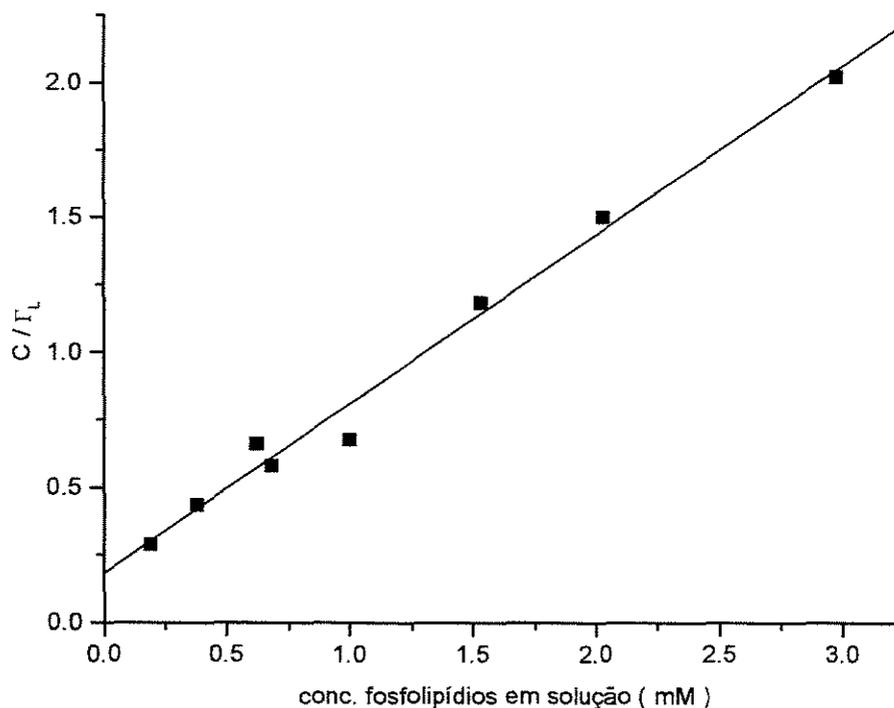


Figura 27: Regressão linear dos pontos experimentais da isoterma de adsorção para os fosfolípidios DPPS/DMPC (razão molar 1:4).

Os valores calculados para Γ_L^0 e K_L foram 1.59 mmol fosfolípido / g Fe e 3.43 mM^{-1} , respectivamente, que também podem ser considerados adequados quando comparados com a predição teórica, que é 1.4 mmol fosfolípido / g Fe (Martins, 1998).

5.3.4. MAGNETOLIPOSSOMAS CONTENDO CARDIOLIPINA

5.4.3.1. Estudo da associação fosfolípido/magnetita

Primeiramente, tentou-se produzir magnetolipossomas contendo cardiolipina (CL) pelo método da diálise, usado para a preparação das vesículas magnéticas contendo DMPE e DPPS. No entanto, os testes mostraram que após 2 horas de diálise praticamente toda a magnetita incubada precipitava. Este resultado foi coerente com as observações feitas por Cuyper e Joniau (1991), que testaram a adsorção

de DSPG (que possui 2 cadeias de hidrocarbonetos de 18 carbonos cada) e observaram flocculação e posterior precipitação da magnetita. Este fenômeno ocorre porque a migração na fase aquosa dos fosfolipídios com a parte apolar muito grande em relação à polar se torna difícil. Nestas condições, o deslocamento do ácido láurico ocorre muito mais rapidamente do que a adsorção dos fosfolipídios na superfície da magnetita, resultando na desestabilização do colóide e precipitação da magnetita. Este fato se torna particularmente crítico no caso da CL, que possui 4 cadeias de ácido linoleico (18 carbonos), e que por isso sua transferência aquosa deve ser extremamente lenta ou mesmo não ocorrer.

Constatado este fato, tentou-se preparar os magnetolipossomas unilamelares contendo CL por hidratação do filme lipídico e posterior extrusão. O fluido de hidratação utilizado foi magnetita coloidal diluída. No entanto, ao se fazer a extrusão, a magnetita anteriormente encapsulada nos magnetolipossomas multilamelares precipitava completamente na membrana de policarbonato, quando os magnetolipossomas eram submetidos à pressão e à temperatura de extrusão. Decidiu-se então preparar os magnetolipossomas como vesículas multilamelares pela hidratação do filme seco de lipídios, seguida de centrifugação para separação da magnetita não-incorporada. Nestes ensaios utilizou-se a razão molar CL/DMPC 1/1, e concentração de fosfolipídios 7.5 mM. O fluido de hidratação utilizado foi magnetita coloidal na concentração 500 ppm. Após hidratados, foram submetidos à centrifugação (Hímac CF15, Hitachi) a 500 rpm por 15 minutos, tempo que visualmente forneceu uma boa separação da magnetita não-encapsulada. Após a centrifugação, as vesículas magnéticas foram submetidas à magnetoforese para separação dos fosfolipídios não-incorporados. Analisando-se os dados obtidos, percebeu-se que a quase totalidade dos fosfolipídios e cerca de 30% do ferro presente em solução não haviam sido incorporados nos magnetolipossomas. Deste modo, deduziu-se que a maior parte dos fosfolipídios poderia ter formado vesículas não-magnéticas ou vesículas magnéticas com muitas lamelas, dificultando a captura eficiente das partículas pelo campo magnético. Para confirmação de tal hipótese, foram realizadas medidas de espalhamento de luz para verificação do diâmetro das vesículas/agregados presentes na solução eluída não-retida pelo campo magnético. As medidas mostraram que a solução com cardiolipina não-incorporada continha cerca de 30% de lipossomas multilamelares (população com cerca de 1000 nm de diâmetro médio), fato que pode ter contribuído para a baixa retenção de ferro na MAG.

De posse destes resultados, procurou-se usar a sonicação após a hidratação do filme de lipídios, visando melhorar a incorporação da magnetita e a produção de vesículas unilamelares. Shinkai et al. (1994) prepararam magnetolipossomas unilamelares compostos de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, associadas com magnetita, com concentrações iniciais de ferro e fosfolipídio de 10000 ppm e 11 mM, respectivamente. No caso deste trabalho, as soluções de magnetolipossomas preparadas anteriormente (concentrações iniciais 7.5mM de fosfolipídio e 500 ppm de ferro) foram sonicadas por 5 e 15 minutos, de modo intermitente em períodos de 30 segundos, usando sonicador Vibra Cell (Sonics and Materials, Inc.), à temperatura ambiente. Após a sonicação as dispersões foram submetidas à magnetoforese para separação dos magnetolipossomas. As frações não-incorporadas foram analisadas em relação à presença de ferro e fosfolipídios. Os resultados mostraram baixa eficiência na produção das vesículas magnéticas, com uma grande quantidade de fosfolipídios agregada e eluídos da solução.

5.3.4.2. Preparação de magnetolipossomas contendo cardiolipina

De posse dos resultados provenientes dos ensaios descritos no item anterior, decidiu-se, então, introduzir modificações nos experimentos para verificar a influência da concentração de magnetita e fosfolipídio, bem como do tempo de sonicação, nos seguintes aspectos: retenção dos magnetolipossomas pela magnetoforese; relação final fosfolipídio/magnetita presente nas vesículas magnéticas; tamanho dos magnetolipossomas e dos agregados formados pelos fosfolipídios não-incorporados e rendimento na utilização dos fosfolipídios e de magnetita. O tempo de sonicação foi elevado para 40 minutos (Shinkai et al., 1994), à temperatura ambiente.

A etapa de centrifugação foi eliminada, uma vez que um dos objetivos da sonicação era aumentar o rendimento do encapsulamento de magnetita. Os resultados obtidos nestes ensaios são apresentados na Tabela 4:

Tabela 4: Influência das concentrações iniciais de fosfolipídio e magnetita nos magnetolipossomas contendo cardiolipina, sonicados por 40 minutos.

Concentração inicial		% retenção na MAG	Razão final fosfolipídio/Fe	Diâmetro das populações (nm)	
Ferro (ppm)	Fosfolipídio (mM)				
10 000	7.5	88	0.6	80 (45%)	220 (55%)
10 000	1.8	85	0.1	55 (45%)	180 (55%)
1000	1.8	100	1.3	70 (55%)	210 (45%)

Analisando-se os dados contidos na Tabela 4 verifica-se que: o maior tempo de sonicação favoreceu o encapsulamento da magnetita; os magnetolipossomas foram formados por um núcleo contendo várias partículas de magnetita, fato comprovado pelos resultados das medidas de diâmetro dos magnetolipossomas por espalhamento de luz; o tamanho médio das vesículas e a distribuição das populações não diferiu muito de um caso para outro; apesar de uma razão maior fosfolipídio/ferro ser obtida a concentrações iniciais baixas de ferro e fosfolipídio, o rendimento da incorporação dos fosfolipídios foi cerca de 4 vezes menor que a altas concentrações iniciais (10% de incorporação a 1.8mM/1000 ppm contra 35% a 7.5 mM/10000 ppm) dos citados compostos; a grande quantidade de ferro presente no meio fez com que a razão fosfolipídio/Fe diminuísse, mas o encapsulamento foi favorecido.

Nesses magnetolipossomas, a associação de fosfolipídios com magnetita foi adequada para a obtenção de um leito de vesículas sob ação do campo magnético de alto gradiente, necessário para detecção da adsorção dos anticorpos em sistema de coluna capilar.

5.3.5. ESTABILIDADE DOS MAGNETOLIPOSSOMAS

Para a avaliação da estabilidade dos magnetolipossomas, fez-se o acompanhamento da razão fosfolípido/ magnetita e do tamanho das vesículas magnéticas e dos agregados eluídos da magnetoforese através de espalhamento de luz quasi-elástico. As medidas foram feitas até a obtenção de valores muito altos de polidispersidade ou até que a medida se tornasse difícil de ser obtida, ambos indicativos de alta taxa de desagregação das vesículas. Os dados obtidos são mostrados nas Tabelas 5, 6 e 7:

Tabela 5: Dados de estabilidade de magnetolipossomas contendo DPPS:DMPC (razão molar 1:4).

Tempo (dias)	mmol FL/g Fe	Diâmetro médio de partícula (nm)					
		Não-incorporado*			Incorporado**		
		Pop. 1	Pop. 2	Pop. 3	Pop. 1	Pop. 2	Pop. 3
fresco	1.6	---	---	---	212 (100%)	---	---
14	1.2	88 (52%)	320 (48%)	---	100 (44%)	360 (51%)	1050 (4%)
21	1.2	53 (58%)	220 (35%)	930 (7%)	105 (48%)	395 (52%)	---
28	0.4	78 (63%)	389 (37%)	---	73 (31%)	290 (69%)	---
35	0.3	136 (75%)	490 (25%)	---	138 (60%)	530 (40%)	---

* Não-incorporado: fluido eluído da magnetoforese com o campo magnético ligado

** Incorporado: associação fosfolípido/magnetita nos magnetolipossomas

Para magnetolipossomas contendo DPPS:DMPC (razão molar 1:4), observa-se que a razão mmol fosfolípido/g Fe diminuiu com o tempo, atingindo valores muito baixos, em torno de 0.3, após 35 dias

de estocagem. A população de vesículas inicialmente homogênea se desagregou. Os fosfolipídios desorveram-se do núcleo magnético, formando agregados (representados pelas populações de agregados/vesículas de fosfolipídios não-incorporados), enquanto os magnetolipossomas diminuíram de diâmetro ou se fundiram, bem como houve precipitação de magnetita não-recoberta. Nessas situações, as populações de vesículas /agregados presentes no fluido eluído da magnetoforese tiveram seus diâmetros designados como não-incorporados, enquanto que para o tamanho dos magnetolipossomas adotou-se a denominação incorporado. Analisando-se os tamanhos das populações de magnetolipossomas observa-se que a população inicial desagregou-se com o tempo, formando uma população de menor tamanho e outra de maior. Há uma tendência de agregação das vesículas em torno de 35 dias, devido aos maiores tamanhos das populações obtidos. Por outro lado, a tendência de formação de agregados maiores no fluido não-incorporado indica a desorção dos fosfolipídios da estrutura dos magnetolipossomas.

Tabela 6: Dados de estabilidade de magnetolipossomas contendo DMPE:DMPC (razão molar 3:1).

Tempo (dias)	mmol FL/g Fe	Diâmetro de partícula (nm)				
		Não-incorp rado			Incorporado	
		Pop. 1	Pop. 2	Pop. 3	Pop. 1	Pop. 2
Fresco	1.3	---	---	---	144 (40%)	560 (60%)
2	1.2	128 (42%)	290 (44%)	1115 (11%)	160 (42%)	570 (58%)
9	0.86	168 (55%)	108 (38%)	3980 (7%)	671 (78%)	5300 (22%)

Para as vesículas contendo DMPE/DMPC, observa-se que a desagregação completa ocorreu muito mais rapidamente do que em magnetolipossomas contendo serina. Em 2 dias, houve pequena desorção de fosfolipídios e agregação dos mesmos, mas a população de magnetolipossomas permaneceu com tamanho estável. Em 9 dias, entretanto, observou-se completa desestabilização das vesículas e agregação.

Tabela 7: Dados de estabilidade de magnetolipossomas contendo CL:DMPC (razão molar 1:1).

Tempo (dias)	mmol FL/ g Fe	Diâmetro de partícula (nm)				
		Não-incorporado			Incorporado	
		Pop. 1	Pop. 2	Pop. 3	Pop. 1	Pop. 2
fresco	0.55	---	---	---	123 (40%)	330 (60%)
14	0.31	30 (85%)	208 (15%)	---	175 (76%)	430 (25%)
21	0.25	70 (45%)	210 (51%)	1420 (4%)	112 (52%)	340 (48%)
28	0.27	68 (62%)	295 (35%)	1720 (8%)	260 (100%)	---

O comportamento de desagregação das vesículas contendo CL/DMPC manifestou-se da mesma forma que nos casos anteriores, pela redução da proporção fosfolípido/magnetita. A análise de tamanho dos agregados mostra que a desagregação pode ser verificada pelo aumento dos tamanhos das populações no fluido não-incorporado, o que provavelmente explica a agregação dos magnetolipossomas em uma única população de 260 nm, após 28 dias.

Dos resultados obtidos para os três tipos de magnetolipossomas preparados, verifica-se que os magnetolipossomas contendo serina mostraram-se os mais estáveis, uma vez que até 21 dias após seu preparo a proporção fosfolípido/ferro alterou-se somente cerca de 20%, enquanto os magnetolipossomas contendo DMPE demonstraram baixa estabilidade, fato já esperado, uma vez que a etanolamina em altas proporções tende a desestabilizar a bicamada. As vesículas magnéticas contendo cardiolipina apresentaram dessorção de quase 50% dos fosfolípidios do núcleo de magnetita em 14 dias.

Portanto, para aplicações práticas, os magnetolipossomas devem ser usados preferencialmente logo após a preparação ou se utilizar lipídios polimerizados para obtenção de vesículas mais estáveis.

5.4. ESTUDOS DE ADSORÇÃO DE AUTOANTICORPOS

5.4.1. ANÁLISE DA ADSORÇÃO EM BATELADA

5.4.1.1. Ligação de autoanticorpos à cardiopina livre

Os espectros de absorção, obtidos de acordo com o método descrito no item 4.2.13.1, durante a adição de soro de referência à cardiopina livre são apresentados nas Figuras 28 e 29:

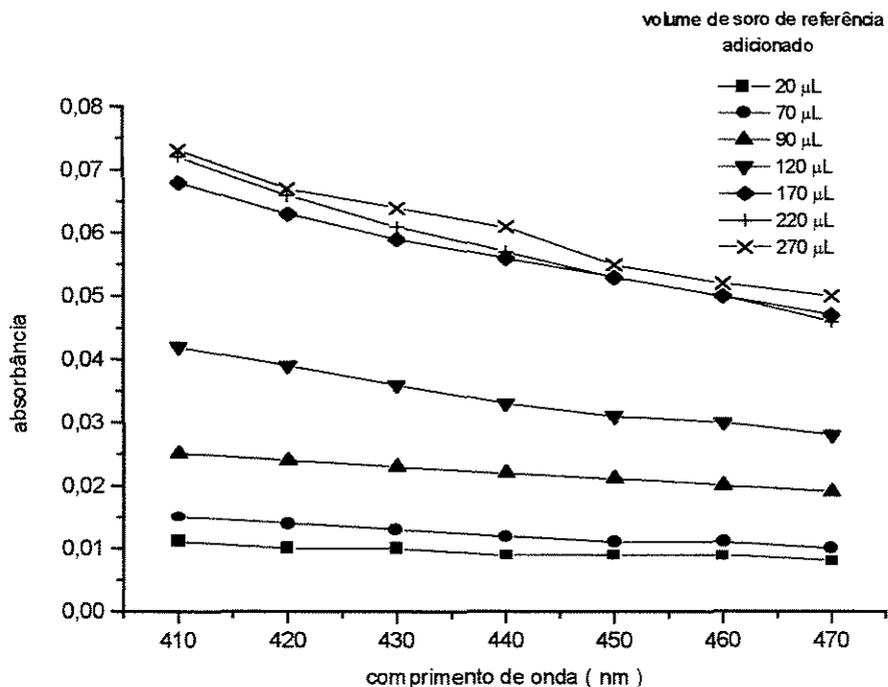


Figura 28: Variação dos espectros de absorção entre 410 e 470 nm em função do volume de soro de referência anti-cardiolipina adicionado, para o sistema contendo CL (0.2 mM) livre.

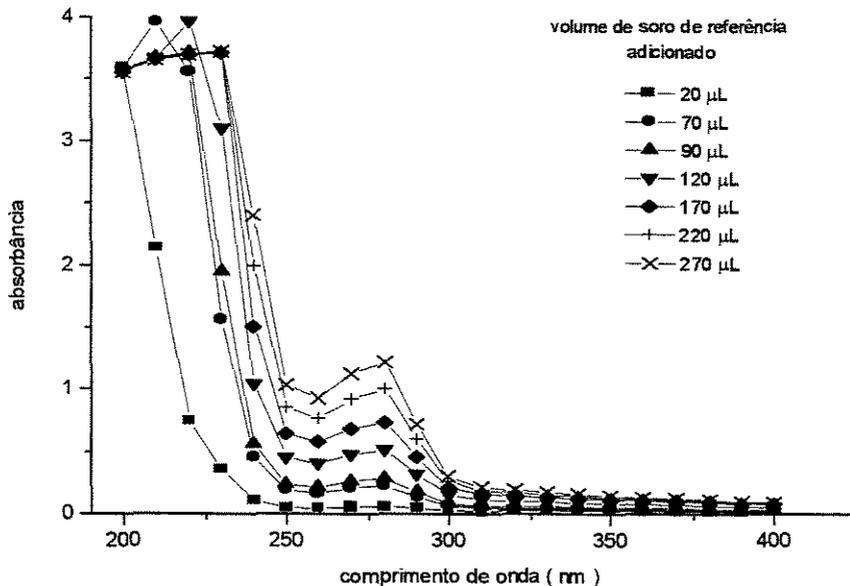


Figura 29: Variação dos espectros de absorção entre 200 e 400 nm em função do volume de soro de referência anti-cardiolipina adicionado, para o sistema contendo CL (0.2 mM) livre.

Os resultados mostram que as maiores perturbações nos espectros de absorção ocorrem preferencialmente abaixo de 300 nm (Figura 29), e entre 410 e 470 nm (Figura 28). Considerando que as proteínas absorvem geralmente abaixo de 300 nm, presume-se que a absorção dos complexos ligante-anticorpo em questão ocorre entre 410 e 470 nm.

Graficando-se as absorbâncias das soluções em função do volume adicionado, na faixa de comprimentos de onda entre 410 e 470 nm, conforme apresentado na Figura 30, observa-se que as curvas apresentam uma tendência de saturação característica da titulação dos sítios do ligante, confirmando a presença dos complexos anticorpo-cardiolipina nessa região.

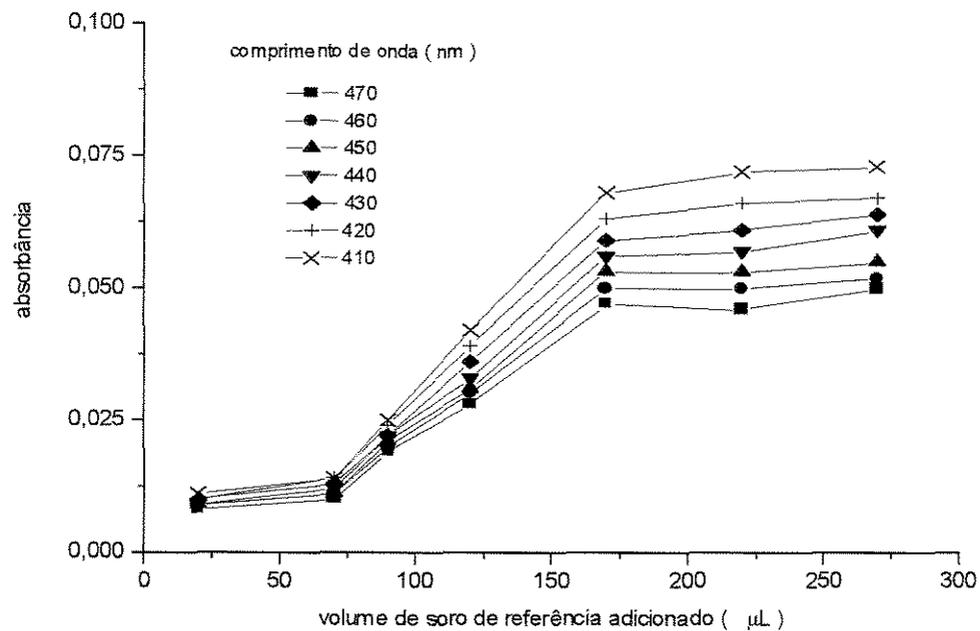


Figura 30: Curvas de titulação da CL livre pelos anticorpos aCL.

Na região de saturação, que se inicia com a adição de 170 μL de soro de referência, tem-se que a relação anticorpo/ligante é 432 U/mmol.

5.4.1.2. Ligação de anticorpos anticardiolipina aos magnetolipossomas

Estudo com soro “sadio”

Os espectros de absorção de soro “sadio” na cardiolipina contida na superfície dos magnetolipossomas são apresentados na Figura 31:

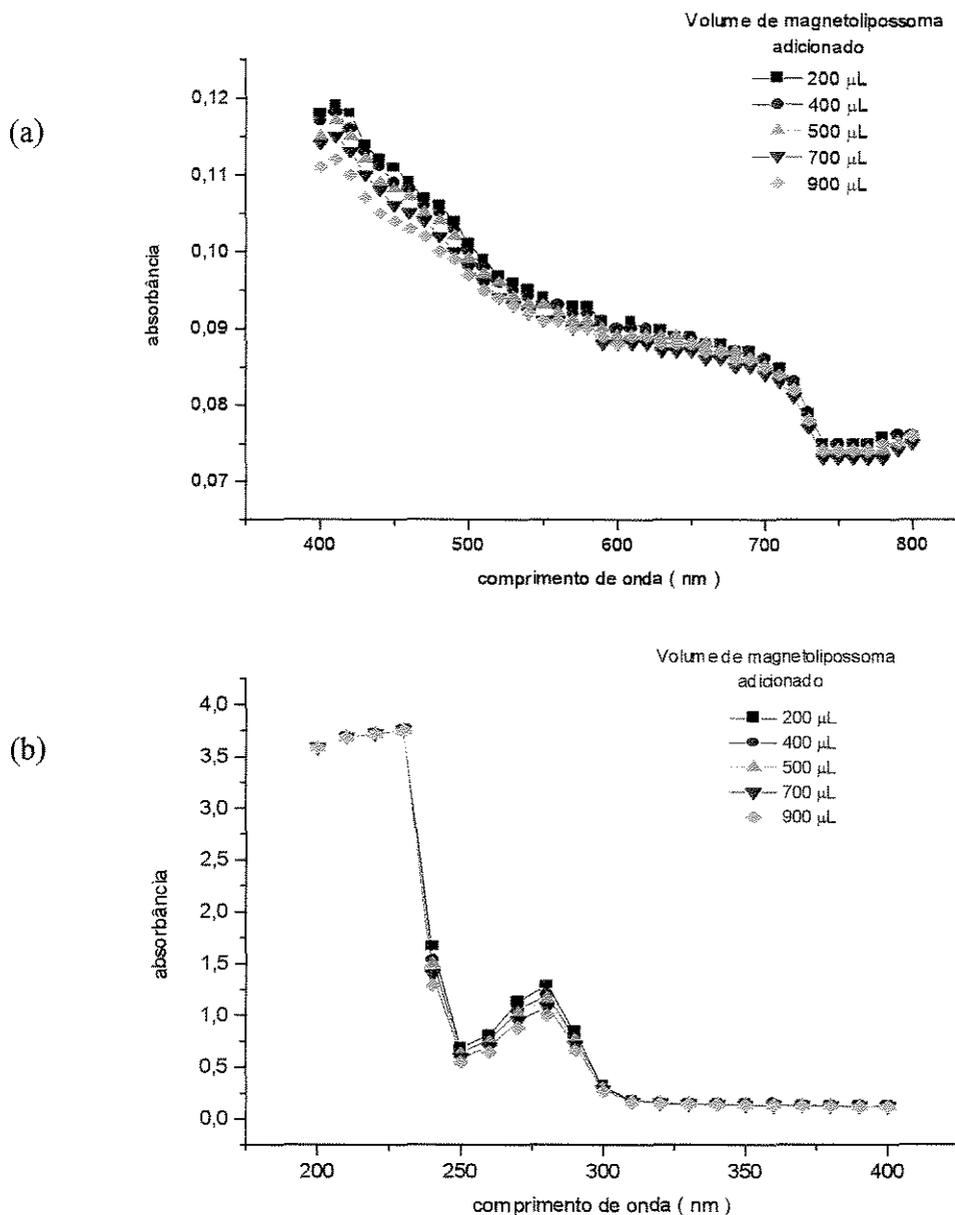


Figura 31: Varredura espectrofotométrica da adição de magnetolipossomas ao soro sadio: (a) intervalo 400-800 nm; (b) intervalo 200-400 nm.

Os espectros foram divididos em duas partes para melhor observação dos valores de absorbância obtidos. Na Figura 31 (a) verifica-se que não há variação significativa das absorbâncias para os vários volumes adicionados, não caracterizando a titulação dos sítios de cardiolipina disponíveis nos magnetolipossomas. Espectros característicos da absorção das proteínas do soro, semelhantes ao da Figura 29, consideradas as condições de cada experimento, podem ser observadas na Figura 31 (b).

Estudo com soro “autoimune”

A adição sucessiva de magnetolipossomas de afinidade ao soro “autoimune” apresentou espectros característicos da titulação dos sítios de cardiolipina. Os espectros mostram que a formação do complexo foi detectada efetivamente após a adição de 500 μL da solução de magnetolipossomas.

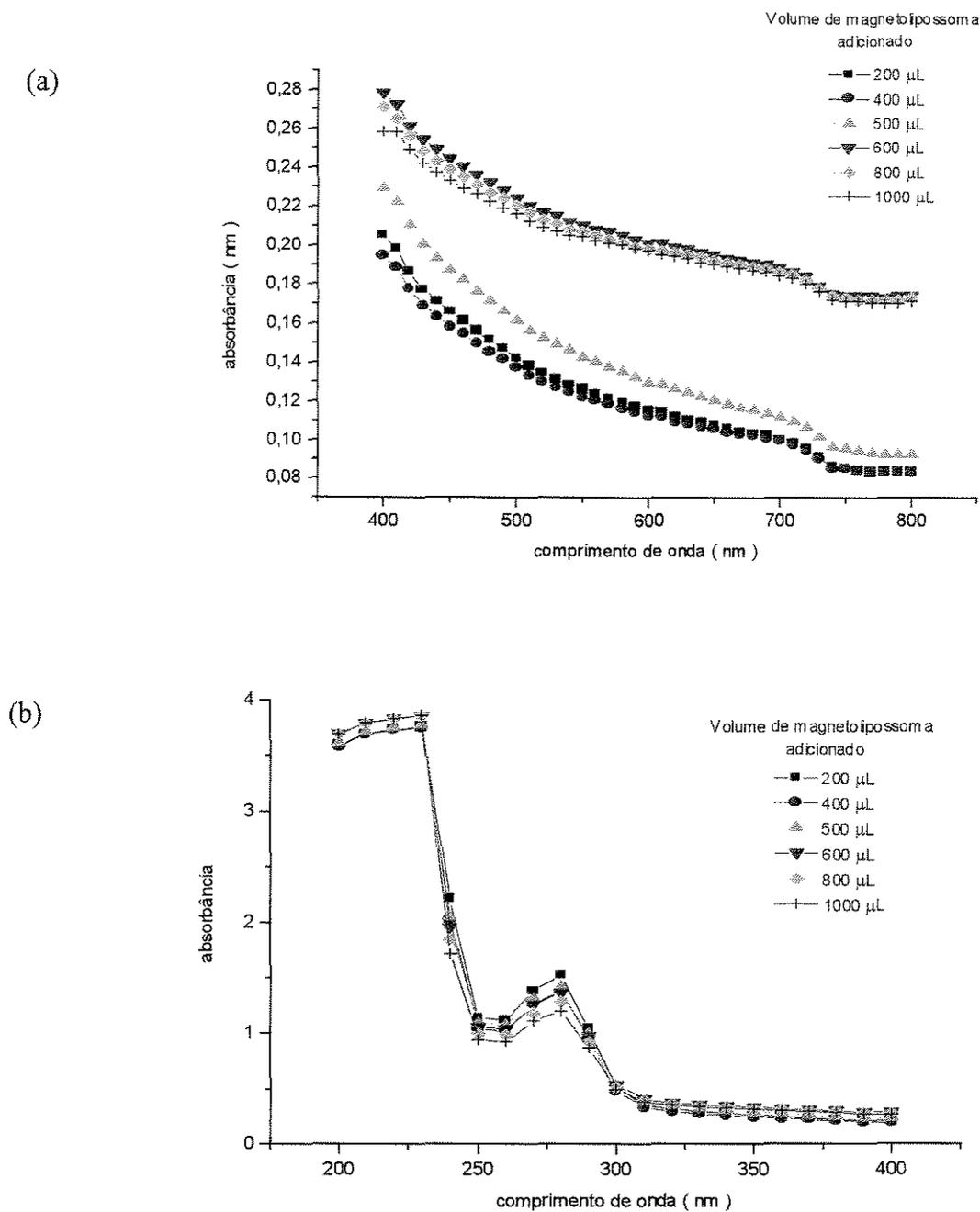


Figura 32: Varredura espectrofotométrica da adição de magnetolipossomas à soro autoimune: (a) intervalo 400-800 nm; (b) intervalo 200-400 nm.

No intervalo entre 200 e 400 nm, os espectros são semelhantes aos das figuras 31 (b), característicos da absorção das proteínas do soro.

Uma comparação entre o comportamento dos espectros obtidos para os soros sadio e autoimune, apresentada na Figura 33, evidencia a especificidade dos sítios de cardiolipina presentes nos magnetolipossomas para a ligação dos autoanticorpos:

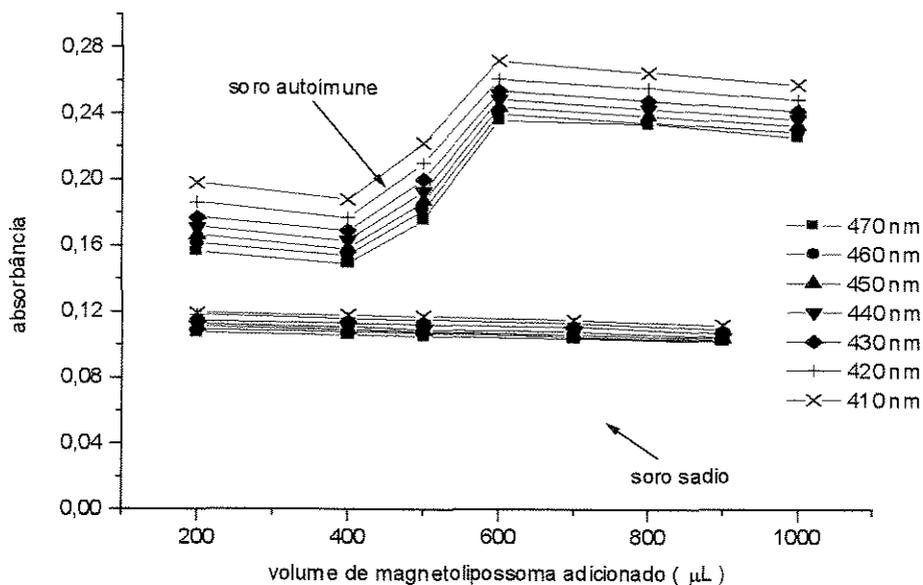


Figura 33: Espectros de absorção dos soros sadio e autoimune em presença de magnetolipossomas e afinidade.

Para o soro “sadio”, não há variação significativa dos espectros, enquanto que para o soro “autoimune” verifica-se que a saturação ocorreu após a adição de 600 µL de magnetolipossoma. Nesta região a relação de titulação anticorpo/ligante foi 1.53×10^8 U/mmol, o que representa 4730 U/lipossoma.

Comparando-se as relações anticorpo/ligante obtidas com soro de referência e soro autoimune, observa-se uma grande diferença entre os resultados. A disponibilidade de sítios de cardiolipina para a ligação com os autoanticorpos foi bem maior para o soro autoimune (1.53×10^8 U/mmol) do que para o soro de referência (432 U/mmol). Embora não seja possível tirar conclusões a partir destes experimentos, justifica-se esta diferença pela provável presença de estruturas agregadas não-uniformes formadas pela cardiolipina livre em solução, dificultando o acesso dos anticorpos aos sítios de

cardiolipina. Por outro lado, o elevado valor da relação obtida para o soro autoimune sugere uma possível adsorção dos anticorpos na forma agregada.

5.4.2. ANÁLISE FRONTAL DA ADSORÇÃO EM COLUNA CAPILAR

Os ensaios de adsorção de autoanticorpos antifosfolípides em coluna magnética foram realizados de acordo com procedimento experimental descrito no item 4.2.13. Para os magnetolipossomas contendo cardiolipina, os resultados podem ser vistos na Figura 34:

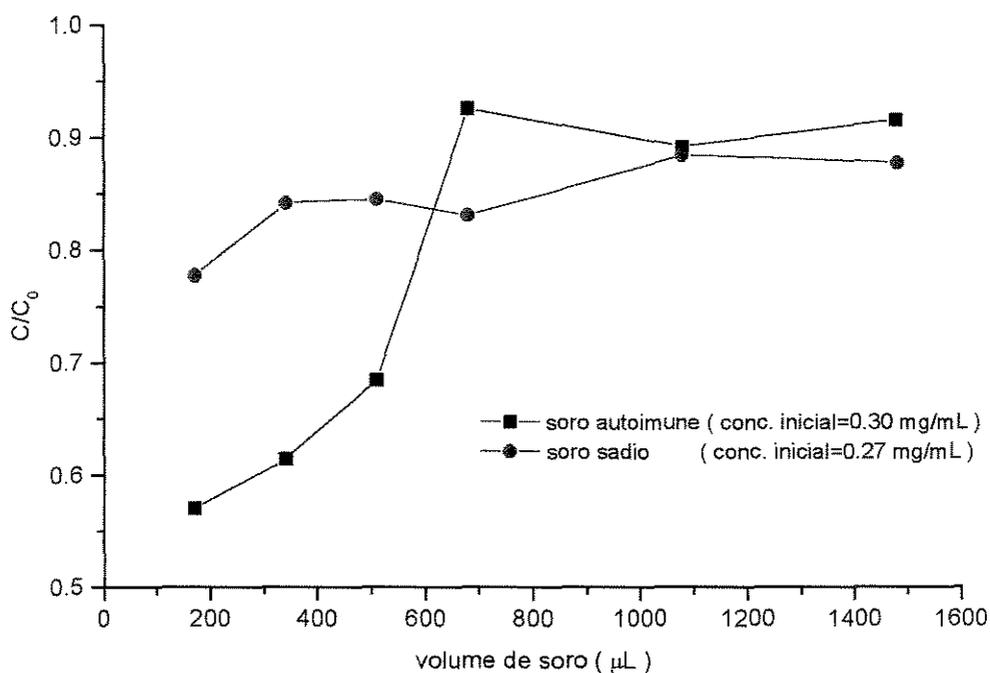


Figura 34: Perfis de adsorção ou curvas de “breakthrough” utilizando magnetolipossomas contendo cardiolipina.

Neste caso, observa-se que os níveis de adsorção do soro “autoimune” e soro “sadio” foram distintos. Enquanto que no primeiro caso a adição de soro gradualmente saturou a coluna, demonstrando possível interação dos autoanticorpos com os magnetolipossomas, o nível de adsorção para o soro “sadio” manteve-se muito baixo, com a concentração de anticorpos na saída do sistema praticamente igual à inicial durante todo o tempo.

Para os magnetolipossomas contendo serina, em ambos os casos as concentrações de anticorpos na saída mantiveram-se próximas aos valores iniciais, indicando praticamente a ausência de interação com o adsorvente, conforme pode ser visto na Figura 35. Este fato pode ser tanto devido à baixa concentração de fosfolípido ligante (serina) quanto à ausência de anticorpos anti-serina no soro selecionado.

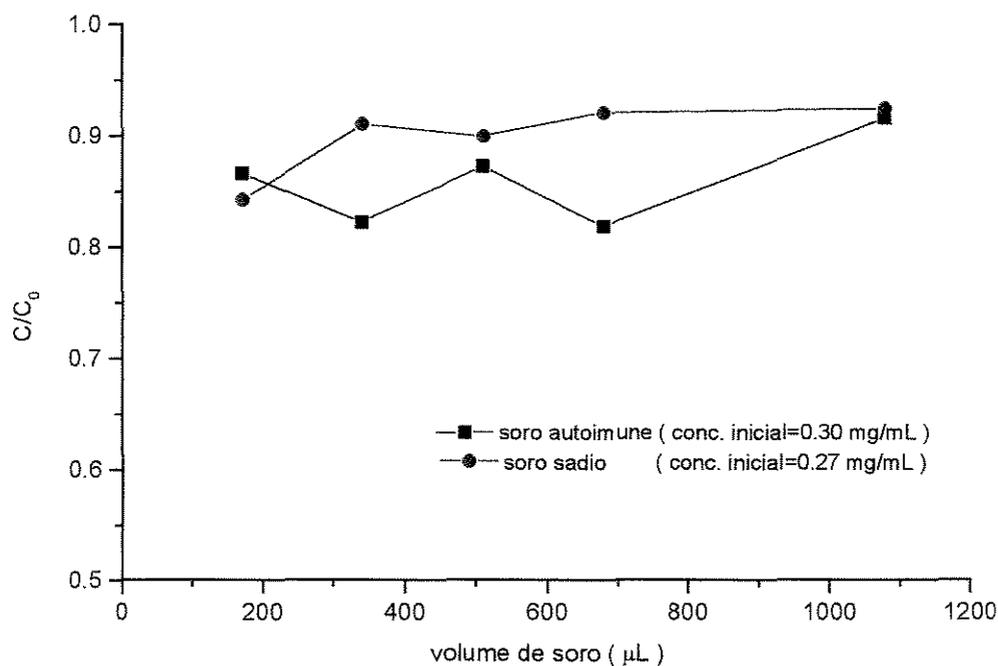


Figura 35: Perfis de adsorção curvas de “breakthrough” utilizando magnetolipossomas contendo serina.

Para os ensaios em coluna contendo magnetolipossomas compostos por etanolamina/colina, os perfis de adsorção estão mostrados na Figura 36:

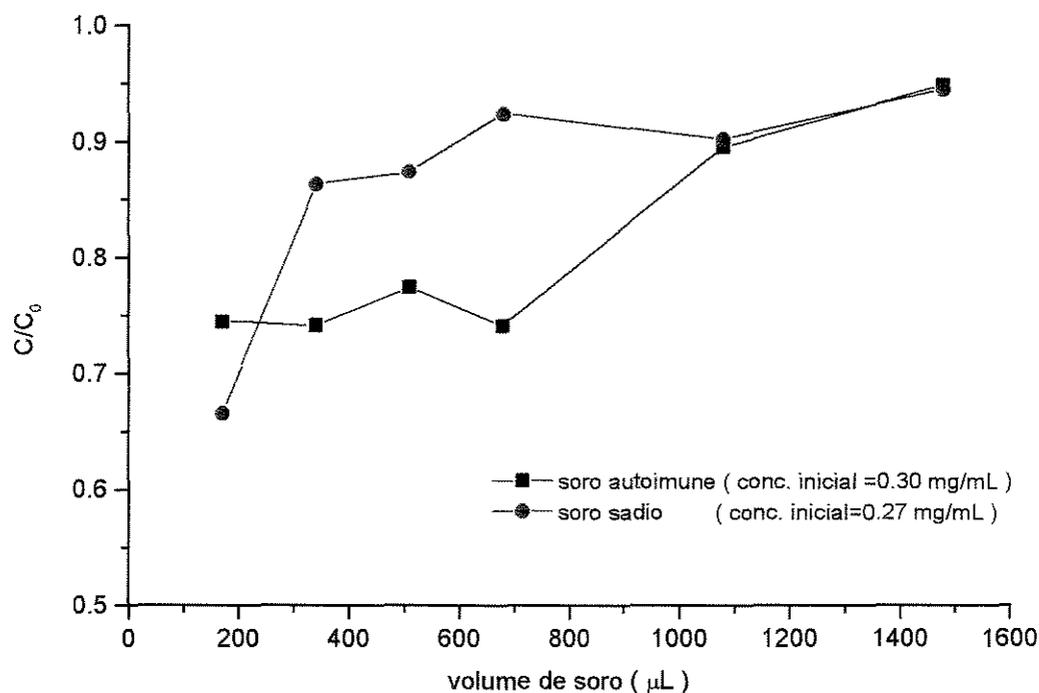


Figura 36: Perfis de adsorção ou curvas de “breakthrough” utilizando magnetolipossomas contendo etanolamina.

Neste caso observa-se que ocorreu diferença significativa nos níveis de adsorção de soro “sadio” e “autoimune”. Isto deve-se provavelmente à presença de anticorpos anti-etanolamina no soro ou à adsorção não-específica.

Com os dados obtidos foi possível construir um gráfico comparativo dos níveis de adsorção de IgG presente nos soros “sadio” e “autoimune” para os três tipos de vesículas magnéticas:

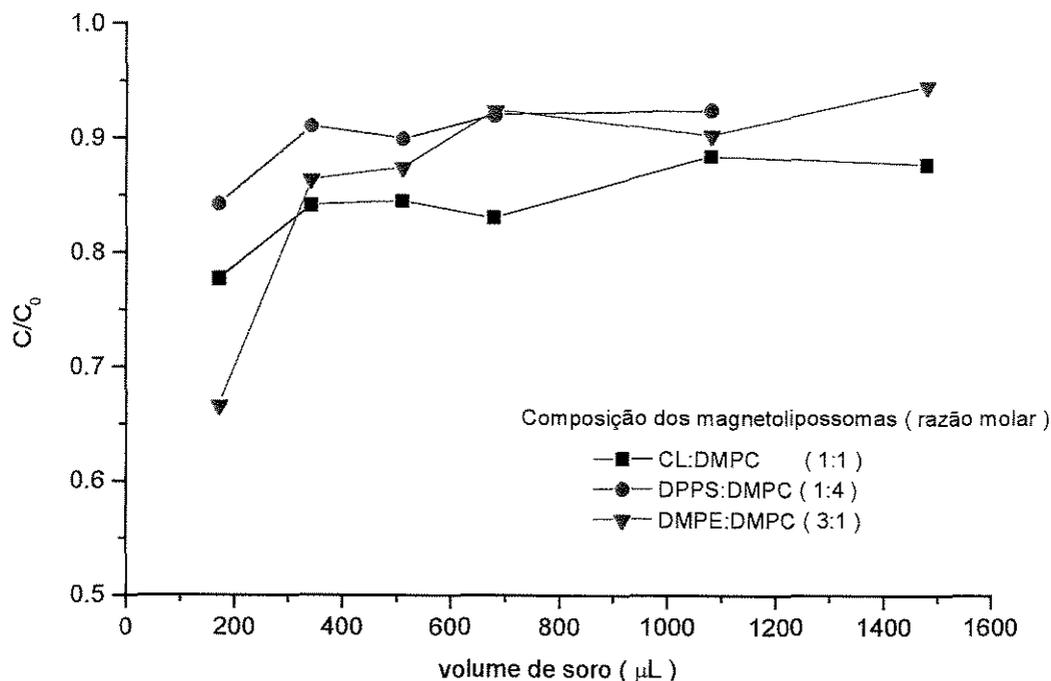


Figura 37: Comparação entre os níveis de adsorção de IgG presente em soro “sadio”.

Na Figura 37 são apresentados os perfis de adsorção para o soro “sadio” obtidos para os três magnetolipossomas estudados. Analisando-se as curvas, observa-se que os níveis de não-especificidade obtidos foram semelhantes para todos os magnetolipossomas.

A comparação entre os perfis de adsorção do soro autoimune, apresentada na Figura 38, evidencia a superioridade da adsorção nos magnetolipossomas contendo cardiolipina, indicando boa especificidade deste sistema.

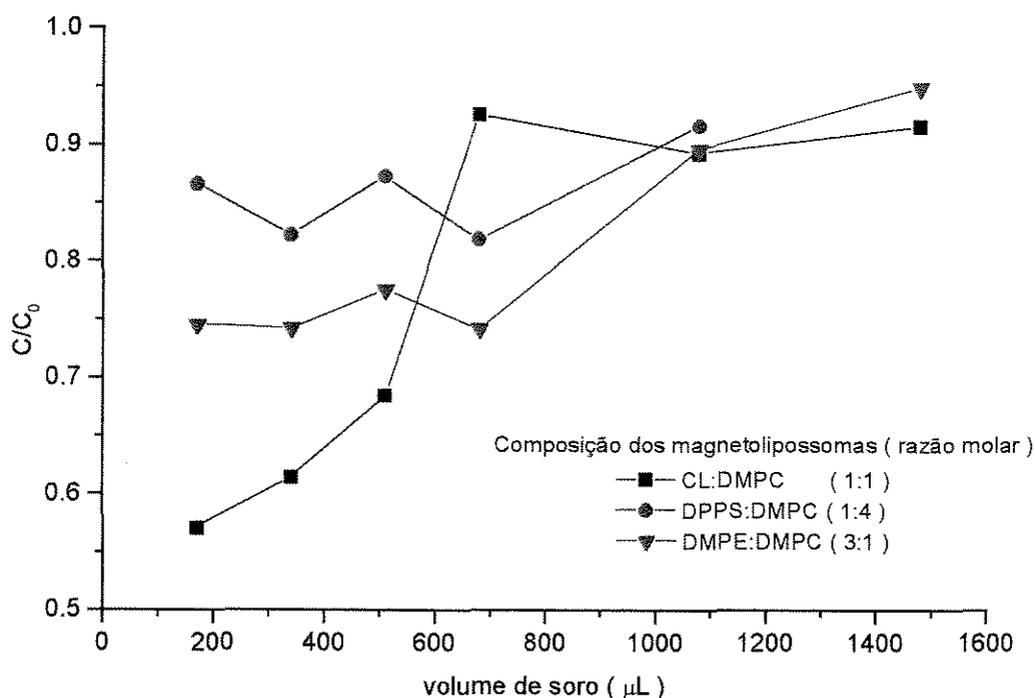


Figura 38: Comparação entre os níveis de adsorção de IgG presente em soro “autoimune”.

Na Tabela 8 é apresentada de forma comparativa a quantificação dos níveis de adsorção nos três tipos de magnetolipossomas testados:

Tabela 8: Comparação dos níveis de adsorção nos três tipos de magnetolipossomas.

Tipo de magnetolipossoma	Número de sítios de ligação disponíveis	Tipo de soro (% adsorvida)	
		“Sadio”	“Autoimune”
CL:DMPC (1:1)	3.08×10^{16}	7	17
DPPS:DMPC (1:4)	5.41×10^{16}	4	6
DMPE:DMPC (3:1)	2.46×10^{17}	4	17

Analisando-se os resultados da Tabela 8, verifica-se que os níveis de não-especificidade resultantes da adsorção de soro “sadio” foram semelhantes em todos os casos. A diferença entre eles foge do nível

de precisão do ensaio. Os resultados relativos ao soro “autoimune” demonstram a maior especificidade dos magnetolipossomas contendo cardiolipina, o que é coerente com o ensaio, uma vez que o soro “autoimune” usado foi proveniente de um “pool” contendo predominantemente anticorpos anticardiolipina. Ressalta-se que, embora a porcentagem de anticorpos adsorvidos seja a mesma nos magnetolipossomas contendo cardiolipina e etanolamina, a quantidade de sítios de ligação disponíveis é 8 vezes maior nas vesículas contendo etanolamina.

Os resultados obtidos nos dois tipos de experimentos de adsorção mostram a potencialidade dos magnetolipossomas de afinidade usados neste trabalho para a adsorção de anticorpos antifosfolípides. Há também indicações da especificidade do sistema, embora o número de ensaios não tenha sido suficiente para esta demonstração. Experimentos com vários “pools” de soros contendo anticorpos específicos e a várias diluições possibilitariam uma análise mais precisa. No entanto, os resultados obtidos são promissores e permitem vislumbrar possíveis aplicações efetivas deste tipo de sistema para a detecção de anticorpos antifosfolípides, com o desenvolvimento de sinal magnético como resposta à adsorção específica.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante a realização deste trabalho permitem concluir que:

- Magnetolipossomas de afinidade podem ser produzidos com boa reprodutibilidade usando-se como ligantes de afinidade os fosfolípidios cardiolipina, serina e etanolamina e a fosfatidilcolina como lipídio estrutural. A separação destas vesículas através de campo magnético de alto gradiente é simples e eficiente, atingindo-se níveis próximos a 100%.
- A aplicação destes magnetolipossomas em processos de adsorção por afinidade, utilizando sistemas reais como soros de indivíduos saudáveis e portadores de doenças autoimunes, mostrou fortes indicações de especificidade e eficiência na detecção de autoanticorpos.
- O sistema apresenta boa potencialidade para o desenvolvimento de um novo método de diagnóstico com muito menos etapas do que os métodos tradicionalmente utilizados em kits comerciais, do tipo ELISA.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Implementar metodologias de análise para quantificação dos fosfolípidios alvo-específicos na superfície das vesículas magnéticas.
- Verificar a formação da bicamada lipídica envolvendo o núcleo de magnetita utilizando tensoativos ou solventes orgânicos.
- Fazer medições visando determinar o diâmetro do núcleo magnético.
- Fazer microscopia eletrônica de transmissão dos magnetolipossomas contendo serina e cardioplipina, testando inclusive corante contendo fototungstato, objetivando melhorar a definição da bicamada.
- Testar outras condições de armazenagem e verificar a estabilidade das vesículas magnéticas.
- Fazer um planejamento fatorial abrangente para avaliar de modo mais eficiente a influência das concentrações iniciais de fosfolípido e magnetita, do tempo e da temperatura de sonicação na incorporação da cardioplipina nos magnetolipossomas.
- Realizar testes mais completos para verificação da interação cardioplipina-anticorpo aCL, utilizando várias diluições de soro de referência e de cardioplipina
- Realizar testes mais abrangentes para verificação da interação entre a cardioplipina incorporada nos magnetolipossomas e soros autoimunes, utilizando várias diluições de ambas as substâncias.
- Obter curvas de “breakthrough” nos ensaios em coluna utilizando várias diluições de soro autoimune e quantidades e concentrações variadas de magnetolipossomas adsorvidos na coluna.
- Em todos os ensaios utilizando soros autoimunes, verificar a sensibilidade do sistema utilizando vários conjuntos de soros.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCÓN-SEGOVIA, D. e CABRAL, A.R. Functional and immunochemical heterogeneity of antiphospholipid antibodies - a classification. **The Journal of Rheumatology**, v. 19, p. 1166-1169, 1992.
- ARVIEUX, J. et. al. Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 74, p. 1120-1125, 1996.
- BACRI, J.C. et. al. Use of magnetic nanoparticles for thermolysis of cells in a ferrofluid. In: HÄFELI et. al. **Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers**. Nova York: Plenum Press, 1997. p. 597-606.
- BERKOVSKI, B. e BASHTOVOY, V. (ed.). **Magnetic fluids and applications handbook**. Paris: UNESCO, 1996.
- BRAUCH, D.W. et al. Association of lupus anticoagulant with antibodies against phosphatidylserine. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 42, p. 63-75, 1987.
- BUREK, C.L. e ROSE, N.R. Autoantibodies. In: Colvin, R.B. et al. **Diagnostic Immunopathology**. Raven Press Ltd.: Nova York, p. 207-217, 1995.
- CABUIL, V. **Ferrofluids à base de maghémite: synthèse, propriétés physicochimiques et magnéto-optiques**. Tese (Doutorado), L'Université de Paris VI, 1987.

- CALICH, V.L.G. e VAZ, C.A.C. **Imunologia básica**. 1ª ed., São Paulo: Artes Médicas, 1989.
- CANONA-DAVIS, E. et al. Use of a reversed-phase evaporation vesicle formulation for a homogeneous liposome immunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 32, p. 1687-1691, 1986.
- CAPEL, P. et al. Comparative study of antiphospholipid antibody detection in eleven Belgian laboratories. **Acta Clinica Belgica**, v. 52, p. 84-91, 1997.
- CHEN, P.S. et al. Microdetermination of phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 1756-1758, 1956.
- CUYPER, M. et al. Catalytic durability of magnetoproteoliposomes captured by high-gradient magnetic forces in a miniature fixed-bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 654-658, 1996.
- CUYPER, M. et al. Exchangeability of phospholipids between anionic, zwitterionic and cationic membranes. **Colloids and Surfaces**, v. 10, p. 313-319, 1984.
- CUYPER, M. e JONIAU, M. Magnetoproteoliposomes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 122, p. 340-342, 1993.
- CUYPER, M. e JONIAU, M. Mechanistic aspects of the adsorption of phospholipids onto lauric acid stabilized Fe₃O₄ nanocolloids. **Langmuir**, v. 7, p. 647-652, 1991.
- CUYPER, M. e JONIAU, M. Immobilization of membrane enzymes into magnetizable, phospholipid bilayer-coated, inorganic colloids. **Progress in Colloid & Polymer Science**, v. 82, p.353-359, 1990a.

- CUYPER, M. e JONIAU, M. Potentialities of magnetoliposomes in studying symmetric and asymmetric phospholipid transfer process. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1027, p. 172-178, 1990b.
- CUYPER, M. e JONIAU, M. Magnetoliposomes - formation and structural characterization. **European Biophysics Journal**, p. 311-319, 1988.
- CUYPER, M. e JONIAU, M. Spontaneous intervesicular transfer of anionic phospholipids differing in the nature of their polar headgroup. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 814, p. 374-380, 1985.
- CUYPER, M. e NOPPE, W. Extractability of the phospholipid envelope of magnetoliposomes by organic solvents. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 182, p. 478-492, 1996.
- DORAN, P.M. **Bioprocess Engineering Principles**. 1^a ed., Londres: Academic Press, 1997.
- EMLLEN, W. Antiphospholipid antibodies: new complexities and new assays. **Arthritis and Rheumatism**, v. 39, p. 1441-1443, 1996.
- FALCÓN, C.R. et al. Antiphosphatidylinositol as markers of antiphospholipid syndrome. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 63, p. 321-322, 1990.
- FERNANDES, S.R.M; COSTALLAT, L.T. e ZOLLNER, R.L. Detecção de anticorpos anticomponentes lipídicos (cardiolipina, gangliosídios e galactocerbrosídios) em pacientes com doença de Behçet. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 30, p. 173-177, 1990.
- GARDAM, M.A. et al. Partitioning of exchangeable phospholipids and sphingolipids between different lipid bilayer environment. **Biochemistry**, v. 28, p. 884-893, 1989.

- HANCOCK, J.P. e KEMSHEAD, J.T. A rapid and sensitive approach to cell separations using an immunomagnetic colloid. **Journal of American Chemical Society**, v. 164, p. 51 - 60, 1993.
- HARRIS, E.N. Antiphospholipid antibodies. **British Journal of Haematology**, v. 74, p. 1-9, 1990.
- HÖRKKÖ, S. et al. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids - recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, p. 815-825, 1996.
- HUGHES, G.R.V. et al. The anticardiolipin syndrome. **The Journal of Rheumatology**, v. 13, p. 486-488, 1986.
- ISHII, F. et al. Preparation and characterization of lipid vesicles containing magnetite and anticancer drug. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 11, p. 581-592, 1990.
- JANEWAY Jr., C.A. e TRAVERS, P. **Imunologia - o sistema imunológico na saúde e na doença**. 2ª ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- JILES, D. **Introduction to magnetism and magnetic materials**. 1ª ed., Londres: Chapman & Hall, 1991.
- LIM, P.L. et al. One-step 2-minute test to detect typhoid-specific antibodies based on particle separation in tubes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2271-2278, 1998.
- LITZINGER, D.C. e HUANG, L.. Phosphatidylethanolamine liposomes: drug delivery, gene transfer and immunodiagnostic applications. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1113, p. 201-227, 1992.
- KANDIAH, D.A. e KRILIS, S.A. Laboratory detection of antiphospholipid antibodies. **Lupus**, v. 5, p. 160-162, 1996.

- KIWADA, H. et. al. Feasibility of magnetic liposomes as a targeting for drugs. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 4253-4258, 1986.

- KLEIN, J. **Immunology**. 1ª ed., Boston: Blackwell Publications, 1990.

- KUNG, V.T. et al. Large liposome agglutination technique for the serological detection of syphilis. **Journal of Immunological Methods**, v. 90, p. 189-196, 1986.

- LASIC, D.D. **Liposomes: from physics to applications**. 1ª ed., Londres: Elsevier, 1993.

- LEÃO, A.M.A.C. et al. Immobilization of protein on ferromagnetic Dacron. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 31, p. 53-58, 1991.

- LEEMPUTEN, E.V. e HORISBERGER, M. Immobilization of enzymes on magnetic particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 16, p. 385-396, 1974.

- LOIZOU, S. et al. Heterogeneity of binding reactivity to different phospholipids of antibodies from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and with syphilis. **Clinical Experimental Immunology**, v. 80, p. 171-175, 1990.

- MARGOLIS, L.B. et al. Magnetoliposomes: another principle of cell sorting. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 735, p. 193-195, 1983.

- MARTINS, F. **Preparação e caracterização de magnetolipossomas - potencialidade para aplicações em adsorção de biomoléculas por afinidade**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1998.

- MASUKO, Y. et al. Possibility of thermosensitive magnetoliposomes as a new agent for electromagnetic induced hyperthermia. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, p. 1802-1804, 1995.
- MITSUMORI, M. et al. Targeted hyperthermia using dextran magnetite complex: a new treatment modality for liver tumors. **Hepato-Gastroenterology**, v. 43, p. 1431-1437, 1996.
- NEW, R.R.C. **Liposomes: a practical approach**. 1^a ed., Oxford: IRL Press, 1990.
- NICHOLS, J.W. Thermodynamics and kinetics of phospholipid monomer-vesicle interaction. **Biochemistry**, v. 24, p. 6390-6398, 1985.
- NICHOLS, J.W. e PAGANO, K.E. Use of resonance energy transfer to study the kinetics of amphiphile transfer between vesicles. **Biochemistry**, v. 21, p. 1720-1726, 1982.
- NICHOLS, J.W. e PAGANO, K.E. Kinetics of soluble lipid monomer diffusion between vesicles. **Biochemistry**, v. 20, p. 2783-2789, 1981.
- OSTROWSKY, N. Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 64, p. 45-64, 1993.
- PEACEMAN, A.M. et al. Interlaboratory variation in antiphospholipid antibody testing. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 166, p. 1780-1787, 1992.
- PLAVINS, J. e LAUVA, M. Study of colloidal magnetite-binding erythrocytes: prospects for cell separation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 1-3, p. 349-353, 1993.
- POWERS, J.D.L; KILPATRICK, P.K. e CARBONELL, R.G. Protein purification by affinity binding to unilamellar vesicles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 173-182, 1987.

- RHEIMERS, G.W. e KHALAFALLA, S.E. **Magnetic fluids**. USA Patent 1.439.031, 1976.

- RIBAS, A.M. **Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos**.
Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas,
1997.

- ROATH, S. Biological and biomedical aspects of magnetic fluid technology. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 1-3, p. 329-334, 1993.

- ROITT, I. **Immunology**. 4^a ed., Londres: Mosby, 1996.

- ROUBEY, R.A.S.et al. Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to β_2 -glycoprotein I and a conventional anticardiolipin immunoassay. **Arthritis and Rheumatism**, v. 39, p. 1606-1607, 1996.

- RUUGE, E.K. e RUSSETSKI, A.N. Magnetic fluids as drug carriers: targeted transport of drugs by a magnetic fluid. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.1-3, p. 335-339, 1993.

- SCHOEPF, V. et al. Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for *in vivo* trafficking studies. **Biotechniques**, v. 24, p. 642-651, 1998.

- SHINKAI, M. et al. Intracellular hypothermia for cancer using magnetic cationic liposomes: *in vitro* study. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 87, p. 1179-1183, 1996.

- SHINKAI, M. et al. Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their applications in hyperthermia. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 21, p. 125-137, 1994.

- SINGH, A. K. e CARBONELL, R.G. Liposomes in immunodiagnostic. In Lasic, D.L. e Barenholz, Y. (eds.). **Nonmedical applications of liposomes**. Boca Raton: CRC Press, 1995.

- VAN DER MEEREN, P. et al. Monolayer adsorption of phosphate and phospholipids onto goethite. **Colloids and Surfaces**, v. 42, p. 9-22, 1989.

- VENTURA, R.C.A. **Remoção de auto-anticorpos de amostras séricas de pacientes com doenças auto-imunes empregando filtração em membranas de afinidade**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999.

- VIROONCHATAPAN, E. et al. Magnetic targeting of thermosensitive magnetoliposomes to mouse livers in an *in situ* on-line perfusion system. **Life Sciences**, v. 58, p. 2251-2261, 1996.

- VLADIMIRSKY, M.A. et al. A magnetic concentration method using hydrosol of ferric particles for diagnosing tuberculosis. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 1-3, p. 371-373, 1993.

- WINZOR, D.J. e SAWYER, W.H. **Quantitative Characterization of Ligand Binding**. 1ª ed., Nova York: Wiley-Liss, 1995.

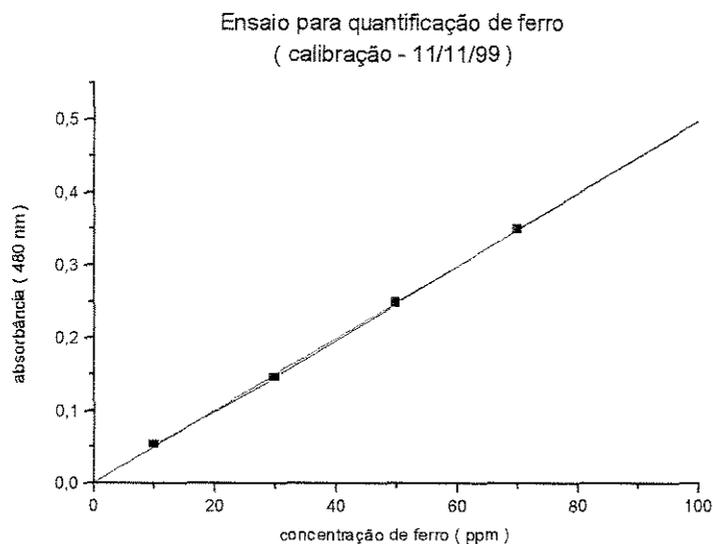
- YAMAMOTO, T. et al. Measurement of antiphospholipid antibody by ELISA using purified β_2 -glycoprotein I in preeclampsia. **Clinical Experimental Immunology**, v. 94, p. 196-200, 1993.

- YANASE, M. et al. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetic cationic liposomes: *ex vivo* study. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 88, p. 630-632, 1997.

- YOE, J.H. e JONES, A.L. Colorimetric determination of iron with disodium-dihydroxibenzene-3,5-disulfonate. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 16, p. 111-115, 1944.

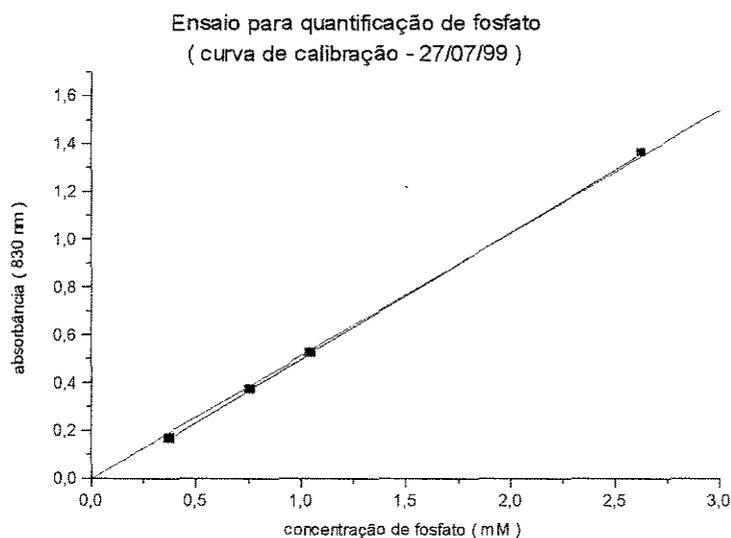
Anexo I – Curvas de calibração

a) Curva de calibração para quantificação de ferro



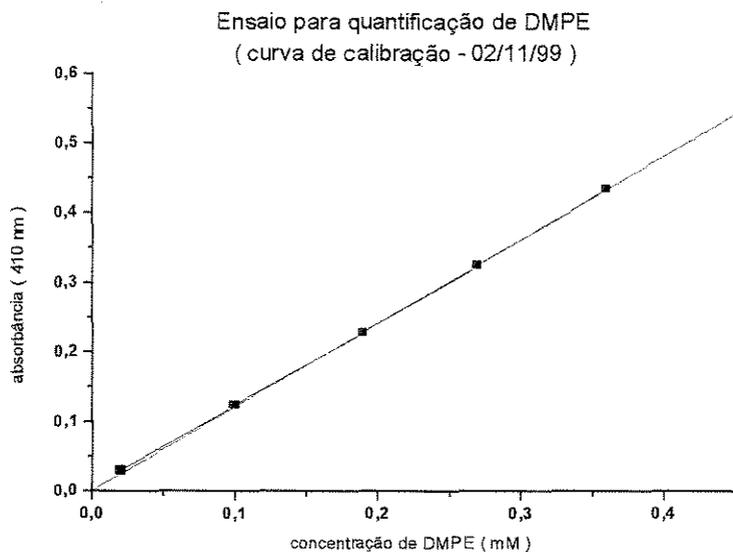
absorvância = 0.00498 * conc. Ferro / Coeficiente de regressão linear: R = 0.9998

b) Curva de calibração para quantificação de fosfolipídios



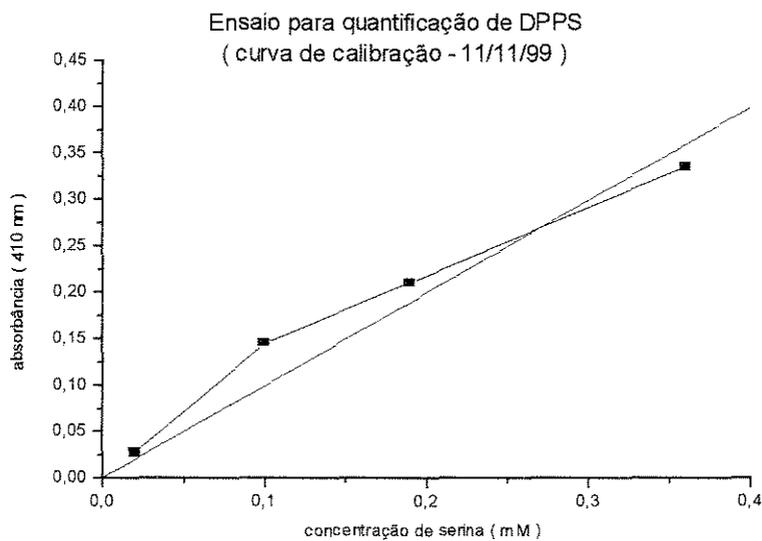
absorvância = 0.51285 * conc. de fosfato / Coeficiente de regressão linear: R = 0.9993

c) Curva de calibração para quantificação de etanolamina



Absorbância = 1.20544 * conc. DMPE / Coeficiente de regressão linear: R = 0.9999

d) Curva de calibração para quantificação de serina



absorbância = 0.99478 * conc. DPPS / Coeficiente de regressão linear: R = 0.9851

Anexo II - Balanços de massa - magnetoforese de alto gradiente

1) Magnetolipossomas contendo DMPE/DMPC (3:1)

Cinética

Fosfolipídio

<i>Tempo (h)</i>	<i>Entrada (mols x 10e6)</i>	<i>Saida (mols x 10e6)</i>		<i>total</i>	<i>% recuperada</i>
		<i>campo ligado</i>	<i>campo desligado</i>		
0,5	7,28	5,76	1,52	7,28	100
1	7,46	2,92	1,63	4,55	61
2	2,95	2,87	1,05	3,92	133
3	7,64	5,70	2,36	8,06	105
4	3,66	2,44	2,20	4,64	127
6	6,88	6,00	1,88	7,88	115
8	6,28	4,70	1,49	6,19	99
14	4,54	3,04	2,00	5,04	111
16	6,80	4,52	1,69	6,21	91
20	4,00	2,00	2,68	4,68	117
22	6,78	5,00	1,33	6,33	93
24	4,94	3,58	3,48	7,06	143
28	6,10	5,00	0,98	5,98	98
32	6,42	5,16	1,26	6,42	100
43	6,70	5,38	1,56	6,94	104
50	6,72	4,98	1,68	6,66	99

Ferro

<i>Tempo (h)</i>	<i>Entrada (mg)</i>	<i>Saida (mg)</i>		<i>total</i>	<i>% recuperada</i>
		<i>campo ligado</i>	<i>campo desligado</i>		
0,5	0,96	0,14	1,00	1,14	119
1	1,05	0,15	1,02	1,17	111
2	0,18	0,04	0,19	0,22	127
3	1,08	0,25	0,96	1,20	112
4	1,50	0,18	1,94	2,12	141
6	1,09	0,24	0,99	1,23	112
8	1,20	0,35	1,26	1,61	134
14	2,16	0,07	1,81	1,88	87
16	1,18	1,71	0,15	1,86	158
20	1,82	0,15	2,32	2,47	136
22	1,21	0,08	1,35	1,43	119
24	1,96	0,22	1,96	2,18	111
28	0,66	0,09	0,69	0,78	117
32	0,93	0,12	0,73	0,85	91
43	1,07	0,08	1,14	1,22	114
50	1,01	0,13	1,24	1,37	135

Isoterma**Fosfolipidio**

<i>mmol FL/g Fe</i>	<i>Entrada (mols x 10e6)</i>	<i>Saida (mols x 10e6)</i>		<i>total</i>	<i>% recuperada</i>
		<i>campo ligado</i>	<i>campo desligado</i>		
0,3	3,65	1,47	0,83	2,30	63
0,6	2,67	1,70	1,15	2,85	107
0,9	2,58	1,85	0,78	2,63	102
1,2	3,12	1,92	1,26	3,18	102
1,8	2,79	1,55	1,28	2,83	101
2,5	2,21	1,60	0,83	2,43	110
3,0	2,52	2,08	0,84	2,92	116
3,5	2,90	1,98	1,23	3,21	111
4,5	2,68	2,01	0,76	2,77	103
5,0	3,26	2,95	0,83	3,78	116

Ferro

<i>mmol FL/g Fe</i>	<i>Entrada (mg)</i>	<i>Saida (mg)</i>		<i>total</i>	<i>% recuperada</i>
		<i>campo ligado</i>	<i>campo desligado</i>		
0,3	5,20	0,10	1,28	1,38	27
0,6	2,85	0,08	1,85	1,93	68
0,9	0,97	0,11	0,85	0,95	99
1,2	1,80	0,12	1,31	1,43	79
1,8	2,00	0,04	1,46	1,50	75
2,5	0,82	0,04	0,67	0,71	87
3,0	0,46	0,03	0,62	0,65	140
3,5	0,60	0,07	0,74	0,81	134
4,5	0,63	0,06	0,60	0,66	105
5,0	0,59	0,07	0,59	0,66	111

2) Magnetolipossomas contendo DPPS/DMPC (1:4)

Isoterma

Fosfolipídio

<i>mmol PL/g Fe</i>	<i>Entrada (mols x 10e6)</i>	<i>Saída (mols x 10e6)</i>		<i>total</i>	<i>% recuperada</i>
		<i>campo ligado</i>	<i>campo desligado</i>		
0,3	0,44	0,29	0,12	0,41	93
0,6	0,65	0,57	0,14	0,71	110
0,9	0,93	0,80	0,18	0,98	105
1,2	1,02	0,90	0,17	1,07	104
1,8	1,74	1,50	0,24	1,74	100
2,5	2,43	2,11	0,24	2,35	97
3,0	2,56	2,29	0,35	2,64	103
3,5	3,43	3,04	0,36	3,40	99
4,5	4,48	3,99	0,39	4,38	98
5,0	5,11	4,47	0,45	4,92	96

Ferro

<i>mmol PL/g Fe</i>	<i>Entrada (mg)</i>	<i>Saída (mg)</i>		<i>total</i>	<i>% recuperada</i>
		<i>campo ligado</i>	<i>campo desligado</i>		
0,3	0,41	0,03	0,18	0,22	53
0,6	0,34	0,03	0,16	0,19	57
0,9	0,25	0,02	0,19	0,22	87
1,2	0,24	0,06	0,14	0,20	83
1,8	0,25	0,03	0,16	0,19	77
2,5	0,21	0,03	0,12	0,15	72
3,0	0,23	0,04	0,30	0,33	143
3,5	0,26	0,04	0,27	0,30	118
4,5	0,27	0,05	0,35	0,41	152
5,0	0,30	0,07	0,31	0,38	125

Cinética**Fosfolipídio**

<i>Tempo (h)</i>	<i>Entrada (mols x 10e6)</i>	<i>Saída (mols x 10e6)</i>		<i>total</i>	<i>% recuperada</i>
		<i>campo ligado</i>	<i>campo desligado</i>		
0,1667	2,56	2,46	0,12	2,58	101
0,5	3,04	2,94	0,20	3,14	103
1	2,94	3,12	0,17	3,29	112
6	3,30	2,80	0,24	3,04	92
8	1,61	1,33	0,23	1,56	97
16	1,78	1,57	0,21	1,78	100
24	1,75	1,54	0,17	1,71	97
40	1,83	1,69	0,20	1,89	103

Ferro

<i>Tempo (h)</i>	<i>Entrada (mg)</i>	<i>Saída (mg)</i>		<i>total</i>	<i>% recuperada</i>
		<i>campo ligado</i>	<i>campo desligado</i>		
0,1667	0,58	0,07	0,55	0,62	106
0,5	0,46	0,07	0,54	0,61	131
1	0,49	0,05	0,53	0,59	119
6	0,51	0,07	0,58	0,64	125
8	0,13	0,04	0,18	0,22	172
16	0,18	0,07	0,19	0,25	141
24	0,18	0,03	0,15	0,18	102
40	0,15	0,03	0,13	0,16	112

Anexo III – Memória de cálculo do número de sítios de ligação disponíveis

a) Magnetolipossomas contendo cardiolipina

Dados:

- Concentração de fosfolipídio total = $C_{FLtotal} = 1.05 \text{ mM}$
- Raio médio dos magnetolipossomas = $R = 82.5 \text{ nm}$
- Espessura da bicamada lipídica = $l = 4 \text{ nm}$
- Área ocupada pela molécula de DMPC = 0.71 nm^2
- Área ocupada pela molécula de CL = 1.78 nm^2
- Volume adicionado de magnetolipossoma para atingir a saturação = $V_{MLsat} = 600 \text{ }\mu\text{L}$

- Número de moléculas de fosfolipídio em solução:

$n_{FL} = V_{MLsat} \times C_{FLtotal} = 2 \times 10^{-4} \text{ L} \times 1.05 \times 10^{-3} \text{ mol/L} = 2.10 \times 10^{-7} \text{ mol} = 1.27 \times 10^{17} \text{ moléculas de fosfolipídio}$

- Número de moléculas de fosfolipídio / lipossoma:

$$N = \frac{4\pi R^2}{a} + \frac{4\pi(R-l)}{a} \quad (9)$$

onde a = área média ocupada pelas moléculas de fosfolipídio, que é dada pela média ponderada das áreas do DMPC e CL individualmente. Portanto:

$a = \text{fração molar de CL} \times \text{área ocupada pela molécula de CL} + \text{fração molar de DMPC} \times \text{área ocupada pela molécula de DMPC} = 0.5 \times 1.78 + 0.5 \times 0.71 \rightarrow a = 1.24 \text{ nm}^2$

Substituindo-se os dados na Equação (9), tem-se que $N = 1.31 \times 10^5$ moléculas de fosfolipídio / lipossoma.

- Quantidade de lipossomas em solução:

$$N_{lip} = n_{FLtotal} / N = 9.69 \times 10^{11} \text{ lipossomas}$$

- Número de moléculas de CL em solução/lipossoma:

$$N_{CL} = N \times \text{fração molar de CL} = 1.31 \times 10^5 \times 0.5 = 6.55 \times 10^4 \text{ moléculas de CL total/lipossoma}$$

- Número de moléculas de CL na superfície/lipossoma:

$$N_{CLsup} = 0.6 \times N_{CL} = 0.6 \times 6.55 \times 10^4 = 3.23 \times 10^4 \text{ moléculas de cardiolipina superficiais/lipossoma}$$

- Número de moléculas de CL disponíveis total:

$N_{CLdisp} = N_{CLsup} \times N_{lip} = 3.23 \times 10^4 \times 9.69 \times 10^{11} = 3.80 \times 10^{16}$ moléculas de CL disponíveis na superfície dos magnetolipossomas

No ensaio em batelada, a solução original de magnetolipossomas foi diluída 200 vezes para a realização deste ensaio, portanto $N_{CLdisp} = 1.90 \times 10^{14}$, em cada fração de 200 μL utilizada.

b) Magnetolipossomas contendo etanolamina

Dados:

- Concentração de fosfolipídio total = $C_{FLtotal} = 0.91 \text{ mM}$
- Raio médio dos magnetolipossomas = $R = 192 \text{ nm}$
- Espessura da bicamada lipídica = $l = 4 \text{ nm}$
- Área ocupada pela molécula de DMPC = 0.71 nm^2
- Área ocupada pela molécula de DMPE = 0.41 nm^2

- Número de moléculas de fosfolipídio em solução:

$n_{FL} = V_{MLsat} \times C_{FLtotal} = 1 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0.91 \times 10^{-3} \text{ mol/L} = 9.1 \times 10^{-7} \text{ mol} = 1.27 \times 10^{17} \text{ moléculas de fosfolipídio}$

- Número de moléculas de fosfolipídio / lipossoma:

$$N = \frac{4\pi R^2}{a} + \frac{4\pi(R-l)}{a} \quad (9)$$

onde a = área média ocupada pelas moléculas de fosfolipídio, que é dada pela média ponderada das áreas do DMPC e PE individualmente. Portanto:

$a = \text{fração molar de DMPE} \times \text{área ocupada pela molécula de DMPE} + \text{fração molar de DMPC} \times \text{área ocupada pela molécula de DMPC} = 0.75 \times 0.41 + 0.25 \times 0.71 \rightarrow a = 0.49 \text{ nm}^2$

Substituindo-se os dados na Equação (9), tem-se que $N = 1.036 \times 10^7$ moléculas de fosfolipídio / lipossoma.

- Quantidade de lipossomas em solução:

$$N_{lip} = n_{FLtotal} / N = 5.28 \times 10^{10} \text{ lipossomas}$$

- Número de moléculas de DMPE em solução/lipossoma:

$N_{PE} = N \times \text{fração molar de DMPE} = 1.036 \times 10^7 \times 0.75 = 7.77 \times 10^6$ moléculas de DMPE total/lipossoma

- Número de moléculas de DMPE na superfície/lipossoma:

$$N_{PEsup} = 0.6 \times N_{PE} = 0.6 \times 7.77 \times 10^6 = 4.66 \times 10^6 \text{ moléculas de DMPE superficiais/lipossoma}$$

- Número de moléculas de DMPE disponíveis total:

$N_{PEdisp} = N_{PEsup} \times N_{lip} = 4.66 \times 10^6 \times 5.28 \times 10^{10} = 2.46 \times 10^{17}$ moléculas de DMPE disponíveis na superfície dos magnetolipossomas

c) Magnetolipossomas contendo serina

Dados:

- Concentração de fosfolípido total = $C_{FLtotal} = 0.75$ mM
- Raio médio dos magnetolipossomas = $R = 106$ nm
- Espessura da bicamada lipídica = $l = 4$ nm
- Área ocupada pela molécula de DMPC = 0.71 nm²
- Área ocupada pela molécula de DPPS (supondo semelhante à etanolamina) = 0.41 nm²

- Número de moléculas de fosfolípido em solução:

$n_{FL} = V_{MLsat} \times C_{FLtotal} = 1 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0.75 \times 10^{-3} \text{ mol/L} = 7.5 \times 10^{-7} \text{ mol} = 4.52 \times 10^{17}$ moléculas de fosfolípido

- Número de moléculas de fosfolípido / lipossoma:

$$N = \frac{4\pi R^2}{a} + \frac{4\pi(R-l)}{a} \quad (9)$$

onde a = área média ocupada pelas moléculas de fosfolípido, que é dada pela média ponderada das áreas do DMPC e PE individualmente. Portanto:

$a = \text{fração molar de DPPS} \times \text{área ocupada pela molécula de DPPS} + \text{fração molar de DMPC} \times \text{área ocupada pela molécula de DMPC} = 0.20 \times 0.41 + 0.80 \times 0.71 \rightarrow a = 0.65 \text{ nm}^2$

Substituindo-se os dados na Equação (9), tem-se que $N = 4.18 \times 10^5$ moléculas de fosfolípido / lipossoma.

- Quantidade de lipossomas em solução:

$$N_{lip} = n_{FLtotal} / N = 1.08 \times 10^{12} \text{ lipossomas}$$

- Número de moléculas de DPPS em solução/lipossoma:

$$N_{PS} = N \times \text{fração molar de DPPS} = 4.18 \times 10^5 \times 0.20 = 8.36 \times 10^4 \text{ moléculas de DPPS total/lipossoma}$$

- Número de moléculas de DPPS na superfície/lipossoma:

$$N_{PSsup} = 0.6 \times N_{PS} = 0.6 \times 8.36 \times 10^4 = 5.01 \times 10^4 \text{ moléculas de DPPS superficiais/lipossoma}$$

- Número de moléculas de DPPS disponíveis total:

$$N_{PSdisp} = N_{PSsup} \times N_{lip} = 5.01 \times 10^4 \times 1.08 \times 10^{12} = 5.41 \times 10^{16} \text{ moléculas de DPPS disponíveis na superfície dos magnetolipossomas}$$