



**FURG**

**Dissertação de Mestrado**

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA GENISTEÍNA EM MEMBRANAS DE  
ASOLECITINA DE SOJA: CORRELAÇÃO COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

---

**CARLA ROBERTA LOPES DE AZAMBUJA**

**PPGQTA**

**Rio Grande, RS - Brasil**

**2014**

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA GENISTEÍNA EM MEMBRANAS DE  
ASOLECITINA DE SOJA: CORRELAÇÃO COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

**por**

**CARLA ROBERTA LOPES DE AZAMBUJA**

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

Rio Grande, RS – Brasil

2014



*De tudo ficaram três coisas:*

*A certeza de que estamos sempre começando,*

*A certeza de que é preciso sempre continuar,*

*A certeza de que seremos interrompidos antes de  
terminar...*

*Por isso devemos fazer da interrupção um novo  
caminho;*

*Da queda, um passo de dança;*

*Do medo, uma escada;*

*Do sonho, uma ponte;*

*Da procura, um encontro.*

Fernando Pessoa

Dedico este trabalho aos homens da minha vida  
Pietro Moraes e Maurício Borges, por serem a  
minha razão para lutar e por tornarem a minha  
vida tão perfeita. Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, por me guiar e não me deixar desamparada nem por um segundo, e principalmente por me dar forças e não me deixar fraquejar.

À minha querida orientadora, Vânia Rodrigues de Lima, que muito além de uma orientadora, sempre foi uma educadora, amiga, protetora, muito obrigada por ter me ouvido, me acalmado e me inserido neste mundo da pesquisa com tanta sabedoria, minha gratidão e eterna admiração pela excelente profissional que a considero.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse possível e para meu crescimento, muito obrigada.

Ao meu co-orientador Alexandre Parize, não só pela contribuição no surgimento deste projeto, que tem me trazido tantas alegrias, mas também por ser extremamente atencioso todas as vezes que eu precisei e pelas análises de DLS e Potencial Zeta.

Aos professores membros da banca avaliadora, muito obrigada, por terem aceitado contribuir com o meu trabalho, aos professores Daniela Bianchini (UFPEL) e João Cardoso de Lima (UFSC), pelas análises de DSC; Alex Fabiani Claro Flores (FURG) pelas análises de RMN  $^{31}\text{P}$ ; Elizandra Braganhol, Luciano Pinto (UFPEL) e Ana Paula Horn (FURG) e sua aluna de doutorado, Elita Silveira pelos ensaios biológicos e ao Dr. Juliano da Rosa Menezes Vicente (FURG), pelas análises de RMN  $^1\text{H}$  e por todos os desabafos e apoio ao longo de toda a minha carreira acadêmica.

À Universidade Federal do Rio Grande e à Escola de Química e Alimentos pelo espaço cedido para que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

Ao meu amado filho, Pietro Lopes de Azambuja Moraes, por ser tão compreensivo com essa minha correria, por ser o menino mais carinhoso e maravilhoso do mundo e por me dar tanto incentivo, mesmo sem saber.

Ao meu noivo, marido, amigo, confidente e companheiro Maurício Cabreira Borges, por ter reaparecido na minha vida, enchendo ela de magia e cor. Por ser o meu maior incentivador, sempre com uma frase de apoio, um sorriso iluminado e o abraço

mais acolhedor do mundo, por passar as madrugadas em claro comigo, me abastecendo à café e chimarrão para que o sono não me vença, por cuidar do meu filho como se fosse seu, por ser o melhor companheiro do mundo e por outros infinitos motivos que me falta espaço para descrever e agradecer. Amo-te meu príncipe.

À minha mãe, Delvaira Lopes, porque sem seu apoio e torcida, tudo teria sido infinitamente mais difícil. Por todos os sacrifícios que passou para que eu alcançasse meus objetivos e por acreditar tanto na minha capacidade. Te amo minha pequena.

À minha amiga-irmã, nora e eterna companheira Muriele Pinho, por ser a melhor amiga do mundo, por estar sempre presente, mesmo distante e por ser meu melhor presente herdado da FURG. Te amo muito, linda, sempre juntas.

Às minhas amigas, companheiras de estudos Sabrina Rosa e Valéria Cavalheiro pela companhia, risadas e muitas noitadas de espectros e aos meus amigos especiais Bárbara Moraes e Reginaldo Terra, que estão sempre presentes, torcendo pela minha vitória. Amo vocês.

Ao anjo que Deus colocou na minha vida, minha amiga, companheira, confidente e comadre Samantha Primeira Mendes, por ter sido o meu braço direito, por me ouvir e por ser tão especial na minha vida, e ao meu cunhado preferido Daniel Borges, amigo de anos, por terem confiado a mim seu bem mais precioso, o meu amado afilhadinho Gustavo Borges, amo vocês.

À minha amada sogra e amiga, Carmen Borges por todas as orações e palavras amigas, por me apoiar sempre e torcer por minha vitória. Amo tu minha querida.

Ao meu grupo de pesquisa GIIMM, em especial aos queridos amigos Marisa Rodrigues (por toda a sua ajuda e carinho) e Robson Simplício e ao seu companheiro Julião por toda a ajuda, por todas as risadas e companhia no lab até a noite. Adoro vocês.

Ao pai do meu filho, Alexandre Moraes e sua esposa Jéssica Martins, por sempre estarem dispostos a ajudar com a criação e cuidados do Pepeto.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
2.1. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	20
2.2. FLAVONÓIDES E ISOFLAVONAS.....	23
2.3. GENISTEÍNA.....	27
2.4. LIPOSSOMOS.....	28
2.5. TÉCNICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA MOLECULAR DE MEMBRANAS.....	33
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1. REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	39
4.2. MÉTODOS.....	40
4.2.1. <i>Preparação dos Lipossomos de ASO e Incorporação da Genisteína</i> .....	40
4.2.2. <i>Determinação da Concentração de Genisteína Incorporada em Lipossomos</i> .....	41
4.2.3. <i>Ensaio de Peroxidação Lipídica nas Membranas</i> .....	42
4.2.4. <i>Ensaio Anti-Tumorais</i> .....	44
4.2.4.1. <i>Cultura Celular e Tratamento com Genisteína</i> .....	44
4.2.4.2. <i>MTT Ensaio de Viabilidade Celular</i> .....	44
4.2.4.3. <i>Análise Estatística</i> .....	45
4.2.5. <i>Ensaio de HATR-FTIR</i> .....	45
4.2.6. <i>Medidas de RMN (<math>T_1</math>)</i> .....	46
4.2.7. <i>Ensaio de DSC</i> .....	47
4.2.8. <i>Ensaio de Turbidez</i> .....	47
4.2.9. <i>Caracterização do Diâmetro e Potencial Zeta</i> .....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>48</b>
5.1. QUANTIFICAÇÃO DE GENISTEÍNA INCORPORADA EM MEMBRANAS DE ASO.....	48
5.2. INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA <i>IN VITRO</i> DE LIPOSSOMOS DE ASO.....	49
5.3. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SISTEMAS LIPOSSOMAIIS CONTENDO GENISTEÍNA: ASO.....	51
5.4. INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA NA DINÂMICA LIPÍDICA DE LIPOSSOMOS DE ASO.....	52
5.4.1. <i>Interação da Genisteína com a Região Polar de Lipossomos de ASO</i> .....	54
5.4.2. <i>Interação da Genisteína com a Região Interfacial de Lipossomos de ASO</i> .....	61
5.4.3. <i>Interação da Genisteína com a Cadeia Acil de Lipossomos de ASO</i> .....	62
5.5. MEDIDAS DE TURBIDEZ.....	66

5.6. GENISTEÍNA: CORRELAÇÕES ENTRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS VS EFEITOS NA DINÂMICA MOLECULAR DE MEMBRANAS .....	68
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

---

FIGURA 1. REAÇÕES DE FENTON E HABER- WEISS.....	21
FIGURA 2. ESQUEMA DE LIPOPEROXIDAÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS. ....	22
FIGURA 3. ESQUEMA DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS ( <b>COM GRUPOS FUNCIONAIS EM DESTAQUE</b> ) QUE SÃO IMPORTANTES PARA O SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES.....	24
FIGURA 4. ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ISOFLAVONAS ENCONTRADAS NA SOJA.....	25
FIGURA 5. ESTRUTURA QUÍMICA DE ISOFLAVONAS NAS FORMAS GLICOSILADA E AGLICONA ENCONTRADAS NOS GRÃOS DE SOJA.....	26
FIGURA 6. ESTRUTURA DA GENISTEÍNA.....	27
FIGURA 7. CORTE TRANSVERSAL DE UM ESQUEMA DE LIPOSSOMO, DEMONSTRANDO AS CABEÇAS POLARES (EM ROSA) E AS CAUDAS APOLARES (EM AZUL).....	29
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (LUV) E VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUENAS (SUV) E DE VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES (MLV) E DE SUAS RESPECTIVAS BICAMADAS.....	30
FIGURA 9. ESTRUTURA E ESQUEMA DE UMA MOLÉCULA DE FOSFATIDILCOLINA .....	31
FIGURA 10. ESTRUTURA DE FOSFATIDILCOLINA DE SOJA, ONDE R OU R' = ÁCIDO OLEICO (C 18:1), LINOLEICO (C 18:2) E LINOLÊNICO (C 18:3) .....	32
FIGURA 11. ESTRUTURAS DOS ÁCIDOS OLEICO, LINOLEICO, LINOLÊNICO.....	32
FIGURA 12. ESQUEMA DE PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS MULTILAMELARES GRANDES (MLV) PELO MÉTODO DE HIDRATAÇÃO DE VESÍCULAS.....	41
FIGURA 13. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GENISTEÍNA INCORPORADA EM LIPOSSOMOS DE ASO .....	42
FIGURA 14. REAÇÃO ENTRE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA) E MALONILDIALDEÍDO (MDA) PARA FORMAR UM ADUTO DE COLORAÇÃO RÓSEA.....	43
FIGURA 15. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE HATR-FTIR.....	46
FIGURA 16. CONCENTRAÇÃO MÁXIMA DE GENISTEÍNA INCORPORADA EM LIPOSSOMOS DE ASO.. ....	48

FIGURA 17. INFLUÊNCIA DE CRESCENTES CONCENTRAÇÕES DE GENISTEÍNA INCORPORADA EM LIPOSSOMOS DE ASO NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA TOTAL, INDUZIDA POR RADICAL HIDROXIL ( $\cdot\text{OH}$ ). OS RESULTADOS FORAM OBTIDOS PELO MÉTODO DE TBARS..	50
FIGURA 18. INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA, NA FORMA LIVRE E INCORPORADA EM LIPOSSOMOS DE ASO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, NA VIABILIDADE CELULAR DAS LINHAGENS C6 (A) E MCF-7 (B).....	52
FIGURA 19. ESPECTROS DE HATR-FTIR DE FOSFATIDILCOLINA PRESENTE EM LIPOSSOMOS DE ASO PURO E NA PRESENÇA DE GENISTEÍNA EM UMA RAZÃO M/M GENISTEÍNA: ASOLECITINA (GN:ASO) DE 0,13.....	53
FIGURA 20. AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE HATR-FTIR DE FOSFATIDILCOLINA PRESENTE EM LIPOSSOMOS DE ASO PUROS E NA PRESENÇA DE GENISTEÍNA (484 $\mu\text{M}$ ) NA REGIÃO DO ESTIRAMENTO ASSIMÉTRICO DE $\text{PO}_2^-$ .....	56
FIGURA 21. ESPECTROS DE RMN DE $^{31}\text{P}$ DE LIPOSSOMOS CONTENDO ASO PURA E NA PRESENÇA DE GENISTEÍNA (484 $\mu\text{M}$ ).....	58
FIGURA 22. CURVAS REFERENTES À RELAXAÇÃO LONGITUDINAL ( $T_1$ ) DOS HIDROGÊNIO DA COLINA EM LIPOSSOMOS DE ASO NA AUSÊNCIA (ASO) E NA PRESENÇA DE GENISTEÍNA (GN: ASO 0,13).....	59
FIGURA 23. DIFERENTES ORIENTAÇÕES DOS GRUPOS COLINA E FOSFATO.....	60
FIGURA 24. AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE HATR-FTIR DE FOSFATIDILCOLINA PRESENTE EM LIPOSSOMOS DE ASO PUROS E NA PRESENÇA DE GENISTEÍNA (484 $\mu\text{M}$ ) NA REGIÃO DA C=O.....	62
FIGURA 25. AMPLIAÇÃO DOS ESPECTROS DE HATR-FTIR DE FOSFATIDILCOLINA PRESENTE EM LIPOSSOMOS DE ASO PUROS E NA PRESENÇA DE GENISTEÍNA (484 $\mu\text{M}$ ) NA REGIÃO DO $\nu_s \text{CH}_2$ (2854,05 $\text{cm}^{-1}$ ).....	63
FIGURA 26. TEMPO DE RELAXAÇÃO LONGITUDINAL ( $T_1$ ) DE $^1\text{H}$ DO $\text{CH}_2$ DE ASO NA AUSÊNCIA (QUADRADOS ABERTOS) E NA PRESENÇA (CÍRCULOS ABERTOS) DE GENISTEÍNA.....	64
FIGURA 27. CURVAS DE DSC PARA LIPOSSOMOS DE ASO COM E SEM GENISTEÍNA INCORPORADA.....	65
FIGURA 28. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GENISTEÍNA SOBRE A TURBIDEZ DE LIPOSSOMOS DE ASO....	66
FIGURA 29. GENISTEÍNA: CORRELAÇÕES ENTRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS vs EFEITOS NA DINÂMICA MOLECULAR DE MEMBRANAS DE ASO.....	69
FIGURA 30. ESQUEMA GERAL E SIMPLIFICADO DOS EFEITOS DA GENISTEÍNA NA DINÂMICA DE LIPOSSOMOS DE ASO.....	72

## LISTA DE TABELAS

---

---

TABELA 1. TAXAS DE INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL E NA CAPITAL PORTO ALEGRE (TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA POR 100 MIL HABITANTES).....	18
TABELA 2. DESLOCAMENTOS NA FREQUÊNCIA( $\nu$ ) DE HATR-FTIR PROVOCADOS PELA INCORPORAÇÃO DE GENISTEÍNA EM LIPOSSOMOS DE ASO NUMA RAZÃO Gn: ASO 0,13.....	54
TABELA 3. DESLOCAMENTO NA LARGURA ( $\Gamma$ ) A 75 % DA ALTURA DOS PICOS DE HATR-FTIR REFERENTES A ESTIRAMENTOS AXIAIS DE GRUPOS LIPÍDICOS DE LIPOSSOMOS DE ASO, PROVOCADO PELA INCORPORAÇÃO DE GENISTEÍNA (GN: ASO 0,13).....	57
TABELA 4. INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA NOS VALORES DE VARIAÇÃO DE ENTALPIA ( $\Delta H$ ) DA ASO .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

---

ASO, asolecitina de soja, do inglês *asolectin soybean*.

DLS, espalhamento de luz dinâmico.

DSC, calorimetria de varredura diferencial, do inglês *differential scanning calorimetry*.

FTIR, infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*.

Gn, genisteína..

HATR-FTIR, infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada horizontal (do inglês *Horizontal Attenuated Total Reflectance*).

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde.

LUV, vesículas unilamelares grandes, do inglês *large unilamellar vesicles*.

MLV, vesículas multilamelares grandes, do inglês *multilamellar large vesicles*.

MDA, malonildialdeído.

RMN, espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

SUV, vesículas unilamelares pequenas, do inglês *small unilamellar vesicles*.

T<sub>1</sub>, tempo de relaxação longitudinal.

TBA, ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid*.

TBARS, substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*.

T<sub>m</sub>, temperatura de transição de fase.

UV-Vis, espectroscopia no ultravioleta visível, do inglês *ultraviolet-visible spectroscopy*

ΔH, variação de entalpia

v<sub>s</sub>, estiramento simétrico

v<sub>as</sub>, estiramento assimétrico

PC fosfatidilcolina, do inglês *phosphatidylcholine*

## RESUMO

**Título: Caracterização dos efeitos da genisteína em membranas de asolecitina de soja: correlação com atividades biológicas**

**Autora:** Carla Roberta Lopes de Azambuja

**Orientadora:** Profa. Dra. Vânia Rodrigues de Lima

**Co- orientador:** Prof. Dr. Alexandre Luís Parize

Neste estudo, realizou-se a incorporação e caracterização dos efeitos da isoflavona genisteína (Gn) na dinâmica molecular de lipossomos de asolecitina de soja (ASO), por meio de UV-vis, HATR- FTIR, RMN, DSC, potencial zeta e DLS. Os resultados obtidos neste contexto foram correlacionados com dados de atividade da Gn frente à peroxidação *in vitro* induzida por radical hidroxil e testes de viabilidade celular em linhagens celulares de glioma de rato e adenocarcinoma da mama humano, através do ensaio MTT. A concentração de saturação de Gn incorporada em lipossomos de ASO foi detectada em 484  $\mu\text{M}$  (0,13 mg/mL). Nesta concentração, a Gn inibiu a peroxidação lipídica em 90,90%. Os lipossomos contendo genisteína em uma concentração de 20  $\mu\text{M}$  reduziram a viabilidade celular das linhagens de glioma C6 e carcinoma MCF-7 em 25%. Resultados referentes aos ensaios de caracterização indicaram que a genisteína influenciou a dinâmica de diferentes regiões da membrana composta por ASO. Os resultados HATR - FTIR demonstraram que a isoflavona aumentou em 1,93  $\text{cm}^{-1}$  a frequência da banda referente ao estiramento assimétrico do grupo fosfato ( $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ), presente na região polar lipídica, reduzindo o seu grau de hidratação. A Gn também reduziu a largura das bandas de  $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$  em 2,74  $\text{cm}^{-1}$ . Os resultados de  $^{31}\text{P}$  RMN demonstraram que a Gn aumentou a anisotropia de deslocamento químico do grupo fosfato, indicando, junto aos dados obtidos por FTIR, um ordenamento desta região do lipídio. Estudos de RMN indicaram que a genisteína reduziu o valor do tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) de  $^1\text{H}$  da colina lipídica em 0,11 s, demonstrando que a isoflavona aumentou a mobilidade deste grupo polar. Os estudos de cargas na membrana indicaram que a Gn tornou os valores de potencial zeta dos lipossomos,

mais positivos, sugerindo que a isoflavona orienta o grupo colina para um plano superior ao plano do grupo fosfato. Na região de interface da membrana, a Gn reduziu a largura de banda de FTIR referente ao estiramento axial do grupo carbonila ( $\nu$  C=O) em  $2,9\text{ cm}^{-1}$ , ordenando esta região. A Gn reduziu o valor de frequência da banda referente ao estiramento simétrico dos grupos metilênicos presentes na região acil do lipídio ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>) em  $1,33\text{ cm}^{-1}$ . Isto indicou um ordenamento da região hidrofóbica da membrana provocado pela isoflavona. Nesta região, foi observado um aumento em 0,46 s no valor de T<sub>1</sub> do lipídio após incorporação de Gn. Os resultados de DSC demonstraram um aumento no valor de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) das cadeias acil de ASO em 0,09 J/g, induzido por Gn. Tais dados de RMN e DSC indicaram um efeito de ordenamento na região hidrofóbica do lipídio. Estes dados foram confirmados por medidas de turbidez, as quais demonstraram que a isoflavona aumentou o valor de densidade ótica do lipídio em 34,6%. Os resultados obtidos neste trabalho contribuirão com dados e informações referentes à interação de Gn e lipossomos de ASO, importantes para a compreensão de seu mecanismo de ação, bem como para o desenvolvimento de sistemas farmacológicos antioxidantes e antitumorais eficientes e menos tóxicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** genisteína, lipossomos, câncer, FTIR, DSC, RMN.

## ABSTRACT

---

---

**Title:** Effects of genistein in soy asolecitin membranes correlation with biological activities

**Author:** Carla Roberta Lopes de Azambuja

**Advisors:** Profa. Dra. Vania Rodrigues de Lima and Prof. Dr. Alexandre Luís Parize

In this study, the isoflavone genistein (Gn) was incorporated into soy asolecitin liposomes (ASO) and its effects on the membrane molecular dynamics were monitored by UV-vis, HATR-FTIR, NMR, DSC, zeta potential and DLS techniques. These results were then correlated with the Gn activity against the lipid peroxidation induced by hydroxyl radical, as well as with its antitumoral responses in rat glioma and human breast adenocarcinoma cell lines. The Gn saturation concentration on ASO liposomes was detected in 484  $\mu\text{M}$  (0.13 mg/mL). This concentration was sufficient to inhibit the lipid peroxidation in 90.90%. ASO liposomes-loaded genistein at 20  $\mu\text{M}$  decreased C6 glioma and MCF-7 cell viability by 25%. HATR-FTIR results showed that Gn promotes an increase of 1.93  $\text{cm}^{-1}$  in the frequency value related to the asymmetric stretching of lipid phosphate group ( $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ ). This suggests that Gn induced a reduction on the hydration degree of this lipid polar region. The Gn also reduced the bandwidth related to  $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$  in 2.74  $\text{cm}^{-1}$ .  $^{31}\text{P}$  NMR spectra indicated that Gn enhances the chemical shift anisotropy of the ASO phosphate group. The FTIR and NMR results showed a Gn-induced ordering effect in the lipid phosphate region.  $^1\text{H}$  NMR spin-lattice relaxation time ( $T_1$ ) measurements showed that Gn reduced the lipid choline  $T_1$  value in 0.11 s, which indicate an increase in the mobility of this lipid polar group. The Gn reduced the lipid carbonyl vibrational mode ( $\nu \text{C}=\text{O}$ ) bandwidth in 2.9  $\text{cm}^{-1}$ . This suggested that Gn also orders the interfacial region of the lipid. The isoflavone shifted the FTIR frequency related to the symmetric stretching band of lipid acyl methylenes ( $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$ ) in 1.33  $\text{cm}^{-1}$  to lower values. Also, Gn promoted an enhancement of 0.46 s in the acyl chain methylenes NMR  $T_1$  value. The DSC results showed a Gn-induced increase on the

lipidic enthalpy variation value ( $\Delta H$ ) of 0.09 J / g. These results confirmed an ordering effect induced by Gn in the membrane hydrophobic region. This effect was also supported by UV-vis. turbidity analysis, since 484  $\mu\text{M}$  of Gn was sufficient to increase the optical density in 34.6%. Results obtained in this work will contribute with the elucidation of Gn antioxidant and antitumoral mechanism of action as well as to the development of more efficient and less toxic systems to be used in cancer therapy.

**KEYWORDS:** genistein, liposomes, cancer, FTIR, DSC, NMR.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo estudos da Organização Mundial da Saúde, até o ano de 2030, haverá 27 milhões de casos incidentes e 17 milhões de mortes relacionadas ao câncer. No Brasil, foi estimada, para os anos de 2012 e 2013, a ocorrência de aproximadamente 385 mil casos novos que, quando somados aos casos de câncer da pele não melanoma, alcançam o índice de 518.510 casos. A região sul do país ocupa a segunda posição em termos de incidência de cânceres, com 99.580 novos casos/ano. Um estudo das taxas de incidência de câncer no estado do Rio Grande do Sul e na capital Porto Alegre aponta o câncer de próstata como sendo o de maior incidência entre os homens e o câncer de mama, como o de maior incidência entre as mulheres (Tabela 1) (INCA, 2011).

**Tabela 1:** Taxas de incidência de câncer no estado do Rio Grande do Sul e na capital Porto Alegre (taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes) (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde, 2011).

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capital		Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	4.270,00	79,27	640,00	94,33	---	---	---	---
Mama feminina	---	---	---	---	4.610,00	81,07	980,00	125,63

Fonte: Ministério da Saúde: Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. 2012.

O câncer está relacionado a um crescimento descontrolado de células para formar um tumor. Este pode invadir os tecidos adjacentes e se propagar, formando

tumores secundários em outras partes do corpo (CAMERON e PAULING, 1979; TOLONEM, 1990). Essa doença pode ser causada pela aquisição seqüencial de mutações em genes, que podem ser causadas por fatores externos ou hereditários e implicam na proliferação e morte celular. O dano causado ao DNA pode resultar de processos endógenos como erros na duplicação do DNA e instabilidade química de certas bases do DNA ou ainda de interações com agentes exógenos, agentes químicos e biológicos (LÓPEZ- LÁZARO, 2002).

O tratamento convencional do câncer consiste em intervenções cirúrgicas, radioterapia, quimioterapia ou a combinação destes procedimentos. O alvo dos fármacos administrados nos tratamentos quimioterápicos é o ciclo celular, atingindo células com divisão rápida. Sendo assim, a quimioterapia anti-tumoral também atinge as células normais, causando efeitos colaterais que podem ser nocivos para os pacientes, visto que estes já se encontram com a saúde fragilizada (LÓPEZ- LÁZARO, 2002). Alguns autores sugerem que o uso de antioxidantes é interessante como terapia complementar aos pacientes com câncer, já que podem reduzir a toxicidade das drogas quimioterápicas, minimizando assim seus efeitos colaterais (DRISKO *et al.*, 2003).

A produção de espécies reativas de oxigênio está relacionada à carcinogênese e ao estresse oxidativo, crucial para o desenvolvimento do tumor (KHAN *et al.*, 2012). As substâncias antioxidantes também beneficiam a redução do tamanho do tumor. Assim sendo, o estudo destas torna-se importante para promover e desenvolver sistemas farmacológicos mais eficientes e menos tóxicos para o tratamento do câncer (CONKLIN, 2000; SALGANIK *et al.*, 2000).

Neste contexto, diversas pesquisas têm como objetivo investigar a ação de compostos antioxidantes e antitumorais que se encontram nos alimentos como, por exemplo, a soja. Um exemplo destes compostos é a genisteína (Gn). Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que as populações asiáticas, que são grandes consumidoras de soja, apresentam menor incidência de alguns tipos de câncer, como o de mama, próstata e cólon (ESTEVES e MONTEIRO, 2001).

Para melhor compreensão dos mecanismos de ação antioxidante e antitumoral de produtos naturais, que apresentem tal propriedade, e das estratégias para viabilizá-

los como sistemas farmacológicos, torna-se importante estudar as interações entre estas substâncias ativas e modelos de membrana, tais como lipossomos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

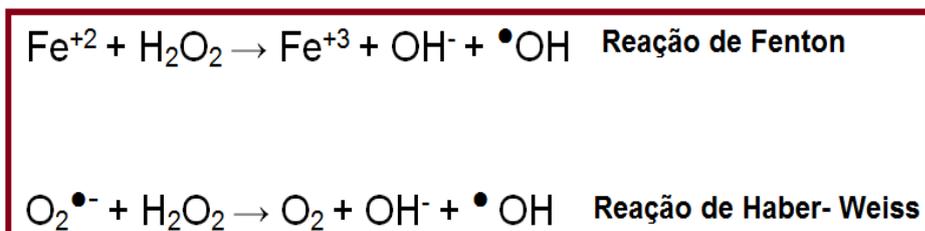
Para maior entendimento sobre o estudo das interações entre substâncias como a Gn e membranas, bem como a correlação com sua atividade antioxidante e antitumoral, estão descritas a seguir informações sobre peroxidação lipídica, flavonóides e isoflavonas, e membranas lipídicas, tais como lipossomos.

### 2.1. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O desequilíbrio entre a geração de radicais livres e os mecanismos de defesa do corpo causa um dano oxidativo que se expande por todos os alvos celulares, tais como DNA, lipídios e proteínas. Assim, umas séries de doenças, incluindo o câncer, estão associadas à ação de radicais livres (DRAGAN *et al.*, 2003).

Um radical livre pode ser definido como um átomo ou molécula que possui pelo menos um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica. O elétron desemparelhado aumenta a reatividade do seu respectivo átomo (AHSAN *et al.*, 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984).

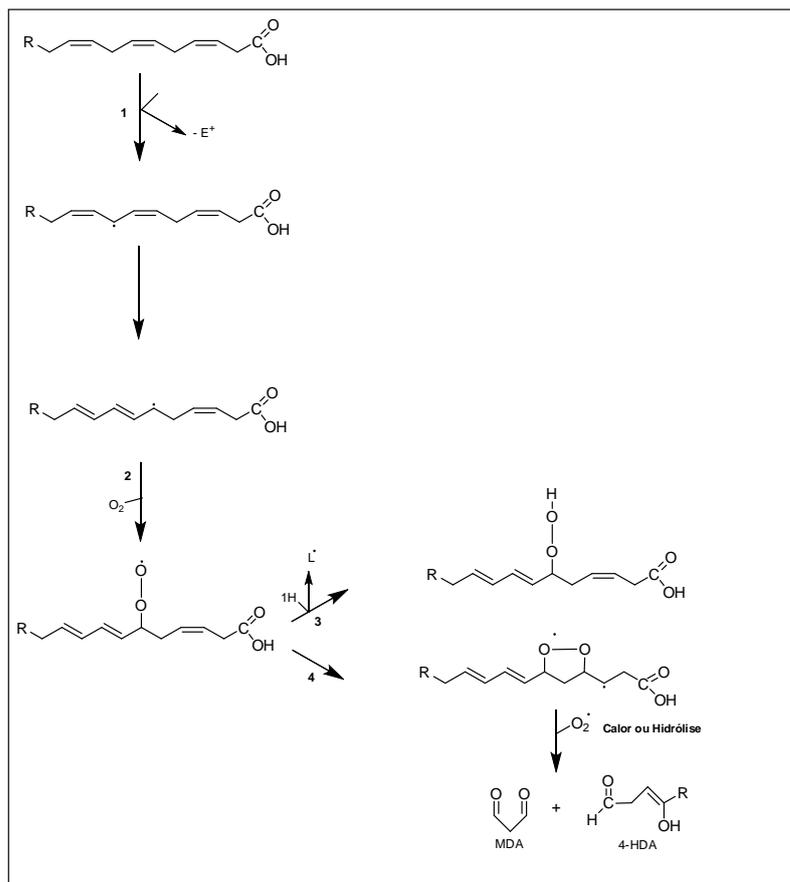
O radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), uma espécie reativa de oxigênio, possui um dos maiores potenciais oxidativos, sendo gerado *in vivo* a partir da redução monovalente de uma molécula de  $\text{O}_2$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000; KLEINVELD *et al.*, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1992). O  $\bullet\text{OH}$  pode ser produzido também, em sistemas biológicos, a partir da reação de Fenton/ Haber-Weiss (STADTMAN, 1992; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1992; LIOCHEV e FRIDOVICH, 2002; KOPPENOL, 2002). As reações de Fenton e Haber-Weiss estão apresentadas na Figura 1.



**Figura 1:** Reações de Fenton e Haber- Weiss.

O processo de lipoperoxidação em membranas ocorre em três etapas principais: iniciação, propagação e terminação (Figura 2). A etapa de iniciação geralmente acontece quando uma espécie reativa abstrai um hidrogênio da cadeia poli-insaturada de lipídios da membrana (GARDNER, 1989; KOPPENOL, 1990).

Após a abstração do hidrogênio, é formada uma nova espécie radical centrada no carbono e essa nova espécie pode interagir com  $\text{O}_2$  para formar um radical lipídico peroxil. Tal radical lipídico pode abstrair um átomo de hidrogênio de um segundo ácido graxo, gerando, assim, outro radical centrado no carbono e um radical hidroperóxido. A ciclização do peroxil pode ocorrer, formando um peróxido cíclico, que pode sofrer rearranjos a endoperóxidos. A etapa de propagação é caracterizada pelas reações descritas a partir da formação de radical peroxil (GARDNER, 1989; KOPPENOL, 1990).



**Figura 2:** Esquema de lipoperoxidação em ácidos graxos poli-insaturados.

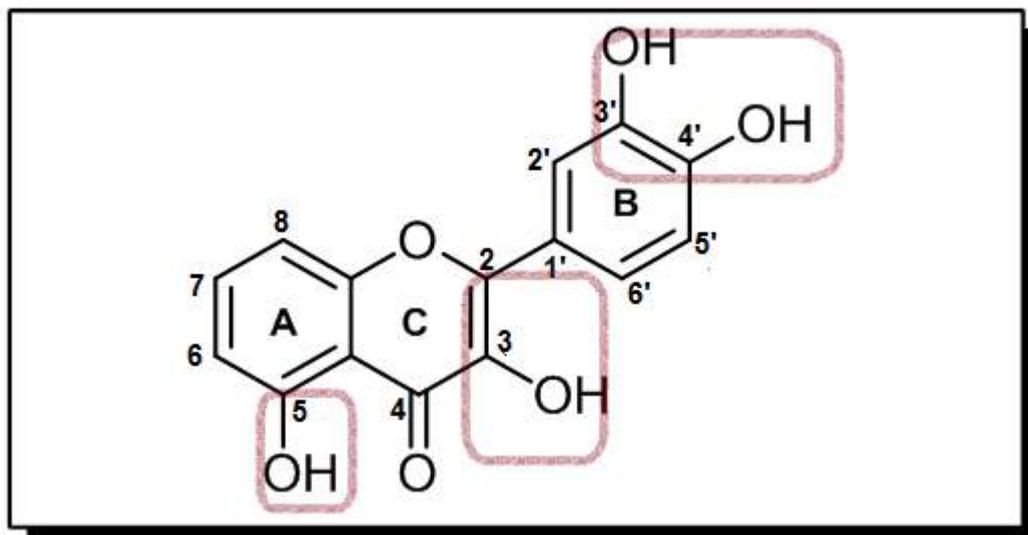
A etapa de terminação é constituída de reações como a oxigenação, a hidrólise dos endoperóxidos ou o fornecimento de energia via calor para os mesmos. Estas reações geram produtos não radicais como malonildialdeído (MDA) e 4- hidroxicenais (4- HDA) (WAGNER *et al.*, 1994; KEHRER, 2000; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

A peroxidação dos radicais livres de lípidos insaturados em biomembranas perturba as suas características estruturais, influenciando nas funções de proteção destas biomembranas e o resultado desta oxidação implica em vários eventos patológicos *in vivo*, incluindo o cancer (ARORA *et al.*, 2000).

## 2.2. FLAVONÓIDES E ISOFLAVONAS

A proteção de biomembranas pode ser associada a compostos endógenos ou exógenos ao organismo. Dentre os compostos exógenos citam-se os flavonóides, os quais se caracterizam por possuírem uma estrutura polifenólica. Estes compostos são encontrados como pigmentos ocorrentes nas plantas e muitas vezes incorporados na dieta diária das pessoas (HENDRICH, 2006). As estruturas polifenólicas de flavonóides são responsáveis por sua capacidade de eliminar os radicais livres e quelar metais de transição, o que determina sua potente capacidade antioxidante (ARORA *et al.*, 2000). Muitos flavonóides têm apresentado propriedades antioxidantes mais eficientes do que as das vitaminas C e E (DRAGAN *et al.*, 2003).

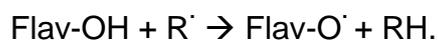
Os flavonóides são bons seqüestradores das espécies reativas, pois reagem com vários tipos de oxidantes, produzindo produtos com elevada estabilidade. Vários estudos descrevem os flavonóides como captadores específicos de radicais como o  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{O}_2\cdot^-$ , estabelecendo relações de estrutura-atividade para a captação destas espécies. A característica estrutural dos flavonóides mais importante para a captação de radicais é a presença do grupo orto-catecol no anel B. Entretanto, o número de substituintes hidroxila na estrutura e sua distribuição espacial influencia a atividade antioxidante dos flavonóides. Outras estruturas que também influenciam a captação de radicais livres são: a dupla ligação  $\text{C}_2=\text{C}_3$  e o grupo 3-OH, descritos na Figura 3 (GOMES *et al.*, 2008; HEIM *et al.*, 2002).



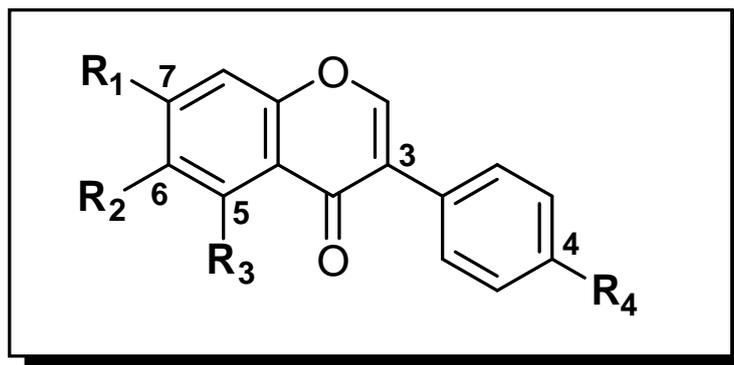
Fonte: Dragan *et al.* 2003

**Figura 3:** Esquema das características estruturais (com grupos funcionais em destaque) dos flavonóides que são importantes para o seqüestro de radicais livres.

Os grupos OH do anel B doam hidrogênio e elétrons aos radicais livres, formando um radical de flavonóide relativamente estável. A capacidade de captação de radicais está diretamente associada à elevada reatividade dos grupos OH, que participam da reação (esquemática):



As isoflavonas (Figura 4) pertencem a uma subclasse do grupo dos flavonóides. As isoflavonas são encontradas em poucas famílias botânicas, principalmente na *Fabaceae*, a qual a soja pertence. Nas leguminosas, existem enzimas que atuam na rota sintética dos flavonóides e catalisam a transformação das flavanonas em isoflavonas. O fato das isoflavonas serem mais frequentemente encontradas na família *Fabaceae* pode dever-se à presença de tais enzimas (AGUIAR *et al.*, 2007; COWARD *et al.*, 1993; TSAO *et al.*, 2003).



**Figura 4:** Estruturas químicas de isoflavonas encontradas na soja.

As isoflavonas da soja têm se destacado por sua capacidade de reduzirem os riscos de doenças cardiovasculares e promover a inibição do crescimento de células cancerígenas. Os efeitos destas isoflavonas são fortemente influenciados por sua estrutura química (FRITSCHÉ e STEINHART, 1999; VILLARES *et al.*, 2011).

O grão de soja contém três isoflavonas principais, encontradas em diferentes formas:

- Forma glicosilada, onde na posição 7 do anel A existe um carboidrato ligado através de ligações  $\beta$ -D- glicosídicas. São exemplos desta forma a daidzina, genistina e glicitina glicosiladas;

- Forma acetilglicosilada, na qual o carboidrato encontra-se esterificado através de um grupo acetil ou malonil na posição 6. Como exemplos, podem ser citadas a malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina;

- Forma aglicona, que não se encontra conjugada com moléculas de glicose, exemplificadas pela daidzeína, Gn e gliciteína não-glicosiladas.

As representações estruturais das isoflavonas da soja, nas formas glicosiladas e agliconas estão apresentadas na Figura 5.

<i>Estrutura molecular plana</i>	<i>Isoflavona</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>
	Daidzina	O-glicosil	H	H	OH
	Daidzeína	OH	H	H	OH
	Glicitina	O-glicosil	OCH <sub>2</sub>	H	OH
	Gliciteína	OH	OCH <sub>2</sub>	H	OH
	Genistina	O-glicosil	H	OH	OH
	Genisteína	OH	H	OH	OH

Fonte: Aguiar, 2002.

**Figura 5:** Estrutura química de isoflavonas nas formas glicosilada e aglicona encontradas nos grãos de soja.

As daidzina e genistina (na forma glicosilada) são as isoflavonas majoritárias (50 a 90 %) encontradas nos grãos de soja. Entretanto, as isoflavonas que possuem maior atividade biológica na soja são a daidzeína e a Gn em sua forma aglicona, encontradas em menor quantidade (ELDRIDGE, 1982; IZUMI *et al.*, 2000; PYU *et al.*, 2005). As isoflavonas, na forma aglicona, são conhecidas por seu potencial antioxidante e antitumoral (principalmente em cânceres de mama e próstata) (SHERTZER *et al.*, 1999).

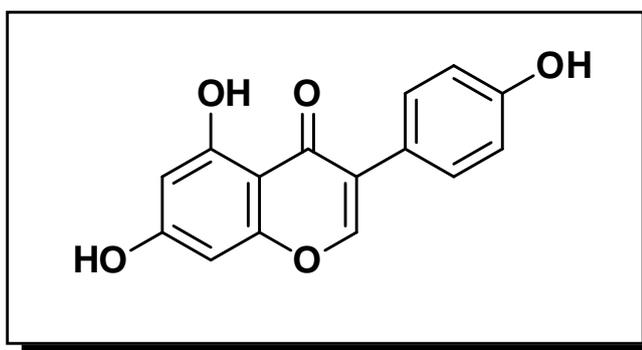
No contexto da atividade antitumoral, os efeitos citotóxicos das isoflavonas podem estar associados à inibição de enzimas, como a topoisomerase II. As isoflavonas também interferem na ação da DNA-topoisomerase II, S6-quinase ribossomal, fosfoinositídeo 3-quinase (PI 3-quinase) e proteína quinase C (PKC) (SKIBOLA e SMITH, 2000; GAMET-PAYRASTRE *et al.*, 1999).

Os efeitos das isoflavonas variam de tecido para tecido, visto que estas apresentam afinidade por receptores específicos diferentes. Em nível molecular, ainda não foram realizados estudos que estabelecessem por completo seus mecanismos de ação. Na literatura, está descrito que as isoflavonas parecem interferir no metabolismo de inúmeros nutrientes. Dentre as funções das isoflavonas, estão incluídos efeitos estrogênicos e anti-estrogênicos, regulação da atividade de proteínas (principalmente

das enzimas tirosina quinases), regulação do ciclo celular e efeitos antioxidantes (ANDERSON e GARNER, 1997; KURZER e XU, 1997).

### 2.3. GENISTEÍNA

A aglicona genisteína (5,7,4' trihidroxiisoflavona, abreviada por Gn, descrita na Figura 6) é uma potente inibidora da tirosina quinase. Tal inibição pode resultar na proteção contra vários tipos de cânceres, como o de mama, próstata e intestino (MATSUDA *et al.*, 1994). A Gn é considerada a principal isoflavona da soja, possuindo efeitos terapêuticos e preventivos nas doenças cardiovasculares e na menopausa, através da sua atividade fitoestrogênica (BEMIS *et al.*, 2004; DIXON, 2002). Apresenta também propriedades antioxidantes contra danos oxidativos dos lípidios (HAN *et al.*, 2009).



**Figura 6:** Estrutura da genisteína.

As atividades antioxidantes das isoflavonas estão fortemente relacionadas com sua estrutura química. A Gn, com substituintes hidroxila nas posições 5, 7 e 4' , possui um maior poder antioxidante do que a aglicona daidzeína, que não possui o substituinte hidroxila na posição 5 (TSAO *et al.*, 2003).

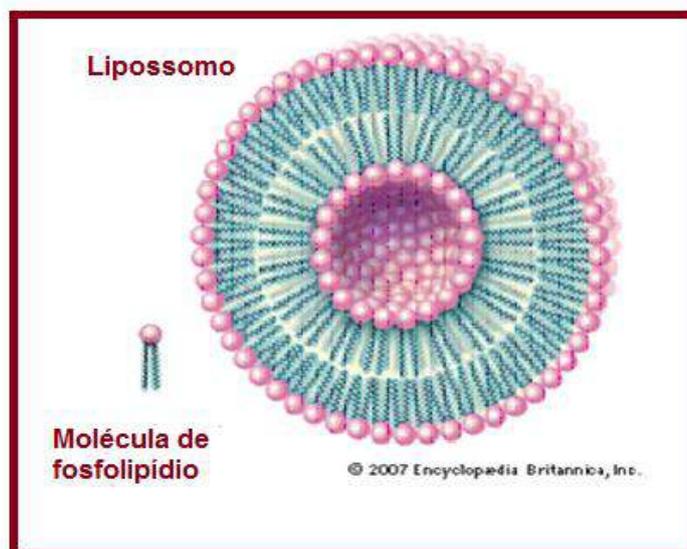
Vários estudos apontam a eficácia da genisteína como inibidora de células tumorais de vários tipos de cânceres, sendo esta, uma das isoflavonas presentes na soja que apresenta maior atividade antitumoral. Entretanto, os mecanismos de ação antioxidante e antitumorais, o que inclui atividades em membranas lipídicas, não foram completamente elucidados e, por apresentar baixa solubilidade em água, sua administração oral é dificultada (ESTEVES e MONTEIRO, 2001; SIMÕES *et al.*, 2000). Para estudo de seu mecanismo de ação, bem como viabilização de seu uso como fármaco, a Gn pode ser incorporada em lipossomos, que são considerados bons modelos de membrana e sistemas carreadores.

## 2.4. LIPOSSOMOS

É importante conhecer a interação de substâncias ativas com membranas lipídicas para elucidar os mecanismos de ação associados às substâncias. Por outro lado, tal conhecimento pode ser útil para viabilizar o uso de substâncias anti-tumorais com baixa solubilidade em meio aquoso como sistemas farmacológicos eficientes no tratamento contra o câncer.

A liberação controlada de moléculas com pouca hidrossolubilidade, tais como as isoflavonas, pode ser obtida por meio de seu transporte em sistemas carreadores. Estes agentes possuem a capacidade de carrear compostos ativos, protegendo-os da degradação após administração, e de permitir com que maiores concentrações da substância ativa alcancem o sítio de ação, acarretando em uma potencialização da atividade biológica dos compostos incorporados e assim, possibilitando a administração de doses menores no organismo, evitando as super-dosagens. Dentre os agentes carreadores, podem ser citados os lipossomos (TROTТА *et al.*, 2001; ROLAND *et al.*, 2003; GURSOY *et al.*, 2004; FRÉZARD *et al.*, 2005; CHANG e YEH, 2012).

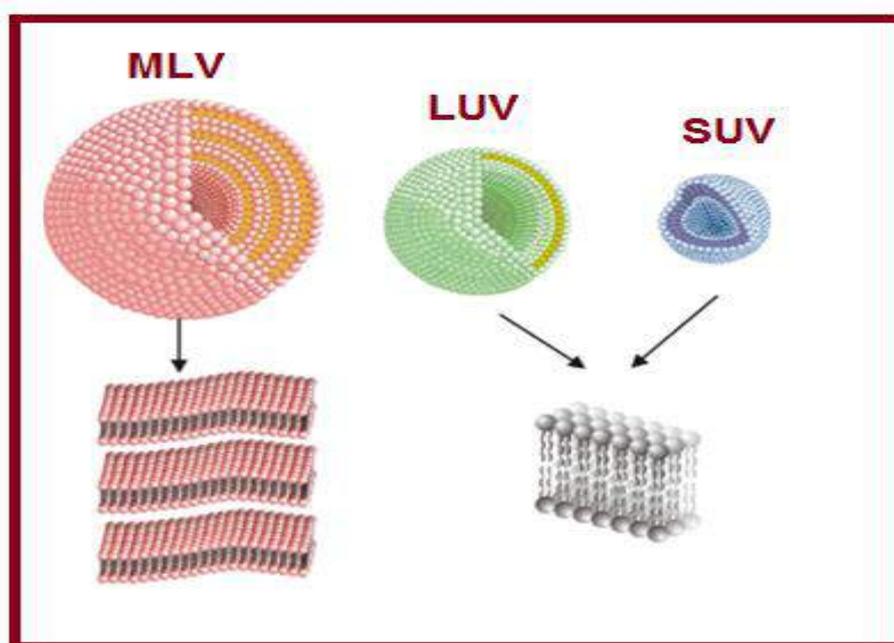
Os lipossomos podem ser descritos como associações coloidais de lipídios anfipáticos que se organizam em estruturas fechadas do tipo concha esférica (Figura 7). Possuem tamanhos e constituições variáveis que, juntamente com o método de preparação, são fatores determinantes de suas propriedades (SANTOS e CASTANHO, 2002).



Fonte: [www.medicinageriatrica.com.br](http://www.medicinageriatrica.com.br)

**Figura 7:** Corte transversal de um esquema de lipossomo, demonstrando as cabeças polares (em rosa) e as caudas apolares (em azul).

Os lipossomos podem ser classificados de acordo com o seu tamanho como: vesículas multilamelares grandes (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) (Figura 8). As MLV apresentam um diâmetro superior a 400 nm e são compostas por uma ou mais lamelas (bicamadas) em seus compartimentos internos. Tais vesículas podem ser preparadas a partir da dispersão de lipídios em meio aquoso (método de hidratação de vesículas), seguido de ciclos de congelamento-descongelamento, de forma a obter-se lipossomos com tamanho uniforme (HOPE *et al.*, 1986).



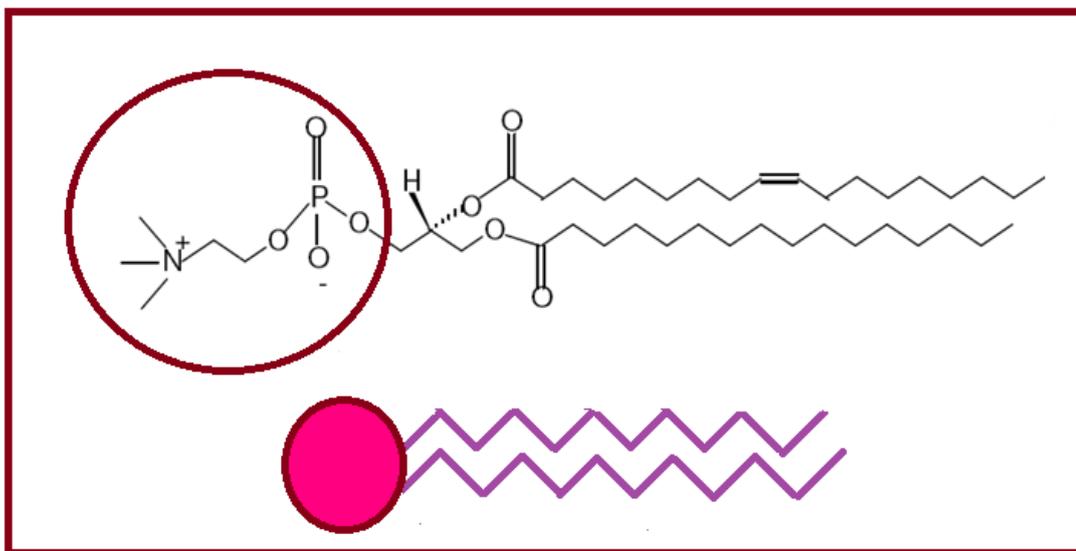
Fonte: de Lima, 2009

**Figura 8:** Representação esquemática de vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) e de vesículas unilamelares grandes (MLV) e de suas respectivas bicamadas.

Os lipossomos podem ser compostos por lipídios, tais como fosfolipídios. A toxicidade dos lipossomos constituídos por matrizes lipídicas é menor para o organismo, quando comparada a outras matrizes. Isto torna os lipossomos interessantes como sistemas de liberação prolongada de fármacos (JANSHOFF e STEINEM, 2006; TIBERG, 2005). As membranas lipossomais podem favorecer a eficiência de fármacos anticancerígenos, aumentando a concentração de fármaco nas células tumorais ou reduzindo a sua exposição em tecidos saudáveis (FRÉZARD *et al.*, 2005; CHANG e YEH, 2012).

Os fosfolipídios estão entre as diversas classes de lipídios que podem constituir os lipossomos utilizados como sistemas carreadores de fármacos. Os fosfolipídios de constituição majoritária na membrana celular são as fosfatidilcolinas, sendo estas também viáveis como constituintes de lipossomos.

As fosfatidilcolinas possuem uma cabeça polar constituída por um grupo fosfocolina zwitteriônico e duas cadeias de ácidos graxos de extensão parecida, que podem ser saturadas ou insaturadas (Figura 9). As fosfatidilcolinas têm como principal função manter a estrutura e organização das membranas celulares (BARENHOLZ e THOMPSON, 1999; OHVO- REKILÄ *et al.*, 2002).

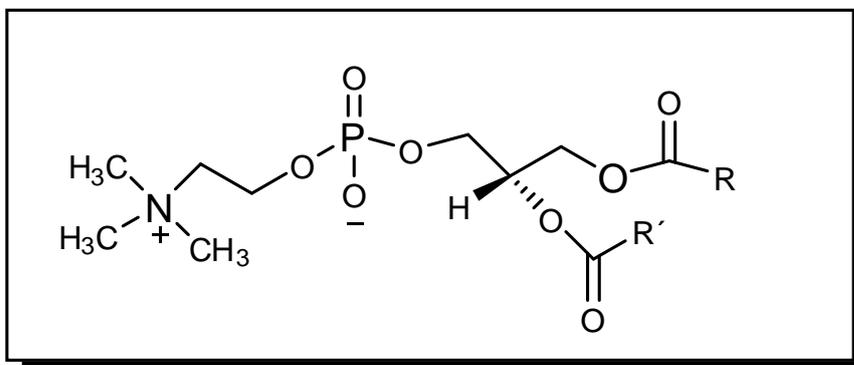


**Figura 9:** Estrutura e esquema de uma molécula de fosfatidilcolina.

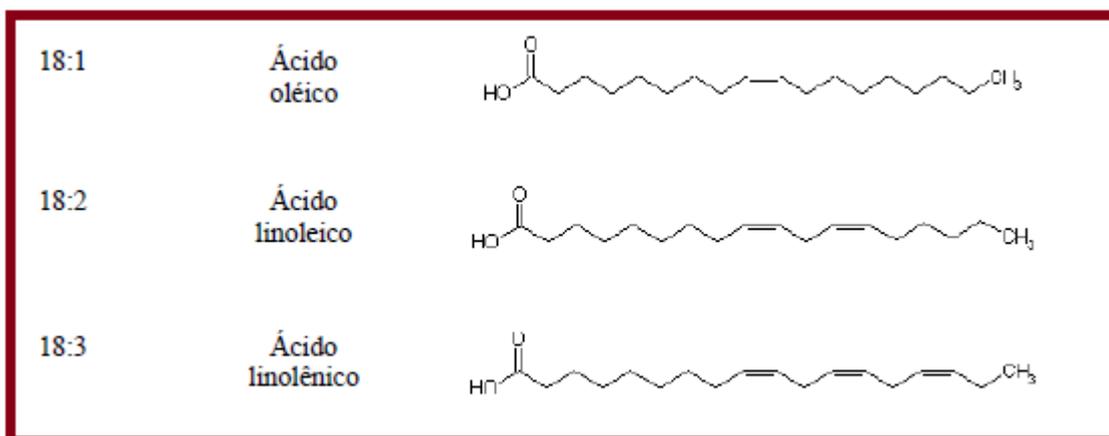
As fosfatidilcolinas podem ser sintéticas ou provindas de fontes naturais. A solecitina de soja (ASO) é composta por uma mistura de fosfolipídios, que incluem fosfatidilcolina, fosfatidilinositol fosfato e fosfatidiletanolamina (Figura 10). As fosfatidilcolinas presentes na ASO apresentam em sua composição os ácidos, oleico (C 18:1), linoleico (C 18:2) e linolênico (C 18:3) (Figura 11).

A dinâmica lipídica está associada a características conformacionais e translacionais das moléculas no plano da bicamada. A incorporação de substâncias ativas, tais como as isoflavonas, em lipossomos pode provocar alterações nas propriedades dinâmicas dos lipídios componentes, o que influencia o mecanismo de ação da substância em si (VAN MEER e VAN GENDEREN, 1994). Como dito anteriormente, é importante conhecer as interações moleculares entre a substância

ativa e a membrana. Estas interações incluem influências no que diz respeito aos parâmetros de ordem, mobilidade e fluidez da membrana.



**Figura 10:** Estrutura de fosfatidilcolina de soja, onde R ou R' = ácido oleico (C 18:1), linoleico (C 18:2) e linolênico (C 18:3).



**Figura 11:** Estruturas dos ácidos oleico, linoleico e linolênico.

No contexto descrito, o presente trabalho investigou o efeito da isoflavona Gn na (i) peroxidação lipídica de lipossomos constituídos por fosfatidilcolinas, bem como (ii) na viabilidade celular das linhagens de glioma de ratos e carcinoma de mama humano. A peroxidação lipídica *in vitro* foi induzida por radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) e o ensaio de viabilidade celular foi realizado através do ensaio colorimétrico MTT. A caracterização

da influência da isoflavona na dinâmica lipídica foi realizada por meio de técnicas instrumentais não invasivas, utilizando lipossomos compostos por asolecitina de soja. Os resultados do estudo de peroxidação lipídica e viabilidade celular foram então correlacionados com a influência da Gn sobre a dinâmica da membrana, monitoradas pelas técnicas de Infravermelho com Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada Horizontal (HATR-FTIR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC), bem como por espectroscopia de UV-visível, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta. A seguir, está apresentada uma breve descrição das técnicas utilizadas.

## **2.5. TÉCNICAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA MOLECULAR DE MEMBRANAS**

A caracterização da dinâmica molecular de membranas pode ser realizada através de técnicas instrumentais como HATR-FTIR, RMN, DSC, UV-vis., DLS e potencial zeta .

O estudo de membranas lipídicas em nível molecular pode ser estudado através da técnica de FTIR. O modo de Refletância Total Atenuada Horizontal acoplado ao FTIR (HATR-FTIR) tem sido utilizado para estudar os lipossomos, pois minimiza danos causados pela irradiação do laser infravermelho à membrana uma vez que, com esta técnica, o raio infravermelho penetra pouco na amostra (TAMM e TATULIAN, 1997; TATULIAN, 2003; ARSOV e QUARONI, 2007). Através dos espectros de HATR- FTIR é possível obter dados sobre a localização de uma substância ativa, bem como seu efeito no grau de hidratação e ordem molecular de grupos funcionais de regiões lipídicas características. Tais informações podem ser obtidas via análise da frequência e largura dos picos característicos de modos vibracionais do lipídio (MORENO *et al.*, 2009).

Para o estudo de fosfatidilcolinas, o espectro de HATR-FTIR mostra bandas de vibração que podem ser ser classificadas em três regiões diferentes do lipídio: polar, interfacial e hidrofóbica (MANTSCH e MCELHANEY, 1991). Em lipídios, geralmente

são detectados e analisados os seguintes estiramentos axiais: (a) estiramento assimétrico do grupo fosfato ( $v_{as} PO_2^-$ ), em torno de 1260 - 1220  $cm^{-1}$ , (b) estiramento assimétrico do grupo colina ( $v_{as} N^+(CH_3)_3$ ) em cerca de 970  $cm^{-1}$ , (c) estiramento do grupo carbonila ( $v C=O$ ), na faixa de 1725 - 1740  $cm^{-1}$ , (d) estiramento simétrico do grupo metileno presente na cadeia acil ( $v_s CH_2$ ), em aproximadamente 2850  $cm^{-1}$  (e) estiramento assimétrico do grupo metileno presente na cadeia acil ( $v_{as} CH_2$ ) em cerca de 2920  $cm^{-1}$  (HEREĆ *et al.*, 2007; MANRIQUE-MORENO, *et al.*, 2010).

Quando uma molécula exógena é incorporada na membrana, esta pode induzir alterações nas bandas lipídicas de HATR-FTIR, tais como variações de largura e mudanças dos valores de frequência. Estas alterações podem fornecer dados sobre os processos físico- químicos que ocorrem na membrana (SEVERCAN *et al.*, 2005). A largura de bandas é afetada por efeitos rotacionais, translacionais e/ ou de colisões. Portanto, variações na largura de bandas de grupos específicos de fosfatidilcolinas provêm informações sobre a dinâmica do sistema (LEE e CHAPMAN, 1986). Quando é observado um aumento da largura da banda do lipídio, é observado o aumento da dinâmica da membrana, ou seja, de sua mobilidade (TOYRAN e SEVERCAN, 2003).

A frequência do estiramento assimétrico do  $PO_2^-$  também é sensível ao grau de hidratação. Quando uma molécula exógena promove um alargamento desta banda, juntamente ao deslocamento de sua frequência para valores menores, isto indica um aumento no grau de hidratação do grupo  $PO_2^-$  (CHEN e TRIPP, 2008; CHOI *et al.*, 1991).

No que diz respeito ao grupo polar colina, os deslocamentos no valor da frequência de suas respectivas bandas de FTIR não estão relacionados ao número de ligações de hidrogênio, pois a formação destas entre água e colina não é possível devido à carga positiva do nitrogênio. No entanto, a separação do grupo colina com o grupo fosfato causada pela intercalação de moléculas de água pode refletir em variações de intensidade e deslocamentos relacionados às bandas de estiramentos da colina (GRDADOLNIK, KIDRIC e HADZI, 1991). O grupo colina pode também estar associado à água por interações dipolo e estes podem ser afetados pela interação de uma molécula exógena (MORENO *et al.*, 2009).

Já a vibração do estiramento da carbonila é um sensor do grau de hidratação da região interfacial do lipídio, também sensível à polaridade, ao grau e à natureza das interações da ligação de hidrogênio na interface lipídio-água (MANRIQUE-MORENO *et al.*, 2010). Um deslocamento da frequência de  $\nu$  C=O, para valores menores, pode indicar um reforço da ligação de hidrogênio existente ou a formação de nova ligação de hidrogênio entre o lipídio e a molécula de interação (SEVERCAN, SAHIN e KAZANCI, 2005; KORKMAZ e SEVERCAN, 2005). As alterações conformacionais na região de interface da membrana podem também refletir em variações relacionadas com a largura de banda referente ao estiramento da carbonila. Estudos que relacionam a influência da temperatura sobre a largura de banda do estiramento da carbonila presente em membranas contendo associações de fosfatidilcolina e colesterol, demonstraram que a largura da banda de  $\nu$  C=O aumenta proporcionalmente ao grau de liberdade desta região (ARSOV e QUARONI, 2007).

No que diz respeito aos grupos metilenos presentes na cadeia acil, estes são sensíveis à conformação da cadeia lipídica. A análise das bandas referentes ao estiramento axial dos grupos metilenos é muito útil para o estudo das propriedades físicas dos fosfolipídios (MANNOCK, LEWIS e MCELHANEY, 2010). Por exemplo, as alterações no grau de liberdade da região hidrofóbica lipídica estão diretamente relacionadas às larguras das bandas referentes aos grupos metilênicos (LÓPEZ-GARCÍA *et al.*, 1993).

Os grupos metilenos são diretamente associados à transição de fase lipídica (LEE e CHAPMAN, 1986). Quando os lipídios estão em uma fase mais ordenada, como a fase gel, as bandas correspondentes a estes grupos são nítidas e centradas em frequências menores, o que indica a predominância de cadeias de hidrocarbonetos com pouca dinâmica e menos movimento (LEWIS e MCELHANEY, 1998). À medida que o estado de fase desses lipídios torna-se mais desordenado, estas bandas tendem a alargar e as suas frequências tendem a aumentar. Estas alterações estão relacionadas com o aumento da mobilidade dos grupos vibracionais das cadeias de hidrocarbonetos (MANNOCK, LEWIS e MCELHANEY, 2010). Alterações na largura destas bandas são conseqüentes de variações na quantidade de confôrmeros gauche,

bem como na liberdade de movimento vibracional ou torção das cadeias acil lipídicas (CASAL *et al.*,1980).

Para complementar as informações obtidas com HATR-FTIR sobre a influência de uma substância ativa, tal como a genisteína, na dinâmica de grupos lipídicos, como fosfato colina e cadeia acil, pode-se realizar medidas com a técnica de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{31}\text{P}$  RMN.

A técnica de  $^1\text{H}$  RMN pode fornecer informações tais como o efeito de substâncias na velocidade e ordem molecular de regiões específicas dos lipídios. Isto pode ser realizado através de estudos de tempos de relaxação longitudinais,  $T_1$  (de LIMA *et al.*, 2007). Os valores de  $T_1$  estão relacionados ao tempo de correlação ( $\tau_c$ ), definido como o tempo médio que uma molécula leva para girar em um (1,0) radiano, sendo um bom parâmetro para se estudar o efeito de um fármaco na mobilidade da membrana em função do regime de mobilidade do sistema a ser analisado. Por exemplo, lipossomos do tipo MLV são considerados como sistemas de baixa mobilidade e nanopartículas, de alta. Em MLV, o  $T_1$  tem relação diretamente proporcional com o  $\tau_c$  (LASIC, 1998). A técnica de  $^{31}\text{P}$  RMN permite avaliar o efeito da genisteína na anisotropia de deslocamento químico. Uma ressonância estreita é típica de um grupo fósforo em sistema desordenado, enquanto que o fósforo com mobilidade restrita representa uma maior largura relacionada ao seu pico de RMN (DEBOUZY *et al.*, 2002 , TIMOSZYK *et al.*, 2004).

Através da técnica de DSC é possível determinar alterações provocadas por substâncias ativas nas propriedades termodinâmicas da região da cadeia acil dos lipossomos. Através das curvas de DSC, é possível analisar as transições de fase. As curvas estão associadas à energia de mudança de fase das cadeias carbônicas da parte apolar da membrana. Durante a varredura, é feito um monitoramento da temperatura em função do tempo, a fim de obter uma taxa de aquecimento constante do sistema. Através da integração da área sob o pico pode-se determinar o valor da variação de entalpia ( $\Delta H$ ) durante a transição de fase (de LIMA *et al.*, 2010). A  $\Delta H$  de transição, parâmetro estudado neste trabalho, é a energia, ou o calor, necessário para que a transição de fase gel para líquido-cristalino se complete. (SEVERCAN *et al.*,

1668; MARSH *et al.*, 1977). Já a temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) refere-se à transição de fase principal, também chamada de transição gel para cristal-líquido. A  $T_m$  é definida como a temperatura em que ocorre 50% de presença de lipídios em estado gel e o restante em estado fluido, em um sistema (de LIMA *et al.*, 2010). Assim, torna-se possível obter informações a respeito da ordem da membrana em função da incorporação de uma substância ativa.

As transições de fase lipídica também podem estar relacionadas com alterações na turbidez do sistema lipossomal. A turbidez lipídica pode ser observada por medidas de densidade óptica e espectrofotômetros UV-vis são adequados para investigar as transições de fase de lipídios (YI e MACDONALD, 1973).

A turbidez do sistema também está associada com o tamanho das partículas, já que uma diminuição no valor de densidade óptica pode estar relacionada a uma redução no tamanho destas partículas (KORKMAZ e SEVERCAN, 2005; KAZANCI, SEVERCAN e ZORLU, 2000). Um dos métodos frequentemente utilizados para a determinação do tamanho de partículas é a Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS), também chamada de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

Com a técnica de DLS, é possível determinar o tamanho das partículas através da análise do movimento difusivo destas partículas em suspensão. Devido ao movimento Browniano (o movimento de partículas, provindo da colisão aleatória com as moléculas do líquido que as rodeia), as partículas presentes no sistema se encontram em constante deslocamento, o que faz com que a intensidade da luz espalhada por elas forme um padrão de movimento. As partículas maiores se movem mais lentamente que as pequenas, o que faz com que a taxa de flutuação da luz espalhada por elas, também seja mais lenta. Sendo assim, o DLS utiliza a taxa de mudança dessas flutuações para determinar a distribuição de tamanho das partículas (MALVERN, 2012). O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, que pode ser usado para o estudo da distribuição de cargas na membrana (TATULIAN, 1983).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da isoflavona genisteína (Gn) na peroxidação lipídica de lipossomos constituídos por fosfatidilcolinas e na viabilidade celular das linhagens C6 e MCF-7 através de ensaios *in vitro*, bem como as interações entre a Gn e os lipossomos, caracterizadas pela influência da isoflavona na dinâmica lipídica - ordem, fluidez e mobilidade a fim de contribuir com geração de conhecimento para viabilizar o uso da genisteína como fármaco em sistemas carreadores.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Incorporar a genisteína (Gn) em lipossomos de asolecitina de soja (ASO);
- ✓ Determinar a concentração de Gn incorporada em ASO através da técnica de UV-Vis;
- ✓ Determinar a influência da Gn na peroxidação *in vitro* de lipossomos de ASO, induzida por  $\bullet\text{OH}$ , através do ensaio de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- ✓ Investigar o efeito da Gn, na forma livre e incorporada em lipossomos de ASO em diferentes concentrações, na viabilidade celular das linhagens C6 e MCF-7 através do ensaio de MTT;
- ✓ Avaliar a localização preferencial e efeito da isoflavona nos graus de hidratação e ordem da membrana lipossomal através de análises dos espectros de HATR-FTIR, analisando o deslocamento dos valores de frequência e o alargamento a 75% da altura dos picos referentes aos estiramentos axiais dos grupos funcionais dos lipídios;

- ✓ Monitorar o efeito de Gn, na mobilidade molecular, bem como no estado de fase de lipossomos, através de:
- i) medidas de RMN, por detecção de valores de  $T_1$  dos prótons presentes nos grupos colina e metilenos através de RMN de  $^1\text{H}$ , bem como anisotropia de deslocamento químico da região fosfato dos fosfolipídios presentes na membrana através de estudos de RMN de  $^{31}\text{P}$  nos lipossomos puros ou contendo Gn incorporada;
  - ii) medidas de DSC, por detecção de valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) nos lipossomos puros ou contendo Gn incorporada;
  - iii) ensaios de turbidez, realizados por espectroscopia de UV-vis. nos lipossomos puros ou contendo Gn incorporada;
  - iv) medidas de espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta nos lipossomos puros ou contendo Gn incorporada.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para o desenvolvimento do presente trabalho, o lipídio asolecitina de soja (ASO), contendo 25% de PC, a isoflavona genisteína, tricina e água deuterada/3-(trimetilsilil)-[2,2,3,3- $^2\text{H}_4$ ]-1-propiónico de sódio (TSP, 0,05%) foram obtidos da SIGMA-ALDRICH (São Paulo, Brasil). Os solventes clorofórmio e metanol foram obtidos através da SYNTH do Brasil (São Paulo, Brasil). As linhagens de glioma de rato (C6) e de carcinoma humano (MCF-7) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA), o 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e soro fetal bovino (FBS; Gibco BRL, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA). Os lipídios foram utilizados sem qualquer purificação adicional. Os demais reagentes utilizados são de grau de pureza analítica.

Os materiais e vidrarias utilizados foram compostos por itens de uso convencional no laboratório, como: béquers, erlenmeyers, pipetas, funis simples, provetas, kitassatos, balões volumétricos de 10 mL e 25 mL, garras, suportes, espátulas, eppendorfs, bastões de vidro, dentre outros.

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: placa de aquecimento e agitação magnética modelo 752A Fisatom com potência de 650W (de 120 a 1800 rpm), evaporador rotatório modelo 801A Fisatom de 70W, bomba de vácuo mod. XKM60-1 1/2HP FAMAC, equipamento Zetasizer- Malvern UK- nano Zs disponível na Universidade de Brasília- UNB, espectrofotômetro de UV-visível Shimadzu UV-2550, espectrofotômetro de FTIR Shimadzu – IR Prestige-21 e espectrômetro de RMN Anasazi Instruments (60 MHz), disponíveis na Universidade Federal do Rio Grande- FURG; espectrômetro de RMN Bruker DPX 400 (162 MHz), disponível na Universidade Federal de Santa Maria- UFSM, calorímetro de varredura diferencial TA Instrument 2010 DSC cell (New Castle, DE), disponível na Universidade Federal de Santa Catarina,

## **4.2. MÉTODOS**

### **4.2.1. Preparação dos Lipossomos de ASO e Incorporação da Genisteína**

Os lipossomos de ASO do tipo vesículas multilamelares grandes (MLV) foram preparados de acordo com o método de hidratação de vesículas (Figura 12) na ausência e presença da Gn.

O lipídio e a Gn foram co-solubilizados em uma mistura de clorofórmio e metanol/clorofórmio (3:1), respectivamente. Os solventes foram evaporados através da técnica de rotaevaporação, formando um filme lipídico e os traços de solventes foram eliminados através de vácuo (em dessecador) por uma hora. O filme lipídico formado foi hidratado em tampão aquoso contendo tricina 10mM / MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, a pH 7,4 e homogeneizado em vórtex (HOPE *et al.*, 1986). A Gn foi incorporada na etapa de

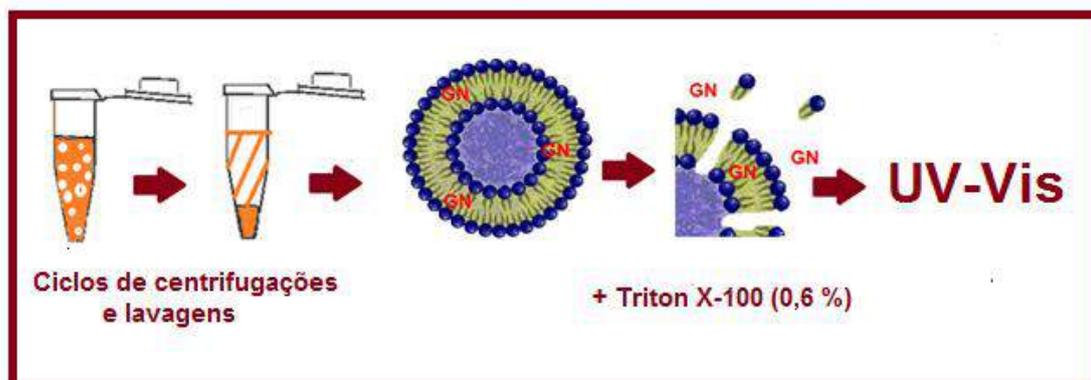
solubilização dos lípidios em solvente orgânico em diferentes razões(m/m) iniciais Gn: ASO variando de 0 a 0,13..



**Figura 12:** Esquema de preparação de vesículas multilamelares grandes (MLV) pelo método de hidratação de vesículas.

#### 4.2.2. Determinação da Concentração de Genisteína Incorporada em Lipossomos

Os lipossomos com diferentes concentrações de genisteína incorporada foram submetidos a três ciclos de lavagem e centrifugação com tampão tricina/  $\text{MgCl}_2$  pH 7,4. As concentrações de Gn incorporada em lipossomos de ASO foram obtidas a partir do seu efluxo para o meio aquoso após dissolução das membranas lipídicas com o surfactante Triton X-100 (0.6%, v/v) (Figura 13). Os lipossomos foram preparados com diferentes razões (m/m) de Gn: ASO, variando de 0,00 a 0,13. Neste ensaio, isto foi correspondente a uma faixa de concentração inicial de Gn de 1,2 a 3,6 mg/mL e a uma faixa de concentração inicial de lipídios de 28,8 mg/mL a 26,4 mg/mL. O ensaio foi monitorado por espectroscopia UV-visível, em equipamento UV-2550 Shimadzu /Kyoto, JP. A Gn foi quantificada considerando seu comprimento de onda máximo de absorção 262nm e a concentração foi calculada a partir do seu coeficiente de absorvidade molar,  $35842 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (FRANKE *et al.*, 2008). Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 13:** Determinação da concentração de Gn incorporada em lipossomos de ASO.

#### 4.2.3. Ensaios de Peroxidação Lipídica nas Membranas

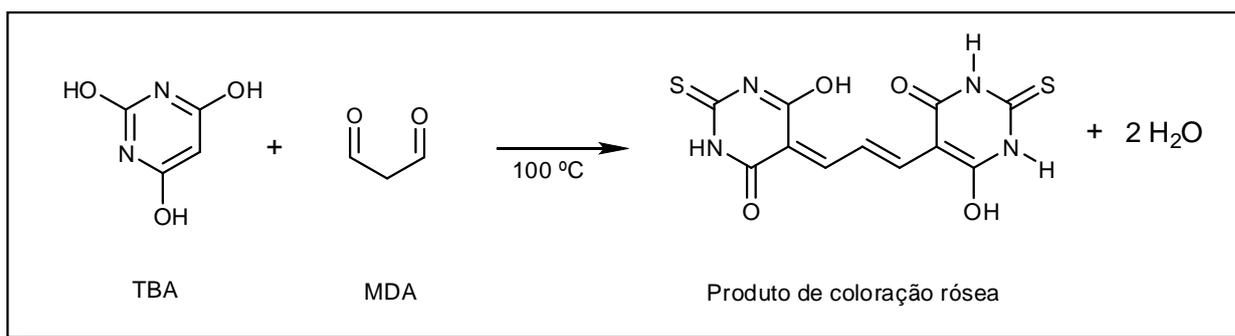
A lipoperoxidação das membranas de ASO, pura ou contendo diferentes razões Gn:ASO (m/m), foi induzida por radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) através de sua geração via reação de Fenton em uma suspensão lipossomal (12,5 mg/mL de fosfolípidios em tampão fosfato de potássio 10 mM). A reação de Fenton foi promovida por adição de  $\text{FeCl}_3$  0,02 mM, ascorbato 0,1 mM e peróxido de hidrogênio 2,8 mM à suspensão lipossomal.

Para controle dos reagentes que podem interferir nas leituras espectrofotométricas, foram realizados dois experimentos. Um dos experimentos-controle apresentou, em seu meio reacional, todos os reagentes descritos exceto as membranas lipídicas. Os valores de leituras espectrofotométricas obtidos com estes controles foram subtraídos dos valores detectados com os lipossomos, para tratamento dos dados.

Para a detecção dos valores de absorvância relativos à peroxidação induzida pelo oxigênio do ar (peroxidação basal), foi utilizado um segundo experimento controle na ausência de espécies  $\cdot\text{OH}$  no meio reacional. Este valor também foi descontado dos valores obtidos com as amostras contendo membranas lipídicas e o radical livre testado (de LIMA, 2009).

Os controles e as amostras foram incubados durante 30 minutos a 37°C e a lipoperoxidação nas membranas foi detectada através do método de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método caracteriza-se pela formação de um complexo de coloração rósea a partir da reação entre malonildialdeído (MDA), produto majoritário da lipoperoxidação, e ácido tiobarbitúrico (TBA) (Figura 14). A reação ocorre em pH ácido, propiciado pela adição de ácido tricloroacético no meio. Esta reação foi acelerada através de incubação por 30 minutos a 100°C (OHKAWA *et al.*, 1979; BIRD e DRAPER, 1984; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

A percentagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinada a partir de leitura espectrofotométrica a 535 nm (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).



**Figura 14:** Reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e malonildialdeído (MDA) para formar um aduto de coloração rósea

#### **4.2.4. Ensaios Anti-Tumorais**

##### **4.2.4.1. Cultura Celular e Tratamento com Genisteína**

As linhagens celulares de glioma de rato (C6) e adenocarcinoma da mama humano (MCF-7), foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 5% ou 10% de soro fetal bovino, a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A genisteína livre e incorporada nos lipossomos de ASO em razão Gn:ASO (m/m) correspondente à concentração máxima incorporada de Gn (ver item 4.2.2) foram diluídas em DMEM, 5% ou 10% de FBS para se obter as concentrações de 10, 20 ou 30 µM. Foram realizados controles contendo ASO em tampão Tricina/MgCl<sub>2</sub> e os experimentos foram realizados em triplicatas.

##### **4.2.4.2. MTT Ensaio de Viabilidade Celular**

Os métodos colorimétricos estão dentre as várias metodologias em que podem ser desenvolvidos os ensaios citotóxicos. Através destes métodos, a taxa de crescimento e multiplicação das células é medida de forma indireta por um indicador de crescimento, a partir do surgimento de coloração e da intensidade da cor (HENRIKSSON et al., 2006; HOUGHTON et al., 2007). Dentre os métodos colorimétricos está o ensaio MTT, um ensaio de proliferação celular, que consiste na quantificação da habilidade das células viáveis reduzirem o sal amarelo de tetrazólio à cristais de formazan (cristais púrpura), usando uma enzima mitocondrial denominada succinato desidrogenase. O ensaio detecta células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados seguindo a redução colorimétrica do 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) à formazan. Resumidamente, as linhagens celulares C6 e MCF-7 foram subcultivadas em placas de 96 poços de cultura de tecidos contendo 1 x 10<sup>3</sup> células por poço, por 24h de cultura. Após este período, as células foram expostas ao tratamento com genisteína livre, ou incorporada em lipossomos de ASO em diferentes concentrações (10, 20 ou 30 µM). Após a 48 h de

tratamento, o ensaio de MTT foi realizado de acordo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como absorvância a 492 nm.

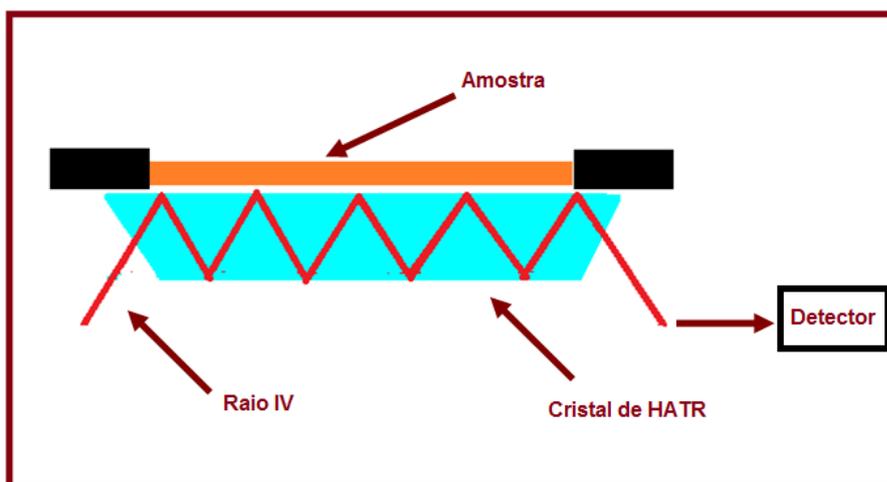
#### **4.2.4.3. Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram submetidos à análise one-way de variância (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey-Kramer (para múltiplas comparações). As diferenças entre os valores médios foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

#### **4.2.5. Ensaio de HATR-FTIR**

Os estudos com HATR- FTIR foram realizados em um aparelho Shimadzu IR Prestige-21 (Kyoto, JP) em temperatura ambiente. Um esquema demonstrando o HATR-FTIR está representado na Figura 15. As amostras de 100 mg/mL de ASO puro e com a razão Gn:ASO (m/m) correspondente à concentração máxima de genisteína incorporada no lipossomo (ver item 4.2.2.) foram depositadas em um cristal de ZnSe previamente lavado com tampão tricina/MgCl<sub>2</sub> pH 7,4 para a realização da análise.

As varreduras foram feitas de 400 a 4000 nm, com resolução de 2 cm<sup>-1</sup>. Os espectros foram analisados utilizando o software Shimadzu IR solution 1.5. Foram analisados valores de frequência e alargamentos a 75% da altura dos picos referentes a estiramentos axiais de grupos lipídicos na ausência e na presença da Gn.



**Figura 15:** Esquema representativo de HATR-FTIR

#### 4.2.6. Medidas de RMN ( $T_1$ )

As medidas de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) de  $^1\text{H}$  foram realizadas em baixo campo magnético, em equipamento Anasazi Instruments 60 MHz (Indianapolis, USA) a temperatura ambiente. Os lipossomos de ASO contendo 150 mg/mL, na ausência e na presença de Gn (na razão m/m Gn:ASO correspondente à concentração máxima de Gn incorporada, ver item 4.2.2.) foram analisados em solvente  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20, v/v). Como referência externa, foi utilizado o TSP (ácido trimetilsilil propiônico).

As medidas de  $T_1$  de  $^1\text{H}$  foram obtidas com seqüência de pulsos de recuperação de inversão à 21 °C. Foi utilizada uma faixa de tempo de correlação ( $\tau$ ) de 0,4 a 12,8 s (de LIMA *et al.*, 2010). Os valores de relaxação e intensidades relativas foram processados através do programa NUTS. As medidas de  $^{31}\text{P}$ -RMN foram registradas utilizando um equipamento Bruker DPW 400 (162 MHz), utilizando água deuterada como referência externa. As medições da largura da linha dos espectros de  $^{31}\text{P}$ -NMR foram obtidos a  $\frac{3}{4}$  do pico de fósforo.

#### 4.2.7. Ensaios de DSC

Os experimentos com lipossomos de concentração 50 mg/mL, na ausência e na presença de Gn (em razão m/m de Gn:ASO correspondente à máxima concentração de Gn incorporada nos lipossomos, ver item 4.2.2.), foram efetuados em aparelho TA Instrument 2010 DSC cell (New Castle, DE), com variação de temperatura de – 45°C a – 5°C. A calibração do aparelho foi realizada com Índio. As varreduras foram efetuadas com uma velocidade de 10°C/min, com fluxo de nitrogênio de 50 /50 mL/min.

A faixa de temperatura de análise foi determinada segundo a  $T_m$  da ASO. A referência para este ensaio foi uma célula de alumínio vazia (de LIMA *et al.*, 2010). Foram avaliadas variações de entalpia ( $\Delta H$ ) lipídica, induzidas pela presença de Gn. A  $\Delta H$  foi obtida por integração da área sob o pico obtida utilizando o Software Universal 4.0 C (TA Instrument).

#### 4.2.8. Ensaios de Turbidez

As medições da turbidez de lipossomos contendo ASO de 28,8 mg / mL, puros ou carregados com Gn (em faixa de concentração inicial de 1,2 a 3,6 mg/mL) foram realizadas a 400 nm por meio de espectroscopia de UV-vis em um aparelho Shimadzu UV-2550 (Kyoto, JP). Foram utilizadas células de quartzo com um caminho óptico de 1 cm.

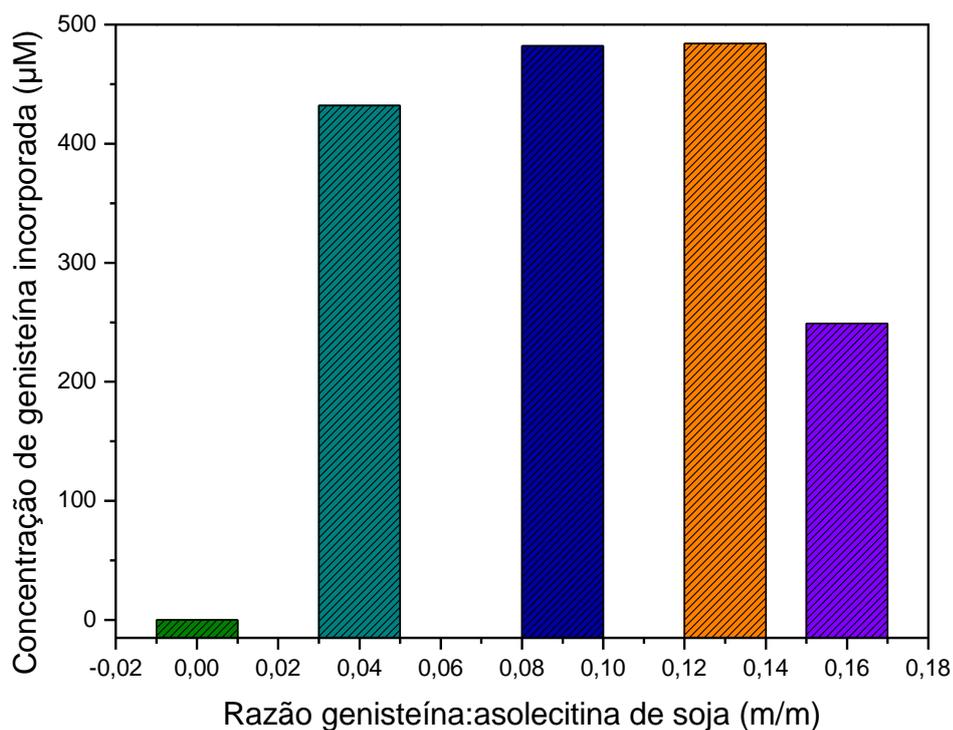
#### 4.2.9. Caracterização do Diâmetro e Potencial Zeta

A caracterização do diâmetro e potencial zeta das nanopartículas preparadas neste trabalho foi realizada utilizando equipamento Zetasizer – Malvern UK – Nano ZS, a 25°C, com dispersante água milliQ, caminho óptico de 1 cm e ângulo fixo de 173°C. Previamente às análises com espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta, os filmes lipídicos foram ressuspensos em 1 mL de solução tampão (tricina /  $MgCl_2$ ) em vórtex. Um volume de 25  $\mu$ L da suspensão formada foram dispersos em 1 mL de água milliQ, sendo posteriormente homogeneizado em vórtex, e submetido a análise de DLS e posteriormente, potencial zeta.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. QUANTIFICAÇÃO DE GENISTEÍNA INCORPORADA EM MEMBRANAS DE ASO

A quantificação da concentração máxima de Gn incorporada foi realizada através de Espectroscopia de UV-vis. A Figura 16 relaciona a concentração de Gn incorporada em sistemas lipossomais preparados inicialmente em diferentes razões iniciais m/m de Gn:ASO (0,00 a 0,13). A partir desta curva, pôde-se detectar o ponto de saturação da Gn. Tal ponto foi observado em uma razão massa/massa genisteína: lipídio de 0,13 onde se obteve a concentração máxima de 484  $\mu\text{M}$  ou 0,13 mg/mL de Gn incorporada no sistema (Figura 16).

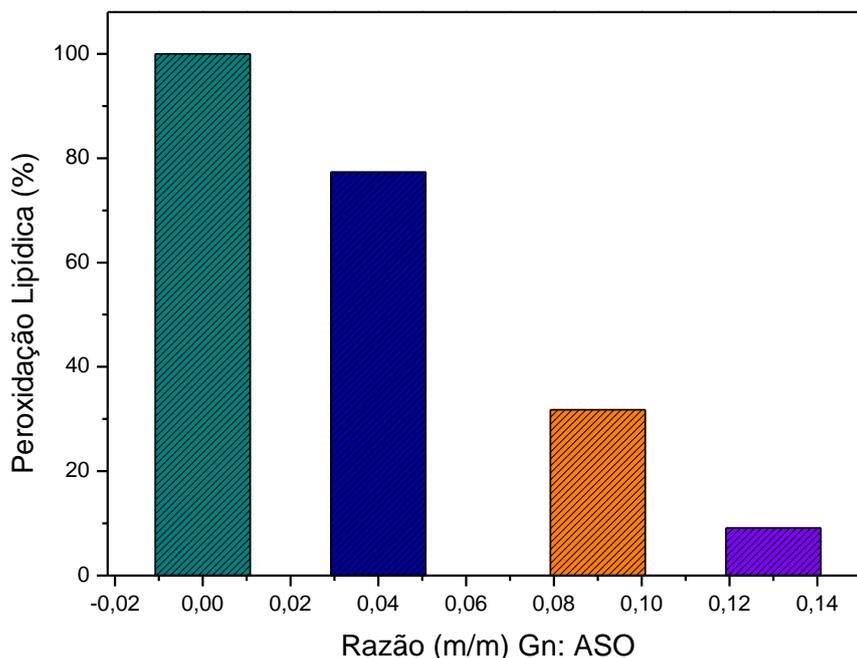


**Figura 16:** Concentração máxima de genisteína incorporada em lipossomos de ASO.

Alcançado o ponto de saturação da Gn no sistema lipossomal (484  $\mu\text{M}$  de Gn), observou-se uma relação inversa entre a concentração inicial de isoflavona adicionada no sistema e a quantidade incorporada nos lipossomos. Isto indica que na concentração de 484  $\mu\text{M}$ , os lipossomos estavam saturados com a Gn (DIMITRIOS e SOPHIA, 2002). A concentração alcançada de Gn incorporada nas membranas de ASO foi suficiente para obterem-se informações sobre sua influência na dinâmica lipídica dos lipossomos.

## **5.2. INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA *IN VITRO* DE LIPOSSOMOS DE ASO**

Para determinar a influência da Gn na peroxidação *in vitro* da membrana, lipossomos de ASO puro e com diferentes razões iniciais m/m Gn: ASO (variando de 0 a 0,13) foram submetidas à oxidação induzida pelo radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) e, posteriormente, foi determinado o nível de TBARS. A Figura 17 mostra o efeito de quantidades crescentes de Gn na percentagem de inibição da peroxidação *in vitro* de lipossomos de ASO induzida por  $\bullet\text{OH}$ .



**Figura 17:** Influência de crescentes concentrações de genisteína incorporada em lipossomos de ASO na peroxidação lipídica total, induzida por radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ). Os resultados foram obtidos pelo método de TBARS.

A concentração máxima de Gn incorporada nos lipossomos (0,13 mg/mL ou 484  $\mu\text{M}$  de isoflavona) inibiu a peroxidação em 90,90 %. A concentração de Gn inibitória da peroxidação lipídica em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) foi atingida em uma razão (m/m) Gn: ASO 0,06, correspondendo a 0,065 mg/mL ou 242  $\mu\text{M}$  de isoflavona incorporada nos lipossomos.

Os resultados obtidos indicam que a Gn tem uma atividade antioxidante contra o dano *in vitro* induzido por  $\bullet\text{OH}$  em lipossomos de ASO. SOUSA e colaboradores (2013) demonstraram que o ácido  $\alpha$ -eleosteárico ( $\alpha$ -ESA), um ácido graxo conjugado que apresenta atividades antitumorais, apresentou uma  $\text{IC}_{50}$  de 15 mg/mL para a lipoperoxidação induzida pelo  $\bullet\text{OH}$  em lipossomos de ASO. Assim, a Gn apresentou uma atividade antioxidante mais eficiente que o  $\alpha$ -ESA.

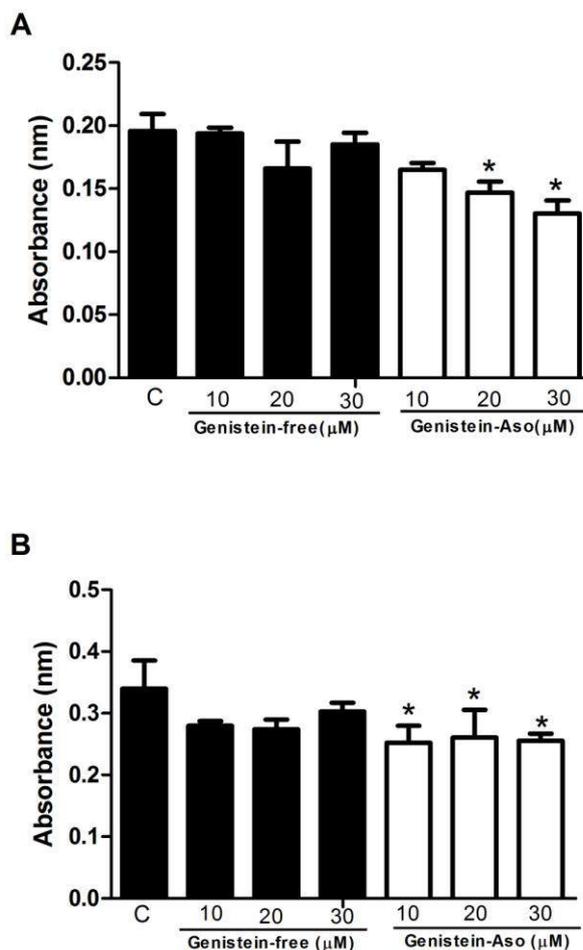
A capacidade inibitória de peroxidação em membranas pode ser atribuída a alterações na estabilidade da membrana (ARORA *et al.*, 2000). Visto que a peroxidação lipídica também pode estar relacionada com o processo de tumorigênese

e com alterações nas propriedades físico-químicas da membrana, procurou-se obter mais informações sobre uma possível relação entre os efeitos antioxidantes e antitumorais observados na Gn, e sua influência na dinâmica molecular das membranas lipídicas compostas por ASO. Com este fim, diferentes técnicas instrumentais foram utilizadas para caracterizar as propriedades físico-químicas do sistema lipossomal contendo Gn. Os resultados referentes ao estudo de atividade antitumoral e dos efeitos da Gn na dinâmica molecular dos lipossomos de ASO estão apresentados a seguir.

### **5.3. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE SISTEMAS LIPOSSOMAIS CONTENDO GENISTEÍNA: ASO**

Para determinar o efeito da Gn sobre a viabilidade celular das linhagens de glioma C6 e câncer de mama MCF-7, estas foram expostas à genisteína na forma livre e incorporada em lipossomos de ASO em diferentes concentrações (10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ ) durante 48h. No final da incubação foi realizado o ensaio MTT. Como mostrado na Figura 18 A, a exposição das células de glioma C6 à lipossomos de ASO carregados com genisteína nas concentrações 20 e 30  $\mu\text{M}$ , resultou em uma redução da viabilidade celular em 25% e 34% respectivamente, em comparação com células não tratadas. Para esta linhagem, a viabilidade celular não foi significativamente alterada, quando tratada com genisteína na forma livre.

Para a linhagem MCF-7 (Figura 18 B), após 48h de tratamento, a genisteína incorporada nos lipossomos de ASO, nas concentrações 10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ , reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 25% quando comparado às células não tratadas ou tratadas com genisteína na forma livre. Estes resultados sugerem que os lipossomos de ASO carregados com Gn favorecem o efeito antitumoral da isoflavona contra duas linhagens de células cancerosas. Alterações na ordem de membrana podem influenciar na atividade antitumoral da Gn, visto que as membranas de células tumorais são mais desorganizadas e fluidas do que as normais (YU *et al.*, 1999). Sendo assim é possível que a incorporação da isoflavona em lipossomos de ASO pode facilitar a interação entre a genisteína e a membrana das células tumorais.

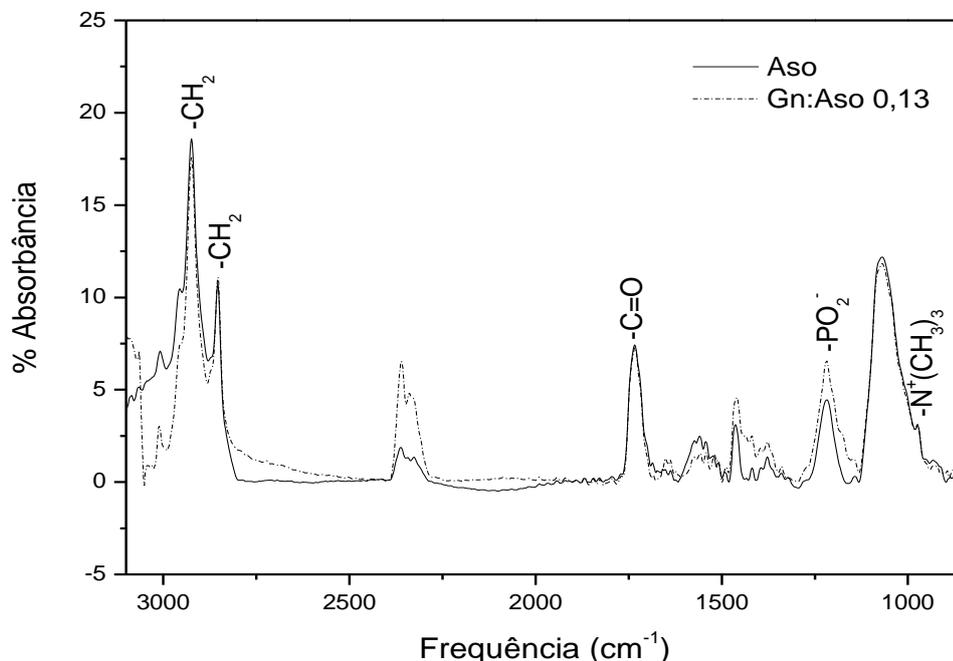


**Figura 18:** Influência da genisteína, na forma livre e incorporada em lipossomos de ASO em diferentes concentrações, na viabilidade celular das linhagens C6 (A) e MCF-7 (B).

#### 5.4. INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA NA DINÂMICA LIPÍDICA DE LIPOSSOMOS DE ASO

Os efeitos provocados pela Gn na dinâmica lipídica dos lipossomos foram caracterizados através das técnicas de UV- visível, HATR-FTIR, RMN, DSC e DLS e potencial zeta. Estas técnicas instrumentais foram utilizadas de forma a comparar a dinâmica dos lipossomos puros e dos lipossomos contendo a concentração máxima de Gn incorporada. A fim de compreender a influência da Gn na dinâmica de regiões

específicas do lipídio, foram obtidos espectros de HATR-FTIR de ASO puro e contendo Gn em uma razão inicial Gn:ASO (m/m) de 0,13, como mostra a Figura 19.



**Figura 19:** Espectros de HATR-FTIR de fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO puro e na presença de Genisteína em uma razão m/m Genisteína: ASOlecitina (gn:aso) de 0,13.

Para a caracterização dos grupos lipídicos de lipossomos puros de ASO foram detectadas e analisadas os seguintes estiramentos axiais: (a)  $\nu_{as} PO_2^-$  1217,08  $cm^{-1}$ , (b)  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$  974,05  $cm^{-1}$ , (c)  $\nu C = O$  a 1734,01  $cm^{-1}$ , (d)  $\nu_s CH_2_s$  2854,05  $cm^{-1}$  (e)  $\nu CH_2_{as}$  2924,09  $cm^{-1}$ . As frequências de vibrações de estiramento descritas representam os 25% de fosfatidilcolina contidos em ASO (LÓPEZ- GARCIA *et al.*, 1993). A influência da Gn foi analisada através das alterações provocadas pela mesma nos valores de frequência de cada pico específico, bem como nas alterações nas larguras de banda a 75% da altura de cada pico. Vale ressaltar que o espectro da Gn pura apresentou os seguintes picos:  $\nu C = O$  em 1645, 28  $cm^{-1}$ ,  $\nu C = C$  em 1614, 42  $cm^{-1}$ ,  $\delta 5-OH$  e  $\nu C = C$  em 1519,91 – 1419,61  $cm^{-1}$ ,  $\nu C-O-C$  em 1307,74- 1143, 79  $cm^{-1}$ , e  $\delta OH$  acerca de 3444,87 – 3165, 19  $cm^{-1}$ . Estes valores estão de acordo com frequências

descritas na literatura, referentes ao espectro de FTIR da Gn (Cieslik-Boczula et al., 2012, Sekinea et al., 2011).

A Tabela 2 apresenta os valores de frequência de grupos em regiões específicas da fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO, na ausência e na presença de Gn. Para a interpretação dos resultados foi considerada a influência da Gn nas regiões polar, interfacial e hidrofóbica dos lipossomos de ASO, que serão discutidas a seguir. Tais análises de dados de FTIR foram complementadas com a interpretação dos resultados obtidos utilizando-se as técnicas de RMN e DSC.

**Tabela 2:** Deslocamentos na frequência ( $\nu$ ) de HATR-FTIR de lipossomos de ASO provocados pela incorporação de Gn em razão m/m Gn:ASO de 0,13.

Grupos	$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )		$\Delta \nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
	ASO	Gn: ASO 0,13 (m/m)	
Colina	974,05	974,05	0
$\text{PO}_2^-_{\text{as}}$	1217,08	1219,01	1,93
C=O	1734,01	1734,01	0
$\text{CH}_2_{\text{s}}$	2854,05	2852,72	1,33
$\text{CH}_2_{\text{as}}$	2924,09	2924,09	0

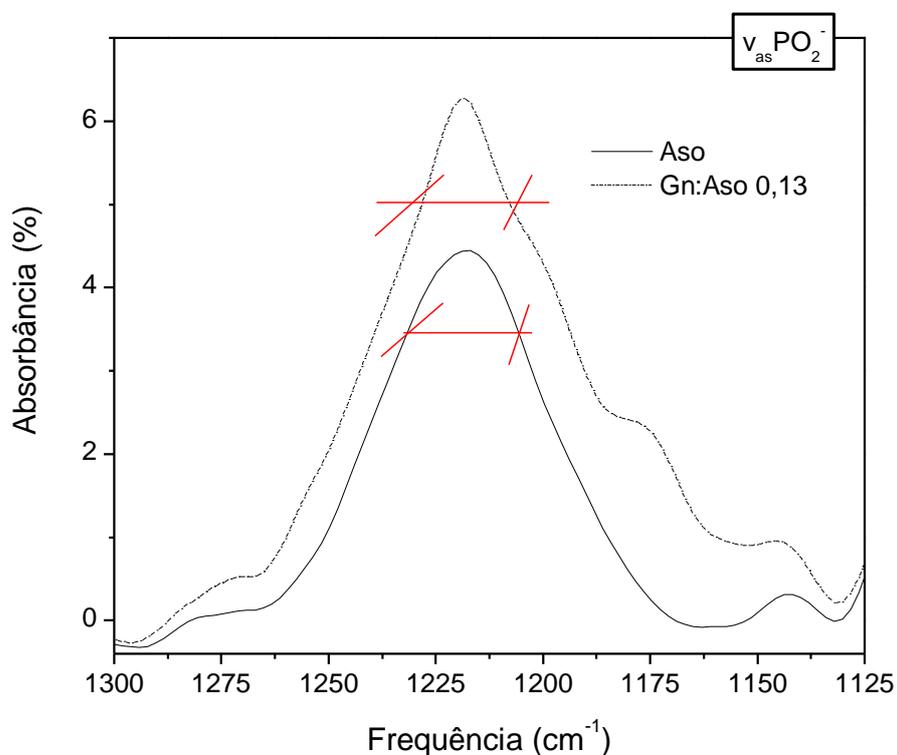
#### 5.4.1. Interação da Genisteína com a Região Polar de Lipossomos de ASO

As bicamadas lipídicas de fosfatidilcolinas possuem um conjunto de associações intermoleculares eletrostáticas do grupo colina que possui carga positiva e do grupo fosfato carregado negativamente. Sendo assim, torna-se importante avaliar a influência da substância ativa na dinâmica lipídica destes grupos, já que estes apresentam papel

importante na manutenção da configuração de duas camadas e nas propriedades de barreira (YEAGLE e MARTIN, 1978). A análise das alterações na frequência do estiramento axial assimétrico do grupo fosfato lipídico é útil para monitorar o estado de hidratação da região polar de fosfolípidios (LÓPEZ- GARCIA *et al.*, 1993).

Como se pode observar na Tabela 2, a Gn provocou o aumento na frequência do estiramento assimétrico do grupo fosfato em  $1,93\text{ cm}^{-1}$ , o que pode indicar que esta substância provoca uma diminuição na quantidade de ligações de hidrogênio entre o grupo fosfato lipídico e os átomos presentes na Gn ou na água, ou seja, a genisteína provoca uma diminuição no grau de hidratação desta região (CASAL, MANTSCH e HAUSER, 1989). PAWLIKOWSKA- PAWLEGA e colaboradores (2012), em estudos das interações entre genisteína e membranas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), observaram um aumento na quantidade dessas ligações de hidrogênio, entretanto, tais autores investigaram o efeito da isoflavona nas bandas de estiramento axial simétrico do grupo fosfato. Diversos autores indicam que a banda mais sensível ao grau de hidratação na região do fosfato é a referente ao estiramento axial assimétrico (MANRIQUE-MORENO, *et al.*, 2010; LÓPEZ- GARCIA *et al.*, 1993; CHEN e TRIPP, 2008; CHOI *et al.*, 1991; HEREC *et al.*, 2007) . Uma segunda explicação para a diferença observada é a influência da natureza do lipídio utilizado, como, por exemplo, o grau de insaturação e a orientação molecular (ARORA *et al.*, 2000). Vale ressaltar que, em lipídios de ASO, a orientação do grupo fosfato presente na fosfatidilcolina pode ser influenciada pela região polar de outros fosfolípidios presentes nesta mistura (fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositolfosfato). Os valores de deslocamentos de frequências foram considerados de acordo com estudos relacionando outras substâncias ativas com lipossomos compostos por fosfatidilcolinas (SEVERCAN, 1997; SEVERCAN *et al.* 2005)

A Figura 20 apresenta uma ampliação do espectro de HATR-FTIR apresentado na Figura 19, na região do fosfato ( $1217,08\text{ cm}^{-1}$ ). A análise da banda de infravermelho demonstrou que a Gn reduziu também a largura do pico referente ao estiramento assimétrico do grupo fosfato em aproximadamente  $2,8\text{ cm}^{-1}$ . Isto indica uma diminuição da mobilidade nesta região (Tabela 3) (MORENO *et al.*, 2009).



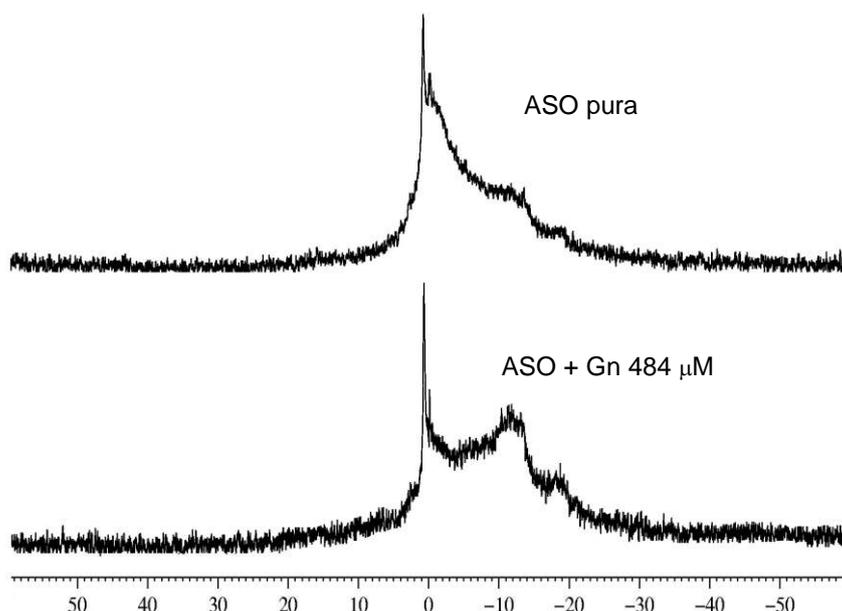
**Figura 20:** Ampliação dos espectros de FTIR de fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO puros e na presença de genisteína (484 $\mu$ M) na região do estiramento assimétrico de  $PO_2^-$ .

Para complementar o estudo dos efeitos da Gn na região do grupo fosfato lipídico, foram realizadas análises da largura do pico de RMN de  $^{31}P$ , a fim de avaliar o efeito da genisteína na anisotropia de deslocamento químico. Os espectros de RMN  $^{31}P$  de ASO puro e na presença de Gn (razão inicial Gn: ASO 0,13, m/m) estão apresentados na Figura 21. A partir destes espectros, obteve-se os valores de largura a  $\frac{3}{4}$  do pico obtido.

**Tabela 3:** Deslocamento na largura ( $\Gamma$ ) a 75 % da altura dos picos de HATR-FTIR referentes a estiramentos axiais de grupos lipídicos de lipossomos de ASO, provocado pela incorporação de Gn (Gn: ASO 0,13).

Grupos	$\Gamma$ ( $\text{cm}^{-1}$ )		$\Delta \Gamma$ ( $\text{cm}^{-1}$ )
	ASO	Gn:ASO 0,13	
$\text{PO}_2^-_{\text{as}}$	30,37	27,63	2,74
C=O	27,78	24,88	2,90
$\text{CH}_2_{\text{s}}$	15,04	13,67	1,37
$\text{CH}_2_{\text{as}}$	22,58	21,38	1,20

Em ensaios de RMN de  $^{31}\text{P}$ , a largura do pico de fósforo em ASO pura foi detectada em 16,9 ppm, enquanto que a incorporação da Gn (Gn:ASO inicial de 0,13, m/m) aumentou a largura do pico do núcleo para 20,8 ppm. A Gn induziu um aumento da largura do pico de  $^{31}\text{P}$  em 3,9 ppm, o que corresponde a 18,7 % do valor inicial, indicando uma diminuição na liberdade de movimento do núcleo, induzida pela Gn, o que está de acordo com os resultados obtidos através de HATR - FTIR.

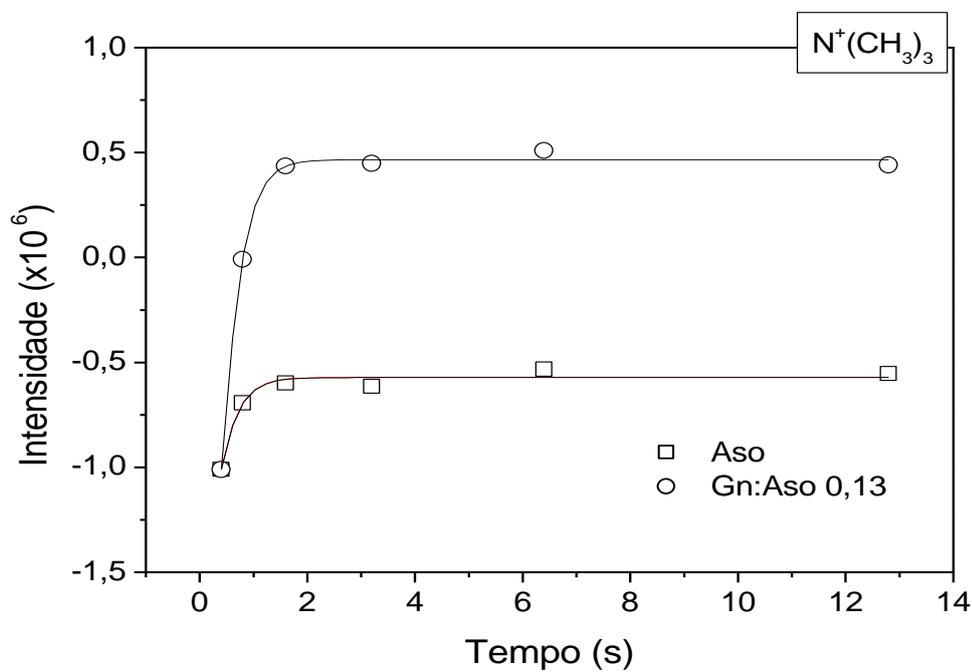


**Figura 21:** Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  de lipossomos contendo aso pura e na presença de genisteína (484 $\mu\text{M}$ )

Ainda no que se refere à região polar observou-se, através da análise dos espectros de HATR-FTIR (Figura 19), que a Gn não provocou alterações na frequência e na largura do pico referente à região da colina lipídica. Sendo assim, com o objetivo de se obter maiores informações acerca da influência da Gn na dinâmica lipídica da região polar do lipossomo, foram realizadas medidas de  $T_1$  de  $^1\text{H}$  do grupo colina. Para tal, foram analisadas uma amostra de lipossomo de ASO puro e uma amostra contendo a concentração máxima de Gn incorporada, a uma razão inicial de Gn: ASO 0,13 (m/m).

Curvas que associam (i) a intensidade do pico de RMN de hidrogênios presentes na colina lipídica (a 3,2 ppm), em sistemas lipossomais puros e na presença de Gn, ao (ii) tempo de intervalo entre pulsos de radiofrequência, estão demonstradas na Figura 22. Tais curvas estão associadas à recuperação dos hidrogênios da colina lipídica após vários pulsos de inversão. A partir destes gráficos pôde-se calcular os valores de  $T_1$  para cada núcleo analisado. A análise destas curvas demonstrou que a presença

de Gn diminuiu o  $T_1$  dos hidrogênios da colina de 0,51 s (valor correspondente a lipossomos de ASO puro) para 0,40 s (valor correspondente a lipossomos de ASO incorporados com Gn).

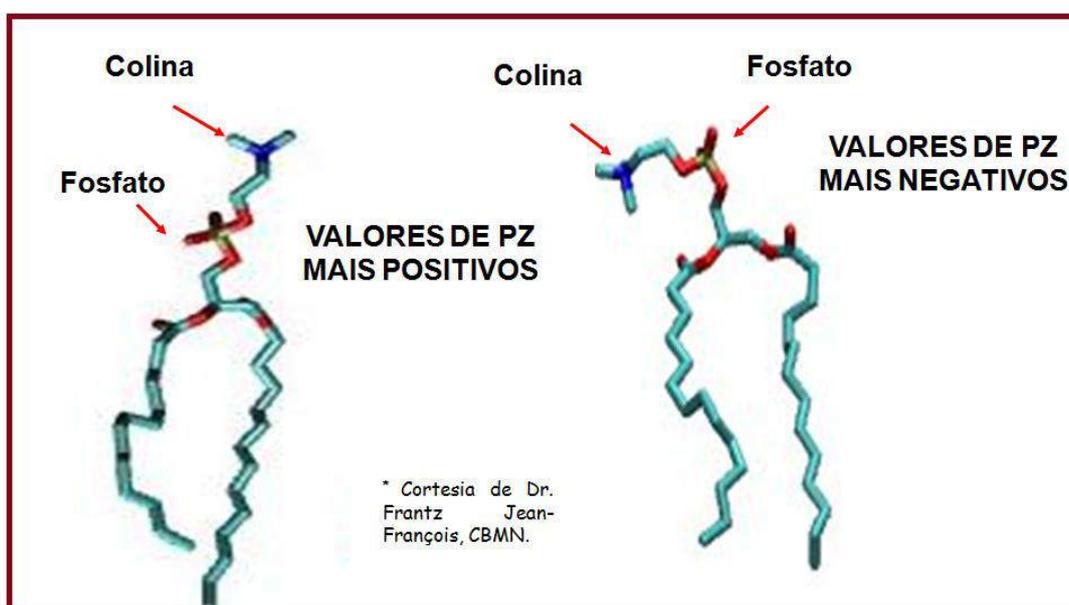


**Figura 22:** Curvas referentes à relaxação longitudinal ( $T_1$ ) dos hidrogênios da colina em lipossomos de ASO na ausência (ASO) e na presença de genisteína (Gn: ASO 0,13)

A variação de  $T_1$  está diretamente relacionada com a variação dos valores de tempo de correlação ( $\tau_c$ ), sendo assim, o comportamento induzido pela Gn parece corroborar com um discreto aumento de mobilidade na região de colina do lipídio. Nas análises de FTIR, não se observou a interação da Gn com o pico referente ao grupo colina. É possível que a Gn, ao interagir com a região do grupo fosfato lipídico, torne a região da colina mais móvel. Esse aumento na mobilidade pode ser responsável por uma modificação no potencial de superfície da membrana. As análises de potencial

zeta indicaram que a Gn aumentou os valores de potencial zeta de -81,3 mV, correspondentes a ASO puro, para -64,86 mV.

Os valores médios de potencial zeta dos lipossomas podem variar de acordo com a natureza dos seus componentes, bem como com as mudanças na orientação dos grupos de cabeça dos lipídios. Estudos apontam que formulações utilizando aolecitina de soja apresentam os valores absolutos de potencial zeta altos, atribuídos à presença de fosfolipídios negativamente carregados na molécula, os quais contribuem com uma forte carga negativa na interface (CALEGARI, 2012). Os valores globais de potencial zeta são negativos quando o plano do grupo colina encontra-se abaixo do plano do grupo fosfato e positivos quando o plano do grupo colina encontra-se acima do plano do grupo fosfato (Figura 23) (DIMITRIOS e SOPHIA, 2002;LEGRAND *et al.*, 1999).



**Figura 23:** Diferentes orientações dos grupos colina e fosfato

O potencial zeta dos lipossomos de ASO foi detectado como - 81,3 mV, enquanto que em lipossomos de ASO na presença de Gn (razão inicial Gn:ASO 0,13, m/m) incorporada tal potencial correspondeu a -64,9 mV. A Gn tornou os valores de potencial zeta de lipossomos de ASO mais positivos em 16,4 mV, o que pode estar relacionado com a orientação do grupo colina, já que esta parece ter ficado mais livre

com a adição de Gn no sistema. A isoflavona pode ter alterado a posição do grupo colina para um plano acima do plano do grupo fosfato.

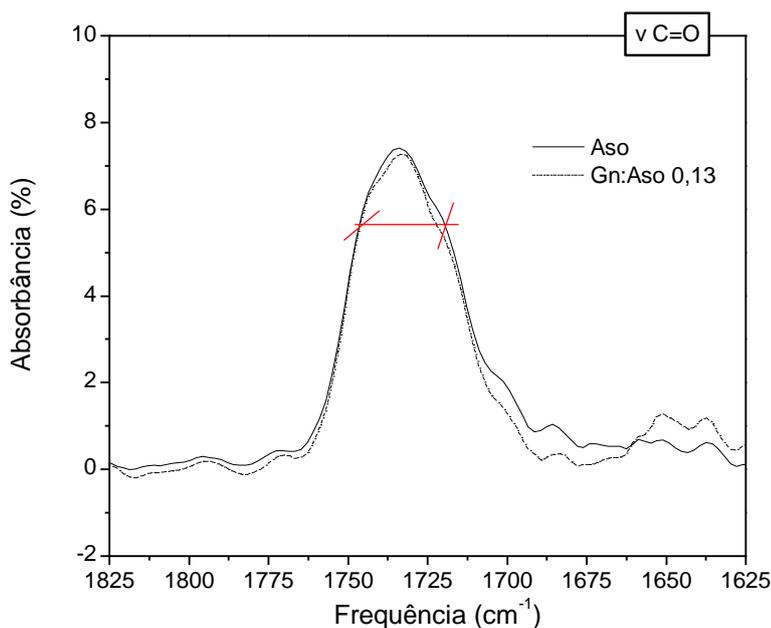
Medidas de potencial zeta são importantes para avaliação da estabilidade. Valores elevados de potencial zeta, acima de 30 Mv (positivos ou negativos), sugerem suspensões de nanocápsulas mais estáveis, devido à repulsão entre as partículas, o que previne sua agregação (MALVERN, 2012). Sendo assim, os valores de potencial zeta obtidos neste estudo, podem representar um sistema lipossomal estável.

#### **5.4.2. Interação da Genisteína com a Região Interfacial de Lipossomos de ASO**

Os efeitos da Gn na região de interface da ASO foram estudados comparando-se os valores da frequência e largura a 75% do pico de HATR-FTIR referente a  $\nu$  C = O lipídico, em lipossomos de ASO puro e contendo Gn (razão inicial Gn:ASO 0,13, m/m). A frequência do grupo carbonila está relacionada a mudanças em seu ambiente, como ligações de hidrogênio ou polaridade (ARRONDO e GOÑI, 1998). Os dados de FTIR indicaram que a presença da Gn não provocou alterações na frequência do grupo carbonila (Tabela 2), o que pode indicar ausência de interação da Gn, via ligações de hidrogênio, com o grupo carbonila lipídico.

A Figura 24 apresenta uma ampliação do espectro de HATR-FTIR apresentado na Figura 19, na região da carbonila ( $1734,01 \text{ cm}^{-1}$ ). Através da análise da largura da banda referente ao grupo carbonila lipídico, observou-se que a presença da Gn promoveu uma redução na largura da banda em aproximadamente  $3 \text{ cm}^{-1}$ .

As absorções de éster da carbonila localizados em sn-1 e sn-2 da cadeia lipídica, os quais não são equivalentes, caracterizam a amplitude da banda C=O (WONG e MANTSCH, 1988). A conversão dos lipídios do estado líquido cristalino para a fase gel coincide com um estreitamento da largura da banda de FTIR correspondente a  $\nu$  C=O (LEWIS *et al.*, 1990; LEWIS e MCELHANEY, 2002). Neste contexto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a Gn também provoca um efeito de ordenamento na região de interface dos lipossomos de ASO.



**Figura 24:** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO puros e na presença de genisteína (484  $\mu\text{M}$ ) na região da C=O

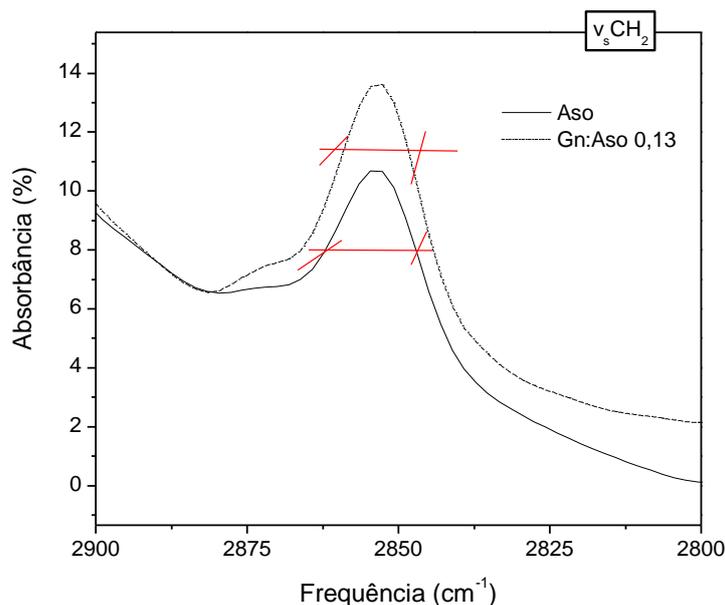
#### 5.4.3. Interação da Genisteína com a Cadeia Acil de Lipossomos de ASO

As alterações nas frequências dos estiramentos axiais simétricos e assimétricos dos metilenos da cadeia acil lipídica ( $\nu_s \text{CH}_2$  a  $2854,05 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{as} \text{CH}_2$  a  $2924,09 \text{ cm}^{-1}$ ) podem refletir no grau de ordem conformacional, bem como na isomerização trans / gauche do sistema lipídico (SEVERCAN, SAHIN e KAZANCI, 2005). A Gn provocou uma pequena influência no  $\nu_s \text{CH}_2$ , diminuindo sua frequência em  $1,33 \text{ cm}^{-1}$ , o que pode indicar um discreto ordenamento na membrana. Já a frequência do  $\nu_{as} \text{CH}_2$ , não apresentou alterações com a presença da Gn no sistema lipossomal (ver Tabela 1).

A ampliação do espectro de HATR-FTIR na região da banda do estiramento simétrico dos metilenos do grupo acil lipídico ( $\nu_s \text{CH}_2$  a  $2854,05 \text{ cm}^{-1}$ ) está apresentada na Figura 25. A incorporação da Gn provocou um estreitamento na largura do pico de  $1,37 \text{ cm}^{-1}$  (ver Tabela 3). A análise das bandas de estiramento assimétrico dos

metilenos do grupo acil lipídico ( $\nu_s \text{CH}_2$  a  $2924,09 \text{ cm}^{-1}$ ) demonstrou que a Gn induziu uma redução na largura do pico em  $1,2 \text{ cm}^{-1}$ . Isto indica uma discreta redução na presença de ligações gauche no sistema, tornando esta região hidrofóbica mais ordenada.

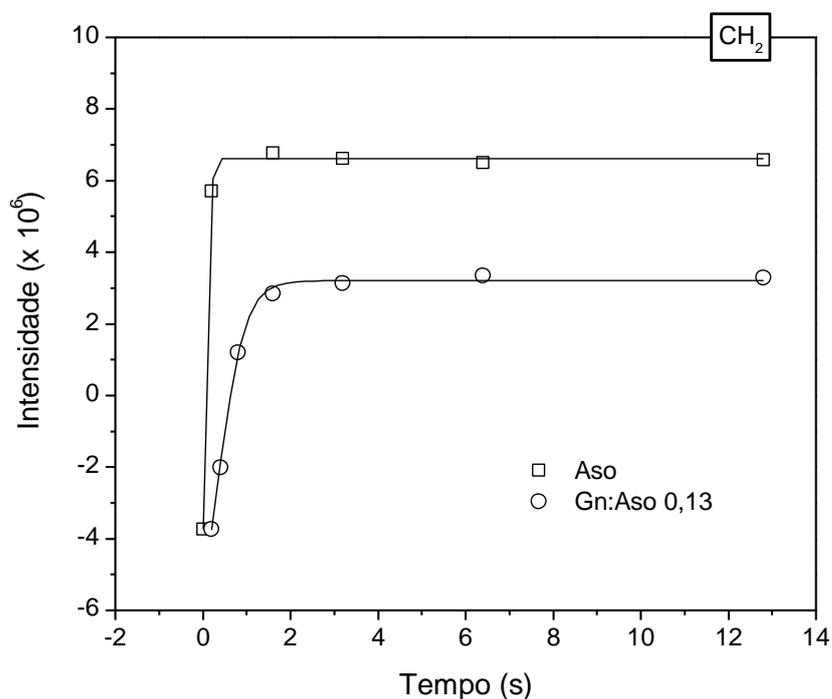
A fim de obter maiores informações sobre a influência da Gn na dinâmica lipídica da região acil de lipossomos de ASO, foram realizadas medidas de  $T_1$ , a partir de RMN de  $^1\text{H}$  nesta região, utilizando lipossomos de ASO puro e contendo a maior concentração de Gn incorporada (na razão inicial Gn:ASO 0,13, m/m). As curvas referentes à intensidade do pico de RMN de hidrogênios presentes nos metilenos da cadeia acil (1-2 ppm) lipossomal, com e sem Gn, ao tempo de intervalo entre pulsos de radiofrequência estão demonstradas na Figura 26. A partir destas curvas, os valores de  $T_1$  foram calculados para a região lipídica em estudo.



**Figura 25:** Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de fosfatidilcolina presente em lipossomos de ASO puros e na presença de genisteína ( $484 \mu\text{M}$ ) na região do  $\nu_s \text{CH}_2$  ( $2854,05 \text{ cm}^{-1}$ ).

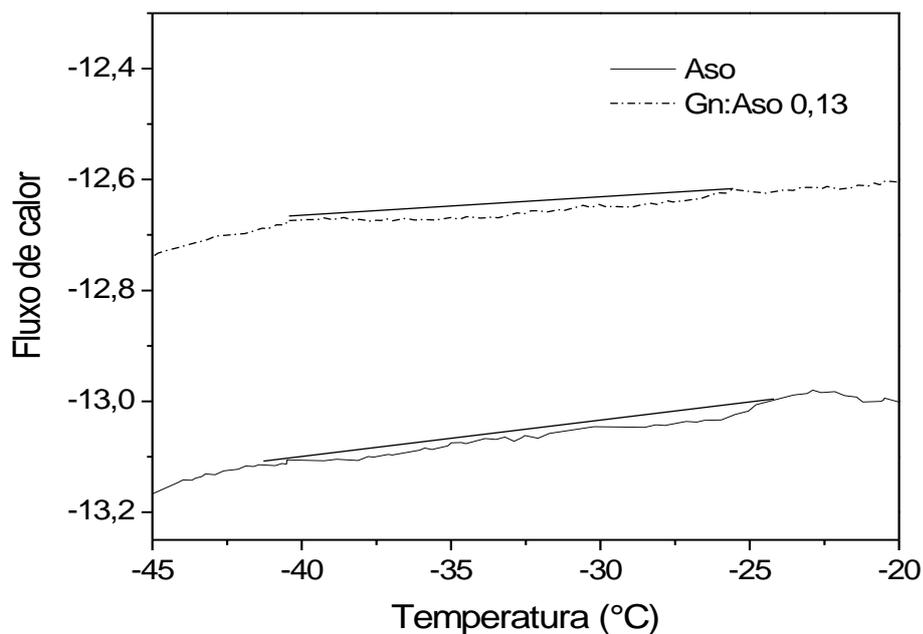
A presença de Gn provocou um aumento no  $T_1$  da região metilênica de 0,018s (valor correspondente a lipossomos de ASO puro) para 0,5 s (valor correspondente a lipossomos de ASO na presença de Gn), o que demonstra que o comportamento induzido pela Gn parece diminuir a mobilidade na região acil, o que corrobora com os resultados observados nas análises de HATR-FTIR.

As informações sobre o efeito da Gn na região apolar dos lipossomos de ASO foram complementadas por análise calorimétrica. A partir de curvas de DSC de lipossomos de ASO puros (ASO) e na presença de Gn em uma razão inicial Gn: ASO 0,13 (Figura 27) foi observada uma transição endotérmica na faixa de  $-40$  a  $-18$  ° C. Este intervalo corresponde ao intervalo negativo típico de fosfatidilcolina insaturada completamente hidratada, como a presente em lipossomos de ASO.



**Figura 26:** Tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ )  $^1\text{H}$  do  $\text{CH}_2$  de ASO na ausência (quadrados abertos) e na presença (círculos abertos) de genisteína

A partir desta transição, foram obtidos valores referentes à variação de entalpia ( $\Delta H$ ) de lipossomos de ASO puros e com Gn na concentração de 484  $\mu\text{M}$ . Os resultados estão expressos na Tabela 4.



**Figura 27:** Curvas de DSC para lipossomos de ASO com e sem genisteína incorporada

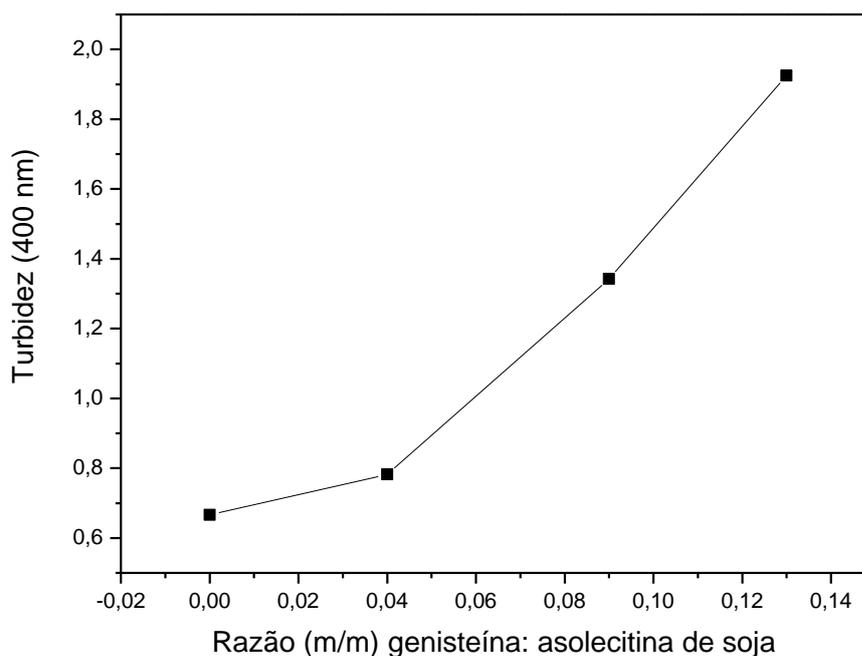
**Tabela 4:** Influência da genisteína (Gn) nos valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) da Asolecitina de Soja (ASO).

Amostra	$\Delta H$ (J/g)
ASO	0,097
Gn:ASO 0,13 (m/m)	0,1876
Variação	0,0906

Os resultados descritos na Tabela 4 demonstram que a Gn aumenta o valor de  $\Delta H$  em ASO, o que indica que a Gn promove um rearranjo molecular na fosfatidilcolina para um estado mais ordenado, ou seja, com menor mobilidade, o que é sustentado pelas análises de HATR- FTIR e RMN.

## 5.5. MEDIDAS DE TURBIDEZ

O efeito global da Gn na turbidez de membranas de ASO foi investigado através de medidas de densidade óptica do sistema lipossomal a 400 nm. Na Figura 28, está apresentada a influência de diferentes concentrações de Gn (razão inicial m/m Gn: ASO variando de 0 a 0,13) sobre a turbidez dos lipossomos.



**Figura 28:** Influência de diferentes concentrações de genisteína sobre a turbidez de lipossomos de ASO.

A partir da análise da Figura 24, pôde-se observar um aumento na turbidez de lipossomos de ASO com o aumento da concentração de Gn incorporada no sistema. Com a razão inicial (m/m) máxima de Gn: ASO (0,13) percebeu-se um aumento de

aproximadamente 34,6% do valor inicial de turbidez nos lipossomos. A redução da turbidez em uma membrana pode ser observada na transição da fase gel para a líquido-cristalina, principalmente devido às alterações no índice de refração dos lipídios (YI e MACDONALD, 1973).

Sendo assim, o aumento observado nos valores de turbidez, indica que a Gn aumentou de forma global a ordem no sistema lipossomal, ou seja, diminuiu a mobilidade da membrana lipídica. Este resultado está suportado pelos resultados obtidos nas análises de HATR-FTIR, RMN e estudos de DSC.

O valor de densidade óptica parece também estar associado com o tamanho das partículas, já que uma diminuição no valor de densidade óptica pode estar relacionada a uma redução no tamanho das partículas (KORKMAZ e SEVERCAN, 2005; KAZANCI, SEVERCAN e ZORLU, 2000). Logo, o aumento na turbidez observado no estudo pode indicar um aumento do tamanho lipossomal provocado pela incorporação da Gn. Resultados preliminares obtidos com a técnica de DLS apontaram o diâmetro de 474,7 nm para lipossomos de ASO puro e de 563,1 nm para lipossomos de ASO contendo Gn. Assim, a adição da Gn (em razão inicial Gn:ASO de 0,13, m/m) aumentou o tamanho do lipossomo de ASO em aproximadamente 18,6%.

CARNEIRO (2007) correlacionou um aumento no diâmetro das partículas compostas pelos lipídios fosfatidilcolina de soja (PC) e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e o antibiótico paromomicida (PA), com a ordem da membrana. O autor sugere que o aumento do diâmetro das vesículas constituídas por fosfolípidios (PC e DPPC), pode indicar a existência de interação entre a PA e as membranas lipossomais.

Assim sendo, a Gn promoveu maior ordenamento em membranas de ASO, bem como o aumento de diâmetro dos lipossomos. Os estudos de caracterização mostraram que a Gn causa um efeito de ordenamento nos lipossomos de ASO, reduzindo a mobilidade da membrana, tanto na região polar, quanto na interface e região apolar, resultados estes, confirmados pelas medidas de turbidez.

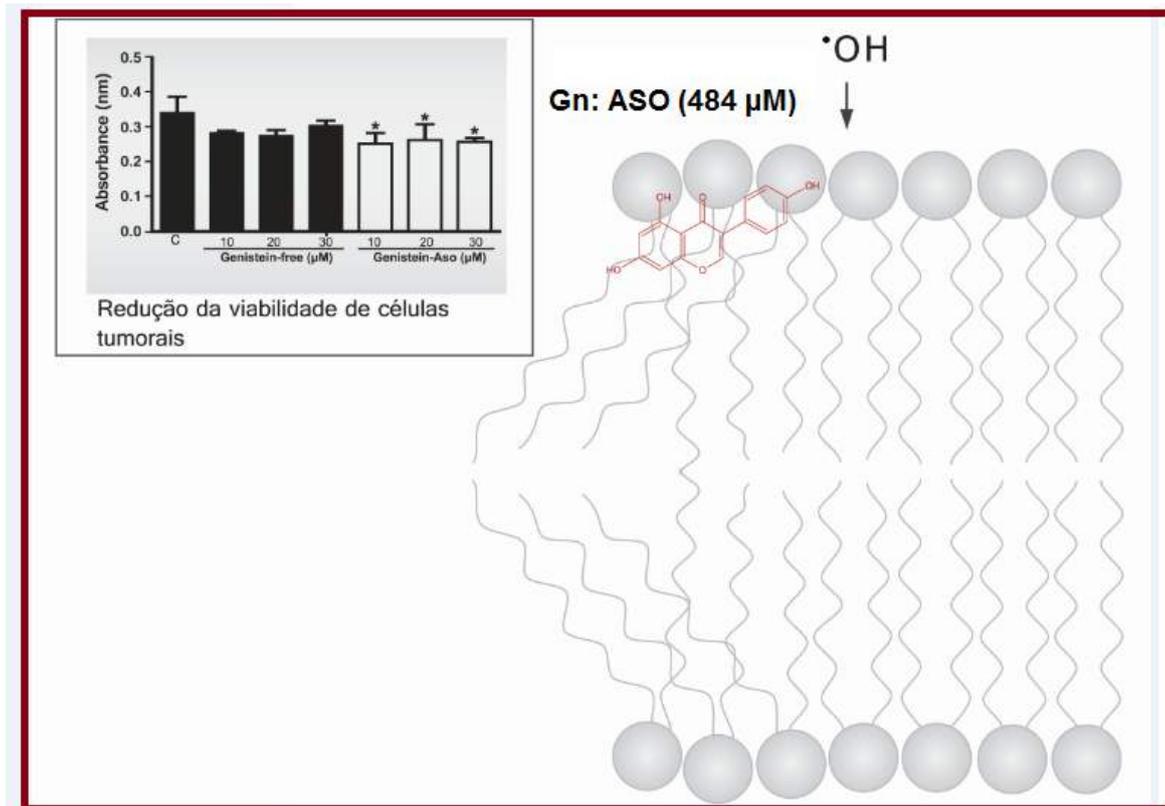
## 5.6. GENISTEÍNA: CORRELAÇÕES ENTRE ATIVIDADES BIOLÓGICAS VS EFEITOS NA DINÂMICA MOLECULAR DE MEMBRANAS

O efeito de aumento na ordem do sistema lipossomal parece estar relacionado com a elevada ação antioxidante apresentada pela Gn. ARORA e colaboradores (2000) sugeriram que um aumento no grau de ordem estrutural e rigidez em membranas de SLPC e DPPC, causado por Gn, pode reduzir a mobilidade dos radicais livres na bicamada lipídica. A redução na fluidez da membrana causada por antioxidantes pode resultar na inibição da peroxidação de lipídios, o que se deve a uma diminuição na difusão de radicais livres no sistema.

Por outro lado, as membranas citoplasmáticas de células tumorais apresentam tipicamente maior fluidez e menor estabilidade frente à das células saudáveis (ARORA *et al.*, 2000). O aumento de fluidez das membranas acarreta em uma maior susceptibilidade das células tumorais aos agentes oxidantes (Medicina complementar, 2004). Segundo SHINITZKY e colaboradores (1983), a diminuição da fluidez de membrana aumenta a imunogenicidade de células tumorais de animais e seres humanos, e é possível restaurar a imunocompetência de pacientes com câncer, com a diminuição da fluidez das células do sistema imune. A combinação de aumento da imunogenicidade tumoral com a restauração da função imune, pode se tornar mais uma aliada estratégia para combater o câncer.

O enrijecimento da membrana pode ser assim um mecanismo de ação da Gn no combate a cânceres como o de mama e de próstata, juntamente com outros mecanismos tais como a inibição da tirosina quinase, captação de radicais livres (pela presença de grupos hidroxila fenólicos) e quelação de metais de transição (MATSUDA *et al.*, 1994).

Na Figura 29, está apresentado um esquema ilustrativo das correlações descritas neste item:



**Figura 29:** Genisteína: Correlações entre atividades biológicas vs efeitos na dinâmica molecular de membranas de ASO.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, realizou-se a incorporação e quantificação da Gn incorporada em lipossomos constituídos por ASO e investigou-se a influência da isoflavona na peroxidação *in vitro* induzida por radicais hidroxil e na dinâmica lipídica dos lipossomos. Os resultados foram correlacionados com estudos das interações entre a Gn e o sistema lipossomal composto por ASO :

- ✓ A concentração máxima de Gn incorporada em lipossomos de ASO foi de 484 μM ou 0,13 mg/mL, o que correspondeu a uma razão inicial (m/m) Gn: ASO de 0,13.

- ✓ A influência da Gn na peroxidação *in vitro* da membrana indicou que esta tem uma atividade antioxidante contra o dano induzido por  $\bullet\text{OH}$  em lipossomos de ASO. A concentração inibitória da peroxidação lipídica em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) foi atingido em uma razão inicial (m/m) Gn:ASO 0,06, o que corresponde a uma concentração de Gn incorporada de aproximadamente 0,065 mg/mL, ou 242  $\mu\text{M}$ . Na maior concentração de Gn incorporada (0,13 mg/mL ou 484  $\mu\text{M}$ ), a isoflavona inibiu a peroxidação induzida por  $\bullet\text{OH}$  em 90,90%.
- ✓ A Gn incorporada em ASO, nas concentrações 20 e 30  $\mu\text{M}$ , reduziu a viabilidade celular da linhagem C6 em 25% e 34% respectivamente, em comparação com células não tratadas. Para a linhagem MCF-7 a genisteína (10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ ), incorporada, reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 25%. Em nenhum dos casos anteriores, a Gn apresentou resultados significativos na sua forma livre, portanto, a incorporação de Gn em ASO parece facilitar a interação entre a isoflavona e a membrana das células tumorais.

A influência da Gn na dinâmica lipídica está listada a seguir, de acordo com as regiões específicas dos lipídios:

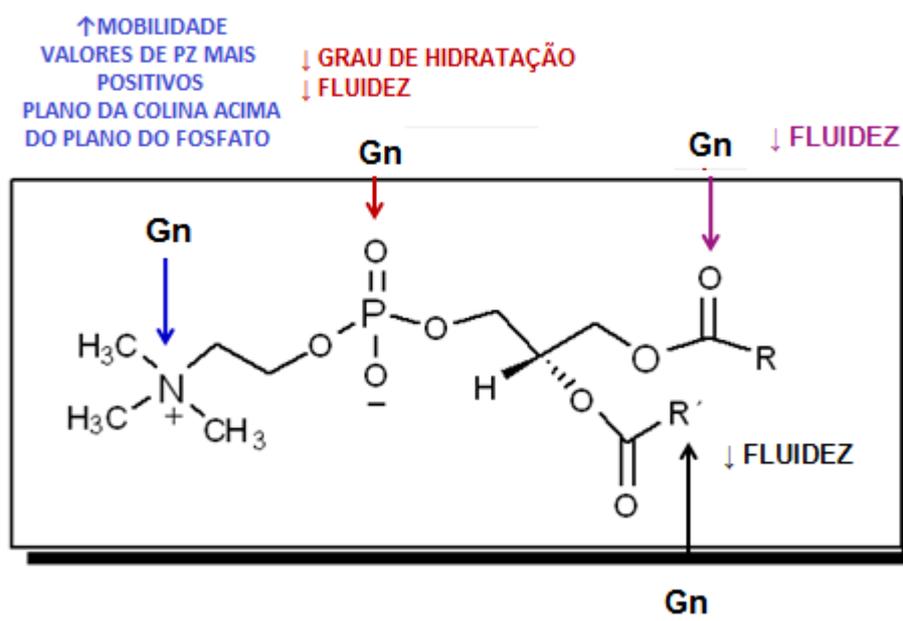
- ✓ REGIÃO POLAR: Através das técnicas de HATR-FTIR e RMN, observou-se que a Gn reduziu o grau de hidratação na região do fosfato lipídico, bem como ordenou a membrana nesta região. A Gn, ao interagir com o grupo fosfato, parece ter deixado o grupo colina mais móvel, o que pode estar relacionado a uma modificação no potencial de superfície da membrana. A presença de Gn tornou os valores de potencial zeta dos lipossomos mais positivos, o que pode indicar que a isoflavona orientou o grupo colina num plano mais acima do plano do grupo fosfato.
- ✓ REGIÃO INTERFACIAL: A Gn não provocou alterações na frequência de HATR-FTIR da banda  $\nu$  C=O, o que indicou ausência de interação da Gn via ligações de hidrogênio com o grupo C=O lipídico. Através da análise de largura a 75% da

altura do pico de HATR-FTIR observou-se que a Gn provocou um maior grau de ordem na interface polar-apolar da membrana.

- ✓ REGIÃO APOLAR: Com os estudos de HATR-FTIR, RMN e DSC, observou-se que a Gn também ordenou a membrana, conferindo um maior grau de ordem na região hidrofóbica da membrana.
  
- ✓ A turbidez do sistema lipossomal aumentou proporcionalmente à incorporação de concentrações crescentes de Gn, indicando um efeito global de ordenamento no sistema lipossomal e também pode ser correlacionado com o aumento do tamanho dos lipossomos, observado por medidas de DLS. Este resultado está suportado pelos resultados obtidos nas análises de HATR-FTIR, RMN e estudos de DSC.

Os estudos de caracterização mostraram que a Gn causa aumento na ordem do sistema lipossomal de lipossomos de ASO tanto na região polar, quanto na interface e região apolar. A diminuição na fluidez da membrana, provocada pela Gn, pode estar fortemente associado ao caráter antioxidante da isoflavona. Adicionalmente a um maior entendimento sobre o mecanismo de ação antioxidante e antitumoral da Gn, a caracterização do sistema lipossomal de ASO contendo Gn contribuirá na escolha de materiais para desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada da isoflavona. Isto aprimorará estudos que viabilizem seu uso como fármaco antioxidante e antitumoral.

Um esquema ilustrando os efeitos descritos acima está apresentado na Figura 30:



**Figura 30:** Esquema geral e simplificado dos efeitos da genisteína na dinâmica de lipossomos de ASO.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; BAPTISTA, A. S.; ALENCAR, S. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Analysis of isoflavonoids from leguminous plant extracts by RPHPLC/ DAD and electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Food Sciences and Nutrition.**, v. 58, p.116-124, 2007.
- AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas **B. CEPPA**, Curitiba, v.20, n.2, p. 323-334, 2002.
- AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. **Clin Exp Immunol.**, v.131, p. 398-404, 2003.
- ANDERSON, J.J.B.; GARNER, S.C. Phytoestrogens and human function. **Nutrition Today**, v.32, n.6, p.232-239, 1997.
- ARORA, A.; BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, p. 102-109, 2000.
- ARRONDO, J.L.R. ; GOÑI, F.M. Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes, **Chem. Phys. Lipids.**, v. 96, p. 53-68, 1998.
- ARSOV, Z.; QUARONI, L.; Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 150, p. 35-48, 2007.
- BARENHOLZ, Y.; THOMPSON, T.E. Sphingomyelin: biophysical aspects. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 102, p. 29-34, 1999.
- BEMIS, D. L.; CAPODICE, J. L.; DESAI, M.; BUTTYAN, R.; KATZ, A. E. A concentrated aglycone isoflavone preparation (GCP) that demonstrates potent anti-prostate cancer activity *in vitro* and *in vivo*. **Clinical Cancer Research, Philadelphia**, v. 10, p. 5282, 2004.
- BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 295-305, 1984.
- CALEGARI, R. L.. Desenvolvimento de filmes de metilcelulose incorporados por nanopartículas de Poli- e- caprolactona/ B caroteno. [dissertação] Florianópolis, **SC**,135 p.,2012.

CAMERON, E.; PAULING, L. Cancer and vitamin C. **Linus Pauling Institute of Science and Medicine.**, New York, p.238, 1979.

CARNEIRO, G. Lipossomas contendo paromomicina: desenvolvimento, caracterização e estudos de permeação cutânea *in vitro*. [dissertação] Belo Horizonte, BH, 71 p., 2007.

CASAL, H.L.; MANTSCH H.H.; HAUSER, H. Infrared and  $^{31}\text{P}$ -NMR studies of the interaction of  $\text{Mg}^{2+}$  with phosphatidylserines: effect of hydrocarbon chain unsaturation, **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 982, p. 228-236, 1989.

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.

CHANG, H.; YEH, M. Desenvolvimento Clínico de Lipossomos Baseados em Drogas: Formulação, Caracterização e Eficácia Terapêutica. **Int. J. Nanomedicine.**, v. 7, p. 49–60, 2012.

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.

CHOI, S.H.; WARE, W.; LAUTERBACH, S.R.; PHILLIPS, W.M. Infrared spectroscopic studies on the phosphatidylserine bilayer interacting with calciumion — effect of cholesterol. **Biochemistry**, v. 30, p. 8563–8568, 1991.

CIESLIK-BOCZULA, K.; MANIEWSKAB, J.; GRYNKIEWICZC, G.; SZEJAD, W.; KOLLA, A.; HENDRICHE, A. B. Interaction of quercetin, genistein and its derivatives with lipid bilayers – An ATR IR-spectroscopic study. **Vib. Spectrosc.** v. 62, p. 64-69, 2012..

CONKLIN, K.A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutr. Cancer.**, v. 37, p. 1-18, 2000.

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHEL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, daidzein and their B- glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soy bean foods from American and asian diets. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.**, v. 41, p. 1961- 1967, 1993.

DEBOUZY, J.C.; AOUS, S.; DABOUI, 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.

de LIMA, V.R. , MORFIM, M.P. ; TEIXEIRA, A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Relationship between the action of reactive oxygen and nitrogen species on bilayer membranes and antioxidants, **Chem. Phys. Lipids.**, v. 132, p.197-208, 2004.

de LIMA, V.R.; CARO, M.S.B.; TAVARES, M.I.B.; CRECZYNSKY-PASA, T.B. Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms. **J. Pineal Res.**, v. 43, p. 276-282, 2007.

de LIMA, V. R. Desenvolvimento de estratégias para investigar a Localização e efeitos de fármacos incorporados em membranas lipídicas. Santa Catarina: **UFSC**, 2009. Tese (Doutorado); Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

de LIMA, V.R.; CARO, M.L.M.; DESBAT, B.; DUFOURC, E.; PASA, P.A.; PASA, T.B.C. Influence of melatonin on the order of Phosphatidylcholine-based membranes. **J. Pineal Res.**, v. 49, p. 169–175, 2010.

DIMITRIOS, G. F.; SOPHIA, G. A. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. **Journal of colloid and Interface Science**, v. 251, p. 271-277, 2002.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**. V. 60, p. 205-211, 2002.

DRAGAN, A.; DUSANKA, D.; DRAGO, B.; NENAD, T. Structure –radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatica Chemita Acta**, v. 76, p. 55-61, 2003.

DRISKO, J.A.; CHAPMAN, J.; HUNTER, V.J. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. **Gynecol. Oncol.**, New York, v.88, p. 434-439, 2003.

ELDRIDGE, A. C. Determination of isoflavonas in soybean flours, protein concentrates, and isolates. **Journal of the American Chemical Society.**, v. 183, p.90, 1982.

ESTEVEZ, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos Benéficos das Isoflavonas de Soja em Doenças Crônicas. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 14(1), p. 43-52, 2001.

FRANKE, A. A.; HALM, B.M.; KAKAZU, K.; XINGNAN, L.; CUSTER, L.J. Phytoestrogenic isoflavonoids in epidemiologic and clinical research. Published

online in **Wiley Interscience**: ([www.drugtestinganalysis.com](http://www.drugtestinganalysis.com)) DOI (10.1002/dta.12), 2008.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomos: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Quím. Nova**. 28, 2005.

FRITSCHÉ, S.; STEINHART, H. Occurrence of hormonally active compounds food: a review. **European Food Research and Technology**., v. 209, p. 153-179, 1999.

GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; GRATACAP, M.P.; TULLIEZ, J.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **General Pharmacology**, v. 32, p. 279-286, 1999.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 7, p.65-86, 1989.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. F. C.; MIRA, L. e CORVO, M. L. Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids, **Current Medicinal Chemistry**, v.15, p. 1586-1605, 2008.

GRDADOLNIK, J.; KIDRIC, J.; HADZI, D. Hydration of phosphatidylcholine reverse micelles multilayers an infrared spectroscopic study. **Chem. Phys. Lipids**, v. 59, p. 57-68, 1991.

GURSOY, A.; KUT, E.; ÖZKIRIMLI, S. Co-encapsulation of isoniazid and rifampicin in liposomes and characterization of liposomes by derivative spectroscopy. **Int. J. Pharm.**, v. 271, p. 115-123, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, v. 219, p. 1-14, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. **FEBS Lett.**, v. 307, p.108-112, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2000.

HAN, R.M.; TIAN, Y.X.; LIU, Y.; CHEN, C.H.H.; AI, X.Ch.; ZHANG, J.; SKIBSTED, L.H. Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants, **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 3780–3785, 2009.

HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R. e BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p.572–584, 2002.

HENDRICH, A.B. Flavonoid–membrane interactions: possible Consequences for biological effects of some polyphenolic compounds, **Acta Pharmacol. Sin.**, v.27, p.27–40, 2006.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WAHLBERG, P.; WENNWERBERG, J.; KJELLSTROM, J.H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 42, p. 320-323, 2006.

HEREĆ, M.; ISLAMOV, A.; KUKLIN, A.; GAGOŚ, M.; GRUSZECKI, W.I. Effect of antibiotic amphotericin B on structural and dynamic properties of lipid membranes formed with egg yolk phosphatidylcholine. **Chem. Phys. Lipids**, v. 147, p. 78-86, 2007.

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.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G. HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods.**, v.42, p. 377-387, 2007.

INCA, 2011. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. Estimativa: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2011.

IZUMI, T.; PISKULA, M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOKE, K; SAITO, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1695- 1699, 2000.

JANSHOFF, A.; STEINEM, C. Transport across artificial membranes—an analytical perspective. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.385, p. 433-451, 2006.

KAZANCI, N.; SEVERCAN, F.; ZORLU, F. Tamoxifen increases membrane fluidity at high concentrations. **Biosci. Rep.**, v. 20, p. 177–184, 2000.

KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicol.**, v. 149, p. 43-50, 2000.

KHAN, A. Q.; KHAN, R.; REHMAN, M. U.; LATEEF, A.; TAHIR, M.; ALI, F.; SULTANA, S. Soy isoflavones (daidzein & genistein) inhibit 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced cutaneous inflammation via modulation of COX-2 and NF- $\kappa$ B in Swiss albino mice. **Toxicol.**, v. 302, p. 266-274, 2012.

KLEINVELD, H. A.; SWAAKA, J.G.; HACK, C.E. Interactions between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview. **Scand. J. of Rheumatol.**, v. 18, p. 341-52, 1989.

KOPPENOL, W.H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **FEBS Lett.**, v. 264, p. 165-167, 1990.

KOPPENOL, W.H. The Haber-Weiss cycle- 71 years later, **Redox Rep.**, v. 7, p. 59-60, 2002.

KORKMAZ, F.; SEVERCAN, 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.

KURZER, M.S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review of Nutrition, Palo Alto**, v.17, p.353-381, 1997.

LASIC, D.D. Novel applications of liposomes. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LEE, D.C.; CHAPMAN, D. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. **Biosci. rep.**, v. 6, p. 235-256, 1986.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. **S.T.P. Pharma sciences**, v. 9, n.5, p. 411 – 418, 1999.

LEWIS, R.N.A.H.; MANNOCK, D.A.; MCELHANEY, R.N.; WONG, P.T.T.; MANTSCH, H.H. Physical properties of glycosyldiacylglycerols: an infrared spectroscopic study of the gel-phase polymorphism of 1,2-di-O-acyl-3-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)-sn-glycerols. **Biochemistry**, v. 29, p. 8933-8943, 1990.

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.

LEWIS, R.N.A.H.; MCELHANEY, R.N. Vibrational spectroscopy of lipids, in: J. M. Chalmers, Griffiths, P.R. (Eds.), *The handbook of vibrational spectroscopy*, **John Wiley & Sons Ltd.**, p. 3447–3464, 2002.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. The Haber-Weiss cycle- 70 years later: an alternative view. **Redox Rep.**, v. 7, p. 55-56, 2002.

LÓPEZ-GARCÍA, F.; MICOL, V.; VILLALAÍN, J.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.C. Infrared spectroscopic study of the interaction of diacylglycerol with 87 phosphatidylserine in the presence of calcium. **Biochim Biophys Acta**, v. 169, p. 264-272, 1993.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. **Curr. Med. Chem.**, v.2, p. 691-714, 2002.

MALVERN INSTRUMENTS. Disponível em: <http://www.malvern.co.uk>. Acesso: Abril 2012.

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**, v. 1798, p. 376-388, 2010.

MANRIQUE-MORENO, M.; HOWE, J.; SUWALSKY, M.; GARIDEL, P.; BRANDENBURG, K. Physicochemical interaction study of non-steroidal anti-inflammatory drugs with dimyristoylphosphatidylethanolamine liposomes. **Lett. Drug Des. Discovery**, v. 7, p. 50-56, 2010.

MANTSCH, H.H.; MCELHANEY, R.N. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. **Chem. Phys. Lipids**, v. 57, p. 213–226, 1991.

MARSH, D., WATTS, A.; KNOWLES, P. F. Cooperativity of the phase transition in single and multilayer lipid vesicles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 465, p. 500-514, 1977.

MATSUDA, S. *et al.* Hydrolysis of isoflavones in soybean cooked syrup by *Lactobacillus casei* subsp. *raamnosus* IFO 3425. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 74, n. 5, p. 301-304, 1994.

Medicina complementar (2004), <http://www.medicinacomplementar.com.br/temaMai04.asp>. Acesso em 04/11/2013.

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.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURITSEN, O.G.; JORGENSEN, K. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. **Chem. Phys.Lipids.**, v. 73, P. 3-25, 1994.

OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OHVO-REKILÄ, H.; RAMSTEDT, B.; LEPPIMAKI, P.; SLOTTE, J.P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Prog. Lipid Res.**, v. 41, p. 66-97, 2002.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B.; MISIAK, L. E.; ZARZYKA, B.; PADUCH, R.; GAWRON, A.; GRUSZECKI, W. I. Localization and interaction of genistein with model membranes formed with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1818, p. 1785-1793, 2012.

PYU, Y. H.; LEE, T. C.; LEE, Y. C. Enrichment of bioactive isoflavonas in soymilk fermented with B- glucosidase- producing lactic acid bacteria. **Food Research International.**, v. 38, p. 551-559, 2005.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil- in- water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

SALGANIK, R. I.; ALBRIGHT, C. D.; RODGERS, J.; KIM, J.; ZEISEL, S. H.; SIVASHINSKIY, M. S.; DYKE, T. A. V. Dietary antioxidant depletion: enhancement of tumor apoptosis and inhibition of brain tumor growth in transgenic mice. **Carcinogenesis.**, v. 21, p. 909-914, 2000.

SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Liposomes: has the magic bullet hit the Target? **Quim. Nova.**, v. 25, p. 1181-1115, 2002.

SEVERCAN, F. Vitamin E decreases the order of the phospholipid model membranes in the gel phase: an FTIR study. **Bioscience Reports.** V. 17, nº 2, 1997.

SEVERCAN, 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.**, p. 215-222, 1668.

SEVERCAN, 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.

SHERTZER, H.G. *et al.* Inhibition of CYP1A1 enzyme activity in mouse hepatoma cell culture by soybean isoflavones. **Chemico Biological Interactions**, v. 123, n. 1, p. 31-49, 1999.

SHINITZKY, M.; SKOMICK, Y.; GORELIK. E.; SINDELAR, W. Regulation of membrane function by lipids; implications for tumor development. **Prog Clin Biol Res.**, v. 132B, p. 425-33, 1983.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento-2.ed.rev.Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. Da **UFSC**.p. **489-507**, 2000.

SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3- 4, p. 375-383, 2000.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, **Journal Controlled Release**, v. 70, p. 1 – 20, 2001.

SOUSA, R. S.; NOGUEIRA, M. A. O.; MARQUES, V. G.; CLEMENTIN, R. M.; de LIMA, V. R. Effects of  $\alpha$ -eleostearic acid on asolectin liposomes dynamics: Relevance to its antioxidant activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 51, p. 8–15, 2013.

STADTMAN, E.R. Protein oxidation and aging. **Sci.**, v. 257, p.1120-1124, 1992.

TAMM, L.K.; TATULIAN, S.A.Q. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. **Rev. Biophys. J.**, v. 30, p. 365-429, 1997.

TATULIAN, S.A.Effect of lipid phase transition on the binding of anions to dimyristoylphosphatidylcholine liposomes, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 736, p.189–195, 1983.

TATULIAN, S.A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: A method of choice for studying **membrane proteins and lipids**. **Biochemistry**, v. 42, p. 11898-11907, 2003.

TIBERG, F. Improving drug delivery by use of lipid self-assembly particle structures- beyond liposomes and emulsions. (2005) Disponível em: <<http://www.touchbriefings.com/pdf/1133/Tiberg.pdf/>>.

TIMOSZYK, A.; GDANIEC, Z.; LATANOWICZ, L. The effect of polysialic acid on molecular dynamics of model membranes studied by  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. **Solid State Nucl. Magn. Reson.**, v. 25, p.142-145, 2004.

TOLONEM, M. Vitamins and minerals in health and nutrition. **Ellis Horwood Series in Food Science and Technology.**, London, p. 231, 1990.

TOYRAN, N.; SEVERCAN, F. Competitive effect of vitamin D<sub>2</sub> and Ca<sup>2+</sup> on phospholipid model membranes: an FTIR study. **J. Mol. Struct.**, v. 123, p. 165-176, 2003.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.53, p. 203-208, 2001.

TSAO, R.; YANG, R.; YOUNG, J. C. Antioxidant isoflavonas in osage orange, maclura pomifera (Raf) schneid. **Journal agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6445-6451, 2003.

VAN MEER, G.; VAN GENDEREN, I.L. Physicochemical questions in lipid sorting. In: HILDESON, H.J.; RALSTON, G.B. Physicochemical methods in the study of biomembranes. New York, 1994.

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCIA- LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; MARTINEZ, J. A. Content and profile of isoflavones in soy- based foods as a function of the production process. **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 27-38, 2011.

WAGNER, B.A.; BUETTNER, G.R.; BURNS, C.P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochem.**, v. 33, p. 4449-4453, 1994.

WONG, P.T.T.; MANTSCH, H.H. High-pressure infrared spectroscopic evidence of water binding sites in 1,2-diacylphospholipids. **Chem. Phys. Lipids**, v. 46, p. 213-224, 1988.

YEAGLE, P.L. ; MARTIN, R.B. Membrane Transport Processes, Raven Press, New York, 1978.

YI, P.N.; MACDONALD, R.C. Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine. **Chem Phys Lipids**, v. 11, p. 14–134, 1973.

YU, J.; CHENG Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Effects of genistein and daidzein on membrane characteristics of HTC cells. **Nutr. Cancer.**, v. 33, p. 100-104, 1999.