



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MAGNÉTICO POLIMÉRICO CONTENDO  
ANTIMICROBIANOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR  
*Helicobacter pylori***

**AUTOR: Thales Renan Ferreira Pontes  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Artur da Silva Carriço  
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito**

**NATAL/RN**

**2014**

**THALES RENAN FERREIRA PONTES**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MAGNÉTICO POLIMÉRICO CONTENDO  
ANTIMICROBIANOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR  
*Helicobacter pylori***

**Documento de dissertação apresentado ao  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Farmacêuticas, da Universidade Federal do  
Rio Grande do Norte, como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**NATAL/RN  
2014**

Catálogo da Publicação na Fonte  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Pontes, Thales Renan Ferreira.

Desenvolvimento de sistema magnético polimérico contendo antimicrobianos para tratamento de infecções por helicobacter pylori / Thales Renan Ferreira Pontes. - Natal, 2014.

76f: il.

Coorientador: Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito.

Orientador: Prof. Dr. Artur da Silva Carriço.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Anti-Infeciosos - Dissertação. 2. Antibióticos - Dissertação. 3. Helicobacter pylori - Dissertação. 4. Antimicrobianos - Vetorização magnética de fármacos - Dissertação. I. Carriço, Artur da Silva. II. Título.

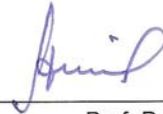
RN/UF/BSA01

CDU 615.33(043.3)

THALES RENAN FERREIRA PONTES

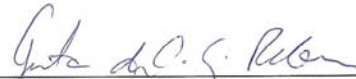
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MAGNÉTICO POLIMÉRICO CONTENDO  
ANTIMICROBIANOS PARA TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR  
*Helicobacter pylori*

**Banca examinadora:**



---

Prof. Dr. Artur da Silva Carriço  
Presidente – UFRN



---

Prof. Dr. Gustavo de Oliveira Gurgel Rebouças  
Examinador Externo – UFERSA/RN



---

Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa  
Examinador Interno – UFRN

Natal, 24 de Fevereiro de 2014

**NATAL/RN**

**2014**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais (Ilma D'arc Ferreira da Silva e José Judas Tadeu Pontes).

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter dado o dom da vida, cuidando de todos nós, dando saúde, paz e amor necessário para vivermos.

A toda minha família, em especial aos meus pais, Ilma D'arc Ferreira da Silva e José Judas Tadeu Pontes por terem me dado amor, atenção e apoio, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Artur Carriço, pelo empenho na minha formação e imensa dedicação aos alunos. Bem como, seu enorme investimento profissional e pessoal em prol da minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Sócrates Egito, pelas oportunidades concedidas no LASID, pela confiança dispensada e pelo incentivo à autonomia dos alunos.

Ao Prof. Aldo Medeiros pela colaboração no projeto de vetorização magnética de antimicrobianos.

Aos Professores Marco Torres e Ana Dantas por terem auxiliado nas discussões dos resultados e correções do artigo.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos professores responsáveis pelos laboratórios nos quais pudemos utilizar os equipamentos e aos técnicos responsáveis pelos mesmos.

Às instituições de fomento CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

À Amanda Silva por ter inserido a física no ambiente farmacêutico e ser uma das responsáveis por levar a farmácia ao grupo de magnetismo da UFRN.

Às companheiras de equipe Érica Freitas e Juliana Fernandes pelo aceite no grupo de magnetismo e por toda a paciência, atenção, dedicação ao longo desses anos.

À Kátia Silva e Ítalo Damasceno pela ajuda nos experimentos deste trabalho.

A Rafael por ter sido um grande amigo e um colega de trabalho singular. Agradeço não só por ter me ajudado no desenvolvimento do projeto, mas também por ser um amigo para todas as horas.

A todos da equipe LASID e BIOMAG pela experiência e ensinamentos transmitidos, pelos momentos de aprendizagem, pelos de descontração e pelo companheirismo e espírito de trabalho em equipe ao longo desses sete anos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

E especialmente à minha namorada Cândida Mendonça pela atenção, amor e companheirismo.

## RESUMO

A *Helicobacter pylori* é a principal causa de gastrites, úlceras gastroduodenais e câncer gástrico. O esquema terapêutico de primeira escolha para a erradicação desse patógeno leva muitas vezes a elevado número de reações adversas, baixa adesão do paciente e conseqüentemente falha na terapêutica. A vetorização magnética é uma técnica bastante difundida na literatura que visa minimizar esses problemas, através da associação de fármacos a núcleos magnéticos direcionando para o local de ação por intermédio de campo magnético externo. O presente trabalho relata o estudo da síntese e caracterização de partículas poliméricas magnéticas contendo os mais frequentes antimicrobianos (amoxicilina e claritromicina) usados no tratamento de infecções por *Helicobacter pylori*, objetivando a produção de um sistema para vetorização magnética por via oral. Granulometria baseada no diâmetro de Feret, microscopia eletrônica de varredura e transmissão, difratometria de raio-x, isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e magnetometria de amostra vibrante revelaram que as partículas de magnetita, produzidas pelo método da coprecipitação, consistem em grande número de agregados de cristalitos de tamanhos nanométricos (da ordem de 6 nm) os quais formam partículas micrométricas superparamagnéticas de alta susceptibilidade magnética, tendo formato irregular com diâmetro médio de  $6,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . Os núcleos magnéticos foram revestidos por polímero (Eudragit<sup>®</sup> S100) em conjunto com amoxicilina e claritromicina (forma polimórfica II) sendo obtido micropartículas núcleo-camada de formato irregular, pela técnica de secagem por aspersão (*spray dryer*), com um diâmetro médio de  $14,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ . A quantidade de magnetita presente no sistema pode ser adaptada pelo controle da suspensão inicial usada na alimentação do *spray dryer*. No presente trabalho o conteúdo magnético final foi estimado em 2,9 % (p/p). Com base nos resultados obtidos, o sistema magnético produzido pode se tornar bastante promissor na erradicação de infecções por *Helicobacter pylori*.

**Palavras-chave:** *Helicobacter pylori*, Vetorização magnética de fármacos, Antimicrobianos, Secagem por aspersão, Eudragit<sup>®</sup> S100, Partículas superparamagnéticas.



## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is the main cause of gastritis, gastroduodenal ulcer disease and gastric cancer. The most recommended treatment for eradication of this bacteria often leads to side effects and patient poor compliance, which induce treatment failure. Magnetic drug targeting is a very efficient method that overcomes these drawbacks through association of the drug with a magnetic compound. Such approach may allow such systems to be placed slowed down to a specific target area by an external magnetic field. This work reports a study of the synthesis and characterization of polymeric magnetic particles loaded with the currently used antimicrobial agents for the treatment of *Helicobacter pylori* infections, aiming the production of magnetic drug delivery system by oral route. Optical microscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, x-ray powder diffraction, nitrogen adsorption/desorption isotherms and vibrating sample magnetometry revealed that the magnetite particles, produced by the co-precipitation method, consisted of a large number of aggregated nanometer-size crystallites (about 6 nm), creating superparamagnetic micrometer with high magnetic susceptibility particles with an average diameter of  $6.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ . Also, the polymeric magnetic particles produced by spray drying had a core-shell structure based on magnetite microparticles, amoxicillin and clarithromycin and coated with Eudragit<sup>®</sup> S100. The system presented an average diameter of  $14.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ . The amount of magnetite present in the system may be tailored by suitably controlling the suspension used to feed the spray dryer. In the present work it was 2.9% (w/w). The magnetic system produced may prove to be very promising for eradication of *Helicobacter pylori* infections.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, Magnetic drug targeting, Antimicrobial agents, Spray drying, Eudragit<sup>®</sup> S100, Superparamagnetic particles.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da inserção da <i>Helicobacter pylori</i> na mucosa estomacal. ....	16
Figura 2 - Estrutura química da amoxicilina. ....	17
Figura 3 - Estrutura química da claritromicina. ....	18
Figura 4 – Representação da vetorização magnética de fármacos para região infectada por <i>H. pylori</i> .....	20
Figura 5 – Célula unitária de magnetita.....	22
Figura 6 – Estrutura química do Eudragit® S100.....	25
Figura 7 – Esquema do processo de secagem por aspersão ( <i>spray-drying</i> ). ....	25
Figura 8 – Esquema da metodologia experimental para a produção de partículas de magnetita.....	28
Figura 9 – Esquema da metodologia experimental para a produção de micropartículas magnéticas revestidas com polímero contendo antimicrobianos. ....	29
Figura 10 – Distribuição granulométrica de PM (A) e PMP (B). ....	33
Figura 11 – MEV de PM. ....	35
Figura 12 – MEV de PMP.....	35
Figura 13 – MET de PM. ....	36
Figura 14 – Distribuição do tamanho dos cristalitos de PM.....	36
Figura 15 - MET de PMP.....	37
Figura 16 - Difractometria de raio-x de PM. ....	38
Figura 17 - Difractometria de raio-x de PMP e seus componentes. ....	39
Figura 18 - Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio para PM (A) e PMP (B). ....	40
Figura 19 - Distribuição do tamanho de poros de PM (A) e PMP (B). ....	41
Figura 20 - Medidas de magnetometria de amostra vibrante das PMP e seus componentes.....	43
Figura 21 - Susceptibilidade magnética experimental de PM.....	44
Figura 22 - Magnetização, susceptibilidade magnética experimental e simulada com e sem interação dipolar para PM.....	44
Figura 23 - Magnetização, susceptibilidade magnética experimental e simulada sem interação dipolar para PM e partículas de 6 nm e 8 nm. ....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BET</b>	Brunauer-Emmet-Teller
<b>BIOMAG</b>	Biomagnetismo
<b>BJH</b>	Barret, Joyner e Halenda
<b>Cag</b>	Gene associado à citotoxina
<b>CAPES</b>	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DRX</b>	Difração de raio-x
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b><i>H. pylori</i></b>	<i>Helicobacter pylori</i>
<b>Hc</b>	Coercividade
<b>IP</b>	Índice de polidispersividade
<b>IUPAC</b>	<i>International union of pure and applied chemistry</i>
<b>JCPDS</b>	<i>Joint Committee on powder diffraction standards</i>
<b>LASID</b>	Laboratório de Sistemas Dispersos
<b>MAV</b>	Magnetometria de amostra vibrante
<b>MET</b>	Microscopia eletrônica de transmissão
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MR</b>	Magnetização remanescente
<b>OMS</b>	Organização mundial da saúde
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PM</b>	Partículas magnéticas
<b>PMP</b>	Partículas magnéticas poliméricas
<b>UFRN</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>T</b>	Tesla
<b>®</b>	Marca registrada
<b>D1</b>	Primeiro decil
<b>D5</b>	Quinto decil
<b>D9</b>	Nono decil
<b>D</b>	Tamanho do cristalito
<b><math>\lambda</math></b>	Comprimento de onda do raio-X
<b><math>\beta</math></b>	Alargamento da linha de difração determinada à meia altura da máxima intensidade do pico
<b><math>\theta</math></b>	Ângulo de incidência do feixe
<b>C</b>	Constante do BET
<b><math>V_m</math></b>	Volume de gás adsorvido em função da pressão relativa
<b><math>S_w</math></b>	Área superficial do material estudado
<b>S</b>	Área ocupada por molécula do gás adsorvente
<b>N</b>	Número de Avogadro
<b>H</b>	Campo magnético

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	15
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	26
3.1	Objetivos gerais	26
3.2	Objetivos específicos	26
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
5.1	Materiais	27
5.2	Síntese das partículas magnéticas	27
5.3	Produção das partículas magnéticas poliméricas contendo antimicrobianos	28
5.4	Caracterização do sistema magnético	29
5.4.1	Granulometria	29
5.4.2	Microscopia eletrônica de varredura e transmissão	30
5.4.3	Difração de raio-X	30
5.4.4	Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio	31
5.4.5	Magnetometria de amostra vibrante	31
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	33
6.1	Granulometria	33
6.2	Microscopia eletrônica de varredura e transmissão	35
6.3	Difração de raio-X	38
6.4	Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio	39
6.5	Magnetometria de amostra vibrante	42
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	48
	<b>REFERÊNCIAS</b>	50
	<b>APÊNDICE – Artigo submetido ao <i>Journal of Magnetism and Magnetic Materials</i></b>	57
	<b>ANEXO – Normas do <i>Journal of Magnetism and Magnetic Materials</i></b>	65

## 1 INTRODUÇÃO

No começo do século XX, doenças infecciosas foram a principal causa de morte em todo mundo (COHEN, 2000). A diminuição da morbidade e mortalidade causadas por essas doenças foi atribuída principalmente à introdução de antibióticos. No entanto, atualmente, a resistência dos microorganismos aos agentes antimicrobianos existentes atingiu um nível crítico, tornando inválido grande parte dos antimicrobianos que são corriqueiramente usados na clínica (GOLD; MOELLERING, 1996; WALSH, 2000).

Neste cenário surge a necessidade de criar novas alternativas de debelar infecções causadas por patógenos resistentes como a síntese de novos fármacos e a modificação química de princípios ativos. Infelizmente, não existe garantia de que novos antimicrobianos possam desempenhar ação de forma eficiente frente ao patógeno, devido ao desenvolvimento de resistência pelos microorganismos (SIEGEL, 2008). Dessa forma, a síntese e modificação química de fármacos é um investimento de retorno não garantido, sendo um dos principais motivos do número de novos agentes terapêutico desta classe aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) ter diminuído com o tempo (TAUBES, 2008).

Uma promissora e interessante alternativa para a problemática é a utilização de nanoantimicrobianos para o tratamento de muitas doenças. Os nanoantimicrobianos são subdivididos em: nanomateriais antimicrobianos (nanopartículas de prata; óxido de zinco; dióxido de titânio; ouro; alumínio; cobre; quitosana; fulerenos; nanotubo de carbono; partículas com óxido nítrico; nanoemulsões) que possuem atividade antimicrobiana inata e os sistemas de liberação de antimicrobianos (lipossoma; nanopartícula lipídica sólida; nanopartícula polimérica e dendrímero). Os nanoantimicrobianos, assim como a síntese de novos fármacos e a modificação química de princípio ativo, são fortemente influenciados pela resistência bacteriana. Todavia, por possibilitar redução das doses/frequência de administração, diminuição das reações adversas, aumento da solubilidade de antimicrobianos pouco solúveis na água, liberação controlada de fármacos permitem uma terapia mais racional de fármacos (HUH; KWON, 2011).

Um aspecto bastante importante a ser levado em consideração no desenvolvimento de sistemas gastroretentivos para a erradicação de patógeno que pode habitar a região estomacal, como a *Helicobacter pylori*, é o tamanho das partículas. Sabe-se que partículas nanométricas possuem grande capacidade de difusão (acumulando-se nos espaços intercelulares das células epiteliais da mucosa) e elevada interação com o sistema imune (captação por macrófagos) quando comparado com micropartículas. Dessa forma, partículas micrométricas são mais eficientes para a retenção gástrica (COLLNOT; ALI; LEHR, 2012).

Partículas magnéticas apresentam uma diversidade de aplicação: biosseparação magnética (BRUCE *et al.*, 2004); marcação celular e diagnóstico (AZZAZY; MANSOUR, 2009); agentes de contraste para imagens de ressonância magnética (TSAI *et al.*, 2010); hipertermia magnética (PURUSHOTHAM; RAMANUJAN, 2010); vetorização de fármacos (SILVA *et al.*, 2010). No que se refere à vetorização de fármacos as partículas magnéticas foram relatadas na literatura uma única vez, associadas a único antimicrobiano (amoxicilina) destinado a vetorização magnética por via oral, a qual consiste em associar um núcleo magnético ao fármaco e no direcionamento do sistema ao local de ação por intermédio de campo magnético externo, para a erradicação de infecções causadas por *Helicobacter pylori* (SILVA *et al.*, 2009).

O presente trabalho propõe o desenvolvimento e a caracterização físico-química de um sistema magnético polimérico microparticulado contendo os principais antimicrobianos (amoxicilina e claritromicina) usados no tratamento de infecções causadas por *H. pylori*.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa, microaerófila, espiralada, catalase/oxidase positiva cuja mobilidade rápida é proporcionada por seus flagelos polares (HARVEY, 2008). Foi descrita por Warren e Marshall em 1983 (WARREN; MARSHALL, 1983) e por essa descoberta esses cientistas receberam o prêmio Nobel de medicina em 2005 (MAJUMDAR; BEBB; ATHERTON, 2011).

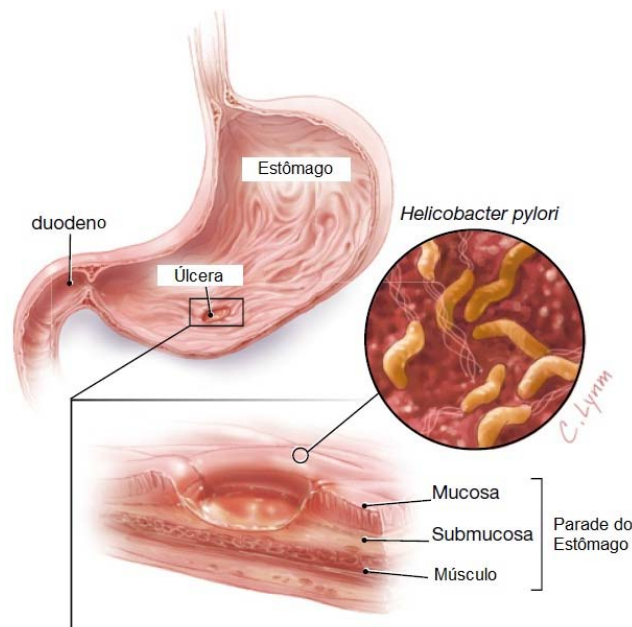
A *H. pylori* é a principal causadora de gastrites, úlceras gastroduodenais e câncer gástrico (GISBERT; PAJARES, 2010). De acordo com a organização mundial de saúde (OMS) 70% da população dos países em desenvolvimento e 20 a 30% da população dos países desenvolvidos estão infectados por essa bactéria. Nos Estados Unidos, mais de 50% das pessoas acima de 60 anos apresentam a infecção causada por *H. pylori*, sendo responsável por 60% a 80% dos casos de úlceras gástricas e 70% a 90% das úlceras duodenais (HILDRETH; LYNM; GLASS, 2008).

No Brasil, diversos estudos mostram índices elevados de prevalência, podendo variar entre 59,5 e 96% desta infecção entre indivíduos sadios e de grupo de risco (fumantes e alcoólatras). A principal via de transmissão deste patógeno é a oral o que pode aumentar a chance de transmissão e de contágio (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003). Com base nos dados relatados é possível afirmar que a infecção por *H.pylori* trata-se de um grave problema de saúde pública.

A infecção por esse microorganismo ocorre pela penetração através da camada da mucosa gástrica. Este se fixa a vários fosfolípidos, glicolípidos na superfície das células epiteliais (figura 1), região onde o pH é aproximadamente 7,0 (YANG; ESHRAGHI; FASSIHI, 1999). No lúmen estomacal a *H. pylori* catalisa a hidrólise da uréia em amônia através da urease o que permite a elevação do pH ao seu redor fornecendo condições favoráveis ao seu desenvolvimento. (OPLUSTIL, 2001).



Figura 1 - Representação esquemática da inserção da *Helicobacter pylori* na mucosa estomacal.



Fonte: (HILDRETH; LYNN; GLASS, 2008).

A colonização da bactéria no tecido gástrico é quase sempre acompanhada por processo inflamatório o qual é uma resposta imunológica do corpo frente à bactéria. O processo de fixação da bactéria na mucosa gástrica e a redução do pH, na tentativa de debelar esse evento, causa inicialmente inflamação leve e superficial no antro gástrico. Com o tempo a inflamação vai se estendendo, resultando na redução da secreção e, às vezes, na perda de células parietais, causando atrofia gástrica. Em consequência disso, a inflamação pode passar de gastrite superficial para câncer gástrico (SUERBAUM, 2002).

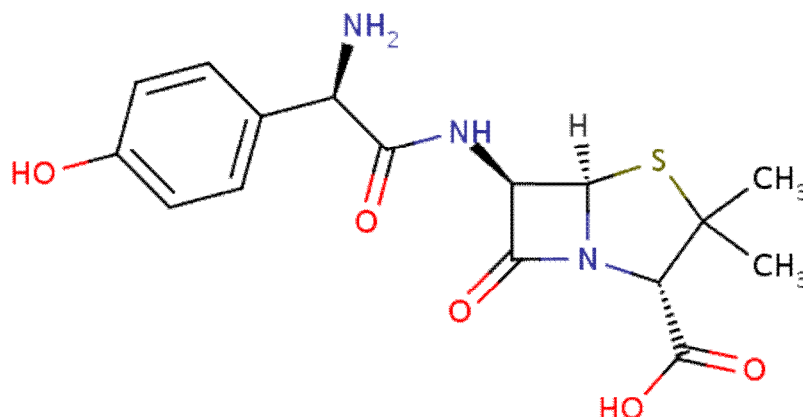
O processo inflamatório está associado à cepa de *H. pylori* que pode apresentar uma variedade genotípica, cujos produtos desencadeiam processo inflamatório, por meio de mediadores e citocinas, os quais podem levar a diferentes graus de resposta inflamatória no hospedeiro, resultando em quadros patológicos diversos. Cepas de *H. pylori* com o gene de patogenicidade *Cag* (gene associado à citotoxina) induzem resposta inflamatória mais grave, através da ativação da transcrição de genes, aumentando o risco para desenvolvimento de úlcera péptica e câncer gástrico. Somado a isso, os radicais livres, gerados em resposta a mediadores pró-inflamatórios e produtos da parede celular bacteriana,

reagem com o DNA do hospedeiro podendo induzir alteração da expressão de proto-oncogenes, bem como gerar produtos genotóxicos capazes de interagir com alvos moleculares no DNA do paciente ou converter pró-carcinógenos em cancerígenos (LADEIRA; SALVADORI; RODRIGUES, 2003).

O esquema terapêutico mais comumente usado para o tratamento de infecções causadas por *Helicobacter pylori* é a tripla terapia, a qual envolve a utilização de um inibidor da bomba de prótons (como por exemplo omeprazol, 20 mg duas vezes ao dia), e o uso de dois antimicrobianos: amoxicilina (1000 mg duas vezes ao dia) e claritromicina (500 mg duas vezes ao dia) durante período de 7 a 14 dias (MALFERTHEINER *et al.*, 2007).

A amoxicilina (figura 2) é um  $\beta$ -lactâmico semi-sintético de grande prescrição e de elevada produção mundial, pertencente a classe das penicilinas, possuindo espectro moderado contra vários tipos de microorganismos (inclusive *Helicobacter pylori*). Usualmente, é o mais utilizado fármaco de sua classe, pois pode ser administrado pela via oral e tem boa absorção no trato gastrointestinal. A amoxicilina inibe a síntese da parede celular de bactérias causando lise e morte bacteriana (BEBU *et al.*, 2011). Sua ação pode ser reduzida em pH ácido isso se deve ao fato da amoxicilina sofrer degradação, principalmente em pH próximos de 1,0 (SINGH *et al.*, 2010).

Figura 2 - Estrutura química da amoxicilina.



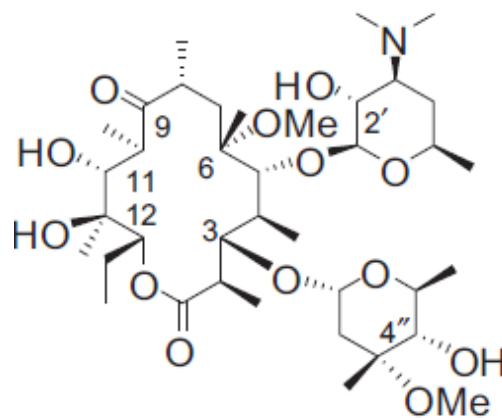
Fonte: (BITTNER *et al.*, 2011).

O outro fármaco utilizado no tratamento de infecções causadas por *Helicobacter pylori* é a Claritromicina (figura 3) que é um macrolídeo semi-sintético e semelhante à amoxicilina apresenta boa absorção oral. Possui amplo

espectro frente a diversas cepas de bactéria (incluindo para a *Helicobacter pylori*). Sua ação se processa pela ligação a subunidade 50S do ribossomo da bactéria o que leva ao bloqueio da síntese de proteínas, posteriormente levando a morte bacteriana (MA *et al.*, 2011). Apesar de ser mais estável em ambiente ácido que a eritromicina A (antimicrobiano que a claritromicina deriva), a claritromicina sofre degradação em pH abaixo de 3,0 (MORDI *et al.*, 2000).

A claritromicina apresenta polimorfismo, tendo quatro distintas formas cristalinas (0,I,II,IV). Sendo a forma II a mais estável e utilizada em formulações de medicamentos no mercado farmacêutico (GOMEZ-BURGAZ; TORRADO; TORRADO, 2009).

Figura 3 - Estrutura química da claritromicina.



Fonte: (CONG *et al.*, 2011).

O polimorfismo (quando uma substância apresenta diferentes formas cristalinas) é um importante aspecto a ser estudado durante o desenvolvimento e formulação de medicamentos uma vez que diferentes polimórficos podem apresentar distintas solubilidades, estabilidades, perfil de dissolução e biodisponibilidade. Consequentemente, pode afetar drasticamente a resposta terapêutica esperada (OROLA *et al.*, 2012).

Durante as duas últimas décadas, o uso indiscriminado de certos antimicrobianos (como por exemplo a claritromicina para infecções respiratórias) na população em geral tem levado ao aumento de resistência por parte da *Helicobacter pylori*. Consequentemente, a efetividade inicial da tripla terapia tem

progressivamente diminuído. Portanto, novas estratégias para melhorar o tratamento de primeira escolha se fazem necessárias (GISBERT; PAJARES, 2010; GISBERT; CALVET, 2011).

Dessa forma, Apesar da *H. pylori* apresentar certa sensibilidade aos antimicrobianos da tríplice terapia, a erradicação dessa bactéria requer altas doses dos mesmos para atingir nível de concentração na mucosa gástrica capaz de erradicar a bactéria (devido a fatores como: esvaziamento gástrico e a distribuição sistêmica). Além disso, reações adversas, alta frequência de administração, baixa adesão do paciente a terapêutica e a resistência bacteriana contribuem para falha do tratamento, principalmente quando se trata de monoterapia (RAJINIKANTH; MISHRA, 2008).

Uma forma de se reduzir a concentração do fármaco na circulação sistêmica e aumentar na mucosa gástrica com conseqüente erradicação da *Helicobacter pylori* é através do incremento do tempo de permanência dos antimicrobianos no estômago. Permitindo assim, maior tempo de contato dos fármacos com a mucosa gástrica possibilitando aumento da permeação dos antimicrobianos no tecido e ação na infecção (RAJINIKANTH; MISHRA, 2009).

Com esse propósito sistemas gastroretensivos (como os de alta densidade, fluotável, expansível, hidrogel superporoso, mucoadesivo) têm sido estudados e desenvolvidos, dentre eles o sistema magnético (BARDONNET *et al.*, 2006).

Além dos sistemas gastroretensivos a combinação de fármacos em uma mesma formulação como proposto em vários estudos relatados na literatura para diferentes doenças vem sendo apontada como uma promissora alternativa (REJINOLD *et al.*, 2014).

No caso particular dos antimicrobianos essa associação tem mostrado ser de grande valia, uma vez que permite atingir concentrações adequadas de fármacos na região infectada pelo microorganismo, reduzindo o risco de resistência bacteriana e permitindo um tratamento mais efetivo (GUILLAUME *et al.*, 2012).

Na presente dissertação é apresentado pela primeira vez, ao nosso conhecimento, um sistema com os principais antimicrobianos utilizados na erradicação de infecções por *Helicobacter pylori* com a associação da vetorização magnética de fármacos.

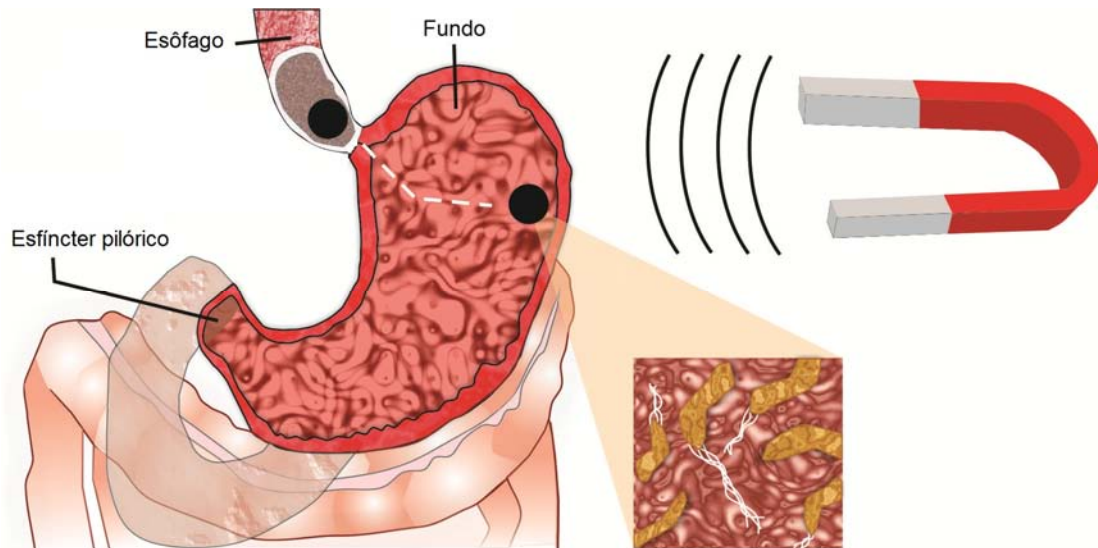
A vetorização magnética de fármacos consiste em associar um fármaco a uma partícula magnética, sendo o direcionamento do mesmo ao local de ação feito por intermédio de campo magnético externo (HÄFELI, 2004).

Essa técnica tem sido amplamente estudada, principalmente no que se refere ao tratamento de câncer (GAUTIER *et al.*, 2012), inclusive já foi realizado estudos em seres humanos (estudo de fase I com epidoxorrubicina) no tratamento de tumores sólidos avançados com resultados bastante promissores (LUBBE *et al.*, 1996).

Contudo, há poucos relatos da vetorização magnética oral de fármacos para a região estomacal. Em um desses, os autores demonstram a possibilidade de reter microesferas magnéticas contendo ranitidina na região estomacal de ratos Wistar utilizando campo magnético externo de 0,8 T (SARAVANAN *et al.*, 2009).

O grupo liderado pelo Prof. Dr. Carriço é um dos pioneiros a propor um sistema magnético polimérico com único antimicrobiano (amoxicilina) destinado a erradicação de infecções causadas por *Helicobacter pylori* (SILVA *et al.*, 2009). O sistema proposto deverá ser posicionado na região do trato gastrointestinal acometida pela infecção, através do uso de campo magnético externo gerado por imãs (figura 4), aumentando o tempo de permanência do fármaco no local de interesse (SILVA *et al.*, 2009).

Figura 4 – Representação da vetorização magnética de fármacos para região infectada por *H. pylori*.



Fonte: Autoria do grupo de biomagnetismo da UFRN.

No corpo humano, após exercerem sua função de vetor, os óxidos de ferro (núcleos magnéticos) utilizados na produção do sistema são internalizados em células fagocitárias. Uma vez dentro dos macrófagos, as partículas são agrupadas nos lisossomos onde ocorrerá a degradação dos óxidos em ferro e oxigênio. Esse processo é influenciado pela variedade de enzimas hidrolíticas e baixo pH. Em seguida, o ferro é incorporado no organismo (hemoglobina, fígado e baço). Como a homeostase desse elemento é regida pela absorção, excreção e deposição, é esperado que depois da administração de partículas que contém ferro, a captação do mesmo no intestino seja temporariamente diminuída e a excreção aumentada. Por esses motivos, tais óxidos já são comercialmente disponíveis como contrastes para ressonância magnética o que comprova a segurança dos mesmos (WEISSLEDER *et al.*, 1995; BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002).

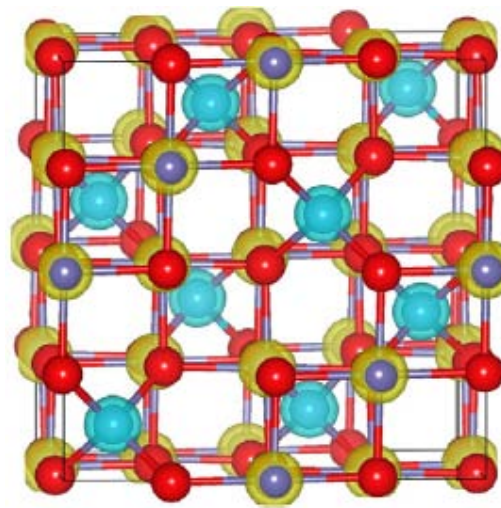
Os vetores magnéticos possuem mobilidade na presença de campo magnético, sendo os mais difundidos na prática médica a maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) por apresentarem propriedades magnéticas apropriadas e compatibilidade biológica (PETCHAROEN; SIRIVAT, 2012).

A magnetita apresenta, de um modo geral, propriedades magnéticas melhores que a maghemita como magnetização de saturação e susceptibilidade magnética maiores. Dessa forma, mesmo com a aplicação de baixos valores de

campo magnético externo as partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tendem a responder mais avidamente ao campo do que as de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (WEI *et al.*, 2011).

A  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  possui estrutura do tipo espinélio inverso,  $\text{AB}_2\text{O}_4$  (A corresponde à simetria de coordenação de  $\text{Fe}^{+3}$  tetraédrico e B à simetria de coordenação  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Fe}^{+2}$  octaédrico), em que os íons  $\text{O}^{2-}$  formam um arranjo cúbico denso de face centrada, gerando dois tipos de sítios de coordenação, o primeiro, tetraédrico (T) formado por quatro íons oxigênio, e o segundo, octaédrico, formado por seis íons oxigênio (figura 5). Nos sítios T posicionam-se os íons de  $\text{Fe}^{+3}$  e nos sítios octaédricos posicionam-se iguais números de íons  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Fe}^{+2}$ . Esta disposição resulta em 24 átomos de Fe (16 íons  $\text{Fe}^{+3}$  e 8 íons  $\text{Fe}^{+2}$ ), com fórmula mínima de  $\{(\text{8Fe}^{+3})_{\text{T}}[(\text{8Fe}^{+2})(\text{8Fe}^{+3})]_{\text{o}}\text{O}_{32}\}$ , arranjados em uma célula unitária composta por 8  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (YU *et al.*, 2012).

Figura 5 – Célula unitária de magnetita.



Legenda: Célula unitária de magnetita com 8  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; bolas vermelhas representam oxigênio; bolas azuis o Fe; bolas amarelas com bolas azuis dentro representa Fe no sítio octaédrico; bola azul dentro de bola azul Fe no sítio tetraédrico. Fonte: (YU *et al.*, 2012).

Com relação às propriedades magnéticas os materiais podem ser classificados de acordo com a resposta que apresentam diante da aplicação de um campo magnético externo em: diamagnético; paramagnético; ferromagnético; antiferromagnético; ferrimagnético e superparamagnético (FERREIRA, 2009).

O diamagnetismo é uma forma muito fraca de magnetismo, sendo observada somente na presença de um campo magnético externo não uniforme. Os átomos de materiais diamagnéticos apresentam subníveis eletrônicos completos nos quais os momentos estão emparelhados e se cancelam, portanto não possuem magnetização. Quando materiais diamagnéticos são submetidos a um campo, os momentos de dipolo magnético dos átomos alinham-se no sentido contrário ao do campo aplicado o que faz com que valores de susceptibilidade magnética (medida da efetividade com que um campo magnético externo induz o dipolo magnético no material) sejam negativos e pequenos (FERREIRA, 2009).

Os materiais paramagnéticos são constituídos de átomos que possuem momentos magnéticos intrínsecos que não interagem entre si. Os momentos magnéticos encontram-se orientados aleatoriamente não havendo uma magnetização macroscópica líquida ou global, porém a aplicação de um campo magnético externo provoca o alinhamento dos dipolos na direção do campo. Como consequência o campo de indução é somado ao campo aplicado fazendo com que esses materiais apresentem valores de susceptibilidade magnética positivos, pequenos e dependentes da temperatura (FERREIRA, 2009).

Compostos ferromagnéticos apresentam momentos atômicos magnéticos alinhados. Na presença de campo externo os dipolos magnéticos alinham na direção do campo aplicado, exibindo altos valores positivos de susceptibilidade magnética. A magnetização em materiais ferromagnéticos varia com a temperatura entre um valor máximo à  $T = 0\text{K}$  até o valor zero na temperatura denominada temperatura de Curie ( $T_c$ ) ferromagnética. Acima desta temperatura os materiais ferromagnéticos tornam-se paramagnéticos (FIGUEIREDO, 2009).

O antiferromagnetismo ocorre quando os materiais têm momentos magnéticos alinhados em direções opostas, levando a uma magnetização nula. Quando expostos a um campo magnético externo os momentos alinham-se na direção do campo apresentando valores reduzidos e positivos de susceptibilidade magnética. Porém acima da temperatura de Néel o alinhamento antiparalelo desaparece e o material passa a exibir um comportamento paramagnético (FIGUEIREDO, 2009).

Por sua vez, o ferrimagnetismo é exibido por materiais que tem momentos magnéticos alinhados antiparalelamente e com diferentes magnitudes.



Apresentam altos valores positivos de susceptibilidade magnética na presença de um campo magnético externo (FIGUEIREDO, 2009).

Partículas com volume reduzido (com um único domínio magnético) estão magnetizadas uniformemente com todos os spins alinhados na mesma direção. Nesse caso a magnetização só pode ser modificada pela rotação simultânea de todos os spins da partícula. No caso em que as partículas são tão pequenas que a energia térmica é comparável à energia necessária para mudar a orientação dos spins, o momento magnético da partícula como um todo passa a sofrer os efeitos da agitação térmica. Este fenômeno é conhecido como superparamagnetismo. Neste estado a curva de magnetização em função do campo externo não apresenta histerese, logo a magnetização residual ( $M_r$  – valor da magnetização quando o campo aplicado é nulo) e o campo coercivo ( $H_c$  – valor do campo magnético externo necessário para inverter a magnetização em uma amostra de anisotropia uniaxial a qual é a tendência direcional de magnetização de um material) são nulos (HANNICKEL, 2011).

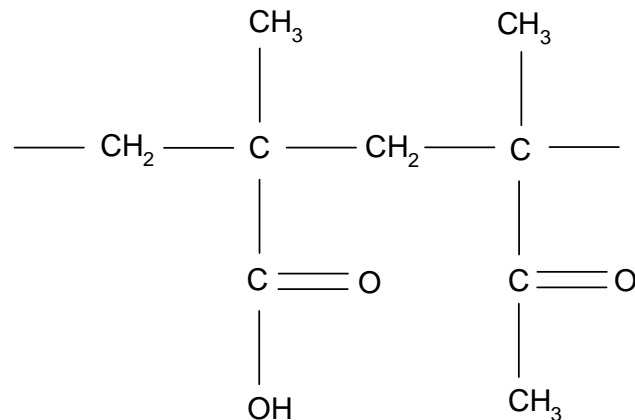
Vários métodos têm sido empregados na produção de partículas magnéticas: decomposição térmica de complexo organometálico como precursor (WANG *et al.*, 2010); síntese hidrotérmica (WU *et al.*, 2005); microemulsão (LIU *et al.*, 2004); síntese eletroquímica (FRANGER; BERTHET; BERTHON, 2004); utilização de moinho de bolas (CARVALHO *et al.*, 2013). Todavia, o método de coprecipitação é um dos mais utilizados e relatados na literatura, consistindo de uma mistura estequiométrica em mol de  $Fe^{+3}:Fe^{+2}$  na proporção de 2:1, respectivamente, a qual é adicionada sobre vigorosa agitação em solução alcalina (SILVA *et al.*, 2012).

Apesar da grande aplicabilidade das partículas de magnetita (SILVA *et al.*, 2010), a  $Fe_3O_4$  se dissolve em meios com baixos valores de pH, o que torna necessária a proteção da mesma, a fim de possibilitar sua utilização por via oral, principalmente quando se deseja aumentar a permanência de princípios ativos no ambiente estomacal (SCHINDLER, 1991).

Com o intuito de conferir proteção a magnetita e a antimicrobianos susceptíveis a degradação em baixos valores de pH, pode-se usar os polímeros acrilatos (conhecidos como Eudragit®) como forma de revestimento. O Eudragit® S100 é um poliânion insolúvel em água e em pH fortemente ácido, produzido a

partir da polimerização do ácido metacrílico e do metilmetacrilato (figura 6). Sendo utilizado para sistemas pH-dependentes, possuindo degradação em pH maior ou igual a 7,0 estando apto para o recobrimento de partículas magnéticas (YOO; GIRI; LEE, 2011).

Figura 6 – Estrutura química do Eudragit® S100.

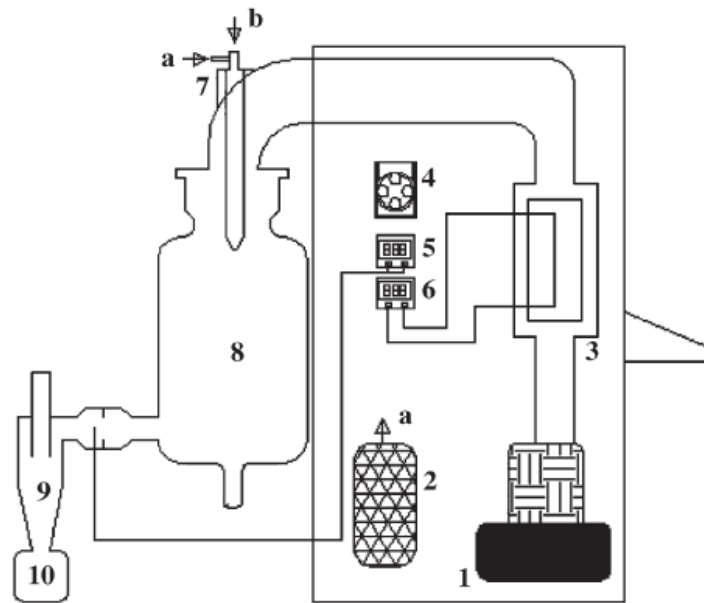


Fonte: Adaptado de (YOO; GIRI; LEE, 2011).

Para o revestimento das partículas magnéticas e dos fármacos, pode-se utilizar diferentes métodos, dentre eles: coacervação, evaporação do solvente, reticulação interfacial, secagem por aspensão, entre outras tecnologias (DESAI; PARK, 2005).

O método de microencapsulação através de secagem por aspensão (*spray drying*, figura 7) é uma excelente técnica que permite obter eficientes resultados de encapsulação e ainda pode ser utilizado em escala industrial. Esta técnica consiste basicamente em quatro etapas: a atomização da dispersão inicial, contato das gotículas com ar quente, evaporação do solvente com formação das micropartículas e a separação do material encapsulado. Dependendo das proporções dos componentes iniciais e dos parâmetros de aspensão pode ser obtida partícula de menor (10–50  $\mu\text{m}$ ) ou de maior tamanho (2-3 mm) (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

Figura 7 – Esquema do processo de secagem por aspensão (*spray-drying*).



Legenda: (1) Filtro de ar; (2) Compressor; (3) Aquecimento; (4) Bomba peristáltica; (5) Controle de temperatura; (6) Termopar de entrada; (7) Atomizador; (8) câmara de secagem, (a) ar comprimido, (b) alimentador; (9) ciclone; (10) Coletor. Fonte: (RATTES, 2007).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Este projeto visa o estudo e desenvolvimento de micropartículas magnéticas revestidas por Eudragit<sup>®</sup> S100, através da técnica de secagem por aspersão, contendo antimicrobianos (amoxicilina e claritromicina), objetivando um sistema de vetorização magnética por via oral para o tratamento de infecções causadas por *Helicobacter pylori*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Síntese de partículas magnéticas (PM);
- Revestimento das PM com polímero gastroresistente (Eudragit<sup>®</sup> S100), contendo antimicrobianos;
- Caracterização das partículas por: granulometria (microscopia óptica baseada no diâmetro de Feret a 0°), microscopia eletrônica de varredura e transmissão,

difratometria de raio-x, isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e magnetometria de amostra vibrante.

#### **4 JUSTIFICATIVA**

Os sistemas gastroretensivos são promissores candidatos na erradicação de infecções causadas por *Helicobacter pylori*. Contudo, são fortemente influenciados pela administração de alimentos, bem como pela: motilidade gástrica, quantidade de líquido presente no conteúdo estomacal e a singularidade biológica (BARDONNET *et al.*, 2006). Dessa forma, o sistema magnético por ser modulado por um campo magnético externo está menos sujeito a esses fatores interferentes que afetam diretamente o resultado terapêutico. Sendo assim, trata-se de um sistema bastante viável para prolongar a permanência de fármacos na região estomacal com chances de debelar infecções com maior eficiência.

#### **5 MATERIAL E MÉTODOS**

##### **5.1 Materiais**

Cloreto férrico hexahidratado (Acros Organics, EUA; P.A.), sulfato ferroso heptahidratado (Acros Organics, EUA; 99%), hidróxido de sódio (Vetec química, Brasil; 99%), ácido clorídrico (Vetec química, Brasil; 37%), amoxicilina trihidratada (Galena, Brasil; 98,8%), claritromicina (Galena, Brasil; 97,3%), Eudragit<sup>®</sup> S100 (Rohm GmbH & Co. KG, Alemanha; ácido metacrílico – metil metacrilato 1:2, respectivamente, 100%), metanol (Vetec química, Brasil, 99,8%), tampão fosfato pH 7,4, e água destilada.

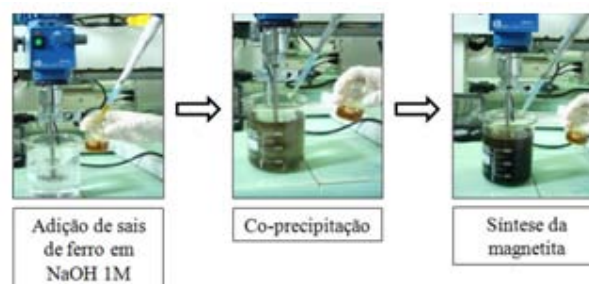
##### **5.2 Síntese das partículas magnéticas**

As soluções de 0,1 mol/L de cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e 0,05 mol/L de sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) foram preparadas como fontes de ferro dissolvendo os respectivos sais de ferro em 0,4 mol/L de HCl. De acordo com o procedimento tradicional da síntese de partículas magnéticas (PM) por coprecipitação (MASSART, 1981; KIM *et al.*, 2001;

KONERACKA *et al.*, 2002), 30 mL da mistura de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  com  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  foi adicionada em 900 mL de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) 1 mol/L sob sonicação (Unique USC 1800, 40 kHz, Brasil) e vigorosa agitação mecânica de 960 rpm (IKA RW-20, Alemanha) por 30 minutos em temperatura ambiente (figura 8). Na reação química a cor da suspensão recém obtida torna-se preta (inicialmente solução alaranjada devido à mistura dos sais de ferro), indicando assim que ocorreu a seguinte reação química de obtenção da magnetita:



Figura 8 – Esquema da metodologia experimental para a produção de partículas de magnetita.



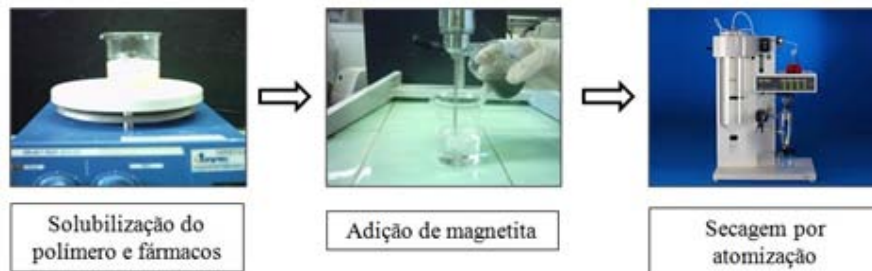
Fonte: Autoria do grupo de biomagnetismo da UFRN.

A suspensão obtida foi ajustada para pH 7,0, o sobrenadante proveniente da reação foi descartado por decantação e água destilada adicionada para retirar íons em excesso do precipitado. Este procedimento foi repetido quatro vezes. Por fim, as partículas sintetizadas foram secas em estufa pré-aquecida a 105°C (Odontobrás EL 1.3, Brasil).

### 5.3 Produção das partículas magnéticas poliméricas contendo antimicrobianos

As partículas magnéticas poliméricas (PMP) com amoxicilina e claritromicina foram produzidas pela técnica de secagem por aspersão (figura 9), sendo a metodologia adaptada de Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2009; SILVA-FREITAS *et al.*, 2011).

Figura 9 – Esquema da metodologia experimental para a produção de micropartículas magnéticas revestidas com polímero contendo antimicrobianos.



Fonte: Autoria do grupo de biomagnetismo da UFRN.

Para a obtenção da micropartícula polimerizada uma solução foi preparada dispersando o Eudragit<sup>®</sup> S100 em tampão fosfato pH 7,4 (40  $\mu\text{mol/L}$ ) e solubilizando a amoxicilina em água (6,9 mmol/L) e claritromicina em metanol (8,9 mmol/L). As soluções contendo os fármacos foram adicionadas na dispersão polimérica sobre agitação mecânica de 960 rpm (IKA RW-20, Alemanha), em seguida a este foi adicionada a suspensão de PM (86 mmol/L).

Posteriormente, 200 mL da suspensão contendo 100 mg de magnetita, 200 mg de amoxicilina, 200 mg de claritromicina e 500 mg de Eudragit<sup>®</sup> S100 alimentaram o Mini Spray dryer Büchi B191, Alemanha, sobre fluxo de alimentação de 1,2 mL/min usando bico aspersor de 0,7 mm de diâmetro, com temperatura do ar de entrada de 120°C e temperatura ar de saída variando de 80-85°C, com fluxo de ar de atomização de 400 NI/h e eficiência do exaustor de 85%. O material microencapsulado foi coletado e armazenado em temperatura ambiente.

## 5.4 Caracterização do sistema magnético

### 5.4.1 Granulometria

A distribuição granulométrica das PM e PMP foram determinadas através de microscopia óptica (Leitz/Leica Biomed, Alemanha). Para isso, a amostra foi colocada sob lâmina e submetida posteriormente a contagem de 500 partículas em triplicata para cada formulação. As análises foram realizadas em microscópio

com escala graduada de acordo com o diâmetro de Feret a 0°, o qual considera como diâmetro da partícula a distância entre tangentes paralelas à área projetada pela mesma (MAZZOLI; FAVONI, 2012).

O diâmetro médio foi determinado baseado na conversão dos valores observados no microscópio para escala micrométrica. Além disso, determinou-se o primeiro (D1), quinto (D5) e nono decil (D9), pela análise do gráfico da frequência acumulada. Bem como, foi determinado o índice de polidispersividade (IP) através da seguinte equação (HU *et al.*, 2002):

$$IP = \frac{(D9 - D1)}{D5} \quad (1)$$

#### 5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão

As PM e PMP foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, XL 30 Phillips, Holanda) para a observação da morfologia das partículas. Além disso, foi avaliada a presença de aglomerados nanométricos principalmente na magnetita através de microscopia eletrônica de transmissão (MET, FEI de 200kV, modelo Tecnai 20). Bem como, por intermédio da análise das fotomicrografias do MET e utilizando o programa Image J (versão 1.46) foi possível a elaboração de um histograma o qual foi elaborado mediante a contagem do tamanho de 200 cristalitos de magnetita.

#### 5.4.3 Difração de raio-X

As propriedades estruturais das PM e PMP, bem como, a avaliação da cristalinidade dos componentes da formulação foram determinadas por difratometria de raio-x (XRD-6000 Shimadzu, Japão). Uma quantidade de amostra representativa foi analisada utilizando-se ângulos de  $10^\circ < 2\theta < 80^\circ$  usando radiação Cu K $\alpha$  (com comprimento de onda de 1,54056 Å).

A equação de Debye-Scherrer (FERNANDES *et al.*, 2013) foi utilizada para determinar o tamanho do cristalito da PM:

$$D = \frac{0,9 \lambda}{\beta \cos\Theta} \quad (2)$$

Em que  $D$  é o tamanho do cristalito;  $\lambda$  é o comprimento de onda do raio-x;  $\beta$  é o alargamento da linha de difração determinada a meia altura da máxima intensidade do pico e  $\Theta$  é o ângulo de incidência do feixe.

#### 5.4.4 Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio

As isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio a 77 K para PM e PMP foram obtidas através da utilização de equipamento Micromeritics (ASAP 2420). Através desse método foi possível determinar a área de superfície do BET por intermédio das seguintes equações (RODELLA, 2001):

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{P(C - 1)}{V_m C P_0} \quad (3)$$

$$S_w = \frac{V_m S N}{M} \quad (4)$$

Em que  $V$  é o volume de gás adsorvido à pressão  $P$ ,  $P_0$  é a pressão de saturação do gás adsorvente,  $C$  é a constante do BET,  $V_m$  é o volume de gás adsorvido em função da pressão relativa,  $S_w$  é a área superficial do material estudado,  $S$  é a área ocupada por molécula do gás adsorvente,  $N$  é o número de Avogadro e  $M$  o volume molecular do gás.

Além disso, a distribuição do tamanho de poros da PM e PMP foi determinada pelo método matemático BJH (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001):

$$\ln(P/P_0) = -(2\gamma M_v \cos\Theta / RT r_m) \quad (5)$$

$$t = [13,90 / (0,034 - \log(P_0/P))]^{1/2} \quad (6)$$

$$r_m = r_k - t \quad (7)$$

Em que  $\gamma$  é a tensão superficial do líquido,  $M_v$  é o volume molar do adsorbato,  $\Theta$  é o ângulo de contato entre o sólido e a fase condensada,  $R$  constante dos gases;  $T$  é a temperatura;  $r_m$  é o raio de curvatura médio do menisco do líquido;  $t$  é a espessura do filme e  $r_k$  é o raio do poro.

#### 5.4.5 Magnetometria de amostra vibrante



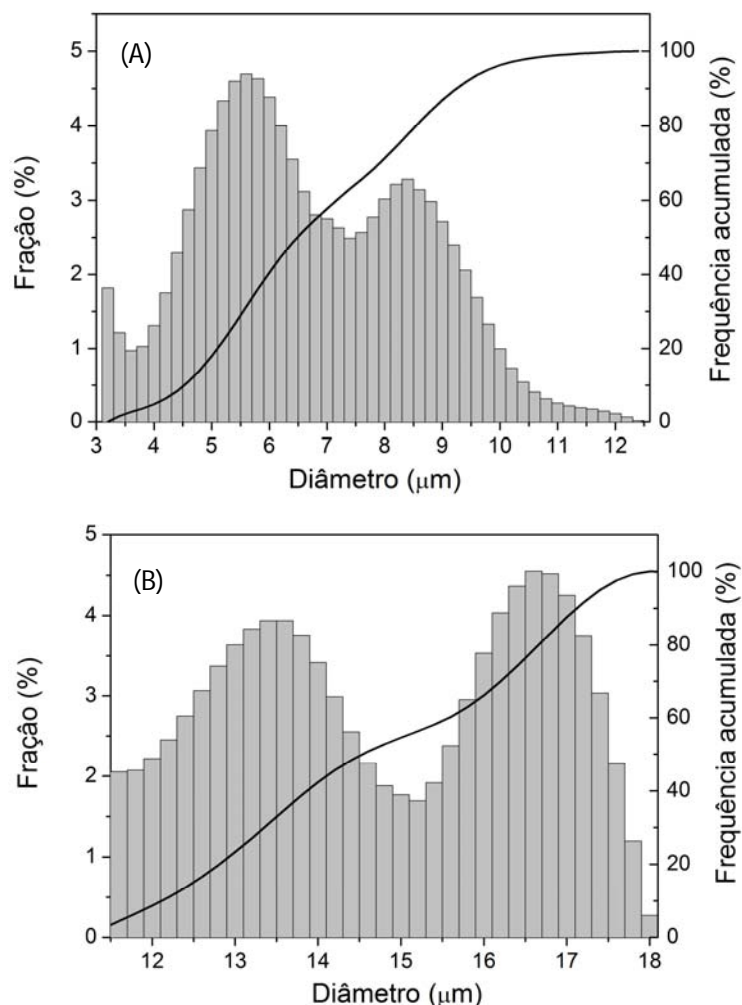
As medidas por magnetometria de amostra vibrante (MAV) foram realizadas para todos os materiais presentes na formulação. A magnetização foi medida em função do campo aplicado (variando de 0 T – 1,2 T – 0 T) em temperatura ambiente (com calibração prévia com níquel) no magnetômetro do departamento de física teórica e experimental da UFRN. Essas medidas forneceram informações quanto às propriedades magnéticas dos materiais, ao longo da curva de magnetização em função do campo magnético aplicado. Podendo assim, identificar a magnetização de saturação, susceptibilidade magnética, bem como o tamanho dos cristalitos os quais são responsáveis pela resposta magnética.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Granulometria

A distribuição do tamanho de partícula da PM e PMP apresentou comportamento bimodal (figura 10). A análise do gráfico de PM permite observar uma faixa de distribuição de 3  $\mu\text{m}$  a 12  $\mu\text{m}$ , na qual as modas estão centradas em: 5,6  $\mu\text{m}$  e 8,4  $\mu\text{m}$ . Por sua vez, para PMP há uma faixa de distribuição que varia de 11  $\mu\text{m}$  a 18  $\mu\text{m}$ , em que as modas estão centradas em 13,5  $\mu\text{m}$  e 16,7  $\mu\text{m}$ . Os resultados apresentados mostram que ambas as distribuições de partículas são similares, no que se refere a moda. Além disso, para a magnetita o histograma apresentou calda a direita diferentemente do encontrado para PMP.

Figura 10 – Distribuição granulométrica de PM (A) e PMP (B).



O tamanho médio de PM é  $6,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$  enquanto que o de PMP é de  $14,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$  (Tabela 01). Esse aumento de 2,1 vezes das micropartículas poliméricas magnéticas é sugestivo da presença de polímero e fármacos (indício que o processo de revestimento foi eficiente) e que o reduzido desvio padrão indica repetibilidade do método de análise empregado. Além disso, o índice de polidispersividade das micropartículas revestidas foi reduzido por um fator de 1,8 (quando comparado com a magnetita), revelando população de tamanho de partícula mais homogênea.

Tabela 1 – Granulometria de PM e PMP.

	PM ( $\mu\text{m}$ )	PMP ( $\mu\text{m}$ )
<b>Diâmetro Médio</b>	$6,8 \pm 0,2$	$14,2 \pm 0,2$
<b>D1</b>	$4,5 \pm 0,1$	$11,7 \pm 0,3$
<b>D5</b>	$6,8 \pm 0,4$	$13,9 \pm 0,4$
<b>D9</b>	$9,3 \pm 0,2$	$16,8 \pm 0,1$
<b>IP</b>	0,7	0,4

Legenda: Primeiro decil (D1); quinto decil (D5); nono decil (D9); índice de polidispersividade (IP).

Esses resultados corroboram com os encontrados em estudos anteriores publicados por Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2009; SILVA-FREITAS *et al.*, 2011), em que o sistema proposto (micropartículas de magnetita com revestimento polimérico contendo amoxicilina) aumentou cerca de 1,5 vezes em comparação com as partículas de magnetita. Bem como, ocorreu redução do índice de polidispersividade das partículas revestidas contendo o fármaco em comparação com a partícula magnética por um fato de 1,3 vezes.

Adicionalmente, a distribuição do tamanho de partícula da PM e PMP sugere uma estrutura com núcleo de magnetita e uma camada externa contendo o polímero e os antimicrobianos (estrutura do tipo núcleo-camada, também denominada de *core-shell*). A diferença dos pontos de máximo das distribuições bimodais entre PM e PMP apresentam uma diferença de diâmetro de  $8 \mu\text{m}$  (aproximadamente), indicando a formação de uma camada de espessura de

aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  de raio ao redor do núcleo magnético contendo antimicrobianos e polímero.

## 6.2 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão

As análises de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que as partículas de magnetita (figura 11) e as micropartículas revestidas contendo fármacos (figura 12) possuem formato irregular.

Figura 11 – MEV de PM.

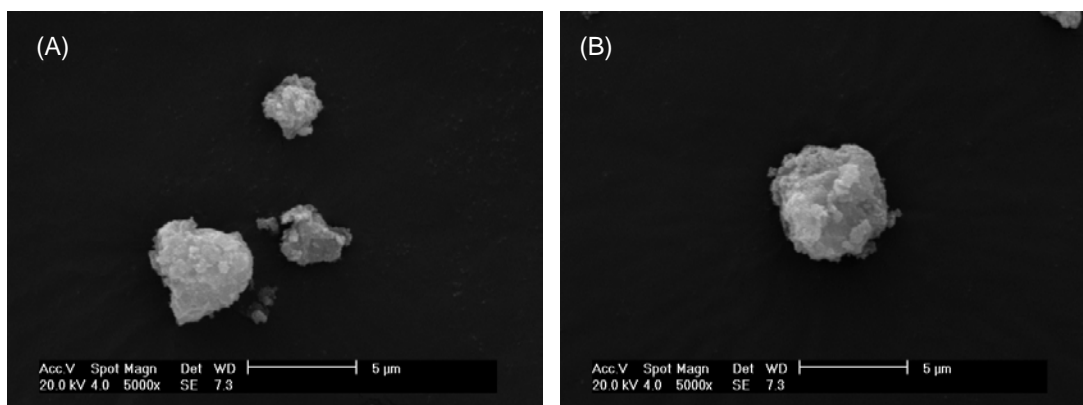
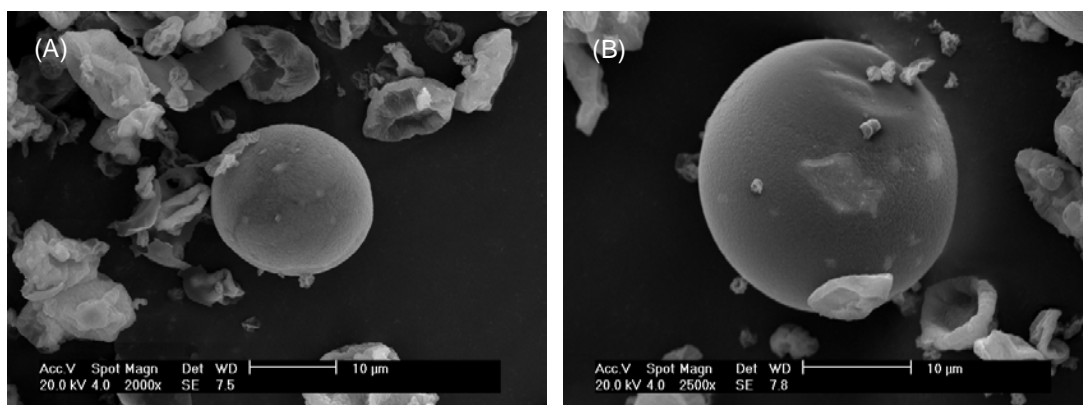


Figura 12 – MEV de PMP.

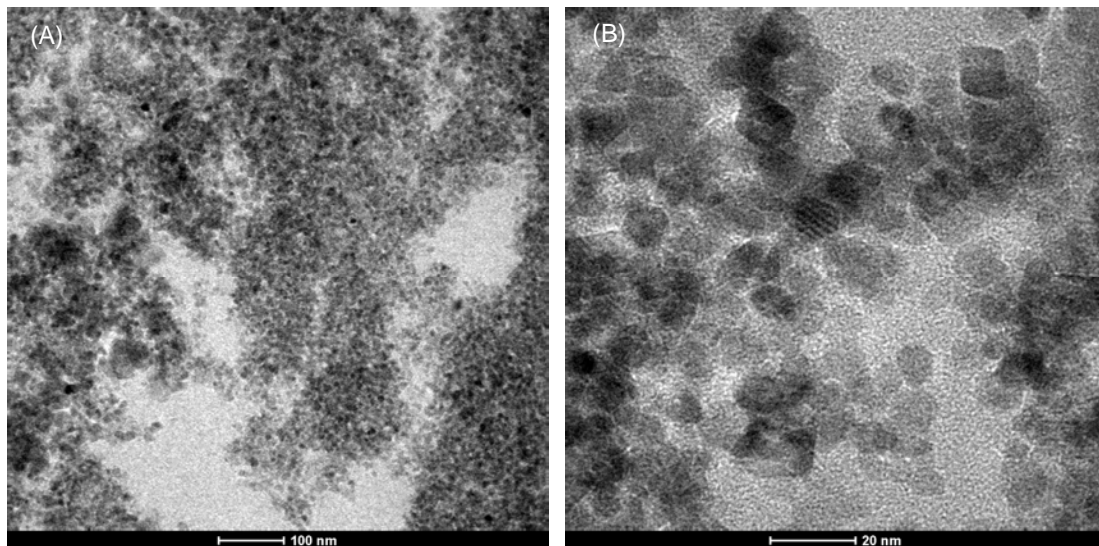


Adicionalmente, o resultado da MEV corroborou com o encontrado na granulometria, o aumento do tamanho médio da PMP em comparação com PM. Esse resultado demonstra a provável eficiência no processo de revestimento da magnetita e fármacos pelo polímero, sendo semelhante aos obtidos por Silva e colaboradores que observaram que após o processo de revestimento houve uma

alteração da morfologia das micropartículas poliméricas quando comparadas com as partículas magnéticas (SILVA *et al.*, 2009; SILVA-FREITAS *et al.*, 2011).

As análises de PM e PMP por microscopia eletrônica de transmissão permitem sugerir que as partículas micrométricas de magnetita são na verdade agregados de cristalitos nanométricos provavelmente formados devido ao fato da não utilização, no presente trabalho, de tensoativos ou agentes estabilizantes durante o processo de síntese deste óxido de ferro (figura 13). O cristalito é a unidade da partícula magnética com qualidade cristalográfica, são essas entidades responsáveis pela resposta magnética e pelos resultados encontrados na difratometria de raio-X característicos da magnetita. Cada micropartícula estável contém bilhões de cristalitos.

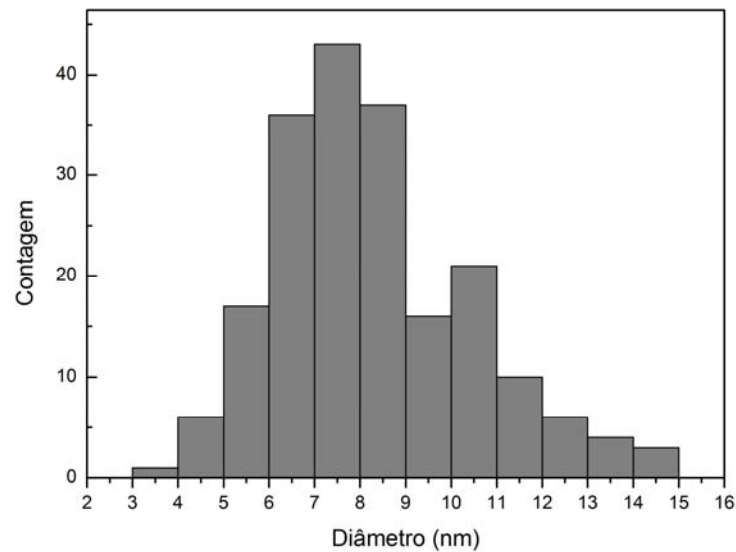
Figura 13 – MET de PM.



Legenda: (A) aumento de 15000x, (B) aumento de 71000x.

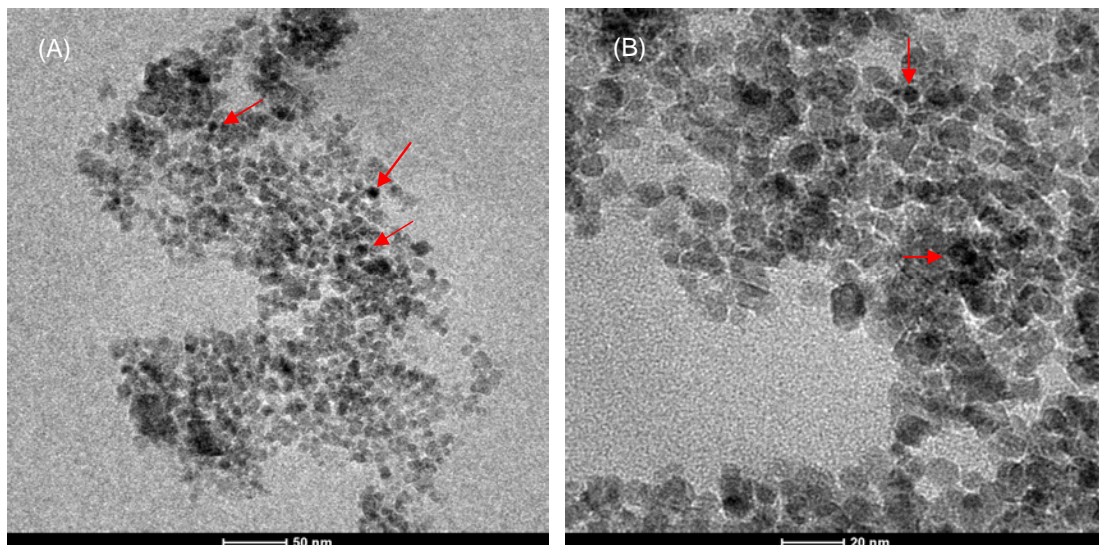
Na figura 14, é possível observar a distribuição do tamanho de cristalitos da magnetita a qual possui uma faixa de 3 nm a 15 nm, em que a moda é de aproximadamente 7 nm.

Figura 14 – Distribuição do tamanho dos cristalitos de PM.



Na figura 15, é possível verificar a presença de cristalitos de magnetita na PMP. Esse fato sugere a presença do núcleo magnético no sistema polimérico contendo fármacos.

Figura 15 - MET de PMP.



Legenda: (A) aumento de 29000x, (B) aumento de 71000x. Setas vermelhas indicam os cristalitos de magnetita.

Frequentemente é observado na literatura que as partículas de magnetita produzidas pelo método da coprecipitação são nanométricas (AHMADI *et al.*, 2013; RODRIGUEZ *et al.*, 2013), contudo o presente trabalho demonstra que tais partículas podem sofrer processo de agregação tornando-se aglomerados de

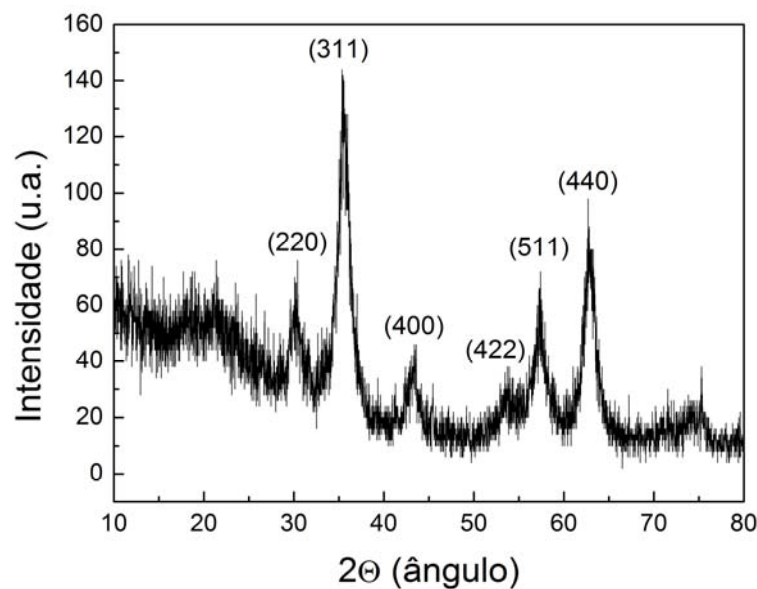
micropartículas, bastante viáveis e de enorme interesse para aplicações biomédicas.

### 6.3 Difração de raio-X

A análise por difração de raio-x foi utilizada para investigar as propriedades estruturais das partículas de magnetita e micropartículas revestidas contendo antimicrobianos, bem como os componentes da formulação em separado.

Na figura 16 pode-se visualizar o padrão de picos característicos da magnetita sintetizada pelo método da co-precipitação tendo como ângulos: 30,10°; 35,42°; 43,05°; 53,39°; 56,94° e 62,51° e índices, respectivamente, (220); (311); (400); (422); (511) e (440), os quais podem ser indexados como uma fase cúbica (ZHANG *et al.*, 2008), de acordo com o encontrado na literatura (carta cristalográfica JCPDS n°.19-0629).

Figura 16 - Difratomia de raio-x de PM.

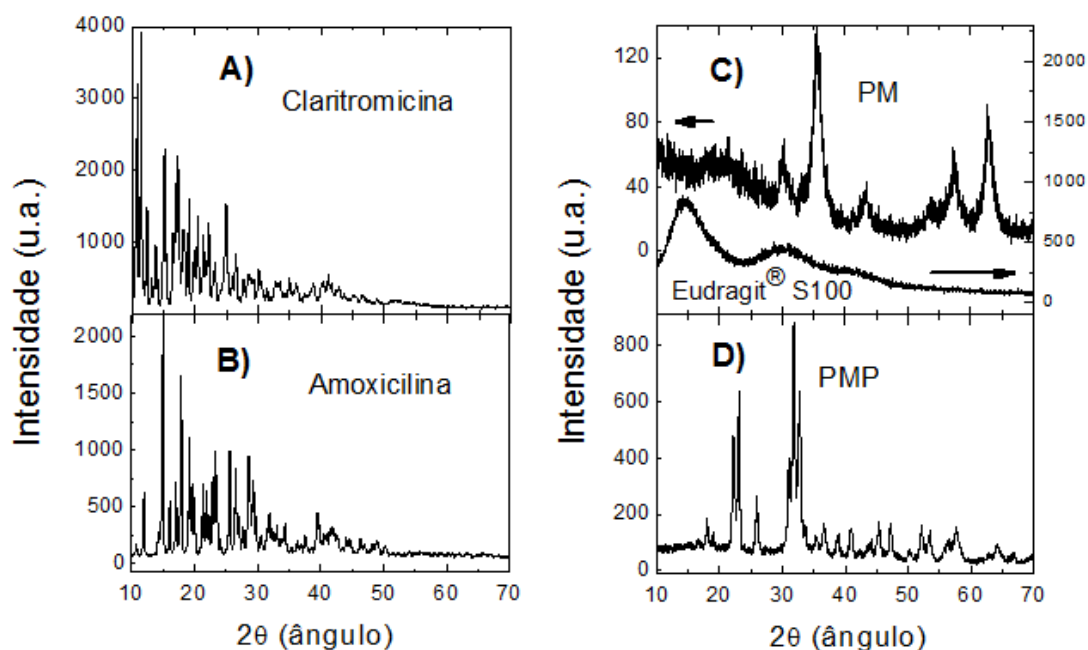


Empregando-se a equação de Debye-Scherrer (FERNANDES *et al.*, 2013) para o pico de 35,42° da PM encontrou-se tamanho de cristalito da ordem de 6 nm. Confirmando assim, os resultados encontrados nas microscopias eletrônicas, que as partículas micrométricas de magnetita são na verdade agregados de

cristalitos nanométricos, existindo grande possibilidade da etapa de neutralização (inerente ao processo de síntese por co-precipitação) permitir a aglomeração dos cristalitos resultando em agregados micrométricos, como já relatado por Silva e colaboradores (SILVA, AMANDA K. ANDRIOLA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

A DRX das partículas revestidas, figura 17, demonstrou padrão de cristalinidade devido à magnetita e aos fármacos (o polímero apresentou comportamento amorfo). Bem como, os padrões de picos presentes na claritromicina abaixo de  $15^\circ$  indicam que o presente antimicrobiano consiste na forma polimórfica II (mais comumente usado no mercado farmacêutico) (GOMEZ-BURGAZ; TORRADO; TORRADO, 2009).

Figura 17 - Difratoimetria de raio-x de PMP e seus componentes.



#### 6.4 Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio

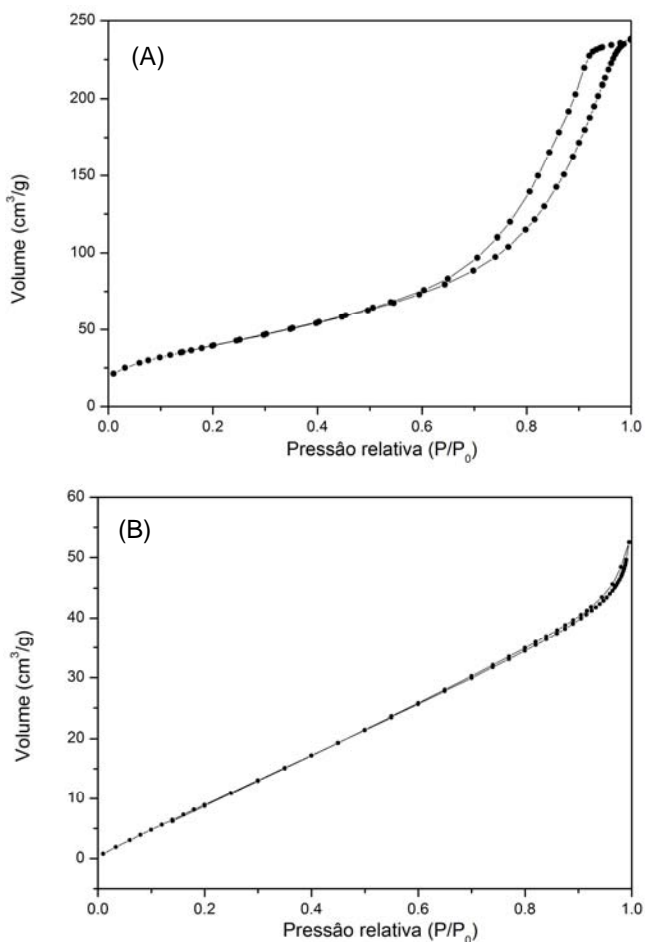
A figura 18 ilustra as isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para PM (figura 18 A) a qual apresenta comportamento de isoterma do tipo IV de acordo com a classificação da IUPAC (SING *et al.*, 1985), com uma área de superfície de  $146,42 \text{ m}^2/\text{g}$ . Essa alta área de superfície permite alta taxa de adsorção de



fármacos (como os antimicrobianos utilizados no presente trabalho) às partículas de magnetita (BHASKARA RAO *et al.*, 2014).

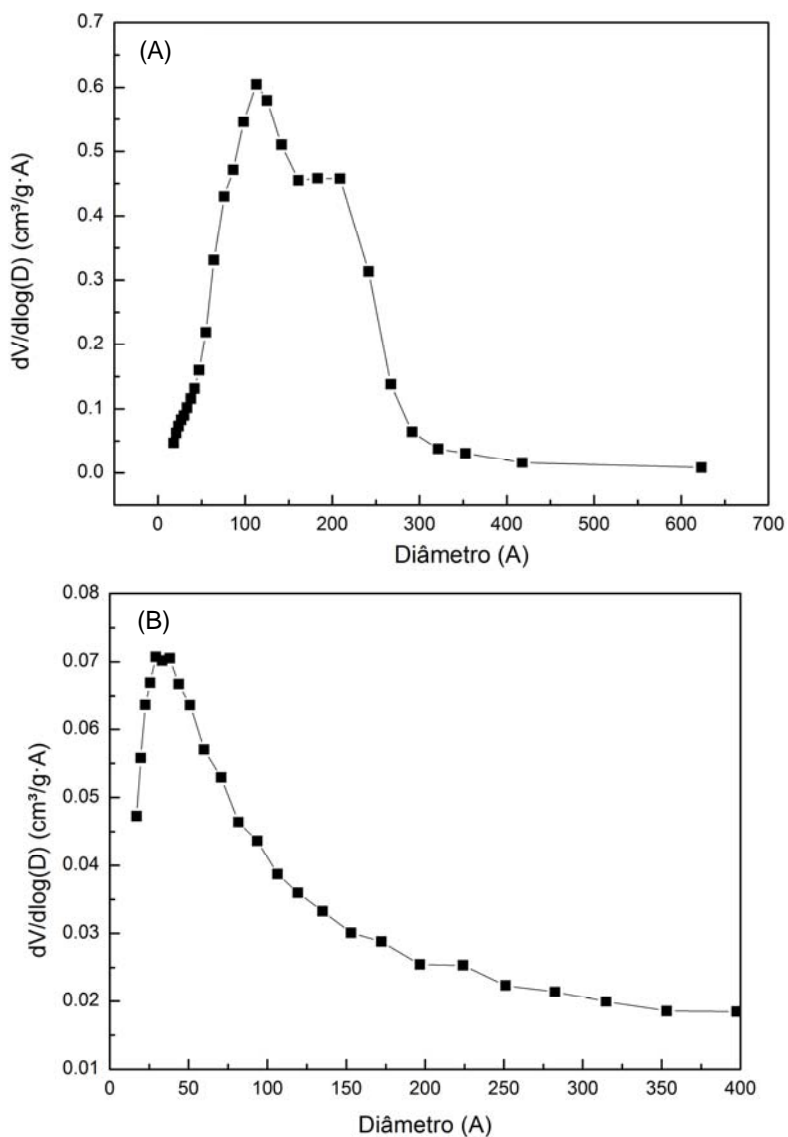
Por sua vez, as isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio para PMP (figura 18B) possuem comportamento de isoterma do tipo III, de acordo com a classificação da IUPAC (SING *et al.*, 1985), sendo característico de material que apresenta fraca interação adsorvente/adsorbato, tendo área de superfície de 63,33 m<sup>2</sup>/g. Como as partículas de magnetita são cerca de duas vezes menor que as partículas magnéticas poliméricas contendo antimicrobianos é de se esperar que a área de superfície da PM seja duas vezes maior do que a PMP, como foi confirmado. Desta forma o método utilizado foi importante para confirmar os resultados já apresentados quanto ao tamanho das partículas PM e PMP.

Figura 18 - Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio para PM (A) e PMP (B).



A figura 19 revela a distribuição do tamanho de poros de PM e PMP, respectivamente. Ambos materiais apresentaram comportamento mesoporoso (poros entre 2 nm a 50 nm) (SING *et al.*, 1985). A PM teve distribuição de tamanho de poros variando de 3 nm a 40 nm, tendo modas centradas em 10 e 20 nm. Entretanto a PMP teve distribuição de tamanho de poros variando de 2 nm a 40 nm, com máximo em 5 nm. Essa redução do tamanho do poro ao se comparar PMP com PM pode ser atribuída à presença de antimicrobianos nos poros do sistema magnético polimerizado, o qual possibilitou redução desse valor.

Figura 19 - Distribuição do tamanho de poros de PM (A) e PMP (B).



## 6.5 Magnetometria de amostra vibrante

A MAV é uma técnica baseada na mudança de fluxo em uma bobina quando uma amostra vibra perto da mesma, permitindo determinar propriedades magnéticas como magnetização remanescente (MR) e a coercividade ( $H_c$ ) (MA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2010). MR é o valor da magnetização quando o campo aplicado é nulo. O campo coercivo,  $H_c$ , é o valor do campo magnético externo necessário para inverter a magnetização em uma amostra de anisotropia uniaxial (tendência direcional de uma propriedade física de um material) (CULLITY, 1972).

Baixos valores de coercividade e magnetização remanescente são favoráveis para a vetorização magnética de fármacos. De maneira ideal ambos os valores deveriam ser zero, indicando uma distribuição do tamanho de partícula em um regime superparamagnético. Evitando assim, a agregação das partículas ao ser retirado o campo magnético externo (KUZNETSOV *et al.*, 1999).

Para aplicações na área biomédica se faz necessário o uso de partículas superparamagnéticas. Esse fenômeno acontece quando partículas de domínio único tem dimensão abaixo do tamanho crítico (25 nm para a magnetita – (BYRNE *et al.*, 2011)). Dentro da escala de tamanho superparamagnética as flutuações de energia térmica são capazes de superar a anisotropia e espontaneamente reverter à magnetização da partícula de uma direção preferencial para outra (SILVA, A. K. A. *et al.*, 2007).

O estado superparamagnético ( $H_c=0$  e  $MR=0$ ) permite altas susceptibilidades magnéticas e elevadas magnetizações de saturação possibilitando que as partículas sejam efetivamente controladas por um campo magnético externo relativamente fraco (SILVA, A. K. A. *et al.*, 2007).

Como esperado, a resposta magnética do polímero e dos fármacos revelaram magnetização praticamente nula (figura 20 A, B, C), diferentemente da PM (figura 20 D) e da PMP (figura 20 E) as quais apresentaram comportamento superparamagnético. A magnetização de saturação das partículas revestidas contendo antimicrobianos (0,9 emu/g) diminuiu ao ser comparado com as partículas de magnetita (31 emu/g). Como a unidade de medida magnética é relacionada com a massa (no presente trabalho, o óxido de ferro), essa redução é esperada uma vez que o núcleo magnético foi revestido com polímero contendo

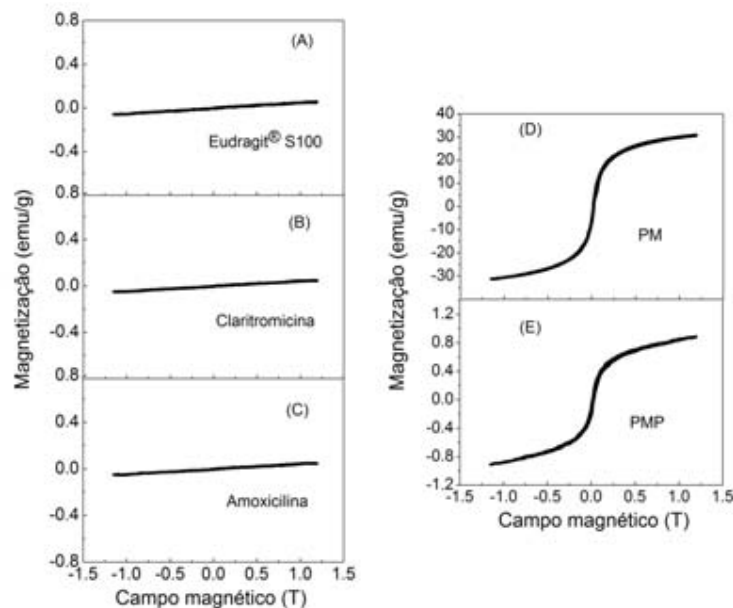
fármacos como relatado por Ramanujan e colaboradores (RAMANUJAN; YEOW, 2005).

Além disso, foi possível estimar conteúdo de magnetita de 2,9 % (p/p) presente na PMP, através da magnetização de saturação. Este resultado está de acordo com trabalho anteriormente publicado por Silva e colaboradores (SILVA-FREITAS *et al.*, 2011), em que no sistema polimérico magnético aspergido por *spray dryer* possuindo único antimicrobiano o conteúdo magnético final apresentou valor semelhante.

Um fato intrigante é como partículas micrométricas de magnetita podem ser superparamagnéticas. Uma possível explicação é que as vizinhanças dos cristalitos nanométricos que compõe as micropartículas têm defeitos na rede que impõe restrição na propagação da ordem magnética, levando a cristalitos superparamagnéticos não correlacionados magneticamente. Isto tem sido relatado em filmes finos de magnetita (MARGULIES *et al.*, 1997).

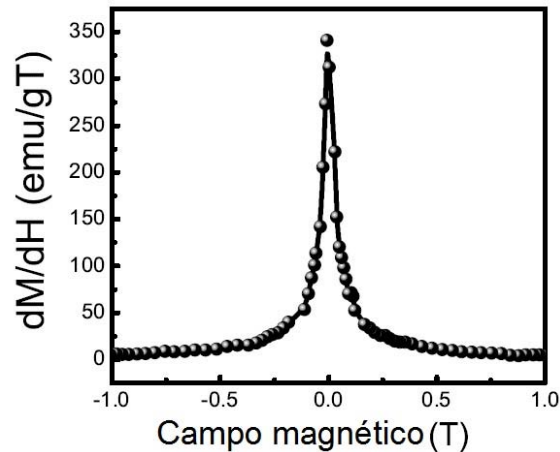
Portanto, o núcleo magnético na PMP consiste em agregados de cristalitos nanométricos (da ordem de 6 nm) formando micropartículas superparamagnéticas (protegidas contra o meio de dissolução gástrico) contendo antimicrobianos.

Figura 20 - Medidas de magnetometria de amostra vibrante das PMP e seus componentes.



Na figura 21 é possível observar a susceptibilidade magnética de partículas de magnetita cujo valor máximo é de 341 emu/gT.

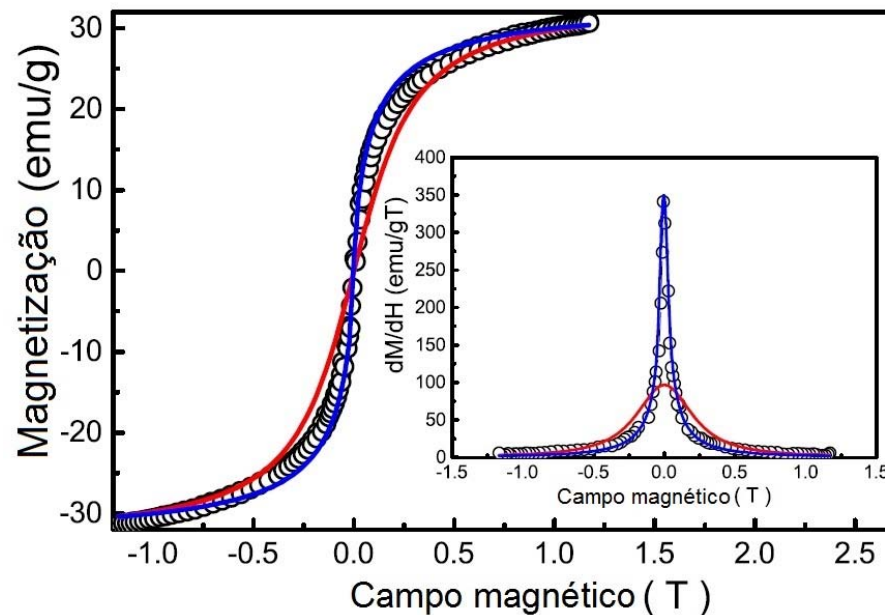
Figura 21 - Susceptibilidade magnética experimental de PM.



Com o objetivo de se avaliar a provável explicação desse valor de susceptibilidade, bem como, realizar simulações teóricas a fim de comparação com os resultados experimentais obtidos na curva de magnetização de partículas de magnetita foi desenvolvido um modelo teórico (detalhado no artigo submetido que consta no apêndice).

Os resultados obtidos (figura 22 e 23) são bastante interessantes. Na figura 22 é mostrada a magnetização da magnetita. Os círculos fechados e vazios representam resultado experimental, a linha azul e vermelha a simulação da interação dipolar (azul com interação e vermelho sem interação) das nanopartículas de magnetita. Na figura inserida é mostrada a susceptibilidade magnética de partículas de magnetita.

Figura 22 - Magnetização, susceptibilidade magnética experimental e simulada com e sem interação dipolar para PM.



Legenda: A figura mostra a magnetização da magnetita. Os círculos fechados e vazios representam resultado experimental, a linha azul e vermelha a simulação da interação dipolar (azul com interação e vermelho sem interação) das nanopartículas de magnetita. Na figura inserida é mostrada a susceptibilidade magnética de partículas de magnetita.

É perceptível que as linhas azul e vermelha reproduzem bem os resultados experimentais encontrados na magnetização, sendo que a azul apresenta melhores resultados tanto para a magnetização quanto para a susceptibilidade magnética. Dessa forma, a interação dipolar entre as nanopartículas de magnetita é responsável por um aumento de 3,6 vezes na susceptibilidade inicial da PM ao se comparar com as mesmas partículas sem o efeito da interação dipolar.

A interação dipolar indica que os cristalitos interagem mutuamente causando, neste caso, um efeito relevante para aplicação em campos magnéticos de baixa intensidade.

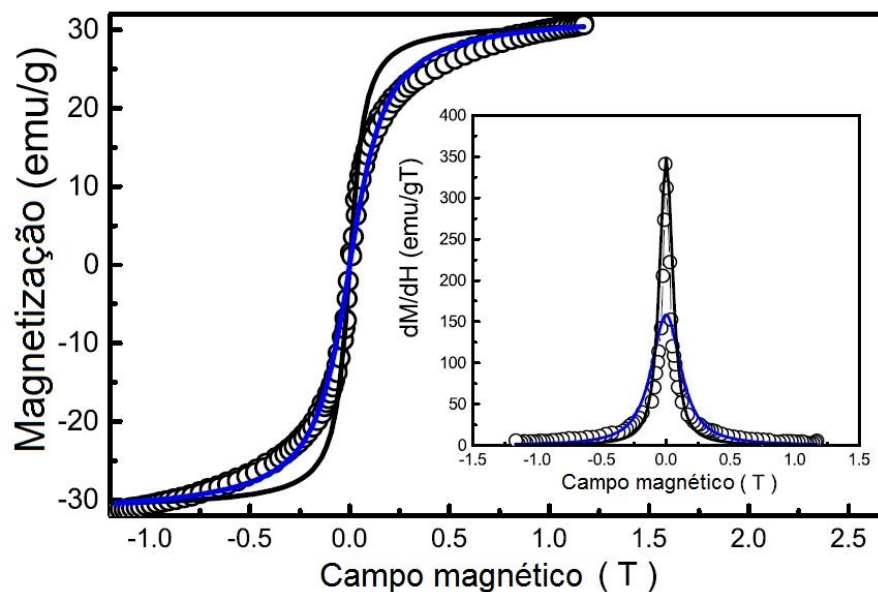
Esse resultado é de grande importância para a vetorização magnética de fármacos, uma vez que, a força magnética (a qual controla a eficiência da vetorização) é proporcional a susceptibilidade inicial (PANKHURST *et al.*, 2003). Dessa forma, quanto maior for a susceptibilidade inicial maior será a força magnética.

Uma forma de interpretar esses resultados é pensar que grandes valores de susceptibilidade inicial estão relacionados com nanopartículas com grande

diâmetro. Na figura 23 é apresentado que isso não é o caso do presente resultado.

Nessa figura é possível visualizar a magnetização da magnetita. Os círculos fechados e vazios representam resultado experimental, a linha azul e preta a simulação sem interação dipolar das nanopartículas de magnetita com tamanho de 8 nm (linha preta) e 6 nm (linha azul). Além disso, na figura inserida é mostrada a susceptibilidade magnética de partículas de magnetita.

Figura 23 - Magnetização, susceptibilidade magnética experimental e simulada sem interação dipolar para PM e partículas de 6 nm e 8 nm.



Legenda: A figura mostra a magnetização da magnetita. Os círculos fechados e vazios representam resultado experimental, a linha azul e preta a simulação sem interação dipolar das nanopartículas de magnetita com tamanho de 8 nm (linha preta) e 6 nm (linha azul). Na figura inserida é mostrada a susceptibilidade magnética de partículas de magnetita.

As partículas com tamanho de 8 nm reproduzem bem os valores de susceptibilidade magnética experimental, contudo não reproduzem bem os valores experimentais de magnetização em baixos valores de campo magnético.

Por sua vez, as partículas que tiveram tamanho de 6 nm reproduzem bem os valores experimentais para a curva de magnetização, entretanto não faz o mesmo para os valores de susceptibilidade encontrados experimentalmente.

Dessa forma, a susceptibilidade encontrada para as partículas de magnetita, cujo valor máximo é de 341 emu/gT, é atribuída a interação dipolar entre as nanopartículas deste óxido de ferro a qual permite em comparação com as mesmas partículas sem interação dipolar e do mesmo tamanho um aumento de 3,6 vezes.

Outra constatação importante feita através das análises de simulação foi a possibilidade de se estimar o tamanho do cristalito de magnetita, sendo encontrado uma distribuição do tipo log-normal, com mediana de 5 nm e 49% das partículas com diâmetro entre 5 - 6 nm, corroborando assim com os resultados encontrados para a MET e DRX.



## 7 CONCLUSÕES

Como conclusões tem-se que a metodologia desenvolvida para a produção de partículas magnéticas revestidas com Eudragit<sup>®</sup> S100 contendo amoxicilina e claritromicina foi eficiente. Isso demonstra um grande potencial para aplicação em sistemas de vetorização de fármacos para o trato gastrointestinal.

Acrescido a isso, tem-se que a metodologia de desenvolvimento é relativamente simples, empregando a já bem estabelecida na literatura técnica de coprecipitação de magnetita, e as vantagens da técnica de secagem por aspersão a qual pode ser utilizada na indústria para a preparação de micropartículas.

As técnicas empregadas para a caracterização das PM e PMP (granulometria, microscopia eletrônica de varredura e transmissão, difração de raio-x, isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e magnetometria de amostra vibrante) revelaram que há um acréscimo no tamanho do sistema magnético polimérico microparticulado contendo antimicrobianos ao ser comparado com as partículas magnéticas de magnetita.

Para a micropartícula de magnetita tem-se que é composta de nanopartículas com tamanho da ordem de 6 nm, as mesmas sofrem processo de aglomeração resultando em partículas com tamanho que varia de 3 µm a 12 µm, tendo distribuição de tamanho bimodal centrado em 5,6 µm e 8,4 µm. Essas partículas, possuem alta área de superfície 146,42 m<sup>2</sup>/g, a qual é requerida para adsorção de fármacos e tamanho de poro de cerca de 10 nm.

Por sua vez, as partículas magnéticas polimerizadas contendo antimicrobianos apresentaram formato irregular, com dimensão de 11 µm a 18 µm e uma distribuição de tamanho bimodal com dois principais picos centrados em 13,5 µm e 16,7 µm, com tamanho de poro variando de 2 nm a 40 nm. Além disso, há um indicativo de que tais partículas tem uma estrutura do tipo núcleo-camada, sendo o núcleo magnético feito de micropartículas de magnetita, revestido com uma camada de 4 µm contendo antimicrobianos e Eudragit<sup>®</sup> S100.

A técnica de magnetometria de amostra vibrante permitiu determinar o comportamento superparamagnético da PM e PMP. Possibilitando estimar o conteúdo de magnetita presente nas micropartículas revestidas. Além disso, por intermédio de simulações teóricas foi possível determinar que há um incremento

no valor da susceptibilidade magnética da magnetita devido as interações dipolares entre essas partículas, em comparação com as partículas não interagentes.

Dessa forma, o sistema magnético polimerizado contendo os principais antimicrobianos para a erradicação de infecções por *Helicobacter pylori* possui adequada morfologia e distribuição do tamanho de partículas para vetorização magnética por via oral. Sendo promissor candidato a sistema no tratamento de infecções causadas por *Helicobacter pylori*.

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, R. *et al.* Effect of concentration on hydrodynamic size of magnetite-based ferrofluid as a potential MRI contrast agent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 424, p. 113-117, 2013.
- AZZAZY, H. M. E.; MANSOUR, M. M. H. In vitro diagnostic prospects of nanoparticles. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, n. 1-2, p. 1-8, 2009.
- BARDONNET, P. L. *et al.* Gastroretentive dosage forms: Overview and special case of Helicobacter pylori. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 1-2, p. 1-18, 2006.
- BEBU, A. *et al.* IR, Raman, SERS and DFT study of amoxicillin. **Journal of Molecular Structure**, v. 993, n. 1-3, p. 52-56, 2011.
- BHASKARA RAO, B. V. *et al.* Controlled release of antimicrobial Cephalexin drug from silica microparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 34, p. 9-14, 2014.
- BITTNER, L. K. H. *et al.* Near-infrared reflection spectroscopy (NIRS) as a successful tool for simultaneous identification and particle size determination of amoxicillin trihydrate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 5, p. 1059-1064, 2011.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 631-651, 2002.
- BRUCE, I. J. *et al.* Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 284, p. 145-160, 2004.
- BYRNE, J. M. *et al.* Control of nanoparticle size, reactivity and magnetic properties during the bioproduction of magnetite by Geobacter sulfurreducens. **Nanotechnology**, v. 22, n. 45, 2011.
- CARVALHO, J. F. *et al.* Synthesis of magnetite nanoparticles by high energy ball milling. **Applied Surface Science**, v. 275, p. 84-87, 2013.
- COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 762-767, 2000.
- COLLNOT, E. M.; ALI, H.; LEHR, C. M. Nano and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 235-246, 2012.
- CONG, C. *et al.* Synthesis and antibacterial activity of novel 4''-O-benzimidazolyl clarithromycin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 3105-3111, 2011.

CULLITY, B. D. **Introduction to magnetic materials** Massachusetts: Addison-Wesley, 1972.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

FERNANDES, M. T. C. *et al.* The competing effect of ammonia in the synthesis of iron oxide/silica nanoparticles in microemulsion/sol-gel system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 422, p. 136-142, 2013.

FERREIRA, R. V. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com núcleo magnético de magnetita**. 2009. Departamento de química, UFMG, Belo Horizonte.

FIGUEIREDO, L. C. **Sistemas magnéticos nanoparticulados à base de maghemita**. 2009. Instituto de física, UNB, Brasília.

FRANGER, S.; BERTHET, P.; BERTHON, J. Electrochemical synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in alkaline aqueous solutions containing complexing agents. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 8, n. 4, p. 218-223, 2004.

GAUTIER, J. *et al.* A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 1, p. 16-25, 2012.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GISBERT, J. P.; CALVET, X. Review article: the effectiveness of standard triple therapy for *Helicobacter pylori* has not changed over the last decade, but it is not good enough. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 34, n. 11-12, p. 1255-1268, 2011.

GISBERT, J. P.; PAJARES, J. M. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: The past and the future. **European Journal of Internal Medicine**, v. 21, n. 5, p. 357-359, 2010.

GOLD, H. S.; MOELLERING, R. C. Drug therapy - Antimicrobial-drug resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 19, p. 1445-1453, 1996.

GOMEZ-BURGAZ, M.; TORRADO, G.; TORRADO, S. Characterization and superficial transformations on mini-matrices made of interpolymer complexes of chitosan and carboxymethylcellulose during in vitro clarithromycin release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 130-139, 2009.

GUILLAUME, O. *et al.* Multilayer, degradable coating as a carrier for the sustained release of antibiotics: Preparation and antimicrobial efficacy in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 3, p. 492-501, 2012.

HÄFELI, U. O. Magnetically modulated therapeutic systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 277, n. 1-2, p. 19-24, 2004.

HANNICKEL, A. **Estudo de nanopartículas de magnetita obtidas pelos métodos de coprecipitação, biossíntese e moagem**. 2011. Instituto militar de engenharia, Ministério da defesa - Exército brasileiro, Rio de Janeiro.

HARVEY, R. A. C., P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. 2ª Edição ARTMED 2008.

HILDRETH, C. J.; LYNM, C.; GLASS, R. M. Helicobacter pylori. **The Journal of the American Medical Association**, v. 300, n. 11, p. 1374, 2008.

HU, J. H. *et al.* Improvement of dissolution rates of poorly water soluble APIs using novel spray freezing into liquid technology. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 9, p. 1278-1284, 2002.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 2, p. 128-145, 2011.

KIM, D. K. *et al.* Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, n. 1-2, p. 30-36, 2001.

KONERACKA, M. *et al.* Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, n. 1-3, p. 409-411, 2002.

KUZNETSOV, A. A. *et al.* New ferro-carbon adsorbents for magnetically guided transport of anti-cancer drugs. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, n. 1-3, p. 22-30, 1999.

LADEIRA, M. S. P. C.; SALVADORI, D. M. F. V.; RODRIGUES, M. A. M. Biopatologia do Helicobacter pylori. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 335-342, 2003.

LIU, Z. L. *et al.* Synthesis of magnetite nanoparticles in W/O microemulsion. **Journal of Materials Science**, v. 39, n. 7, p. 2633-2636, 2004.

LUBBE, A. S. *et al.* Clinical experiences with magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. **Cancer research**, v. 56, p. 4686-4693, 1996.

MA, M. *et al.* Size dependence of specific power absorption of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles in AC magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 268, n. 1-2, p. 33-39, 2004.

MA, S. *et al.* Synthesis and antibacterial evaluation of novel clarithromycin derivatives with C-4 " elongated arylalkyl groups against macrolide-resistant strains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 556-566, 2011.

MAJUMDAR, D.; BEBB, J.; ATHERTON, J. Helicobacter pylori infection and peptic ulcers. **Medicine**, v. 39, n. 3, p. 154-161, 2011.

MALFERTHEINER, P. *et al.* Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the maastricht III consensus report. **Gut**, v. 56, n. 6, p. 772-781, 2007.

MARGULIES, D. T. *et al.* Origin of the anomalous magnetic behaviour in single crystal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> films. **Physical Review Letters**, v. 79, n. 25, p. 5162-5165, 1997.

MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 17, n. 2, p. 1247-1248, 1981.

MAZZOLI, A.; FAVONI, O. Particle size, size distribution and morphological evaluation of airborne dust particles of diverse woods by Scanning Electron Microscopy and image processing program. **Powder Technology**, v. 225, p. 65-71, 2012.

MORDI, M. N. *et al.* Acid-catalyzed degradation of clarithromycin and erythromycin B: A comparative study using NMR spectroscopy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 467-474, 2000.

OPLUSTIL, C. P. Z., C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier 2001.

OROLA, L. *et al.* The effect of pH on polymorph formation of the pharmaceutically active compound tianeptine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 432, n. 1-2, p. 50-56, 2012.

PANKHURST, Q. A. *et al.* Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of physics D: applied physics** v. 36, p. 167-181, 2003.

PETCHAROEN, K.; SIRIVAT, A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. **Materials Science and Engineering B**, v. 177, n. 5, p. 421-427, 2012.

PURUSHOTHAM, S.; RAMANUJAN, R. V. Thermoresponsive magnetic composite nanomaterials for multimodal cancer therapy. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 2, p. 502-510, 2010.

- RAJINIKANTH, P. S.; MISHRA, B. Floating in situ gelling system of acetohydroxamic acid for clearance of H-pylori. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 6, p. 577-587, 2008.
- RAJINIKANTH, P. S.; MISHRA, B. Stomach-Site Specific Drug Delivery System of Clarithromycin for Eradication of Helicobacter pylori. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 10, p. 1068-1075, 2009.
- RAMANUJAN, R. V.; YEOW, Y. Y. Synthesis and characterisation of polymer-coated metallic magnetic materials. **Materials Science & Engineering C**, v. 25, n. 1, p. 39-41, 2005.
- RATTES, A. L. R., OLIVEIRA, W. P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, v. 171, n. 1, p. 7-14, 2007.
- REJINOLD, N. S. *et al.* Dual drug encapsulated thermo-sensitive fibrinogen-graft-poly (N-isopropyl acrylamide) nanogels for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 209-217, 2014.
- RODELLA, C. B. **Preparação e caracterização de catalisadores de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> suportados em TiO<sub>2</sub>**. 2001. Universidade de são paulo, São Carlos.
- RODRIGUEZ, A. F. R. *et al.* Synthesis, characterization and magnetic properties of polymer – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 100, p. 101-103, 2013.
- SARAVANAN, M. *et al.* Controlled Delivery of Ranitidine in the Stomach using Magnetic Field. **West Indian Medical Journal**, v. 58, n. 2, p. 87-91, 2009.
- SCHINDLER, P. W. A solution chemists view of surface-chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 12, p. 1697-1704, 1991.
- SIEGEL, R. E. Emerging gram-negative antibiotic resistance: Daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. **Respiratory Care**, v. 53, n. 4, p. 471-479, 2008.
- SILVA-FREITAS, É. L. *et al.* Magnetite Content Evaluation on Magnetic Drug Delivery Systems by Spectrophotometry: A Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 2, p. 521-524, 2011.
- SILVA, A. *et al.* Magnetic particles in biotechnology: from drug targeting to tissue engineering. In: PETRE, M. (Ed.). **Advances in applied biotechnology**: Intech, v.1, 2012. cap. 13, p.237-256.
- SILVA, A. K. A. *et al.* Synthesis and characterization of xylan-coated magnetite microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 334, n. 1-2, p. 42-47, 2007.

SILVA, A. K. A. *et al.* Development of superparamagnetic microparticles for biotechnological purposes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, n. 10, p. 1111-1116, 2008.

SILVA, A. K. A. *et al.* Magnetic carriers: A promising device for targeting drugs into the human body. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 11, p. 1179-1185, 2007.

SILVA, A. K. A. *et al.* Drug targeting and other recent applications of magnetic carriers in therapeutics. **Key Engineering Materials** v. 441, p. 357-378, 2010.

SILVA, É. L. *et al.* Development of a magnetic system for the treatment of *Helicobacter pylori* infections. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1566-1570, 2009.

SING, K. S. W. *et al.* Reporting physisorption data for gas solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (recommendations 1984) **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

SINGH, S. K. *et al.* Pharmaceutical characterization of amoxicillin trihydrate as mucoadhesive microspheres in management of *H. pylori* **International journal of pharmtech research**, v. 2, n. 1, p. 348-358, 2010.

SUERBAUM, S., MICHETTI, P. Medical progress: *Helicobacter pylori* infection. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175-1186, 2002.

TAUBES, G. The bacteria fight back. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 356-361, 2008.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808-818, 2001.

TSAI, Z.-T. *et al.* In situ preparation of high relaxivity iron oxide nanoparticles by coating with chitosan: A potential MRI contrast agent useful for cell tracking. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, n. 2, p. 208-213, 2010.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775-781, 2000.

WANG, C. Y. *et al.* Facile method to synthesize oleic acid-capped magnetite nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 2, p. 179-182, 2010.

WARREN, J.R; MARSHALL, B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. **The Lancet**, v. 321, n. 8336, p. 1273-1275, 1983. ISSN 0140-6736.

WEI, X. *et al.* Highly water-soluble nanocrystal powders of magnetite and maghemite coated with gluconic acid: Preparation, structure characterization, and



surface coordination. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 354, n. 1, p. 76-81, 2011.

WEISSLEDER, R. *et al.* Long-circulating iron-oxides for MR-imaging **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 2-3, p. 321-334, 1995.

WU, M. Z. *et al.* Magnetic field-assisted hydrothermal growth of chain-like nanostructure of magnetite. **Chemical Physics Letters**, v. 401, n. 4-6, p. 374-379, 2005.

YANG, L. B.; ESHRAGHI, J.; FASSIHI, R. A new intragastric delivery system for the treatment of Helicobacter pylori associated gastric ulcer: in vitro evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 3, p. 215-222, 1999.

YOO, J. W.; GIRI, N.; LEE, C. H. pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1-2, p. 262-267, 2011.

YU, X. *et al.* Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> surface electronic structures and stability from GGA plus U. **Surface Science**, v. 606, n. 9-10, p. 872-879, 2012.

ZHANG, Z. J. *et al.* Hydrothermal synthesis and self-assembly of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles with the magnetic and electrochemical properties. **Journal of Crystal Growth**, v. 310, n. 24, p. 5453-5457, 2008.

## APÊNDICE – Artigo submetido ao *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*

### High susceptibility magnetic system for dual antibiotic therapy of *Helicobacter pylori* infections.

Thales R. F. Pontes, Érica L. Silva-Freitas, Kátia L. Silva, Rafael P. A. Neto, Juliana F. Carvalho, Italo H. M. Damasceno, E. Socrates T. Egito

*Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rua Gal. Gustavo Cordeiro de Farias s/n, Petrópolis, CEP: 59012-570, Natal-RN, Brazil*

Aldo C. Medeiros

*Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rua Gal. Gustavo Cordeiro de Farias s/n, Petrópolis, CEP: 59012-570, Natal-RN, Brazil*

Ana L. Dantas, Rodolfo B. Silva

*Departamento de Física, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Rua, CEP: 59610-210, Mossoró-RN, Brazil*

Marco A. Morales, Artur S. Carriço<sup>1</sup>

*Departamento de Física Teórica e Experimental, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus universitário, CEP: 59078-970, Natal-RN, Brazil*

#### Abstract

We report the synthesis and characterization of Eudragit<sup>®</sup> S100 coated high susceptibility polymeric particles loaded with amoxicillin, clarithromycin and magnetite. Optical microscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, x-ray powder diffraction, nitrogen adsorption/desorption isotherms and vibrating sample magnetometry, revealed that the magnetite particles consists of a large number of aggregated nanometer-size crystallites, forming superparamagnetic particles with an average diameter of 6.8  $\mu\text{m}$  and large susceptibility. Also, the polymeric particles have a core-shell structure with an average diameter of 14.2  $\mu\text{m}$ , consisting of magnetite microparticles core, and a shell of amoxicillin and clarithromycin coated with Eudragit<sup>®</sup> S100. The dipolar interaction between crystallites leads to a factor of three enhancement of the initial susceptibility, favoring the targeting of the conjugated antibiotics for eradication of *Helicobacter pylori* infections.

#### Keywords:

*Helicobacter pylori*; Magnetic drug targeting; Antimicrobial agents; Spray drying; Superparamagnetic

PACS: 75.50.Tt

#### 1. Introduction

*Helicobacter pylori* was described by Warren and Marshall in 1983 [1] for which they were awarded the Nobel prize in 2005. This bacterium is a gram-negative microaerophilic non-invasive spiral bacillus that has the ability to live deep within the gastric mucus layer where pH is around 7.0 [2, 3], causing gastritis, peptic ulcers and gastric adenocarcinoma [4]. Furthermore, it has a powerful urease enzyme that catalyzes the hydrolysis of the urea to ammonia, enabling the bacteria to survive in the acid medium [5]. Although it induces a strong host local and systemic immune response, this bacterium has also developed mechanisms to evade host immunity [6].

A large research effort has been dedicated to finding a suitable treatment for the eradication of *H. pylori* infections. However, the treatment of *H. pylori* gastric infections has not yet

achieved a satisfactory level of therapeutic efficacy. Due to gastric emptying and systemic distribution, it requires high doses of oral formulations of antibiotics in order to achieve an adequate drug concentration level in the gastric mucus. Moreover, side effects, poor patient compliance and bacterial resistance have contributed to treatment failure [7].

Gastro-retentive dosage forms have been designed to enhance the eradication rate of *H. pylori*, by extending the residence time of the antibiotics in the stomach. The longer residence time may allow more of the antibiotic to penetrate through the gastric mucus layer to act on *H. pylori*, improving the therapeutic efficacy [8, 9].

So far the most recommended treatment, in all international guidelines, is the triple therapy. It is based on a formulation with the combination of two antibiotics and a proton pump inhibitor (PPI), for at least 7 days [10]. Amoxicillin and clarithromycin are two antibiotics widely used as antibacterials to

<sup>1</sup>Corresponding author: ascarrico@gmail.com

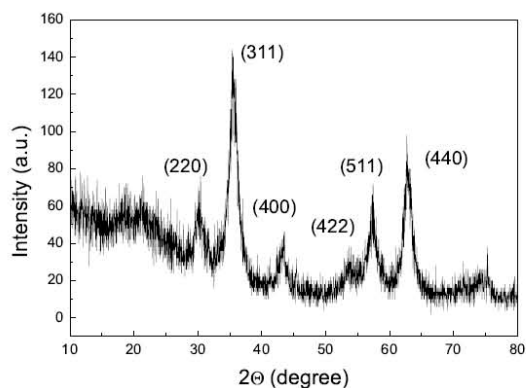


Figure 1: XRD pattern of the magnetite nanoparticles at room temperature.

treat *Helicobacter pylori* infections.

However, during the last two decades, widespread use of certain antibiotics (e.g. clarithromycin for respiratory infections) in the general population has led to an increase in primary *H. pylori* resistance. As a result, the initial effectiveness of standard triple therapy has progressively declined in the last few years. Therefore, new strategies in order to improve first-line treatment are still urgently needed [11, 12].

One way to overcome this drawback is the combination of drugs in the same formulation as proposed in several studies reported in the literature for different diseases [13].

In the particular case of antibiotics this association has proved to be of great importance, since it allows achieving suitable levels of drug concentration in the infected region, reducing the risk of bacterial resistance and enabling highly effective treatment [14].

We presently report a dual antibiotics formulation with advantages further enhanced by association with magnetic drug targeting.

Magnetic drug delivery by particulate carriers is a very efficient way of delivering a drug to a target tissue, such as a specific site of the gastrointestinal (GI) tract. The speed of travel through the stomach can be slowed down at specific positions by an external magnet, thereby changing the timing and/or extent of drug absorption in the stomach or intestines [15, 16].

Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) are well established in medical applications because of their appropriate magnetic properties and biological compatibility [17].

Magnetite particles may dissolve in acid media [18] and protection against gastric dissolution is an essential prior step to enable their use for local drug delivery in the stomach.

Eudragit<sup>®</sup> S100 is a widely used polymer with pH dependent solubility to protect microparticles against low pH [19]. It dissolves only in  $\text{pH} \geq 7.0$ , and has been used as a pH-sensitive polymer in various applications including enteric coating materials and drug delivery vehicles [20].

The successful development of a formulation for the treat-

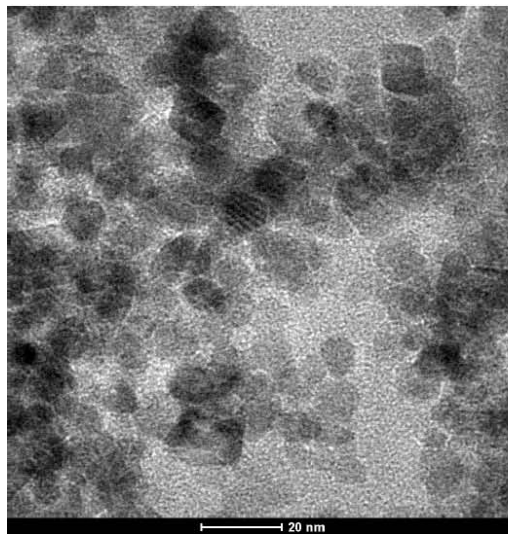


Figure 2: TEM picture of the magnetite nanoparticles.

ment of *H. pylori* infections in the gastro-intestinal tract, requires the use of micrometer-sized particles.

It is known that, as compared to microparticles, nanoparticles have higher diffusion capacity, favoring their accumulation in the intercellular spaces of mucosal epithelial cells, and higher interaction with the immune system, favoring larger uptake by macrophages [21]. Thus, microparticles are more effective for gastric retention, leading to more promising drug delivery systems.

We presently report the synthesis and characterization of a magnetic dual antibiotic formulation. It is designed for local delivery of antibiotics for the treatment of *H. pylori* infections in the gastro-intestinal tract. The system consists of microparticles composed of magnetite, amoxicillin and clarithromycin, coated by Eudragit<sup>®</sup> S100 (MACE particles). It combines the necessary protection of the drugs and the magnetic particles against the low pH of the gastric fluid, and the advantages of dual antibiotics formulations further enhanced by magnetic targeting with high susceptibility superparamagnetic particles.

## 2. Materials and Methods

The Ferric chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 99% of purity) and ferrous sulphate heptahydrate ( $\text{Fe}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 99% of purity) were purchased from Acros Organics, EUA; hydrochloric acid (37% aqueous solution) and sodium hydroxide (99% purity) were purchased from Vetec Chemical, Brazil; amoxicillin trihydrate (98.8%) and Clarithromycin (97.3%) were purchased from Galena, Brazil; Eudragit<sup>®</sup> S100 was purchased from Rohm GmbH & Co, Germany; methanol (Vetec Chemical, Brazil, 99.8%), phosphate buffer pH 7.4 and deionized wa-

ter were of pharmaceutical grade and used as received without further purification.

The structural properties of the magnetite and MACE particles were characterized by X-ray powder diffraction (XRPD), using a Shimadzu (XRD-6000) X-ray diffractometer. Representative powder samples were analyzed in the range  $10^\circ < 2\theta < 80^\circ$ , using the Cu K $\alpha$  line as the radiation source with a wavelength of  $\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$ , using a scanning speed of  $2^\circ/\text{min}$  and step size of  $0.02^\circ$ .

Nitrogen adsorption/desorption (NSD) isotherms at a temperature of 77 K were recorded on a Micromeritics Instrument (ASAP- 2420). The specific surface area ( $S_{BET}$ ) of the powder samples was obtained from the standard Brunauer - Emmett - Teller (BET) model [22], and the pore size distribution was calculated using the Barrett - Joyner - Halenda (BJH) method [23].

The analysis of the size of the magnetite and MACE particles were made using an optical microscope (Leitz/Leica Biomed microscope) calibrated with a stage micrometer scale [24]. The morphology analysis of the samples was conducted by scanning electron microscope (SEM, XL 30 ESEM, Philips) and transmission electron microscopy (TEM, Tecnai20, FEI).

Magnetization measurements were performed using a home-made vibrating sample magnetometer (VSM), previously calibrated with nickel. Representative powder samples were obtained after drying the samples. Magnetization versus applied field was measured at room temperature for all samples.

We have used the standard procedure of iron coprecipitation to produce  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles [25], stock solutions of 0.1M ferric chloride hexahydrate and 0.05M ferrous sulphate heptahydrate were prepared with 0.4M HCl solution. Then, 30 ml of the mixture of  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  were added to a 900 ml of NaOH 1M solution at 300K and under mechanic stirring at 960 rpm for 30 minutes.

At the end of this process the pH was adjusted for 7.0, the supernatant was discarded, and the precipitated was washed with deionized water four times. Then, the fine powder was dried in the oven at  $105^\circ\text{C}$ .

The MACE particles were prepared using the spray-drying method [26]. We have used a Mini Spray dryer (Büchi B191, Germany) with a 0.7mm diameter nozzle. The Spray dryer was fed under a flux of 1.2 mL/min, and the drying of the particles was in two steps: one at the top at the temperature of  $120^\circ\text{C}$  and the other at the bottom of the chamber  $80\text{-}85^\circ\text{C}$ .

The dispersion to feed the spray drier was prepared by first dispersing Eudragit<sup>®</sup> S100 in a phosphate buffer pH 7.4 (0.0004 M). Amoxicillin was dispersed in water at a concentration of 0.0069 M and clarithromycin in methanol (0.0089 M). The dispersions were mixed under mechanic stirring at 960 rpm, before the addition of 0.086 M of magnetite nanoparticles.

### 3. Characterization

The x-ray diffraction (XRD) patterns were analyzed using the Rietveld method. The pattern in Figure1 shows reflection planes corresponding to magnetite. The average lattice parameter obtained from the Rietveld refinement was of 0.839 nm.

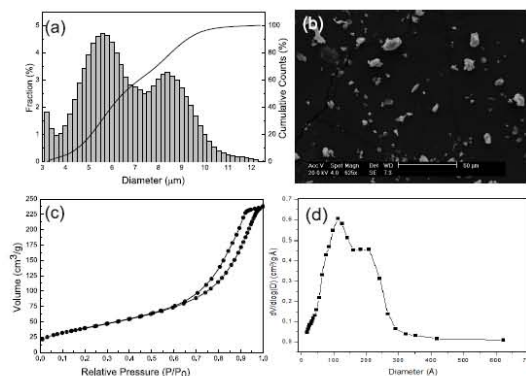


Figure 3: (a) Histogram of the magnetite aggregates obtained from optical microscopy. (b) MEV image of the magnetite aggregates. (c) NSD hysteresis loop and (d) The size distribution of the pores formed in the aggregates obtained from the NSD hysteresis.

This value is in close agreement with the reported value for stoichiometric magnetite [27]. The magnetite particle size obtained from Debye-Scherrer formula was of 5.8nm.

Figure 2 shows a typical transmission electron microscopy (TEM) picture of the magnetite microparticles. The image corresponds to a small area of a microparticle with dimensions of the order of 120nm, showing magnetite nanoparticles with dimensions in the 3nm to 15nm size range.

The magnetite particle size distributions were determined after sonication the samples for 10 min to avoid agglomeration of the particles. The samples were placed on glass slides and size measurements were made on sets of 1500 particles. We have used four samples of each formulation, and size measurements were performed according to the Ferrets diameter principle, using an optical microscope calibrated with a stage micrometer scale [24].

The size histogram shown in Figure 3(a) indicates that the magnetite particles have dimensions in the  $3\mu\text{m}$  to  $12\mu\text{m}$  range, with a bimodal size distribution centered at  $5.6\mu\text{m}$  and  $8.4\mu\text{m}$ , with an average particle size of  $6.8\mu\text{m}$ . The MEV image in Figure 3(b) shows microparticles of magnetite with sizes up to  $12\mu\text{m}$ .

Nitrogen sorption-desorption (NSD) isotherms were measured at 77K to determine the specific surface area, and to evaluate the porous structure of the magnetite particles. Figure 3(c) shows the NSD hysteresis loop. The magnetite particles NSD measurements showed a mesoporous system with a porous structure with a wide distribution of diameters (Figure 3(d)), from 3nm to 40nm, and two main features: a maximum at 10 nm and a shoulder at 20 nm.

The NSD hysteresis measured at 77 K can be classified as type IV, and from this curve we have calculated the specific surface ( $S_{BET}$ ) parameter which is equal to  $146.42 \text{ m}^2/\text{g}$ . Notice that high  $S_{BET}$  values are important in applications requiring high level sorption of macromolecules, as in the case of drug

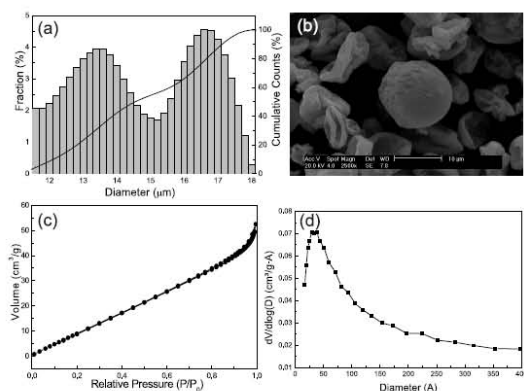


Figure 4: (A) Histogram related to the size distribution of the formulation. (B) SEM image of the formulation. (C) NSD hysteresis curve. (D) Porous size distribution obtained from the NSD measurements.

loading in pharmaceutical applications [29].

#### 4. Drug loading in the Eudragit<sup>®</sup> coated magnetite beads

The MACE particles were prepared as follows: a given volume of 0.0069 M aqueous solution of amoxicillin and 0.0089 M methanolic solution of clarithromycin were added to a 0.00004 M aqueous dispersion of Eudragit<sup>®</sup> S100, to this dispersion was added a given mass of magnetite nanoparticles. A Mini Spray dryer Bchi B191 was fed with 200 ml of the above dispersion to a rate of 1.2 ml/min. The beads were formed at a rate of 400 Nl/h and with an efficiency of 85 w%.

From Figure 4(a) and Figure 4(b), we notice that the MACE particles have irregular shapes, dimensions in the 11  $\mu\text{m}$  to 18  $\mu\text{m}$  range, and a bimodal size distribution with two main peaks centered at 13.5  $\mu\text{m}$  and 16.7  $\mu\text{m}$ , with an average size of 14.2  $\mu\text{m}$ .

The range of dimensions and also the values of the main peaks are roughly 8  $\mu\text{m}$  larger than ones found in Figure 3 for the magnetite particles, and represents a layer of 4  $\mu\text{m}$  of the polymer and bactericides formulation surrounding the magnetite particles.

This result seems to indicate that the MACE particles have similar drug loading, and a core-shell structure, with a magnetic core surrounded by a 4  $\mu\text{m}$  layer containing the antibiotics and Eudragit<sup>®</sup> S100. This structure gives to the formulation enhanced protection against low pH gastric fluids.

The porous size distribution of MACE particles, as seen from Figure 4(d), covers the 2nm to 40nm range, with a maximum at 5 nm. This scale of porous size distribution is appropriate for releasing the drugs from the bead compartment to the target tissue.

The XRD patterns for individual elements present in the formulation are shown in Figure 5(a) - Figure 5(c).

A common feature for the bactericides is that they are crystalline with very intense peaks for  $2\theta < 30$  degrees. Eudragit<sup>®</sup>

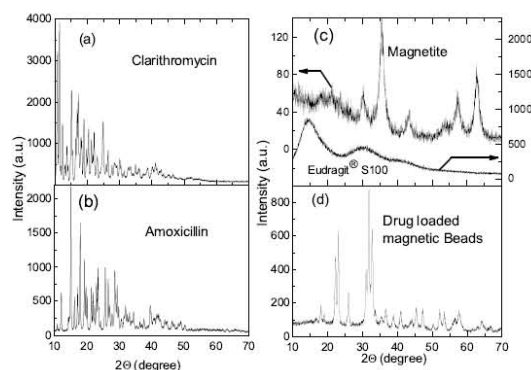


Figure 5: XRD pattern of the individual constituents and the MACE particles.

S100 lacks crystallinity, exhibiting wide peaks at 15 and 30 degrees. When these substances are mixed to form the MACE particles, very intense peaks appeared at angles not related to the individual components.

Figure 5(d) shows the XRD pattern for the drug loaded magnetic beads (MACE particles). Because magnetite had very low intensity diffraction peaks, it was difficult to observe in the formulation pattern. Almost all the diffraction peaks in the formulation are related to a new crystalline phase. Similar diffractograms have previously been found in samples containing Eudragit<sup>®</sup> S100, amoxicillin and magnetite, and prepared by spray drying [31].

Eudragit<sup>®</sup> S100 is an anionic copolymer based on methacrylic acid and methyl methacrylate 1:2. In general polymers are amorphous solids, that is, they are microscopically disordered without translation symmetry.

Polymers can crystallize from a solution upon evaporation of a solvent. In dilute solutions, the molecular chains have no connection with each other and exist as a separate entity. The polymer concentration may increase via solvent evaporation, this will increase van der Waals forces between chains and will favor crystallization if the solvent is slowly evaporated.

It is known that polymer crystallites will form if the sample is slowly cooled from the melt and above the glass transition,  $T_g$ . The  $T_g$  value for pure Eudragit<sup>®</sup> S100 is around 150°C, but it can be lowered if the polymer is mixed or crosslinked with foreign molecules.

To better discuss the pattern observed in our formulation, we have performed additional XRD studies in samples containing only amoxicillin and magnetite, clarithromycin and magnetite, and the both antibiotics and magnetite. In none of these cases the patterns found were similar to the formulations pattern. Furthermore, the sample containing only amoxicillin and magnetite showed a characteristic pattern for pure magnetite. Therefore, the crystalline structure observed in the formulation seems to be related to crystallization of the Eudragit<sup>®</sup> S100 polymer in the spray drier process.

In Figure 6 we show the hysteresis loops of the magnetite

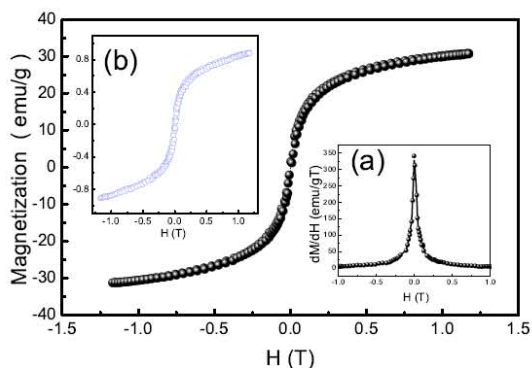


Figure 6: Hysteresis loops of the magnetite particles. In the inset (a) we show the static susceptibility of the magnetite particles and (b) the magnetization of the MACE particles.

and MACE particles. The loops in Figure 6 show rather small values of coercivity. Also, for any value of the magnetic field, the magnetization of the MACE particles is 2.9% of the corresponding value of for the magnetite particles. This indicates that the magnetite mass content of the MACE particles is around 2.9%, and that the manipulation in the evaporation process in the spray drier to make the MACE particles, did not affect the magnetic structure of the magnetite microparticles.

The MACE particles were prepared by feeding the spray drier with a suspension containing 100mg of magnetite, 200mg of amoxicillin, 200mg of clarithromycin and 500mg of Eudragit® S100. This corresponds to a 10% mass content of magnetite.

Therefore the spray drying leads to a reduction in the magnetite content from 10% in the original emulsion down to 2.9% in the the MACE particles. This reduction is commonly found in formulations prepared by spray drier. The differences in the physical properties of the components of the suspension control the impact of the operating parameters of the spray drier on the final yield [31, 32]

Two features are worth noticing. The magnetite as well as MACE particles are superparamagnetic. Furthermore, both systems exhibit large values of the initial susceptibility. This is rather useful for magnetic drug targeting, since the magnetic force, which controls the drug targeting efficiency, is proportional to the initial magnetic susceptibility [33].

The width of the peaks in the XRD data of the magnetite particles (shown in Figure 1) revealed that the coherence length in the crystal lattice was of the order of 5.8 nm.

On the other hand, the MEV pictures (a typical image is shown in Figure 3B) shows particles with dimensions ranging from  $3\mu\text{m}$  up to  $12\mu\text{m}$ . Thus, the magnetite micro-particles consist in the agglomeration of large number of nanometer sized crystallites. This is a common feature of iron oxide particle systems produced by coprecipitation. In our process no surfactant was used and no peptization was carried out. Therefore,

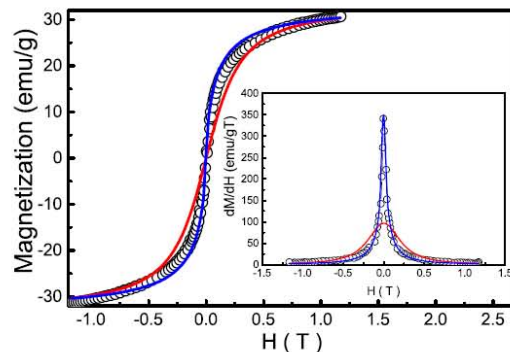


Figure 7: Hysteresis loop of the magnetite particles. In the inset we show the static magnetic susceptibility. The experimental results are shown in the open symbol curves, and the blue (red) color continuum line curves are for the theoretical model with (without) the dipolar interaction between the nanoparticles.

there is a good chance of neutralization of the nanometer-sized crystallites, allowing their agglomeration [34].

The agglomeration of magnetite nanoparticles into stable micrometer sized particles leads to promising properties, regarding the efficiency of magnetic targeting.

As discussed in detail below, the magnetite nanoparticles have a small size dispersion with dimensions in the 4nm to 6nm range. Thus, they are smaller than the critical size (25nm) required to prevent thermal relaxation effects at room temperature [35]. This would lead to small values of the initial susceptibility. However, the magnetite nanoparticles are packed at moderately large density inside the microparticles. As a result, each nanoparticle is within the reach of the dipolar field of the others, leading to a larger susceptibility.

From the NSD data, the distance between crystallites ranges from 3nm up to 30nm. Therefore, the average distance between crystallites is of the order of the crystallite diameters. Under these densities, each crystallite is within the reach of the magnetic field produced by the surrounding particles.

Each magnetite microparticle contains billions of nanometer sized crystallites bound together in a stable micro-particle. Thus, the local field at each superparamagnetic crystallite is bound to be larger than the applied field. This may produce a relevant increase in the initial susceptibility. In our samples the dipolar effect leads to nearly a factor of four enhancement of the initial susceptibility.

Before entering the discussion of the theoretical model, it is instructive to describe certain features of the dipolar interaction between the superparamagnetic crystallites.

In the presence of a magnetic field  $H$ , an isolated superparamagnetic particle has a thermal average magnetic moment, along the field direction, which may be estimated [35] as:

$$\mu = \mu_0 \mathcal{L} \{ \mu_0 H / k_B T \} \quad (1)$$

where  $\mu_0$  is the saturation moment, and  $\mathcal{L}$  is the Langevin function,  $\mathcal{L}(x) = \coth(x) - 1/x$ .

Magnetite has a magnetic moment of  $16.4 \mu_B$  per unit cell of  $0.295 \text{ nm}^3$  volume [35]. A 6nm diameter spherical magnetite particle has a saturation moment of around  $6380 \mu_B$ . Thus, at room temperature, a magnetic field of 10mT strength is enough to break the thermal relaxation balance, producing a thermal average net magnetic moment of around 10% of the saturation value. This amounts to stabilizing  $638 \mu_B$  per 6nm diameter particle. At a distance of 6nm from particle's center the dipolar field is of the order of 30mT. Thus at small external field strengths, the dipolar field produced by the 6nm magnetite nanoparticle at its neighborhood is of the order of magnitude of the external field.

In order to have a full description of the dipolar interaction between the nanoparticles one needs to know the position and the size of all particles. The shape of the micro-particles is also relevant, since elongated micro-particles favor a larger net dipolar effect. However, essential features may be explored in simpler ways.

We use a self-consistent method. The thermal average value of the magnetization is represented by an average over a distribution of superparamagnetic spherical crystallites, each of which is considered to be subjected to the thermal average dipolar field of the others.

For a given value of the external field, the magnetization is given by:

$$M(H) = M_S \int \mathcal{L} \left\{ \frac{\mu(D) \mathcal{H}_{eff}}{k_B T} \right\} f(D) dD \quad (2)$$

where  $\mathcal{L}$  is the Langevin function,  $M_S$  is the saturation magnetization,  $\mu(D) = \pi M_S D^3 / 6$  is the saturation magnetic moment of a nanoparticle of diameter  $D$ , and  $f$  is a log-normal distribution function.

$M(H)$  and the effective field  $\mathcal{H}_{eff}$  are determined self-consistently.  $\mathcal{H}_{eff}$  includes the external field and an effective dipolar field,  $\mathcal{H}_{eff} = H + \mathcal{H}_d$ . We assumed that the effective dipolar field  $\mathcal{H}_d$  is proportional to the thermal average dipolar field produced by the crystallite at a distance of one diameter,  $\mathcal{H}_d = 2\alpha \langle \mu(D) \rangle / D^3$ .  $\langle \mu(D) \rangle$  is the thermal average magnetic moment of the crystallites with diameter  $D$ .

$M(H)$ ,  $\alpha$  and the distribution function were adjusted self-consistently to fit the experimental data. We have found a narrow log-normal distribution function

$$f(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma D} \exp \left[ -\frac{\ln(D/D_0)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (3)$$

with a small standard deviation  $\sigma = 0.08$  and a  $D_0 = 5.0\text{nm}$  median diameter, with 49% of the particles with diameter in the 5nm – 6nm range, in agreement with the X-ray results.

In Figure 7 we show the magnetization curve and susceptibility of the magnetite micro-particles. Notice from Figure 7 that the theoretical model (blue line curves) reproduces quite well the experimental results. Notice also that the magnetization does not saturate for an external field of 1.1 T strength. This is a signature of small size superparamagnetic nanoparticle systems.

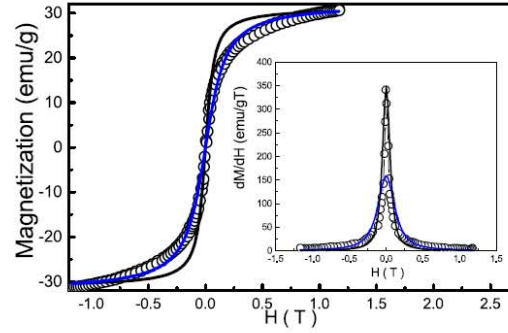


Figure 8: Hysteresis loops of the non-interacting nanoparticles. In the inset we show the static magnetic susceptibility. The experimental results are shown in the open symbol curves, and the black (blue) color continuum line curves are for the theoretical model with median diameter of 8nm (6nm).

We have also included, for comparison purposes, the magnetization curve for a system of non-interacting nanoparticles with the same size dispersion (red line curves).

It is clear that both models reproduce the large field limit of the magnetization curve, except for a small asymmetry found in the VSM data. However, in the low field range there are noticeable differences.

The dipolar interaction between the nanoparticles leads to the large value of the initial susceptibility found in the experimental data of the magnetite micro-particles. The initial susceptibility of the non-interacting nanoparticles system is smaller by a factor of 3.6.

One may think that the large value of the initial susceptibility corresponds to a nanoparticle system with larger diameter values. In Figure 8 we show that this is not the case. We have used the same size distribution function, as in Eq(3), except for the value of the median diameter, and calculated the magnetization and susceptibility of non-interacting nanoparticle systems with median diameters from 6nm up to 8nm.

In Figure 8 we show the results for the 6nm and 8nm median diameter nanoparticles systems. Notice that the 6nm diameter curve reproduces the large field limit but fails to reproduce the low field susceptibility. The magnetization of the 8nm diameter nanoparticle system reproduces well the low field limit susceptibility, but saturates too early, at an external field strength around 500mT.

## 5. Conclusions

In summary, we have reported the synthesis and characterization of a dual antibiotics formulation with advantages further enhanced by association with magnetic drug targeting.

The formulation is designed for the treatment of *H.pylori* infections in the gastro-intestinal tract, and consists of Eudragit S100 coated core-shell polymeric particles, loaded with amoxicillin and clarithromycin and with a magnetic core composed of high susceptibility magnetite microparticles.

The method of fabrication is a two-step process taking advantage of the well-known technique of coprecipitation of iron salts to prepare iron oxides, and the advantages of the spray-drying technique, a single-step process widely used in the industry to prepare microcapsules.

The magnetite particles are composed of magnetite nanoparticles with diameters in the 4nm to 6nm range, and have dimensions in the 3 $\mu$ m to 12 $\mu$ m range, with a bimodal size distribution centered at 5.6 $\mu$ m and 8.4 $\mu$ m. The particles have a high specific surface area of 146.42 m<sup>2</sup>/g, as required for drug loading in pharmaceutical applications, and pore sizes of about 10 nm.

We have shown that the magnetite particles have a low field static susceptibility of 341 emu/gT, and that this large value of susceptibility of the MACE particles magnetic core originates in the dipolar interaction between the magnetite nanoparticles, within the magnetite microparticles.

The MACE particles have irregular shapes, dimensions in the 11  $\mu$ m to 18 $\mu$ m range, and a bimodal size distribution with two main peaks centered at 13.5  $\mu$ m and 16.7  $\mu$ m, with a porous size ranging from 2nm to 40nm.

We suggest that the MACE particles have a core-shell structure, with a magnetic core, made of magnetite microparticles, surrounded by a 4 $\mu$ m layer containing the antibiotics and Eudragit<sup>®</sup> S100.

This structure gives to the formulation enhanced protection against low pH gastric fluids, as well as promising chances of efficient drug release.

To our best knowledge, the present work is the first attempt to prepare a magnetic system for local delivery of the amoxicillin and clarithromycin antibiotics for the treatment of *H. pylori* infections.

## Acknowledgements

This research was partially supported by the Brazilian research agencies CAPES and CNPq. The work of A.S.C. was supported by CNPq Grant No. 350773. The work of A.L.D. was supported by CNPq Grant No. 309676. The authors acknowledge technical support from the staff of the NEPGN Laboratory, UFRN.

- [1] J.R. Warren, B. Marshall, Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis, *The Lancet* 321 (1983) 1273-1275.
- [2] S. Schreiber, M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H.O. Werling, C. Josenhans, S. Suerbaum, The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 5024-5029.
- [3] L.B. Yang, J. Eshraghi, R. Fasshi, A new intragastric delivery system for the treatment of *Helicobacter pylori* associated gastric ulcer: in vitro evaluation, *J. Control. Release* 57 (1999) 215-222.
- [4] D. Majumdar, J. Bebb, J. Atherton, *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcers, *Medicine (Baltimore)* 39 (2011) 154-161.
- [5] D.L. Weeks, S. Eskandari, D.R. Scott, G. Sachs, A H<sup>+</sup> gated urea channel: The link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization, *Science* 287 (2000) 482-485.
- [6] J.C. Atherton, M.J. Blaser, Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications, *J. Clin. Investig.* 119 (2009) 2475-2487.
- [7] P.S. Rajinikanth, B. Mishra, Floating in situ gelling system of acetohydroxamic acid for clearance of *H. pylori*, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34 (2008) 577-587.
- [8] P.S. Rajinikanth, B. Mishra, Stomach-Site Specific Drug Delivery System of Clarithromycin for Eradication of *Helicobacter pylori*, *Chem. Pharm. Bull.* 57 (2009) 1068-1075.
- [9] P.L. Bardonnnet, V. Faivre, W.J. Pugh, J.C. Piffaretti, F. Falson, Gastroenteric dosage forms: Overview and special case of *Helicobacter pylori*, *J. Control. Release* 111 (2006) 1-18.
- [10] P. Malfertheiner, F. Megraud, C. O'Morain, F. Bazzoli, E. El-Omar, D. Graham, R. Hunt, T. Rokkas, N. Vakil, E.J. Kuipers, E.S. Grp, Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the maas-tricht III consensus report, *Gut* 56 (2007) 772-781.
- [11] Review article: the effectiveness of standard triple therapy for *Helicobacter pylori* has not changed over the last decade, but it is not good enough, *Aliment pharmacol ther* 34 (2011) 1255-1268.
- [12] Treatment of *Helicobacter pylori* infection: The past and the future, *European Journal of Internal medicine* 21 (2010) 357-359.
- [13] Dual drug encapsulated thermo-sensitive fibrinogen-graft-poly (N-isopropyl acrylamide) nanogels for breast cancer therapy, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 114 (2014) 209-217.
- [14] O. Guillaume, X. Garric, J.-P. Lavigne, H. Van Den Berghe, J. Coudane, Multilayer, degradable coating as a carrier for the sustained release of antibiotics: preparation and antimicrobial efficacy in vitro, *Journal of Controlled Release* 162 (2012) 492-501.
- [15] U.O. Hfeli, Magnetically modulated therapeutic systems, *Int. J. Pharm.* 277 (2004) 19-24.
- [16] M. Saravanan, A.B. Balaji, P. Kavitha, J.D. Kingsley, Controlled Delivery of Ranitidine in the Stomach using Magnetic Field, *West Indian Med. J.* 58 (2009) 87-91.
- [17] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Delivery. Rev.* 54 (2002) 631-651.
- [18] P.W. Schindler, A solution chemists view of surface-chemistry, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1697-1704.
- [19] V.R. Sinha, R. Kumria, Polysaccharides in colon-specific drug delivery, *Int. J. Pharm.* 224 (2001) 19-38.
- [20] J.W. Yoo, N. Giri, C.H. Lee, pH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery, *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 262-267.
- [21] J.J. Powell, N. Faria, E. Thomas-McKay, L.C. Pele, Origin and fate of dietary nanoparticles and microparticles in the gastrointestinal tract, *Journal of autoimmunity* 34 (2010) 226-233.
- [22] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, *J. Am. Chem. Soc.* 60 (1938) 309.
- [23] E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda, The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms, *J. Am. Chem. Soc.* 73 (1951) 373.
- [24] M.N. Pons, H. Vivier, V. Delcour, J.R. Authelin, L. Pailleres-Hubert, Morphological analysis of pharmaceutical powders, *Powder Technol.* 128 (2002) 276.
- [25] Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, *Ieee Transactions on Magnetics* 17 (1981) 1247-1248.
- [26] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, R. Saurel, Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, *Food Res. Int.* 40 (2007) 1107-1121.
- [27] C.A. Gorski, M. Scherer, Determination of nanoparticulate magnetite stoichiometry by Mossbauer spectroscopy, acidic dissolution, and powder X-ray diffraction: a critical review, *American Mineralogist* 95 (2010) 1017-1026.
- [28] D.K. Kim, Y. Zhang, W. Voit, K.V. Rao, M. Muhammed, Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles, *Journal of magnetism and magnetic materials* 225 (2001) 30-36.
- [29] B.V. Bhaskara Rao, R. Mukherji, G. Shitre, F. Alam, A.A. Prabhune, S.N. Kale, Controlled release of antimicrobial Cephalixin drug from silica microparticles, *Materials Science and Engineering: C*, 34 (2014) 9-14.
- [30] C. Han, D. Zhao, C. Deng, K. Hu, A facile hydrothermal synthesis of porous magnetite microspheres, *Materials Letters* 70 (2012) 7072.
- [31] Érica L. Silva, Juliana F. Carvalho, Thales R.F. Pontes, Elquio E. Oliveira, Barbara L. Francelino, Aldo C. Medeiros, E. Scrates T. do Egito, Jos H. Araujo, Artur S. Carriço, Development of a magnetic system for the treatment of *Helicobacter pylori* infections, *Journal of Magnetism and*



- Magnetic Materials 321 (2009) 15661570
- [32] E. Esposito, R. Roncarati, R. Cortesi, et al., *Pharm. Dev. Technol.* 5 (2000) 267
  - [33] Q A Pankhurst, J Connolly, SK Jones and J Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R167R181.
  - [34] Pedro Tartaj, Maria del Puerto Morales, Sabino Veintemillas-Verdaguer, Teresita Gonzalez-Carre no and Carlos J Serna, The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R182R197
  - [35] J. M. D. Coey, *Magnetism and Magnetic Materials*, Cambridge University Press, Cambridge, 2010

## ANEXO – Normas do *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*



# JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS

### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

●	<b>Description</b>	p.1
●	<b>Audience</b>	p.1
●	<b>Impact Factor</b>	p.1
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	p.1
●	<b>Editorial Board</b>	p.2
●	<b>Guide for Authors</b>	p.3



ISSN: 0304-8853

#### DESCRIPTION

The *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* provides an important forum for the disclosure and discussion of original contributions covering the whole spectrum of topics, from basic **magnetism** to the technology and applications of **magnetic materials** and **magnetic recording**. The journal encourages greater interaction between the basic and applied subdisciplines of magnetism with short but comprehensive review articles, a rapid publication channel with "Letters to the Editor", in addition to full-length contributions. The section on *Information Storage: Basic and Applied* contains articles on all topics in magnetic recording media and processes.

#### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

#### AUDIENCE

Solid state physicists, materials scientists.

#### IMPACT FACTOR

2012: 1.826 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

#### ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents/Physics, Chemical, & Earth Sciences  
 EI Compendex Plus  
 Engineering Index  
 INSPEC  
 Metals Abstracts  
 Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**S.D. Bader**, Div. of Materials Science, Argonne National Laboratory, Argonne, IL 60439, USA, **Email:** [jmmm@anl.gov](mailto:jmmm@anl.gov)

### *Editors:*

**R.W. Chantrell**, Dept. of Physics, University of York, Heslington, York, YO10 5DD, UK, Fax: (+44) 1904 432214, **Email:** [roy.chantrell@york.ac.uk](mailto:roy.chantrell@york.ac.uk)

**D. Givord**, Institut Néel, 25 Avenue des Martyrs, BP 166, F-38042 Grenoble Cedex 9, France, Fax: +33 4 7688 1191, **Email:** [jmmm\\_givord@grenoble.cnrs.fr](mailto:jmmm_givord@grenoble.cnrs.fr)

### *Founding Editor:*

**A.J. Freeman**, Dept. of Physics and Astronomy, Weinberg College of Arts and Sciences, Northwestern University, 2145 N. Sheridan Rd, Evanston, IL 60208-3112, USA, Fax: +1 847 491 5082, **Email:** [art@freeman.phys.northwestern.edu](mailto:art@freeman.phys.northwestern.edu)

### *Members until December 2014*

**A.S. Arrott**, Burnaby, BC, Canada  
**D.D. Awschalom**, Santa Barbara, USA  
**J.M.D. Coey**, Dublin, Ireland  
**A. Continenza**, Coppito, Italy  
**K. Dumesnil**, Vandoeuvre les Nancy cedex, France  
**A. Fert**, Orsay, France  
**P. Gorria**, Oviedo, Spain  
**U. Hafeli**, Vancouver, BC, Canada  
**X.F. Han**, Beijing, China  
**G. Hrkac**, Sheffield, UK  
**T. Jungwirth**, Prague 6, Czech Republic  
**S. Maekawa**, Tokai, Japan  
**I. Mertig**, Halle, Germany  
**T.H.M. Rasing**, Nijmegen, Netherlands  
**I.K. Schuller**, La Jolla, CA, USA

### *Members until December 2015*

**D. Bahadur**, Powai, Mumbai, India  
**O. Chubykalo-Fesenko**, Madrid, Spain  
**C. Felser**, Dresden, Germany  
**P. Fischer**, Berkeley, CA, USA  
**J. Fontcuberta**, Catalonia, Spain  
**X.F. Jin**, Shanghai, China  
**C.A. Ross**, Cambridge, MA, USA  
**S. Saitoh**, Aoba, Sendai, Japan  
**P. Schobinger-Papamantellos**, Zurich, Switzerland  
**R. Sessoli**, Sesto Fiorentino, Italy  
**B. Shen**, Beijing, China  
**R. Stamps**, Glasgow, UK

### *Members until December 2016*

**J. Barnas**, Adam Mickiewicz University of Poznan, Poznan, Poland  
**G.E.W. Bauer**, Tohoku University, Aoba, Sendai, Japan  
**N.M. Dempsey**, Institut Néel, Grenoble Cedex 9, France  
**H. Ding**, Nanjing University, Nanjing, China  
**A. Granovsky**, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation  
**K.M. Krishnan**, University of Washington, Seattle, WA, USA  
**J.R. Kwo**, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, ROC  
**V.L. Pokrovsky**, Texas A&M University, College Station, TX, USA  
**M. Sagawa**, Intermetallics Co., Ltd., Kyoto, Japan  
**K.G. Sandeman**, Imperial College London, London, UK  
**T. Santos**, HGST, a Western Digital Company, San Jose, CA, USA  
**J. Slonczewski**, NY, USA  
**B. Smorodin**, Perm State University, Perm, Russian Federation  
**Y. Tokura**, University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Japan  
**J.-Q. Xiao**, University of Delaware, Newark, DE, USA  
**C.-Y. You**, Inha University, Incheon, South Korea  
**H. Zabel**, Ruhr-University Bochum, Bochum, Germany

## GUIDE FOR AUTHORS

---

*Your Paper Your Way*

[ppyw-gfa-banner.gif](#) your paper your way

### BEFORE YOU BEGIN

#### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

#### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

#### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

#### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

#### **Copyright**

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

#### *For Subscription articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### *For Open Access articles*

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Open Access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution (CC BY):** lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND):** for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

## **PREPARATION**

### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### **References**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### **Formatting requirements**

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

#### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

## LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class *elsarticle.cls* (<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography.

For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see <http://www.elsevier.com/latex>.

## Article structure

### Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### Results

Results should be clear and concise.

### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

## Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
  - Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
  - Number the illustrations according to their sequence in the text.
  - Use a logical naming convention for your artwork files.
  - Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
  - For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
  - Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.
- A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.



TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

*Non-electronic artwork*

Provide all illustrations as high-quality printouts, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly mark all illustrations on the back (or - in case of line drawings - on the lower front side) with the figure number and the author's name and, in cases of ambiguity, the correct orientation.

Mark the appropriate position of a figure in the article.

*Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

*Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

**References**

*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

*Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

*Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

*References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

*Reference management software*

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

*Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

*Reference style*

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

*Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

**Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

**AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and

to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

#### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

### **Author benefits**

#### **Author benefits**

*No page charges.* Publishing in the *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* is free. *Free offprints.* The corresponding author will receive 25 offprints free of charge. An offprint order form will be supplied by the Publisher for ordering any additional paid offprints. *Discount.* Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on all Elsevier books.

### **AUTHOR INQUIRIES**

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>