FURG
Tese de Doutorado
NOVOS POLÍMEROS <i>ROD-COIL-ROD</i> : SÍNTESE, ENCAPSULAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA EM SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
Marinalva Cardoso dos Santos
PPGQTA
Rio Grande, RS - Brasil 2021

por

MARINALVA CARDOSO DOS SANTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) (RS), como requisito parcial para obtenção do título de DOUTORA EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2021

Ficha Catalográfica

S237n	Santos, Marinalva Cardoso dos
020711	Novos polímeros <i>Rod-Coil-Rod</i> : síntese, encapsulamento e
	caracterização físico-química em sistemas nanoestruturados /
	Marinalva Cardoso dos Santos. – 2021. 150 f.
	Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande –
	FURG, Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e
	Ambiental, Rio Grande/RS, 2021.
	Orientadora: Dra. Vânia Rodrigues de Lima.
	Coorientador: Dr. Alexandre Dal-Bó.
	1. Lipossomos 2. Polímero 3. Rod-Coil-Rod 4. Interações
	Moleculares 5. Caracterização I. Lima, Vânia Rodrigues de II. Dal-Bó,
	Alexandre III. Título.
	CDU 54

Catalogação na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Escola de Química e Alimentos Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Defesa de Tese

NOVOS POLÍMEROS *ROD-COIL-ROD*: SÍNTESE, ENCAPSULAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA EM SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Elaborada por

Marinalva Cardoso dos Santos

Como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Química Tecnológica e Ambiental

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Vânia Rodrigues de Lima (FURG) (Presidente-Orientadora)



Prof. Dr. Alexandre Gonçalves Dal-Bó (Unesc)



Prof. Dr. Tito Sant Anna Cadaval Júnior (FURG)

Alexandre L. Parije

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize (UFSC)

Prof.^a Dr.^a Rostene Maria Clementin (FURG)

Rio Grande, 30 de abril de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à virgem Maria, pois é na fé que encontro perseverança para superar os obstáculos. Fé e ciência caminham mais do que nunca juntos!

À minha família, meu alicerce. Ao meu esposo Mario Nelson (vida), pelo incentivo, compreensão e por abraçar meus ideais! Ao meu filho Pedro Henrique (Luz dos meus olhos), que ainda pequenininho, aprendeu o valor do estudo e, com isso, foi muito benevolente. À minha tia Mercêdes, que sonhou meus objetivos comigo!

Aos meus pais, em especial ao meu pai Mário Cardoso (em memória), pelos ensinamentos.

À minha orientadora Dr^a. Vânia Rodrigues de Lima. Obrigada Professora, pelos anos que dedicou sua orientação com empenho e carinho. Que investiu e instruiu-me no desenvolvimento das investigações científicas, desde a iniciação científica (IC), passando pelo Mestrado e agora no Doutorado.

Ao meu coorientador Dr. Alexandre Gonçalves Dal-Bó, sempre disponível e atencioso, seja em Criciúma, SC, na Universidade do extremo Sul Catarinense (UNESC) ou em atendimentos remotos (internet). Pelos ensinamentos e auxílio com materiais para o desenvolvimento desta tese. E ao seu grupo de pesquisa (Laboratório de Processamento de Polímeros Avançados (LAPPA).

Ao corpo docente da EQA-FURG! Cada um com suas peculiaridades, agregou ensinamentos que levarei para toda a minha vida, que me fez ter uma visão diferenciada do que é ciência! Em especial professores Dr^a. Vânia Rodrigues de Lima, Dr^a. Rosilene Maria Clementin, Dr^a. Darlene Flores, Dr. Alex Flores e Dr. Felipe Kessler.

À banca, professores Dr. Alexandre Luis Parize, Dr^a. Rosilene Maria Clementin e Dr. Tito Roberto Sant'Anna Cadaval Junior, por aceitar contribuir, nesta tese.

À equipe do Centro Integrado de Análises (CIA), desta universidade (FURG), pelas análises de RMN, principalmente ao Dr. Diego Cabrera, pelas sugestões e amizade desde a minha IC.

Ao meu grupo de pesquisa, o Grupo de Investigação de Interações Moleculares em Membranas (GIIMM), ao qual tenho orgulho em dizer que faço parte! Agradeço a vocês, meus amigos, pela jornada, que agora nem parece tão longa. Pelos congressos, ensinamentos, cafés entre conversas, incentivos, gargalhadas... Principalmente aos meus amigos, em ordem alfabética, rs... doutorando Alessandro Nogueira, Dr^a. Amanda Marques, Dr^a. Carla Borges, Dr^a. Desirée Costa e MSc. Nichole Silva. Ao IC Guilherme dos Santos pelo apoio e à IC Katheleen Bastos, a qual auxiliei em suas pesquisas.

Aos meus amigos, dos grupos de pesquisa das áreas de inorgânica, físico-química, analítica e orgânica da Escola de Química e Alimentos. Grata pelos estudos, reuniões e sugestões.

A equipe da Secretaria de Pós-Graduação em especial à Rosane Alves e ao Murilo Vitória da Silva.

Por último, porém não menos importante, agradeço aos órgãos de fomento CNPq, FAPERGS e CAPES. A contribuição destes, foi de grande relevância para o desenvolvimento desta tese.

"A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Nós devemos ter persistência e, acima de tudo, confiança em nós mesmos..."

''Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas.''

Marie Curie (1867-1934)



Sumário

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DA LITERATURA	26
 2.1 Lipossomos	30
2.2.2 RMN de ¹ H	33
2.2.3 RMN de ³¹ P	35
2.2.4 Potencial ζ	38
2.2.5 DLS	42
2.2.6 UV-Vis - Turbidez	45
2.2.7 DSC	48
2.3 Polímeros	52
2.3.2 Copolímeros supramoleculares	53
2.3.3 Copolímeros supramoleculares: Rod-Coil	54
2.3.4 Arquitetura de copolímeros supramolecular usados em veículos farmacológicos	55
2.3.5 Sistemas lipossomais contendo polímeros: aplicações em sistemas de liberação fármacos com ênfase em doenças infecciosas	de 56
3. OBJETIVOS	61
3.1 Objetivo geral613.2 Objetivos específicos61	
4. MATERIAIS E METODOS	62
 4.1 Reagentes e solventes utilizados	62
4.2.1.1 Síntese do polímero Col-PEO-Trip	62
4.2.1.2 Polímeros Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc	64
4.2.1.3 Caracterização dos polímeros	65
4.2.1.3.1 RMN de ¹ H e 13 C	65

4.2.1.3.2 FTIR	65
4.2.2 Preparo dos lipossomos	65
4.3 Estudo da dinâmica molecular dos sistemas lipossomais-poliméricos.66 4.3.1 HATR-FTIR	66
4.3.2 RMN de ¹ H e de ³¹ P	67
4.3.3 DLS e potencial ζ	67
4.3.4 UV-Vis-Turbidez	68
4.3.5 DSC	68
5. RESULTADOS E DISCUSÃO	69
5.1 Síntese do novo polímero <i>Rod-Coil-Rod</i> , o Col-PEO-Trip	72
5.1.1.1 Espectro de RMN de ¹ H e de ¹³ C e, FTIR do hemisuccinato colesteril	72
5.1.1.2 Espectro de RMN de ¹ H e de ¹³ C e, FTIR do conjugado Col-PEO ₁₀₀₀	76
5.1.1.3 Espectro de RMN de ¹ H e de ¹³ C e, FTIR do Col-PEO-Trip	80
5.2 Polímeros Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc	
5.3.1 Análises de HATR-FTIR	86
 5.3.1 Análises de HATR-FTIR 5.3.1.1 HATR-FTIR: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Trip 	86
 5.3.1 Análises de HATR-FTIR	86 86 91
 5.3Caracterização da Interação Inolecular em hpossonios	86 91 96
 5.3Caracterização da Interação Inolecular em hpossonios	86 91 96 102
 5.3Caracterização da Interação Inolecular em hpossonios	86 91 96 102 106
 5.3Caracterização da interação inolecular em hpossonios	86 91 96 102 106 109
 5.3Caracterização da Interação Inforecular em hipossonios	86 91 96 102 106 109 113
 5.3.1 Análises de HATR-FTIR 5.3.1.1 HATR-FTIR: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Trip 5.3.1.2 HATR-FTIR: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Gal 5.3.1.3 HATR-FTIR: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-GlicNAc 5.3.2 Análises de RMN de ¹H 5.3.3 Análises de RMN de ³¹P 5.3.4 Análises de potencial ζ 5.3.5 Análises de DLS 5.3.6 Análises de UV-Vis - Turbidez 	86 91 96 102 106 109 113 115
5.3.5 Caracterização da Interação molecular em hipossonios	86 91 96 102 106 109 113 115 117
5.3.Caracterização da interação molecular em inpossonios 84 5.3.1 Análises de HATR-FTIR	86 91 96 102 106 109 113 115 117 123
 5.3.Caracterização da interação inolecular em hipossonios	86 91 96 102 106 109 113 115 117 117 123 128
5.3.Caracterização da interação indecular em inpossonios 84 5.3.1 Análises de HATR-FTIR	86 91 96 102 106 109 113 115 117 117 123 128 128 143

8.1.1 Mecanismo proposto referente a primeira etapa da rota sintética para a obtenção do hemisuccinato colesteril
8.1.2 Mecanismo proposto referente a segunda etapa da rota sintética para a obtenção do conjugado colesterol-PEO ₁₀₀₀ 144
8.1.3 Mecanismo proposto referente a terceira etapa da rota sintética para a obtenção do novo polímero colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Col-PEO-Trip)145
 8.2 Espectro de HATR-FTIR, efeito dos polímeros no número de onda e largura de bandas dos principais grupos da membrana lipossomal de Aso.146 8.2.1 Atribuições das bandas de estiramentos e suas variações: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Trip
8.2.2 Atribuições das bandas de estiramentos e suas variações: lipossomos de Aso e Aso+Col- PEO-Gal
8.2.3 Atribuições das bandas de estiramentos e suas variações: lipossomos de Aso e Aso+Col- PEO-GlicNAc

LISTA DE FIGURAS

=

Figura 1: Lipossomos	.26
Figura 2: Exemplo de fórmula estrutural de fosfatidilcolina.	.27
Figura 3: Espectro de HATR-FTIR de membrana lipídica e exemplificação de medida de número de	
onda, e a largura à 75% da altura de picos referentes aos v dos principais grupos que compõe regiões	
específicas dos lipídios	.32
Figura 4: Medidas de T ₁ em função do tempo de correlação τ_c (s), para sistemas lipossomais de alta	
mobilidade e baixa mobilidade	.34
Figura 5: Espectros teóricos de RMN de ³¹ P de lipossomos esféricos (a) e lipossomos elipsoidais (b). A	As
linhas sólidas e tracejadas são partes de absorção e dispersão dos espectros (calculados pela convolução)
de uma função de alargamento I (v) com uma função de probabilidade P (v) por programas matemáticos	s);
componentes do tensor de anisotropia de deslocamento químico estão representados como σ_{II}	
componentes paralelos e σ_{\perp} , componentes perpendiculares; eixos do elipsoide: c, eixo maior e a, eixo	20
menor	.30
Figura 6: Modelos espectrais de movimentos anisotropicos típico de dicamada lípidica, $L(a)$ e	27
Figure 7: Papresentação de lipossomos com a camada de íons positivos adsorvidos na camada de	.57
"Stern": relação notencial elétrico (mV) y plano de cisalhamento	20
Figura 8: Orientações de grupos colina, acima da bicamada linídica (a) e abaixo da bicamada linídica (.33 b)
a partir de fórmulas estruturais de fosfatidilcolinas	<u></u>
Figura 9: Ilustração generalizada da intensidade dependente do tempo da luz espalhada por partículas.	me
está flutuando devido ao movimento browniano	43 23
Figura 10: Ilustração esquemática da autocorrelação. A esquerda o gráfico das flutuações da intensidad	le.
da luz espalhada devido à variação na densidade de partículas no volume de observação, em um interva	ilo
de tempo (t) de t ₀ (tempo inicial) a t ₂ (tempo final). A esquerda o gráfico das duas funcões de	
autocorrelação (g (τ)) para uma espécie de partícula pequena, em verde e uma maior, em azul	.43
Figura 11: Representação das transições de transição de fase dos lipídios	.50
Figura 12: Classificação dos copolímeros de acordo com a disposição dos monômeros em: bloco (a),	
alternado (b), aleatório (c) e enxertado (d)	.54
Figura 13: Diferentes tipos de copolímeros em bloco: diblocos (a), triblocos (b), multiblocos (c) e estre	ela
(d)	.54
Figura 14: Arquiteturas de polímeros lineares (a) e ramificados (b)	.56
Figura 15: Ilustração de novos polímeros <i>Rod-Coil-Rod</i> (a), cujo bloco destacado em amarelo pode	
consistir de aminoácido ou glicídio para inserir em lipossomos (b).	.58
Figura 16: Fórmula estrutural do colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e	
colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNac), ao variar R , por galacte)se
(Gal) (a) e n-acetilglicosamina (GlicNAc) (b), respectivamente	.64
Figura 17: O novo polímero <i>Rod-Coil-Rod</i> , o colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Col-PEO-Trip): (a) antes	da
filtração sobre uma fina camada de celite e purificação/isolação e (b) pos filtração sobre uma fina cama	da
de celite e purificação/isolação.	.71
Figura 18 : Espectro de RMIN de ¹ H do hemisuccinato colesteril, em CDCl ₃	.72
Figura 19: Espectro de RMIN de ¹³ C do nemisuccinato colesteril, em CDCl ₃	.74
Figura 20: Espectro de FIIR do nemisuccinato colesteril.	.75
Figura 21 : Espectro de Rivin de ⁻ H do conjugado colesterol-PEO ₁₀₀₀ (Col-PEO ₁₀₀₀), em CDCl ₃	./b 70
Figure 22: Espectro de KIVIN de ²² C do conjugado colesterol-PEO ₁₀₀₀ (Col-PEO ₁₀₀₀), em CDCl ₃	./ð 70
Figure 24: Espectro de PTIK do conjugado consterol PEO $_{1000}$ (Col-PEO $_{1000}$)	.19
Figura 24: Espectro de RIVIN de El do colesterol PEO de triptofano (Col PEO Trip), em CDCI.	00. רס
rigura 25: Espectro de Rivilv de ²⁰ C do colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptolano (Col-PEO-1rip), em CDCl ₃	.82

Figura 26: Espectro de FTIR do colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Col-PEO-Trip)83
Figura 27: Polímeros: colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) (a) e colesterol-
PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNac) (b)84
Figura 28: Sistemas lipossomais de: Asolecitina de Soja (Aso), sistema controle (a), colesterol-PEO ₁₀₀₀ -
triptofano (Aso+Col-PEO-Trip) (b), colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) (c) e
colesterol-PEO1000-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNac) (d)85
Figura 29: Espectros de HATR-FTIR: o polímero colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Col-PEO-Trip),
lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e lipossomos de Aso+Col-PEO-Trip86
Figura 30: Efeito do colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Col-PEO-Trip) no número de onda e na variação da
largura de banda de grupos específicos de lipossomos de asolecitina de soja (Aso). As variações foram
calculadas a partir dos espectros mostrados na Figura 29 e dos valores listados na Tabela 10, em anexo na
seção 8.2.1
Figura 31: Ampliação das bandas de absorção da região apolar do v _{as} CH ₂ e v _s CH ₂ do espectro de
HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes
aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Aso+Col-PEO-Trip)88
Figura 32: Ampliação das bandas de absorção da região de interface dos v C=O (a) e v COC (b) do
espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul
as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Aso+Col-PEO-Trip)89
Figura 33: Ampliação das bandas de absorção da região polar dos $v_{as} PO_2^-$ (a) e $v_{as} N^+$ (CH ₃) ₃ (b) do
espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul
as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Aso+Col-PEO-Trip)90
Figura 34: Representação estrutural da influência do colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Col-PEO-Trip) nos
fosfolipídios da membrana lipossomal de asolecitina de soja (Aso), observadas por análises de HATR-
FTIR91
Figura 35 : Espectros de HATR-FTIR: lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e lipossomos de
Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal)92
Figura 36: Efeito do colesterol-PEO ₁₀₀₀ -galactose (Col-PEO-Gal) no número de onda e na variação da
largura de banda relacionados aos grupos específicos de lipossomos de asolecitina de soja (Aso). As
variações foram calculadas a partir dos espectros mostrados na Figura 35 e dos valores listados na Tabela
11, em anexo na seção 8.2.292
Figura 37: Ampliação das bandas de absorção da região apolar do v_{as} CH ₂ e v_s CH ₂ do espectro de
HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes
aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal)93
Figura 38: Ampliação das bandas de absorção da região de interface dos v C=O (a) e v COC (b) do
espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul
as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal)94
Figura 39: Ampliação das bandas de absorção da região polar dos $v_{as} PO_2^-$ (a) e $v_{as} N^+$ (CH ₃) ₃ (b) do
espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul
as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal)95
Figura 40:Representação estrutural da influência do colesterol-PEO ₁₀₀₀ -galactose (Col-PEO-Gal) nos
fosfolipídios da membrana lipossomal de asolecitina de soja (Aso), por análises de HATR-FTIR96
Figura 41: Espectros de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja
(Aso) e, em azul, as referente aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina
(Aso+Col-PEO-GlicNAc)
Figura 42: Efeito do colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) no número
de onda e na variação da largura de banda relacionados aos grupos específicos de lipossomos de
asolecitina de soja (Aso). As variações foram calculadas a partir dos espectros mostrados na Figura 41 e
dos valores listados na Tabela 12, em anexo na seção 8.2.397
Figura 43: Ampliação das bandas do v CH_2 no espectro de HATR-FTIR. Em vermelho, as bandas de
lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul, as referente aos lipossomos de Aso+colesterol-
PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc)98

Figura 44: Ampliação das bandas de absorção dos v C=O (a) e v COC (b) no espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc)......99 Figura 45: Ampliação das bandas de absorção do $v_{as} PO_2^-$ (a) e $v_{as} N^+(CH_3)_3$ (b) do espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).....100 Figura 46: Representação estrutural da influência do colesterol-PEO₁₀₀₀-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) nos fosfolipídios da membrana lipossomal, por análises de HATR-FTIR......101 Figura 47: Recuperação dos sinais de RMN¹H (de FID) da colina em lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip).103 Figura 48: Recuperação dos sinais de RMN de ¹H (de FID) da colina em lipossomo de: asolecitina de soja (Aso) e, contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e o colesterol-Figura 49: Ilustração dos polímeros Rod-Coil-Rod colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-nacetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc), na interação preferencial do colesterol com os metilenos lipídico, favorecendo a interação da região polar dos fosfolipídios com a região glicídica do polímero. Representado em azul, o colesterol, em verde, o poli (óxido etileno) PEO e, em amarelo, o Trip ou anel triazol com as porções glicídicas (Gal e GlicNAc).105 Figura 50: Espectro de RMN de ³¹ P- anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano Figura 51: Espectro de RMN de ³¹ P- anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de: asolecitina de soja (Aso), Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-Figura 52: Ilustração dos polímeros *Rod-Coil-Rod* colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-nacetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) e seu efeito na reorientação da região polar dos fosfolipídios. Representado em azul, o colesterol, em verde, o poli (óxido etileno) PEO e, em amarelo, o Trip ou anel Figura 53: Gráfico de absorbância de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e a influência dos polímeros colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc) nos valores de turbidez lipídica.....116 Figura 54: Curvas de DSC de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e Aso contendo o polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip).....118 Figura 55: Curvas de DSC de (a) lipossomos de asolecitina de soja (Aso) contendo o polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e (b) lipossomos de Aso contendo o polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc)......120 Figura 56: Representação estrutural da localização preferencial do colesterol em membranas lipossomais de fosfolipídios......121 Figura 57: Efeito do colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip) na membrana lipossomal de Asolecitina de soja (Aso), representado por setas que indicam os resultados obtidos dos principais grupo Figura 58: Efeito do colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) na membrana lipossomal de Asolecitina de soja (Aso), representado por setas que indicam os resultados obtidos dos Figura 59: Efeito do colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc) na membrana lipossomal de Asolecitina de soja (Aso), representado por setas que indicam os resultados obtidos dos principais grupos que compõem a membrana.....124

Figura 60: Ilustração dos polímeros *Rod-Coil-Rod* colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) inseridos em lipossomos de asolecitina de soja (Aso). Representado em marrom o fosfolipídio; representado em azul, o colesterol, em verde, o poli (óxido etileno) PEO e, em amarelo, o Trip ou anel triazol com as porções glicídicas (Gal e GlicNAc).......125

LISTA DE ESQUEMAS

=

Esquema 1: Representação esquemática da rota da síntese do novo polímero colesterol-PEO ₁₀₀₀ -	
triptofano (Col-PEO-Trip). A 1ª etapa (i): obtenção do hemisuccinato colesteril, a 2ª etapa (ii): obtenç	ção
do colesterol-PEO ₁₀₀₀ e a 3ª etapa (<i>iii</i>): obtenção do colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Col-PEO-Trip).	63
Esquema 2: Representação esquemática do método de preparação de lipossomos por evaporação por	fase
reversa. Solubilização do lipídio (a), formação das micelas reversas (b), evaporação do solvente (c),	
hidratação do organogel (d) e obtenção da suspensão lipossomal-LUVs (e).	66
Esquema 3: Mecanismo proposto: primeira etapa da rota sintética para a obtenção do hemisuccinato	
colesteril.	143
Esquema 4: Mecanismo proposto: segunda etapa da rota sintética para a obtenção do conjugado	
colesterol-PEO ₁₀₀₀ .	144
Esquema 5: Mecanismo proposto: terceira etapa da rota sintética para a obtenção do novo polímero	
colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Col-PEO-Trip).	145

LISTA DE TABELAS

=

Tabela 1: Multiplicidades referente ao deslocamento químicos (δ) dos sinais de RMN de ¹ H e, dados de
integrais e do hemisuccinato colesteril, em ppm73
Tabela 2: Multiplicidades referente ao deslocamento químicos (δ) dos sinais de RMN de ¹ H e, dados de
integrais do conjugado colesterol-PEO1000 (Col-PEO1000), em ppm77
Tabela 3: Multiplicidades referente ao deslocamento químicos (δ) dos sinais de RMN de ¹ H e, dados de
integral do colesterol-PEO1000-triptofano (Col-PEO-Trip), em ppm81
Tabela 4: Valores de T1 dos hidrogênios da colina presentes nos lipossomos de: asolecitina de soja (Aso),
Aso contendo o colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Aso+Col-PEO-Trip), Aso contendo o colesterol-PEO ₁₀₀₀ -
1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso contendo o colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-
acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc)103
Tabela 5: Valores das larguras dos picos de RMN de ³¹ P, presente nos lipossomos de: asolecitina de soja
(Aso), Aso contendo o colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Aso+Col-PEO-Trip), Aso contendo o colesterol-
PEO1000-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso contendo o colesterol-PEO1000-1,2,3-triazol-n-
acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc), em ppm107
Tabela 6: Influência dos polímeros colesterol-PEO1000-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO1000-
1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-
PEO-GlicNAc) quanto a distribuição de cargas na superfície de lipossomos de asolecitina de soja (Aso).
Tabela 7: Influência dos polímeros colesterol-PEO1000-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO1000-
1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-
PEO-GlicNAc) no diâmetro dos lipossomos de asolecitina de soja (Aso), em nm114
Tabela 8: Valores de turbidez dos lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e a influência dos polímeros
colesterol-PEO1000-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO1000-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e
Aso+colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) nas mesmas, em u.a116
Tabela 9: Valores de temperatura de transição de fase $(T_m, ^\circ C)$ e, valores de variação de entalpia (ΔH)
dos sistemas de asolecitina de soja (Aso), Aso contendo o colesterol-PEO ₁₀₀₀ -triptofano (Aso+Col-PEO-
Trip), Aso contendo o colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso contendo o
colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc)118
Tabela 10: Variação de número de onda e largura de bandas de grupos específicos, presentes nos
lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e lipossomos de Aso contendo o polímero colesterol-PEO ₁₀₀₀ -
triptofano (Aso+Col-PEO-Trip), em cm ⁻¹ 147
Tabela 11: Variação de número de onda e largura de bandas de grupos específicos, presentes nos
lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e lipossomos de Aso contendo o polímero colesterol-PEO ₁₀₀₀ -
1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal), em cm ⁻¹ 148
Tabela 12: Variação de número de onda e largura de bandas de grupos específicos, presentes nos
lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e lipossomos de Aso contendo o polímero colesterol-PEO ₁₀₀₀ -
1,2,3-triazol-n-acetiglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc), em cm ⁻¹ 149

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- a, elipsóide
- aa, aminoácido
- aas, aminoácidos
- A, absorbância
- Aso, asolecitina de soja
- BHE, barreira hematoencefálica
- B₀, campo magnético
- c, concentração
- c, eixo principal
- cm, centímetro
- Col-PEO-Gal, colesterol-poli (óxido etileno) -1,2,3-triazol-galactose
- Col-PEO-GlicNAc, colesterol-poli (óxido etileno) -1,2,3-triazol-N-acetiglicosamia
- Col-PEO-Trip, colesterol-poli (óxido etileno) -triptofano
- λ , comprimento de onda
- σ_{sca}, seção transversal
- CSA, anisotropia de deslocamento químico, do inglês "chemical shift anisotropy"
- δ, deslocamento químico
- ΔG , variação de energia livre de Gibbs
- ΔH , variação de entalpia
- △S, variação de entropia
- ΔT , variação de temperatura
- D, constantes de difusão translacional
- DLS, espalhamento de luz dinâmico, do inglês "dynamic light scattering"
- DNA, ácido desoxirribonucléico
- DSC, calorimetria de varredura diferencial, do inglês "differential scanning calorimetry"
- ELS, espalhamento de luz eletroforética
- FAE, função de autocorrelação exponencial
- FID, decaimento da indução livre, do inglês "Free Induction Decay"
- FTIR, infravermelho com transformada de Fourier
- G, energia livre de Gibbs
- Γ , extinção devido ao espalhamento
- Gal, galactose

GlicNAc, n-acetilglicosamina

H, entalpia

H_{II}, estado de fase lipídica hexagonal

HATR-FTIR, infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada horizontal, do inglês *"horizontal attenuated total reflection-Fourier transform infrared"*

HIV, vírus da imunodeficiência humana do inglês "human immunodeficiency vírus"

HSV, herpes-vírus simples do inglês "Herpes Simplex Viru"

Hz, hertz

I, intensidade da luz espalhada

Io, intensidade da luz incidente

IV, infravermelho

J, constante de acoplamento

K_B, é a Constante de Boltzmann

l, comprimento do caminho

L, estado de fase lipídica lamelar ou bicamada

La, fase cristal-líquido

Lβ, fase gel-sólido

LUVs, Vesículas Unilamelares Grandes, do inglês "Large Unilamellar Vesicles"

 m^2 / Vs, metro quadrado/volt segundo

MHz, mega-hertz

MLVs, Vesículas Multilamelares Grandes, do inglês "Multilamellar Large Vesicles"

mV, milivolts

 η , viscosidade

n, índice de refração do meio

v, estiramento axial

vas, estiramento axial assimétrico

nm, nanometro

 v_s , estiramento axial simétrico

 v_0 , frequência de precessão

NOE, Efeito Overhausen Nuclear, do inglês "Overhauser Nuclear Effect"

OMS, Organização Mundial da Saúde

PDI, índice de polidispersão

PEO, poli (óxido etileno)

Ψ, potencial elétrico

 $\Psi_{"bulk"}$, potencial elétrico da solução

 ψ_0 , superfície de interface

pH, potencial hidrogeniônico

r, raio da partícula

r_h, raio hidrodinâmico

RF, radiofrequência

RMN de ¹H, ressonância magnética nuclear de ¹H, do inglês "¹H nuclear magnetic resonance" RMN de³¹P, ressonância magnética nuclear de ³¹P, do inglês "³¹P nuclear magnetic resonance"

Rivin de P, ressonancia magnetica nuclear de P, do ingles P nuclear magnetic re

s, distância de espalhamento da partícula

S, entropia

σ, tensor

 σ_{II} , tensor paralelo

 σ_{\perp} , tensor perpendicular

SUVs, Vesículas Unilamelares Pequenas, do inglês "Small Unilamellar Vesicles"

TLC, cromatografia de camada delgada, do inglês "Thin Layer Chromatography"

T, temperatura

t, tempo

te, atenuação devido ao espalhamento

t_u, turbidez

T, Tesla

 τ_c , tempo de correlação

 θ , o ângulo de espalhamento

T₁, tempo de relaxação longitudinal

T_m, temperatura de transição de fase principal, do inglês *"main transition temperature" ou "melting temperature"*

mening temperatur

E, extinção

 \mathcal{E}_A , é o coeficiente de absorção molar

Trip, triptofano

UV-Vis, espectrofotometria no ultravioleta visível, do inglês "ultraviolet visible"

ζ, zeta

NOVOS POLÍMEROS *ROD-COIL-ROD*: SÍNTESE, ENCAPSULAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA EM SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Autora: Marinalva Cardoso dos Santos Orientadora: Prof. Dr^a. Vânia Rodrigues de Lima Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Dal-Bó

As doenças, incluindo as associadas às infecções virais, tais como HIV, HSV e COVID-19, propiciam a necessidade de investigar e produzir novos modelos de liberação prolongada de fármacos que atendam critérios de biocompatibilidade, especificidade e de menor toxicidade. Neste âmbito, são relevantes os nanocarreadores de fármacos baseados em lipídios e polímeros, tais como os lipossomos contendo polímeros supramoleculares do tipo Rod-Coil-Rod. Os lipossomos são vantajosos, por apresentarem os critérios acima descritos bastante estabelecidos, e os polímeros por promoverem alternância e versatilidade dos blocos tanto rígidos (Rod), quanto flexíveis (*Coil*). A partir destas informações, este trabalho objetivou, a partir da síntese de três novos polímeros sintéticos do tipo Rod-Coil-Rod, o colesterol-poli (óxido etileno)-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-poli (óxido etileno)-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e o colesterolpoli (óxido etileno)-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc), o estudo das suas interações em lipossomos constituídos de asolecitina de soja (Aso), através de caracterizações espectroscópicas, espectrofotométrica e termoanalítica. A síntese do Col-PEO-Trip foi proposta neste trabalho e, gerou rendimento de 75%. O Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc cedidos, também foram obtidos com rendimentos próximos a 75%. Os polímeros incorporados nos lipossomos tiveram seus efeitos monitorados pelas técnicas de: infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada horizontal (HATR-FTIR), ressonância magnética nuclear de ¹H (RMN de ¹H) e de ³¹P (RMN de ³¹P), potencial zeta (ζ), espalhamento de luz dinâmico (DLS), espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-Vis) e calorimetria de varredura diferencial (DSC). Os dados de HATR-FTIR demonstraram que, o Col-PEO-Trip em lipossomos de Aso interagiu preferencialmente com a região de interface lipídica, provocando variações do número de onda/largura de banda de 5,78 cm⁻¹/21,38 cm⁻¹ e 15,43 cm⁻¹/19,99 cm⁻¹, dos estiramentos v_s C=O e v_s COC, respectivamente. O Col-PEO-Gal variou o número de onda do v_{as} N⁺(CH₃)₃ em 19,29 cm⁻¹ e o Col-PEO-GlicNAc, em 28,93 cm⁻¹. Considerando-se o efeito das porções glicídicas, o GlicNAc, constituinte do Col-PEO-GlicNAc, gerou interações mais significativas que a Gal, porção do Col-PEO-Gal, do tipo dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio, com a região polar da

membrana de Aso. Os resultados de RMN de ¹H mostraram que, o Col-PEO-Trip aumentou o tempo de relaxação longitudinal (T_1), dos hidrogênios da colina lipídica ($N^+(CH_3)_3$; 3,2 ppm), na região polar dos lipossomos em 12%, tornando-a mais móvel. De outro lado, o polímero que contém a porção Gal, reduziu o T_1 em 5,62%, tornando-a menos fluida; enquanto o que contém a porção GlicNAc, aumentou o T₁ em 11,23 %, deixando a região polar mais fluida. A análise de RMN de ³¹P constatou a forma do espectro dos lipossomos, típica de fase hexagonal (H_{II}), e que não foi alterada pela adição do Col-PEO-Trip. A presença do Col-PEO-Gal na membrana alterou a forma do espectro, que se tornou típica de estado de fase em bicamada (L). A inserção do Col-PEO-GlicNAc no lipossomo não alterou a forma do espectro de RMN, mantendo a fase lipídica como sendo H_{II}. A análise da largura do pico de RMN de ³¹P indicou efeito de acréscimo em 45,60% após inserção do Col-PEO-Trip, redução da largura em 22,05%, provocada por Col-PEO-Gal, e aumento da largura após interação na membrana com Col-PEO-GlicNAc, em 76,41%. Os dados de potencial ζ mostraram que os polímeros Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc promoveram uma variação de 8,9 nm, 32,25 nm e 12,8 nm, respectivamente, neste parâmetro, favorecendo a redução da hidrofobicidade da superfície lipossomal e, conservando os valores de carga superficial negativa, os quais são recomendados para as formulações para tratamento de infecções virais. Os valores obtidos via DLS demonstraram que a presença dos três polímeros reduziu os tamanhos de lipossomos, quando comparado aos lipossomos de Aso (controle). O Col-PEO-Trip reduziu o diâmetro dos lipossomos em 49,60 %, o Col-PEO-Gal em 74 %, tornando um modelo promissor nos estudos de ultrapassagem da Barreira hematoencefálica (BHE), e o Col-PEO-GlicNAc em 28,79%. Os valores de variação de entalpia (ΔH), obtidos por DSC, indicaram que os polímeros Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc aumentaram os valores deste parâmetro, em módulo, de -0,10 J/g (controle) para -0,16 J/g, -0,13 J/g e -0,22 J/g, respectivamente. O Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc, aumentaram a temperatura de transição de fase principal (T_m) de seus modelos correspondentes em $|8,08| \circ C$, $|6,4| \circ C \in |5,2|$ ° C, na devida ordem. Assim, promoveram alterações nas forças de van der Waals, ao ordenar a região apolar dos lipossomos. De forma geral, os polímeros reduziram a fluidez, na ordem Col-PEO-Gal > Col-PEO-Trip > Col-PEO-GlicNAc e, aumentaram a estabilidade dos lipossomos de Aso. Os novos sistemas lipossomais, demonstraram diferentes interações intermoleculares, como as dipolares e ligações de hidrogênio e, formas de empacotamento, tanto em relação ao controle, como entre si. Tais características os tornam promissores para estudos de atividades biológicas, em prol do tratamento de doenças, tais como as infecções virais.

Palavras-chave: lipossomos; polímero; Rod-Coil-Rod; interações moleculares; caracterização.

NEW *ROD-COIL-ROD* POLYMERS: SYNTHESIS, ENCAPSULATION AND PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION IN NANOSTRUCTURED SYSTEMS

Author: Marinalva Cardoso dos Santos Advisor: Prof. Dr^a. Vânia Cardoso dos Santos Co-Advisor: Prof. Dr. Alexandre Dál-Bó

Diseases, including those associated with viral infections, such as HIV, HSV and COVID-19, provide the need to investigate and produce new models of prolonged release of drugs that meet the criteria of biocompatibility, specificity and less toxicity. In this context, drug nanocarriers based on lipids and polymers are relevant, such as liposomes containing supramolecular polymers of the Rod-Coil-Rod type. Liposomes are versatile phospholipids, used, among others, as a controlled release system for drugs or biologically active substances. Liposomes are advantageous for presenting the criteria described above quite established, and polymers for promoting alternation and versatility of both rigid (Rod) and flexible (Coil) blocks. From this information, this work aimed, from the synthesis of three new synthetic polymers of the *Rod-Coil-Rod* type, cholesterol-poly (ethylene oxide) -tryptophan (Col-PEO-Trip), cholesterol-poly (ethylene oxide) -1,2,3-triazole-galactose (Col-PEO-Gal) and cholesterol-poly (ethylene oxide) -1,2,3-triazole-nacetylglycosamine (Col-PEO-GlicNAc), the study of interactions in liposomes consisting of soy spectrophotometric asolecithin (Aso), through spectroscopic, and thermoanalytical characterizations. The synthesis of Col-PEO-Trip was proposed in this work and generated a yield of 75%. The Col-PEO-Gal and Col-PEO-GlicNAc ceded were also obtained with yields close to 75%. When the polymers were incorporated in the liposomes, were monitored by the techniques of: Fourier transform infrared spectroscopy with horizontal attenuated total reflectance (HATR-FTIR), nuclear magnetic resonance of ¹H (¹H NMR), and ³¹P (³¹P NMR), zeta potential (ζ), dynamic light scattering (DLS), visible ultraviolet spectrophotometric (UV-Vis) e differential scanning calorimetry (DSC). The HATR-FTIR data demonstrated that the Col-PEO-Trip in Aso liposomes interacted, preferentially, with the lipid interface region, there were variations of $v_s C =$ O and v_s COC in the wavenumber / bandwidth of 5.78 cm⁻¹ / 21.38 cm⁻¹ and 15.43 cm⁻¹ / 19.99 cm⁻¹, respectively. Col-PEO-Gal varied the wave number of vas N⁺(CH₃)₃ by 19.29 cm⁻¹ and Col-PEO- GlicNAc by 28.93 cm⁻¹, from the point of view of the effect of the glycidic portions, the GlicNAc constituent of the Col-PEO-GlicNAc, generated more significant interactions than the Gal portion of the Col-PEO-Gal, of the dipole-dipole type and hydrogen bonds, with the polar

region of the membrane (from Aso). The results of ¹H NMR showed that the Col-PEO-Trip increased the longitudinal relaxation time (T_1) , of the hydrogens of the lipid choline $(N^+(CH_3)_3;$ 3.2 ppm), in the polar region of the liposomes by 12 %, making it more mobile. On the other hand, the polymer containing the Gal portion, reduced T_1 by 5.62%, making it less fluid; while the one containing the GlicNAc portion, increased T_1 by 11.23%, making the polar region more fluid. The ³¹P NMR analysis found the shape of the Aso liposome spectrum, a shoulder in a high field and an intense peak in a low field, typical of the H_{II} phase of anisotropic lipid movement, which was not altered by the addition of Col-PEO- Trip. The opposite effect exhibited Col-PEO-Gal in the membrane, which presented the shape of typical lines of the L phase state. The Col-PEO-GlicNAc did not alter the shape of the liposomal spectrum. The increase in the width of the peak of lipid phosphates, reflects in the reduction of the mobility of the region and, the effect was observed in the membrane that contained the Col-PEO-Trip, the width of the peak was increased in 45.60%; while the one containing Col-PEO-Gal, the width was reduced by 22.05%; the Col-PEO-GlicNAc, increased the width by 76.41%. The ζ potential data showed that the polymers Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal and Col-PEO-GlicNAc, promoted a variation of 8.9 nm, 32.25 nm and 12.8 nm, respectively, favored the reduction of the hydrophobicity of the liposomal surface and, preserved values of negative surface charge that are preferable in formulations for the treatment of viral infections. The DLS values of the liposomal models with polymers, showed reduced sizes, compared to the Aso liposomes (control). Col-PEO-Trip reduced the vesicles by 49.60%, Col-PEO-Gal by 74%, making the model relevant in studies of overcoming the Blood-brain barrier (BHE), and Col-PEO-GlicNAc by 28.79%. The DSC values of enthalpy variation (ΔH) of Aso liposomes was -0.10 J/g, and for the control containing the polymers Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal and Col-PEO-GlicNAc of - 0.16 J / g, -0.13 J/g and -0.22 J/g, respectively. Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal and Col-PEO-GlicNAc, increased the main phase transition temperature (T_m) of their corresponding models by [8.08] ° C, [6.4] ° C and [5.2] ° C, in proper order. They promoted alteration in the van der Waals forces, when ordering the non-polar region. In general, the polymers reduced the fluidity, in the order Col-PEO-Gal>Col-PEO-Trip>Col-PEO-GlicNAc and, increased the stability of Aso liposomes. The new liposomal systems demonstrated different intermolecular interactions, such as dipolar and hydrogen bonds, and forms of packaging, both in relation to control, and between themselves. Such characteristics make them promising for studies of biological activities, in favor of the treatment of diseases, such as viral infections.

Keywords: liposomes; polymer; Rod-Coil-Rod; molecular interactions; characterization.

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de liberação prolongada de fármacos baseados em nanocarreadores lipídicos, tais como os **lipossomos**, são bastante aplicados no tratamento de doenças e em pesquisas relacionadas às mesmas (Batista et al., 2007; Egbaria & Weiner 1991; Edwards & Baeumner 2006; Lis et al., 1998). Dentre as doenças, estão incluídas as infecciosas como a HIV (sigla do inglês *"human immunodeficiency vírus"*), HSV (sigla do inglês *"Herpes Simplex Viru"*) (Pinnapireddy et al., 2019) e covid-19 (Liu et al., 2020; Zheng et al., 2020).

Os lipossomos, através de modificações em seus constituintes estruturais, podem interagir com diversos sistemas biológicos em nível molecular podendo estimular, vetorizar e interagir com as células-alvo e tecidos (Gregoriadis et al.,1999; Mertins et al., 2009; Ulrich et al., 2002). Os lipossomos são versáteis no que se refere as formas de obtenção (Sánchez et al., 2013; Hope et al., 1986), assim como as suas aplicações (Gregoriadis et al.,1999; Ulrich et al., 2002). Os métodos de preparo propiciam lipossomos com diferentes parâmetros de empacotamento lipídico, sendo também o reflexo da estrutura da molécula. Tais parâmetros também podem definir as formas de administração mais viáveis, tais como tópicas, nasal, oral, etc. Embora os lipossomos sejam carreadores promissores, ainda existem desafios relacionados a estabilidade do sistema tanto para o seu período de estocagem, quanto para a sua vetorização a um tecido alvo no organismo (Masserini, 2013).

Quando aplicados em formulações, uma maneira de atribuir ao sistema lipossomal características funcionais para aumentar sua eficiência contra doenças, tais como as infecciosas, assim como a sua estabilidade, é inserir nestes sistemas **copolímeros anfifílicos supramoleculares** (Pinnapireddy et al., 2019). Entretanto, ainda que importantes, os estudos descritos na literatura sobre tal aplicação são limitados (Schaffazick et al., 2003).

Vale ressaltar que a síntese de copolímeros anfifílicos, supramoleculares, permite distintas possibilidades de automontagem molecular como a descrita para os polímeros *Rod-Coil* (Mai & Eisenberg 2012). O processo de automontagem referente a estes polímeros é também uma estratégia de funcionalização molecular que se destaca em diversas áreas da nanociência e nanotecnologia (Giacomelli et al., 2010, Kuo et al., 2008; Xu et al., 2019). Dentre tais áreas, são amplamente descritas as aplicações em sistemas farmacológicos, como em sistemas lipossomais (Dékány et al., 2001; Dos Santos et al., 2016; Michelleto et al., 2015; Takeuchi., et al., 2001). Neste contexto, é possível **combinar a biocompatibilidade dos lipossomos** (Mertins et al., 2009)

às vantagens da versatilidade e robustez química de copolímeros, para funcionalizar e estabilizar as membranas (Peyret et al., 2018). O sistema lipossomo-polímero pode, por exemplo, possuir um longo tempo de circulação no corpo e, consequentemente, proporcionar a redução da administração de substância ativa no organismo (Masserini, 2013; Ramos-Cabrer & Campos 2013).

No que diz respeito aos componentes dos copolímeros anfifílicos, o colesterol e poli óxido etileno (PEO), são inseridos frequentemente em formulações lipossomais, pois contribuem na estabilidade e tendem a diminuir a permeabilidade da bicamada lipídica (Masserini, 2013; Mai & Eisenberg 2012). Estruturas de copolímero anfifílico que contém o heterociclo 1,2,3-triazol, propiciaram também uma variedade de moléculas relevantes (Dal-Bó et al., 2011) no desenvolvimento de novos sistemas farmacológicos (Melo et al., 2006), o que incluiu sua inserção em lipossomos (Dos Santos et al., 2016; Micheletto et al., 2015). Carreadores lipídicos contendo polímeros glicosilados ou com aminoácidos (aas), podem reduzir a toxicidade e favorecer a estabilização do sistema (Jain et al., 2012, Metselaar et al., 2003; Romberg et al., 2007). A porção glicosilada polimérica, quando inserida em lipossomos, pode favorecer o perfil farmacocinético do sistema como ligante de superfície (Jain et al., 2012). Por outro lado, polímeros contendo determinados aas, como o triptofano (Trip), conferem ao lipossomo propriedades anti-inflamatórias, atuantes no sistema nervoso central e também eletroluminescente (Rizzo et al., 1986).

Lipossomos constituídos por copolímeros anfifílicos, supramoleculares, podem mimetizar sistemas de envelopes virais artificiais que são relevantes nas investigações de doenças infecciosas (Pinnapireddy et al., 2019), causadas por microrganismos patogênicos, tais como os vírus, bactérias, fungos e parasitas, e que são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo (Guido et al., 2010; OMS, 2020). No Brasil, houve um declínio da morbimortalidade relacionada a doenças infecciosas na década de 1960 (Sousa et al., 2020), que é a relação entre a morbilidade (presença de um determinado tipo de doença em uma população), e a mortalidade (estatística sobre as mortes em uma população), em outras palavras, doenças causadas de morte em determinadas populações, espaços e tempos. Entretanto, atualmente, um fator de ordem global, infectocontagioso, causado pelo vírus Sar-CoV-2 da família coronavírus, colocou o Brasil entre os mais afetados da América Latina e o 14° mais afetado no mundo pela doença COVID-19 (Chahrour et al., 2020; Marson & Ortega 2020; OMS, 2020). Assim, as pesquisas, investigações e caracterizações para contribuir no controle de doenças infecciosas

tornam-se cada vez mais relevantes (Liu et al., 2020; Nobre et al., 2014; Zheng et al., 2020). Desta forma, é importante sintetizar **novos polímeros** do tipo *Rod-Coil* e inseri-los em **lipossomos**, para contribuir com o desenvolvimento de **novos sistemas**, com **potencial** para colaborar no combate às doenças infecciosas (Dos Santos et al., 2021; Pinnapireddy et al., 2019).

A adição de um polímero *Rod-Coil* é capaz de influenciar os movimentos moleculares dos lipossomos em nível vibracional, rotacional e translacional, o que reflete nas propriedades do sistema. Tais movimentos moleculares podem ser monitorados por diferentes técnicas espectroscópicas, espectrofotométricas e calorimétricas. Assim, é importante realizar as **caracterizações físico-químicas** dos sistemas **lipossomos-polímeros** *Rod-Coil* e obter parâmetros como ordem, mobilidade, carga superficial da membrana, tamanho e possível localização do polímero na membrana lipossomal, que podem vir a refletir na cinética de vetorização de uma substância ativa.

Neste contexto, o presente trabalho visou a síntese e caracterização de três novos **polímeros do tipo** *Rod-Coil-Rod* para serem inseridos em **lipossomos de asolecitina de soja** (Aso) e, portanto, a formação de **três novos sistemas lipossomais-poliméricos** que foram **caracterizados por técnicas espectroscópicas, espectrofotométrica e termoanalítica**. Os polímeros referidos foram o 1) colesterol-poli (óxido etileno) triptofano (Col-PEO-Trip), 2) colesterol-poli (óxido etileno) -1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e o 3) colesterol-poli (óxido etileno) -1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc). O Col-PEO-Trip foi composto pelo colesterol, PEO₁₀₀₀ e um aminoácido (aa), o Trip, enquanto que o Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc foram constituídos de colesterol, PEO₁₀₀₀, um heterocíclo, o 1,2,3-triazol, e uma porção glicídica constituída de galactose (Gal) e de n-acetiglicosamina (GlicNac), respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho irão contribuir com o desenvolvimento de novos sistemas para diagnóstico e tratamento de doenças, como as associadas às infecções virais.

2.1 Lipossomos

Os **lipossomos** fazem parte da primeira geração de nanosistemas de liberação de fármacos (Budai & Szogyi 2001). Desenvolvidos nos anos 60 e farmacologicamente consolidados nos anos 80, os lipossomos tornaram-se o primeiro sistema de liberação controlada de fármaco (Masserini, 2013). Vários estudos têm sido responsáveis pelo aprimoramento dos lipossomos (Deo et al., 2004; Spuch & Navarro 2011), que originam **sistemas farmacêuticos** atualmente aprovados pelo "*Food and Drug Administration*" (FDA), incluindo aqueles à base de doxorrubicina (para tratamento de cânceres de ovário e mama), anfotericina B (para tratamento de infecções fúngicas) e morfina (para tratamento de meningite neoplásica e tratamento de dor pós-cirúrgica) (Edwards & Baeumner 2006).

Lipossomos são vesículas microscópicas esféricas, compostas por uma ou mais **bicamadas lipídicas concêntricas**, que delimitam um meio aquoso (Masserini, 2013) (Figura 1). A bicamada lipossomal é composta por lipídios biocompatíveis e biodegradáveis, com propriedades estruturais semelhantes à de organelas biológicas (Masserini, 2013). Isto contribui para que sejam atóxicos, não imunogênicos e altamente versáteis (Edwards & Baeumner 2006).

Figura 1: Lipossomos.



Fonte: Adaptado de < http://www.integratedhealth.com/supplements/liposomes.html > Acesso em: 26 set. 2020.

Os lipídios que compõem os lipossomos são capazes de conter uma ou duas cadeias de ácidos graxos na sua região hidrofóbica (cauda apolar), os quais podem ser ou não insaturados, conectadas a uma região hidrofílica (cabeça polar) que pode ser iônica ou não, e possibilita incluir grupos fosfato e álcoois esterificados entre si (Hope et al., 1986). Com estas características anfipáticas, os lipossomos podem encapsular substâncias hidrofílicas e/ou hidrofóbicas (Edwards & Baeumner 2006; Mertins et al., 2009) que serão direcionadas a tecidos específicos no organismo.

Os lipossomos mais estudados e aplicados são constituídos por **fosfolipídios** carregados ou zwitteriônicos, tais como as fosfatidilcolinas (Figura 2) (Meyrs, 1999).

Figura 2: Exemplo de fórmula estrutural de fosfatidilcolina.



As **fosfatidilcolinas**, podem ser obtidas por vias sintéticas ou extraídas de fontes naturais, sendo estas últimas preferíveis, por fornecer lipídios de maior **biocompatibilidade**. As fosfatidilcolinas extraídas de fontes naturais podem ser isoladas por processos de purificação de óleos vegetais (tal como o óleo de soja), ou podem ser obtidas na forma de associações fosfolipídicas, como a **asolecitina de soja** (**Aso**). As associações fosfolipídicas obtidas da soja com alto grau de pureza, incluem fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol como componentes. Dentre estes, a fosfatidilcolina é geralmente o constituinte majoritário (Hoogevest & Wendel 2014).

Relevante na produção dos lipossomos, a fosfatidilcolina é usada em vários tipos de formulações, para quaisquer das vias de administração (Hoogevest & Wendel 2014), pois são

estruturalmente semelhantes a membranas celulares. Nas vias metabólicas, 5% da fosfatidilcolina é excretada na bile, 55% é utilizada em tecidos e 40% retorna ao fígado para regulação dos níveis de colina (Al-Humadi et al., 2012).

As estruturas vesiculares baseadas em fosfolipídios podem variar desde micelas, pequenos agregados, a estruturas altamente organizadas, como os lipossomos. A formação dos lipossomos ocorre através de diferentes modos de empacotamento lipídico. Os métodos de obtenção dos mesmos, bem como os seus constituintes, irão definir o estado de fase lipídica em micela esférica, lamelar ou bicamadas (L), hexagonal (H_{II}), entre outras (Pfeiffer et al., 2012; Sánchez et al., 2013), assim como o diâmetro do sistema.

O tamanho e uniformidade dos lipossomos definem a sua interação com organelas do organismo e eficácia (Frézard et al., 2005; Batista et al., 2007). Devido à diversidade dos lipossomos em relação a seu diâmetro e número de bicamadas, na literatura destacam-se as vesículas multilamelares grandes (MLVs - "Multilamellar Large Vesicles"), vesículas unilamelares grandes (LUVs - "Large Unilamellar Vesicles") e vesículas unilamelares pequenas (SUVs- "Small Unilamellar Vesicles"). As MLVs são modelos clássicos de lipossomos. Seus diâmetros variam entre 400 e 3.500 nanômetros (nm) e possuem diversas bicamadas lipídicas. Em geral, são utilizadas como carreadores para aplicações tópicas (Laverman et al., 1999). As LUVs possuem diâmetros iguais ou superiores a 100 nm e uma única bicamada. As LUVs são as que mais se destacam no uso como carreador para via oral, parenteral e intravenosa, pois as vesículas com diâmetro entre 100 e 200 nm atravessam os poros das membranas, além de carrearem o máximo de substâncias ativas, que são direcionadas à tecidos específicos (Barenholz, 2012). As SUVs apresentam diâmetro de 20 a 50 nm, e contêm, assim como as LUVs, uma única bicamada. As SUVs são usadas para estudos de superfície (sujeitas a processos de agregação e fusão) (Batista et al., 2007).

Vale salientar, como mencionado anteriormente, que o diâmetro e os números de bicamadas dos lipossomos, também podem ser definidos pelo método de obtenção dos mesmos (Hope et al., 1986). Por exemplo, as **LUVs** podem ser **obtidas pelo método de preparação de evaporação por fase reversa** (Szoka & Papahadjopoulos, 1978; Mertins et al., 2005). No processo de formação das LUVs, um organogel é hidratado por solvente aquoso para gerar as vesículas lipossomais. Nesta etapa do método, o efeito hidrofóbico dos metilenos resulta no aumento de entropia (*S*) dos fosfolipídios, que gera um processo espontâneo de formação das vesículas. Do ponto de vista termodinâmico, a formação de vesículas é determinada pela energia livre do sistema, expressa por

 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, onde ΔG , $\Delta H e \Delta S$ são, respectivamente, as variações (Δ) de energia livre de Gibbs (G), entalpia (H) e entropia (S) no processo de organização das vesículas e a temperatura (T). Quando há alterações nestes parâmetros termodinâmicos, a energia livre de Gibbs se modifica (Apolinário et al., 2017; Atkins et al., 2008). No processo espontâneo de formação das vesículas lipídicas, em solvente aquoso, ocorre a diminuição de G, pois há um aumento da S dos lipídios, gerado pelo efeito hidrofóbico dos metilenos, que se organizam de modo a minimizar o contato das cadeias hidrofóbicas entre si e com o solvente aquoso. O processo espontâneo de formação das vesículas, permite maior mobilidade das moléculas e agregados termodinamicamente mais estáveis (ATKINS *et al.*, 2008). Estas alterações, juntamente à composição fosfolipídica dos lipossomos, influenciam parâmetros importantes como a temperatura de transição de fase principal (T_m) (do inglês "*main transition temperature*", ou também pode ser encontrado como "*melting temperature*") do sistema (Atkins et al., 2008). A T_m é definida como a temperatura em que há presença de 50% de lipídios em estado gel-sólido ou L β e 50% em estado cristal-líquido ou L α (Qie et al., 2012) no sistema. Assim podemos analisar a ordem dos lipossomos após a inserção de polímeros no modelo lipídico (esta será abordada na seção 2.2.7).

As bicamadas fosfolipídicas apresentam movimentos em nível **vibracional**, **rotacional** e **translacional**. A adição de compostos nos lipossomos é capaz de influenciar tais movimentos, que podem ser **monitorados** por diferentes **técnicas instrumentais**, como as descritas a seguir.

2.2 Técnicas instrumentais aplicadas para caracterização da dinâmica molecular dos lipossomos

Dentre as técnicas instrumentais que podem ser usadas para monitorar a dinâmica lipossomal ao ser inserido um composto no sistema, podem ser citadas:

- ✓ Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada horizontal (HATR-FTIR);
- \checkmark Análises de ressonância magnética nuclear de ¹H e de ³¹P (RMN de ¹H e de ³¹P);
- ✓ Potencial zeta (ζ);
- ✓ Espalhamento de luz dinâmico (DLS);
- ✓ Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis).

✓ Calorimetria de varredura diferencial (DSC);

Estas técnicas estão detalhadas a seguir.

2.2.1 HATR-FTIR

A técnica de espectroscopia de infravermelho (IV) permite a identificação estrutural de compostos orgânicos ou inorgânicos, bem como estudos de movimentos moleculares. A técnica fornece importantes informações para a identificação de grupos funcionais da amostra, de acordo com a sua natureza (Casal & Mantsch 1984; Severcan & Kazanci 2005; Haris et al., 1986). Assim, os sistemas lipossomais podem ser caracterizados quando submetidos à radiação infravermelha. Os raios IV possuem comprimento de onda (λ) entre 700 nm e 50 000 nm. Visto que o λ é inversamente proporcional à energia, esse tipo de radiação é relativamente, baixa e, suficiente para modificar as vibrações e rotações de grupos moleculares e ligações químicas. As transições rotacionais vão depender da geometria molecular, das massas dos átomos, além da forma da superfície de energia potencial da molécula (Smith, 1999). A absorção de radiação IV provoca, portanto, aumento da amplitude das vibrações moleculares (Lopes & Facio 2004).

A espectroscopia na região do IV produz espectros de absorção e/ou transmissão. Um feixe de luz na região do IV é incidido sobre a amostra e, após a radiação eletromagnética incidente (IV) ser absorvida (e/ou transmitida), o processo é quantizado e expresso em λ ou frequência referente a absorção/transmissão de cada grupo funcional presente. Cada banda característica no espectro de IV é oriunda de mudança de nível de energia vibracional, correspondente a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional. As posições das bandas no espectro podem ser apresentadas em número de ondas, utilizando a unidade centímetro inverso (4000- 400 cm⁻¹) ou em micrômetros (2,5 - 16 μ m) (Leite & Prado 2012).

Cada molécula possui suas vibrações, absorvendo ondas eletromagnéticas de número de onda específico e, gerando um espectro de absorção característico (Leite & Prado 2012; Mantsch & McElhaney 1991). Considerando-se as interações que poderão ou não ocorrer ao adicionar um composto aos lipossomos, é possível analisar no espectro de IV, as variações ocorridas nas vibrações dos grupos específicos das bandas que constituem os lipossomos, como por exemplo os estiramentos axiais (v) e deformações angulares (δ), que são duas formas de vibrações fundamentais. Os estiramentos envolvem uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. Quanto a vibração de deformação angular, esta é característica de variações do ângulo entre duas ligações (Silverstein, 1991).

A obtenção de um espectro de IV pode ocorrer via espectrômetro que aplica a transformada de Fourier. Tal espectroscopia de IV é chamada de espectroscopia de IV com transformada de Fourier (FTIR). A FTIR ocorrente no modo refletância total atenuada horizontal (HATR -FTIR) destaca-se por ser não-invasiva, apresentar maior precisão nas medidas de números de ondas (aproximadamente, 2 cm⁻¹), com resolução de até 4 cm⁻¹ e, por demandar menores quantidades de amostra nas análises. Neste modo, a amostra é depositada em cristal de seleneto de zinco (ZnSe), com alto índice de refração. Um feixe de radiação de IV é incidido neste cristal, promovendo ondas evanescentes. Estas ondas interagem com a amostra, sem danificá-la (Silverstein et al., 2000).

A técnica de HATR-FTIR pode ser usada para monitorar as interações moleculares em uma membrana lipossomal, em nível vibracional, rotacional e translacional de grupos funcionais de regiões características dos lipídios em membranas (regiões polar, de interface e a apolar). Também é útil para monitorar o efeito e localização de qualquer substância adicionada ao sistema (Mantsch & McElhaney 1991).

Analisando as variações de número de onda, e a largura à 75% da altura de picos referentes aos v dos grupos presentes em regiões específicas dos lipídios, pode-se obter indícios importantes sobre a mobilidade de grupos funcionais presentes na membrana lipídica e o grau de hidratação (Moreno et al., 2010). A largura à 75% da altura de picos pode ser obtida conforme a Figura 3. Se $5,5 \text{ cm}^{-1}$ corresponde a 100 % que é toda a altura do pico, ou seja, da linha base traçada (vermelha) até a extremidade do pico, então 75% corresponde a altura em questão (x em cm⁻¹). E é nesta altura x, a 75%, que se obtém a largura do pico em cm⁻¹. Em um espectro de IV, as principais bandas referentes a regiões lipídicas de sistema lipossomal, analisadas, são: o estiramento axial assimétrico (v_{as}) do grupo metileno (CH₂), próximo ao número de onda de 2920 cm⁻¹; o estiramento axial simétrico (v_s) do grupo metileno (CH₂), próximo a faixa do número de onda de 2850 cm⁻¹; o v do grupo carbonila (C=O), na faixa de 1725 - 1740 cm⁻¹; o v da ligação C-O-C na faixa de 1078 - 1081 cm⁻¹; o v_{as} do grupo fosfato (PO₂⁻), na faixa do número de onda de 1260 - 1220 cm⁻¹ e o v_{as} do grupo colina (N⁺(CH₃)₃) próximo ao número de onda de 970 cm⁻¹ (Mantsch & McElhaney 1991; Moreno et al., 2010) (Figura 3).



Figura 3: Espectro de HATR-FTIR de membrana lipídica e exemplificação de medida de número de onda, e a largura à 75% da altura de picos referentes aos v dos principais grupos que compõe regiões específicas dos lipídios.

Fonte: Próprio autor.

Na região apolar, os números de onda do v_s CH₂ e v_{as} CH₂ das cadeias de hidrocarboneto, estão associados à presença de ligações *trans* e *gauche* e, consequentemente ao estado de fase lipídico (Lee & Chapman 1986). Quando os lipídios estão em uma fase mais ordenada, as cadeias dos metilenos estão majoritariamente em conformação *trans*, organizadas entre si de forma paralela e estabilizadas por interações de van der Waals (Nagle, 1980). As bandas destes estiramentos (v_s CH₂ e v_{as} CH₂) ocorrem em valores de número de onda menores, o que indica a restrição de mobilidade das cadeias hidrofóbicas (Lewis e McElhaney 1998). Quando os metilenos mudam o estado de fase, para uma fase mais desordenada, as cadeias dos metilenos estão majoritariamente em conformação *gauche*, desorganizadas entre si e ocorre uma diminuição das interações de van der Waals. As bandas destes estiramentos (v_s CH₂ e v_{as} CH₂), quando ocorrem em valores de número de onda menores de número de onda maiores, indicam que o sistema lipossomal apresenta maior

quantidade de ligações *gauche* e está na fase cristal-líquido, adquirindo assim uma maior mobilidade das cadeias hidrofóbicas (Mannock et al., 2010).

O grupo carbonila, na região de interface, e o grupo fosfato, na região polar lipídica, podem interagir com moléculas de água (Mantsch & McElhaney 1991) ou com um composto exógeno por interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio. O aumento do grau de hidratação destes grupos, pode ser indicado pelo deslocamento do número de onda das suas bandas de estiramento (v_{as} C=O e v_{as} PO₂⁻) para menores valores, e vice-versa (Chen et al., 2008; Korkmaz et al., 2005; Moreno et al., 2010; Servecan et al., 2005).

A variação quanto ao deslocamento de número de onda do $v_{as} N^+(CH_3)_3$, presente na região polar de membranas lipossomais, pode indicar interações intermoleculares do $N^+(CH_3)_3$ com o PO_2^- do lipídio mais próximo (lipídio vizinho), ou interações dipolo-dipolo com moléculas de água. O $v_{as} N^+(CH_3)_3$ também pode ser influenciado por interação da membrana com substâncias exógenas (Popova & Hincha 2011; Moreno et al., 2009).

A largura das bandas tem influência dos efeitos translacionais, rotacionais e/ou colisões na ausência ou presença de uma substância exógena, em regiões especificas da membrana. O aumento da largura da banda característica de um lipídio, indica um aumento da velocidade do movimento molecular e vice-versa (Mantsch & McElhaney 1991; Toyran & Severcan 2003).

2.2.2 RMN de ¹H

Quando se trata de investigações espectroscópicas de movimentos rotacionais moleculares em compostos, a RMN de ¹H tem notoriedade por causa da longa escala espectroscópica de análise de tempo, decorrente das fracas interações dependentes de spin, que influenciam o espectro de RMN de ¹H (Bloom & Thewalt, 1994).

A RMN pode fornecer informações importantes sobre a ordem e interações moleculares de determinada região na membrana, assim como a amplitude e escala de tempo dos movimentos (De Lima et al., 2007; Dufourc et al., 1992).

A espectrometria de RMN envolve o uso da radiação eletromagnética que ocorre na faixa de energia de rádio frequência (RF). Quando se emite pulsos de RF (pulsos 180° e 90°, por exemplo) intermitentes com intervalos de tempo, durante estes intervalos é emitido um sinal de decaimento da indução livre (FID, do inglês "*Free Induction Decay*"). O FID é provindo do processo de relaxação nuclear (liberação de energia para retornar ao estado de equilíbrio). A

relaxação que envolve a transferência de energia para a rede molecular é chamada relaxação spinrede (ou longitudinal-R₁), e o tempo em que ocorre é denominado de T₁ (Silverstein *et al.*, 2005; Skoog *et al.*, 1998; Milhaud, 2004). Na técnica de RMN, ao aplicar um pulso de 180° em um determinado núcleo, a magnetização longitudinal é invertida, e durante o intervalo de tempo (tempo de correlação, τ_c), a magnetização evolui para o processo de relaxação longitudinal (Milhaud, 2004; Silverstein et al., 1991).

A Figura 4 demonstra uma relação entre valores de T₁ ao tempo de correlação (τ_c) útil na análise dos movimentos de membranas. Um ponto de mínimo separa duas regiões, na qual uma refere-se a um sistema típico de baixa mobilidade, como as MLVs e LUVs, por exemplo (à direita), onde T₁ é inversamente proporcional ao τ_c , enquanto a outra região refere-se a um sistema de maior mobilidade, como as micelas, por exemplo (à esquerda), onde T₁ é diretamente proporcional ao τ_c (De Lima et al., 2007). No ponto mínimo da curva, determina-se os regimes de alta e baixa mobilidade, onde a frequência da banda de ressonância do τ_c é igual a 1. A Equação (1) exprime a tal frequência em mega-hertz (MHz), cuja razão giromagnética do núcleo é y, o campo aplicado é B₀ e a constante de blindagem é σ .

$$f = \frac{y}{2\pi} B_{o} (1 - \sigma) = MHz$$
 (Equação 1)

Figura 4: Medidas de T₁ em função do tempo de correlação τ_c (s), para sistemas lipossomais de alta mobilidade e baixa mobilidade.



Fonte: Adaptado de Brown, 1979.

O τ_c é definido como o tempo médio que uma molécula leva para girar um (1,0) radiano em torno do próprio eixo, sendo um parâmetro usado para estudar mudanças nos movimentos moleculares rotacionais da membrana, influenciados por interações dipolo-dipolo com núcleos vizinhos (Lasic, 1998). Abaixo do mínimo da curva, a redução de valores de T₁ indica um sistema de maior mobilidade, enquanto que o seu aumento indica um sistema de mobilidade reduzida (De Lima et al., 2007).

O T₁ de ¹H presentes em regiões específicas de lipídios em bicamadas, é um indicador sensível à adição de compostos, quanto do próprio ambiente circundante da membrana (Klauda et al, 2008). Sendo assim, as regiões apolares e polares lipídica, via análise de núcleos de ¹H presentes nos metilenos e colina, respectivamente, podem ser investigados (Lepore et al., 1992). Ainda na região polar, é possível investigar os movimentos do grupo fosfato, através do ajuste de frequência da técnica para análise do núcleo de ³¹P (RMN de ³¹P).

2.2.3 RMN de ³¹P

Uma vez que os lipídios nas membranas biológicas são predominantemente fosfolipídios, a RMN de ³¹P torna-se uma ferramenta também importante para avaliar o movimento rotacional da região polar das membranas lipossomais. A partir desta análise, é possível obter informações quanto ao estado de fase das membranas lipídicas, o "Efeito Overhauser Nuclear" (NOE), a ordem e a orientação média da região polar (Noggle & Schirmer 1971; Seelig, 1978). As investigações são feitas pela medida da anisotropia de deslocamento químico (CSA, do inglês "chemical shift anisotropy"). A CSA é refletida pela forma e largura da banda demonstrada nos espectros de RMN de ³¹P. Em lipossomos compostos por fosfolipídios, a CSA é determinada pelos elementos principais do tensor (σ) de blindagem e pela orientação das moléculas de fosfolipídios em relação ao campo magnético aplicado (Dubinnyi et al., 2006) (Figura 5). O σ é afetado pela velocidade média do movimento molecular e intramolecular. Nas bicamadas líquido-cristalinas, as moléculas de fosfolipídios passam por uma rotação rápida (na escala de tempo RMN de ³¹P) em torno da bicamada normal. Geralmente, o σ tem os dois componentes principais diferentes, o σ axialmente simétrico, cuja blindagem do núcleo ³¹P, degenera por esta rotação, e o σ resultante que, por sua vez, tem dois valores principais: o paralelo (σ_{II}) e o perpendicular (σ_{\perp}). Como resultado, um espectro de RMN de ³¹P exibe uma forma de banda característica, como por exemplo, com um pico em campo alto e um ombro em campo baixo, de movimentos anisotrópicos de fase em
bicamada (L, Figura 5 (a)) (Dubinnyi, 2006; Sánchez et al., 2013). A CSA corresponde à diferença entre σ_{\parallel} e σ_{\perp} . A contribuição adicional para a forma de banda surge da orientação parcial das bicamadas lipídicas no campo magnético. Sendo assim, pode haver a deformação de lipossomos esféricos em elipsóides prolatos (Figura 5 (b)) que é, portanto, resultante da anisotropia da susceptibilidade magnética das moléculas de fosfolipídios que é negativa. Logo, existe uma tendência a se orientar em seu eixo longo, perpendicular ao campo magnético. A extensão da deformação é descrita pela razão c/a, onde c é o eixo principal e a é o eixo elipsóide (Figura 5 (a) e (b)). A deformação depende das propriedades elásticas de curvatura da membrana, da anisotropia diamagnética (característica de cada tipo de fosfolipídio) e da intensidade do campo magnético aplicado. Vale ressaltar que o campo magnético é aplicado ao longo do eixo c do elipsóide (Dubinnyi, 2006).

Figura 5: Espectros teóricos de RMN de ³¹P de lipossomos esféricos (a) e lipossomos elipsoidais (b). As linhas sólidas e tracejadas são partes de absorção e dispersão dos espectros (calculados pela convolução de uma função de alargamento I (v) com uma função de probabilidade P (v) por programas matemáticos); componentes do tensor de anisotropia de deslocamento químico estão representados como σ_{11} componentes paralelos e σ_{\pm} , componentes perpendiculares; eixos do elipsóide: *c*, eixo maior e *a*, eixo menor.



Fonte: Adaptado de Dubinnyi, 2006.

As formas dos espectros de RMN de ³¹P, designam o estado de fase da membrana lipossomal, tais como em L (Figura 6 (a)) ou hexagonal invertida (H_{II}) (Figura 6 (b)) (Pfeiffer et al., 2012; Sánchez et al., 2013). O espectro de fase em L típico, conforme já descrito acima, é

largo, com um ombro em campo baixo e um pico em campo alto. Na fase H_{II} , o espectro apresenta a formas reversa em relação ao espectro de bicamada. As mudanças espectrais de um grupo fosfato lipídico depende tanto da taxa, como do processo de reorientação dos spins (Ghosh, 1988).

Figura 6: Modelos espectrais de movimentos anisotrópicos típico de bicamada lipídica, L (a) e hexagonal, H_{II} (b).



Fonte: Adaptado de Ghosh, 1988.

As medidas da intensidade do sinal do ³¹P no espectro permitem avaliar as possíveis interações do grupo fosfato com o ambiente circundante (Noggle & Schirmer 1971; Seelig, 1978). Este efeito de aumento de intensidade de pico de RMN de ³¹P é denominado NOE. Em geral, o NOE é a mudança na intensidade de absorção da RMN integrada, quando a absorção de outra rotação é saturada (Noggle & Schirmer 1971). Um mecanismo de relaxamento cruzado ocorre para acoplar o ³¹P com ¹H por fortes interações dipolar fósforo-hidrogênio, que podem ser de natureza intramolecular e / ou intermolecular. Está estabelecido na literatura que essas interações levarão a um NOE intenso de 2,4 para vesículas de tamanho de aproximadamente 300 nm (Seelig, 1978). A diminuição na intensidade do pico, gerada por adição eventual de um composto ao sistema, sugere que não há interações do núcleo de fósforo com os hidrogênios presentes no meio, ou mesmo com um composto; e vice-versa (Noggle & Schirmer 1971; Seelig, 1978).

A variação de CSA refletida através de mudanças na largura do pico de RMN de ³¹P, indica modificações induzidas por substâncias exógenas. A liberdade de movimento do ³¹P nos fosfolipídios, pode refletir dois tipos espectros, um com banda estreita ou com banda larga. O espectro com largura de banda estreita (pico fino), descreve que o grupo fosfato possui maior movimentação rotacional e menor valor de CSA; em contra partida, o espectro com forma de linha larga (pico largo), descreve que o grupo fosfato possui movimento rotacional restrito e maior valor de CSA (Ghosh, 1988; Seelig, 1978).

2.2.4 Potencial ζ

O potencial ζ reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula, ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. O parâmetro é determinado utilizando-se técnicas de eletroforese (Disalvo & Bouchet 2014; Schaffazick et al., 2003).

Os fosfolipídeos, tais como as fosfatidilcolinas, copolímeros triblocos (poloxâmeros) e os polímeros constituintes das nanopartículas, são os principais componentes presentes em sistema ou formulações capazes de influenciar os valores de potencial ζ (Schaffazick et al., 2003).

Os fosfolipídios em geral, fornecem um potencial negativo à interface (Wissing & Müller, 2002), enquanto que os copolímeros triblocos tendem a reduzir o valor absoluto deste parâmetro (Legrand et al., 1999).

O potencial de superfície da membrana não pode ser medido diretamente. A Figura 7 sugere um modelo de lipossomo de bicamada lipídica, cuja superfície e a região de interface, na fase aquosa, podem ser modeladas como uma camada elétrica dupla. Ainda na Figura 7, uma superfície de bicamada contendo fosfolipídios aniônicos, constitui uma superfície plana (cinza), com cargas negativas uniformemente distribuídas, onde um campo elétrico se origina (sombreado vermelho). A distribuição de eletrólitos da solução é para contra-íons (cátions em azul, e ânions em vermelho). Dentro da camada de Stern os contra-íons estão firmemente ligados à superfície da bicamada. Dentro da camada de Gouy-Chapman os íons da solução são mais dispersos, refletindo um equilíbrio entre a atração e repulsão coulombiana e o movimento térmico. O potencial elétrico (ψ) assume uma magnitude máxima na superfície da interface (ψ_0), e atenua à medida que se distancia desta superfície em direção à solução (ψ_{bulk}), de uma maneira que é dependente das características iônicas do solvente, potencial hidrogeniônico (pH) ou força iônica do meio. O potencial elétrico no plano de cisalhamento que existe neste limite é denominado potencial ζ , o parâmetro pelo qual é medido a carga de superfície da membrana (Sathappa & Alder 2016). **Figura 7:** Representação de lipossomos com a camada de íons positivos adsorvidos na camada de *"Stern"*; relação potencial elétrico (mV) x plano de cisalhamento.



Fonte: Adaptado de Sathappa & Alder 2016.

A expressão para o modelo de Stern é dada pela Equação 2 (Shaw, 1975):

 $\mathcal{E}'(\psi_{0} \cdot \psi_{St}) / \delta_{St} + \sigma_{m} / 1 + (N_{Av} / n_{0} \cdot V_{m}) \exp(z.e. \psi_{St} + \phi / K.T) - \sqrt{8.n. \mathcal{E}.K.T} \cdot sen h(z.e.\psi_{St}) / 2.K.T = o$ (Equação 2)

Onde, onde ε' é permissividade da camada de Stern; $\psi_0 e \psi_{St}$ é o potencial na superfície e no plano de Stern, respectivamente; δ_{St} é a espessura da camada de Stern; N_{Av} é o número de Avogrado; n₀, a concentração inicial dos íons; σ_m , é a densidade de carga correspondente a uma monocamada; V_m , é o volume molar do solvente; φ , é o termo do componente de van der Waals na energia de adsorção e k a constante.

O potencial elétrico no plano de Stern é bastante complexo, visto que se faz necessário o conhecimento de inúmeros parâmetros conforme demonstra a Equação 2. Assim sendo, são feitas

medidas de potencial no plano de cisalhamento da dupla camada, denominado de potencial ζ , obtido por fenômenos eletrocinéticos, na parte móvel da dupla camada elétrica (Shaw, 1975).

Para partículas lipídicas zwitteriônicas, como as fosfatidilcolinas, seria esperado que a carga superficial fosse próxima ou zero. No entanto, estudos consideram que a extremidade positiva de grupos colina, por exemplo, é deslocada em direção a um plano da membrana interna, deixando a extremidade negativa do grupo fosfato mais exposta à água (Disalvo & Bouchet 2014).

Diferentes estratégias são propostas para modificar a carga de superfície de lipossomos de fosfolipídios. Como já mencionado, o seu potencial de superfície é naturalmente negativo e, por esta razão, os lipossomos são rapidamente reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear, o que não favorece a estabilidade lipossomal no organismo. Contudo, é possível reduzir a hidrofobicidade da superfície dos lipossomos, através da adsorção física (ou fisissorção) de polímeros baseados em PEO, por exemplo, e deste modo, fazer o sistema lipossomal permanecer por mais tempo no organismo (Calvo et al., 2001; Soppimath et al., 2001).

Na Figura 8 estão representadas duas possíveis orientações da cabeça polar lipídica, que reflete nos valores de potencial ζ . Quando o grupo colina encontra-se acima do plano da bicamada lipídica, valores positivos são atribuídos ao potencial ζ ; porém se o grupo colina estiver abaixo do plano, valores negativos são atribuídos ao potencial ζ (Disalvo & Bouchet 2014; Fatouros & Antimisiaris 2002).

Figura 8: Orientações de grupos colina, acima da bicamada lipídica (a) e abaixo da bicamada lipídica (b), a partir de fórmulas estruturais de fosfatidilcolinas.



Fonte: O próprio autor do trabalho.

Um valor de potencial ζ relativamente alto, maior do que - 30 milivolts (mV) ou + 30 mV, é importante para manter a estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (Muller-Goymann 2004; Schaffazick et al., 2003). Caso a suspensão coloidal contenha tensoativos ou surfactantes, como polímeros anfifílicos, a estabilidade das suspensões vesiculares, podem ser da ordem próxima aos - 20 mV (Mishra et al., 2009).

Esta análise fornece, portanto, parâmetros quanto à natureza hidrofóbica e a carga do sistema lipossomal, que são fatores importantes para sua permeabilidade através da membrana celular, além da capacidade de ligação de hidrogênio e/ou ligação eletroestática entre compostos e a membrana (Naoi et al., 1977).

2.2.5 DLS

O DLS é uma técnica não invasiva usada para medir o tamanho e a homogeneidade de partículas submicroscópicas e também nanoscópicas, entre estas as lipossomais (Muller-Goymann, 2004). A partir destas medidas, pode-se também, avaliar possíveis agregações e fusões entre as vesículas lipossomais, causados por instabilidade das mesmas em função dos constituintes de membranas (Komatsu et al., 1999; Schaffzick et al., 2003). Entretanto, em particular, bicamadas lipídicas zwitteriônicas de Aso, fosfatidilcolinas e fosfatidiletanolaminas, que possuem grupos da região polar altamente hidratados, previnem de forma mediana que suas bicamadas não irão aderir ou agregar fortemente entre si, e não irão se fundir, mesmo sob condições onde não há força eletrostática repulsiva. Forças de hidratação repulsivas entre duas bicamadas lipossomais, surgem sempre em que há grupos de superfície hidratados (hidrofílicos). À medida que as duas superfícies se aproximam, a água entre estas superfícies é removida em direção ao meio que é energeticamente desfavorável e comportam-se como forças de hidratação repulsivas entre elas (Komatsu & Okada, 1995).

O tamanho das vesículas lipossomais são determinadas em função do movimento Browniano, decorrente de colisão aleatória entre as próprias, dispersas em solução. A luz laser é incidida sobre estas vesículas e espalhada em diferentes intensidades, em um ângulo fixo. Formase, então, um padrão de movimento que determina o seu tamanho. As partículas maiores se movem mais lentamente que as menores, consequentemente, a taxa de flutuação da luz espalhada pelas vesículas também é mais lenta (Figura 9). Espalhando um padrão de intensidade, estão correlacionados com eles mesmos (auto - correlação) após intervalos de atraso, curtos de tempo para monitorar a deterioração contínua da correlação (Falke & Betzel 2019).



Figura 9: Ilustração generalizada da intensidade dependente do tempo da luz espalhada por partículas, que está flutuando devido ao movimento browniano.

Fonte: Adaptado de Falke & Betzel 2019.

Dependendo da velocidade de difusão das partículas, as constantes de tempo de decaimento da correlação, que são derivadas da função de autocorrelação exponencial (FAE), são individualmente diferentes. As constantes de tempo de decaimento de pequenas partículas são mais curtas de acordo com a dependência da velocidade de difusão na massa da partícula. Portanto, dependendo do tamanho da vesícula, a velocidade de difusão e a escala de tempo do declínio do coeficiente de correlação, varia. Sendo assim, as funções de autocorrelação (g (τ)) para uma espécie de vesículas menores e maiores variam (Figura 10).

Figura 10: Ilustração esquemática da autocorrelação. A esquerda o gráfico das flutuações da intensidade da luz espalhada devido à variação na densidade de partículas no volume de observação, em um intervalo de tempo (t) de t_o (tempo inicial) a t_2 (tempo final). A esquerda o gráfico das duas funções de autocorrelação (g (τ)) para uma espécie de partícula pequena, em verde e uma maior, em azul.



Fonte: De Falke & Betzel 2019.

A FAE de luz espalhada no tempo *t*, dependendo do atraso do τ_c , é gerado durante a análise de DLS (Falke & Betzel 2019).

O FAE pode ser avaliado pelo algoritmo CONTIN (Provencher, 1982), que permite ajustar até mesmo um decaimento complexo de correlação em soluções polidispersas para calcular as respectivas constantes de difusão translacional (D) e processar os dados. Como para a maioria das medições a temperatura (T) é mantida constante e a viscosidade (η) da solução de amostra é conhecida, ou D pode ser usada para determinar o raio hidrodinâmico (r_h) de uma partícula esférica correspondente, de acordo com à equação de Stokes (Equação 3), onde K_B é a Constante de *Boltzmann* 1,380648 × 10⁻²³ J K⁻¹.

$$D = \frac{k \cdot B \cdot T}{6 \pi \cdot \eta \cdot r_h}$$
 Equação (3)

A luz espalhada normalmente sobre as partículas não é coerente, já que as ondas esféricas interferem umas nas outras. E a intensidade da luz espalhada *I* depende de outros parâmetros de configuração, como o comprimento de onda λ , o ângulo de espalhamento θ , a distância de espalhamento da partícula *s*, o índice de refração *n* do meio e o raio da partícula *r*, conforme a Equação (4) (Falke & Betzel 2019).

$$I = I_0 \frac{16 \pi^4}{\lambda^4} \frac{1 + \cos^2 \theta}{2s^2} \left[\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right]^2 r^6 \qquad \text{Equação (4)}$$

A seção transversal de espalhamento é obtida pelo valor médio de I, sobre todos os ângulos de espalhamento. A *I* é inversa proporcional à quarta potência do λ do laser, o que torna o λ mais curto, favorável para a detecção de moléculas que se espalham discretamente. A intensidade de dispersão da luz é diretamente proporcional a sexta potência do diâmetro da partícula. Consequentemente, as vesículas maiores contribuem mais para a intensidade de espalhamento, tornando a análise de DLS, particularmente, sensível para vesículas maiores, em comparação com as menores (Falke & Betzel 2019).

A homogeneidade (refletida pelo tamanho particular e distribuição do mesmo no sistema) da suspensão é obtida pelo índice de polidispersão (PDI). O PDI indica a formação de sistemas mono ou polidispersos, a estabilidade física das suspensões (Muller-Goymann, 2004) e mostra o quanto o diâmetro das vesículas desviou-se da média. Sistemas monodispersos são indicados por valores de PDI menores que 0,3 (Mishra et al., 2009).

A análise é efetuada em uma ampla faixa de raios hidrodinâmicos, de abaixo de 1 nm até alguns μm, ou seja, uma faixa de peso molecular de 10 kDa a vários MDa (Falke & Betzel 2019). Os lipossomos possuem diâmetros que variam entre 20 nm e dezenas de micrômetros (μm). Neste contexto, como exemplos, caso o tamanho varie entre 100 nm e 200 nm, poderá ser aplicado via parenteral, haverá um aumento das concentrações destes no cérebro, além de atrasar o reconhecimento e depuração da corrente sanguínea dos lipossomos pelos macrófagos (sistema fagocíticos mononuclear), gerando maior tempo de circulação prolongada no organismo (Batista et al., 2007, Ulrich et al., 2002). Diâmetros de vesículas entre 200 e 400 nm administrados via parenteral, são removidas mais rapidamente do sangue, pelos macrófagos do que as vesículas menores. Em geral, são utilizadas como modelos para estudos das propriedades estruturais e termodinâmicas das membranas ou como carreadores para aplicações tópicas (Laverman et al., 1999). A análise de DLS fornece, portanto, informações relevantes sobre o tamanho e estabilidade de lipossomos livres e o efeito da inserção de um composto no diâmetro destes (Calvo et al., 2001; Soppimath et al., 2001).

2.2.6 UV-Vis - Turbidez

As energias relacionadas às variações entre os estados de vibração e rotação que as moléculas podem apresentar, ocorre na faixa de comprimento de onda (λ) de 200 nm a 400 nm do espectro na região do ultravioleta, e na região do visível no λ de 400 nm a 800 nm.

Na espectrofotometria de UV-Vis a amostra absorve uma parte da radiação ultravioleta, ou visível incidida na mesma. Cada composto absorve em um λ específico que gera um espectro, picos de absorção que estão correlacionados com a ligação intramolecular e intermolecular existente na amostra, propiciando distintos modos vibracionais e rotacionais (Skoog et al., 1998). Esta luz excita os elétrons da molécula, dando origem às chamadas transições eletrônicas. Nestas transições os elétrons de valência passam de seu estado fundamental para estados de mais alta energia (estado excitado). Ao retornar para o estado fundamental, o excesso de energia é emitido na forma radiativa (luminescência, fosforescência) ou na forma não-radiativa (sem reemissão de luz) (Paiva et al., 2010; Skoog et al., 1998).

Em geral, o fóton quando encontra uma vesícula pode passar sem interagir (ser transmitido), ser absorvido (por exemplo, por um fluoróforo) ou espalhar por fora da vesícula sem alterar seu λ (Wang, et al., 2019). Quando um fóton passa por uma amostra, existem quantidades análogas que descrevem o efeito de toda a amostra na luz. A extinção \mathcal{E} , refere-se à atenuação dos fótons à medida que passam por uma amostra e consiste na atenuação devido à absorção (absorbância, A) e na atenuação devido ao espalhamento (t_e). Embora os espectrofotômetros relatem A, como a quantidade que é realmente medida, quantidade de luz que não passa através da amostra em direção a um detector situado em frente à fonte de luz (\mathcal{E}). Sendo assim, I_0 é a intensidade da luz incidente, I é a intensidade da luz que entra no detector e Γ é a extinção devido ao espalhamento, na A de um espectrofotômetro típico (equação 5) (Wang, et al., 2019; Skoog et al., 1998).

$$Abs = -\log_{10} (I / I_0) = \mathcal{E} = A = \Gamma$$
 (Equação 5)

Para amostras com dispersão de luz insignificante (t = 0), a quantidade medida \mathcal{E} é igual a uma A verdadeira, e a concentração de uma amostra pode ser determinada usando $A = \mathcal{E}_A c l$, também conhecida como lei de Beer-Lambert. Onde, \mathcal{E}_A é o coeficiente de absorção molar, c é a concentração da molécula absorvente e l é o comprimento do caminho (geralmente através de uma cubeta, l aproximadamente 1 cm). Ao descrever amostras não absorventes, a atenuação total da luz após ela passar por uma amostra é geralmente descrita por uma turbidez t_u (Equação 6), o \mathcal{O}_{sca} é a seção transversal de espalhamento por espalhador (por exemplo, uma vesícula, $[\mathcal{O}_{sca}] = m^2$) e N é a densidade do número de vesículas ($[N] = m^{-3}$) (Wang, et al., 2019).

$$t_u = -\ln (I / I_0) = \mathcal{O}_{sca} N l \qquad (Equação 6)$$

A turbidez de uma amostra não absorvente (A = 0) pode ser medida em um espectrofotômetro (Equações 5 e 6). A "*absorção* E " medida em espectrofotômetros é linearmente proporcional à t_u.

Para uma concentração (c) de um sistema anfifílico, a densidade do número de vesículas N pode ser reescrita como a Equação 7, onde N_A é o número de Avogadro, L é o número de moléculas anfifílicas por vesícula, a é a área por anfifílico em uma membrana e, a área total do folheto é a_v

= $\Sigma i \ 8 \ \pi r_i^2$, onde r_i é o raio de cada uma das membranas na vesícula (medida do centro da vesícula até o meio da membrana) (Wang, et al., 2019).

$$N = 10^{3} cN_{A} / L = 10^{3} c N_{A} (a_{v} / a)^{-1}$$
 (Equação 7)

O fator 1000 é devido à diferença em unidades de volume entre a densidade numérica N (m⁻³) e a c (mol / L). A t_u (Equação 6) torna-se então a Equação 8.

$$t_u = \mathcal{O}_{sca} N l = 10^3 c N_A a l \mathcal{O}_{sca} / a_v \qquad (\text{Equação 8})$$

Como na t_u há uma escala linear entre *c* e o *l*, também podemos definir o coeficiente de turbidez molar, \mathcal{E}_t em $\mathcal{E}_t = t / cl = 10^3 \text{ N}_A$ a \mathcal{O}_{sca} / a_v , que tem unidades M⁻¹cm⁻¹ análogas ao coeficiente de absorção molar \mathcal{E}_A na Equação 5. Para amostras de absorção, podemos substituir \mathcal{O}_{sca} pela seção transversal de absorção \mathcal{O}_{abs} na Equação 8 e encontrar a absorbância medida em um espectrofotômetro, A_e (Equação 9).

$$A_{e} = G_{abs} Nl = 10^{3} cN_{A} al G_{sca} / a_{v}$$
 (Equação 9)

A G_{sca} e a G_{abs} podem ser calculados pelo HoloPy, um software livre que pode ser encontrado em https: // github.com/manoharan-lab/holopy, como um recursivo algoritmo de Yang dentro do pacote de espalhamento de luz HoloPy (Wang, et al., 2019).

Os ensaios de UV-Vis podem ser usados em medidas de turbidez dos lipossomos, que descrevem a região apolar dos fosfolipídios em rígida ou fluida, ao incorporar um composto no sistema lipossomal. A membrana com a região apolar rígida, ou seja, maior empacotamento molecular ou ordenamento apresentará maiores valores de absorbância e turbidez; o contrário também é verdadeiro (Sousa et al., 2013). Os ensaios de UV-Vis também podem informar a estabilidade e/ou diâmetro dos lipossomos (Elsayed & Cevc 2011; Matsumaki et al., 2000; Wang et al., 2019). Sivakumar & Rao (2001), por exemplo, descreveram estudos de sistemas lipossomais polimerizados e monoméricos, constituídos de uma mistura de poli (etilenoglicol)₄₀₀-dimetacrilato e metacrilato de colesteril. A medida da turbidez foi usada para demonstrar que os lipossomos polimerizados são mais estáveis que os lipossomos monoméricos (Sivakumar & Rao 2001). Por outro lado, Wang e colaboradores (2019) associam a turbidez dos fosfolipídios, não só a

estabilidade do sistema, mas a outras propriedades como tamanho, lamelaridade e fluidez, sendo a lamelaridade um fator diferencial no método turbidimétrico para os estudos de tamanho. Estes estudos foram comprovados através de cálculos matemáticos usando o modelo de Lorenz-Mie (Wang et al., 2019).

Quando as análises de UV-Vis são atribuídas ao diâmetro dos lipossomos, menores valores de absorbância e turbidez são relacionados ao tamanho de vesículas menores; em contra partida, maiores valores de absorbância e turbidez são correspondentes ao tamanho de vesículas maiores. Para vesículas em que os constituintes (membrana e o meio dispersante) não tem nenhum contraste de índice de refração ($n_{membrana} = n_{meio dispersante}$), a turbidez do sistema aumenta, aproximadamente, com o logarítmo do tamanho da vesícula, para uma concentração total fixa de lipídios semelhantes ao ácido oleico (presente na Aso) em amostras (Wang et al., 2019), por exemplo. Uma partícula esférica homogênea é completamente descrita como um dispersor de luz em termos de seu índice de refração, n_P, e raio, r. O último define a área de superfície, A = $4\pi r^2$, e o volume, V = $(4\pi / 3)$ r³, de uma única partícula de dispersão (Elsayed & Cevc 2011). A concentração do número de tais partículas homogêneas em suspensão, isto é, o número de partículas esféricas por unidade de volume da suspensão, é $N_P = c/V\rho$. Sendo c a concentração do material da partícula (peso / volume) e ρ a densidade da partícula. Descrever uma esfera com núcleo por camada esférica como um dispersor de luz, requer conhecimento do núcleo e dos n da superfície, no caso, camada, núcleo e n_{camada}; ainda, o raio externo da superfície, r_{camada} e a espessura da superfície, d_{camada} (Elsayed & Cevc 2011).

Atribuir dados de turbidez ao parâmetro correto da vesícula é um desafio. Entretanto o UV-Vis quando associado à outras técnicas, torna-se versátil, a partir da compreensão dos parâmetros envolvidos.

2.2.7 DSC

A DSC pode quantificar a variação de energia em uma transição de fase de um sistema, a partir de uma relação entre temperatura e o fluxo de calor em função do tempo. Assim, pode-se obter informações sobre parâmetros termodinâmicos da transição de fase L β para L α em amostras, como as membranas lipídicas (Castelli et al., 1997), por estudos de T_m. Como já definida anteriormente, a T_m é a temperatura em que há presença de 50% de lipídios em estado L β e 50%

em L α (Qie et al., 2012) ($\Delta G = 0$), ou seja, quando não há diferença de energia livre entre as duas fases, caracterizados por um calor latente (absorção ou liberação de energia).

A T_m é específica para cada lipídio, sendo assim a T_m dos fosfolipídios depende da natureza do grupo polar, comprimento e grau de insaturação das suas cadeias de hidrocarboneto. A T_m tende a aumentar com o aumento do tamanho das cadeias apolares e diminuir com o grau de insaturação (New, 1990). A inserção de compostos nos lipossomos, pode alterar a T_m do lipídio que os compõem (Atkins et al., 2008).

O aparelho de DSC fornece diretamente a medida de calor específico da dispersão lipídica, através de um pico no qual pode se obter o valor de T_m . A diferença entre o fluxo de calor da amostra e a de um material de referência é detectada ao usar células de alumínio, uma contendo a referência e a outra a amostra (McElhaney et al., 1982). A amostra e a referência que, inicialmente apresentam diferença de temperatura igual à zero, são aquecidas sob uma taxa fixa. Quando ocorre uma transição de fase ou um rearranjo molecular na amostra, a variação de temperatura (ΔT) terá valor diferente de zero, em função de uma variação na distribuição do estado energético na amostra, gerando os picos no espectro de DSC. Em aparelhos de DSC por fluxo de calor, as células de alumínio são aquecidas por uma única fonte de calor. Se a amostra sofrer algum tipo de modificação em sua estrutura, o sinal correspondente a média de ΔT , será convertido como uma diferença de potencial elétrico (em Watts, W) (McElhaney et al., 1982). Este procedimento, portanto, utiliza o recurso termo elétrico para medir a ΔT entre os recipientes de referência e amostra.

Cada substância apresenta uma capacidade distinta de armazenamento de energia interna, a relação entre troca de calor e a variação de temperatura depende das propriedades da estrutura em questão (Atkins et al., 2008). Sendo assim, a troca de calor pode ocorrer com mudanças de temperatura ou não, pois a transferência de energia para um corpo pode aumentar a energia cinética de suas moléculas, elevando sua temperatura, mas pode também aumentar a rotação e vibração destas moléculas, assim como alterar sua energia potencial. Neste último caso, não se observa variação de temperatura (Riske & Perez 2014).

Como a medida de DSC é feita a pressão constante, o calor absorvido durante a T_m é igual à variação de entalpia (ΔH) da transição gel-fluido (Riske & Perez 2014). A ΔH é, portanto, associada à processos exotérmicos e endotérmicos. O valor de ΔH para os eventos térmicos obtidos, é fornecido através da integração da área sob o pico correspondente. Os picos gerados no espectro de DSC serão exotérmicos quando houver a liberação de calor pela amostra durante a transição de fase. A amostra estará em um estado mais energético e transitará para um estado mais estável ou de menor energia. Já os picos gerados nas análises de lipossomos são endotérmicos, onde ocorre absorção de calor pela amostra. Haverá uma transição de fase ou de fusão (Hohne et al., 1996). A transição de fase principal L β para L α (Figura 11) é um exemplo de transição endotérmica. E assim, através destes eventos térmicos, pode-se analisar a ordem do sistema lipossomal, pelas medidas de T_m, após a inserção de compostos como, por exemplo, de polímeros. Vale salientar que em misturas de fosfolipídios, a detecção da T_m é dificultada, pois a heterogeneidade do sistema alarga os picos de DSC.

Figura 11: Representação das transições de transição de fase dos lipídios.



Fase gel-sólido ou Lβ

Fase cristal-líquido ou La

Os lipídios podem apresentar diferentes estados de fases em função da temperatura (e outros fatores, tais como pressão) que estão submetidos, na qual se destaca a fase L β e a fase L α . Na fase L β os lipídios estão numa razão conformacional *trans/gauche* elevada, as cadeias de hidrocarboneto ficam distendidas perpendicularmente ao plano da bicamada lipídica, que gera um elevado grau conformacional, rotacional e translacional à bicamada (Lee & Chapman 1986). Em particular, a fase L β de membranas fosfolipídica, pode ser atribuída as interações repulsivas dos grupos da cabeça polar. Isto se deve ao fato de que a interação repulsiva do grupo de cabeça polar, impede que as moléculas perpendiculares à bicamada se aproximem o suficiente, para minimizar as interações de van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonetos; entretanto, as cadeias

Fonte: O próprio autor do trabalho.

totalmente *trans* podem estar localizadas próximas entre si (Nagle, 1980; Lee & Chapman 1986). A T_m também é influenciada por uma ligação de hidrogênio fraca e transitória que ocorre em apenas cerca de 3% de todas as moléculas, e que propicia um pequeno efeito na mobilidade lateral entre os grupos fosfato e grupos etanolamina (CH₂(NH₂)CH₂O-, componente da Aso). Circunstância que inibe a expansão lateral da bicamada, um recurso necessário da transição de fase. Esta ligação de hidrogênio contribui para o aumento da T_m (Nagle, 1980).

Conforme mencionado nas análises de HATR-FTIR, as cadeias de hidrocarbonetos dos lipossomos estão associadas à conformação de ligações trans e gauche, consequentemente ao estado de fase lipídico (Lee & Chapman 1986). Quando os lipídios estão em uma fase mais ordenada (conformação trans), as cadeias dos metilenos estão organizadas paralelamente (Nagle, 1980), apresentando menor mobilidade, com maior grau de empacotamento molecular, estarão em uma fase L_β. As posições das regiões polares dos lipídios no plano da bicamada estão correlacionadas, formando uma rede quase cristalina de arranjos hexagonais ou ortorrômbicos. Quando os metilenos mudam o estado de fase para uma fase mais desordenada, estas apresentam vários isômeros, e podem ser encontradas as configurações trans e gauche. Os lipídios que apresentam isomerizações gauche ocupam uma área maior no plano da bicamada, e menor extensão ao longo desta. Portanto, a área por lipídio aumenta consideravelmente na transição de fase L β para L α (aproximadamente 25%) e a espessura da bicamada diminui (próximo de 15%). As interações entre os lipídios encontram-se mais fraças. No plano da membrana as cabecas polares apresentam alta mobilidade lateral. As cadeias dos metilenos estão desorganizadas entre si apresentando maior mobilidade, com menor grau de empacotamento molecular, caracterizando a fase Lα (Mannock et al., 2010). É interessante mencionar que a espessura da bicamada é definida basicamente pelo comprimento de dois (2) lipídios, entre dois (2) e cinco (5) nm. A espessura é dada como cerca de quatro (4) nm para vesículas com diâmetro da ordem próxima de 200 nm (Apolinário et al., 2017).

Para sistemas lipossomais em que são adicionados colesterol, este causa um aumento na proporção de confôrmeros *gauche* abaixo da T_m , e uma diminuição desses confôrmeros acima da T_m , em comparação com uma bicamada lipídica na ausência de colesterol. Através da técnica de HATR-FTIR, um aumento na proporção de confôrmeros *gauche* é refletido em um aumento no número de onda referente à banda do v_{as} e v_s de CH₂ em temperaturas abaixo da T_m . Isto torna as informações obtidas pelas técnicas de FTIR e DSC complementares entre si (Lee & Chapman, 1986).

A ΔH pode ser influenciada pelas forças de ligação entre um lipídio e um aa como o Trip, que incluem interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. De acordo com os parâmetros termodinâmicos, o tipo de força de ligação pode ser detectado. A ΔH é considerada uma constante quando a temperatura não apresenta grandes variações. E os valores de variação de ΔH e ΔS podem ser calculados (Ross & Subramanian 1981). Com base nisto, a relação entre os parâmetros termodinâmicos e as forças de ligação informam que, quando a ΔH for maior que zero, haverá um valor correspondente de ΔS maior que zero; logo, as interações predominantes serão as hidrofóbicas; mas se ΔH for menor que zero, ΔS também será menor que zero e as interações predominantes serão as ligações de hidrogênio e van der Waals. Caso a ΔH seja aproximadamente zero ($\Delta H \approx 0$) ou for muito pequena, é considerada a ΔS menor que zero e a interaçõo predominante são as eletrostáticas (Jiao et al., 2018; Ross & Subramanian 1981).

Em processos endotérmicos as análises de absorção de energia necessária para que ocorra a transição de fase, quanto a ΔH , designa que o aumento do valor de ΔH , pode indicar um estado de transição mais ordenado em modelos membranares. Por outro lado, a redução do valor de ΔH pode indicar modelos mais desordenado (Marsh et al., 1977).

Assim, os parâmetros obtidos via DSC propiciam informações quanto a estabilidade, associação/organização e interações dos grupos presentes nos lipossomos, que são relevantes quanto a permeabilidade de um composto inserido em um sistema lipossomal, por exemplo (Castelli et al., 1997; Hohne et al., 1996; Schaffzick et al., 2003).

2.3 Polímeros

2.3.1 Polímeros aplicados em sistemas lipossomais

O surgimento dos **polímeros** como material constituinte de nanocarreadores de fármacos, proporcionou avanços relevantes na nanotecnologia e nanociência nos últimos anos (Singh et al., 2015; Xu et al., 2019). As aplicações dos polímeros ocorrem em diversas áreas (Blanazs et al., 2009; Mai et al., 2014; Singh et al., 2015; Xu et al., 2019). Há destaque no **setor medicinal**, onde novos polímeros são sintetizados com o objetivo de propor **sistemas simples**, **versáteis** e **eficientes** para serem aplicados em sistemas de diagnóstico e/ou tratamento de doenças (Hage, 1998; Blanazs et al., 2009).

Os materiais poliméricos incluindo os naturais, seminaturais e sintéticos, apresentam inúmeras **propriedades** para **modular** as características de **entrega de fármacos** (Masserini, 2013; Singh et al., 2015; Xu et al., 2019). Estruturas macromoleculares podem ser adaptadas, visto que um polímero é, por definição, um composto químico com moléculas (monômeros) unidas por ligações covalentes, em longas e repetidas cadeias (Brunsveld et al., 2001; Coelho & Gomes 2007). Sendo assim, um grande número de sistemas poliméricos de distribuição de fármacos, foram projetados de forma a alcançar uma liberação sustentada do medicamento. **Polímeros em sistemas lipossomais**, por exemplo, **fornecem** um **controle temporal e espacial da liberação do fármaco** (Rosler et al., 2001). O controle temporal enfatiza a cinética predeterminada do fármaco, ou seja, liberação durante o tratamento, enquanto que o controle de distribuição espacial, visa direcionar o veículo farmacológico para locais específicos (Qiu & Bae 2016). Desta forma, polímeros são, uma classe promissora de compostos em sistemas de controle de liberação de fármacos, bem como na fabricação de sistemas de distribuição de medicamentos (Folkman & Long 1964).

2.3.2 Copolímeros supramoleculares

Com o surgimento dos **polímeros supramoleculares**, os polímeros deixaram de estar restritos às espécies macromoleculares, nas quais a repetição de unidades monoméricas é governada principalmente por ligações covalentes (Brunsveld et al., 2001). Polímeros supramoleculares, são polímeros baseados em unidades monoméricas, mantidas não somente por interações covalentes, mas também por interações secundárias, direcionais e reversíveis (Brunsveld et al., 2001). Polímeros que contêm a mesma unidade monomérica são chamados de homopolímeros, enquanto, os que contêm duas ou mais unidades monoméricas diferentes são chamadas de **copolímeros**. De acordo com a disposição destes monômeros, os copolímeros podem ser divididos em classes, tais como bloco, alternado, aleatório, enxertado entre outros (Figura 12) (Coelho & Gomes 2007). Estes **contêm segmentos funcionais**, que são obtidos por técnicas versáteis de síntese de polímeros combinados, com estratégias adequadas, que podem ser aplicadas a estruturas pré-formadas, ou blocos de construção individuais (cadeias) antes e / ou durante os processos de automontagem (Giacomelli et al., 2010, Xu et al., 2019).





Fonte: O próprio autor do trabalho.

Os copolímeros em bloco são formados por uma sequência de monômeros, que podem ser classificados em grupos, de acordo com a disposição de seus blocos (montagem), como do tipo diblocos (AB), triblocos (ABA), multiblocos e estrela (Figura 13) (Qiu & Bae 2016).

Figura 13: Diferentes tipos de copolímeros em bloco: diblocos (a), triblocos (b), multiblocos (c) e estrela (d).



Fonte: O próprio autor do trabalho.

2.3.3 Copolímeros supramoleculares: Rod-Coil

Os blocos de copolímeros podem ter diferentes ordens, assim como diferentes polaridades. Podem ser constituídos por porções flexíveis, geralmente hidrofílicas, com orientação randômica (*Coil*) e/ou por porções rígidas, que podem ser ou não hidrofóbicas e possuem conformação de haste (*Rod*) (Lin et al., 2013; Apolinário et al., 2017). Estes copolímeros são denominados de *Rod*-*Coil*. entretanto podem ser nomeados levando-se em consideração a alternância e flexibilidade dos blocos de construção, ou seja, dos seus constituintes. E assim, podem ser nomeados, por exemplo como *Rod-coil, Rod-Rod, Coil-Coil, Rod-Coil-Rod* etc (Yu et al., 2019).

O bloco *Rod* não tem a mesma entropia conformacional do bloco *Coil*, o que restringe a habilidade para "esticar" e se auto-organizar (Apolinário et al., 2017). Na maior parte das vezes, os polímeros *Rod* exibem conformação anisotrópica em forma de haste, com alta energia de flexão. Isto significa que a curvatura de polímeros *Rod* é restrita. Algumas destas restrições deve-se a presença de conjugação π (em polímeros semicondutores, por exemplo), estruturas secundárias helicoidais (em biomoléculas) e grupos aromáticos que, dentre outros, levam à adoção de conformações quase linear, além de rígida (Apolinário et al., 2017, Lin et al., 2013; Kuo et al., 2008).

Os copolímeros do tipo *Rod* são extensivamente estudados, por conter **propriedades biológicas e/ou eletroluminescentes** do material (Lin et al., 2013; Rizzo et al., 1986; Mai & Eisenberg, 2012; Vriezema et al., 2003). Em contra partida, blocos do tipo *Coil* podem fornecer **flexibilidade** ao material polimérico (Qiu & Bae 2006). Blocos *Coil* são frequentemente investigados compondo copolímeros supramoleculares di ou triblocos, em sistemas de liberação prolongada de fármacos (Xu et al., 2017). Blocos *Coil* em sistemas de carreadores de fármacos, facilitam o transporte através de barreiras de membrana e aumentam a biocompatibilidade, enquanto que os blocos *Rod* fornecem propriedades específicas ao material (Lin et al., 2013; Rizzo et al., 1986; Vriezema et al., 2003).

2.3.4 Arquitetura de copolímeros supramolecular usados em veículos farmacológicos

Os processos de diversos tipos de automontagem de copolímeros, a partir de uma variedade de interações supramoleculares, permitem uma diversidade de arquiteturas poliméricas, com base na combinação e modulações de propriedades, tais como as farmacológicas. À medida que nano sistemas foram desenvolvidos, a importância das relações de propriedades da arquitetura polimérica foi gradualmente detectada e enfatizada (Folkman & Long 1964; Qiu & Bae 2006). Sendo assim, polímeros anfifílicos supramoleculares tornam-se uma importante estratégia para funcionalizar e auxiliar no direcionamento do sistema farmacológico para locais desejados. Copolímero no processo de auto-montagem em reações de esterificações, por exemplo, pode ser funcionalizado com uma ou várias moléculas (Dos Santos et al., 2021), como a propriedade de reconhecer tecido e/ou órgão específico, entre outras. Um copolímero que contém sacarídeos,

quando inserido em um nanocarreador, poderá auxiliar no direcionamento do sistema até o local alvo, com a finalidade diminuir as doses do medicamento e minimizar possíveis efeitos colaterais (Jain et al., 2012).

Na Figura 14 estão apresentadas algumas **arquiteturas de polímeros relevantes** para aplicação de **sistemas farmacológicos**, entre os quais destacam-se os **polímeros lineares** (Figura 14 (a); ver também Figura 13 di (a), tri (b) e multiblocos (c) - *Rod-Coil*) para **inserção** em **lipossomos**. Os polímeros lineares estão associados especialmente a polímeros solúveis em água, para criar conjugados polímero-fármaco. Os copolímeros ramificados (Figura 14 (b)) são caracterizados pela presença de pontos de ramificação e mais de dois grupos terminais (Qiu & Bae 2006).



Figura 14: Arquiteturas de polímeros lineares (a) e ramificados (b).

Fonte: Adaptado de Qiu & Bae 2006.

2.3.5 Sistemas lipossomais contendo polímeros: aplicações em sistemas de liberação de fármacos com ênfase em doenças infecciosas

Nos últimos anos, copolímeros *Rod-Coil* com morfologias variadas em nanoescala, foram obtidos e empregados em modelos de controle de liberação de fármacos (Mai & Eisenberg, 2012; Xu et al., 2019). Neste âmbito, uma nova classe de vetores híbridos que mimetizam a composição lipídica de envelopes virais, tem sido evidenciada com sucesso em terapia gênica, tanto para estudos *in vitro* quanto *in vivo*, e é denominada de envelopes virais artificiais. Os envelopes virais artificiais, podem ser obtidos a partir de sistemas lipossomais contendo polímeros *Rod-Coil*

glicosilados ou não, com o objetivo de transportar por exemplo, sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Al-Dosari & Gao 2009; Pinnapireddy et al., 2019; Ramamoorth & Narvekar 2015). Embora este veículo de entrega de genes apresente atividade terapêutica satisfatória, como proteger o material de entrega da degradação, não ser tóxicos para as células, ser compatíveis com as mesmas, específicos para o tecido alvo e, o mais importante, apresentar imunogenicidade, existe desvantagem do uso destes vetores de entrega de DNA não viral, que é a sua baixa eficiência de transfecção (Oliveira et al., 2018). Consequentemente, a maioria das pesquisas em terapia gênica não viral tem se concentrado no desenvolvimento de vetores mais eficientes. A glicosilação é um dos processos nos quais os agentes virulentos usam para proteger a proteína viral do reconhecimento imunológico. Neste contexto, Pinnapireddy e colaboradores (2019) propuseram sistemas lipossomais aniônicos com polímeros glicosilados e não glicosilados como envelopes virais artificiais. Nestes estudos, os autores desenvolveram lipossomos baseados em lipídios e colesterol, e polímero polietilenimina com e sem o glicídio galactose (Gal), para mimetizar sistemas de envelopes virais do vírus da imunodeficiência humana da doença HIV e do vírus da herpes simples da doença HSV. Os sistemas foram caracterizados de forma físico-química e morfológica, e foi constatado que os lipossomos com polímeros glicosilados por Gal, que mimetizam vírus, mostraram uma eficiência de transfecção maior em comparação com os não glicosilados. Esses vetores híbridos mostraram uma toxicidade segura e perfil de hemocompatibilidade. Os estudos foram considerados pré-requisitos essenciais para a continuidade de estudos in vivo.

Polímeros contendo uma porção glicídica são frequentemente aplicados em lipossomos (Figura 12), pois a porção glicídica pode atuar como vetorizador e como ligantes de superfície das vesículas, fazendo com que sejam reconhecidos e endocitados por receptores de lectina nas células. Além disto, podem aumentar a capacitação celular de um fármaco, como por exemplo, da azidotimidina (fármaco antiviral, HIV) que é substancialmente aumentada em lipossomos revestidos por Gal (Jain et al., 2012). Além disso, a porção glicídica contribui com diferentes propriedades benéficas em formulações, incluindo características furtivas, propriedade bioadesiva, bioestabilidade, solubilidade e toxicidade reduzida do transportador e do fármaco, com melhor perfil farmacocinético e índice terapêutico superior, por especificidade aos tecidos-alvo (Jain et al., 2010; Nahar et al., 2006). Além da azidotimidina, os **carreadores glicosilados** têm sido utilizados com sucesso para entregar outros agentes terapêuticos, tais como o **antiviral** estavudina,

os fármacos **anticâncer** metotrexato e doxorrubicina, fármacos **antituberculose**, como rifampicina, além de **antígenos**, como por exemplo, genes (Jain et al., 2012).

Os **polímeros contendo** um dos seus blocos constituído de **aa**, podem ser sintetizados e inseridos **em lipossomos** (Dos Santos et al., 2021). Este sistema é uma alternativa de relevância para os avanços de sistema de nanocarreadores lipídicos, visto que os aas possuem funções importantes. Citando o **Trip**, o aa tem sido cada vez mais evidenciado por apresentar **respostas imunológicas**, como as inflamatórias, redução do estresse e na melhoria dos transtornos de humor (Le Floc'h et al., 2010). O Trip atua como **antimicrobiano**, inibe a biossíntese microbiana, é **antioxidante**, atua na **redução da citotoxicidade e apoptose celular** (morte celular programada), é precursor da síntese de melatonina (Lee et al., 2002), além de apresentar **propriedades eletroluminescentes** (Rizzo et al., 1986), entre outros. Porém, estudos são necessários para avaliar novos sistemas e suas interações em diferentes níveis de integração (Figura 15).

Figura 15: Ilustração de novos polímeros *Rod-Coil-Rod* (a), cujo bloco destacado em amarelo pode consistir de aminoácido ou glicídio para inserir em lipossomos (b).



Fonte: O próprio autor do trabalho.

O poli (óxido etileno) (**PEO**) é uma matéria-prima também usada na produção de formulações (Spitzer et al., 2002; Mai & Eisenberg 2012). Quando inserido **em lipossomos**, o PEO contribui para a estabilidade, diminuem o atrito ao passar pelos poros de membranas, como as BHE, e auxilia na circulação prolongada no plasma sanguíneo, pois diminui o nível de opsonização, ou seja, atrasa o reconhecimento do sistema pelos macrófagos dos órgãos do sistema

fagocítico mononuclear (fígado, baço, medula óssea). Os PEOs são solúveis em meios orgânicos e aquosos (Batista et al., 2007, Ulrich et al., 2002).

Outro componente que pode fazer parte da estrutura polimérica é o **colesterol**. O colesterol é muito usado em formulações, pois ao interagir com a membrana fosfolipídica aumenta a espessura e a resistência mecânica e, diminui a permeabilidade da bicamada fosfolipídica na fase $L\alpha$, fisiologicamente relevante, produzindo uma fase Lo (fase ordenada de líquido lamelar), denominada como um grau de organização intermediário, entre as fases L β e L α (Mannock et al., 2010). Além disto, é biocompatível e aumenta a estabilidade dos lipossomos *in vivo* (Masserini, 2013). Por ser biocompatível, o colesterol pode passar pelo plasma e ser transportado pela lipoproteína Apolipoproteína E (apoE) (um constituinte protéico) juntamente com outros lipídios, para o sistema nervoso central (SNC). Complexos formados a partir de lipoproteínas podem ser absorvidos no cérebro através do reconhecimento de apoE por receptores específicos na BHE (Bu, 2009; Laskowitz et al., 2001).

Considerando a rota sintética de preparo dos polímeros em questão, a reação de cicloadição 1,3-dipolar envolvendo azidas orgânicas e alcinos terminais, denominada de reação "*Click Chemistry*", ao formar o **heterocíclico 1,2,3 triazol** propicia uma diversidade de moléculas com funções variadas. O 1,2,3-triazol é um heterocíclico de origem exclusivamente sintética, com um vasto campo de aplicações, com destaque para o desenvolvimento de novos fármacos (Melo et al., 2006).

Dal-Bó e colaboradores (2011), sintetizaram duas (2) novas estruturas de copolímeros triblocos, sendo um dos blocos constituído de uma cadeia de hidrocarboneto com 18 átomos de carbono, como espaçador um único bloco de PEG e, um terceiro bloco formado pelo 1,2,3 triazol, responsável por conectar e variar a porção glicídica entre n-acetilglicosamina e lactose, o N-acetilβ-D-glucosaminida (C₁₈PEG₉₀₀GlcNAc) Propargil-β-lactosídeo e 0 $C_{18}PEG_{900}Lac$, respectivamente. Este procedimento deu origem ao polímero N-acetil-β-D-glucosaminil-PEG₉₀₀docosanato (C₂₂PEG₉₀₀GlcNAc) (Dal-Bó et al., 2011; Dal-Bó et al., 2014), que mais tarde foi inserido em lipossomos (Micheletto et al., 2015) e, posteriormente, foi inserido neste sistema uma proteína, a lectina de Bauhinia variegata (BVL) (Dos Santos et al., 2016). A reação de "Click Chemistry" entre a azida terminal e álcool propargílico possibilitou a variação da porção glicídica nos polímeros (Dal-Bó et al., 2011; Dal-Bó et al., 2014) de forma rápida, termodinamicamente favorável e estereoespecífica (Sharpless et al., 2001). Modificar as porções glicídicas dos polímeros que foram inseridos em lipossomos e, realizar as caracterizações físico-químicas dos

modelos, contribuíram para a escolha adequada de materiais, para aumentar a eficiência dos sistemas, ou como agente terapeutico (BVL como um fármaco) ou como um sistema vetorizador (BVL atuando no reconhecimento celular) para carrear fármacos.

Apesar de não constar no âmbito de "*Click Chemistry*", é também importante ressaltar que Mohr e colaboradores (2014), geraram duas estruturas de copolímeros diblocos, constituídos de colesterol e PEG para serem inseridos em lipossomos. Uma estrutura consistia em um único segmento de PEG, enquanto a outra consistia em vários segmentos multifuncionais. Os polímeros promoveram melhoras na solubilidade aquosa, resistência à adsorção de proteínas e proteção dos lipossomos (Mohr et al., 2014).

3.1 Objetivo geral

Realizar a síntese e a caracterização de um novo polímero *Rod-Coil-Rod*, contendo um aminoácido, o colesterol-poli (óxido etileno)-triptofano (Col-PEO-Trip). A partir deste e de outros dois novos polímeros glicosilados também do tipo *Rod-Coil-Rod*, o colesterol-poli (óxido etileno)-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e o colesterol-poli (óxido etileno)-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc), realizar as caracterizações espectroscópicas, espectrofotométrica e termoanalítica de seus efeitos em sistemas lipossomais. Desta forma, contribuir com o "*design*", ou planejamento, de novos sistemas para diagnóstico e tratamento de doenças, como as associadas às infecções virais.

3.2 Objetivos específicos

✓ Sintetizar um novo polímero do tipo *Rod-Coil-Rod*, o Col-PEO-Trip e caracterizá-lo por RMN de ¹H e de ¹³C e por FTIR;

√Obter os polímeros Col-PEO-Gal e o Col-PEO-GlicNAc;

✓ Produzir lipossomos de Aso (controle);

✓ Incorporar os polímeros do tipo *Rod-Coil-Rod* o Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e o Col-PEO-GlicNAc em lipossomos de Aso, obtendo-se três sistemas distintos;

 \checkmark Caracterizar a localização preferencial dos polímeros no sistema lipossomal de Aso, bem como seus efeitos nas propriedades físico-químicas das membranas através de técnicas espectroscópicas, espectrofotométrica e termoanalítica;

 \checkmark Avaliar a estabilidade dos sistemas a partir dos resultados obtidos.

4.1 Reagentes e solventes utilizados

Para o desenvolvimento deste trabalho, a Aso foi fornecida pela Solae do Brasil, S.A. (Esteio, Brasil). A composição de Aso é de aproximadamente 75% de distearoilfosfatidilcolina (DSPC, 18: 0), 12% de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC, 18: 2) e 8% de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, 16: 0) (Micheletto et al., 2015; Mertins et al., 2015; al., 2010). Água deuterada (D₂O) e 3- (trimetilsilil) - [2,2,3,3-2H4] -1-propionato de sódio (TSP, 0,05%) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Todos os reagentes foram de qualidade comercial, e foram usados como recebidos, sem purificação adicional, salvo indicações. Os solventes foram secos e destilados de acordo com os procedimentos da literatura antes do uso. As placas pré-revestidas foram do tipo E. Merck Silica Gel 60 F254 (Darmstadt, Alemanha). Para a cromatografia em coluna foi usado a Merck Silica Gel 60.

4.2 Métodos de preparo

4.2.1 Síntese dos polímeros Rod-Coil-Rod

A seguir são descritas as vias de obtenção dos polímeros Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc.

4.2.1.1 Síntese do polímero Col-PEO-Trip

O novo polímero *Rod-Coil-Rod*, o Col-PEO-Trip, foi obtido pelo método adaptado de Michelleto e colaboradores (2015) e Dan-bo e colaboradores (2008), de acordo com o Esquema 1. E o mecanismo proposto, encontra-se em anexo na seção 8. O Col-PEO-Trip foi sintetizado, com participação da autora do trabalho, no Laboratório de Processamento de Polímeros Avançados (LAPPA), localizado na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) em Criciúma, Santa Catarina.

Esquema 1: Representação esquemática da rota da síntese do novo polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip). A 1ª etapa (*i*): obtenção do hemisuccinato colesteril, a 2ª etapa (*ii*): obtenção do colesterol-PEO₁₀₀₀ e a 3ª etapa (*iii*): obtenção do colesterol-PEO₁₀₀₀ erapa (*coletaria*): obtenção do



Polímero, colesterol-PEO1000-triptofano (Col-PEO-Trip)

A síntese foi realizada em três etapas:

i) **1**^a **Etapa** \rightarrow A primeira etapa está relacionada à modificação química do colesterol com anidrido succínico, para a obtenção do hemisuccinato colesteril. O colesterol (1,93 g; 5 mmol), anidrido succínico (0,75 g; 7,5 mmol) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,61 g; 5 mmol), foram solubilizados em 30 mL de cloreto de metileno e a mistura foi aquecida a 65 ° C. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (TLC, do inglês "*Thin Layer Chromatography*") por aproximadamente 12 horas. A mistura foi adicionada o sulfato de sódio (Na₂SO₄) e evaporada sob pressão reduzida. Por fim, foi obtido o hemisuccinato colesteril, na forma de um precipitado branco, que foi, então, isolado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando cloreto de metileno: metanol (9: 1 v / v) como eluente, e obteve-se o **hemisuccinato colesteril puro** (1,94 g, 80%).

ii) 2^{a} Etapa \rightarrow Na etapa seguinte, a partir de uma reação de esterificação, foi obtido o colesterol-PEO₁₀₀₀. A N, N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0,680g, 3,3 mmol) e o catalizador DMAP (0,092g, 0,75mmol), foram adicionados a um béquer que continha o cloreto de metileno anidro (30 mL), uma solução de PEO (1000 g.mol⁻¹) (3 g, 3 mmol) e hemisuccinato colesteril (1,46 g, 3 mmol), sob agitação magnética. A reação foi monitorada por TLC, e após 48 horas à temperatura ambiente, sob atmosfera de nitrogênio (N₂), a mistura foi filtrada sobre uma fina camada de Celite e evaporada sob pressão reduzida. Foi obtido um composto oleoso e incolor, que

foi isolado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando o cloreto de metileno: metanol (15: 1 v / v) como eluente e obteve-se o **colesterol-PEO**₁₀₀₀ **puro** (3,37 g, 75%).

iii) **3**^a **Etapa** \rightarrow Por fim, na terceira etapa, o Col-PEO-Trip foi obtido por uma reação também de esterificação, a partir do colesterol-PEO₁₀₀₀ com o Trip como reagente, DMAP e DCC, (Dan-bo et al., 2008). O DCC (0,309 g, 1,5 mmol) e o DMAP (0,183 g, 1,5 mmol) foram então, adicionados a um béquer que continha o cloreto de metileno anidro (30 mL), uma de solução de (S) -2-Amino-3- (Ácido 1H-indol-3-il) -propiônico (Trip) (0,3 g, 1,5 mmol) e o conjugado de colesterol-PEO₁₀₀₀ (2,25 g, 1,5 mmol), sob agitação magnética. Após 48 horas à temperatura ambiente, sob atmosfera de N₂, a mistura foi filtrada sobre uma fina camada de Celite e evaporada sob pressão reduzida. Foi obtido um produto oleoso e incolor, o Col-PEO-Trip. O produto foi isolado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando o cloreto de metileno: metanol (9: 1 v / v) como eluente e obteve-se o **Col-PEO-Trip puro** (1,89 g, 75%).

4.2.1.2 Polímeros Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc

Os polímeros (Figura16) foram sintetizados pela equipe de trabalho do LAPPA, na UNESC em Criciúma, Santa Catarina, ao qual acompanhei algumas das etapas no processo de obtenção e, foram gentilmente fornecidos pelo Professor Alexandre Dal-Bó.

Figura 16: Fórmula estrutural do colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNac), ao variar **R**, **por galactose (Gal) (a) e n-acetilglicosamina (GlicNAc) (b)**, respectivamente.



4.2.1.3 Caracterização dos polímeros

As caracterizações espectroscópicas para identificação do polímero sintetizado Col-PEO-Trip e a constatação de pureza, foram feitas por RMN de ¹H e de ¹³C e por FTIR.

4.2.1.3.1 RMN de ¹H e ¹³C

As análises espectroscópicas de RMN de ¹H e de ¹³C, foram realizadas a 400 e 100 MHz, respectivamente, em equipamento Bruker Avance III (Ettlingen, Alemanha) (disponível na UNESC), utilizando o clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente. A referência utilizada foi o tetrametilsilano (TMS) (0,00 ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) foram relatadas em hertz (Hz).

4.2.1.3.2 FTIR

Os espectros de FTIR foram adquiridos por um espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige-21 (Kyoto, Japão) (disponível na UNESC), com uma resolução de 4 cm⁻¹, empregando pastilha de KBr (600-4.000 cm⁻¹).

4.2.2 Preparo dos lipossomos

Os lipossomos de Aso na ausência de polímeros foram preparados na concentração lipídica de 10 mg.mL⁻¹. Lipossomos de Aso contendo: Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc, continham concentrações respectivamente de 15 mg/mL (10 mg/mL de Aso e 5 mg/mL de polímero), sendo assim a razão entre os componentes 2:1 (m/m, ou seja, 10 mg/mL de Aso, 5 mg/mL de polímero).

Os lipossomos do tipo LUVs foram preparados pelo método de evaporação por fase reversa (Szoka & Papahadjopoulos 1978; Mertins et al., 2005). Para a obtenção do lipossomo controle, a Aso foi solubilizada em clorofórmio (CHCl₃), em um balão de fundo redondo (volume de 25 mL) seguido da adição de água destilada (volume de 20 μ L). A mistura foi submetida a banho de ultrassom por 3 min a temperatura ambiente, produzindo as micelas reversas em uma dispersão homogênea. O organogel foi obtido por evaporação do CHCl₃ (temperatura do banho 30 °C) sob

pressão reduzida, aproximadamente de 450 milímetros de mercúrio (mmHg). Os lipossomos puros foram obtidos adicionando-se água destilada (1 mL) ao organogel, seguido por agitação vigorosa. Para a obtenção dos sistemas lipossomais poliméricos (Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc), foi utilizada a mesma rota, sendo o polímero solubilizado em água destilada e acrescentado ao sistema na fase de hidratação do organogel. As etapas estão representadas conforme o Esquema 2.

Esquema 2: Representação esquemática do método de preparação de lipossomos por evaporação por fase reversa. Solubilização do lipídio (a), formação das micelas reversas (b), evaporação do solvente (c), hidratação do organogel (d) e obtenção da suspensão lipossomal-LUVs (e).



Fonte: O próprio autor do trabalho.

4.3 Estudo da dinâmica molecular dos sistemas lipossomais-poliméricos

4.3.1 HATR-FTIR

As análises dos espectros HATR-FTIR dos sistemas lipossomal controle e lipossomaispoliméricos (Aso-Col-PEO-Trip, Aso-Col-PEO-Gal e Aso-Col-PEO-GlicNac), foram realizados em espectrofotômetro Shimadzu-IR Prestige-21 (Kyoto, Japão) (disponível na FURG). Os interferogramas foram obtidos através de 45 varreduras, com resolução de 2 cm⁻¹. As leituras foram feitas na região de 4.000 a 400 cm⁻¹ (Chen & Tripp 2008). Os espectros foram analisados considerando os deslocamentos do número de onda e variações da largura das bandas (calculados a 75% da altura do pico), referente as vibrações dos estiramentos axiais (v), relacionados à grupos específicos contidos na Aso (Chen & Tripp 2008; Moreno et al., 2009). As referidas vibrações foram: v_{as} CH₂ e v_s CH₂, v C=O, v COC, v_{as} PO₂⁻ e v_{as} N⁺(CH₃)₃.

4.3.2 RMN de ¹H e de ³¹P

As medidas de RMN de ¹H e de ³¹P dos lipossomos em estudo (Aso-Col-PEO-Trip, Aso-Col-PEO-Gal e Aso-Col-PEO-GlcNAc), foram realizadas em equipamento Bruker 400 MHz (Ettlingen, Alemanha) (disponível no Centro Integrado de Análises (CIA-FURG). As medidas de T₁ de ¹H do grupo colina lipídico (N⁺(CH₃)₃, δ =3,2 partes por milhão (ppm)) foram realizadas a 400 MHz, em temperatura de 20 ° C, usando uma sequência de pulso de recuperação de inversão (180- τ 90 °) com intervalo de tempo de 0,2 a 12,8 s (De Lima et al., 2010; Feigenson & Chan, 1974).

As análises de CSA de ³¹P (Seelig, 1978) foram realizadas a 161 MHz, em temperatura de 25 ° C. O número de varreduras (*"scans"*) foi de 2.048 e o número de varreduras de espera (*"dummy scans"*) de 4s; foi utilizado um intervalo (*"delay"*) de 0,2 s e um tempo de aquisição (*"acquisition time"*) de 0,5111808 s. Para todas as medidas de RMN, os lipossomos foram dispersos em H₂O: D₂O (80:20, v / v), e para os ensaios de RMN de ¹H, o sal sódico do ácido 3- (trimetilsilil) propiônico-D4 (TSP) foi usado como referência.

4.3.3 DLS e potencial ζ

As medidas do diâmetro e potencial ζ do sistema controle, e as variações que os polímeros propiciaram neste, foram realizadas usando um Litesizer Equipment 500 (Worcestershire, UK) (disponível na FURG). As vesículas eram dispersas em água milli-Q, 25 µL de amostra em 1mL de água milliQ. O tamanho das mesmas e o PDI foram medidos por DLS a 90 °. As análises de potencial ζ foram realizadas por espalhamento de luz eletroforética (ELS), usando a faixa de -600 a + 600 mV, com uma mobilidade de 10⁻¹¹ metro quadrado/volt segundo (m² / Vs), a 2 x 10⁻⁷ m² / Vs. A faixa de controle de temperatura era de 0 a 90 ° C, com a temperatura de operação fixada em 10 a 35 ° C (Hädrich et al., 2015). As medidas foram realizadas em triplicatas, em colaboração

com os professores Tito Roberto Cadaval e Luiz Antonio Pinto, no Laboratório de Tecnologia Industrial (LTI).

4.3.4 UV-Vis-Turbidez

As medidas de turbidez, do lipossomo controle e, o efeito de cada polímero testado neste, foram obtidas por espectrofotômetro Shimadzu UV-2550 (Kyoto, Japão) (disponível na FURG). Os valores de absorbância dos sistemas foram medidos em λ de 400 nm. Foram utilizadas células de quartzo com caminho óptico de 1 cm (Hope et al., 1986; Sousa et al., 2013).

4.3.5 DSC

As medidas de DSC foram realizadas em equipamento DSC-50 Shimadzu (Kyoto, Japão), na taxa de aquecimento de 5 ° C min⁻¹. O gradiente de temperatura variou de -40 ° C a -5 ° C. O Índio foi usado para calibração do instrumento e nitrogênio (N₂) como gás de purga, a uma taxa de fluxo de 50/50 mL min ⁻¹ (Koynova & Caffrey 1998). Uma célula de alumínio vazia foi usada como referência (De Lima et al., 2010). A T_m dos lipossomos (controle e polimérico) foi detectada e analisada. Os valores ΔH foram calculados integrando a área sob o pico de DSC usando o software TA 60WS.

5.1 Síntese do novo polímero Rod-Coil-Rod, o Col-PEO-Trip

A síntese do novo polímero, o Col-PEO-Trip, foi realizada em três etapas:

i) **1ª** Etapa - Para obter o novo polímero *Rod-Coil-Rod*, o Col-PEO-Trip, era necessário integrar os blocos Colesterol (*Rod*), PEO₁₀₀₀ (*Coil*) e o aa Trip (*Rod*). Deste modo, para que houvesse a primeira integração entre blocos, a molécula de colesterol foi modificada para que o PEO fosse adicionado posteriormente. Então, na primeira etapa da síntese foram solubilizados em cloreto de metileno o colesterol, anidrido succínico e a DMAP (a 65 ° C). Sendo o cloreto de metileno o solvente da reação; o DMAP o catalizador nucleofílico (base de Lews) responsável por doar pares de elétrons para o anidrido succínico. A reação foi monitorada por cromatografia em TLC, afim de verificar o término da reação, ou seja, quando os reagentes foram convertidos ao produto final e, para determinar a eluição mais adequada para o procedimento da cromatografia em coluna, para realizar a purificação/isolamento do hemisuccinato colesteril. O sulfato de sódio (Na₂SO₄) foi utilizado para remover a formação de possíveis moléculas de água. A mistura foi filtrada sob pressão reduzida para remoção de impurezas e o hemisuccinato colesteril foi obtido na forma de um precipitado branco. O produto hemisuccinato colesteril foi purificado/isolado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando cloreto de metileno: metanol (9: 1 v / v) como eluente.

ii) **2**^a **Etapa -** Para a adição de PEO₁₀₀₀ (*Coil*) na molécula de colesterol que foi modificada, ou seja, o hemisuccinato colesteril (*Rod*), e obtenção, portanto, do dibloco, *Rod-Coil*, o colesterol-PEO₁₀₀₀, foi utilizada uma reação de esterificação na segunda etapa, entre o grupo ácido carboxílico presente no hemisuccinato colesteril e o grupo hidroxila do PEO₁₀₀₀. Em béquer que continha o solvente cloreto de metileno anidro, uma solução do composto PEO₁₀₀₀ e hemisuccinato colesteril, sob agitação magnética, que forneceu energia mecânica para a mistura, foram adicionados a DCC e o DMAP. A DCC foi utilizada nesta reação, como o agente desidratante ou de condensação, que é convertida no processo de esterificação a diclohexiluréia (DHU), enquanto que a DMAP como catalizador nucleofílico (Dan-bo et al., 2008). A reação também foi monitorada por TLC, assim como já mencionado anteriormente, para verificar o término da reação e avaliar as melhores condições de eluição para o procedimento da cromatografia em coluna, para realizar

a purificação/isolamento do dibloco, *Rod-Coil*, o colesterol-PEO₁₀₀₀. O monitoramento da reação por 48 horas à temperatura ambiente, sob atmosfera de nitrogênio (N₂), foi feita para que os compostos não reagissem com outros componentes do ar, como a umidade e/ou oxigênio. A sensibilidade dos compostos da síntese, geralmente se manifestam por oxidação, decomposição e/ou hidrolise. A mistura (Figura 17 (a), antes da filtração) obtida foi filtrada sobre uma fina camada de Celite para a remoção de impurezas e remoção da DHU formada durante a reação de esterificação a partir da conversão do DCC. A DHU é insolúvel em diclorometano e, por isso, é removido do produto reacional apenas por filtração, após as reações (Dan-bo et al., 2008). O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, para a obtenção do produto. Foi obtido um produto soleoso e incolor, o colesterol-PEO₁₀₀₀, que foi purificado/isolado por cromatografia em coluna de sílica gel, usando o cloreto de metileno: metanol (15: 1 v / v) como eluente e obteve-se o terminal hidrofílico do conjugado para ser integrado o Trip, na etapa subsequente.

iii) **3ª Etapa** - Na última etapa o método para a síntese do tribloco, *Rod-Coil-Rod*, foi por reação de esterificação entre o grupo de ácido carboxílico do Trip e o grupo hidroxila do conjugado Col-PEO₁₀₀₀. Nesta terceira etapa, o DCC e DMAP foram adicionados com a mesma finalidade descritas na etapa anterior (**2ª Etapa**) (Dan-bo et al., 2008), à um béquer que continha solvente, o cloreto de metileno anidro, o conjugado de colesterol-PEO₁₀₀₀ e, uma solução de Trip, composto a ser integrado ao polímero (colesterol-PEO₁₀₀₀) obtido da etapa anterior, sob agitação magnética. O monitoramento da reação por 48 horas à temperatura ambiente, sob atmosfera de nitrogênio (N₂) e, a filtração foram realizadas com as mesmas finalidades já mencionadas anteriormente. Foi obtido um produto oleoso e incolor, o Col-PEO-Trip. Para purificar/isolar foi realizada a cromatografia em coluna de sílica gel, usando o cloreto de metileno: metanol (9: 1 v / v) como eluente e obteve-se o **Col-PEO-Trip puro** (Figura 17 (b)).

Figura 17: O novo polímero *Rod-Coil-Rod*, o colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip): (a) antes da filtração sobre uma fina camada de celite e purificação/isolação e (b) pós filtração sobre uma fina camada de celite e purificação/isolação.



A porção *Rod*, o colesterol, é considerado de baixa polaridade e estrutura rígida (Campbell et al., 2011), ao ser modificado para a integração do PEO₁₀₀₀ na molécula, a porção *Rod*, o hemisuccinato colesteril, adquiriu uma certa polaridade e flexibilidade, mesmo antes da adição de PEO, em função do hemisuccinato possuir em sua estrutura dois átomos de oxigênio. Além disto, o colesterol é biocompatível com células membranares (Campbell et al., 2011).

Ao compor o Col-PEO-Trip a porção *Coil*, o PEO₁₀₀₀, é a parte hidrofílica do polímero, atribuído ao fato de sua estrutura (HO-(CH₂CH₂O)_n-H) possuir hidroxilas e átomos de oxigênio, que por interações via ligação de hidrogênio, facilitam sua miscibilidade com solventes polares (Medeiros & Kanis 2010). As regiões polares do PEO são afastadas por regiões hidrofóbicas de Carbono-Hidrogênio as quais quando ligadas a solventes polares, como a água, acabam reduzindo o momento dipolar desta e ainda proporcionam a formação de cavidades no solvente que acomodam o soluto de menor polaridade (Medeiros & Kanis 2010). O PEO possui estrutura randômica, que viabiliza flexibilidade para a molécula polimérica (Lin et al., 2013; Apolinário et al., 2017).

A última porção *Rod* que foi integrada, o aa Trip, é considerado de baixa polaridade e estrutura rígida, principalmente atribuída ao sistema de conjugações π (Le Floc'h et al., 2010 Lee
et al., 2002). O Trip por apresentar propriedades farmacológicas e fluorescentes (Rizzo et al., 1986), possui capacidade de funcionalizar a molécula polimérica.

5.1.1 Caracterização espectroscópica do polímero Col-PEO-Trip

Nesta seção, constam os espectros de RMN de ¹H e ¹³C e FTIR dos compostos. Foram atribuídos os principais deslocamentos químicos, dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C e, picos dos espectros de FTIR que identificam os produtos obtidos das etapas da síntese do Col-PEO-Trip.

5.1.1.1 Espectro de RMN de ¹H e de ¹³C e, FTIR do hemisuccinato colesteril

i) RMN de ¹H do hemisuccinato colesteril.

O espectro de RMN de ¹H do hemisuccinato colesteril está apresentado na Figura 18, e as principais multiplicidades e atribuições que confirmam o produto obtido, constam na tabela 1.



Figura 18 : Espectro de RMN de ¹H do hemisuccinato colesteril, em CDCl₃.

Singleto	Dupleto	Multipleto
0,68 (3H)	2,31-2,33 (2H)	1,58 (4H)
5,38 (1H)		1,84-2,03 (5H)
		2,61-2,69 (4H)
		4,63 (5H)

Tabela 1: Multiplicidades referente ao deslocamento químicos (δ) dos sinais de RMN de ¹H e, dados de integrais e do hemisuccinato colesteril, em ppm.

A partir do espectro de RMN de ¹H, foram analisados os principais sinais de δ do hemisuccinato colesteril e atribuídas conforme a Figura 18.

O espectro indicou muitas ressonâncias de núcleo de hidrogênios alifáticos nas faixas de δ em 2,3 a 0,6 ppm (Khatun et al., 2017).

Os singletos da molécula de colesterol (Maria et al., 2009) foram observados no δ em 0,68 ppm referente ao grupo metilo com integração de 3 hidrogênios (Figura 18 (**a**)) e, em 5,38 ppm, com integração de 1 hidrogênio, correspondente ao hidrogênio do carbono vinílico (figura 18 (**d**)) (Maria et al., 2009).

O dupleto no δ em 2,31 e 2,33 ppm, com integração de 2 hidrogênios em cada δ , são correspondentes aos hidrogênios do carbono adjacente vinílico, respectivamente na Figura 18 (e) e (c), sendo o hidrogênio no δ em 2,33 ppm mais desblindado, por estar mais próximo ao átomo de oxigênio da ligação éster. Estes dupletos possuem constates de acoplamento (*J*) de 7,8 Hz, que é uma medida de quão intensamente o núcleo destes é afetado pelos spins de seus vizinhos (Silverstein et al., 2000).

O Multipleto no δ em 1,58 ppm, refere-se a Figura 18 (**j**) com integração de 4 hidrogênios. O multipleto no δ em 2,61 ppm, sofre a influência da carbonila do grupo éster na Figura 18 (**f**) sendo mais blindado quando comparado com o multipleto no δ em δ 2,69 ppm, que tem a influência da carbonila do grupo do ácido carboxílico na Figura 18 (**1**). Não é possível observar o sinal do δ do núcleo de hidrogênio característico do grupo carboxílico próximo a 11,0 ppm no Espectro de RMN de ¹H (Silverstein et al., 2000), entretanto o multipleto da ligação C-O no δ em 4,63 ppm com integração de 3 hidrogênios (Figura 18 (*****)), sugeriu a formação da molécula pretendida, o composto hemisuccinato colesteril, ratificada pela ausência do sinal no δ próximo a 3,58 ppm, que é característico de sinal do δ do núcleo de hidrogênio do grupo álcool presente no colesterol (Khatun et al., 2017).

Os sinais característicos da molécula de colesterol do espectro de RMN de ¹H (Maria et al., 2009) nos δ em 1,34 ppm, 1,2 ppm, 0,88 ppm e 0,87 ppm, foram identificados como os grupos metilo na posição **i**, **g**, **a** e **h** na Figura 18, respectivamente.

ii) RMN de ¹³C do hemisuccinato colesteril.

O espectro de RMN de ¹³C do hemisuccinato colesteril está apresentado na Figura 19.



Figura 19: Espectro de RMN de ¹³C do hemisuccinato colesteril, em CDCl₃.

O espectro de RMN de ¹³C foi analisado de forma a confirmar a obtenção do hemisuccinato colesteril, através dos principais δ , em ppm.

O sinal do carbono vinílico foi observado no δ em 122,75 ppm (Maria et al., 2009) (Figura 19 (a)). A principal atribuição que indicou a formação do hemisuccinato colesteril está no δ em 77,02 ppm, referente a ligação C-O do éster formado (Silverstein et al., 2000) (Figura 19 (b)), assim como o pico de carbonila do éster formado (Maria et al., 2009) foi observado no δ em 171,56 ppm na Figura 19 (c)) e, em 177,63 ppm referente ao pico da carbonila de ácido carboxílico (Silverstein et al., 2000) (Figura 19 (d)), cujo pico não foi avaliado no espectro de RMN de ¹H (Figura 18).

iii) FTIR do hemisuccinato colesteril.

O espectro de FTIR do hemisuccinato colesteril está apresentado na Figura 20.





A partir do espectro de FTIR (Figura 20) foram observadas as principais bandas dos componentes (Maria et al., 2009; Vyas et al., 2010; Vyas & Joshi 2013) que constituem o hemisuccinato colesteril. O v OH do ácido carboxílico foi verificado em 3459,0 cm⁻¹. As vibrações

do v_{as} e v_s CH de alifáticos da estrutura molecular foram observadas em 2949,0 cm⁻¹ e 2870,0 cm⁻¹, respectivamente. A banda fina com forte intensidade no v C=O, foi observada em 1734,0 cm^{-1,} que pode ser contribuição tanto da carbonila do éster, quanto do ácido carboxílico, visto que ambos os grupos geram bandas no espectro muito próximos a mesma faixa, sendo para v C=O de ésteres na faixa de 1750 a 1735 cm⁻¹ e para v C=O de ácidos carboxílicos entre 1730 e1700 com⁻¹ (Barbosa et al., 2007). A bandas de vibração do v C-O (éster) foram observadas em 1172,0 cm⁻¹. Por fim, as bandas referentes às vibrações do anel esterol, foram observadas em 954,0 cm⁻¹ e 840,0 cm⁻¹.

5.1.1.2 Espectro de RMN de ¹H e de ¹³C e, FTIR do conjugado Col-PEO₁₀₀₀

i) RMN de ¹H do conjugado Col-PEO₁₀₀₀.

O espectro de RMN de ¹H do conjugado Col-PEO₁₀₀₀ está apresentado na Figura 21, e as principais multiplicidades e atribuições que confirmam o produto obtido, constam na tabela 2.



Figura 21 : Espectro de RMN de ¹H do conjugado colesterol-PEO₁₀₀₀ (Col-PEO₁₀₀₀), em CDCl₃.

Singleto	Dupleto	Multipleto
0,66 (3H)	2,27-2,29 (2H)	1,58 (4H)
5,33 (1H)		2,59-2,63 (4H)
		3,56-3,70 (m, H, CH ₂ O-repetição de unidades de
		PEO)
		4,13-4,24 (2H, CH ₂ PEO)

Tabela 2: Multiplicidades referente ao deslocamento químicos (δ) dos sinais de RMN de ¹H e, dados de integrais do conjugado colesterol-PEO₁₀₀₀ (Col-PEO₁₀₀₀), em ppm.

A partir do espectro de RMN de ¹H foram analisados os principais sinais de deslocamentos químicos do colesterol-PEO₁₀₀₀ e, foram atribuídas conforme a Figura 21.

Após a inserção de PEO na molécula, foi observado um pequeno desvio químico nos sinais dos δ anteriormente analisados para valores menores. Após a inserir PEO na molécula, foram observados os singletos em 0,66 ppm (referente ao grupo metilo, Figura 21 (**a**)) e 5,33 ppm (referente ao hidrogênio do carbono vinílico, Figura 21 (**d**)).

O dupleto no δ em 2,27 ppm e 2,29 ppm correspondentes aos hidrogênios do carbono adjacente vinílico na Figura 21 (e) e (c), respectivamente.

Na Figura 21 foram observados os multipletos em 1,54 ppm (Figura 21 (j)).

O δ em 2,59 ppm é referente ao sinal próximo a carbonila do éster que tem a influência dos ciclos que formam a molécula de colesterol (Figura 21 (**f**)), enquanto que o δ em 2,63 ppm tem a influência da carbonila da ligação éster formada, que conforme mencionado anteriormente, foi atribuída a influência da carbonila do ácido carboxílico (Figura 21 (**l**)).

As unidades de repetições das ligações que compõem PEO, ou seja, CH₂-O (Figura 21 (m)), foram observadas no multipleto no δ em 3,56-3,70 ppm (Van Hove et al., 2013).

O δ em 4,22 ppm, indicou a ligação de CH₂ do PEO na molécula, sendo este sinal também característico de repetições de PEO (Van Hove et al., 2013).

ii) RMN de 13 C do conjugado Col-PEO₁₀₀₀.

O espectro de RMN de ¹³C do conjugado Col-PEO₁₀₀₀ está apresentado na Figura 22.



Figura 22: Espectro de RMN de ¹³C do colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), em CDCl₃

O espectro de RMN de ¹³C foi analisado de forma a confirmar a obtenção do conjugado Col-PEO₁₀₀₀, através dos principais δ , em ppm.

O sinal do carbono vinílico foi observado no δ em 122,67 ppm (Maria et al., 2009) (Figura 22 (**a**)). A principal atribuição que indicou a formação do hemisuccinato colesteril está no δ em 77,41 ppm, referente a ligação C-O do éster formado (Figura 22 (**b**)), assim como o pico de carbonila deste grupo (Maria et al., 2009) foi observado no δ em 171,64 ppm na Figura 22 (**c**)). Em 172,38 ppm o sinal referente a esterificação de PEO na molécula (Figura 22 (**d**)), o que justifica a proximidade entre este sinal e o sinal no δ em 171,64 ppm (Figura 22 (**c**)). Além disto, a ausência do sinal no δ em 177,63 ppm que foi atribuído a formação do ácido do hemisuccinato colesteril,

ratificou a ligação de PEO no mesmo, formando a ligação éster, portanto, o conjugado Col-PEO₁₀₀₀.

iii) FTIR do conjugado Col-PEO₁₀₀₀.

O espectro de FTIR do conjugado Col-PEO₁₀₀₀ está apresentado na Figura 23.

Figura 24: Espectro de FTIR do conjugado colesterol-PEO₁₀₀₀ (Col-PEO₁₀₀₀).



A partir do espectro de FTIR (Figura 23) foram observadas as principais bandas dos componentes (Sethupathy et al., 2014; Vyas et al., 2010; Vyas & Joshi 2013) que constituem o conjugado Col-PEO₁₀₀₀. Com a inclusão do PEO no hemisuccinato colesteril, foi observado o deslocamento do número de onda referente aos v_{as} CH de alifáticos, que foi de 2949,0 para 2915,0 cm⁻¹. O deslocamento para um número de onda menor, assim como o aumento da intensidade do pico do v_{as} CH, indicou a integração de PEO na molécula (Porjazoska et al., 2004). O v_s CH de alifáticos foram observados em 2871,0 cm⁻¹. A banda do v OH do álcool foi verificado em 3430,0 cm⁻¹. As vibrações de deformação em balanço dentro do plano "*rocking*", de CH em 1468,0, 1455, 1300 e 1347,0 cm⁻¹, foram atribuídas ao PEO. O v C=O de éster foi observado nas bandas

em 1734,0 cm⁻¹ e 1643,0 cm⁻¹. A banda característica de PEO, v COC, foi verificada em 1100,0 cm⁻¹, enquanto que a deformação em balanço fora do plano "*wagging*" do CH, também característica de PEO, foi verificada em 1248,0 cm⁻¹. A banda de vibração do v C-O (éster), foi observada em 1032,0 cm⁻¹. As bandas vibracionais de v do anel esterol, foram observadas em 954,0 cm⁻¹ e 840,0 cm⁻¹.

5.1.1.3 Espectro de RMN de ¹H e de ¹³C e, FTIR do Col-PEO-Trip

i) RMN de ¹H do Col-PEO-Trip.

O espectro de RMN de ¹H do Col-PEO-Trip está apresentado na Figura 24, e as principais multiplicidades e atribuições que confirmam o produto obtido, constam na tabela 3.





Singleto	Dupleto	Multipleto
0,66 (3H)	2,31-2,33 (2H)	1.57
5,29 (1H, Trip)		2.60-2.63 (4H)
5,35 (1H)		3.44-3.46 (2H, Trip)
		3,57-3,80 (H, CH ₂ O- de PEO)
		4,13-4,24 (2H, CH ₂ PEO)
		7,29-7,80 (5H Trip)

Tabela 3: Multiplicidades referente ao deslocamento químicos (δ) dos sinais de RMN de ¹H e, dados de integral do colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), em ppm.

A partir do espectro de RMN de ¹H foram analisados os principais sinais de δ do Col-PEO-Trip e, foram atribuídas conforme a Figura 24.

A integração do Trip na molécula polimérica contribuiu, entre outros fatores, para os pequenos desvios químicos que estão mencionados a seguir, proveniente dos δ de RMN ¹H que foram observados anteriormente das moléculas de hemisuccinato colesteril e Col-PEO₁₀₀₀.

Além dos sinlgetos já observados em 0,66 ppm (referente ao grupo metilo, Figura 24 (**a**)) e, em 5,35 ppm (referente ao hidrogênio do carbono vinílico (Figuras 24 (**d**)), o sinal no δ em 5,29 ppm referente ao hidrogênio do anel pirrol, isto é, C-NH de integração de 1 hidrogênio (Figura 24 (**o**)). Também, já mencionados, o dupleto no δ em 2,31 ppm e 2,33 ppm, correspondentes aos hidrogênios do carbono adjacente vinílico, na figura 24 (**e**) e (**c**); o multipleto no δ em 1,58 ppm (Figura 24 (**j**)), os multipleto em 2,60 ppm (Figura 24 (**f**)) e em 2,63 (Figura 24 (**l**)). E, ainda, os multipletos referente as unidades de repetições de PEO ((CH₂-O)₂₂), que foram observadas no δ em 3,57-3,80 ppm e no δ em 4,13-4,24 ppm, que indicou a ligação de CH₂ do PEO na molécula (repetições de PEO) (Van Hove et al., 2013). Todos estes sinais de δ foram mencionados anteriormente nas análises de RMN de ¹H das moléculas hemisuccinato colesteril e Col-PEO₁₀₀₀, com exceção do sinal do δ da ligação C-NH, proveniente da adição do Trip no polímero.

Foi observado o multipleto no δ em 3.44 - 3.46 ppm, típico do núcleo de hidrogênio que faz ligação com o C-NH₂ (Figura 24 (**n**)). Outros sinais característicos do aa foram observados,

como os referentes ao anel pirrol do Trip, o multipleto no δ em 7,29 - 7,80 ppm, sendo nos δ em 7,80 ppm, 7,79 ppm, 7,34 ppm, e 7,29 ppm, na posição **s**, **p**, **r** e **q** na Figura 24, respectivamente.

ii) RMN de ¹³C do Col-PEO-Trip.

O espectro de RMN de ¹³C do Col-PEO-Trip está apresentado na Figura 25.



Figura 25: Espectro de RMN de ¹³C do colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), em CDCl₃.

O espectro de RMN de ¹³C foi analisado de forma a confirmar a obtenção do polímero *Rod*-*Coil-Rod*, o Col-PEO-Trip, através dos principais δ , em ppm.

O sinal do carbono vinílico foi observado no δ em 122,63 ppm (Maria et al., 2009) (Figura 25 (**a**)). A principal atribuição que indicou a formação do hemisuccinato colesteril está no δ em 77,43 ppm, referente a ligação C-O do éster formado (Figura 25 (**b**)), assim como o pico de carbonila deste grupo, foi observado no δ em 171,69 ppm (Maria et al., 2009) na Figura 25 (**c**)), em 171,82 ppm o sinal referente esterificação de PEO na molécula (Figura 25 (**d**)) e, no δ em 174,74 ppm o sinal referente a carbonila, Figura 25 (**f**), o mais desblindado em relação aos outros,

por ter influência da proximidade do anel pirrol. Este último δ (Figura 25 (**f**)), indicou a inclusão do Trip no polímero, por esterificação, para a formação do Col-PEO-Trip. O carbono na posição **m** do anel pirrol na Figura 25, foi observado no δ em 132,98 ppm, enquanto que o carbono na posição **g** do anel pirrol na mesma figura, foi observado no δ em 139, 55 ppm, por ter influência da ligação NH, encontra-se mais desblindado quando comparado ao δ anterior (Moura et al., 2011).

Os δ característicos do anel aromático que compõem o anel pirrol do aa (Moura et al., 2011) foram observados em 122,63 ppm, 126,03 ppm, 127,95 ppm, 129,82 ppm, 132,98 ppm e 139,55 ppm na posição **h**, **l**, **i**, **j m**, e **g** na Figura 25, respectivamente.

iii) FTIR do Col-PEO-Trip.

O espectro de FTIR do Col-PEO-Trip está apresentado na Figura 26.





A partir do espectro de FTIR (Figura 26) foi observado, através das principais bandas dos componentes (Ayodhya et al., 2015; Sethupathy et al., 2014; Vyas et al., 2010; Vyas & Joshi 2013), a obtenção do novo polímero Col-PEO-Trip. O número de onda do v_{as} CH de alifáticos, após a adição do Trip no conjugado Col-PEO₁₀₀₀, foi observado em 2932,0 cm⁻¹ e o v_s C-H em 2866 cm⁻¹. Embora ocorra uma sobreposição nas regiões de N-H (faixa de absorção de 3.500 –

 3300 cm^{-1}) e O-H (faixa de absorção de $3650 - 3200 \text{ cm}^{-1}$) (Barbosa, 2007), o pico largo em $3512,0 \text{ cm}^{-1}$ foi atribuído a inclusão do Trip no Conjugado-Col-PEO₁₀₀₀, via esterificação no grupo OH, visto o aumento de sua intensidade. E, também, como resultado da formação do polímero, foi notado a ausência do pico referente a ligação OH em 2561,0 cm⁻¹, característico do ácido do Trip (Ayodhya et al., 2015). Ainda foram observados os v de bandas de CN do pirrol, de arilaminas, e v de bandas de CH do anel aromático do Trip em 942 cm⁻¹ e 770 cm⁻¹, respectivamente.

Ainda podem ser vistas no espectro uma banda em 1051,20 cm⁻¹, atribuída à uma deformação bending (δ) do grupo NH₃⁺, e a outra em 1452,40 cm⁻¹, referido a δ_s NH₃⁺ (Haque 2017; Cao & Fischer, 1999).

5.2 Polímeros Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc

Conforme mencionado na seção 4.2.1.2 os polímeros Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc foram sintetizados pela equipe de trabalho do LAPPA (UNESC) em Criciúma e, foram gentilmente fornecidos pelo Professor Alexandre Dal-Bó. Os polímeros constam na figura 27 (a) o Col-PEO-Gal em coloração marron clara e (b) o Col-PEO-GlicNAc em coloração marrom escura.

Figura 27: Polímeros: colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) (a) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNac) (b).





5.3 Caracterização da interação molecular em lipossomos

Os resultados referentes as técnicas espectroscópicas estão abordadas da seguinte forma neste manuscrito: primeiramente, os referentes ao sistema controle (Figura 28 (a)) e, ao sistema

lipossomal contendo Aso+Col-PEO-Trip (Figura 28 (b)). Posteriormente, estão descritos o sistema controle e os sistemas lipossomais Aso+Col-PEO-Gal e Aso+Col-PEO-GlicNAc (Figura 28 (c) e (d), respectivamente). Ao final da segunda seção, estão descritas considerações entre os dois modelos de membrana contendo o polímero Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc, visto que estes se diferem somente na porção glicídica.

Figura 28: Sistemas lipossomais de: Asolecitina de Soja (Aso), sistema controle (a), colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip) (b), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) (c) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNac) (d).



5.3.1 Análises de HATR-FTIR

Foram realizadas análises de HATR-FTIR dos sistemas Aso+Col-PEO-Trip, Aso+Col-PEO-Gal e o Aso+Col-PEO-GlicNAc. Foram calculadas, a partir dos espectros, as variações dos números de onda e larguras dos principais picos referentes aos v dos grupos lipídicos que compõem a membrana: v_{as} CH₂; v_s CH₂; v C=O, v COC, v_{as} PO₂⁻ e v_{as} N⁺(CH₃)₃. As atribuições referentes a estes grupos, bem como os valores das variações citadas anteriormente, estão em anexo (seção 8).

5.3.1.1 HATR-FTIR: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Trip

Os espectros de HATR-FTIR do polímero Col-PEO-Trip e dos lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Trip, estão demonstrados na Figura 29. Na Figura 30, é possível observar as variações de número de onda e largura de bandas de grupos específicos dos lipossomos de Aso, que foram ocorridas pela inserção de Col-PEO-Trip.





Figura 30: Efeito do colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip) no número de onda e na variação da largura de banda de grupos específicos de lipossomos de asolecitina de soja (Aso). As variações foram calculadas a partir dos espectros mostrados na Figura 29 e dos valores listados na Tabela 10, em anexo na seção 8.2.1.



No espectro dos lipossomos de Aso+Col-PEO-Trip (Figura 29), foram verificadas duas bandas de absorção do Trip (grupo amino), que indicam a protonação do aa, uma banda em 1051,20 cm⁻¹, atribuída à uma deformação bending (δ) do grupo NH₃⁺, e a outra em 1452,40 cm⁻¹, referido a δ_s NH₃⁺ (Haque 2017; Cao & Fischer, 1999). A avaliação realizada sugere interações entre a membrana e o Col-PEO-Trip que serão abordadas ainda nesta seção.

A inserção de Col-PEO-Trip nos lipossomos de Aso promoveu um deslocamento significativo no número de onda do v_{as} CH₂ do lipídio para valores mais baixos, de 2983,88 cm⁻¹ para 2958,80 cm⁻¹, uma variação de 25,08 cm⁻¹. Isto sugere que o polímero Col-PEO-Trip, induziu um arranjo mais empacotado na região hidrofóbica do lipossomo de Aso, como consequência do aumento do número de metilenos em conformação *trans* (Lewis & McElhaney 1998; Mannock et al., 2010; Vilcheze et al., 1996; Casal et al., 1980). Considerando os estudos de Nagle (1980), pode ser sugerido que o Col-PEO-Trip induziu um arranjo paralelo aos metilenos de Aso, que são estabilizados por interações de van der Waals. A variação na largura de banda do v_{as} CH₂ lipídico, (Figura 31) promovido pelo Col-PEO-Trip, indicou uma redução equivalente a 4,83 cm⁻¹ no parâmetro, que propõe uma restrição no movimento da região hidrofóbica lipídica (referencia), fato que reforça os resultados observados quanto ao número de onda do v_{as} CH₂. Já na análise de v_s CH₂, não foi possível obter dados conclusivos sobre a variação do seu número de onda e, tampouco foram observadas variações da largura de banda. Como a banda referente ao v_{as} CH₂ é

a mais sensível a variações relacionadas à isomerização *trans-gauche* e à mobilidade dos grupos metilênicos, foram considerados os resultados referentes a este v para abordar o comportamento da região hidrofóbica da membrana.

Figura 31: Ampliação das bandas de absorção da região apolar do v_{as} CH₂ e v_s CH₂ do espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip).



O efeito induzido pelo Col-PEO-Trip, observado na região apolar de lipossomos de Aso, é atribuído a interações com a porção colesterol do polímero (Batista et al., 2007; Bhattacharya & Haldar 2000; Cannon et al., 2003; Ho et al., 1995; Kucerka et al., 2007; Sulkowski et al., 2005). De acordo com os estudos relatados por Chen e colaboradores (2008), é possível que a porção colesterol do polímero, esteja preferencialmente localizada entre as cadeias de metileno lipídico, em uma orientação paralela ao mesmo.

Na região de interface lipídica, a redução do número de onda referente a v C=O de 1691,57 cm⁻¹ para 1685,79 cm⁻¹, refletiu no aumento do grau de hidratação do grupo carbonila lipídico, após interação com o polímero (Chen et al., 2008; Moreno et al., 2009; Moreno et al., 2010). É possível que ambos os grupos, C=O lipídico e NH₃⁺ do polímero, estejam hidratados e, que a interação entre estes grupos ocorra por ligação de hidrogênio. O grupo carbonila presente na interface (assim como o grupo fosfato e colina), também pode interagir com o meio aquoso por meio de interações eletrostáticas e / ou ligações de hidrogênio (Moreno et al., 2009). Os grupos éster e/ou éter componentes do Col-PEO-Trip, podem ser influenciados também pelo grau de hidratação na formação das ligações de hidrogênio com o grupo carbonila lipídico.

A redução da mobilidade na região de interface (região do grupo carbonila, C=O), foi ratificada pela redução significativa da largura de banda de v C=O (Figura 32 (a)) em 21,38 cm⁻¹ (Arsov & Quaroni 2007). Ainda na interface, na porção COC, ocorreram interações significativas do polímero Col-PEO-Trip com a membrana, observadas pelo decréscimo do número de onda de 15,43 cm⁻¹, e pela redução da largura de banda de 19,99 cm⁻¹ (Figura 32 (b)).

Figura 32: Ampliação das bandas de absorção da região de interface dos v C=O (a) e v COC (b) do espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip).



Não foram observadas alterações no número de onda do $v_{as} PO_2^-$, sugerindo que o polímero não induziu variações no grau de hidratação do fosfato, localizado na região polar lipídica. No entanto, foi verificada uma redução na largura de banda do $v_{as} PO_2^-$ (Figura 33 (a)), de 18,62 cm⁻¹ para 5,51 cm⁻¹, equivalente a uma variação de 13,11 cm⁻¹. Avaliou-se que o Col-PEO-Trip gerou possivelmente, a restrição no movimento do fosfato lipídico, por interações eletrostática entre o NH₃⁺ do polímero e o fosfato lipídico.

Com relação ao efeito do Col-PEO-Trip no grupo colina da membrana, também localizado na região polar lipídica, o polímero diminuiu o número de onda da banda do $v_{as} N^+(CH_3)_3$ de 993,34 cm⁻¹ para 964,41 cm⁻¹, causando uma variação de 28,93 cm⁻¹. O resultado indica que o polímero promoveu mudanças conformacionais no grupo colina por interações com moléculas de água, ou por mudanças nas forças de atração dipolar com o grupo fosfato lipídico mais próximo (Moreno et al., 2009; Popova & Hincha, 2011). O Col-PEO-Trip também reduziu a largura da banda do grupo colina (Figura 33 (b)) em 7,59 cm⁻¹. É importante ressaltar que estas forças de atração têm

uma forte influência na orientação do grupo polar, a partir do plano da bicamada lipídica (Cheng et al., 2015; Disalvo & Bouchet, 2014, Schaffazick et al., 2003).

Figura 33: Ampliação das bandas de absorção da região polar dos $v_{as} PO_2^-$ (a) e $v_{as} N^+(CH_3)_3$ (b) do espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip).



Considerando a extensão do efeito do Col-PEO-Trip nas regiões específicas dos lipossomos de Aso, observou-se que todas as regiões lipídicas foram influenciadas pelo polímero. Uma representação das interações supracitadas está demonstrada na Figura 34.

A região interfacial do sistema lipossomal mostrou uma interação mais forte com o polímero Col-PEO-Trip, seguida pela região do fosfato e metileno lipídico. Todos os grupos de lipídeos reduziram a sua liberdade de movimento após interagir com o polímero. Variações importantes provocadas pelo polímero estão também associadas ao aumento da conformação *trans* nas cadeias de metileno, bem como as alterações nas interações dipolares do grupo colina lipídica.

Figura 34: Representação estrutural da influência do colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip) nos fosfolipídios da membrana lipossomal de asolecitina de soja (Aso), observadas por análises de HATR-FTIR.



5.3.1.2 HATR-FTIR: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Gal

Os espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Gal, estão demonstrados na Figura 35. Na Figura 36 é possível observar as variações quanto ao número de onda e largura de bandas de grupos específicos dos lipossomos, que foram causadas pela interação com Col-PEO-Gal.



Figura 35: Espectros de HATR-FTIR: lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal).

Figura 36: Efeito do colesterol-PEO₁₀₀₀-galactose (Col-PEO-Gal) no número de onda e na variação da largura de banda relacionados aos grupos específicos de lipossomos de asolecitina de soja (Aso). As variações foram calculadas a partir dos espectros mostrados na Figura 35 e dos valores listados na Tabela 11, em anexo na seção 8.2.2.



A inserção do Col-PEO-Gal nos lipossomos de Aso, promoveu um deslocamento no número de onda do v_{as} CH₂ lipídicos para valores mais baixos, de 2983,88 cm⁻¹ para 2945,30 cm⁻¹, uma variação significativa de 38,58 cm⁻¹. O resultado sugere que os metilenos (presentes na região hidrofóbica) do lipídio, estão majoritariamente em uma conformação *trans*, em um estado menos fluido (Lewis & McElhaney 1998; Mannock et al., 2010; Vilcheze et al., 1996; Casal et al.,

1980). A redução na largura de banda do v_{as} CH₂ lipídico (Figura 37), também provocada pelo polímero, foi equivalente a 4,83 cm⁻¹ e indicou restrições no movimento da região apolar da membrana. Assim como para o sistema lipossomal composto pelo polímero Col-PEO-Trip, a análise de variação de número de onda do v_s CH₂ dos lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal, não forneceu informações precisas ou conclusivas sobre o comportamento do grupo metileno.

Figura 37: Ampliação das bandas de absorção da região apolar do v_{as} CH₂ e v_s CH₂ do espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal).



A restrição na região apolar pode ser atribuída, mais especificamente, a porção colesterol do Col-PEO-Gal (Batista et al., 2007; Bhattacharya & Haldar 2000; Cannon et al., 2003; Ho et al, 1995; Kucerka et al., 2007; Sulkowski et al., 2005), tal como foi descrito para a interação de Col-PEO-Trip em Aso.

Para a banda do v C=O, referente à carbonila presente na região de interface dos lipossomos de Aso, a inserção de Col-PEO-Gal na membrana diminuiu o seu número de onda de 1691,57 cm⁻¹ para 1687,71 cm⁻¹. A redução deste valor sugere um aumento no grau de hidratação do grupo carbonila, que remete a um aumento da interação entre tal porção lipídica e o meio aquoso (Chen & Tripp 2008; Lewis & McElhaney 1998; Vilcheze et al., 1996). A sensibilidade à hidratação na região de interface, pode influenciar na formação de ligações de hidrogênio entre a carbonila lipídica e o nitrogênio do heterocíclico, assim como com os grupos éster e/ou éter presentes no polímero. O Col-PEO-Gal diminuiu o valor da largura de banda do v C=O da membrana lipídica

(Figura 38 (a)) em 6,9 cm⁻¹ (de 27,58 para 20,68 cm⁻¹). Ainda na região de interface, no v COC, houve uma variação no deslocamento do número de onda, de 23,14 cm⁻¹ (de 1095,57 cm⁻¹ para 1118, 71 cm⁻¹) e redução na largura de banda de 8,96 cm⁻¹ (Figura 38 (b)).

Figura 38: Ampliação das bandas de absorção da região de interface dos v C=O (a) e v COC (b) do espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal).



Os resultados refletem em uma interação entre o polímero e a membrana lipídica nesta região de interface, de forma a torná-la menos fluida (Mannock et al., 2010).

Na região polar lipídica, o Col-PEO-Gal promoveu variações no grau de hidratação do fosfato lipídico, de modo a aumentar as interações entre o grupo fosfato e o meio aquoso. Isto é resultado decorrente da variação do deslocamento do número de onda do v_{as} PO₂⁻ para valores menores, de 1222,87 cm⁻¹ para 1217,08 cm⁻¹ (redução de 5,79 cm⁻¹), após inserção do polímero. A presença de um pequeno ombro em número de onda mais baixo que o v_{as} PO₂⁻ (em 1237 cm⁻¹), sugere interações entre o grupo fosfato de um lipídio, e o grupo colina de um outro lipídio mais próximo, por ligação de hidrogênio, ou interações entre o fosfato com o Col-PEO-Gal por ligação de hidrogênio (Cieslik-Boczula et al 2009). Quanto ao decréscimo observado na largura de banda do v_{as} PO₂⁻ lipídico (Figura 39 (a)), de 18,62 cm⁻¹ para 14,48 cm⁻¹, decorrência do que pode ser o reflexo do aumento do grau de hidratação deste grupo.

Ainda considerando a região polar lipídica, o efeito do Col-PEO-Gal no grupo colina da membrana lipídica, consistiu em diminuir o número de onda da banda do $v_{as} N^+(CH_3)_3$ de 993,34 cm⁻¹ para 974,05 cm⁻¹ (variação de 19,29 cm⁻¹). Essa variação, provocada pelo polímero, indicou

que houveram interações entre o grupo colina e o grupo fosfato mais próximo, por atração dipolar, ou interações entre o grupo colina com moléculas de água (Moreno et al., 2009; Popova & Hincha, 2011). Como citado anteriormente, estas interações podem promover mudanças conformacionais na orientação do grupo polar, a partir do plano da bicamada lipídica (Cheng et al., 2015; Disalvo & Bouchet, 2014, Schaffazick et al., 2003). O Col-PEO-Gal pode também formar interações entre a hidroxila da sua porção glicídica e o grupo colina lipídico (Micheletto et al., 2015). Não foram observadas variações na largura da banda do v_{as} N⁺(CH₃)₃ (Figura 39 (b)) geradas pelo Col-PEO-Gal.

Figura 39: Ampliação das bandas de absorção da região polar dos $v_{as} PO_2^{-}(a) e v_{as} N^+(CH_3)_3$ (b) do espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal).



Tendo em vista as análises sobre a interação do polímero Col-PEO-Gal nas regiões específicas dos lipossomos de Aso observou-se, de forma geral que, o polímero interagiu em todas as regiões especificas da membrana lipossomal. Os efeitos mais pronunciados foram referentes quanto ao aumento da conformação *trans* nas cadeias de metilenos. Na figura 40 consta uma representação das interações mencionada anteriormente.

Figura 40:Representação estrutural da influência do colesterol-PEO₁₀₀₀-galactose (Col-PEO-Gal) nos fosfolipídios da membrana lipossomal de asolecitina de soja (Aso), por análises de HATR-FTIR.



5.3.1.3 HATR-FTIR: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-GlicNAc

Os espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-GlicNAc, estão demonstrados na Figura 41. Na Figura 42 é possível observar as variações, quanto ao número de onda e largura de bandas de grupos específicos dos lipossomos, que foram provocadas pelo Col-PEO-GlicNAc.

Figura 41: Espectros de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul, as referente aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).



Figura 42: Efeito do colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) no número de onda e na variação da largura de banda relacionados aos grupos específicos de lipossomos de asolecitina de soja (Aso). As variações foram calculadas a partir dos espectros mostrados na Figura 41 e dos valores listados na Tabela 12, em anexo na seção 8.2.3.



Como resultado da adição do Col-PEO-GlicNAc nos lipossomos de Aso, foram verificados desdobramentos de picos do v CH₂ em 2991,59, 2953,02, 2910,58 e 2868,15 cm⁻¹, formando uma

única banda larga. O efeito sucedido inviabilizou a obtenção dos dados referentes ao efeito do polímero no número de onda e, tampouco na largura das bandas referentes a v_{as} CH₂ e v_s CH₂ (Figura 43).

Figura 43: Ampliação das bandas do v CH_2 no espectro de HATR-FTIR. Em vermelho, as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul, as referente aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).



Na região de interface dos lipossomos de Aso, houve um decréscimo no número de onda do v C=O de 1691,57 cm⁻¹ para 1681,93 cm⁻¹, a partir da adição do Col-PEO-GlicNac. A análise sugere um aumento no grau de hidratação do grupo carbonila (Chen & Tripp 2008; Lewis & McElhaney 1998; Vilcheze et al., 1996), o que pode influenciar na formação de ligações de hidrogênio entre o grupo carbonila lipídico e o nitrogênio do heterocíclico, ou ainda com os grupos éster e/ou éter presentes no polímero. Isto também foi observado para os lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal. A inserção do Col-PEO-GlicNAc promoveu redução da largura de banda do v C=O (Figura 44 (a)), em 6,9 cm⁻¹ (de 27,58 para 20,68 cm⁻¹). O resultado observado indica a redução da fluidez na região de interface lipídica, provocada pelo polímero.

No que se refere ao v COC, grupo éster presente na região de interface lipídica, ocorreu variação no número de onda da banda deste estiramento, reduzido em 40,15 cm⁻¹ (de 1095,57 cm⁻¹ para 1055,42 cm⁻¹) e também aumento na largura desta banda (Figura 44 (b)) em 4,14 cm⁻¹ (de 23,44 cm⁻¹ para 27,58 cm⁻¹), após a inserção do polímero.

Figura 44: Ampliação das bandas de absorção dos v C=O (a) e v COC (b) no espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).



Analisando-se os efeitos no grupo fosfato, presente na região polar lipídica, não foi identificada variação no número de onda do v_{as} PO₂⁻, promovido pelo Col-PEO-GlicNAc nos lipossomos de Aso. Logo, não houveram variações no grau de hidratação deste grupo lipídio. Entretanto, houve uma redução na largura desta banda de 4,14 cm⁻¹ (de 23,44 cm⁻¹ para 27,58 cm⁻¹) (Figura 45 (a)), que sugeriu menor fluidez nesta região. Sendo assim, a redução da mobilidade da região polar ocorreu por prováveis interações entre a membrana lipídica e o polímero, mais especificamente, entre o grupo fosfato e o grupo n-acetil da porção glicídica GlicNAc (Micheletto et al., 2015).

O efeito do Col-PEO-GlicNAc no grupo colina, integrante da região polar lipídica, consistiu em reduzir o número de onda da banda do $v_{as} N^+(CH_3)_3$ de 993,34 cm⁻¹ para 964,41 cm⁻¹ (variação de 28,93 cm⁻¹). Assim sendo, o polímero propiciou interações entre o grupo colina com o grupo fosfato lipídico mais próximo, por atração dipolar, ou interações entre o grupo colina com moléculas de água (Moreno et al., 2009; Popova & Hincha, 2011). Outra possibilidade de contribuição promovida pelo Col-PEO-GlicNAc na membrana lipídica, que justificam a redução no número de onda supracitado, são as interações entre a hidroxila da porção glicídica e o grupo colina lipídico (Micheletto et al., 2015). Não houveram variações significativas na largura da banda do $v_{as} N^+(CH_3)_3$ (Figura 45 (b)), causadas pelo polímero.

Figura 25: Ampliação das bandas de absorção do $v_{as} PO_2^-$ (a) e $v_{as} N^+(CH_3)_3$ (b) do espectro de HATR-FTIR. Em vermelho as bandas de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e, em azul as, referentes aos lipossomos de Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).



Tendo em vista as análises sobre a colaboração do polímero Col-PEO-GlicNAc nas regiões específicas dos lipossomos de Aso, observou-se, de forma geral que, o polímero interagiu em todas as regiões especificas da membrana lipossomal. Os efeitos mais pronunciados do polímero ocorreram na região de interface e polar lipídica, tornando-as menos fluida, ou mais restrita em termos de movimentos moleculares. A representação destas interações descritas está demonstrada na Figura 46.

Figura 46: Representação estrutural da influência do colesterol-PEO₁₀₀₀-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) nos fosfolipídios da membrana lipossomal, por análises de HATR-FTIR.



Ao variar e comparar a porção glicídica nos polímeros, referentes a Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc, infere-se a partir dos dados supracitados que:

- (i) Uma comparação em nível de região hidrofóbica lipídica não foi possível via HATR-FTIR, visto que o sistema lipossomal de Aso+Col-PEO-GlicNAc, na região apolar, apresentou desdobramentos de picos do v CH₂, formando uma única banda larga de absorção, tornando inviável a interpretação dos dados dos v_{as} e v_s de CH₂, para estudos da fluidez desta região, por variação de deslocamento de número de onda e largura.
- (ii) Na interface lipídica, ambos os polímeros ordenaram o grupo carbonila, aumentando seu grau de hidratação. Os resultados no sistema Aso+Col-PEO-GlicNAc indicaram maior grau de interação com a membrana.

(iii) Na região polar, os lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal aumentaram o grau de hidratação do grupo fosfato e, contribuíram favorecendo as comunicações intermoleculares entre o grupo colina e fosfato próximos, ou entre o grupo colina e o meio aquoso. Ao comparar com a região polar dos lipossomos de Aso+Col-PEO-GlicNAc, foram observadas as mesmas contribuições no que tange o grupo fosfato, exceto quanto ao grau de hidratação, no qual não foram observadas variações causadas pelo polímero.

Portanto, ambos os sistemas influenciaram todas as regiões, sendo os efeitos mais pronunciados os causados por Col-PEO-GlicNAc nos lipossomos de Aso. O resultado pode ser decorrente das interações do grupo n-acetil na posição do carbono 2, que difere a porção GlicNAc da porção Gal, que propiciou mais interações entre o polímero e a membrana lipossomal, tais como as dipolares e ligações de hidrogênio.

As interações representadas esquematicamente de acordo com o estudo da técnica de HATR-FTIR (Figuras 34, 40 e 46), podem ser alteradas se adicionado ao sistema uma substância exógena (Soppimath et al., 2011). Os polímeros como sítio de reconhecimento, por exemplo, de uma substância exógena como um fármaco, adicionado aos lipossomos, modificam as forças de interação do sistema como um todo, influenciando assim suas atrações/repulsões. Consequentemente, conduzem à um aumento na afinidade entre substâncias ou não, que irá influenciar nas respostas das análises, portanto, na farmacocinética e na farmacodinâmica.

5.3.2 Análises de RMN de ¹H

As curvas de recuperação do sinal do FID de ¹H, relacionadas aos hidrogênios da colina lipídica (N⁺(CH₃)₃; 3,2 ppm) estão apresentadas nas Figuras 47 e 48. A partir destas curvas, os valores de T₁ foram calculados e estão demonstrados na Tabela 4.

Figura 47: Recuperação dos sinais de RMN ¹H (de FID) da colina em lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip).



Tabela 4: Valores de T₁ dos hidrogênios da colina presentes nos lipossomos de: asolecitina de soja (Aso), Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip), Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).

Lipossomos	$T_1(s)$	$\Delta T_1(s)$	$\Delta T_1(\%)$
Aso	0,178	-	-
Aso+Col-PEO-Trip	0,156	0,022	12,36
Aso+Col-PEO-Gal	0,168	0,01	5,62
Aso+Col-PEO-GlicNAc	0,198	0,02	11,23

 T_l , tempo de relaxação longitudinal; Δ , variação; s, segundos; %, porcentagem.

A inserção de Col-PEO-Trip reduziu o valor de T₁ de ¹H da colina nos lipossomos de Aso em aproximadamente 12,36 % (de 0,178 s para 0,156 s) (Figura 47). Isto indica que o polímero aumentou a velocidade de rotação da colina lipídica (De Lima et al., 2010; Feigenson & Chan 1974; Levy & Peat 1978). A fluidez gerada pode favorecer a interação entre o grupo N⁺(CH₃)₃ lipídico e uma substância ativa. Micheletto e colaboradores (2015), adicionaram o polímero anfifílico N-acetil- β -D-glucosaminil-PEG₉₀₀-docosanato (C₂₂PEG₉₀₀GlcNAc) em lipossomos de Aso, e o valor de T_1 foi reduzido em cerca de 25%, deixando a colina lipídica mais móvel. Dando continuidade a estes estudos, Dos Santos e colaboradores (2016) inseriram lectina de *Bauhinia variegata* (BVL) ao sistema, composto de lipossomos de Aso e C_{22} PEG₉₀₀GlcNAc. A BVL é uma proteína com propriedades farmacológicas, que atua no reconhecimento celular (Lis et al., 1986; Sharon et al., 1993) (Pinto et al., 2005). No trabalho (Dos Santos et al., 2016), a BVL mostrou preferência de interação com a região mais externa da membrana, a polar e interface lipídica. O sistema lipídio-polímero mostrou-se promissor com a BVL, então outros tipos de lectinas poderão também ser testados, podendo auxiliar no reconhecimento de um tecido ou órgão especifico, pelo nanocarreador lipossomal.

Figura 48: Recuperação dos sinais de RMN de ¹H (de FID) da colina em lipossomo de: asolecitina de soja (Aso) e, contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).



O polímero Col-PEO-Gal nos lipossomos de Aso reduziu o valor de T_1 em 5,62 % (de 0,178 s para 0,168 s) (Figura 48), aumentou moderadamente o movimento de rotação do grupo colina da membrana lipídica (De Lima et al., 2010; Feigenson & Chan, 1974; Levy & Peat 1978).

Já o Col-PEO-GlicNAc, quando inserido nos lipossomos de Aso, aumentou o valor de T₁ em 11,23 % (de 0,178 s para 0,198 s) (Figura 48). Este acréscimo no T₁, promoveu uma redução do movimento de rotação do grupo colina maior e oposta que a promovida por Col-PEO-Gal e semelhante à causada por Col-PEO-Trip.

Ao comparar os sistemas lipossomais de Aso+Col-PEO-Gal e Aso+Col-PEO-GlicNAc, a variação da porção glicídica de Gal para GlicNAc, propiciou em efeitos opostos na fluidez de T₁. Enquanto o Col-PEO-Gal promoveu, de forma discreta, aumento na mobilidade do grupo colina; o Col-PEO-GlicNAc promoveu redução na mobilidade deste grupo nos lipossomos de Aso.

A preferência do posicionamento do grupo colesterol, constituinte do polímero, nas cadeias de hidrocarboneto dos lipossomos (conforme HATR-FTIR), pode favorecer a localização da região glicídica próxima a região polar das membranas lipídicas. Logo, uma das possíveis interações que pode ocorrer, é entre o grupo colina da membrana e a região glicídica do polímero, via interação dipolo-dipolo (Micheletto et al., 2015; Dos Santos et al., 2016) (Figura 49). A outra possível interação ainda na região polar lipídica é com o grupo fosfato, que será discutida na seção 5.3.3.

Figura 49: Ilustração dos polímeros *Rod-Coil-Rod* colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc), na interação preferencial do colesterol com os metilenos lipídico, favorecendo a interação da região polar dos fosfolipídios com a região glicídica do polímero. Representado em azul, o colesterol, em verde, o poli (óxido etileno) PEO e, em amarelo, o Trip ou anel triazol com as porções glicídicas (Gal e GlicNAc).



Os polímeros ao intervir na mobilidade do grupo colina, podem influenciar sobre a orientação deste grupo, posicionados mais acima ou abaixo da bicamada lipídica, o que reflete na

carga superficial da membrana (Fatouros et al., 2002). Os efeitos dos polímeros na carga superficial da membrana serão descritos na seção 5.3.4.

5.3.3 Análises de RMN de ³¹P

Para investigar a influência dos polímeros no movimento de rotação do grupo fosfato lipídico, os espectros de RMN de ³¹P (Figuras 50 e 51) foram obtidos e, a partir dos mesmos, foram calculadas as variações das larguras dos picos a 75% de sua altura. Os valores e variações de largura das bandas estão demonstrados na Tabela 5.

Figura 50: Espectro de RMN de ³¹ P- anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip).



Lipossomos	Largura dos δ (ppm)	Δ de largura dos δ	Δ de largura dos δ
		(ppm)	(%)
Aso	14,37	-	-
Aso+Col-PEO-Trip	60,80	46,46	76,41%
Aso+Col-PEO-Gal	3,17	11,2	22,05%
Aso+Col-PEO-GlicNAc	26,42	12,05	45,60%

Tabela 5: Valores das larguras dos picos de RMN de ³¹P, presente nos lipossomos de: asolecitina de soja (Aso), Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip), Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc), em ppm.

 δ , deslocamentos químicos; %, porcentagem.

O espectro dos lipossomos de Aso apresentado na Figura 50 demonstra um ombro em campo alto e um pico intenso em campo baixo, que é típico de uma fase H_{II} com movimento anisotrópico de lipídios (Pfeiffer et al., 2012; Sánchez et al., 2013). O espectro de lipossomos de Aso resultou em forma de linhas com assimetria reversa, em comparação com espectros típicos de bicamada lipídica. A adição do polímero Col-PEO-Trip no sistema lipossomal de Aso, preservou o estado de fase H_{II}. A intensidade observada no pico em campo baixo na RMN de ³¹P dos lipossomos de Aso (Figura 50), sugere um NOE que reflete na interação dipolo entre o grupo fosfato lipídico e hidrogênios do meio aquoso (Noggle & Schirmer, 1971; Seelig, 1978). A inserção de Col-PEO-Trip na membrana, promoveu uma redução (visível) na intensidade do pico, que sugere o enfraquecimento das interações dipolares entre o fosfato lipídico e o meio aquoso, bem como uma predominância de interações eletrostáticas entre grupos fosfato e grupos colina próximos. Esta pode ser a interação responsável pelas variações observadas nos parâmetros de HATR-FTIR, referente ao grupo colina (seção 5.3.1.1). A diminuição na intensidade do pico de campo baixo em espectros de RMN de ³¹P, também está relacionada a restrições do movimento dos núcleos (Seelig, 1978). A inserção do polímero, ampliou em 76,41% (de 14,37 ppm para 60,80 ppm, uma variação de 46,46 ppm) a largura do pico do espectro de RMN de ³¹P dos lipossomos de Aso (Figura 50). O resultado reforça a evidência para a restrição de rotação do grupo fosfato lipídico, promovido pelo polímero, uma vez que a largura da linha do pico do ³¹P está relacionada à CSA (Debouzy et al., 2002; Timoszy et al., 2004, Dufourc et al., 1992).
Figura 51: Espectro de RMN de ³¹ P- anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de: asolecitina de soja (Aso), Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).



A redução de intensidade do pico do espectro de RMN de ³¹P nos lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal (Figura 51), sugere também uma predominância de interações eletrostáticas (entre grupos fosfato e colina próximos) sobre as interações dipolares (entre os grupos fosfato e as moléculas de água). Quanto a análise da largura do pico de RMN de ³¹P deste sistema, foi reduzida cerca de 22,05% (de 14,37 ppm para 3,17 ppm, uma variação de 11,2 ppm), após inserção de Col-PEO-Gal. A contribuição do polímero Col-PEO-Gal nos lipossomos de Aso aponta para o aumento da rotação do grupo fosfato lipídico (Debouzy et al., 2002; Timoszy et al., 2004, Dufourc et al., 1992). Quando comparado ao controle, o polímero Col-PEO-Gal promoveu alteração na forma do espectro de RMN de ³¹P dos lipossomos de Aso, que apresentou um ombro em campo baixo e um pico em campo alto. O pico passou de tipicamente de fase H_{II} para a forma típica de estado de fase em L.

Em termos visuais, a variação da intensidade do pico no espectro de RMN ³¹P dos lipossomos de Aso+Col-PEO-GlicNAc, não foi avaliada, por influência do diâmetro dos lipossomos, cuja restrição é abordada e justificada na seção 5.3.5 (Noggle & Schirmer 1971; Seelig, 1978). Considerando a análise da largura de linha do espectro dos lipossomos de Aso, o polímero Col-PEO-GlicNAc aumentou em 45,60% (de 14,37 ppm para 26,42 ppm, uma variação

de 12,05 ppm) reduzindo a rotação do grupo fosfato lipídico (Figura 51) (Debouzy et al., 2002; Timoszy et al., 2004, Dufourc et al., 1992) e, por conseguinte, sua mobilidade.

Ao comparar os resultados referentes aos sistemas lipossomais de Aso+Col-PEO-Gal e Aso+Col-PEO-GlicNAc, no que tange à mobilidade dos fosfatos lipídicos, os polímeros forneceram efeitos opostos. Enquanto o Aso+Col-PEO-Gal apresenta um sistema com maior mobilidade rotacional para os grupos fosfato, predominâncias de interações eletrostáticas e estado de fase H_{II}, o Aso+Col-PEO-GlicNAc demonstra um sistema de menor mobilidade rotacional e estado de fase em L. Os resultados de RMN de ³¹P complementaram as análises de RMN de ¹H, visto que os grupos fosfato e colina, integram a região polar da membrana lipídica. Sendo assim, o Col-PEO-Gal tornou mais móvel a região polar da membrana, enquanto o Col-PEO-GicNAc, a tornou menos móvel. A investigação mostra a preferência do GlicNAc pela região polar, propiciando maiores interações do GlicNAc com o grupo colina e fosfato, ou seja, entre a hidroxila da porção glicídica e o grupo colina lipídico, conforme também observado pelas análises de HATR-FTIR. Com base nos dados obtidos de HATR-FTIR e RMN de ¹H, o posicionamento preferencial do colesterol, constituinte do polímero, nas cadeias de hidrocarboneto, favorece a localização dos glicídios próximos a região polar, favorecendo interações do tipo dipolo-dipolo (Micheletto et al., 2015) e, gerando redução na mobilidade nesta região.

5.3.4 Análises de potencial ζ

A técnica de potencial ζ permitiu avaliar as possíveis alterações na carga superficial dos lipossomos de Aso, ocorridas após interação de cada polímero com o sistema lipossomal. Na Tabela 6, os dados mostram o efeito da inserção de cada polímero na carga superficial dos lipossomos de Aso (Komatsu et al., 1999; Schaffzick et al., 2003).

Potencial ζ	$\Delta(\overline{x}, mV)$
$(\overline{X}, mV) D.P.$	
-54,92 ±3,06	
-46,02 ±2,20	8,9
$-22,67 \pm 0,87$	32,25
-42,12 ±1,07	12,8
	Potencial ζ (\overline{x} , mV) D.P. -54,92 ±3,06 -46,02 ±2,20 -22,67 ± 0,87 -42,12 ±1,07

Tabela 6: Influência dos polímeros colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc) quanto a distribuição de cargas na superfície de lipossomos de asolecitina de soja (Aso).

 \overline{X} , média aritmética; *D.P.*, desvio padrão; Δ , variação.

O potencial ζ dos lipossomos de Aso foi correspondente a -54,92 mV. Lipossomos fosfolipídicos, tais como os de Aso, apresentam um potencial negativo em sua superfície (Schaffzick et al., 2003). Após a inserção do Col-PEO-Trip, o potencial ζ alterou de -54,92 mV para -46,02 mV. A redução do potencial de superfície para valores mais positivos indicou uma reorientação do grupo colina em direção à superfície dos lipossomos (Dos Santos et al., 2016; Fatouros & Antimisiaris 2002). Os dados ratificam os resultados observados por RMN de ¹H, que indicaram o aumento da mobilidade rotacional na região polar (grupo colina) dos lipossomos de Aso+Col-PEO-Trip, e, portanto, orientou-se acima da bicamada lipídica. A fluidez do grupo colina lipídico, pode ter procedido em virtude do enfraquecimento das interações dipolares entre o grupo fosfato lipídico e o meio aquoso, o qual gerou a predominância de interações eletrostáticas entre grupos fosfato e grupos colina próximos, conforme os parâmetros investigados de HATR-FTIR, referente ao grupo colina (seção 5.3.1.1).

Como o sistema lipossomal de Aso+Col-PEO-Trip apresentou potencial ζ superior a -30 mV, foi considerado fisicamente estável, provavelmente devido à forte repulsão de cargas e, baixa tendência a aglomeração por colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (Wissing & Müller 2002; Mishra et al., 2009).

O Col-PEO-Gal inserido no sistema controle reduziu o potencial ζ de -54,92 mV para -22,67 mV, enquanto que o Col-PEO-GlicNAc reduziu o potencial ζ de -54,92 mV para -42,12 mV. O polímero com a porção glicídica Gal, teve maior capacidade em reduzir o potencial de superfície para valores mais positivos (variação em módulo de |32,25| mV), indicando um maior efeito da reorientação da colina em direção à superfície dos lipossomos, quando comparado à porção GlicNAc (variação em módulo de |12,8| mV). As análises de RMN de ¹H e de ³¹P, assim como as de HART-FTIR, ratificaram as análises de potencial ζ dos modelos em estudo. A RMN de ¹H indicou que os lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal, possui o grupo colina fluido, assim como o grupo fosfato (visto pela técnica de RMN de ³¹P), permitindo maior liberdade de movimento acima do plano da bicamada lipídica, propiciando o aumento da carga de superficial. Por outro lado, provavelmente mais abaixo da bicamada lipídica que o no sistema Aso+Col-PEO-Gal, o grupo colina dos lipossomos de Aso+Col-PEO-GlicNAc estão menos fluidos, por interações entre o grupo fosfato e o grupo colina próximos, conforme as análises de RMN de ¹H e de³¹P. Como já informado, os polímeros Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc se diferem na porção glicídica. Os glicídios são formados por um anel piranosídico com 6 átomos de carbono, sendo que na porção Gal, uma hidroxila é ligada a cada átomos de carbono; enquanto na porção GlicNAc, a posição do carbono 2 do anel, é ligado ao grupo n-acetil e os demais átomos de carbono do anel, são ligados a uma hidroxila. Como o grupo n-acetil é mais volumoso, a interação entre a região glicídica do Col-PEO-GlicNAc com a região polar da membrana de Aso, pode ser um fator relevante na mobilidade rotacional do grupo colina, e mais especificamente, nas interações entre o grupo nacetil da porção glicídica GlicNAc e o grupo fosfato lipídico (Micheletto et al., 2015). Além das interações entre a hidroxila da porção glicídica e o grupo colina lipídico (Micheletto et al., 2015), conforme observado nas análises de HATR-FTIR.

Na estruturação dos lipossomos fosfolipídicos, a formação do vetor entre os átomos de fósforo e nitrogênio (vetor PN) inclinado, se alinham por atração dipolo-dipolo, integrando as porções vizinhas, fosfato e colina. O vetor pode chegar à uma inclinação em que o ângulo seja menor que 30 ° em relação ao plano da bicamada, quase paralelo à superfície (Cheng et al., 2015). Tal ângulo pode ser obtido através de cálculos matemáticos realizados em programas computacionais (Dubinnyi, 2006). A reorientação da cabeça polar para mais próximo do plano da bicamada pode acontecer por atrações dipolo-dipolo que são influenciadas pelo grau de hidratação do fosfato ou por adição de outros compostos, como os polímeros em estudo nesta tese (Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNac) (Figura 52).

Figura 52: Ilustração dos polímeros *Rod-Coil-Rod* colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) e seu efeito na reorientação da região polar dos fosfolipídios. Representado em azul, o colesterol, em verde, o poli (óxido etileno) PEO e, em amarelo, o Trip ou anel triazol com as porções glicídicas (Gal e GlicNAc).



O grupo fosfato é responsável pela variação no ângulo, propiciando que o vetor PN esteja mais próximo ou não do plano da bicamada lipídica, e desta forma colaborando com carga da superfície da membrana para valores próximos do positivo ou negativo (Cheng et al., 2015). Assim, está correlacionado com a mobilidade do grupo colina da membrana lipídica. Com base nesta informação, apesar de o grupo colina dos lipossomos de Aso+Col-PEO-Trip estar mais móvel, conforme observado na RMN de ¹H (seção 5.3.2), o grupo fosfato mostrou mobilidade significativamente reduzida, pela adição do polímero ao sistema, conforme os estudos de RMN ³¹P (seção 5.3.3). É possível então sugerir que o vetor PN dos lipossomos de Aso contendo o polímero Col-PEO-Trip, em função da redução da mobilidade da região do fosfato dos fosfolipídios, esteja em uma posição intermediária no plano da bicamada, entre a posição descrita para Aso+Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc, referidas abaixo.

É possível influir que o vetor PN dos lipossomos de Aso+Col-PEO-GlicNAc, esteja mais próximo da bicamada lipídica, em virtude das possíveis interações que houveram na região polar, que gerou valor de potencial ζ de -42,12 mV. Sugere-se que os lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal,

têm vetor PN acima do plano da bicamada, devido a fluidez da região polar e ao valor de potencial ζ de -22,67 mV.

Tanto o sistema lipossomal de Aso+Col-PEO-Gal quanto o Aso+Col-PEO-GlicNAc foram considerados estáveis. Apesar de estabelecido na literatura que potenciais ζ superiores a -30 mV são valores considerados fisicamente estáveis (Wissing & Müller 2002; Mishra et al., 2009), para o caso de tensoativos ou surfactantes como os polímeros anfifílicos *Rod-Coil-Rod*, a estabilidade de suspensões vesiculares (Schaffazick et al., 2003), é proposta com valores de potencial ζ da ordem próxima aos - 20 mV (Mishra et al., 2009).

Para uma perspectiva de aplicação do sistema, sabe-se que o efeito descrito e supracitado pode contribuir para reduzir a hidrofobicidade da superfície, retardar o reconhecimento dos sistemas lipossomais pelos macrófagos e, consequentemente, proporcionar maior liberação controlada (Frézard et al., 2005; Batista et al., 2007; Calvo et al., 2001). Além disso, pode melhorar a interação do sistema lipossomal com o ácido desoxirribonucléico (DNA) carregado negativamente, por meio de interações eletrostáticas (Batista et al., 2007). Entretanto, sistemas lipossomais com superfície de membrana negativa são preferíveis nas formulações de vetores lipossomais com polímeros, glicosilados ou não, que mimetizam a composição lipídica de envelopes virais artificiais (Pinnapireddy et al., 2019). Devido à sua carga superficial negativa, diferentes ligantes de direcionamento podem ser anexados à superfície externa da membrana, como proteínas de ligação viral (Muller et al., 2001).

A estabilidade física dos modelos apresentados, pode também influenciar na cinética de liberação, assim como no direcionamento biológico dos nanocarreadores, pois as cargas presentes nas membranas são atraídas por cargas opostas de outras membranas celulares e receptores (Tamjidi et al., 2013).

5.3.5 Análises de DLS

Para medir o diâmetro dos lipossomos de Aso e o efeito da inserção dos polímeros nestes, foram realizadas análises de DLS (Komatsu et al., 1999; Schaffzik et al., 2003). Os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

Diâmetro	Δ	PDI
$(\overline{X}, nm) D.P.$	(\overline{x}, nm)	(\overline{X}) D.P.
731,55 ±21,62		0,27 ±0,03
368,67 ±6,97	362,88	0,27 ±0,03
187,94 ±9,27	543,61	$0,22 \pm 0,02$
520,92 ±24,92	210,63	0,27 ±0,03
	Diâmetro (\overline{x} , nm) D.P. 731,55 ±21,62 368,67 ±6,97 187,94 ±9,27 520,92 ±24,92	Diâmetro \varDelta (\overline{x} , nm) D.P.(\overline{x} , nm)731,55 ±21,62368,67 ±6,97368,67 ±6,97362,88187,94 ±9,27543,61520,92 ±24,92210,63

Tabela 7: Influência dos polímeros colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) no diâmetro dos lipossomos de asolecitina de soja (Aso), em nm.

 \overline{X} , média aritmética; Δ , variação; *D.P.*, desvio padrão.

Os parâmetros foram avaliados e apresentaram alterações significativas por influência dos polímeros no sistema controle. O polímero Col-PEO-Trip reduziu o diâmetro dos lipossomos de Aso em 362,88 nm (de 731,55 nm para 368,67 nm), equivalente a uma redução de 49,60%. A redução da vesícula de Aso+Col-PEO-Trip está relacionada a uma maior coesão de interações intermoleculares e empacotamento entre as cadeias de metileno (Sherry et al., 2013; Valenti et al., 2001), que repercutiu nos dados de HATR-FTIR. Além disso, para membranas insaturadas, como lipossomos de Aso de origem natural, a diminuição do diâmetro da vesícula também está relacionada à redução do número de confômeros *gauche* das cadeias de hidrocarboneto (Giacometti et al., 2017.), que foram observadas por HATR-FTIR (seção 5.3.1.1). As porções do polímero PEO e Trip podem ter tido um papel importante na redução do diâmetro da vesícula e no favorecimento da uniformidade do sistema (Muller-Goymann, 2004; Elsayed et al., 2011; Calvo et al., 1987).

A redução expressiva de 543,60 nm no diâmetro (de 731,55 nm para 187,94 nm), foi observada após adição do Col-PEO-Gal nos lipossomos de Aso. Este decréscimo no tamanho é equivalente a 74 %. Ao variar a porção glicídica, ou seja, ao adicionar no modelo controle o Col-PEO-GlicNAc, houve uma redução no diâmetro dos lipossomos de Aso em 210,63 nm, equivalente a 28,79 % (de 731,55 nm para 520,92 nm), isto é, uma variação 2,6 vezes menor que o Col-PEO-Gal gerou. O tamanho de Aso+Col-PEO-GlicNAc foi determinante para inviabilizar a análise da intensidade do pico no espectro de RMN de ³¹P (seção 5.3.3). Tal análise só pode ser realizada em sistemas com diâmetros de cerca de 300 nm (Noggle & Schirmer 1971; Seelig, 1978). Conforme as análises de DLS descritas nesta seção, os lipossomos de Aso+Col-PEO-GlicNAc, obtiveram

valores de diâmetro muito superiores a 300 nm. Vale ressaltar que a variação do número de onda observada nas bandas de HATR-FTIR do grupo colina para os três sistemas lipossomas poliméricos, também apontam para interações entre o grupo colina e o grupo fosfato. O aumento das forças de atração intermoleculares da colina, bem como, o ordenamento da região de interface e apolar, podem contribuir para um maior empacotamento lipídico e, consequentemente, para a redução significativa do tamanho dos lipossomos (Sherry et al., 2013; Valelenti et al., 2001). A resposta mais pronunciada foi observada nos lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal.

A homogeneidade da distribuição de tamanho das vesículas, foram medidos pelo PDI que indicou o perfil das nanopartículas (tamanho e distribuição) (Moller-Goymann, 2004). Os polímeros quando em suas respectivas matrizes lipossomais, favoreceram um sistema monodisperso, visto que os valores do PDI foram menores que 0,3. Além disto, indica que são uniformes (Elsayed et al., 2011; Calvo et al., 1987).

Em uma perspectiva de aplicação, a redução do diâmetro pode diminuir o atrito dos lipossomos-polímero, facilitando a passagem pelos poros da BHE (Kreuter, 2007). E, ainda, pode ser vantajosa para reduzir a taxa de captação dos lipossomos por macrófagos fagocíticos mononucleares, diminuindo a possibilidade de opsonização (Batista et al., 2007, Ulrich et al., 2002).

5.3.6 Análises de UV-Vis - Turbidez

Os valores de turbidez lipídica podem, estar relacionados tanto com a fluidez da região apolar do sistema, visto que os maiores constituintes da membrana de Aso são as cadeias de hidrocarboneto (Hope et al., 1986; Sousa et al., 2013), como com o tamanho (Elsayed & Cevc 2011). Os resultados de turbidez obtidos, a partir de medidas de absorbância a 400 nm, foram descritos como densidade óptica (unidade arbitrária, u.a.), estão demonstradas na Figura 53 e na Tabela 8.

Figura 53: Gráfico de absorbância de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e a influência dos polímeros colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc) nos valores de turbidez lipídica.



Tabela 8: Valores de turbidez dos lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e a influência dos polímeros colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e Aso+colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) nas mesmas, em u.a.

Lipossomos	Turbidez (\overline{x} , u.a.) D.P.	$\Delta(\overline{x}, u.a.)$
Aso	0,668 ±0,10	
Aso+Col-PEO-Trip	0,639 ±0,011	0,029
Aso+Col-PEO-Gal	0,892 ±0,003	0,22
Aso+Col-PEO-GlicNAc	$0,645 \pm 0,005$	0,023

 \overline{X} , média aritmética; *D.P.*, desvio padrão; Δ , variação.

A turbidez dos lipossomos de Aso foi de 0,668 u.a. A adição do polímero Col-PEO-Trip nos mesmos, variou a turbidez muito discretamente, de 0,668 u.a. para 0,639 u.a., uma variação percentual de 4,53 %. O referente dado pode ser relacionado ao tamanho lipossomal (Elsayed & Cevc 2011; Wang et al., 2019). Era esperado que houvesse uma redução significativa nos valores de turbidez, visto os valores de redução no diâmetro das vesículas lipídicas de 49,60 % (verificada nas análises de DLS, seção 5.2.5). Entretanto, não foi observado um decréscimo significativo da turbidez. É possível que, além do efeito na redução do tamanho, o polímero não tenha alterado a relação entre concentração dos lipídios e lamelaridade. Isto significa que Col-PEO-Trip pode ter reduzido a concentração de lipídios por lipossomos e aumentado a lamelaridade dos lipossomos ou vice-versa (Wang et al., 2019). Entretanto, outras investigações tornam-se necessárias para confirmar tal hipótese. Os dados de PDI (dados de DLS) ratificaram os dados de turbidez obtidos que podem, ainda, refletir a estabilidade da membrana de Aso+Col-PEO-Trip, uma vez que não houve aglomeração das matrizes (Elsayed & Cevc 2011; Chong & Colbow 1976; Wang et al., 2019).

O polímero Col-PEO-Gal aumentou a turbidez dos lipossomos de Aso em 25,11 % (de 0,668 para 0,892 u.a.). O acréscimo de 0,224 u.a. nos valores de turbidez, indicaram a redução de fluidez ou ordenamento da região apolar da membrana lipossomal (Hope et al., 1986; Sousa et al., 2013).

Quando foi adicionado o Col-PEO-GlicNAc aos lipossomos de Aso, observou-se a redução dos valores de turbidez de 0,668 para 0,645 u.a. (decréscimo de 0,023 u.a.). Foi uma redução discreta de 3,59 % e, ainda assim, pode ser atribuída ao tamanho (Elsayed & Cevc 2011). Era esperado para o sistema de Aso+Col-PEO-GlicNAc uma redução nos valores de turbidez maior, já que houve redução no diâmetro das vesículas lipídicas de 28,79 % (verificada nas análises de DLS). Assim como analisado no sistema lipossomal de Aso+Col-PEO-Trip, provavelmente, além do efeito na redução do tamanho, o Col-PEO-GlicNAc não alterou a relação entre concentração dos lipídios e lamelaridade no lipossomo controle. Os dados de PDI (dados de DLS) corroboraram os de turbidez, no que se refere a estabilidade da membrana de Aso+Col-PEO-GlicNAc (Elsayed & Cevc 2011; Chong & Colbow 1976; Wang et al., 2019).

5.3.7 Análises de DSC

A partir dos resultados de DSC, as contribuições termodinâmicas dos polímeros para a região hidrofóbica dos lipossomos de Aso foram monitoradas. Através dos eventos térmicos, ou seja, das curvas de DSC (Figura 54 e 55) foram avaliados as $T_m e \Delta H$ dos respectivos sistemas. Os parâmetros e suas variações estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de temperatura de transição de fase (T_m,° C) e, valores de variação de entalpia (ΔH) dos sistemas de asolecitina de soja (Aso), Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip), Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e Aso contendo o colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).

Lipossomos	$T_m(\bullet C)$	∆ (° C)	ΔH (J/g)
Aso	-29,86		-0,10
Aso+Col-PEO-Trip	-21,78	8,08	-0,16
Aso+Col-PEO-Gal	-23,46	6,4	-0,13
Aso+Col-PEO-GlicNAc	-24,66	5,2	-0,22

 T_m , temperatura de transição de fase, Δ , variação e ΔH , variação de entalpia.

Os lipossomos de Aso mostram um pico endotérmico de T_m de -29,86 ° C, típico do ácido oleico presente na fosfatidilcolina, contida em Aso (Figura 54) (Hohne et al., 1996). A inserção do polímero Col-PEO-Trip na membrana, aumentou a T_m de -29,86 ° C para -21,78 ° C, uma variação da T_m equivalente a $|8,08| \circ C$ (Figura 54).



Figura 54: Curvas de DSC de lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e Aso contendo o polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-

A ΔH obtida do lipossomo controle foi de -0,10 J/g. O polímero Col-PEO-Trip influenciou a ΔH destes, moderadamente, de -0,10 J/g para -0,16 J/g.

O aumento do valor da T_m associado ao aumento moderado (em módulo) da ΔH , sugeriu o ordenamento da região apolar lipídica. A efeito em questão, muito provavelmente, advenha da presença do colesterol, constituinte do polímero, que favorece no aumento de confôrmeros *trans*. Estes resultados em geral, são ratificados pela redução do número de onda do v_{as} do CH₂. Após a inserção do Col-PEO-Trip no lipossomo controle, verificou-se a redução na absorção deste v_{as} CH₂, de 2983,88 cm ⁻¹ para 2958,80 cm ⁻¹ (ver seção 5.3.1.1) (Lee & Chapman 1986). O polímero Col-PEO-Trip pode ter influenciado o empacotamento das cadeias de hidrocarbonetos da membrana de Aso, devido ao efeito do anel esterol (Alakoskela et el., 2010).

Alguns fatores podem alterar a ΔH de um sistema lipossomal. Dentre estes fatores, cita-se as forças das ligações que ocorrem entre a membrana lipossomal e o Col-PEO-Trip, mais especificamente a Aso (lipossomo) e o Trip (constituinte do polímero). As forças das ligações incluem interações hidrofóbicas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. Como a ΔH foi de -0,16 J/g, após a adição do Col-PEO-Trip nos lipossomos de Aso, a ΔS foi influenciada e, tendeu a um valor menor que zero (Ross & Subramanian 1981), como resultante das forças de interações predominantes, as ligações de hidrogênio e as de van der Waals (Jiao et al., 2018; Ross & Subramanian, 1981). Embora exista a tendencia de ΔS para ser menor que zero, os resultados indicaram que a adição do Col-PEO-Trip aumenta a S do modelo membranar ao reduzir a liberdade molecular. A S está associado ao número de configurações (ou microestados), ou seja, níveis energéticos quantizados, incluindo os translacionais, vibracionais, rotacionais e eletrônicos (Basurto-Flores et al., 2018) do lipídio. A contribuição de ΔS na transição de fase, pode ser reconhecida por uma mudança na inclinação da linha de base, devido uma mudança na capacidade de calor específico (Muller-Goymann, 2004). Esta alteração na linha de base pode ser vista nas Figura 54, e Figura 55 (a) e (b), a partir da inserção de cada polímero em suas respectivas matrizes (Aso+Col-PEO-Trip, Aso+Col-PEO-Gal e Aso+Col-PEO-GlicNAc). As interações entre a membrana e o Trip, investigadas nesta técnica, vai ao encontro das interações observadas na região de interface (carbonila lipídica), através dos estudos de HATR-FTIR. Conforme descrito na seção 5.3.1.1, a interação entre o polímero e a membrana ocorreu por ligação de hidrogênio, entre o grupo NH_{3^+} e C=O, que indicou o ordenamento desta região e apresentou interações mais pronunciadas frente aos outros grupos.

Os eventos térmicos indicaram um acréscimo nos resultados da T_m dos lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal, em relação ao lipossomo controle de -29,86 ° C para -24,66 ° C, equivalente a uma variação em módulo da T_m de |5,2| °C (Figura 55 (a)). De forma similar a este

comportamento, os lipossomos de Aso+Col-PEO-GlicNAc, apresentaram variação da T_m de -29,86 ° C para -23,46° C, equivalente a um aumento em módulo da T_m de |6,4| ° C (Figura 55 (b)). Ao comparar os dois modelos membranares, verificou-se que ambos contribuíram para a variação da T_m, porém o tipo de glicídio parece não ser um fator relevante na modificação da T_m, em virtude da diferença entre as matrizes (Aso+Col-PEO-Gal e Aso+Col-PEO-GlicNac) promoverem uma variação de T_m de 1,2 ° C, quando comparadas entre si.

Figura 55: Curvas de DSC de (a) lipossomos de asolecitina de soja (Aso) contendo o polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) e (b) lipossomos de Aso contendo o polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc).



O aumento da T_m nos sistemas lipossomais de Aso+Col-PEO-Gal e Aso+Col-PEO-GlicNAc, indicou a redução da mobilidade na região hidrofóbica. Uma das possíveis justificativas é a presença do colesterol (constituinte do polímero) e o aumento do número de confôrmeros *trans*, observado com a redução do número de onda do v_{as} do CH₂ (Lee & Chapman, 1986), nas análises de HATR-FTIR. O aumento da T_m de |5,2|° C e a redução do número de onda do v_{as} CH₂, de 2983,88 cm ⁻¹ para 2945,30 ⁻¹ (dados de HATR-FTIR), foram correlacionados somente para os lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal, pois conforme visto nas análises de HATR-FTIR das vesículas de Aso+Col-PEO-GlicNAc, a sobreposição dos picos dos estiramentos dos metilenos (v_{as} CH₂ e v_s CH₂), gerou uma única banda (v CH₂), que inviabilizou a obtenção dos dados, conforme descrito na seção 5.3.1.3.

Worcester e Franks (1976) realizaram estudos para detectar a localização preferencial do colesterol, em membranas de MLVs à base de lecitina. Sendo assim, marcaram a posição do grupo hidroxila da molécula de colesterol com o deutério do átomo do carbono adjacente; um método de

escalonamento direto para comparar átomos marcados e não marcados. O marcador de deutério foi encontrado próximo a posição das ligações de éster de glicerol de ácido graxo, e constataram que a molécula de colesterol estava imersa na região de hidrocarbonetos (Figura 56). Com base neste e, de acordo com os estudos apresentados nesta tese, é possível que o colesterol constituinte do polímero Col-PEO-GlicNAc, também esteja preferencialmente, localizado entre as cadeias de metileno lipídico, em uma orientação paralela.

Figura 56: Representação estrutural da localização preferencial do colesterol em membranas lipossomais de fosfolipídios.



Os lipossomos de Aso+Col-PEO-GlicNAc absorveram mais energia para que ocorresse a transição de fase, quando comparado com os lipossomos de Aso+Col-PEO-Gal. Isto pode ter ocorrido porque as vesículas de Aso+Col-PEO-Gal possuem maior curvatura, conforme observado nas análises de potencial ζ (Alakoskela et al., 2010). Por outro lado, o potencial de superfície para valores mais positivos não foi um fator de relevância para o aumento da T_m, visto que o Col-PEO-GlicNAc não foi o polímero responsável por atribuir à membrana valores de potencial ζ mais positivos.

O aumento da curvatura dos sistemas lipossomais (potencial ζ), aliado à unilamelaridade das vesículas do tipo LUVs, causa uma diminuição na unidade cooperativa da transição de fase (número de lipídios que transicionam juntos), e gera um efeito de alargamento considerável do pico nas curvas de DSC (Ivanova & Heimburg 2001), conforme pode ser verificado na Figura 55 (a) e mais pronunciado em (b), justamente pelo maior efeito da curvatura que o polímero causou nos lipossomos de Aso.

Tanto o Col-PEO-Gal quanto o Col-PEO-GlicNAc, promoveram, portanto, alterações nas forças de atração de van der Waals, entre as cadeias hidrofóbicas da membrana lipossomal de Aso (Zhao et al., 2007), promovendo o ordenamento desta região. O aumento da turbidez do sistema lipossomal de Aso+Col-PEO-Gal de 25,11 % e a conformação majoritária *trans* dos metilenos em um estado menos fluido, por HATR-FTIR, ratificam este ordenamento visto por DSC.

De forma geral, os polímeros (Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc) em seus respectivos sistemas lipossomais, reduziram a fluidez da região hidrofóbica e deformação da membrana, aumentando a sua estabilidade (Yarosh, 2001).

A síntese para obtenção do novo polímero *Rod-Coil-Rod*, o Col-PEO-Trip é versátil, eficiente e de rendimento satisfatório. O Col-PEO-Trip é um polímero biocompatível com membranas celulares e possui propriedades farmacológicas, por conter Trip (Lee et al., 2002; Le Floc'h et al., 2010; Rizzo et al., 1986).

Quando foi incorporado em sistemas lipossomais de Aso, o Col-PEO-Trip, interagiu com todas as regiões da membrana (Figura 57), preferivelmente, ordenando-as.

Figura 57: Efeito do colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip) na membrana lipossomal de Asolecitina de soja (Aso), representado por setas que indicam os resultados obtidos dos principais grupo que compõem a membrana.



Quando foi incorporado em sistemas lipossomais de Aso, o Col-PEO-Gal, interagiu com todas as regiões da membrana (Figura 58), tornou a região polar fluida e, tornou as regiões de interface e apolar ordenada.

Figura 58: Efeito do colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Aso+Col-PEO-Gal) na membrana lipossomal de Asolecitina de soja (Aso), representado por setas que indicam os resultados obtidos dos principais grupos que compõem a membrana.



Quando foi incorporado em sistemas lipossomais de Aso, o Col-PEO-GlicNAc, interagiu com todas as regiões da membrana (Figura 59), ordenando-as.

Figura 59: Efeito do colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc) na membrana lipossomal de Asolecitina de soja (Aso), representado por setas que indicam os resultados obtidos dos principais grupos que compõem a membrana.



Os polímeros Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc, encontram-se inseridos nos lipossomos de Aso (nos seus respectivos sistemas), com o grupo colesterol, preferivelmente, interagindo com região apolar, paralelamente, enquanto que o aa (Trip) e os

glicídios (Gal e GlicNAc), encontram-se preferivelmente entre a interface e a superfície da membrana (Figura 60).

Figura 26: Ilustração dos polímeros Rod-Coil-Rod colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip), colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-galactose (Col-PEO-Gal) e colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetilglicosamina (Col-PEO-GlicNAc) inseridos em lipossomos de asolecitina de soja (Aso). Representado em marrom o fosfolipídio; representado em azul, o colesterol, em verde, o poli (óxido etileno) PEO e, em amarelo, o Trip ou anel triazol com as porções glicídicas (Gal e GlicNAc).



No que tange os reflexos que as características físico-químicas dos sistemas podem ter em suas propriedades como nanocarreadores farmacológicos, podem ser descritas as seguintes considerações:

O Trip (constituinte do Col-PEO-Trip) localizado próximo à interface e superfície da membrana, poderá contribuir no direcionamento biológico dos nanocarreadores (Tamjidi et al., 2013). A preferência dos glicídios Gal e GlicNAc por uma localização na interface e superfície da membrana poderão favorecer propriedades no sistema de nanocarreadores e/ou de vetorizadores, pois aumentam os sítios de reconhecimento em células superficiais membranares (Awsthi et al., 2004; Sharon et al., 1993; Ulrich et al., 2002).

A predominância do efeito ordenante nas vesículas de Aso+Col-PEO-GlicNAc, pode favorecer uma cinética de liberação mais lenta, quando comparado com às vesículas de Aso+Col-PEO-Trip e, em seguida de Aso+Col-PEO-Gal.

Os sistemas lipossomais tiveram seus tamanhos reduzidos pela adição do polímero, sendo que a redução mais significativa foi a observada no sistema com o Col-PEO-Gal (74%), tornando este muito relevante, visto que viabiliza a ultrapassagem da BHE (Kreuter, 2007). A ordem de magnitude da redução seguiu contendo na matriz o Col-PEO-Trip (~50%) e Col-

PEO-GlicNAc (28,79%). A redução do diâmetro, bem como a estabilidade e a uniformidade gerada pela adição dos polímeros em seus respectivos sistemas lipossomas, facilita a passagem pelos poros de membranas celulares (Batista et al., 2007; Kreuter, 2007; Ulrich et al., 2002).

Todos os polímeros estudados reorientaram o grupo colina acima do plano da bicamada lipídica, atribuindo à membrana um potencial de superfície mais positivo. A redução da hidrofobicidade da superfície das membranas, contribuem na interação dos mesmos com o DNA (Batista et al., 2007). Entretanto, as superfícies de vesículas negativas são preferíveis nas formulações que mimetizam a composição lipídica de envelopes virais artificiais (Pinnapireddy et al., 2019; Muller et al., 2001). Os lipossomos de Aso+Col-PEO-Trip por apresentar maior valor de potencial ζ (de carga negativa) sobre os outros sistemas, é considerado o mais promissor como modelo de envelope viral, seguido dos lipossomos de Aso+Col-PEO-GlicNAc e Aso+Col-PEO-Gal. Entretanto, a membrana de Aso+Col-PEO-Gal tem maior potencial entre os outros sistemas para interações com o DNA, por meio de interações eletrostáticas, ao demostrar menor valor de carga de superfície, seguida dos lipossomos de Aso+Col-PEO-GlicNAc e Aso+Col-PEO-Trip.

Diante dos resultados apresentados avaliou-se que os sistemas lipossomais de Aso+Col-PEO-Trip, Aso+Col-PEO-Gal e Aso+Col-PEO-GlicNAc são promissores como envelopes virais artificiais, para os avanços das pesquisas de doenças, tais como as infecciosas. Entre os atributos, as vesículas foram avaliadas como estáveis, uniformes e homogêneas. Embora a redução da hidrofobicidade após a inserção dos copolímeros anfifílicos *Rod-Coil-Rod*, a carga superficial negativa dos sistemas lipossomais propõe que diferentes ligantes de direcionamento possam ser anexados à superfície externa dos sistemas, como proteínas de ligação viral e diferentes frações de açúcares (Muller et al., 2001). O posicionamento das porções Gal e GlicNAc nos sistemas de Aso, podem favorecer as porções de glicídio como ligantes de superfície, visto que são reconhecidos e endocitados por receptores de lectina nas células. O uso de aas como o Trip nestes estudos ainda é recente, porém promissor, visto suas propriedades biológicas e farmacológicas (Lee et al., 2002; Le Floc'h et al., 2010; Rizzo et al., 1986).

Os resultados obtidos neste trabalho, contribuem com novos modelos de forma a aumentar a eficiência do sistema composto por lipídio e polímeros *Rod-Coil-Rod*.

Este trabalho sugere perspectivas no âmbito de averiguar, dentre outros, estudos fotofísicos, fotoquímicos e biológicos, bem como a inserção de um fármaco nos sistemas, como

lectinas que são expressas e expostas em membranas celulares, auxiliando no reconhecimento e na interação dos órgãos e tecidos do organismo (Gabius, 1994).

Alakoskela, J.-M., Parry, M. J., & Kinnunen, P. K. J. The Intermediate State of DMPG Is Stabilized by Enhanced Positive Spontaneous Curvature. Langmuir, v. 26, p. 4892–4900, 2010. doi:10.1021/la100411p

Al-Dosari M. S, Gao X. Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. AAPS J., v. 11, p. 671-681, 2009. doi:10.1208/s12248-009-9143-y

Al-Humadi, H., Zarros, A., Kyriakaki, A., Al-Saigh, R., Liapi, C. Choline Deprivation: An Overview of the Major Hepatic Metabolic Response Pathways. Scand J Gastroenterol., v. 47, p. 874-886, 2012. doi:10.3109/00365521.2012.685755

Apolinário, A. C., Pachioni-Vasconcelos, J. A., Pessoa Jr., A., Rangel Yagui, C. O. Polimerossomos Versus Lipossomos: A Evolução da "Bala Mágica." Quím Nova., v. 40, p. 810-817, 2017. doi:10.21577/0100-4042.20170054

Arsov, Z., Quaroni, L. Direct Interaction Between Cholesterol and Phosphatidylcholines in Hydrated Membranes Revealed by ATR-FTIR Spectrscopy. Chem. Phys. Lipids., v. 150, p. 35-48, 2007. doi: 10.1016 / j.chemphyslip.2007.06.215

Atkins, P., De Paula, J. Friedman, R. Quanta, Matéria e Mudança. Uma Abordagem Molecular para a Fisico-química. Tradução do v. 1. Rio de Janeiro. LTC v. 1, 2008.

Ayodhya, D., Venkatesham, M., kumari, S., A., Reddy, B. G., Veerabhadram, G. One-Pot Sonochemical Synthesis of CdS Nanoparticles: Photocatalytic and Electrical Properties. Int. J. Ind. Chem., v. 6, p. 261-271, 2015. doi:10.1007/s40090-015-0047-7

Barbosa, L. C. de A. Espectroscopia no Infravermelho, na Caracterização de Compostos Orgânicos. UFV, 2007.

Basurto-Flores, R.; Guzmán-Vargas, L.; Velasco, S.; Medina, A.; Calvo Hernandez, A. On Entropy Research Analysis: Cross-Disciplinary Knowledge Transfer. Scientometrics., v. 117, p. 123-139 ,2018. doi:10.1007/s11192-018-2860-1

Bhattacharya, S., Haldar, S. Interactions Between Cholesterol and Lipids in Bilayer Membranes. Role of Lipid Head Group and Hydrocarbon Chain–Backbone Linkage. Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes., v. 1467, p. 39-53, 2000. doi: 10.1016/S0005-2736(00)00196-6

Blanazs, A., Armes, S. P., & Ryan, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. Macromolecular Rapid Communications., v. 30, p. 267-277, 2009. doi:10.1002/marc.200800713 Bloom, M., Thewalt, J. Spectroscopic Determination of Lipid Dynamics in Membranes. Chemistry and Physics of Lipids., v. 73, p. 27-38, 1994. doi:10.1016/0009-3084(94)90172-4 Boruchovitch, E., Felix-Sousa, I. C., & Schall, V. T. Conceito de Doença e Preservação da Saúde de População de Professores e Escolares de Primeiro Grau. Revista de Saúde Pública., v. 25, p. 418-425, 1991. doi:10.1590/s0034-89101991000600002

Bradbury, J. H., Norton, R. S. J. J. Carbon-13 NMR Spectra of Tryptophan, Tryptophan Peptides and of Native and Denatured Proteins. Biochim Biophys Acta., v. 328, p. 10-19, 1973. doi:10.1016/0005-2795(73)90324-3

Brocksom, T. J., Danatoni, M. C., Uliana, M. P., Vieira, Y. W. A Reação de Diels-Alder no Início do Século Vinte Um. Quím. Nova., v. 33, p. 2211-2218, 2010. doi: 10.1590/S0100-40422010001000034

Brown M. F, Seelig J. Structural Dynamics in Phospholipid Bilayers from Deuterium Spin-Lattice Relaxation Time Measurements. J Chem Phys., v. 70, p. 5045–5053, 1979. doi: 10.1063/1.437346

Bu, G. Apolipoprotein and its Receptors in Alzheimer's Disease: Pathways, Pathogenesis and Therapy. Rev. Neurosci., v. 10, p. 333-344, 2009. doi: 10.1038 / nrn2620

Budai, M., Szogyi, M. "Liposomes as Drug Carrier Systems. Preparation, Classification and Therapeutical Advantages of Liposomes., Acta Pharmaceutica Hungarica., v. 71, p. 114-118, 2001.

Calvo, P., Gouritin, B., Chacun, H., Desmaële, D., D'Angelo, J., Noel, J. P., Georgin, D., Fattal, E., Andreux, J. P., Couvreur, P. Long-Circulating PEGylated Polycyanoacrylate Nanoparticles as New Drug Carrier for Brain Delivery. Pharm Res., v. 18, p. 1157-1166, 2001. doi:10.1023/a:1010931127745

Campbell, M. K., Farrel, S. O. Bioquímica básica. 5ª Ed. São Paulo: Cenagage Learning. v. 1, 2011.

Cannon, B., Heath, G., Huang, J. Y., Somerharju, P., Virtanen, J. A., Cheng, K. H. Time Resolved Fluorescence and Fourier Transform Infrared Spectroscopic Investigations of Lateral Packing Defects and Superlattice Domains in Compositionally Uniform Cholesterol/Phosphatidylcholine Bilayers. Biophys. J., v. 84, p. 3777-3791, 2003. doi: 10.1016 / S0006-3495 (03) 75106-6

Cao, X., Fischer, G. Infrared Spectral, Structural, and Conformational Studies of Zwitterionic L-Tryptophan. J. Phys. Chem. A., v. 103, p. 9995-10003, 1999. doi: 10.1021/jp992421c

Casal, H. L., Cameron, D. G., Smith, I. C. P., Mantsch, H. H. Acholeplasma Laidlawii Membranes: A Fourier Transform Infrared Study of the Influence of Protein on Lipid Organization and Dynamics. Biochemistry., v. 19, p. 444-451, 1980. doi: 10.1021/bi00544a007

Casal, H. L., Mantsch, H. H. Polymorphic Phase Behavior of Phospholipid Membranes Studied by Infrared Spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes., v. 779, p. 381-401, 1984. doi: 10.1016/0304-4157(84)90017-0

Castelli, F., Trombetta, D., Tomaiano, A., Bonina, F.; Romeo, G.; Uccella, N.; Saija, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/ Linoleic Acid Mixed Unilamellar Vesicles as Model Membranes for Studies on Novel Free-Radical Scavengers. J. Pharmacol. Toxicol., v. 37, p. 135-141, 1997. doi: 10.1016/s1056-8719 (97) 00009-9

Cervantes-Barragan, L., Chai, J. N., Tianero, M. D., Di Luccia, B., Ahern, P. P., Merriman, J., Cortez, V. S., Caparon, M. G., Donia, M. S., Gilfillan, Susan, Cella, M., Gordon, J. I., Hsieh, C-S., Colonna, Marco. Lactobacillus Reuteriinduces Gut Intraepithelial CD4⁺CD8αα⁺T Cells. Science., v. 357, p. 806–810, 2017. doi:10.1126/science.aah5825

Chahrour, M., Assi, S., Bejjani, M., Nasrallah, A. A., Salhab, H., Fares, M., Khachfe, H. H. A Bibliometric Analysis of COVID-19 ResearchActivity: A Call for Increased Output. Cureus., e7357, v. 12, 2020. doi: 10.7759/cureus.7357

Chen, C; Tripp, C. P. An Infrared Spectroscopic Based Method to Measure Membrane Permeance in Liposomes. Biochim. Biophys. Acta. v. 1778, p. 2266-2272, 2008. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.05.010

Cheng, C.-Y., Song, J., Pas, J., Meijer, L. H. H., Han, S. DMSO Induces Dehydration Near Lipid Membrane Surfaces. Biophysical Journal, v. 109, p. 330-339, 2015. doi:10.1016/j.bpj.2015.06.011

Chong, CS, & Colbow, K. Medições de Dispersão de Luz e Turbidez em Vesículas Lipídicas. Biochim Biophys Acta Biomembr., v. 436, p. 260-282, 1976. doi: 10.1016 / 0005-2736 (76) 90192-9

Chorilli, M., Rimeiro, T. C., Oliveira, A. G., Scarpa, M. V. Stability Study of Small Unilamellar liposomes with Caffeine by Turbidity. Rev. Bras. Farm., v. 4, p. 88, 2007.

Cieslik-Boczula, K., Szwed, J. Jaszczyszyn, A. Gasiorowski, K. Koll, A. Interactions of Dihydrochloride Fluphenazine with DPPC Liposomes: ATR-IR and ³¹P NMR Studies J. Phys. Chem. B., v. 113, p. 15495-15502, 2009. doi:10.1021/jp904805t

Coelho, M. R. G., Gomes, A. de S. Síntese de Copolímeros em Bloco com Propriedades líquido Cristalinas. Quím Nova., v. 30, p. 636-643, 2007. doi:10.1590/s0100-40422007000300025

Dal-Bó, A. G., Soldi, V., Giacomelli, F.G., Jean, B., Pignot-Paintrand, I., Borsali, R., Fort S. Self-Assembled Carbohydrate-Based Micelles for Lectin Targeting. Soft Matter, v. 7, p. 3453-3461, 2011. doi:10.1039/c0sm01411g

Dal-Bó, A. G., Soldi, V., Giacomelli, F.G., Travelet, C., Jean, B., Pignot-Paintrand, I., Borsali, Fort, S. Self-Assembly of Amphiphilic Glycoconjugates Into Lectin-Adhesive Nanoparticles. Langmuir., v. 28, p. 1418-1426, 2012. doi.org/10.1021/la204388h

Dan-bo, Y., Zhu, J., Huang, Z., Ren, H., Zheng, Z. Synthesis and Application of Poly (ethylene glycol)-Cholesterol (Chol-PEGm) Conjugates in Physicochemical Characterization of Nonionic Surfactant Vesicles. Colloid Surf. B., v. 63, p. 192–199, 2008.

Davis, J. H. The Description of Membrane Lipid Conformation, Order and Dynamics by ²H-NMR. Biochim. Biophys Acta., v. 737, p. 117-171, 1983. doi:10.1016/0304-4157(83)90015-1

Debouzy, J. C., Aous, S., Dabouis, V., Neveux, Y., Gentilhomme, E. Phospholipid Matrix as a Target for Sulfur Mustard (HD): NMR study in Model Membrane Systems. Cell. Biol. Toxicol., v. 18, p. 397-408, 2002. doi:10.1023/a:1020815723009

De Lima, V. R., Caro, M. S. B., Munford, M. L., Desbat, B., Dufourc, E.J., Pasa, A., Creczynski-Pasa, T. B. Influence of Melatonina on the Order of Phosphatidylcholine Based Membranes. J. Pineal Res., v. 49, p. 169-175, 2010. doi:10.1111 / j.1600-079X.2010.00782.x

De Lima, V. R., Caro, M. S. B., Tavares, M. I. B., Creczynski-Pasa, T. B. Melatonin Location in Egg Phosphatidylcholine Liposomes: Possible Relation to its Antioxidant Mechanisms. Journal of Pineal Research., v. 43, p. 276-282, 2007. doi:10.1111/j.1600-079x.2007.00474.x

Disalvo, E. A., Bouchet, A. M. Electrophoretic Mobility and Zeta Potential of Liposomes due to Arginine and Polyarginine Adsorption. Colloid Surface A., v. 440, p. 170-174, 2014. doi:10.1016/j.colsurfa.2012.09.012

Deo, N., Somasundaran, T., Somasundaran, P. Solution Oroperties of Amitriptyline and its Partitioning Into Lipid Bilayers. Colloid Surface B., v. 34, p. 155-159, 2004. doi:10.1016/j.colsurfb.2003.10.019

Dubinnyi, M. A., Lesovoy, D. M., Dubovskii, P. V., Chupin, V. V., Arseniev, A. S. Modeling of ³¹P-NMR Spectra of Magnetically Oriented Phospholipid Liposomes: A New Analytical Solution. Solid State Nuclear Magnetic Resonance., v. 29, p. 305-311, 2006. doi:10.1016/j.ssnmr.2005.10.009

Dos Santos, M. C., Farias, B. S., Cabrera, D. C., Cadaval, T. J. R. S., Pinto., L. A. A., Dal-Bó, A. G., De Lima, V. R. Physico-Chemical Interactions of a New Rod-Coil-Rod Polymer with Liposomal System: Approaches to Applications in Tryptophan-Related Therapies. Chem. Phys. Lipids., v. 235, p. 105027, 2021. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2020.105027

Dos Santos, M. C., Micheleto, Y. M. S., Da Silveira, N. P., Pinto, L. S., Giacomelli, F. C., De Lima, V. R., Frizone, T. E. A., Dal-Bó, A. G. Self-Assembled Carbohydrate-Based Vesicles for Lectin Targeting. Colloi Surface B., v. 148, p. 12-18, 2016. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.053

Dufourc, E. J, Mayer, C., Stohrer, J., Althoff, G., Kothe, G. Dynamics of Phosphate Head Groups in Biomembranes. Comprehensive Analysis Using Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Lineshape and Relaxation Time Measurements. Biophysical Journal., v. 61, p. 42-57, 1992. doi:10.1016/s0006-3495(92)81814-3

Edwards, K., Baeumner, A. Liposomes in Analyses. Talanta., v. 68, p. 1421-1431, 2006. doi:10.1016/j.talanta.2005.08.044

Egbaria, K., Weiner, N. Topical Application of Liposomal Preparation. Cosm. Toil, v. 106, p. 79-93, 1991. doi: 10.1691 / ph.2011.0829

Elsayed, M. M. A., Cevc, G. Turbidity Spectroscopy for Characterization of Submicroscopic Drug Carriers, Such as Nanoparticles and Lipid Vesicles: Size Determination. J. Chem. Pharm. Res., v. 28, p. 2204-2222, 2011. doi: 10.1007 / s11095-011-0448-z

Fatouros, D. G., Antimisiaris, S. G. Effect of Amphiphilic Drugs on the Stability and Zeta-Potential of Their Liposome Formulations: A Study with Prednisolone, Diazepam, and Griseofulvin. J Colloid and Interf Sci., v. 251, p. 271-277, 2002. doi:10.1006/jcis.2002.8432

Feigenson, G. W., Chan, S. I. Nuclear Magnetic Relaxation Behavior of Lecithin Multilayers. J. Am. Chem. Soc., v. 96, p. 1312-1319, 1974. doi: 10.1021 / ja00812a009

Falke S., Betzel C. Dynamic Light Scattering (DLS). In: Pereira A., Tavares P., Limão-Vieira P. (eds) Radiation in Bioanalysis. Bioanalysis (Advanced Materials, Methods, and Devices), vol 8. Springer, Cham., 2019. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-28247-9_6

Frézard, F., Schettini, D. A., Rocha, O. G. F., Demicheli, C. Lipossomas: Propriedades Físico-Químicas e Farmacológicas, Aplicações na Quimioterapia à base de Antimônio. Quim. Nova., v. 28, p. 511-518, 2005. doi: 10.1590/S0100-40422005000300025

Gabius, H. J. Non-carbohydrate binding parteners/domains of animal lectins. International Journal of Biochemistry., v. 80, p. 131-135, 1994. doi: 10.1016/0020-711X(94)90002-7

Ghosh, R. ³¹P and ²H NMR Studies of Structure and Motion in Bilayers of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine. Biochemistry., v. 27, p. 7750-7758, 1988. doi: 10.1021 / bi00420a025

Gregoriadis G, Mccormack B, Obrenovic M, Saffie R, Zadi B, Perrie Y. Vaccine Entrapment in Liposomes. Methods., v. 19, p., 156-162, 1999. doi: 10.1006 / met.1999.0841

Guido, R. V. C., Andricopulo, A. D., Oliva, G. Planejamento de Fármacos, Biotecnologia e Química Medicinal: Aplicações em Doenças Infecciosas. Estudos Avançados., v. 24, p. 81-98, 2010. doi:10.1590/s0103-40142010000300006

Hädrich, G., Monteiro, S. O., Rodrigues, M. R., de Lima, V. R., Putaux, J. -L., Bidone, J., Teixeira, H. F., Baisch, A. L. M., Dora, C. L. Lipid-Based Nanocarrier for Quercetin Delivery: System Characterization and Molecular Interactions Studies. Drug Dev. Ind. Pharm., v. 42, p. 1165-1173, 2015. doi: 10.3109/03639045.2015.1118491

Haque, M. M. Infrared Studies of Deformation and Docking in Hydrogen-Bonded Molecular systems. J Biomol. Struct. Dyn., p. 1-6, 2017. doi: 10.1080/07391102.2017.1406406

Haris, P. I., Lee, D. C., Chapman, D. A. Fourier Transform Infrared Investigation of the Structural Differences Between Ribonuclease A and Ribonuclease S. Biochim. Biophys. Acta., v. 874, p. 255-265, 1986. doi: 10.1016/0167-4838(86)90024-5

Heimburg, T. Mechanical Aspects of Membrane Thermodynamics. Estimation of the Mechanical Properties of Lipid Membranes Close to the Chain Melting Transition From Calorimetry. Biochim Biophys Acta Biomembr, v. 1415, p. 147-162, 1998. doi:10.1016/s0005-2736(98)00189-8

Ho, C., Slater, S. J., Stubbs, C. D. Hydration and Order in Lipid Bilayers. Biochemistry., v. 34, p. 6188-6195, 1995. doi: 10.1021/bi00018a023

Hohne, G. W. H., Hemminger, W., Flammersheim, H. J. Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners. Germany: Springer, 1996.
Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S., Cullis, P. R. Generation of Multilamellar and Unilamellar Phospholipid Vesicles. Chem. Phys. Lipids., v. 40, p. 89-107, 1986. doi: 10.1016 / 0009-3084 (86) 90065-4

Houk, K. N., Javier, G., Li, Y. Pericyclic Reaction Transition States: Passions and Punctilios. Chem. Res., v. 28, p. 81-90, 1995. doi: 10.1021/ar00050a004

Ivanova, V. P., Heimburg, T. Histogram Method to Obtain Heat Capacities in Lipid Monolayers, Curved Bilayers, and Membranes Containing Peptides. Physical Review E., v. 63, p. 041914, 2001. doi:10.1103/physreve.63.041914

Itri, R., Junqueira, H. C., Mertins, O., Baptista, M. S. Membrane Changes Under Oxidative Stress: The Impact of Oxidized Lipids. Biophysical Reviews., v. 6, p. 47-61, 2014. doi:10.1007/s12551-013-0128-9

Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U., Jain, N. K. Dendrimer Toxicity: Let's Meet the Challenge. Int J Pharm., v. 394, p. 122-142, 2010. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.04.027

Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U., Jain, N. K. A Review of Glycosylated Carrier for Drug Delivery. Biomateriais., v. 33, p. 4166-4186, 2012. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.033.

Jiao, Q., Wang, R., Jiang, Y., Liu, B. Study on the Interaction Between Active Components from Traditional Chinese Medicine and Plasma Proteins. Chem. Cent. J., v. 12, p. 48, 2018. doi:10.1186/s13065-018-0417-2

Khatun, R., Hunter, H., Magcalas, W., Sheng, Y., Carpick, B., Kirkitadze, M. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) study for the detection and quantitation of cholesterol in HSV529 therapeutic vaccine candidate. Computational and Structural Biotechnology Journal., v. 15, p. 14-20, 2016. doi: 10.1016/j.csbj.2016.10.007

Klauda, J. B., Roberts, M. F., Redfield, A. G., Brooks, B. R., Pastor, R. W. Rotation of Lipids in Membranes: Molecular Dynamics Simulation, ³¹P Spin-Lattice Relaxation, and Rigid-Body Dynamics. Biophysical Journal., v. 94, p. 3074-3083, 2008. doi:10.1529/biophysj.107.121806.

Komatsu, H., Okada, S. Ethanol-Induced Aggregation and Fusion of Small Phosphatidylcholine Liposome: Participation of Interdigitated Membrane Formation in Their Processes. Biochim Biophys Acta Biomembr, v. 1235, p. 270-280, 1995. doi:10.1016/0005-2736(95)80014-7

Korkmaz, F., Servecan, F. Effect of Progesterone on DPPC Membrane: Evidence for Lateral Phase Separation and Inverse Action in Lipid Dynamics. Arch. Biochem. Biophys., v. 440, p. 141-147, 2005. doi: 10.1016/j.abb.2005.06.013

Koynova, R., Caffrey, M. Phases and Phase Transitions of the Phosphatidylcholines. Biochim. Biophys. Acta., v. 1376, p. 91-145, 1998. doi: 10.1016/S0304-4157(98)00006-9

Kreuter, J. Nanoparticles: A Historical Perspective. Int. J. Pharm., v. 331, p. 1-10, 2007. doi: 10.1016 / j.ijpharm.2006.10.021

Kucerka, N., Pencer, J., Nieh, M. P., Katsaras, J. Influence of Cholesterol on the Bilayer Properties of Monounsaturated Phosphatidylcholine Unilamellar Vesicles. Eur. Phys. J. E Soft Matter., v. 23, p. 247-254, 2007. doi: 10.1140 / epje / i2007-10202-8

Laskowitz, D. T., Thekdi A. D, Thekdi, S. D., Han, S. K., Myers, J. K., Pizzo, S. V, Bennett, E. R. Downregulation of Microglial Activation by Apolipoprotein E and ApoEmimetic Peptides. Exp. Neurol., v. 167, p. 74-85, 2001. doi: 10.1006 / exnr.2001.7541

Laverman, P., Boerman, O. C., Oyen, W. J. G., Dams, E. Th. M., Storm, G., Corstens, F. H. M. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. Adv. Drug Del. Rev., v. 37, p. 225-235, 1999. doi: 10.1016/s0169-409x (98) 00095-7

Lee, D. C., Chapman, D. Infrared Spectroscopic Studies of Biomembranes and Model Membranes. Biosci. Rep., v. 6, p. 235-256, 1986. doi: 10.1007 / bf01115153

Lee, G. K., Park, H. J., Macleod, M., Chandler, P., Munn, D. H., Mellor, A. L. Tryptophan Deprivation Sensitizes Activated T Cells to Apoptosis Prior to Cell Division. Immunology., v. 107, p. 452-460, 2002. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01526.x

Legrand, P., Barratt, G., Mosqueira, V., Fessi, H., Devissaguet, J.-P. Polymeric Nanocapsules as Drug Delivery Systems: A Review. S.T.P. Pharma Sci., Paris v.9, p.411-418, 1999.

Leite, D. de O., Prado, R. J. Espectroscopia no Infravermelho: Uma Apresentação ara o Ensino Médio. Revista Brasileira de Ensino de Física., v. 34, 2012. doi:10.1590/s1806-11172012000200015

Levy, G., Peat, I. The Experimental Approach to Accurate Carbon-13 Spin-lattice Relaxation Measurements. J. Magn. Reson., v. 18, p. 500-521, 1978. doi: 10.1016/0022-2364(75)90106-7

Lis, H., Sharon, N. Lectins as molecules and as tools. Anual Review of Biochemistry., v. 55, p. 35-67, 1986. doi: 10.1146 / annurev.bi.55.070186.000343

Lin, Y.-L., Chang, H.-Y., Sheng, Y.-J., & Tsao, H.-K. Structural and Mechanical Properties of Polymersomes Formed by Rod–Coil Diblock Copolymers. Soft Matter., v. 9, p. 4802, 2013. doi:10.1039/c3sm00051f

Liu, C., Zhou, Q., Li, Y., Garner, L. V., Watkins, S. P., Carter, L. J., Smoot, J., Gregg, A. C., Daniels, A. D., Jervey, S. Albaiu, D. Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. ACS Cent. Sci., 2020. doi:10.1021/acscentsci.0c00272

Le Floc'h, N., Otten, W., Merlot, E. Tryptophan Metabolism, From Nutrition to Potential Therapeutic Applications., v. 41, p. 1195-1205, 2010. doi: 10.1007 / s00726-010-0752-7

Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. Princípios de Bioquímica. 2^a. Ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

Lepore, L. S., Ellena, J. F., Cafiso, D. S. Comparison of the Lipid Acyl Chain Dynamics Between Small and Large Unilamellar Vesicles. Biophys. J., v. 61, p. 767-775, 1992. doi: 10.1016 / s0006-3495 (92) 81881-7

Lewis, R. N A. H., McElhaney, R. N. The Structure and Organization of Phospholipid Bilayers as Revealed by Infrared Spectroscopy. Chem. Phys. Lipids., v. 96, p. 9-21, 1998. doi: 10.1016/S0009-3084(98)00077-2

Lopes, W. A.; Fascio, M. Esquema Para Interpretação de Espectros De Substâncias Orgânicas na Região do Infravermelho. Quím Nova, v. 27, p. 670-673, 2004. doi: 10.1590/S0100-40422004000400025.

Mai, Y., Zhang, F., Feng, X. Polymer-Directed Synthesis of Metal Oxide-Containing Nanomaterials for Electrochemical Energy Storage. Nanoscale., v. 6, p. 106-121, 2014. doi:10.1039/c3nr04791a

Mannock, D. A., Lewis, R. N. A. H., McElhaney, R. N. A. Calorimetric and Spectroscopic Comparison of the Effects of Ergosterol and Cholesterol on the Thermotropic Phase Behavior and Organization of Dipalmitoylphosphatidylcholine Bilayer Membranes. Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes, v. 1798, p. 376-388, 2010. doi: 10.1016 / j.bbamem.2009.09.002

Mantsch, H. H., McElhaney, R. N. Phospholipid Phase Transitions in Model and Biological Membranes a Studied by Infrared Spectroscopiy. Chem. Phys. Lipids., v. 57, p. 213-226, 1991. doi:10.1016/0009-3084(91)90077-o

Maria, T. M. R., Nunes, R. M. D., Pereira, M. M., Eusébio, M. E. S. Argilas como catalisadores verdes na esterificação do colesterol: caracterização espectroscópica e identificação de polimorfos por métodos de análise térmica. Uma proposta laboratorial interdisciplinar para o 1° ciclo universitário. Quím. Nova., v. 32, p. 2225-2229, 2009. doi:10.1590/s0100-40422009000800040

Marsh, D., Watts, A., Knowles, P. F. Coooperativity of the Phase Transition in Single and Multiplayer Lipid Vesicules. Biochim. Biophys. Acta., v. 465, p. 500-514, 1977. doi:10.1016/0005-2736(77)90268-1

Marson, F. A. L., Ortega, M. M. COVID-19 in Brazil. Pulmonology. Pulmonol., v. 26 p. 241-256, 2020. doi:10.1016/j.pulmoe.2020.04.008..

Matsuzaki, K., Murase, O., Sugishita, K. Yoneyama, S., Akada, K., Ueha, M., Nakamura, A., Kobayashi, S. Optical Characterization of Liposomes by Right Angle Light Scattering and Turbidity Measurement. Biochim. Biophys. Acta., v. 1467, p. 219-226, 2000. doi: 10.1016/S0005-2736(00)00223-6

Medeiros, Jorge de; Kanis, Luiz Alberto. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de Mikania glomerata Spreng., Asteraceae, e Passiflora edulis Sims, Passifloraceae. Rev. bras. Farmacogn., v. 20, p. 796-802, 2010. doi:10.1590/S0102-695X2010005000001

Melo, J. O. F., Donnici, C. L., Augusti, R., Ferreira, V. F., DE Sousa, M. C. B. V., Ferreira, M. L. G., Cunha, A. C. Heterociclos 1,2,3-Triazólicos: Histórico, Métodos de Preparação, Aplicações e Atividades Farmacológicas. Quím. Nova., v. 29, p. 3, 2006. doi: 10.1590/S0100-40422006000300028

Mertins O., Sebben, M., Pohlmann, A. R., Silveira, N. P. Production of Soybean Phosphatidylcholine–Chitosan Nanovesicles by Reverse Phase Evaporation: A Step by Step Study. Chem. Phys. Lipids., v. 138, p. 29-37, 2005. doi: 10.1016 / j.chemphyslip.2005.07.004 McElhaney, R. N. The Use of Differential Scanning Calorimetry and Differential Thermal Analysis in Studies of Model and Biological Membranes. Chem. Phys. Lipids., v. 30, p. 229-259, 1982. doi: 10.1016 / 0009-3084 (82) 90053-6

Michelleto, Y. M. S., Silveira, N. P., Barboza, D. M., Santos, M. C., DE Lima, V. R., Giacomelli, F. C., Martinez, J. C. V., Frizon, T. E. A., Dal-Bó, A. G. Investigation of Self-Association Between New Glycosurfactant N-Acetyl-β-D-Glucosaminyl-PEG-Docosanate and Soybean Phosphatidylcholine Into Vesicles. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects., v. 467, p. 166-172, 2015. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.11.052

Milhaud, J. New Insights Into Water? Phospholipid Model Membrane Interactions. Biochim. Biophys, Acta., v. 1663, p. 19-51, 2004. doi:10.1016/s0005-2736(04)00047-1

Miranda, A., Figueiras, A. R. R. Nanotechnology Applications in Forum Neurological Diseases: Benefits and Challenges. Boletim Informativo Geum., v. 5, p.14-30, 2014.

Mishra, P. R., Al Shaal, L., Müller, R. H., Keck, C. M. Production and Characterization of Hesperetin Nanosuspensions for Dermal Delivery. Int. J. Pharm., v. 371, p. 182-189, 2009. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.12.030

Moreno, M. M., Garidel, P., Suwalsky, M., Howe, J., Brandenburg, K. The Membrane-Activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A Physico-Chemical Study with Lecithin Phospholipids. Biochim. Biophys. Acta., v. 1788, p. 1296-1303, 2009. doi: 10.1016 / j.bbamem.2009.01.016

Moreno, M. M., Howe, J., Suwalsky, M., Garidiel, P., Brandenburg, K. Phisicochemical Interation Study of Non-Steroidal Anti-Inflamatory Drugs with Dimyristoylphosphatidylethanolamine Liposomes. Lett. Drug Des. Discovery., v. 7, p. 50-56, 2010. doi: 10.2174 / 157018010789869280

Moura, A. C. S., Vilegas, W., dos Santos, L. C., Identificação de Alguns Constituintes Químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) Por CLAE-IES-EM (TOF) e Avaliação da Atividade Antirradicalar. Quim. Nova., v. 7, p. 1136-1140, 2011. doi: 10.1590/s0100-40422011000700006

Müller-Goymann, C. C. Physicochemical Characterization of Colloidal Drug Delivery Systems such as Reverse Micelles, Vesicles, Liquid Crystals and Nanoparticles for Topical Administration. Eur J Pharm Biopharm, v. 58, p. 343-356, 2004. doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.028

Müller, K., Nahde, T., Fahr, A., Müller, R., & Brüsselbach, S. Highly Efficient Transduction of Endothelial Cells by Targeted Artificial Virus-Like Particles. Cancer Gene Therapy., v. 8, p. 107-117, 2001. doi:10.1038/sj.cgt.7700280

Nagle, J. F. Theory of the Main Lipid Bilayer Phase Transition. Annual Review of Physical Chemistry., v. 31, p. 157-196, 1980. doi: 10.1146 / annurev.pc.31.100180.001105

Nahar M, Dutta T, Murugesan S, Asthana A, Mishra D, Rajkumar V. Functional Polymeric Nanoparticles: An Efficient and Promising Tool for Active Delivery of Bioactives. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst., v. 23, p. 259-318, 2006. doi: 10.1615 / critrevtherdrugcarriersyst.v23.i4.10.

Naoi, M., Naoi, M., Shimizu, T., Malviya, A., Yagi, K. Permeability of Amino Acids Into Liposomes. Biochim Biophys Acta Biomembr., v. 471, p. 305-310, 1977. doi:10.1016/0005-2736(77)90258-9

New, R. R. C. Liposomes: a Pratical Approach. Oxford: Oxford University Press, 1997.

Nobre, A. F. S., Sousa, R. C. M., Santos, M. C., Barbagelata, L. S., Júnior, E. C., Lima, D. F., Souza, E. M. A., Mello, W. A. Primeira Detecção de Coronavírus Humano Associado à Infecção Respiratória Aguda na Região Norte do Brasil. Rev Pan-Amaz Saude., v. 5, p. 37-41-10, 2014. doi: 5123/S2176-62232014000200005

Noggle, J. H., Schirmer, R. E. The Nuclear Overhauser Effect, Academic Press, New York, 1971.

Oliveira, B. A., França, E. S., Souza, V. G., Vallinoto, A. C. R., Da Silva, A. N. M. R. Vetores Virais para Uso em Terapia Gênica. Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua., v. 9, p. 57-66, 2018. http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232018000200008

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. R. Introdução à Espectroscopia. Tradução da 4ª Ed. note-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

Pfeiffer, H., Weichert, H., Klose, G., Heremans, K. Hydration Behaviour of POPC/C12-Bet Mixtures Investigated by Sorption Gravimetry, ³¹P NMR Spectroscopy and X-Ray Diffraction. Chem Phys Lipids., v. 165, p. 244-251, 2012. doi:10.1016/j.chemphyslip.2012.01.004

Pinnapireddy, S., Raafat El Assy, M., Schlote, P., Bakowsky, U. Glycosylated Artificial Virus-Like Hybrid Vectors for Advanced Gene Delivery. Polymers., v. 11, p. 243, 2019. doi:10.3390/polym11020243

Pinto, L. S., Neto, M. A., Bacarin, M. A., Castellón, R. R., Gadelha, T. S., Gadelha, C. A., Cavada, B. S. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata L.* Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental., v. 9, p. 385-390, 2005. doi: dx.doi.org/10.1590/S1415-43662005000300014

Popova, A. V., Hincha, D. K. Thermotropic Phase Behavior and Headgroup Interactions of the Nonbilayer Lipids Phosphatidylethanolamine and Monogalactosyldiacylglycerol in the Dry State. BMC Biophysics., v. 4, p. 2-11, 2011. doi: 10.1186/2046-1682-4-11

Porjazoska, A., Goracinova, K., Mladenovska, K., GlavaL, M. Poly(DL-lactide-co-glycolide) Microparticles as Systems for Controlled Release Of Proteins – Preparation and Characterization. Acta Pharm., v. 54, p. 215-229, 2004.

Provencher, S. W. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations., v. 27, p. 229-242, 1982. doi:10.1016/0010-4655(82)90174-6

Qiu, D., An, X., Chen, Z., Ma, X. Microstructure Study of Liposomes Decorated by Hydrophobic Magnetic Nanoparticles. Chemistry and Physics of Lipids., v. 165, p. 563–570, 2012. doi:10.1016/j.chemphyslip.2012.06.004

Qiu, L. Y., Bae, Y. H. Polymer Architecture and Drug Delivery. Pharm. Res., v. 23, p. 1-30, 2006. doi:10.1007/s11095-005-9046-2

Ramamoorth, M; Narvekar, A. Non Viral Vectors in Gene Therapy- an Verview. J Clin Diagn Res., v. 9, GE01-GE6, 2015. doi:10.7860/JCDR/2015/10443.5394

Riske, K. A., Perez, K. R. Entre Sólidos e Líquidos - Uma Visão Contemporânea e Multidisciplinar- Para a Formação de Professores e Divulgação do Conhecimento. Ed. Livraria da Física., Ed 1. p. 167-191, 2014.

Rizzo, T. R., Park, Y. D., Peteanu, L. A., Levy, D. H. The Electronic Spectrum of the Amino Acid Tryptophan in the Gas Phase. Int. J. Chem. Phys., v. 84, p. 2534-2541, 1986. doi:10.1063/1.450323

Rösler, A., Vandermeulen, G. W., Klok, H.-A. Advanced Drug Delivery Devices Via Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers. Adv. Drug Deliv. Rev., v. 53, p. 95-108, 2001. doi: 10.1016 / s0169-409x (01) 00222-8

Ross, P. D., Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. Biochemistry, v. 20, p. 3096–3102, 1981. doi:10.1021/bi00514a017

Sánchez, V., S., Rabasco, A. M., González-Rodríguez, M. L. Thermal and ³¹P-NMR Studies to Elucidate Sumatriptan Succinate Entrapment Behavior in Phosphatidylcholine/Cholesterol Liposomes. Comparative ³¹P-NMR Analysis on Negatively and Positively-Charged Liposomes. Colloid Surface B., v. 105, p. 14-23, 2013. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.12.019

Sathappa, M., Alder, N. N. Ionization Properties of Phospholipids Determined by Zeta Potential Measurements. Bio-protocol., e2030, p. 6, 2016. doi:10.21769/BioProtoc.e2030

Schaffazick, S. R., Guterres, S. S., Freitas, L. de L., Pohlmann, A. R. Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. Quím Nova, v. 26, p. 726-737, 2003. doi:10.1590/s0100-40422003000500017

Seelig, J. ³¹P Nuclear Magnetic Resonance and the Head Group Structure of Phospholipids in Membranes. Biochim. Biophys. Acta., v. 515, p. 105-140, 1978. doi: 10.1016/0304-4157(78)90001-1

Servercan, F., Sahin, I., Kazanci, N. Melatonin Strongly Interacts with Zwitterionic Model Membranes-Evidence from Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry, Biochim. Biophys. Acta, v. 1668, p. 215-222, 2005. doi: 10.1016 / j.bbamem.2004.12.009

Sethupathy, M.; Sethuraman, V.; Raj, J. Anandha; Muthuraja, P.; Manisankar, P. Electrospun Polyethylene Oxide (PEO) Nanofiber Membranes Based Polymer Electrolyte for dye Sensitized Solar Cell. AIP Conference Proceedings [AIP Publishing LLC Light and its Interactions witch Matter - Nit, Calicut, Kerala, India 673 601 (19–21 March 2014)]., v.1620, p. 253-257, 2014. doi:10.1063/1.4898250

Sharon, N. Lectins-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. Trends Biochemical Sciences., v. 18, p. 221-226, 1993. doi: 10.1016/0968-0004 (93) 90193-q.

Shaw, D. J. Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies. São Paulo: Edgar Blucher Ltda, 1975.

Sherry, M., Charcosset, C., Fessi, H., Greige-Gerges, H. Essential Oils Encapsulated in Liposomes: A Reviw. J. Liposome Res., v. 23, p. 268-275, 2013. doi: 10.3109 / 08982104.2013.819888

Sivakumar, P. A., Rao, K. P. Polymerized (Ethylene Glycol) Dimethacrylate–Cholesteryl Methacrylate Liposomes: Preparation and Stability Studies. React Funct Polym., v 49, p. 179-187, 2001. doi: 10.1016/s1381-5148 (01) 00061-x

Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 6 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 5 Ed Singapore: John Wiley & Sons: New York, 1991.Smith, B. Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach. New York: CRC Press, 1999.

Singh, A. N., Thakre, R. D., More, J. C., Sharma, P. K., Agrawal, Y. K. Block Copolymer Nanostructures and Their Applications: A Review. Polym Plast Technol Eng., v. 54, p. 1077-1095, 2015. doi:10.1080/03602559.2014.986811

Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. Principles of Instrumental Analysis. Usa: Hartcourt Brace & Company, 1998.

Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E. Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. J Control Release, v. 70, p. 1-20, 2001. doi:10.1016/s0168-3659(00)00339-4

Sousa, R. S., Nogueira, A. O. M., Marques, V. G., Clementin, R. M., Lima, V. R. Effects of α -Eleostearic Acid on Asolectin Liposomes Dynamic: Relevance to its Antioxidante Activity. Bioorganic Chemistry., v. 51, p. 8-15, 2013. doi: 10.1016/j.bioorg.2013.08.004

Souza, H. P., Oliveira, W. T. G. H., Santos, J. P. C., Toledo, J. P., Ferreira, I. P. S., Esashika, S. N. G. S., Lima, T. F. P., Delácio, A. S. Doenças Infecciosas e Parasitárias no Brasil de 2010 a 2017: aspectos para vigilância em saúde. Revista Panamericana de Saúde Pública., e. 10, 2020, v. 44, doi:10.26633/rpsp.2020.10

Spitzer, M., Sabadini, E., Loh, W. Poly(ethylene glycol) or Poly(ethylene oxide)? Magnitude of end-group Contribution to the Partitioning of Ethylene Oxide Oligomers and Polymers between Water and Organic. Phases. J. Braz. Chem. Soc., v. 13, p. 7-9, 2002. doi: org/10.1590/S0103-50532002000100002

Spuch, C., Navarro, C. Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). Int. J. Drug Deliv., p. 1-12, 2012. doi: 10.1155/2011/469679

Sulkowski, W.W., Pentak, D., Nowak, K., Sulkowska, A. The Influence of Temperature, Cholesterol Content and pH on Liposome Stability. J. Mol. Struct., v. 744-747, p. 737-747, 2005. doi: 10.1016/j.molstruc.2004.11.075

Szoka, F., Papahadjopoulos, D. Procedure por Preparation of Liposomes With Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse-Phase Evaporation. PNAS., v. 75, p. 4194-4198, 1978. doi: 10.1073 / pnas.75.9.4194

Tabatt, K., Kneuer, C., Sameti, M., Olbrich, C., Müller, R. H., Lehr, C.-M., Bakowsky, U. Transfection With Different Colloidal Systems: Comparison of Solid Lipid Nanoparticles and Liposomes. J Control Release., v. 97, p. 321-332, 2004. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.02.029

Tamjidi F., Shahedi M., Varshosaz J., Nasirpour A. Nanostructured Lipid Carriers (NLC): A Potential Delivery System for Bioactive Food Molecules. Innovative Food Science and Emerging Technologies., v.190, p. 29-43, 2013. doi: 10.1016/j.ifset.2013.03.002

Timoszyk, A., Gdaniec, Z., Latanowicz, L. The Effect of Polysialic Acid on Molecular Dynamics of Model Membranes Studied by 31P NMR Spectroscopy. Solid State Nucl. Magn. Reson., v. 25, p. 142-145, 2004. doi: 10.1016/j.ssnmr.2003.03.023

Toyran, N., Severcan, F. Competitive Effect of Vitamin D_2 and Ca^{2+} on Phospholipid Model Membranes: an FTIR Study. J. Mol. Struct., v. 123, p. 165-176, 2003. doi: 10.1016/S0009-3084(02)00194-9

Ulrich, A. S. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. Biosci. Rep., v. 22, p. 129, 2002. doi: 10.1023 / a: 1020178304031

Valenti, D., Logu, A. D., Loy, G. Snico, C., Bonsignore, L., Cottiglia, F., Garau, D., Fadda, A. M. Liposome-Incorporated Santolina Insularis Essential Oil: Preparation, Characterization and in Vitro Antiviral Activity. J. Liposome Res., v. 11, p. 73-90, 2001. doi: 10.1081 / LPR-100103171

Van Hove, A. H., Wilson, B. D., Benoit, D. S. W. Microwave-assisted Functionalization of Poly(ethylene glycol) and On-resin Peptides for Use in Chain Polymerizations and Hydrogel Formation. J. Vis. Exp., v. 80, p. 1-15, 2013. doi: 10.3791 / 50890

Van Hoogevest, P., Wendel, A. The Use of Natural and Synthetic Phospholipids as Pharmaceutical Excipients. Eur J Lipid Sci Tech., v. 116, p. 1088-1107, 2014. doi:10.1002/ejlt.201400219

Vilcheze, C., McMullen, T. P. W., McElhaney, R. N., Bittman, R. The Effect of Side Chain Analogues of Cholesterol on the Thermotropic Phase Behavior of 1-Stearoyl-2- Oleoyl-Phosphatidylcholine Bilayers: A Differential Scanning Calorimetric Study. Biochim. Biophys. Acta., v. 1279, p. 235-242, 1996. doi: 10.1016/0005-2736(95)00258-8

Vyas, P. M., Joshi, M. J. Surface Micro Topographical and Dielectric Studies of Cholesterol Crystals. Adv. Mater. Res., v. 665, p. 289–296, 2013. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.665.289

Vyas, P. M., Vasant, S. R., Hajiyani, R. R., Joshi, M. J., Giri, P. K., Goswami, D. K; Perumal, A. Chattopadhyay, A. Synthesis and Characterization of Cholesterol Nano Particles by Using w/o Microemulsion Technique. AIP Conference Proceedings [AIP International Conference on Advenced Nanomaterials and Nanotechnology (ICANN-2009) - Guwahati, Assam (India), p. 198-209, 2010. doi: 10.1063 / 1.3504297

Wang, A., Miller, C. C., Szostak, J. W. Core-Shell Modeling of Light Scattering by Vesicles:Effect of Size, Contents, and Lamellarity. Biophys. J., v.116, p. 659-669, 2019. doi:10.1016/j.bpj.2019.01.006

Wissing, S. A., Müller, R. H. Solid Lipid Nanoparticles as Carrier for Sunscreens: in Vitro Release and in Vivo Skin Penetration. J. Control. Release., v. 81, p. 225-233, 2002. doi: 10.1016 / s0168-3659 (02) 00056-1

Worcester, D. L., Franks N. P. J. Structural Analysis of Hydrated Egg Lecithin and Cholesterol Bilayers II. Neutron Diffraction. Mol. Biol., v. 100, p. 359-378, 1976. doi: 10.1016/S0022-2836(76)80068-X

Yarosh, D. B. Liposomes in Investigative Dermatology Photodermatol Photoimmunol Photomed., Denmark 17, 203-212, 2001. doi: 10.1034/j.1600-0781.2001.170501.x

Yu, B., Danielsen, S. P. O, Patterson, A. L, Davidson, E. C, Segalman, R. A. Effects of Helical Chain Shape on Lamellae-Forming Block Copolymer Self-Assembly. Macromoléculas., 2019. doi: 10.1021 / acs.macromol.9b00211

Zhao, L., Feng, S., Kocherginsky, N., Kostetski, I. DSC and EPR Investigations on Effects of Cholesterol Component on Molecular Interactions Between Paclitaxel and Phospholipid within Lipid Bilayer Membrane. Int. J. Pham., v. 338, p. 258-266, 2007. doi: 10.1016 / j.ijpharm.2007.01.045

Zheng, Y.-Y., Ma, Y.-T., Zhang, J.-Y., & Xie, X. COVID-19 and the Cardiovascular System. Nat. Rev. Cardiol., 2020. doi:10.1038/s41569-020-0360-5

8.1 Mecanismo proposto para a obtenção do polímero Col-PEO-Trip

8.1.1 Mecanismo proposto referente a primeira etapa da rota sintética para a obtenção do hemisuccinato colesteril.

No Esquema 3 em (a) o par de elétrons do oxigênio da molécula de colesterol ataca o carbono da carbonila, e assim rompe a ligação entre o carbono da carbonila e o oxigênio do anidrido succínico. Como consequência, o par de elétrons deste oxigênio captura o hidrogênio da molécula de colesterol, levando à obtenção do hemisuccinato colesteril (b), com um terminal carboxílico ativo.

Esquema 3: Mecanismo proposto: primeira etapa da rota sintética para a obtenção do hemisuccinato colesteril.


8.1.2 Mecanismo proposto referente a segunda etapa da rota sintética para a obtenção do conjugado colesterol-PEO₁₀₀₀.

No esquema 4 em (a) o par de elétrons do átomo de oxigênio da molécula de PEO ataca o carbono da carbonila e, consequentemente, suprindo a eletrodeficiência do oxigênio da carbonila protonada mediante migração dos elétrons π . Em (b) a base (DCC) deprotona o átomo de oxigênio. Em (c) o átomo de um dos álcoois geminal da molécula, captura o hidrogênio da base. Em (d) ocorre a saída de uma molécula de água e, em virtude disto, o elétron do oxigênio da hidroxila forma uma ligação dupla para restaurar a ligação do carbono (e) a base do meio captura o hidrogênio do átomo do oxigênio carbonílico, formando o conjugado colesterol-PEO₁₀₀₀, em (f).

Esquema 4: Mecanismo proposto: segunda etapa da rota sintética para a obtenção do conjugado colesterol-PEO₁₀₀₀.



8.1.3 Mecanismo proposto referente a terceira etapa da rota sintética para a obtenção do novo polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip).

No Esquema 5 em (a) o par de elétrons do átomo de oxigênio do grupo álcool do colesterol-PEO₁₀₀₀, ataca o carbono da carbonila do aa, que está protonada. Em (b) a base deprotona o átomo de oxigênio. A partir do diol geminal em (c), um dos pares de elétrons, de um dos átomos do oxigênio, captura o hidrogênio da base que está no meio em (d)). Em (e) ocorre a saída de uma molécula de água e, posteriormente, o elétron do oxigênio da hidroxila forma uma ligação dupla (f), para restaurar a ligação do carbono, a base do meio captura o hidrogênio deste átomo de oxigênio carbonílico, formando o Col-PEO-Trip, em (g).

Esquema 5: Mecanismo proposto: terceira etapa da rota sintética para a obtenção do novo polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Col-PEO-Trip).





8.2 Espectro de HATR-FTIR, efeito dos polímeros no número de onda e largura de bandas dos principais grupos da membrana lipossomal de Aso

Este anexo mostra tabelas referentes aos estiramentos dos principais grupos que compõem a membrana lipossomal de Aso, observados por HATR-FTIR, e as variações que os polímeros Col-PEO-Trip, Col-PEO-Gal e Col-PEO-GlicNAc proporcionam ao seu respectivo sistema, quanto ao número de onda e largura das bandas dos v_{as} CH₂; v_s CH₂; v C=O, v COC, v_{as} PO₂⁻ e v_{as} N⁺(CH₃).

8.2.1 Atribuições das bandas de estiramentos e suas variações: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Trip

Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)			Largura de bandas (cm ⁻¹)		
Lipossomos	Aso	Aso+Col-PEO-Trip	∆ (cm ⁻¹)	Aso	Aso+Col-PEO-Trip	Δ (cm ⁻¹)
vas CH ₂	2983,88	2958,80	25,08	13,10	8,27	4,83
v _s C=O	1691,57	1685,79	5,78	27,58	6,20	21,38
v _s COC	1095,57	1080,14	15,43	23,44	3,45	19,99
vas PO ₂ -	1222,87	1224,80	1,93	18,62	5,51	13,11
$v_{as} N^+ (CH_3)_3$	993,34	964,41	28,93	13,79	6,20	7,59

Tabela 10: Variação de número de onda e largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e lipossomos de Aso contendo o polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-triptofano (Aso+Col-PEO-Trip), em cm⁻¹.

As variações da largura de banda foram calculadas a $\frac{3}{4}$ da altura do pico; Δ , variação.

8.2.2 Atribuições das bandas de estiramentos e suas variações: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-Gal

Tabela 11: Variação de número de onda e largura de bandas de grupos específicos, p	resentes nos lipossomos de asolecitina de
soja (Aso) e lipossomos de Aso contendo o polímero colesterol-PEO ₁₀₀₀ -1,2,3-triazol-	galactose (Aso+Col-PEO-Gal), em cm ⁻¹ .

Grupo funcional	upo funcional Número de onda (cm ⁻¹)			Largura de bandas (cm ⁻¹)		
Lipossomos	Aso	Aso+Col-PEO-Gal	∆ (cm ⁻¹)	Aso	Aso+Col-PEO-Gal	∆ (cm ⁻¹)
vas CH ₂	2983,88	2945,30	38,58	13,10	8,27	4,83
<i>v_s C</i> = <i>O</i>	1691,57	1687,71	3,86	27,58	20,68	6,90
v _s COC	1095,57	1118,71	23,14	23,44	14,48	8,96
$v_{as} PO_2^-$	1222,87	1217,08	5,79	18,62	14,48	4,14
$v_{as} N^+ (CH_3)_3$	993,34	974,05	19,29	13,79	14,48	-

As variações da largura de banda foram calculadas a $\frac{3}{4}$ da altura do pico; Δ , variação.

8.2.3 Atribuições das bandas de estiramentos e suas variações: lipossomos de Aso e Aso+Col-PEO-GlicNAc

Tabela 12: Variação de número de onda e largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de asolecitina de soja (Aso) e lipossomos de Aso contendo o polímero colesterol-PEO₁₀₀₀-1,2,3-triazol-n-acetiglicosamina (Aso+Col-PEO-GlicNAc), em cm⁻¹.

Grupo funcional	Número de onda (cm ⁻¹)			Largura de bandas (cm ⁻¹)		
Lipossomos	Aso	Aso+Col-PEO- GlicNAc	∆ (cm ⁻¹)	Aso	Aso+Col-PEO- GlicNAc	∆ (cm ⁻¹)
vas CH2	2983,88	Banda de v CH ₂ em	-	-	-	-
vs CH2	2837,29	2991,11, 2953,02, 2910,58 e 2868,15	-	-	-	-
$v_s C=O$	1691,57	1681,93	9,64	27,58	20,68	6,9
v _s COC	1095,57	1055,42	40,15	23,44	27,58	4,14
$v_{as} PO_2^-$	1222,87	1222,87	-	18,62	5,51	13,11
$v_{as} N^+ (CH_3)_3$	993,34	964,41	28,93	13,79	13,79	-

As variações da largura de banda foram calculadas a $\frac{3}{4}$ da altura do pico; Δ , variação.