



**FURG**

**Dissertação de Mestrado**

**NANOCARREADORES LIPOSSOMAIS CONTENDO A LECTINA  
BVL: INFLUÊNCIA DE POLÍMEROS GLICOSILADOS NA  
DINÂMICA MOLECULAR**

---

**Marinalva Cardoso dos Santos**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Vania Rodrigues de Lima.

Co-orientador: Dr. Alexandre Dal-Bó.

**PPGQTA**

**Rio Grande, RS - Brasil**

**2017**

**NANOCARREADORES LIPOSSOMAIS CONTENDO A LECTINA  
BVL: INFLUÊNCIA DE POLÍMEROS GLICOSILADOS NA  
DINÂMICA MOLECULAR**

**por**

**MARINALVA CARDOSO DOS SANTOS**

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.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2017

Universidade Federal do Rio Grande  
Escola de Química e Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**NANOCARREADORES LIPOSSOMAIS CONTENDO A  
LECTINA BVL: INFLUÊNCIA DE POLÍMEROS  
GLICOSILADOS NA DINÂMICA MOLECULAR**

Elaborada por

**MARINALVA CARDOSO DOS SANTOS**

Como requisito parcial para a obtenção do título de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Alex Fabiani Claro Flores (FURG - RS)

---

Prof. Dr. Alexandre Gonsalves Dal-Bó (UNESC - SC)

---

Prof. Dr. Darlene Correia Flores (FURG - RS)

---

Prof. Dr. Felipe Kessler (FURG - RS)

Rio Grande, 21 de agosto de 2017.



## **DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE E AUTENTICIDADE**

Eu, Marinalva Cardoso dos Santos, declaro que este trabalho é de minha autoria, tendo sido elaborado com base nos recursos aos quais faço referência ao longo do texto e experiências no decorrer do referido trabalho.

---

Assinatura do Orientando

Rio Grande, 21 de agosto de 2017.

*“...Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,  
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.  
Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”*

*Mario Quintana*

Agradeço primeiramente a Deus, por não me faltar a fé, e fazer deste o alicerce das minhas determinações.

Agradeço a minha pequena, grandiosa família. Ao meu amado esposo Mario Nelson, por compreender e incentivar as minhas decisões e fazer dos meus objetivos, também os seus. Ao meu filho “vida”, Pedro Henrique, por entender às vezes em que deixei de lhe dar atenção, pelos seminários assistidos e o orgulho que ele sente de me ter como sua mãe, que é o meu maior incentivo. A minha querida tia (mãe), que transformou os obstáculos em barreiras irrelevantes.

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

Agradeço a minha Professora orientadora, Doutora Vânia Rodrigues de Lima, pelos ensinamentos, paciência, incentivos e sobre tudo, amor e carinho que exerce a sua função.

Ao Professor Doutor Alexandre Dal- Bó, por sempre dispor seus conhecimentos em minha co-orientação. Por fornecer auxílio e material para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Luciano Pinto, pela sua colaboração e disponibilidade. Por ceder gentilmente, sempre que possível, material para elaboração deste trabalho.

Ao corpo docente, em especial a Darlene Flores, Alex Flores, Jaqueline Buffon e Daiane Dias.

Ao meu grupo de pesquisa GIIMM, pelo apoio e companheirismo. Principalmente a Doutoranda Msc. Carla Borges pela amizade, incentivo e por compartilhar seus conhecimentos que ajudaram para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos da inorgânica em especial ao Leonardo Schaidhauer pelo companheirismo.

Agradeço aos meus amigos, especialmente aos da FURG, pela trajetória.

A equipe da secretaria de Pós-Graduação, pelo auxílio e apoio ao longo curso.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPERGS e CAPES (CASADINHO).

*Dedico esta dissertação ao Pedro Henrique (filho), Mario Nelson (marido)  
e Mercêdes (tia), pelo apoio incondicional, paciência e incentivo.*

*Ao meu pai, Mário Alves Cardoso (“in memoriam”).*

*Amo vocês, luz dos meus olhos.*



## RESUMO

### NANOCARREADORES LIPOSSOMAIS CONTENDO A LECTINA BVL: INFLUÊNCIA DE POLÍMEROS GLICOSILADOS NA DINÂMICA MOLECULAR

**Autora: Marinalva Cardoso dos Santos**

**Orientadora: Vânia Rodrigues de Lima**

**Co-orientador: Alexandre Dal-Bó**

Rio Grande, 21 / 08 / 2017.

Neste estudo foram investigadas e caracterizadas as interações de um sistema lipossomal contendo lipídio, polímero glicosilado e proteína lectina, extraída de *Bauhinia variegata*, denominada BVL, que possui propriedades farmacológicas. O sistema lipossomal estudado foi constituído por fosfolipídios presentes na asolecitina de soja (Aso), onde foi inserido o novo polímero modificado, o docosanato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>, cuja porção glicosil era constituída por glicosídeos do tipo manose ou galactose, para avaliar diferenças na interação da proteína com estes monossacarídeos e efeito na estabilidade do sistema. Assim, as interações moleculares do sistema lipossomal foram caracterizadas pelas técnicas infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada horizontal (HATR-FTIR), calorimetria de varredura diferencial (DSC), espectroscopia no ultravioleta visível (UV), espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta ( $\zeta$ ), ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H (RMN de <sup>1</sup>H), e de <sup>31</sup>P (RMN de <sup>31</sup>P). Ambos os polímeros, docosanato de  $\beta$ -D-Manose-PEG<sub>900</sub> e docosanato de  $\beta$ -D-Galactose-PEG<sub>900</sub> ao serem incorporados em seus distintos sistemas lipossomais permitiram maior estabilidade. Ao inserir a BVL no lipossomo composto por tais polímeros, respectivamente, propiciou diferentes interações.

*Palavras chaves: lipossomos; polímeros; lectina; interações moleculares*

## ABSTRACT

### LIPOSOMAL NANOCARRIERS CONTAINING THE LECTIN BVL: THE INFLUENCE OF GLYOSILATED POLYMERS IN MOLECULAR DYNAMICS

**Author: Marinalva Cardoso dos Santos**

**Advisor : Prof. Dr<sup>a</sup>. Vânia Rodrigues de Lima**

**Co-Advisor : Prof. Dr. Alexandre Dál-Bó**

Rio Grande, 21 / 08 / 2017.

This study investigated and characterized the interactions of a liposomal system containing lipid, glycosylated polymer and a lectin protein, called BVL, which has pharmacological properties. The liposomal system was composed of phospholipids present in soybean asolecithin (Aso), where the new modified polymer,  $\beta$ -D-glycosyl-PEG<sub>900</sub> docosanate, whose glycosyl moiety was composed of glycosides of the mannose or galactose type, was inserted. Evaluate differences in the interaction of the protein with these sugars and effect on the stability of the system. The lectin incorporated into this system was extracted from *Bauhinia variegata*. Thus, the molecular interactions of the liposomal system containing lipid, polymer and lectin were characterized by techniques Fourier transform infrared spectroscopy with horizontal attenuated total reflectance (HATR - FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), visible ultraviolet spectroscopy (UV), dynamic light scattering (DLS), zeta potential ( $\zeta$ ), nuclear magnetic resonance of <sup>1</sup>H (<sup>1</sup>H NMR), and <sup>31</sup>P (<sup>31</sup>P NMR). Both polymers, docosanate  $\beta$ -D-Manose-PEG<sub>900</sub> and docosanate  $\beta$ -D-Galactose-PEG<sub>900</sub> when incorporated in liposomal systems allowed greater stability when inserting the BVL in the liposome composed of such polymers, respectively, provided different interactions.

*Keywords: liposomes; polymer; lectin; molecular interactions*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1. Objetivo geral .....	27
2.2. Objetivos específicos .....	27
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>28</b>
3.1. Lipossomos .....	28
3.1.1. Definição e composição da membrana lipossomal.....	28
3.1.2. Organização dos lipossomos .....	32
3.1.3. Classificação dos lipossomos .....	33
3.1.4. Interações moleculares e dinâmica lipossomal.....	36
3.1.4.1. Interações com água.....	37
3.1.4.2. Movimentos vibracionais lipídicos: estudos na dinâmica molecular da membrana fosfolipídica, por infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada horizontal (HATR-FTIR).....	37
3.1.4.3. Movimentos rotacionais lipídicos: estudos na dinâmica molecular da membrana fosfolipídica, por ressonância magnética nuclear (RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>31</sup> P) .....	45
3.1.4.4. Movimentos vibracionais e rotacionais lipídicos.....	52
3.1.4.5. Parâmetros translacionais: temperatura de transição de fase (T <sub>m</sub> ) dos lipossomos e seus efeitos na membrana fosfolipídica – Estudos por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) .....	53
3.1.4.6. Distribuição de cargas superficiais do lipossomo: Estudo da distribuição de cargas na membrana por análises de Potencial Zeta (ζ) .....	56
3.1.4.7. Análise de tamanho do lipossomo por espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	58
3.1.4.8. Influência do tamanho lipossomal na eficiência terapêutica .....	59
3.1.4.9. Processos de entrega no organismo da substância ativa, mediados por vesículas lipossomais .....	60
3.1.4.10. Aplicação de lipossomos como modelo de membranas celulares. ....	62
3.2. Lectinas .....	64
3.2.1. Lectinas e suas aplicações .....	64
3.2.2. Origem da BVL: gênero e espécie.....	65
3.2.4. Ponto isoelétrico e aminoácidos da BVL: determinação da carga total na macromolécula .....	67
3.2.5. Similaridade entre as estruturas primárias de lectinas.....	69
3.2.6. Lectinas e suas interações com carboidratos .....	71
3.2.7. Lectinas e o reconhecimento de glicídios (carboidratos) em polímeros e superfícies celulares. ....	72

3.3.	Polímeros .....	73
3.3.1.	Conceitos e Histórico .....	73
3.3.2.	Polímeros docosanato de $\beta$ -D-glicosil-PEG <sub>900</sub> inseridos em lipossomos. ....	73
3.3.3.	Formação do heterociclo 1,2,3-triazol, via reação de ciclo adição 1,3 dipolar ao gerar a molécula de docosanato de $\beta$ -D-glicosil-PEG <sub>900</sub> .....	78
3.3.4.	Variação do sacarídeo, via Reação “ <i>Click Chemistry</i> ”, na molécula de docosanato de $\beta$ -D-glicosil-PEG <sub>900</sub> .....	80
<b>4.</b>	<b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>81</b>
4.1.	Reagentes e solventes utilizados .....	81
4.2.	Método de preparação de lipossomos por evaporação por fase reversa. ....	81
4.3.	Extração e purificação da BVL.....	82
4.4.	Síntese dos polímeros .....	83
4.4.1.	Metódo experimental de obtenção do monoazida de polietileno glicol (PEG <sub>900</sub> ) .....	83
4.4.2.	Metódo experimental de obtenção do docosanato de monoazida de polietileno glicol (C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> N <sub>3</sub> ).....	84
4.4.3.	Funcionalização do glicídio para inserção no polímero .....	84
4.4.4.	Inclusão do glicídio no polímero .....	85
4.5.	Medidas de FTIR- HATR .....	85
4.6.	Medidas de DSC .....	85
4.7.	Medidas de turbidez.....	86
4.8.	Medidas de DLS e potencial zeta ( $\zeta$ ) .....	86
4.9.	Medidas de RMN <sup>1</sup> H e <sup>31</sup> P .....	86
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
5.1.	Medidas de HATR-FTIR .....	87
5.2.	Medidas de Potencial Zeta - Estudo da distribuição de cargas na membrana ( $\zeta$ ).....	103
5.3.	Medidas de RMN <sup>1</sup> H.....	106
5.4.	Medidas de RMN <sup>31</sup> P .....	109
5.5.	Caracterização dos parâmetros termodinâmicos dos sistemas, analisados por calorimetria de varredura diferencial (DSC) .....	114
5.6.	Medidas de Turbidez: Espectrofotometria de Ultravioleta Visível (UV-Vis).....	119
5.7.	Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) .....	122
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>126</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática de lipossomos- Adaptado de <https://pbs.twimg.com/media/DCxn99xU0AAgnKi.jpg>.....27
- Figura 2:** Exemplificação de fórmula estrutural de lipídio, utilizados na preparação de lipossomos.....28
- Figura 3:** Fórmula estrutural da fosfatidilcolina (a), fosfatidiletanolamina (b) e fosfatidilinositol fosfato (c) .....30
- Figura 4:** Fórmula estrutural de fosfatidilcolina. Ilustração de porção polar, interface e apolar do lipídio.....30
- Figura 5:** Fases dos lipossomos- (a) fase lamelar ou bicamada, (b) micela esférica, (c) micela esférica inversa - Adaptado de SÁNCHEZ *et al.*, 2013.....31
- Figura 6:** Classificação dos lipossomos quanto às características estruturais de seus constituintes. Adaptado de BATISTA *et al.*, 2007 .....34
- Figura 7:** Representação da curva da energia potencial de uma molécula e de uma parábola. Adaptado de ATKINS *et al.*, 2011.....37
- Figura 8:** Esquema representativo para a excitação vibracional de uma ligação. Molécula formada por dois átomos distintos de massa desiguais em uma mola que oscila. Adaptado de VOLLHARDT & SCHORE, 2013.....41
- Figura 9:** Ilustração do cristal de ZnSe. Adaptado de <http://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/> .....42
- Figura 10:** Modelo para representar a dinâmica de lipídio ao longo do eixo (rotação do eixo), descrito por  $D_{||}$ : rotação restrita ao longo do eixo (wobble) e  $D_{\perp}$  a reorientação de interna.  $\beta$ , é o ângulo médio entre o vetor de interesse (em verde escuro) e o eixo longo ( $D_{||}$ ) do lipídio. A bicamada normal é mostrada em marrom. A extensão média de ondulação lipídica e reorientação interna do vetor é representada pelo disco maior, em verde e azul, respectivamente. Uma trajetória hipotética é projetada no disco maior para ilustrar o bamboleio. Adaptado de KLAUDA *et al.* (2008) .....44
- Figura 11:** Gráfico de Medidas de  $T_1$  em função do tempo (s), para sistemas lipossomais de alta mobilidade e baixa mobilidade.....48
- Figura 12:** Representação esquemática de espectro de RMN  $^{31}\text{P}$ , quanto a anisotropia do deslocamento químico dos núcleos de fósforo (a) núcleo de fósforo e (b) núcleos de fósforo com interações com moléculas de água. Adaptado de GHOSH, 1988 .....49
- Figura 13:** Modelos espectrais de movimentos anisotrópicos (a) típico de bicamada lipídica ou de fase lamelar e movimentos isotrópicos (b), típico de micelas ou estado fluido de líquido cristalino. Adaptado de PFEIFFER *et al.*, 2012.....50

<b>Figura 14:</b> Movimento anisotrópico do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios (118,5 MHz) de lipossomos de 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina a 15 °C: (a) rígido, sem adição de H <sub>2</sub> O, (b) e (c) perda da rigidez, adição de 6% e 7% de H <sub>2</sub> O, respectivamente. Adaptado de SEELIG, 1978 .....	<b>51</b>
<b>Figura 15:</b> Representação esquemática das variações de transição de fase.....	<b>53</b>
<b>Figura 16:</b> Representação esquemática do método experimental para análises de DSC.....	<b>54</b>
<b>Figura 17:</b> Representação das condições em uma partícula negativa com uma camada de íons positivos adsorvidos na camada adjacente, denominada camada de Stern. No plano de cisalhamento, pode ser medido potencial zeta. Adaptado de MALVERN, 2012 .....	<b>56</b>
<b>Figura 18:</b> Representação esquemática de lipossomos com substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas inseridas em lipossomos.....	<b>59</b>
<b>Figura 19:</b> Representação de membrana celular e as interações com as vesículas lipossomais.....	<b>60</b>
<b>Figura 20:</b> (a) Representação de membrana lipossomal; (b) modelo mosaico fluido Semelhança estrutural entre ambas.....	<b>62</b>
<b>Figura 21:</b> Representação esquemática da lectina de <i>Bauhinia variegata</i> (BVL).....	<b>63</b>
<b>Figura 22:</b> Pata de vaca.....	<b>65</b>
<b>Figura 23:</b> Fórmula estrutural (a) ácido palmítico, (b) ácido linoleico, (c) ácido esteárico e (d) ácido eicosanóico.....	<b>66</b>
<b>Figura 24:</b> Fórmula estrutural de aminoácidos presentes na BVL, lisina (a), prolina (b), arginina (c) e histidina (d).....	<b>67</b>
<b>Figura 25:</b> Fórmula estrutural de aminoácidos aniônicos presentes na BVL, triptofano (a), fenilalanina (b), isoleucina (c) e vanila (d).....	<b>67</b>
<b>Figura 26:</b> Descreve a semelhanças entre as sequências de aminoácidos; BVL I e BVL II. Adaptado de PINTO <i>et al.</i> , 2008.....	<b>69</b>
<b>Figura 27:</b> Sequência de aminoácido da lectina BVL I de <i>Bauhinia variegata</i> .....	<b>70</b>
<b>Figura 28:</b> Fórmula estrutural do docosanato de β-D-glicosil-PEG <sub>900</sub> , ou seja, docosanato de β-D-manose-PEG <sub>900</sub> (C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose) .....	<b>73</b>
<b>Figura 29:</b> Fórmula estrutural do docosanato de β-D-glicosil-PEG <sub>900</sub> , ou seja, docosanato de β-D-Galactose-PEG <sub>900</sub> (C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose) .....	<b>73</b>

<b>Figura 30:</b> Fórmula estrutural do docosinato de $\beta$ -D-glicosil-PEG <sub>900</sub> , ou seja, docosinato de N-acetilglicosaminaPEG <sub>900</sub> (C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc).....	<b>76</b>
<b>Figura 31:</b> Espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose .....	<b>87</b>
<b>Figura 32:</b> Ampliação da região de absorção de número de onda do vas N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose.....	<b>88</b>
<b>Figura 33:</b> Ampliação da região de absorção de número de onda em (a) do $\nu$ C-O e (b) do $\nu$ C=O do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose.....	<b>89</b>
<b>Figura 34:</b> Espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose.....	<b>90</b>
<b>Figura 35:</b> Ampliação da região de absorção de número de onda do vas N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose .....	<b>91</b>
<b>Figura 36:</b> Ampliação da região de absorção de número de onda em (a) do $\nu$ C-O e (b) do $\nu$ C=O do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose.....	<b>93</b>
<b>Figura 37:</b> Fórmula estrutural do (a) C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e (b) C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose.....	<b>93</b>
<b>Figura 38:</b> Fórmula estrutural do docosinato de N-acetilglicosaminaPEG <sub>900</sub> (C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GlcNAc).....	<b>94</b>
<b>Figura 39:</b> Resumo das interações moleculares do C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose.....	<b>95</b>
<b>Figura 40:</b> Espectro de HATR-FTIR de lipossomos Aso, na presença do polímero C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e incorporado a BVL (AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL).....	<b>95</b>
<b>Figura 41:</b> Ampliação da região de absorção de número de onda do vas PO <sup>2-</sup> do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL.....	<b>97</b>
<b>Figura 42:</b> Ampliação da região de absorção de número de onda em (a) do $\nu$ C-O e (b) do $\nu$ C=O do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL.....	<b>97</b>
<b>Figura 43:</b> Espectro de HATR-FTIR de lipossomos Aso, na presença do polímero C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose e incorporado a BVL (AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBVL).....	<b>98</b>



<b>Figura 44:</b> Ampliação da região de absorção de número de onda do vas $PO^{2-}$ do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBVL.....	<b>99</b>
<b>Figura 45:</b> Ampliação da região de absorção de número de onda em (a) do $\nu$ C-O e (b) do $\nu$ C=O do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose e lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBVL.....	<b>100</b>
<b>Figura 46:</b> Resumo das interações moleculares do lipossomo de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBV.....	<b>100</b>
<b>Figura 47:</b> Espectro de HATR-FTIR lipossomo de Aso, polímero C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose, polímero C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose e BVL.....	<b>101</b>
<b>Figura 48:</b> Ampliação da região de absorção dos metilenos: espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso, polímero C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose, polímero C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose e BVL. ....	<b>101</b>
<b>Figura 49:</b> Representação da orientação do grupo colina ( $N^+(CH_3)_3$ ), destaque em preto, acima do plano da bicamada lipídica e em destaque amarelo, abaixo do plano da bicamada lipídica. Adaptado de CHENG et al., 2015.....	<b>103</b>
<b>Figura 50:</b> Fórmula estrutural (a) do C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose e (b) C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose.....	<b>104</b>
<b>Figura 51:</b> Recuperação dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H (de FID) da colina em lipossomo de: Aso, AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose .....	<b>106</b>
<b>Figura 52:</b> Recuperação dos sinais de RMN de <sup>1</sup> H (de FID) da colina, em lipossomo de: (a) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e (b) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose BVL e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose.....	<b>107</b>
<b>Figura 53:</b> Espectro de RMN <sup>31</sup> P- anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de (a) asolecitina de soja (Aso).....	<b>109</b>
<b>Figura 54:</b> Espectros de RMN <sup>31</sup> P- anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de: (b) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e (c) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose.....	<b>110</b>
<b>Figura 55:</b> Espectros de RMN <sup>31</sup> P- anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de: (d) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL e (e) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBVL.....	<b>110</b>
<b>Figura 56:</b> Curva de DSC referente aos lipossomos de: (a) Aso, (b) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e (c) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose.....	<b>114</b>
<b>Figura 57:</b> Curva de DSC referente aos lipossomos de: (d) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL e (e) AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBVL.....	<b>115</b>

**Figura 58:** Gráfico de absorvância de lipossomos de Aso na presença de: C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GactoseBVL.....118

**Figura 51:** Fórmula estrutural de triptofano (a) componente da BVL e galactose (b) componente do polímero, constituinte do lipossomo. Adaptado de WEIS et al., 1996.....121

## LISTA DE ESQUEMAS

**Esquema 1:** Representação da ciclização dos glicídios (a)  $\beta$ -D-Manose e (b)  $\beta$ -D-Galactose.

.....74

**Esquema 2:** Representação esquemática da Reação de *Huisgen* (reação de cicloadição 1,3-dipolar): formação de heterociclo triazólico 1,4 e 1,5-dissubstituídos, respectivamente.....78

**Esquema 3:** Representação esquemática da Reação “*Click Chemistry*”. Formação de heterociclo triazólico 1,4-dissubstituído.....78

**Esquema 4:** Representação esquemática da Reação “*Click Chemistry*”, para a introdução da porção sacarídica na cadeia polimérica.....79

**Esquema 5:** Representação esquemática do método de preparação de lipossomos por Evaporação por Fase Reversa. (a) Solubilização do lípido, (b) formação do filme lipídico e (c) suspensão lipossomal.....81

**Esquema 6:** Representação esquemática de método de extração e purificação da BVL. (a) trituração das sementes de BVL; (b) 1<sup>o</sup>- adição de hexano e evaporação deste por rotaevaporador, (c) 2<sup>o</sup>- adição de tampão Tris-HCl (pH 7,6) e NaCl 0,15 M e Câmera fria; (d) Centrifugação, 30 min; (e) filtração; (f) Coluna de agarose-lactose, BVL eluidas com tampão- Proteínas dializadas e armazenadas (30°C).....82

**Esquema 7:** Representação esquemática de (a) interação com molécula de água ou (b) com o grupo fosfato do lípido próximo.....89

**Esquema 8:** Representação esquemática de interação com molécula de água ou com o grupo fosfato do lípido próximo.....92

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Exemplo de fosfolipídios utilizados na preparação de lipossomos.....	<b>29</b>
<b>Quadro 2:</b> Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup> H e PZ .....	<b>108</b>
<b>Quadro 3:</b> Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBVL por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup> H e PZ .....	<b>108</b>
<b>Quadro 4:</b> Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>31</sup> P e PZ .....	<b>112</b>
<b>Quadro 5:</b> Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBVL por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>31</sup> P e PZ .....	<b>113</b>
<b>Quadro 6:</b> Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>31</sup> P, DSC e PZ .....	<b>117</b>
<b>Quadro 7:</b> Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBVL por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>31</sup> P, DSC e PZ .....	<b>118</b>
<b>Quadro 8:</b> Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>31</sup> P, DSC e PZ .....	<b>124</b>
<b>Quadro 9:</b> Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseBVL e AsoC <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseBVL por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup> H, RMN <sup>31</sup> P, DSC e PZ .....	<b>124</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Variação da frequência de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose), em cm<sup>-1</sup>.....**87**
- Tabela 2:** Variação de largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose), em cm<sup>-1</sup>.....**87**
- Tabela 3:** Variação de frequência de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose), em cm<sup>-1</sup>.....**90**
- Tabela 4:** Variação de largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose), em cm<sup>-1</sup>.....**91**
- Tabela 5:** Variação de frequência de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose) e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e a proteína BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL), em cm<sup>-1</sup>.....**96**
- Tabela 6:** Variação de largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose) e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e a proteína BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL), em cm<sup>-1</sup>.....**96**
- Tabela 7:** Variação de frequência de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose) e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e a proteína BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL), em cm<sup>-1</sup>.....**98**
- Tabela 8:** Variação de largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose) e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e a proteína BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL), em cm<sup>-1</sup>.....**99**
- Tabela 9:** Influência dos polímeros e da BVL, quanto à distribuição de cargas na superfície de lipossomos de Aso.....**102**
- Tabela 10:** Valores de T<sub>1</sub> dos prótons da colina presentes nos lipossomos de: Aso, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL .....**106**
- Tabela 11:** Valores das larguras dos picos referente à anisotropia do deslocamento químico presentes nos lipossomos de: Aso, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL, em ppm .....**111**

**Tabela 12:** Tabela de variação de temperatura de transição de fase ( $T_m$ , °C) dos sistemas Aso, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL .....115

**Tabela 13:** Valores de turbidez dos lipossomos de Aso na presença: do C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GactoseBVL .....120

**Tabela 14:** Influência dos polímeros e da proteína no diâmetro das vesículas lipossomais de Aso, em nm .....123

## Lista de abreviações

A – absorvância

aa – aminoácidos

Aso – asolecitina de soja

$B_0$  – campo magnético

BVL – lectina extraída de *Bauhinia variegata*

c – velocidade da luz

$C_{22}PEG_{900}$ Galactose – polímero docosanato de  $\beta$ -D-Galactose- $PEG_{900}$

$C_{22}PEG_{900}$ Manose – polímero docosanato de  $\beta$ -D-Manose- $PEG_{900}$

$C_{22}PEG_{900}$ GlcNAc – polímero docosanato de N-acetilglucosamina- $PEG_{900}$

$\lambda$  – comprimento de onda

Da – Dalton

DMPC – dimiristoilfosfatidilcolina

DNA - ácido desoxirribonucléico

DOPC – dioleoilfosfatidilcolina

DPPC – dipalmitoilfosfatidilcolina

CSA – anisotropia de deslocamento químico

DSC – calorimetria de varredura diferencial

DSPC – diestearoilfosfatidilcolina

$v$  – estiramento axial

$v_{as}$  – estiramento axial assimétrico

$v_s$  – estiramento axial simétrico

E – radiação eletromagnética

FT – transformada de Fourier

$\epsilon$  – absortividade molar

G – energia livre de Gibbs

$\gamma$  – razão giromagnética

GUVs – Vesicular Unilamelares Gigantes

h – constante de Planck

HATR-FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada Horizontal

K – constante de força de ligação

L – caminho óptico

LUVs – Vesículas Unilamelares Grandes  
M – momento magnético  
MLVs – Vesículas Multilamelares Grandes  
 $\nu$  – número de onda  
 $\bar{\nu}$  – frequência  
 $\nu_0$  – frequência de precessão  
OLVs – Vesículas Oligolamelares  
PDI – índice de poli dispersão  
PEG – polietileno glicol  
pH – potencial hidrogeniônico  
PI – ponto isoelétrico  
 $R_e$  – comprimento da ligação no equilíbrio  
rf – radiofrequência  
RMN  $^1\text{H}$  – ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$   
RMN  $^{31}\text{P}$  – ressonância magnética nuclear de  $^{31}\text{P}$   
S – entropia  
SUVs – Vesículas Unilamelares Pequenas  
T – temperatura  
T – tesla  
 $\tau$  – tempo de correlação  
 $T_1$  - tempo de relaxação longitudinal  
 $T_2$  - tempo de relaxação transversal  
 $T_m$  – temperatura principal de fase  
UV-Vis – espectroscopia no ultravioleta visível  
 $\Delta E$  – variação de energia  
 $\Delta H$  – variação de entalpia  
 $\Delta S$  – variação de entropia  
 $\Delta T$  – variação de temperatura  
W – Watts



## 1. INTRODUÇÃO

O sistema de liberação prolongada de substâncias ativas é considerado uma forma eficiente de baixa toxicidade, pela qual o fármaco é disponibilizado no organismo (EGBARIA *et al.*, 1991). Entretanto, o desenvolvimento e a investigação de novas formas de transporte de substâncias ativas no organismo, envolve a consideração de diversas barreiras anatômicas a serem ultrapassadas. Dentre estas, cita-se a barreira hematoencefálica, determinante para entrada de fármacos no cérebro, em função de seus tamanhos, e lipofilicidades (BARENHOLZ, 2012). Neste contexto, torna-se muito importante a biocompatibilidade do sistema de liberação prolongada de fármaco (SESSA *et al.*, 1968; MERTINS *et al.*, 2009). Assim sendo, nas últimas décadas, destacam-se os estudos baseados em nanocarreadores lipídicos, tais como os lipossomos (LASIC, 1993; SANTOS *et al.*, 2002).

Os lipossomos são carreadores lipídicos que transportam substâncias ativas a células, tecidos ou órgãos-alvo. Na ausência de uma substância ativa encapsulada, os lipossomos umidificam a pele, melhorando a sua elasticidade e a função de barreira de tecidos (ULRICH *et al.*, 2002).

Este sistema carreador foi estudado inicialmente por Alec Bangham e colaboradores (BANGHAN *et al.*, 1965; SANTOS *et al.*, 2002). Foi estabelecido na década de 60 e desde os anos 80, vem sendo comercializado como fonte para a entrega de fármacos em tecidos específicos (LIS *et al.*, 1998; EGBARIA *et al.*, 1991; KLÜPPEL *et al.*, 2007). Os lipossomos podem minimizar os efeitos colaterais de substâncias ativas, pois evitam que estas se desloquem a células e tecidos saudáveis, e que podem prolongar o tempo de ação associado a uma dose das mesmas no organismo (BATISTA *et al.*, 2007; ULRICH *et al.*, 2002). Atualmente entre os sistemas transportadores disponíveis, os lipossomos, ocupam uma posição de destaque. De acordo com Ghosh & Bachhawat (1995), os lipossomos atuam como imunomoduladores, com ação imunoadjuvante, ativando macrófagos, ou atuando sobre outras células do sistema imunológico, tais como os linfócitos. Podem ser administrados por via oral, intravenosa, ocular, pulmonar ou dérmica (KLÜPPEL *et al.*, 2007).

Os lipossomos são carreadores lipídicos altamente versáteis, podendo sua composição ser manipulada em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos. Visando-se o avanço das aplicações terapêuticas associadas aos lipossomos, a inserção de proteínas nos mesmos, tais como lectinas, são estudadas como substâncias ativas e

vetorizadores do sistema (FU *et al.*, 2011). Lectinas possuem propriedades farmacológicas tais como anti-inflamatórias, antivirais e antitumorais. Estas proteínas podem melhorar o funcionamento do sistema imunológico, quando associados a sistemas de carreadores como os lipossomos, e assim agir diretamente contra vírus, inflamações, ou associados no tratamento ou prevenção de câncer (ROLLENHAGEM *et al.*, 2001; SHARON *et al.*, 1993; TIMOSHENKO *et al.*, 2001). Adicionalmente, as lectinas possuem a capacidade de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas, por se ligarem específica e reversivelmente a determinados carboidratos (SHARON *et al.*, 1993).

Estas propriedades favorecem uma função vetorizante da proteína quando inserida em uma matriz lipossomal, ou seja, a lectina pode contribuir no sistema de entrega de outra substância ativa em um tecido específico (FU *et al.*, 2011). Assim, matrizes lipossomais constituídas por lectinas extraídas de plantas como a *Bauhinia variegata*, a BVL, são investigadas intensamente em função da sua diversidade e a sua vasta aplicação na área medicinal.

Um desafio relacionado às interações moleculares entre lectinas e lipídios, presentes nos lipossomos, é a estabilidade do sistema e a estabilidade deste no organismo (LIM *et al.*, 2008). Existe a captura precoce dos lipossomos pelo sistema fagocitário (atuação dos macrófagos que são células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, ricos em lipossomos que fagocitam, ou seja, realizam a digestão de elementos estranhos ao corpo) bem como a força de atração de Van der Waals ou eletrostática da proteína que pode variar em função da composição lipossomal, fazendo com que essa não permaneça em interação com o sistema durante o transporte no organismo (BATISTA *et al.*, 2007; ULRICH *et al.*, 2002).

De forma a aumentar os sítios de reconhecimentos nos lipossomos pela lectina e aumentar sua estabilidade, e consequentemente sua permanência e circulação no organismo, pode-se inserir como componente do sistema, polímeros glicosilados (LIM *et al.*, 2008). Dal-Bó e colaboradores (2011, 2012) propuseram um polímero composto por glicídio e um modificador covalente do tipo polietileno glicol (PEG), o docosanato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>. O uso deste polímero, aumenta o tempo de meia-vida do lipossomo no organismo, diminui a sua toxicidade e protege as vesículas dos atritos ao passar pelos poros das membranas (AWSTHI *et al.*, 2004; BARENHOLZ, 2012; FRÉZARD *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2008). Variando-se o tipo de açúcar no polímero, varia-se também as forças de interação entre a BVL e o polímero, influenciando assim suas atrações/repulsões

com o sistema lipossomal. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, investigaram as interações de um sistema lipossomal contendo asolecitina de soja (Aso), BVL e o polímero docosanato de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminil-PEG<sub>900</sub>. A BVL interagiu com as porções colina e carbonila, tendo desordenado a região hidrofóbica lipídica e tal comportamento foi relacionado com a estabilidade e vetorização do sistema (SANTOS *et al*, 2016). Com base no estudo supracitado, este trabalho foi desenvolvido para variar o tipo de monossacarídeo no polímero, e assim as forças de interação entre a BVL e os respectivos polímeros, para compreender e aprimorar a estabilidade e eficiência do sistema lipossomal.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar e caracterizar as interações moleculares de sistemas lipossomais baseados em asolecitina de soja (Aso), de novos polímeros com distintas porções glicosiladas, docosanato de  $\beta$ -D-Manose-PEG<sub>900</sub> e docosanato- $\beta$ -D-Galactose-PEG<sub>900</sub>, na ausência e na presença de BVL extraída de *Bauhinia variegata*, BVL.

### **2.2. Objetivos específicos**

Produzir lipossomos de Aso contendo:

- Polímero docosanato de  $\beta$ -D-Manose-PEG<sub>900</sub>.
- Polímero docosanato de  $\beta$ -D-Galactose-PEG<sub>900</sub>.
- Polímero docosanato de  $\beta$ -D-Manose-PEG<sub>900</sub> e BVL.
- Polímero docosanato de  $\beta$ -D-Galactose-PEG<sub>900</sub> e BVL.

Caracterizar a localização preferencial tanto dos polímeros quanto da BVL no sistema lipossomal, bem como seus efeitos nos graus de hidratação e ordem da membrana por análises de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada horizontal (FTIR- HATR), por estudo de deslocamento de frequência variação das larguras das bandas de estiramento axial de picos lipídicos à 75% da sua altura.

Caracterizar e monitorar o efeito dos polímeros e da BVL no que tange:

- A turbidez do sistema lipossomal, através de análises de espectroscopia de ultravioleta visível (UV-Vis);
- O estado de fase de lipossomos, através de análises de temperatura de transição de fase (T<sub>m</sub>), obtidas por calorimetria de varredura diferencial (DSC);

- Tamanho dos lipossomos por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e distribuição de cargas na membrana, através de medidas de potencial zeta ( $\zeta$ );
- A velocidade rotacional de regiões da membrana, através das medidas de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) de núcleos específicos dos lipídios, através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ), bem como através de medidas da anisotropia do deslocamento químico do grupo fosfato lipídico, obtido por RMN de fósforo (RMN  $^{31}\text{P}$ ).

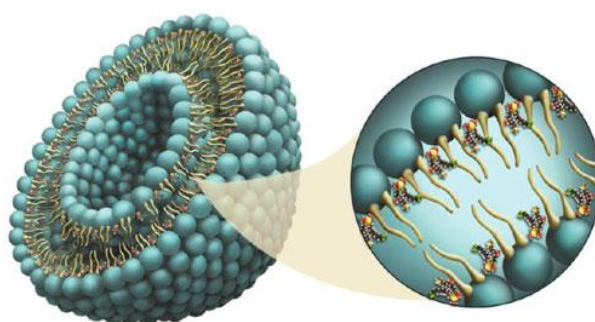
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Lipossomos

##### 3.1.1. Definição e composição da membrana lipossomal

Por definição, lipossomos são vesículas esféricas, formadas por uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios de natureza anfótera, sendo constituídos por uma fase externa contendo um sistema de membranas fosfolipídicas e uma fase interna constituída por um meio aquoso (**Figura 1**), onde a região polar dos lipídios está representada por bola e a região hidrofóbica, por caudas) (LEHNINGER *et al.*, 2000).

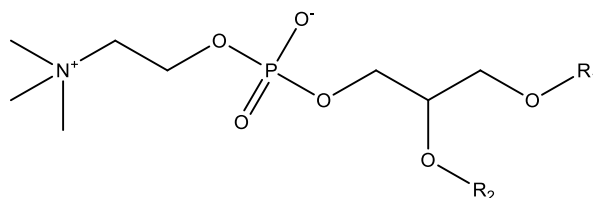
Os lipossomos podem ser aplicados como carreadores de fármacos ou substâncias ativas hidrofílicas e/ou hidrofóbicas, a serem direcionadas a tecidos específicos. Os lipossomos são estruturados por um ou uma mistura de lipídios (s) idênticos ou similares aos presentes na membrana celular, o que favorece sua biocompatibilidade (CAMPBELL *et al.*, 2009; LEHNINGER *et al.*, 2000).



**Figura 1:** Representação esquemática de lipossomos- Adaptado de <https://pbs.twimg.com/media/DCxn99xU0AAgnKi.jpg>

Os lipídios podem ser classificados entre dois grupos principais: (i) os que possuem anéis aromáticos fundidos, denominado de esteróides e (ii) os que possuem compostos de cadeia aberta, com região polar e apolar, sendo denominados triacilgliceróis, esfingolipídios, fosfolipídios e os glicolipídios (CAMPBELL *et al.*, 2009). Dentre estes últimos, os fosfolipídios, principalmente as fosfatidilcolinas, são responsáveis pela manutenção da estrutura em bicamada lipídica da membrana celular (LEHNINGER *et al.*, 2000).

Os fosfolipídios são formados por uma molécula de ácido fosfórico, que pode formar ligações ésteres com glicerol ou álcool (**Figura 2**). Em função da sua natureza, alguns dos lipídios que podem fazer parte na formação das bicamadas vesiculares lipossomais estão citadas no quadro abaixo (**Quadro 1**). Onde R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> são alguns exemplos de cadeias de ácidos graxos. A variação em números de átomos de carbono presentes na cadeia de ácidos graxos, determinam entre outros fatores a formação (diâmetro e bicamadas) das vesículas lipossomais (HOPE *et al.*, 1986).



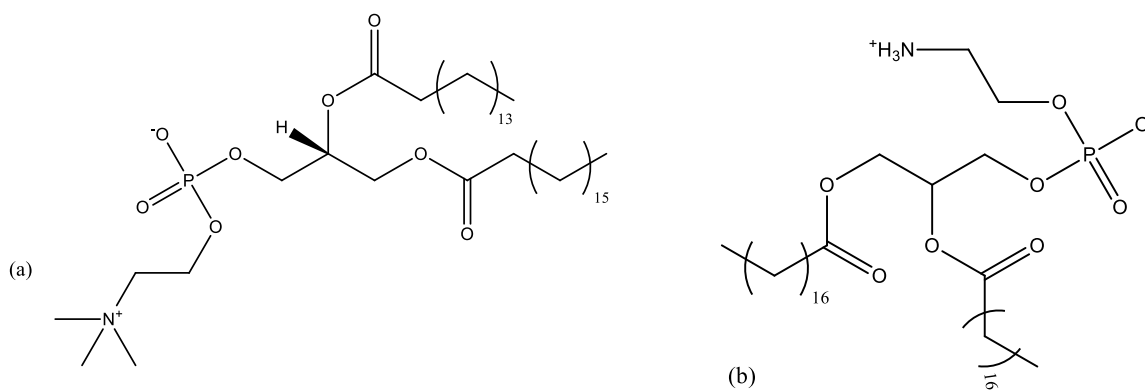
**Figura 2:** Exemplificação de fórmula estrutural de lipídio, utilizados na preparação de lipossomos

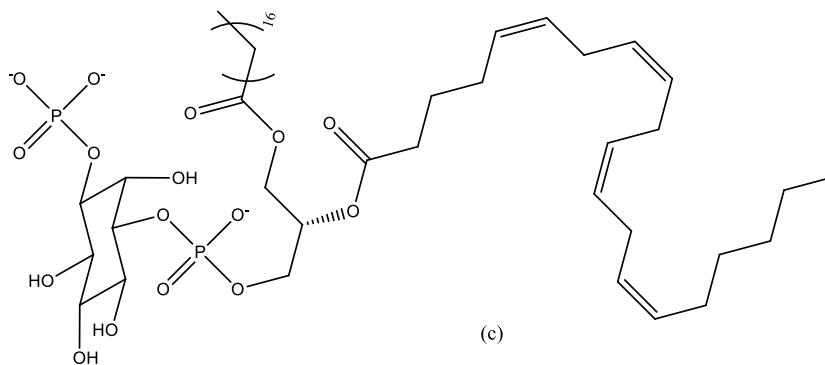
Quadro 1: Exemplo de fosfolipídios utilizados na preparação de lipossomos

$R_1, R_2$ Cadeia de ácido graxo	Nomenclatura e abreviatura
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-(\text{O})-$	Dioléilfosfatidilcolina (DOPC)
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}(\text{O})-$	Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(\text{O})-$	Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{C}(\text{O})-$	Diestearoilfosfatidilcolina (DSPC)

Os fosfolipídios são compostos anfífilos, ou seja, possuem em sua estrutura uma região polar hidrofílica (iônica ou não), e uma região apolar, hidrofóbica que em geral são compostas por uma ou duas cadeias de hidrocarbonetos (que podem conter ou não insaturações). Estas características, permeiam fosfolipídios de fontes naturais e fosfolipídios sintéticos (CAMPBELL *et al.*, 2009).

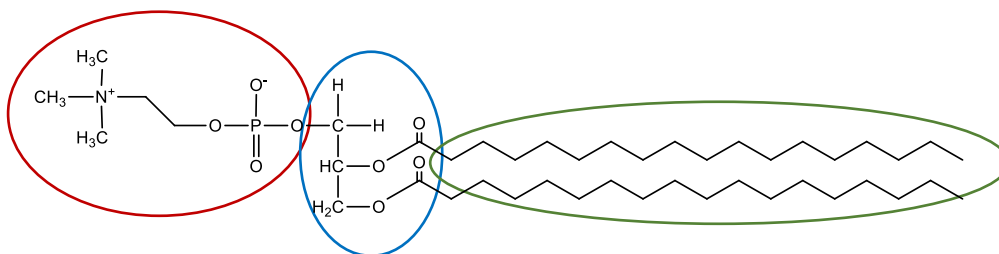
As fosfatidilcolinas são os fosfolipídios mais utilizados para a obtenção dos lipossomos (**Figura 3** (a)). Dentre suas fontes naturais de extração (animal ou vegetal), cita-se principalmente da gema de ovo, grãos de soja e gérmen de trigo. Estão também presentes em cerca de 25% em associações fosfolipídicas, como a Asolecitina de soja (Aso), juntamente com outros fosfolipídios como a fosfatidiletanolamina (**Figura 3** (b)), fosfatidilinositol fosfato (**Figura 3** (c)).





**Figura 3:** Fórmula estrutural da fosfatidilcolina (a), fosfatidiletanolamina (b) e fosfatidilinositol fosfato (c).

A fosfatidilcolina possui sua região polar composta por um grupo colina ( $N^+(CH_3)_3$ ), com carga parcialmente positiva, e por um grupo fosfato ( $PO_2^-$ ) com carga parcialmente negativa (**Figura 4**, em destaque vermelho). Uma região de interface tendo um grupo éster ( $R^2-COOR^1$ ) (**Figura 4**, em destaque azul) e duas cadeias longas de hidrocarbonetos (CH), na denominada região apolar, que podem ser insaturadas ou não (**Figura 4**, em destaque verde).



**Figura 4:** Fórmula estrutural de fosfatidilcolina. Ilustração de porção polar, interface e apolar do lipídio.

Por apresentar um cabeça polar com uma carga positiva e outra negativa, as fosfatidilcolinas são moléculas classificadas como anfóteras ou “zwitteriônicas” (MEYRS, 1999).

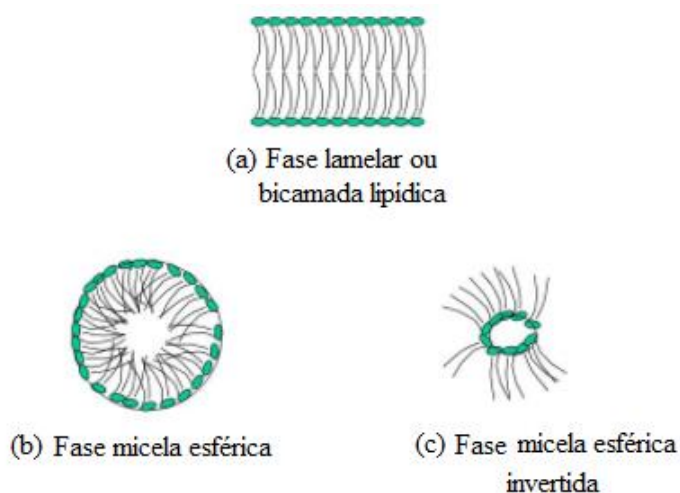
A presença de fosfatidilcolina em uma mistura de vários lipídios como a Aso, proporciona ao lipossomo o aumento da capacidade de retenção de substâncias. Suas diferentes cadeias de hidrocarboneto, variantes em tamanho, possibilitam irregularidades

para acomodar os fármacos ou substâncias ativas que serão acrescentados a este sistema (ULRICH *et al.*, 2002).

### 3.1.2. Organização dos lipossomos

Há diversas formas dos lipídios organizarem-se nos lipossomos, ou seja, diferentes modos de empacotamento lipídico que ocorrem de acordo com a estrutura da molécula. A formação dos lipossomos dá-se a partir de fosfolipídios de cadeia dupla, associados a um solvente orgânico e uma pequena parcela de água, o que propicia a organização de estruturas em bicamadas (lamelares), em qualquer concentração. Entretanto, ao reduzir-se o comprimento da cadeia apolar dos fosfolipídios para números de carbono igual ou menor que doze, a formação de estruturas micelares, será predominante na suspensão obtida a partir da mesma preparação citada anteriormente (SÁNCHEZ *et al.*, 2013).

As estruturas vesiculares podem variar desde de micelas (pequenos agregados), até estruturas altamente organizadas como os lipossomos, que podem ter graus de ordem molecular variadas. As condições experimentais e os constituintes, determinam as fases lipídicas, como a fase lamelar ou bicamada (**Figura 5** (a)), entre outras fases como por exemplo a micela esférica e a micela esférica invertida (**Figura 5** (b) e (c)).



**Figura 5:** Fases dos lipossomos- (a) fase lamelar ou bicamada, (b) micela esférica, (c) micela esférica inversa - Adaptado de SÁNCHEZ *et al.*, 2013.



Dentre as técnicas que podem ser usada para a identificação das fases polimórficas dos lipossomos, destaca-se a técnica de calorimetria de varredura diferencial (DSC), a ser discutida posteriormente (GHOSH, 1988; SÁNCHEZ *et al.*, 2013).

### 3.1.3. Classificação dos lipossomos

Os constituintes da membrana lipossomal, bem como o número de bicamadas lipídicas e o diâmetro, influenciam as propriedades físico-químicas dos lipossomos (BATISTA *et al.*, 2007).

Dependendo das características estruturais dos seus constituintes, os lipossomos são classificados em:

- i) **Convencionais**, contendo fármacos hidrofílicos na fase aquosa dos lipossomos (**Figura 6 (A)**) ou fármacos lipofílicos adsorvidos ou inseridos em regiões específicas da bicamada lipídica (**Figura 6 (B)**). São exemplos os lipossomos compostos por Aso, podendo esta ser associada ou não com colesterol. *In vivo*, são rapidamente removidos da circulação, pelo sistema fagocitário (VERMURI *et al.*, 1995).
- ii) **De longa circulação**, contendo um polímero hidrofílico na superfície (**Figura 6 (D)**), tal como o polietileno glicol (PEG) (SAGRISTÁ *et al.*, 2000; TORCHILIN *et al.*, 2005). *In vivo*, os polímeros que revestem a superfície da membrana lipossomal aumentam o tempo de circulação no organismo, pois retardam o reconhecimento pelos macrófagos (células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, ricos em lipossomos, que fagocitam elementos estranhos ao corpo; os macrófagos derivam dos monócitos do sangue e de células conjuntivas ou endoteliais). Isto porque previne a associação com as opsoninas no plasma. Opsoninas são moléculas que agem como facilitadoras de ligação no processo de fagocitose. Revestem substâncias (ou microorganismos) estranhas ao organismo aumentam a capacidade de englobamento das mesmas por parte dos fagócitos.
- iii) **Sítio-específicos**, são lipossomos que possuem ligantes acoplados a sua superfície, cuja função é distribuir seletivamente o fármaco no sítio desejado (**Figura 6 (E)**). As vesículas lipossomais sítio-específicas, podem ser formadas por fosfatidiletanolamina e colesterol, ou PEG, em

função de conterem grupos hidroxilas. Estes atuam como ligantes de reconhecimento de, por exemplo, os anticorpos, glicopeptídeos e lectinas. Dentro desta classe de lipossomos sítio-específicos, temos:

a) **Imunolipossomos (Figura 6 (F))**, que possuem ligantes como as imunoglobulinas e seus fragmentos, que proporcionam o aumento do acúmulo de fármacos nas células e tecidos alvo.

b) **Carreadores de proteínas e peptídeos (Figura 6 (G))**, cuja superfície é formada por compostos biologicamente ativos de origem proteica (subunidade proteica) ou peptídica, como hormônios.

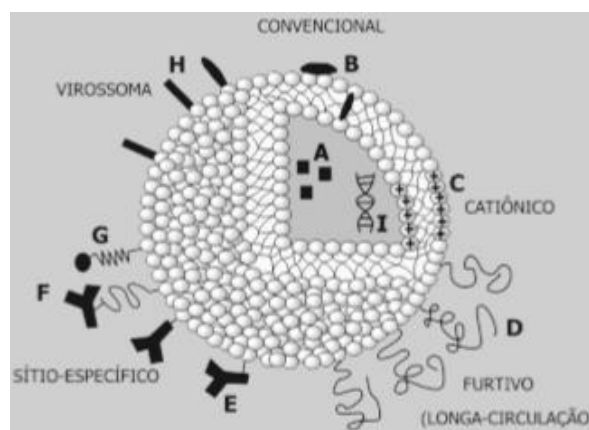
c) **Virossomos (Figura 6 (H))**, contendo hemaglutinina na superfície, que funciona como um direcionador. A hemaglutinina liga-se a resíduos de ácido sialílico na membrana das células. Este sistema lipossomal, proporciona maior intensidade nos efeitos benéficos das vacinas encapsuladas, com liberação específica do antígeno.

iv) **Lipossomos polimórficos**, que são lipossomos, cuja reatividade é aumentada pela modificação da estrutura da membrana lipídica, quando submetidos a variações de potencial hidrogeniônico (pH), temperatura ou carga eletrostática. Sendo assim, esta classe é subdividida, de acordo com a sensibilidade a uma destas variações, em:

a) **Lipossomos sensíveis ao pH**, são sensíveis ao pH, e geralmente compostos por fosfatidiletanolaminas insaturadas.

b) **Lipossomos termo-sensíveis**, são formados por mistura de lipídeos sintéticos, como a DPPC, que possuem uma temperatura de transição de fase ( $T_m$ ), alguns graus acima da temperatura fisiológica.

c) **Lipossomos catiônicos (Figura 6 (C e I))**, ou **aniônicos**, são classificados de acordo com a carga de superfície da membrana lipídica. Os lipossomos catiônicos são os mais frequentemente utilizados na terapia gênica humana, visto que o ácido desoxirribonucleico (DNA) possui uma carga efetiva negativa, e interage com os lipossomos catiônicos através de interações eletrostáticas.



**Figura 6:** Classificação dos lipossomos quanto às características estruturais de seus constituintes. Adaptado de BATISTA *et al.*, 2007.

Quanto ao tamanho os lipossomos podem variar entre 20 nanômetros (nm) e dezenas de micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). O tamanho é definido pelo método de obtenção dos mesmos (HOPE *et al.*, 1986). Quanto ao número de **bicamadas**, são divididos em **unilamelares** quando possuem uma única bicamada e quando apresentam mais de uma bicamada, são classificados como **multilamelares**.

Em função do tamanho e número de bicamadas, são denominados de:

- i) **Vesículas multilamelares grandes** (MLVs - "*Multilamellar Large Vesicles*"), é o modelo mais clássico apresentado nos estudos com lipossomos, tendo produção rápida e imediata. Seus diâmetros variam entre 400 nm e 3.500 nm e possuem diversas bicamadas lipídicas. Estudos de tempo de meia-vida com MLVs de tamanhos entre 200 e 400 nm, e composições lipídicas idênticas, demonstraram que as MLVs de maiores concentrações lipídicas, foram removidas do sangue mais rapidamente do que as vesículas menores (LAVERMAN *et al.*, 1999). Vesículas MLVs em geral, são utilizadas como modelos para estudos relacionados a propriedades estruturais e termodinâmicas das membranas ou como carreadores para aplicações tópicas.
- ii) **Vesículas oligolamelares** (OLVs - "*Oligolamellar Vesicles*"); apresentam tamanhos entre 100 e 500 nm, com 2 ou 6 bicamadas lipídicas. Sendo assim, podem ser subdivididas em vesículas oligolamelares

pequenas (SOVs, *Small Oligolamellar Vesicles*) com diâmetros entre 20 nm e 50 nm, vesículas oligolamelares grandes (LOVs, *large oligolamellar vesicles*) e vesículas oligolamelares gigantes (GOVs, *giant oligolamellar vesicles*),

- iii) **Vesículas unilamelares grandes** (LUVs - "*Large Unilamellar Vesicles*"). As LUVs possuem tamanhos iguais ou superiores a 100 nm. As vesículas de diâmetro entre 100 e 200 nm, atravessam os poros das membranas, e por isso tem sido um dos modelos mais utilizados como carreador (BARENHOLZ, 2012). Permite carrear o máximo de substância ativa para ser liberada gradualmente no tecido específico, reduzindo o tempo de administração do fármaco, melhorando assim a biodistribuição.
- iv) **Vesículas unilamelares pequenas** (SUVs- "*Small Unilamellar Vesicles*"), à semelhança das SOVs, com diâmetro de 20 a 50 nm, diferenciando-se no número de lamelas, contêm uma única bicamada. As SUVs são usadas para estudos de superfície, porém são termodinamicamente instáveis (sujeitas a processos de agregação e fusão).
- v) **Vesículas unilamelares gigantes** (GUVs - "*Giant Unilamellar Vesicles*") com dimensões superiores a 1000 nm, pode chegar a dezenas de  $\mu\text{m}$  (LAOUINI *et al.*, 2012; TYRRELL *et al.*, 1976). Este tamanho é comparável à de uma célula eucariota (entre 10 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro). As GUVs são modelos membranares que por conter propriedades que podem ser observadas por microscopia óptica, são usados para estudos referentes à elasticidade de membrana, por exemplo.

#### 3.1.4. Interações moleculares e dinâmica lipossomal

As bicamadas fosfolipídicas das membranas são mantidas por interações de Van der Waals tais como as interações dipolo-dipolo, e por interações hidrofóbicas. Tais interações refletem em diferentes movimentos da membrana lipossomal, em nível vibracional, rotacional e translacional. Tal dinâmica é afetada pela presença de substâncias exógenas ao lipossomo, e pode ser monitorada por diferentes técnicas

instrumentais. Neste item, cada movimento da dinâmica molecular será discutido seguido de explanação sobre a técnica instrumental que pode ser usada para monitorá-lo.

#### **3.1.4.1. Interações com água**

As moléculas de água que estão disponíveis para fazer interações com os lipídios presentes na vesícula lipossomal, encontram-se de quatro (4) formas; livres, aprisionadas, fracamente ligadas, e as que estão firmemente ligadas ocupando a camada de hidratação principal ou ocupando a camada de hidratação interna (TEXTER, 2001).

O efeito hidrofóbico dos metilenos, durante o método de preparo lipossomal em solvente aquoso, resulta no aumento de entropia ( $S$ ) dos lipídios, o que permite que haja um processo espontâneo de formação das vesículas. Quando um sistema sofre uma mudança de estado (entalpia ( $H$ ), temperatura ( $T$ ) e  $S$ ), a energia livre de Gibbs ( $G$ ) se altera (equação 1).

Assim, a influência do efeito hidrofóbico durante a preparação de lipossomos, como um processo termodinâmico, ocorre de forma a diminuir  $G$ . As moléculas se arranjam de forma a minimizar o contato da cadeia apolar com a água. Este processo de agregação lipídica espontânea, permite maior mobilidade ao movimento das moléculas, originando agregados termodinamicamente mais estáveis (ATKINS *et al.*, 2008; MOURITSEN *et al.*, 1994).

$$G = H - TS \quad (\text{equação 1})$$

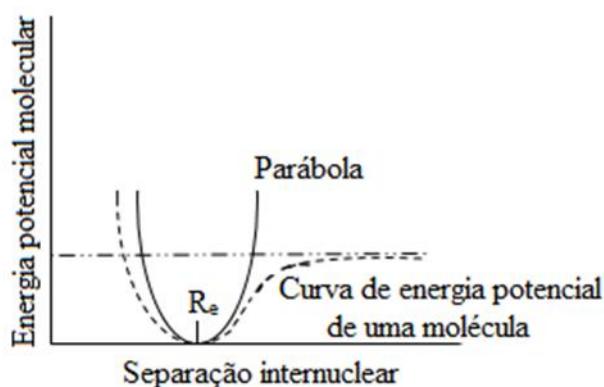
A equação 1 descreve informações importantes da reação química e da temperatura de transição de fase ( $T_m$ ) (ATKINS *et al.*, 2008), que ocorre no sistema lipídico e discutida mais a diante.

#### **3.1.4.2. Movimentos vibracionais lipídicos: estudos na dinâmica molecular da membrana fosfolipídica, por infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada horizontal (HATR-FTIR).**

As moléculas tais como os lipídios, vibram constantemente de diferentes formas. Dentre estas, destacam-se os estiramentos axiais ( $\nu$ ) ou angulares ( $\delta$ ). Os estiramentos envolvem uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação

entre dois átomos. Já, as vibrações de deformação são características de variações do ângulo entre duas ligações, tais como as deformações angulares do tipo: balanço no plano, tesoura no plano, sacudida fora do plano e torção fora do plano (SKOOG *et al.*, 1998).

A partir de uma curva de energia potencial característica de uma molécula diatômica, é possível observar no mínimo da curva, onde a energia potencial pode ser próxima de uma parábola, ou seja, próximo do comprimento da ligação no equilíbrio ( $R_e$ ) (**Figura 7**) (ATKINS *et al.*, 2011).



**Figura 7:** Representação da curva da energia potencial de uma molécula e de uma parábola. Adaptado de ATKINS *et al.*, 2011.

Com base nesta informação, tem-se as equações 2 e 3 que fornece a energia potencial da molécula em relação a constante de força de ligação ( $K$ ). Quanto mais rígida for a ligação, maior será a constante da força, pois mais inclinadas estarão as paredes da curva de potencial (ATKINS *et al.*, 2011).

$$V = \frac{1}{2} K X^2 \quad \text{equação 2}$$

Onde,

$$X = R - R_e \quad \text{equação 3}$$

Utilizando a série de Taylor (suporte matemático), para ver a relação citada anteriormente, entre a forma da curva de energia potencial da molécula e o valor de  $K$  é permissível expandir a energia potencial em torno do ponto de mínimo da curva (equação 4).

$V_0$ , pode ser igualado a zero. A primeira derivada de  $V$  é zero no ponto de mínimo. O primeiro termo diferente de zero é proporcional ao quadrado do deslocamento e assim pequenos deslocamentos podem ter todos os termos de ordem superior ignorados (**Equação 5**) (ATKINS *et al.*, 2011).

$$V(X) = V(0) + \left(\frac{dV}{dX}\right)_0 X + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2V}{dX^2}\right)_0 X^2 \quad \text{equação 4}$$

$$V(X) \approx \frac{1}{2} + \left(\frac{d^2V}{dX^2}\right)_0 X^2 \quad \text{equação 5}$$

Sendo assim, a curva de energia potencial da molécula é a de um potencial parabólico (equação 6) (ATKINS *et al.*, 2011).

$$K = \frac{1}{2} + \left(\frac{d^2V}{dX^2}\right)_0 \quad \text{equação 6}$$

A  $K$  será, portanto, grande quando a curva de energia potencial for muito aguda (fechada) nas vizinhanças do mínimo, e  $K$  será pequena quando for aberta nas vizinhanças do mínimo.

As restrições na ligação molecular são refletidas nos modos vibracionais das ligações (ATKINS *et al.*, 2011). Os grupos lipídicos fosfato e colina, presentes nas regiões polares, bem como o grupo carbonila presente na interface, podem interagir com o meio aquoso por interações eletrostáticas e/ou por ligações de hidrogênio, o que define o grau de hidratação nas respectivas regiões. O grau de hidratação influencia os modos vibracionais moleculares. Outro fator que influencia as vibrações moleculares lipídicas é a isomerização *trans-gauche*, ocorrente nas cadeias hidrocarboneto dos lipídios (MORENO *et al.*, 2009). As variações nas quantidades destes confôrmeros, influência na liberdade de movimento vibracional ou torção das cadeias acil lipídicas (CASAL *et al.*, 1980).

As vibrações são responsáveis pela absorção na região do infravermelho do espectro eletromagnético (ATKINS *et al.*, 2011), sendo assim as interações moleculares em uma membrana lipossomal, podem ser estudadas a nível vibracional, através da técnica de **HATR-FTIR**, discutida a seguir.

Estudos **de modos vibracionais lipídicos por HATR-FTIR**, a técnica de espectroscopia de infravermelho permite a identificação estrutural e o estudo de dinâmica molecular de diversos compostos e complexos, sejam estes orgânicos ou inorgânicos. Esta técnica permite investigar a composição de uma amostra, através de uma variação no momento dipolar de suas ligações. Uma amostra em contato com a radiação eletromagnética na região do infravermelho, sofrerá interferência nas rotações e vibrações das ligações covalentes aumentando a sua amplitude (BARBOSA *et al.*, 2008; SILVERSTEIN *et al.*, 2012).

A teoria ondulatória e a teoria corpuscular complementam-se para descrever a natureza da radiação eletromagnética. A radiação eletromagnética possui propriedades de partículas e de ondas, e assim podem ser descritas por sua frequência ( $\nu$ ) e por seu comprimento de onda ( $\lambda$ ) (BARBOSA *et al.*, 2008; SILVERSTEIN *et al.*, 2012). A teoria ondulatória descreve a formação da radiação eletromagnética a partir de um campo elétrico perpendicular a um campo magnético, onde ambos oscilam e se propagam. A velocidade desta oscilação no vácuo corresponde à velocidade da luz ( $c$ ), correspondente a  $2,997925 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$ .

A frequência é correspondente ao número de ciclos ou número de onda por segundo. O número de onda é uma grandeza física inversamente proporcional ao comprimento de onda ( $\lambda \approx 2,5\text{-}16,7 \text{ }\mu\text{m}$ ) (VOLLHARDT & SCHORE, 2013) e pode ser definido por:

$$\bar{\nu} = c/\lambda \quad (\text{equação 7})$$

A quantidade de número de onda ( $\nu$ ) é uma medida do número de ciclos ou número de ondas que passa a cada segundo em um determinado ponto, ou seja, a frequência da radiação. Como não é conveniente trabalhar com valores numéricos de ordem de grandeza em ciclos por segundo, ficou definido uma quantidade denominada número de onda que é proporcional a frequência e a energia, sendo, portanto, um valor recíproco e a unidade é dada em  $\text{cm}^{-1}$  (VOLLHARDT & SCHORE, 2013).

$$\bar{\nu} = 1/\lambda \quad (\text{equação 8})$$



As mudanças de energia associadas às absorções variam entre 10 Kcal mol<sup>-1</sup> a 42 KJ mol<sup>-1</sup>.

A teoria corpuscular descreve a radiação eletromagnética como sendo formada por fótons ou quanta. De acordo com Planck, Bohr e Einstein (BARBOSA *et al.*, 2008), a energia associada a uma radiação eletromagnética ( $E$ ) é proporcional a sua frequência. A constante de Planck ( $h$ ) corresponde ao valor de  $6,6242 \times 10^{-27}$  J/s.

$$E = h \nu \quad (\text{equação 9})$$

Combinando as equações de ambas as teorias (Equação 7 e 9), tem-se a Equação 10.

$$E = h c / \lambda \quad (\text{equação 10})$$

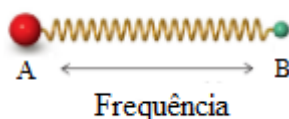
Cada modo vibracional de energia para um determinado grupo funcional é relacionado a um pico de absorção ou transmitância em determinada frequência no espectro de IV.

O espectro de infravermelho é comumente dividido em regiões de acordo com a faixa de número de onda, onde a radiação eletromagnética será absorvida pelos grupos funcionais da molécula. A região do espectro denominada de infravermelho médio compreende o número de ondas entre 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> e é amplamente utilizada pelos químicos orgânicos. Apresenta bandas de absorção porque para cada mudança de nível vibracional, ocorre uma série de transições rotacionais que vão depender da geometria molecular, das massas dos átomos, além da forma da superfície de energia potencial da molécula (SILVERSTEIN *et al.*, 2012). Tal característica, permitirá identificar grupos funcionais específicos de uma molécula, bem como compreender a sua dinâmica, visto que esta é influenciada por movimentos rotacionais, translacionais e referentes a colisões no seu ambiente (LEE & CHAPMAN, 1986).

Para que ocorra mudanças de estado vibracional ocorrida em função da absorção ou emissão de radiação, o momento de dipolo elétrico da molécula tem que sofrer uma variação quando os átomos forem deslocados uns em relação aos outros, sendo ativas, portanto no infravermelho. As vibrações inativas no infravermelho, são referentes as moléculas que suas vibrações não afetam o momento de dipolo da molécula, como por exemplo, o movimento de estiramento de uma molécula diatômica homonuclear, com

exceção para o N<sub>2</sub>, que possui pelo menos um modo de vibração que provoca alteração no momento de dipolo (ATKINS *et al.*, 2011)

A **Figura 8**, representa um modelo de ligações entre dois átomos, com massas desiguais em uma mola que oscila (“vibra”) com uma certa frequência. A frequência das vibrações de dois átomos, depende das forças das ligações entre eles e seus pesos atômicos. Esta força é a denominada Lei de Hooke. Como as ligações se comportam como molas, é possível aplicar esta Lei, para determinar a frequência das vibrações (BARBOSA *et al.*, 2008).



**Figura 8:** Esquema representativo para a excitação vibracional de uma ligação. Molécula formada por dois átomos distintos de massa desiguais em uma mola que oscila. Adaptado de VOLLHARDT & SCHORE, 2013

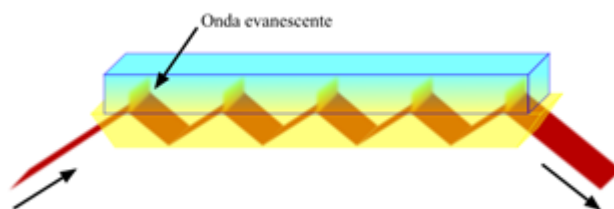
A Lei de Hooke é descrita conforme a equação 11, onde  $\bar{\nu}$  é a frequência,  $c$  é a velocidade da luz,  $K$  é uma constante que indica a tenacidade da mola e  $m_1$  e  $m_2$  é uma função de massa dos dois átomos envolvidos na ligação (VOLLHARDT & SCHORE, 2013).

$$\bar{\nu} = K \sqrt{f \frac{(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}} \quad (\text{equação 11})$$

Esta equação sugere que cada ligação de uma molécula tem uma absorção específica no espectro de infravermelho, porém a interpretação deste tipo de espectro, é um pouco mais complexa, visto que as moléculas que absorvem luz infravermelha não sofrem apenas deformações axiais, mas também deformações angulares, bem como as combinações delas. As vibrações angulares possuem em geral intensidade mais fraca, superpõem-se a outras absorções e podem produzir padrões mais complicados. As vibrações de ligações polares fornecem bandas fortes de absorção no infravermelho,

enquanto que as absorções associadas com ligações apolares, podem ser fracas ou estar ausentes (VOLLHARDT & SCHORE, 2013).

O espectro de infravermelho pode ser obtido por modos de FTIR como a HATR. Este modo destaca-se por ser não-invasivo, por apresentar maior precisão nas medidas de números de ondas ( $\approx 2 \text{ cm}^{-1}$ ), com resolução de até  $4 \text{ cm}^{-1}$ , e por demandar menores quantidades de amostra nas análises. A HATR possibilita também o aumento da razão *sinal / ruído* (BARBOSA *et al.*, 2008). Por este modo, a amostra é depositada em um cristal altamente polido, com um alto índice de refração como o seleneto de zinco (ZnSe). Um feixe de radiação de infravermelho é incidido neste cristal, de forma que a luz seja refletida internamente no mesmo (**Figura 9**), e parte desta luz é transmitida, e denominada onda evanescente. Esta onda evolui para além do cristal, de modo a interagir com a amostra sem danificá-la. Quando a amostra absorve determinado comprimento de onda evanescente, ocorre uma atenuação do feixe cujo comprimento de onda corresponde às bandas de absorção no infravermelho. As posições de absorção, associadas a excitação vibracional dos átomos em torno de suas ligações, dependem do tipo de grupo funcional, e o espectro de infravermelho exibe um padrão único para cada substância



**Figura 9:** Ilustração do cristal de ZnSe. Adaptado de <http://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/>

Como dito anteriormente, a técnica de HATR- FTIR permite o monitoramento das interações moleculares em uma membrana lipossomal, em nível vibracional. Através da análise dos espectros de HATR-FTIR, pode-se obter parâmetros como o grau de hidratação e ordem molecular de grupos funcionais de regiões específicas lipídicas, tais como a região polar (hidrofílica) de interface e região apolar (hidrofóbica) (MANTSCH *et al.*, 1991).

Para se obter informações quanto o grau de hidratação e mobilidade de grupos funcionais presentes na membrana lipídica, em função da presença de uma substância exógena, deve-se observar a variação do número de onda e a variação de largura à 75%

da altura dos picos de absorção referente aos estiramentos axiais dos grupos funcionais, tais como o estiramento assimétrico do grupo colina ( $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$ ) na faixa de absorção próxima a  $970 - 974 \text{ cm}^{-1}$ ; o estiramento assimétrico do grupo fosfato ( $\nu_{as} PO_2^-$ ), na faixa de absorção de  $1260 - 1220 \text{ cm}^{-1}$ ; o estiramento do grupo carbonila ( $\nu C=O$ ), na faixa de absorção de  $1725 - 1740 \text{ cm}^{-1}$ ; o estiramento simétrico do grupo metileno ( $\nu_s CH_2$ ), próximo a faixa de absorção  $2850 \text{ cm}^{-1}$ ; e o estiramento assimétrico do grupo metileno ( $\nu_{as} CH_2$ ), próximo a faixa de absorção de  $2920 \text{ cm}^{-1}$  (MORENO *et al.*, 2010).

Quanto ao deslocamento de número de onda referente ao  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$ , este pode refletir as comunicações intermoleculares com o grupo fosfato ( $\nu_{as} PO_2^-$ ) do lipídio mais próximo (lipídio vizinho), ou com interações dipolo-dipolo com moléculas de água. O  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$  também pode ser influenciado pela interação da membrana com substâncias exógenas (MORENO *et al.*, 2009).

O grupo fosfato lipídico assim como o grupo carbonila, interage com a água ou com uma substância ativa por interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio. O aumento do seu grau de hidratação pode ser indicado pelo deslocamento do número de onda do  $\nu_{as} PO_2^-$  para menores valores e vice-versa (CHEN *et al.*, 2008; MORENO *et al.*, 2010; KORKMAZ *et al.*, 2005; SEVERCAN *et al.*, 2005).

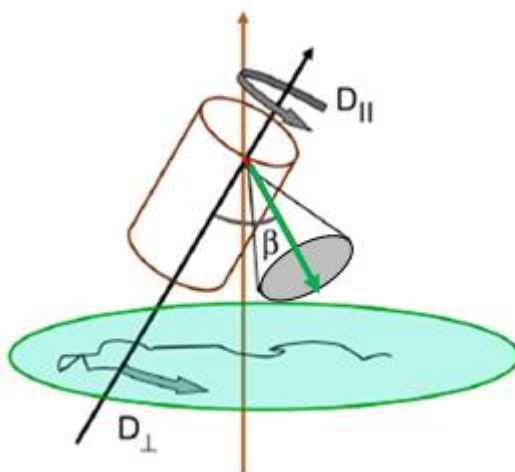
Para a análise do comportamento da cadeia de hidrocarbonetos (região apolar) lipídica, sabe-se que o número de onda de  $\nu_s CH_2$  e  $\nu_{as} CH_2$  estão associados à presença de ligações *trans* e *gauche*, e conseqüentemente ao estado de fase lipídico (LEE *et al.*, 1986). Quando os lipídios estão em uma fase mais ordenada, de menor mobilidade molecular, e ocorrendo maior presença de ligações hidrocarbonetos em conformação *trans*, as bandas dos estiramentos dos metilenos ocorrem em valores de número de onda menores (LEWIS *et al.*, 1998). As cadeias acilo estão organizadas entre si de uma forma paralela, e são estabilizadas por interações de Van der Waals (NAGLE 1980). Quando os metilenos da cadeia hidrofóbica lipídica sofrem transição para um estado mais fluido, há um aumento da presença de ligações hidrocarboneto do tipo *gauche*. Ocorre a diminuição das interações de Van der Waals, o que origina um aumento da distância entre os lipídios e uma diminuição da organização das cadeias acilo (NAGLE 1980). Os valores de número de onda das bandas de estiramento dos metilenos aumentam (MANNOCK *et al.*, 2010).

O aumento da largura da banda de estiramento de um grupo específico presente no lipídio, reflete um aumento da dinâmica molecular, e vice-versa (TOYRAN *et al.*, 2003).

As informações providas por análises de HATR-FTIR permitem a obtenção de dados importantes tais como, a localização da substância ativa na membrana lipossomal, o grau de hidratação e mobilidade molecular, que podem influenciar em outros parâmetros do sistema como a cinética de liberação.

### 3.1.4.3. Movimentos rotacionais lipídicos: estudos na dinâmica molecular da membrana fosfolipídica, por ressonância magnética nuclear (RMN $^1\text{H}$ e RMN $^{31}\text{P}$ )

A dinâmica rotacional de uma molécula lipídica está representada na **Figura 10**, apontando a rotação sobre o eixo ( $D_{||}$ ), a rotação restrita do eixo (wobble) e reorientação interna (KLAUDA *et al.*, 2008). Esta última pode ser exemplificada através da reorientação do fosfato tetraédrico com respeito as moléculas presentes no glicerol (DUFOURC *et al.*, 1992).



**Figura 10:** Modelo para representar a dinâmica de lipídio ao longo do eixo (rotação do eixo), descrito por  $D_{||}$ : rotação restrita ao longo do eixo (wobble) e  $D_{\perp}$  a reorientação interna.  $\beta$ , é o ângulo médio entre o vetor de interesse (em verde escuro) e o eixo longo ( $D_{||}$ ) do lipídio. A bicamada normal é mostrada em marrom. A extensão média de ondulação lipídica e reorientação interna do vetor é representada pelo disco maior, em verde e azul, respectivamente. Uma trajetória hipotética é projetada no disco maior para ilustrar o bamboleio.  
Adaptado de KLAUDA *et al.*, 2008.

O tempo de correlação ( $\tau$ ) é definido como o tempo necessário que o núcleo de hidrogênio leva para girar em um radiano em torno do próprio eixo. Reflete o movimento

rotacional molecular e quando aplicado a estudos de dinâmica de membranas, é influenciado pela estrutura lipídica e pelo empacotamento do meio. No caso dos grupos lipídicos, o valor  $\tau$  é influenciado por interações dipolares do grupo com hidrogênios vizinhos; para o grupo fosfato, interações com hidrogênios presentes no grupo glicerol e com o grupo colina, bem como pela anisotropia de deslocamento químico (CSA, do inglês *chemical shift anisotropy*) são também fatores determinantes (KLAUDA *et al.*, 2008). Em estudos de dinâmica molecular de membranas, estudos de relaxação e CSA fornecem informações importantes sobre regiões específicas dos lipídios e podem ser monitorados por **ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{31}\text{P}$** , discutidas a seguir.

**Espectroscopia de ressonância magnética nuclear - A espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$** , foi desenvolvida para estudar as propriedades de núcleos atômicos na década de 40, mas foi em 1951 que esta técnica foi implementada para estudos de compostos orgânicos. Isto foi possível por os compostos orgânicos apresentarem núcleos com estados de spin de  $+1/2$  e  $-1/2$ . Os núcleos de hidrogênios foram os primeiros a serem estudados, daí, a designação de “RMN”– ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ). Surgiram mais tarde estudos relacionados a outros núcleos magnéticos, como por exemplo a espectrometria de RMN  $^{31}\text{P}$  (SEELIG, 1978).

Quase todos os elementos químicos possuem um isótopo com um núcleo atômico que possui um momento magnético ( $M$ ), quando submetido a um campo magnético externo, o núcleo é excitado na sua frequência de precessão ( $\nu_0$ ), a frequência que define a quantidade de giros do núcleo por segundo; e o mesmo será desviado do seu estado de equilíbrio (MILHAUD, 2004; SILVERSTEIN *et al.*, 1991). O núcleo gira e tende a alinhar-se a favor ou contra o campo de maior magnetismo. Mais energia é então necessária, para um próton alinhar-se contra o campo, do que a favor dele. Prótons que se alinham a favor do campo magnético, estão no estado de spin  $\alpha$  de menor energia, e os que se alinham contra o campo, estão em estado de spin  $\beta$  de maior energia. Um número, maior de núcleos encontram-se no estado de spin  $\alpha$ , do que spin  $\beta$ . Esta diferença de populações é o que permite que a ressonância nuclear propicie os espectros de RMN.

A radiação requerida está na região de radiofrequência (rf) do espectro eletromagnético e é denominada radiação rf.

A energia necessária para a transição que ocorre dos spins é pequena (“excitação” dos spins). Quando os núcleos relaxam, ou seja, retornam ao seu estado fundamental, emitem sinais eletromagnéticos, cuja frequência depende da diferença de energia ( $\Delta E$ ) entre os estados de spins  $\alpha$  e  $\beta$ . O espectrômetro de RMN detecta esses sinais e os

apresenta como um registro de frequência do sinal versus sua intensidade. Isto é possível, por os núcleos estarem em ressonância com a radiação de rf. A ressonância refere-se ao giro do núcleo entre os estados de spin  $\alpha$  e  $\beta$  em resposta a radiação de rf.

A constante de Planck, é a constante de proporcionalidade que relaciona  $\Delta E$  e  $\nu$ . A equação 12 exprime a diferença de energia entre os estados de spins ( $\Delta E$ ), que depende da frequência de operação do espectrômetro, o qual depende da força de  $B_0$  medida em tesla ( $T$ ) e de razão giromagnética ( $\gamma$ ). A razão giromagnética é uma constante que depende do momento magnético (tipo de núcleo particular). O próton (H) por exemplo, tem um valor de  $\gamma$  de  $2,675 \times 10^8 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

$$\Delta E = h\nu = h \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (\text{equação 12})$$

Cancelando a constante de Planck em ambos os lados da equação, temos que

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (\text{equação 13})$$

Os espectros de RMN permitem ajustes de diferentes fontes de radiação em diferentes frequências, para que outros espectros de RMN de diferentes tipos de núcleos sejam averiguados, como o RMN  $^{31}\text{P}$ .

Nos Espectrômetros de pulso com transformada de Fourier (FT), o campo magnético é mantido constante e um pulso curto de duração de rf, excita os spins (estado de ressonância) de todos os prótons simultaneamente. Após estar em contato com o campo magnético externo, serão incididos e absorvidos no núcleo numerosos pulsos de radiação de rf. No intervalo entre os pulsos, os elétrons retornam ao equilíbrio (em um processo denominado relaxação), produzindo um sinal de decaimento da indução livre (FID, do inglês *Free Induction Decay*), em uma frequência correspondente a  $\Delta E$ . A intensidade do sinal cai à medida que os núcleos perdem energia que ganharam do pulso de rf (SILVERSTEIN *et al.*, 1991; SKOOG *et al.*, 1998). O espectro de RMN é então obtido pela coleta de informações do computador (por meio de operações matemáticas, FT), que converte o sinal de FID (resultante das relaxações) de intensidade versus frequência, que pode ser convertida em valores de deslocamento químico.

Os processos de relaxação podem ser do tipo spin-rede (ou longitudinal,  $R_1$ ) e relaxação spin-spin (ou transversal,  $R_2$ ). O processo de relaxação spin-rede, está associada ao retorno do núcleo para seu estado fundamental, após a transferência da energia por toda a rede molecular, enquanto que a relaxação spin-spin, o retorno ocorre via transferência de energia entre spins. A partir de  $R_1$  e  $R_2$ , pode-se calcular os tempos de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e transversal ( $T_2$ ), respectivamente (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

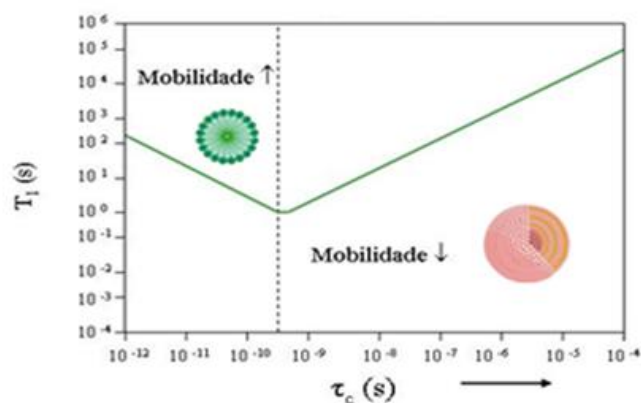
Ao analisar sistemas como os lipossomos, averígua-se a mobilidade das membranas fosfolipídicas, através das medidas de  $T_1$  associados com o tempo de correlação, visto que ambos refletem movimentos rotacionais influenciados por interações dipolo-dipolo com núcleos vizinhos (LASIC, 1998). Quando se emite pulsos de rf no RMN em diferentes intervalos de tempo, esse núcleo muda de eixo de rotação, e quando cessam essas emissões de rf, o núcleo tende a relaxar. Este tempo que ele leva para relaxar é denominado de  $T_1$  (SKOOG *et al.*, 1998; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

O  $T_1$  varia segundo o ambiente químico do núcleo em análise. Por isto, em um experimento para determinação do  $T_1$ , os tempos de intervalos entre pulsos são variados, para garantir que se obtenha a relaxação completa do núcleo. A este experimento chama-se, sequência de pulsos com recuperação da inversão.

Na região polar lipídica é possível estudar a mobilidade dos hidrogênios presentes no grupo colina, enquanto que na região apolar, a mobilidade é indicada pela análise dos hidrogênios da cadeia de hidrocarbonetos, por estudos de RMN  $^1\text{H}$  (LEPORE *et al.*, 1992).

Estudos que correlacionam  $T_1$  e  $\tau$ , está descrito no gráfico representado na **Figura 11**, onde se percebe um ponto de mínimo que separa duas regiões. Em uma delas o  $T_1$  é inversamente proporcional ao  $\tau$ , sendo típico dos sistemas de baixa mobilidade, tal como MLVs. Assim, se uma substância exógena produz a redução do valor de  $T_1$  de um núcleo presente no lipossomo, isto é um indicativo de que a mesma provocou um aumento da sua mobilidade e vice-versa. Na segunda região, existe proporcionalidade entre  $T_1$  e  $\tau$ , típico de sistemas de alta mobilidade, como SUVs e micelas (DE LIMA *et al.*, 2007).

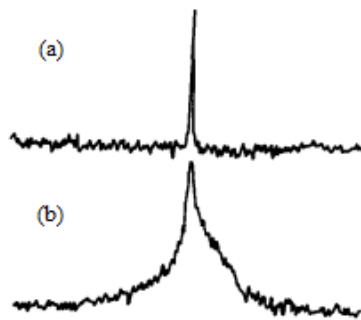




**Figura 11:** Gráfico de Medidas de  $T_1$  em função do tempo (s), para sistemas lipossomais de alta mobilidade e baixa mobilidade

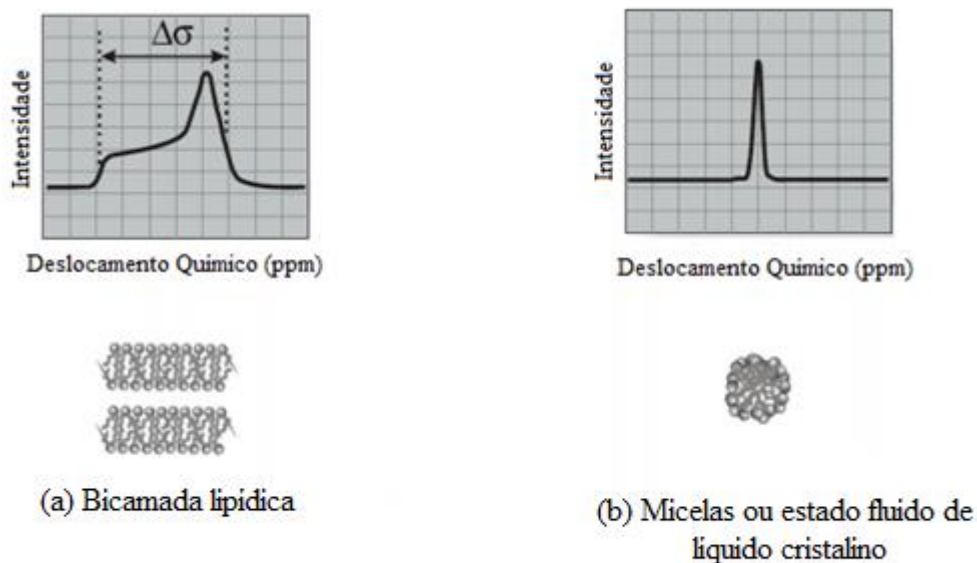
Enquanto os ensaios de RMN  $^1\text{H}$  podem fornecer informações sobre a relaxação do grupo colina, os ensaios de **RMN  $^{31}\text{P}$**  fornecem informações quanto CSA da região do fosfato dos fosfolípidos que constituem a membrana lipossomal (GHOSH, 1988; SÁNCHEZ *et al.*, 2013). Uma vez que os lípidios em membranas biológicas são predominantemente fosfolípidos, a RMN  $^{31}\text{P}$  é uma ferramenta usada para estudar o movimento e a orientação média do grupo fosfato (SEELIG, 1978).

As medidas de CSA, fornecem parâmetros sobre a ordem e mobilidade do grupo fosfato nas membranas fosfolípídicas. As formas dos espectros de RMN  $^{31}\text{P}$ , são indicadores do estado da fase da membrana lipossomal (SÁNCHEZ *et al.*, 2013). Assim, a forma da linha do espectro está associada aos fatores relacionados com os movimentos rotacionais, sendo influenciada pela CSA dos núcleos de fósforo (**Figura 12 (a)**), assim como interações com outros núcleos, por exemplo, interações dipolares entre o hidrogênio (moléculas de água) e o fósforo (**Figura 12 (b)**) (GHOSH, 1988).



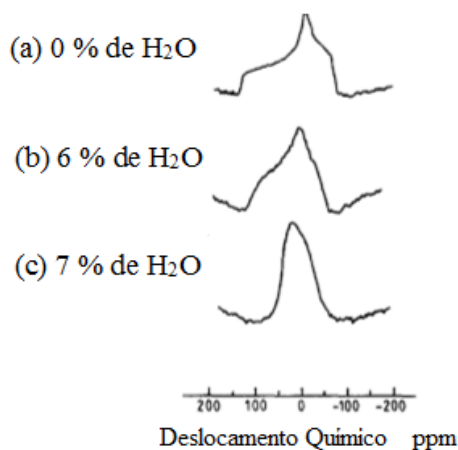
**Figura 12:** Representação esquemática de espectro de RMN  $^{31}\text{P}$ , quanto a anisotropia do deslocamento químico dos núcleos de fósforo. (a) núcleo de fósforo e (b) núcleos de fósforo com interações com moléculas de água. Adaptado de GHOSH, 1988.

A fim de compreender e interpretar os diferentes espectros obtidos, usa-se como referência os modelos propostos por Pfeiffer (PFEIFFER *et al.*, 2012), a partir dos espectros de RMN  $^{31}\text{P}$  dos lipossomos. Um pico típico de  $^{31}\text{P}$  de um fosfato presente em uma bicamada lipídica é largo com um ombro em campo baixo e um pico em campo alto (**Figura 13 (a)**). Quando os lipídios estão em fase micelar ou indicam um estado fluído líquido cristalino (SEELIG, 1978), resultam em um espectro simétrico (**Figura 13 (b)**). Na bicamada o movimento das moléculas lipídicas é anisotrópico enquanto que as estruturas micelares mostram um comportamento isotrópico (SÁNCHEZ *et al.*, 2013).



**Figura 13:** Modelos espectrais de movimentos anisotrópicos (a) típico de bicamada lipídica ou de fase lamelar e movimentos isotrópicos (b), típico de micelas ou estado fluido de líquido cristalino. Adaptado de PFEIFFER *et al.*, 2012.

Ao incorporar uma substância ativa em um sistema lipossomal, pode haver mudanças na forma do espectro como ilustrado na **Figura 14**. A **Figura 14** (a) representa o limite de rede rígida em que o grupo fosfato está completamente restrito. A adição de pequenas quantidades de água, induz um movimento lento de reorientação (tumbling) do segmento fosfato, que conduz aos espectros correspondentes as **Figura 14** (b) e (c). As mudanças espectrais de um grupo fosfato lipídico dependem não apenas da taxa de reorientação, ao inserir-se uma substância exógena por exemplo, na membrana, mas também dos detalhes do processo de reorientação (difusão, mecanismo “de salto”). As membranas quando em estado fluido, apresentam rotação rápida das moléculas lipídicas em torno de um eixo perpendicular (SEELIG, 1978). Isto reduz os valores de CSA, quando comparado a membranas em estado de fase mais ordenado. A CSA é refletida na largura do pico de RMN, quanto mais fino menor a CSA e por consequência, mais móvel o grupo fosfato. O oposto é válido para grupos fosfatos lipídicos com movimentação rotacional restrita, onde os picos de RMN  $^{31}\text{P}$  apresentar-se-ão mais largos.



**Figura 14:** Movimento anisotrópico do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios (118,5 MHz) de lipossomos de 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina a 15 °C: (a) rígido, sem adição de H<sub>2</sub>O, (b) e (c) perda da rigidez, adição de 6% e 7% de H<sub>2</sub>O, respectivamente. Adaptado de SEELIG, 1978.

#### 3.1.4.4. Movimentos vibracionais e rotacionais lipídicos

Na **Espectroscopia de Ultravioleta-visível (UV-Vis)** as faixas de energias envolvidas nas regiões do ultravioleta e do visível, estão relacionadas à diferença entre os estados vibracionais e rotacionais que as moléculas podem apresentar (PAIVA *et al.*, 2010; SKOOG *et al.*, 1998). A região do ultravioleta visível ocorre na faixa de  $\lambda$  de 400 nm a 800 nm, com energia correspondente em torno de 72 kcal.mol<sup>-1</sup> a 36 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. A região do ultravioleta do espectro é na faixa de 200 nm a 400 nm com energias correspondentes de 150 kcal.mol<sup>-1</sup> a 72 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os ensaios de UV-Vis podem ser usados para medidas a absorbância (turbidez) de amostras. Valores maiores de absorbância sugerem um ordenamento do empacotamento molecular da amostra, sendo maiores, portanto, os seus valores de turbidez. Valores menores de absorbância, sugerem um desordenamento quanto ao empacotamento molecular da amostra, tende à um estado mais fluido. Menores serão então, os valores de turbidez (SOUSA *et al.*, 2013).

A absorção da radiação ultravioleta ou visível excita os elétrons da molécula, dando origem às chamadas transições eletrônicas. A energia de transição eletrônica envolvida entre os estados eletrônicos de energia ocorre na faixa de 200 a 400 nm, como mencionado anteriormente. Nestas transições os elétrons de valência são promovidos de seu estado fundamental (estado normal) para estados de mais alta energia (estado

excitado). De maneira geral, o tempo no estado excitado é da ordem de  $10^{-8}$  s sendo que em seguida, o excesso de energia é emitido na forma radiativa (luminescência, fosforescência) ou na forma não-radiativa (sem reemissão de luz) (PAIVA *et al.*, 2010; SKOOG *et al.*, 1998).

A absorção pelos compostos orgânicos e inorgânicos é relacionada com uma deficiência de elétrons na molécula. Nos inorgânicos o comprimento de onda de absorção das transições “d-d” depende do metal envolvido, do número de grupos coordenados, da basicidade, dos átomos doadores e da geometria dos grupos coordenados (SKOOG *et al.*, 1998).

Nos compostos orgânicos os que possuem dupla ligação absorvem fortemente no ultravioleta remoto. Os compostos que possuem ligações simples e duplas alternadamente, chamadas de ligações conjugadas, produzem absorção em comprimentos de ondas maiores. Quanto mais extenso for o sistema conjugado, mais longos serão os comprimentos de onda absorvidos, podendo chegar à região do visível.

Os valores de turbidez indicam, portanto, a fluidez da membrana lipossomal (HOPE *et al.*, 1986) e também pode averiguar o tamanho e estabilidade dos lipossomos (MAZA *et al.*, 1994; MAZA *et al.*, 1996).

#### **3.1.4.5. Parâmetros translacionais: temperatura de transição de fase (T<sub>m</sub>) dos lipossomos e seus efeitos na membrana fosfolipídica – Estudos por calorimetria de varredura diferencial (DSC)**

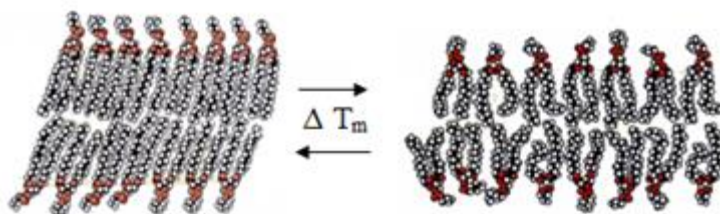
A viscosidade da membrana lipídica é descrita pela sua fluidez. Se a temperatura da membrana for mantida em torno de 37 °C, alguns lipídios estarão em um estado fluido. Se diminuir-se gradualmente a temperatura, as bicamadas dos mesmos sofrerão uma mudança. Os lipídios são convertidos desta forma de um estado líquido para o gel. Ocorre assim uma transição de uma fase em função de um gradiente de temperatura (**Figura 15**) (LASIC, 1993; NEW, 1990). A **temperatura de transição de fase, T<sub>m</sub>** (do inglês *main transition temperature*) é definida como a temperatura em que há presença de 50% de lipídio em estado gel e 50% em estado fluido (DE LIMA *et al.*, 2010). A T<sub>m</sub> dos fosfolipídios que compõem os lipossomos depende da natureza do seu grupo polar, bem como do comprimento e grau de insaturação das suas cadeias acíclicas. A T<sub>m</sub> é, portanto, específica para cada lipídio. Geralmente a T<sub>m</sub> aumenta com o aumento do tamanho das cadeias apolares e diminui com o grau de insaturação (NEW, 1990). Para misturas de

fosfolípidios, presentes em membranas de composição homogênea, o valor de  $T_m$ , compreende um intervalo de temperaturas. Por exemplo, em misturas de fosfatidilcolinas, as  $T_m$  podem variar de valores negativos a valores superiores a  $60^\circ\text{C}$ . Este valor delimita a temperatura mínima necessária para que a água se insira nos lipídios para formar os lipossomos. A presença de substâncias exógenas, pode alterar a  $T_m$  do (s) lipídio (s) componentes dos lipossomos (ATKINS *et al.*, 2008).

A transição da fase gel para a fase fluída, é um processo endotérmico, acompanhado por uma variação de entalpia ( $\Delta H$ ), requerida para quebra de ligações de Van der Waals.

Acima da  $T_m$ , as moléculas de lipídios e suas caudas hidrofóbicas estão livres para mover-se em certas direções, mantendo uma certa ordem. Abaixo da temperatura de transição de fase, o movimento das moléculas é bastante restrito, e toda a bicamada pode ser descrita como gel cristalino.

Para um designo dos lipossomos a serem usados em uma terapia, é apropriado escolher lipídios que apresentem uma  $T_m$  superior à temperatura fisiológica, para que quando administrado no organismo, mantenha uma cinética de liberação do fármaco reduzida, pois estarão mais ordenados (fase gel), visto que as amplitudes dos movimentos lipídicos de rotação são reduzidas.



**Figura 15:** Representação esquemática das variações de transição de fase

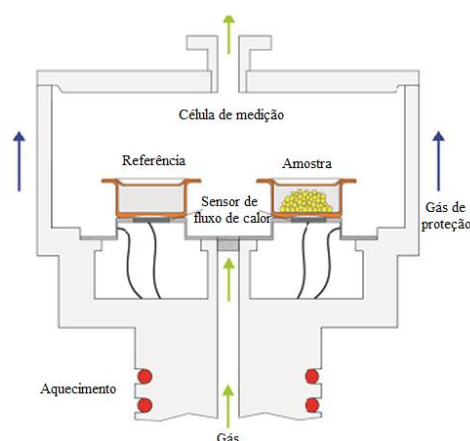
As análises relacionadas às transições de fase nos lipossomos, são frequentemente estudadas por **Calorimetria de varredura diferencial (DSC)**, como “fusão” do estado gel, para o estado cristal líquido.

**Estudo da temperatura de transição de fase por DSC** (do inglês *differential scanning calorimetry*, DSC), constitui uma técnica térmica e analítica que fornece informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância.

Análises realizadas através de DSC têm sido amplamente descritas no estudo das interações intermoleculares entre fármacos e adjuvantes, sendo de grande utilidade em estudos de pré-formulação (HOHNE *et al.*, 1996S; CHAFFZICK *et al.*, 2003). São aplicados, também na elucidação da forma de associação/organização de substâncias ativas e componentes integrados a carreadores lipídicos como polímeros e proteínas (CASTELLI *et al.*, 1997).

Os parâmetros termodinâmicos da transição principal de fase em membranas lipídicas, podem ser analisados pela variação de energia na transição de fase gel para fluida, a partir da relação entre um gradiente de temperatura e o fluxo de calor em função do tempo (CASTELLI *et al.*, 1997). Para tal, a diferença entre o fluxo de calor da amostra e a de um material de referência, é detectada usando-se células de alumínio, submetidos a um gradiente de temperatura (McELHANEY *et al.*, 1982; BILTONEN *et al.*, 1993).

Em aparelhos de DSC por fluxo de calor, as células de alumínio são aquecidas por uma única fonte de calor (**Figura 16**). Se a amostra sofrer algum tipo de modificação em sua estrutura, o sinal correspondente a média de variação de temperatura ( $\Delta T$ ), é obtido como uma diferença de potencial elétrico (Watts, W) (McELHANEY *et al.*, 1982). Este procedimento, portanto, utiliza o recurso termoelétrico para medir a  $\Delta T$ , entre os recipientes de referência e amostra.



**Figura 16:** Representação esquemática do método experimental para análises de DSC

Inicialmente, a  $\Delta T$  entre a referência e a amostra é nula. A amostra e a referência são aquecidas a uma taxa de aquecimento fixa. Quando ocorre uma transição de fase ou um rearranjo molecular na amostra, a  $\Delta T$  terá valor diferente de zero, em função de uma

variação na distribuição do estado energético da mesma (**Figura 16**), gerando os picos no espectro de DSC. Os picos podem ser exotérmicos ou endotérmicos. Os eventos exotérmicos ocorrem quando a amostra liberar energia na forma de calor durante algum processo termodinâmico. A amostra estará em um estado mais energético e transitará para um estado mais estável, ou de menor energia. Os eventos endotérmicos serão gerados quando a amostra absorver calor para vencer a barreira de energia, para sofrer a transição, sendo típicos dos processos de transição de fase principal, onde pode-se obter a  $T_m$  (HOHNE *et al.*, 1996). Deste modo, torna-se possível analisar a influência de uma substância exógena, como uma substância ativa na ordem da parte hidrofóbica (visto que a  $T_m$  é influenciada pelo número de carbonos e grau de insaturações das cadeias de hidrocarbonetos lipídicas, como dito anteriormente) de um sistema lipossomal.

No DSC é adotada a convenção termodinâmica na qual os eventos endotérmicos têm variação positiva de entalpia,  $\Delta H > 0$ ; enquanto que eventos exotérmicos têm variação de entalpia negativa,  $\Delta H < 0$ . A  $\Delta H$  é obtida através da integração da área sob o pico. As análises de  $\Delta H$ , através de DSC, incluem monitorar quanto de energia é necessária para que ocorra a transição principal de fase. O aumento do valor do  $\Delta H$  de um lipídio, após interação com uma substância exógena, pode indicar um estado de fase mais ordenado, enquanto o valor que a redução de  $\Delta H$  pode indicar um sistema mais desordenado (MARS *et al.*, 1977).

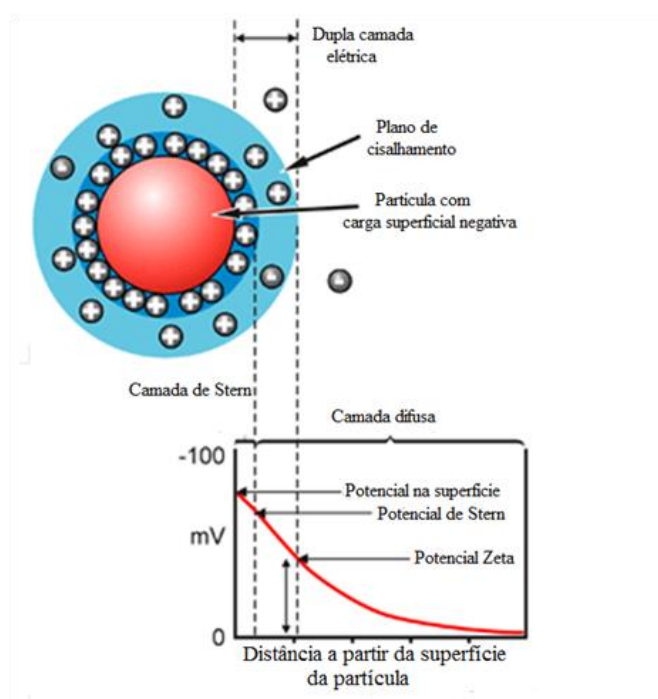
#### **3.1.4.6. Distribuição de cargas superficiais do lipossomo: Estudo da distribuição de cargas na membrana por análises de Potencial Zeta ( $\zeta$ )**

A maioria das partículas em suspensão possui uma carga de superfície, por apresentarem grupos ionizáveis ou por adsorção de espécies carregadas. Quando apresentam grupos ionizáveis, contra-íons criam uma camada ao redor da partícula, chamada camada de Stern. Com o movimento Browniano, essa camada se move como parte da partícula. Na fronteira entre a camada de Stern há uma segunda camada de contra-íons, chamada difusa, existe o plano de cisalhamento (**Figura 17**). E o potencial que existe neste limite, é conhecido como o potencial zeta, uma medida indireta do potencial de superfície da partícula, discutido a seguir (MALVERN, 2012). No caso dos fosfolipídios, o potencial de carga de superfície e o potencial de dipolo, são constituídos pela organização dos resíduos positivos e/ou negativos das moléculas e a orientação dos dipolos com a água (CEVC, 1991; CLARKE, 2001). A organização dos grupos positivos



e/ou negativos de um fosfolípido, está relacionada a sua orientação para cima ou para baixo do plano da membrana, que pode ser influenciada pela interação com substâncias exógenas (DISALVO & BOUCHET, 2014).

O potencial de superfície das partículas é influenciado por substâncias exógenas, e assim pode fornecer informações sobre interações da sua interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula, ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão, bem como da orientação dos grupos funcionais carregados de uma molécula (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).



**Figura 17:** Representação das condições em uma partícula negativa com uma camada de íons positivos adsorvidos na camada adjacente, denominada camada de Stern. No plano de cisalhamento, pode ser medido potencial zeta. Adaptado de MALVERN, 2012.

O potencial zeta consiste no potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento. Depende não somente da superfície da partícula, mas do dispersante. Pode ser afetado pelo pH ou força iônica do meio. Os fosfolípidos (como fosfatidilcolinas), polímeros e proteínas, quando são componentes presentes no sistema lipossomal, são capazes de influenciar o potencial zeta. Os fosfolípidos de origem natural fornecem um potencial negativo à interface (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Em lipossomos multicomponentes, os valores de potencial zeta podem ser mais positivos em função da

presença de um lipídio positivamente carregado, como por exemplo, a estearilamina ou 1,2 dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP, lipídio catiônico) ou ainda um lipídio ou polímero que apresente carga positiva orientada em direção à superfície da membrana (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Os valores de potencial zeta são também um indicativo da estabilidade de um lipossomo. Em módulo um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química do sistema, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (MALVERN, 2012).

As características de superfície das partículas, também podem alterar a resposta biológica do fármaco associado. Sendo assim, pode-se modificar a carga de superfície do lipossomo, para que estes não sejam removidos rapidamente da circulação sanguínea pelo sistema fagocitário. Isto pode ser realizado a partir da redução da hidrofobicidade da superfície das partículas através da adsorção física de um polímero hidrofílico, constituído de PEG, por exemplo (CALVO *et al.*, 2001). Calvo e colaboradores (1987) prepararam nanoemulsões e nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), contendo quitosana (um polissacarídeo catiônico). A presença da quitosana aumentou o potencial de superfície positivo das partículas, proporcionando um aumento da interação destas com as membranas fosfolipídicas celulares, negativamente carregadas. A quitosana também promoveu maior estabilização do sistema, devido à adsorção de cátions e proteínas catiônicas presentes nos fluidos biológicos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A estabilidade da suspensão de partículas, é indicada por um valor de potencial zeta maior do que - 30 mV ou + 30 mV, em módulo (MALVERN, 2012). O índice de polidispersidade obtido em medidas de potencial zeta, reflete a formação de sistemas mono ou polidispersos. Sistemas monodispersos são indicados por índices menores que 0,3 (CALVO *et al.*, 1987).

#### **3.1.4.7. Análise de tamanho do lipossomo por espalhamento de luz dinâmico (DLS)**

O DLS é uma técnica não invasiva que permite medir o tamanho de partículas em sistemas como os lipossomais. A partir destas medidas, pode-se também avaliar possíveis agregações e fusões entre lipossomos, causados por instabilidade das vesículas em função dos constituintes de membranas, incluindo uma substância ativa encapsulada

(KOMATSU *et al.*, 1999; SCHAFFZICK *et al.*, 2003). A técnica de DLS caracteriza partículas, emulsões ou moléculas, dispersas ou dissolvidas num líquido, em função do movimento browniano de partículas que faz com que um laser seja espalhado em diferentes intensidades. O movimento Browniano das partículas é decorrente da sua colisão aleatória com as moléculas do líquido que as rodeiam. Neste meio, a intensidade da luz espalhada pelas partículas, em um ângulo fixo, forma um padrão de movimento que caracteriza o tamanho de uma partícula. As partículas maiores se movem mais lentamente que as pequenas, de forma que a taxa de flutuação da luz espalhada por elas, também é mais lenta.

A homogeneidade ou heterogeneidade da distribuição dos tamanhos, assim como o controle destes, é medida pelo Índice de Poli dispersão (PDI), já que este indica o perfil das nanopartículas (tamanho e distribuição). Desta forma o PDI é utilizado para estudos da estabilidade física das suspensões (MÜLLER-GOYMANN, 2004) e mostra quanto o tamanho da partícula desviou da média. Quanto menor o PDI (< 0,3) mais uniforme é a suspensão, indicando a formação de sistemas monodisperso (ELSAYED *et al.*, 2011).

#### **3.1.4.8. Influência do tamanho lipossomal na eficiência terapêutica**

O tamanho e uniformidade dos lipossomos definem sua interação com organelas do organismo e eficácia em função da sua forma de administração, sendo determinante para o tempo de meia vida de circulação e percentual de encapsulação de uma substância ativa. Por exemplo, o tamanho de lipossomos, negativamente carregados, referente à faixa de 500 a 1000 nm, liberam a substância ativa encapsulada de forma mais eficiente (ALLEN *et al.*, 1991). O tamanho dos lipossomos influencia na eficiência de captura destes pelos macrófagos. Os lipossomos pequenos (menores que 100 nm) são facilmente eliminados do organismo, quando comparados aos maiores (próximo de 100 nm). Isto permite que a vesícula lipossomal, permaneça mais tempo na circulação sanguínea, proporcionando uma liberação mais prolongada (FRÉZARD *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 2007).

Assim sendo, torna-se necessário o controle do tamanho lipossomal e sua uniformidade, esta última para garantir a dosagem apropriada para ser determinado em tratamento medicamentoso. Existem diferentes métodos de preparos de lipossomos que garantem a obtenção de MLVs, LUVs e SUVs de tamanhos uniformes (AKBARDAZEH

*et al.*, 2013), bem como técnicas de avaliação e monitoramento dos mesmos. Uma destas é o espalhamento de luz dinâmico, como descrito anteriormente.

#### **3.1.4.9. Processos de entrega no organismo da substância ativa, mediados por vesículas lipossomais**

Os componentes da membrana lipossomal, permitem que as substâncias hidrofóbicas ou hidrofílicas (**Figura 18**) sejam inseridas neste sistema estruturado para serem transferidas posteriormente no organismo para membranas celulares (MERTINS *et al.*, 2009).

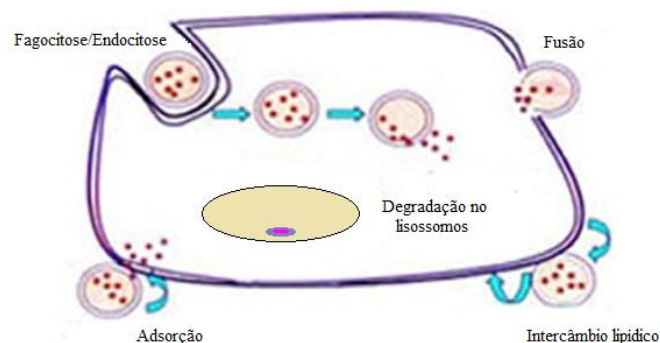


**Figura 18:** Representação esquemática de lipossomos com substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas inseridas em lipossomos

A substância ativa é carregada pelos lipossomos até as células, órgãos ou tecidos alvo, onde pode ocorrer a absorção por fagocitose/endocitose, fusão, troca de lipídio (intercâmbio) ou por adsorção do sistema (LAMPRECHT *et al.*, 1999). A eficiência do transporte e a entrega do fármaco encapsulado é determinada pela especificidade do material com o qual foi desenvolvido o carreador, e a forma como a célula alvo recebe este lipossomo. A interação entre a célula-alvo e os lipossomos, pode ocorrer de quatro modos distintos (LASIC, 1993; NEW, 1990) (**Figura 19**).

- i)* Por **fagocitose/endocitose**, processo pelo qual as células fagocitam os lipossomos em um pH entre 5,0 e 5,5 ocorrendo a incorporação dos mesmos em organelas da membrana plasmática, denominadas de lisossomas e endossomas. Nos lisossomas ocorre a digestão celular, e os endossomas são fundidos com os lisossomas formando um lisossoma secundário que posteriormente é degradado em pH próximo a 4,5. Durante o processo de ruptura dos lipossomos no lisossoma secundário, a substância ativa anteriormente encapsulada permanece no lisossoma até que sofra a exocitose ou se desprenda no conteúdo celular (liberação para

- o citoplasma). A fagocitose e pinocitose formam juntos processos endocíticos, pelos quais a membrana se modifica para incorporar a substância, e processos exocíticos, que expulsam as substâncias da célula
- ii) A **fusão** ocorre devido à aproximação da membrana celular e dos lipossomos. Os lipossomos rompem e fusionam-se na célula alvo, o que resulta em mistura completa dos lipídios das membranas lipossomais e a célula em consequente liberação da substância ativa para o citoplasma.
  - iii) A **transferência dos componentes lipídicos** ocorre por transferência intermembranar. É possível ocorrer esta transferência sem danos a membrana lipossomal e sem a transferência do conteúdo do compartimento aquoso. Durante a troca de lipídios, os lipossomos que contêm substâncias ativas lipofílicas, podem ser transferidos para as lipoproteínas do plasma.
  - iv) A **adsorção** de lipossomos na membrana celular, ocorre quando este apresenta moléculas vetorizadoras em sua superfície, ou quando sua carga é contrária à da célula alvo (que normalmente é negativa). Esta adsorção ocorre como resultado de forças físicas atrativas ou da ligação de moléculas da membrana dos lipossomos a receptores específicos da célula. O contato entre lipossomos e lisossomos, aumenta a permeabilidade da membrana lipossomal, permitindo a liberação dos solutos hidrossolúveis que podem assim ser absorvidos pela célula.



**Figura 19:** Representação esquemática de membrana celular e as interações com as vesículas lipossomais

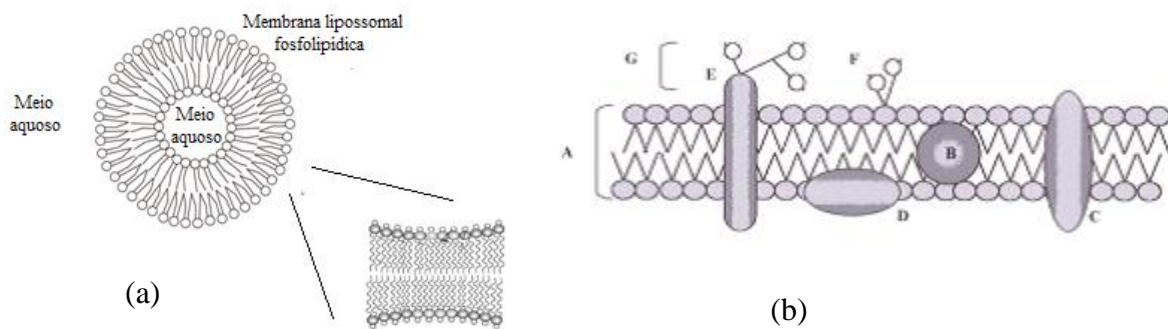
Um dos fatores que contribui para a entrega do fármaco no tecido específico é o pH. A presença de tumores, por exemplo, altera o pH intracelular, tornando-o mais ácido, devido ao aumento da taxa de glicólise aeróbia e ao aumento da hipóxia (baixo teor de oxigênio) nas células vizinhas ao tumor. Tal fato, propicia a protonação dos fármacos que normalmente são bases fracas, com  $7,4 < pK_a < 8,2$  (SANFORD *et al.*, 1993).

Um modelo de Sanford e colaboradores (1993), propõe que lipossomos carregados de agentes quimioterápicos, difundam-se em um gradiente de concentração na célula alvo. Os lipossomos são transportados para fora do citosol. Assim, ocorrem mudanças no pH intracelular alterando a partição transmembranar ou sequestro intracelular de fármacos. Desta forma a membrana lipossomal é protonada no citosol e o fármaco na sua forma iônica se liga a seus alvos, tais como DNA. Se as células tumorais estão comprometidas em sua capacidade de regular o pH, elas podem ser mais suscetíveis do que células saudáveis às abordagens farmacológicas que modificam a regulação do pH. Sendo assim, lipossomos podem potencializar agentes quimioterápicos na entrega de fármacos.

#### **3.1.4.10. Aplicação de lipossomos como modelo de membranas celulares.**

Os lipossomos são um modelo (**Figura 20** (a)) que pode ser aplicado aos estudos de efeitos e fenômenos em membranas celulares, por apresentarem similaridade em sua constituição (MERTINS *et al.*, 2009). As membranas celulares são formadas por uma bicamada lipídica contendo proteínas, sacarídeos e outras organelas (**figura 20** (b)) (CAMPBELL *et al.*, 2009; LEHNINGER *et al.*, 2000). Mais especificamente, pode-se descrever tais componentes como:

- i) **Bicamada lipídica** (ou fosfolipídica) (**Figura 20-b** (A)), formada por fosfolipídios, são moléculas que tem a porção hidrofóbica apolar dirigida para o centro da membrana, e com a porção hidrofílica polar (cabeça com terminal fosfato) direcionada para o exterior ou interior da célula. As moléculas de fosfolipídios que integram a membrana celular (LEHNINGER *et al.*, 2000) podem se mover livremente, mantendo-se em constante reorganização (característica fluida), evitando rupturas na membrana e possuindo alta capacidade de regeneração.



**Figura 20:**(a) representação de membrana lipossomal; (b) modelo mosaico fluido- Semelhança estrutural entre ambas

- ii) **Colesterol (Figura 20-b (B))**, reduz ou aumenta a fluidez da membrana de acordo com a temperatura.
- iii) **Proteína transmembranar** (intrínseca ou integrais) (**Figura 20-b (C)**) são firmemente aderidas aos lipídios da membrana, e formam canais de transporte de substâncias. São também receptores específicos de hormônios.
- iv) **Proteína extrínseca (Figura 20-b (D))** liga-se à membrana por interação com a região polar dos lipídios (por atração eletrostática) ou por interação com as proteínas transmembranares.
- v) **Glicoproteína (Figura 20-b (E))** descrita como uma associação entre carboidratos e proteínas de membrana.
- vi) **Glicolípídios (Figura 20-b (F))** descritos como uma associação entre carboidratos e lipídios.
- vii) **Glicocálice** (ou Glicocálix) (**Figura 20-b (G)**), definido como a união entre glicoproteínas e glicolípídios. É através do glicocálix, que as células se reconhecem e se unem umas às outras, para formar os tecidos.

A natureza do sistema membranal consiste em igualar concentrações (intra e extracelular) dos componentes celulares. Sendo assim, a troca entre a célula e o meio externo pode ocorrer por: transporte passivo, transporte ativo e processos mediados por vesículas. O transporte passivo ocorre sem o gasto de energia. No processo passivo temos a difusão a favor de um gradiente de concentração, difusão facilitada e a osmose. Já o transporte ativo, ocorre com gasto de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP).

### 3.2. Lectinas

Lectinas referem-se as proteínas ou glicoproteínas (**Figura 21**) que reconhecem e se ligam à resíduos de carboidratos com certa especificidade. De acordo com Goldstein (1980) as lectinas são definidas como proteínas que se ligam, de um modo estável, a hidratos de carbono (carboidratos ou glicídios) de origem não imunológica, capazes de aglutinar células ou precipitar complexos de hidratos de carbono. Tais proteínas complexam-se reversivelmente a glicoproteínas expostas na superfície de células (SHARON *et al.*, 1993).



**Figura 21:** Representação esquemática da lectina de *Bauhinia variegata* (BVL)

#### 3.2.1. Lectinas e suas aplicações

As lectinas são encontradas na maioria dos organismos, tais como os de vírus, bactérias, animais e plantas.

Lectinas foram extraídas pela primeira em 1888 por Peter Hermann Stillmark a partir de mamonas (*Ricinus communis* L.) (BOROWSKI *et al.*, 2012). Pertencem à família de proteínas distintas, que apesar de apresentarem sequências e características estruturais semelhantes, variam amplamente em tamanho, estrutura, organização molecular e sítios de interações (CAMPBELL *et al.*, 2009).

A lectina pode ser encontrada em qualquer planta, em quantidades variadas, sendo que está mais concentrada nos órgãos de reservas (VAN, 1988). Tais plantas apresentam o ciclo de vida perene, são encontradas em áreas tropicais, subtropicais e equatoriais (CRUZ, 1985; CARIBE *et al.*, 1991), tendo se adaptado principalmente no Sul e Sudeste do Brasil.



O uso de proteínas extraídas de plantas, tem se mostrado efetivo para aplicações imunológicas como anti-inflamatória, antiviral e antitumoral (LIS *et al.*, 1986; SHARON *et al.*, 1993) bem como para reconhecimento da porção glicídica de moléculas presentes na superfície de células, como principalmente as neurais (ROLLENHAGEM *et al.*, 2001). Em geral, estas superfícies de células são compostas por glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanos, que proporcionam rigidez à matriz, podem formar géis que atuam como um filtro para regular a passagem de moléculas através do meio extracelular, e ainda podem bloquear, ativar ou guiar a migração celular através da matriz (LEHNINGER *et al.*, 2000).

Desta forma, as lectinas são foco de estudos pertinentes devido a sua atuação determinante no reconhecimento de carboidratos em diversos processos biológicos, além de suas propriedades farmacológicas (LIS *et al.*, 1986; SHARON *et al.*, 1993).

### **3.2.2. Origem da BVL: gênero e espécie.**

Lectinas podem ser obtidas através de métodos de extração, bem como por técnicas de DNA recombinante (LIS *et al.*, 1998). As lectinas extraída de plantas como a conhecida popularmente por pata de vaca, pertence ao gênero *Bauhinia*, cujo nome homenageia o botânico Gaspar Bauhin, são extensivamente caracterizadas (IRIMURA *et al.*, 1972; COELHO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001; PINTO *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012.). Pertencem à família das leguminosas (Fabales: subfamília *Caesalpinaceae*) (SHARON *et al.*, 1990), compreendendo cerca de 300 espécies (LEWIS, 1987) das quais aproximadamente 64 podem ser encontradas no Brasil (**Figura 22**).



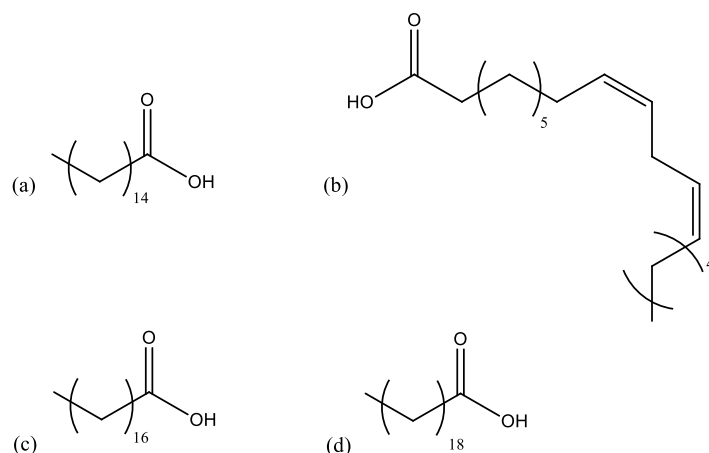
**Figura 22:** Pata de vaca

A lectina extraída do gênero e espécie *Bauhinia variegata* é denominada BVL, está representada na (**Figura 21**). A BVL ainda não tem uma estrutura determinada na literatura, e sim uma previsão de sua provável estrutura, a partir do uso de programas, tais como o Bhageerath-H (método de algoritmos baseados em homologia, nos quais os modelos 3D são calculados usando uma estrutura existente, altamente idêntica, do *Protein Data Bank* (PDB)) (JAYARAM *et al.*, 2012; BANGHAM *et al.*, 1965). Este tipo de método consiste em usar parâmetros comparativos com modelos em 3D de estruturas existentes e já determinadas. A aproximação deste modelo em 3D pode ser calculada quando a identidade da sequência é maior que 50%, embora seja utilizada uma faixa entre 30% e 50%.

### **3.2.3. Principais constituintes da *Bauhinia variegata***

Os principais constituintes lipídicos da *Bauhinia variegata* são o ácido palmítico (19,69%) (**Figura 23** (a)), ácido linoleico (56,98%) (**Figura 23** (b)), ácido esteárico (13,98%) (**Figura 23** (c)) e o ácido eicosanóico (1,08%) (**Figuras 23** (d)) (PINTO *et al.*, 2005). Nesta planta há em torno de 16,41% de lipídeos totais. Quando comparados a outras plantas como a *Bauhinia forficata* (lipídeos, 5,89% e proteína, 19,69%) (BRAGA, 1960), o teor de proteínas e lipídios provindos da *Bauhinia variegata* são superiores

(PINTO *et al.*, 2005). As lectinas de *Bauhinia variegata* (BVL) (Figura 21) são proteínas de cadeia única específicas para D-lactose (1,15 mM), D-galactose (2,3 mM) e D-GalNAc (0,58 mM) de PM de 32 817 Da (PINTO *et al.*, 2008). Quanto aos teores de proteínas que constitui a BVL, estes representam 29,29%.



**Figura 23:** (a) ácido palmítico, (b) ácido linoleico, (c) ácido esteárico e (d) ácido eicosanóico

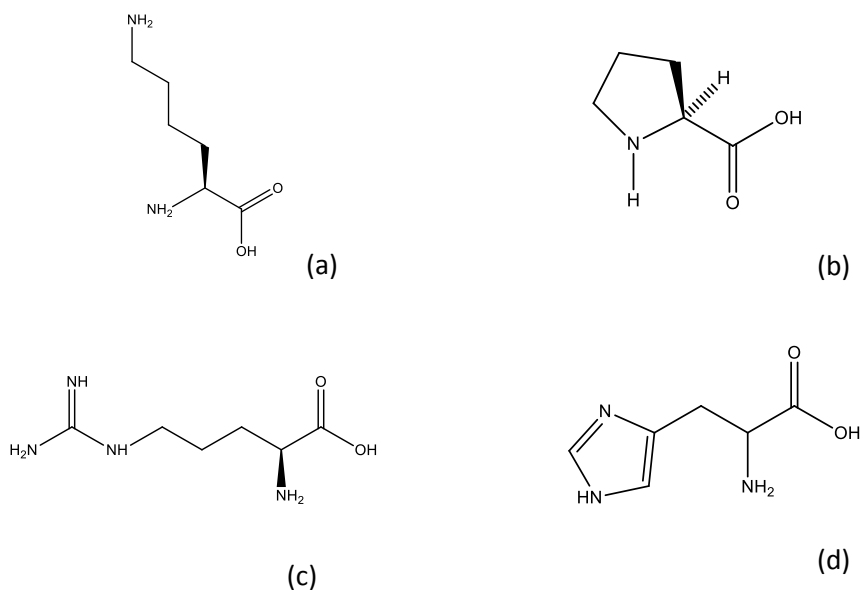
As sementes de *Bauhinia variegata* apresentam ainda em sua constituição uma porcentagem em relação aos seus teores de umidade de 3,71%, carboidratos solúveis totais de 13,38%, açúcares redutores de 4,46 %, amido, um total de 19,08%, e carboidratos insolúveis (fibra bruta) de 9,26% (PINTO *et al.*, 2005).

#### 3.2.4. Ponto isoelétrico e aminoácidos da BVL: determinação da carga total na macromolécula

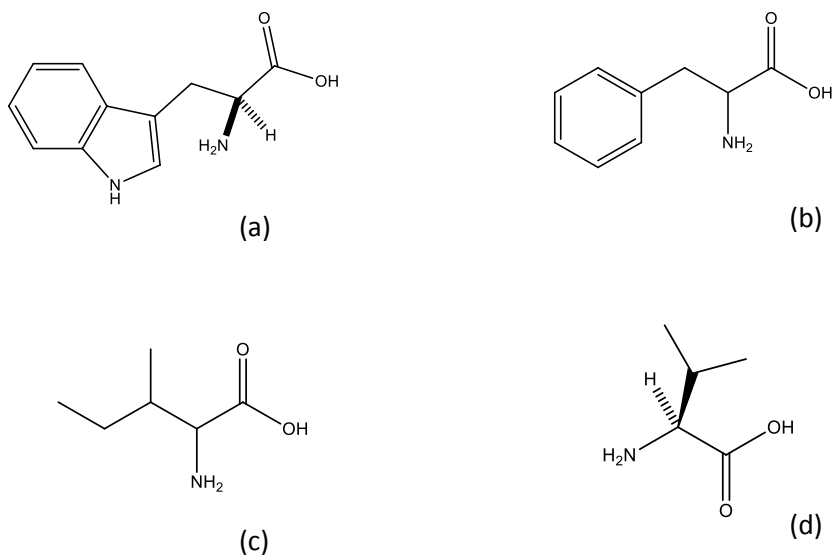
O ponto isoelétrico (PI) é definido como o valor de potencial hidrogeniônico (pH) para o qual a carga total do aminoácido (aa) é nula (CHANG, 2010).

Os aa possuem um grupo amina e um grupo carboxílico, ambos ionizáveis, ou seja, podem sofrer protonação/desprotonação. Entretanto, nas cadeias laterais de vários aa é possível encontrar outros grupos adicionais ionizáveis. A proteína pode, portanto, apresentar carga total positiva, negativa ou neutra, em função dos aa que compõem a macromolécula (CHANG, 2010; CAREY, 2011).

Dentre as variedades de aa que compõem a BVL, tem-se os principais aa catiônicos apresentados na **Figura 24** e na **Figura 25**, estão apresentados os principais aa aniônicos.



**Figura 24:** Fórmula estrutural de aminoácidos catiônicos presentes na BVL, lisina (a), prolina (b), arginina (c) e histidina (d).



**Figura 25:** Fórmula estrutural de aminoácidos aniônicos presentes na BVL, triptofano (a), fenilalanina (b), isoleucina (c) e vanila (d).

A composição química do aa ou da molécula onde o aa está inserido, como no caso da BVL, o pH da solução e a composição química do sistema onde a BVL está inserida, são fatores que irão influenciar a carga do aa que compõem a BVL. A presença de determinados átomos e/ou grupos funcionais numa molécula, altera a distribuição da nuvem eletrônica, tornando algumas ligações covalentes mais fortes e outras mais fracas, além de poder haver interações eletrostáticas entre os aa e os componentes do sistema (FATOUROS & ANTIMISIARIS, 2002). O grupo funcional que compõem o aa vai apresentar um estado de protonação que é influenciado pelo pH do meio, ou seja, se o pH for inferior ao seu pKa, o grupo funcional tende a estar protonado, e se for superior ao pKa, tende a estar desprotonado (CHANG, 2010). Neste contexto, quando a BVL que possui um PI de 6,31, é colocada numa solução, por exemplo com um pH inferior ao seu PI, adquire carga positiva, pois os grupos funcionais tendem a estar protonados. Se o pH for superior ao PI, a carga total é negativa, pois os grupos funcionais tendem a estar predominantemente desprotonados.

### 3.2.5. Similaridade entre as estruturas primárias de lectinas

A similaridade da lectina com outras lectinas da mesma subfamília, permitiu um sequenciamento de múltiplos clones de BVL. Isto foi realizado como o auxílio de programas computacionais, que utilizou uma sequência de aminoácidos de espécies já estabelecidas como parâmetro. Este estudo revelou, que a lectina é provavelmente codificada por uma família de genes. Duas isoformas diferentes de lectinas foram identificadas e denominadas BVL I e BVL II (PINTO *et al.*, 2008). As sequências de nucleotídeos de outras lectinas, como por exemplo as de *Bauhinia purpurea* e *Bauhinia unguolata*, foram utilizadas para os estudos dos fragmentos. Apresentaram identidade com o correspondente fragmento de BVL I em 99% (*Bauhinia purpúrea*) e 90% (*Bauhinia unguolata*). Para BVL II a identidade foi de 94% respectivamente.

O alinhamento das sequências de aa de BVL I e BVL II é apresentado na **Figura 26**, onde a sequência de consenso é apresentada em itálico; os espaços em branco representam as alterações de aa não compatíveis entre as sequências. O sinal de adição (+) indica alterações em aa quimicamente semelhantes. Em negrito está o péptido-sinal (N-terminal, constituído de 20 a 30 resíduos de aa). As caixas cinzentas indicam os locais prováveis de glicosilação. Adaptado de PINTO *et al.*, 2008. A sequência de aa pró-proteína totaliza 291 aa em ambas as isoformas. A BVL I possui cinco (5) locais de

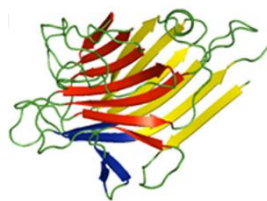
glicosilação putativos, enquanto que a BVL II, possui dois prováveis sítios de glicosilação putativos (PINTO *et al.*, 2008).

Este estudo pôde comprovar a alta similaridade das sequências primárias presente nesta família, e que a estrutura genética foi mantida ao longo dos anos.

BVLI	1	MLLYNSKSYVLQLIFITLLLTQLNKVKSTSSTLTGFTFPNFWNTQEGTEIIFLGATY	60
		MLLYNSK YVLQLI ITLLLTQLNKVKSTSSTLT FTFP+FWSN+QENGT+IIFLG ATY	
BVLII	1	MLLYNSKPYVLQLILITLLLTQLNKVKSTSSTLTSTFTFPDFWNSQEGTKIIFLGGATY	60
BVLI	61	TPGALRLTRIGEDGIPLKSNAGQASYSRPVFLWDSTGHVASFYTSFSPFIVRSIDVPHITA	120
		TPGALRLTRI +DG P+KSNAGQASYS PVFLWDSTGHVASFYTSFSPFIVR+ DVP ITA	
BVLII	61	TPGALRLTRIAKDGPPMKSNAQASYSHPVFLWDSTGHVASFYTSFSPFIVRNCVDPKITA	120
BVLI	121	DGFASFLAPVDSSVKDYGGCLGLFRYKTATDPSKNQVVAVEFDTWPNTEWSDLRYPHIGI	180
		DGFA FLAPVDSSVK +GGCLGLF Y TA DPSKNQVVAVEFDTWPN+WSDL Y HIGI	
BVLII	121	DGFAFFLAPVDSSVKGFGGCLGLFTYGTAAADPSKNQVVAVEFDTWPNQWSDLRYRHIGI	180
BVLI	181	NVSTVSVATTRWDNDDAYGNKIGTAHITYDATSKIITVLLTYDNGRHYQLSHVVDLPKI	240
		+VNS VSVAT RW+NDDAYGNKIGTAHITYDATSKIITVLLTYDNGRHYQLSHVVDLPKI	
BVLII	181	DVNSIVSVATRRWENDDAYGNKIGTAHITYDATSKIITVLLTYDNGRHYQLSHVVDLPKI	240
BVLI	241	LPERVRIGFSGGTGFETQYILSWSFTSTLSTKISALTQKLRSSASYSSM	291
		LP+ VRIGFS TG+NETQYILSWSFTSTL+STKISALTQKLRSSASYSSM	
BVLII	241	LPKWVRIGFSAATGYETQYILSWSFTSTLDSTKISALTQKLRSSASYSSM	291

**Figura 26:** Descreve a semelhanças entre as sequências de aminoácidos; BVL I e BVL II. Adaptado de PINTO *et al.*, 2008.

As estruturas tridimensionais (3D) da BVL-I e BVL-II não foram resolvidas experimentalmente, pois são difíceis de cristalizar, possivelmente devido à presença de diferentes estados de oligomerização, após a purificação. Desta forma, suas estruturas terciárias e quaternárias, foram estudadas com o auxílio de programas computacionais, como o Bhageerath-H (JAYARAM *et al.*, 2012; BANGHAM *et al.*, 1965).



```
FTFPDFWSNSQENGTKIIFLGGATYTPGALRLTRIAKDGFPMKSNAGQ  
ASYSHPVFLWDSTGHVASFYTSFSFIVRNCVDPKITADGFAFFLAPVDS  
SVKGFGGCLGLFTYGTAAADPSKNQVVAVEFDTWPNTQWSDLSYRHI  
GIDVNSIVSVATRREWENDDAYGNKIGTAHITYDATSKIITVLLTYDNG  
RHYQLSHVVDLPKILPKWVRIGFSAATGYNETQYILSWSFTSTLDST
```

**Figura 27:** Sequência de aminoácido da BVL I de *Bauhinia variegata*

A estrutura resultante da BVL I é relacionada quanto à presença das folhas  $\beta$  (**Figura 27**), onde a folha dianteira está destacada em vermelha, a folha traseira em amarela e a folha pequena, chamada de folha-S em azul (GUSTAVO *et al.*, 2013). A posição de aa terminais está indicado pelas setas. Por esta análise detectou-se 1.26% de  $\alpha$ -hélice, e 44.96% de folha estendida.

### 3.2.6. Lectinas e suas interações com carboidratos

Como já mencionado, as lectinas se ligam reversivelmente a monossacarídeos e oligossacarídeos com alta especificidade. As lectinas são desprovidas de atividade catalítica, e em contraste com os anticorpos, não são produtos de uma resposta imune (LIS *et al.*, 1998).

As lectinas se ligam a carboidratos por diversos tipos de ligações, com destaque para a interação com as ligações glicosídicas (combinação da hidroxila de um carbono anomérico de um monossacarídeo com a hidroxila de um álcool ou com a hidroxila de qualquer carbono de outro monossacarídeo, produzindo água). As lectinas se ligam a extremidade redutora presente no monossacarídeo (OH presente no C1), formando a ligação glicosídica com a eliminação de uma molécula de água (QUIOCHO, 1986). Podem se ligar também a sacarídeos não redutores, onde não há hidrólise na formação desta ligação glicosídica (LEHNINGER *et al.*, 2000; LIS *et al.*, 1989). Outras

possibilidades são as interações hidrofóbicas, das quais muitas são criadas pelas hidroxilas estéricas dispostas nas proteínas. O posicionamento das hidroxilas, fazem com que as regiões hidrofóbicas da proteína se encontre com as regiões hidrofóbicas da superfície do sacarídeo (RINI, 1999).

O arranjo tridimensional das interações moleculares entre lectina-glicídio, podem favorecer a ligações entre lectina e a porção sacarídica de um polímero glicosilado em um sistema lipossomal, por exemplo. Estudos relacionados a sítios de ligação entre a lectina e glicídios, conduzem ao aumento de substâncias na afinidade.

### **3.2.7. Lectinas e o reconhecimento de glicídios (carboidratos) em polímeros e superfícies celulares.**

As lectinas podem interagir com a membrana lipídica e com os glicídios presentes no polímero que constitui este sistema lipossomal, assim como também podem reconhecer os carboidratos, que constituem as superfícies celulares. Cada subunidade de lectina possui pelo menos um domínio que permite a interação (modelo chave e fechadura) entre sacarídeos localizados na superfície de células adjacentes (LIS *et al.*, 1986).

A investigação das lectinas e o seu papel no reconhecimento celular, bem como a aplicação dessas proteínas para o estudo de carboidratos em solução e em superfícies celulares, vem contribuindo de forma significativa para o avanço da glicobiologia (DWEK, 1996).

Tais descrições reforçam a hipótese de que lectinas como a BVL, podem reconhecer polímeros glicosilados na superfície das vesículas lipossomais, bem como o reconhecimento de substratos, e assim direcionador a um sítio específico (GABIUS, 1994). O desenvolvimento e a caracterização de uma matriz lipossomos-polímero-lectina, é promissora para sistemas de liberação prolongada de fármacos (DOS SANTOS *et al.*, 2016; MAKHLOF *et al.*, 2011; MEYER *et al.*, 1994). As ligações que são predominantes para a estabilização deste sistema (lipossomos, polímero e BVL), são ligações de hidrogênio e as forças de Van der Waals (WEIS *et al.*, 1996).



### 3.3. Polímeros

#### 3.3.1. Conceitos e Histórico

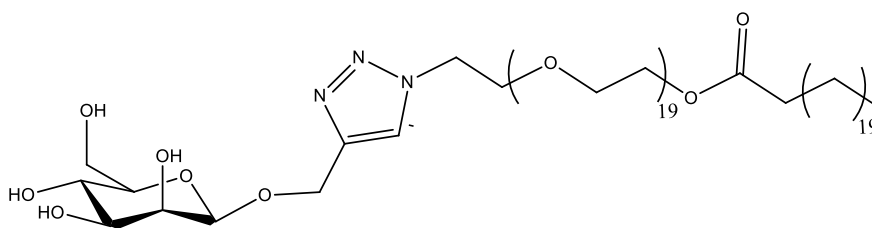
A palavra polímero tem origem grega *polumeres*, que quer dizer “muitas partes”. Os polímeros são macromoléculas, constituídas por repetição de unidades estruturais simples e menores, denominado de monômeros (do grego “mono” – um), dando origem a dímeros, trímeros, tetrâmeros...ou polímeros.

Os monômeros são moléculas de baixa massa molecular que a partir de reações de polimerização, geram uma macromolécula polimérica. O processo de polimerização foi descoberto por Hermann Staudinger, químico alemão pioneiro no estudo da química dos polímeros, e ganhador do Prêmio Nobel da Química em 1953. As unidades repetitivas, chamadas de *mero*, presentes na estrutura do monômero é chamado grau de polimerização (CAREY, 2011).

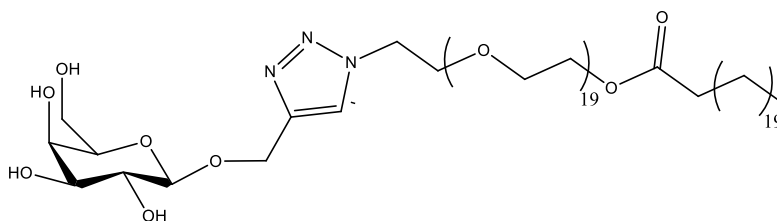
Os polímeros possuem origem natural como por exemplo a celulose (plantas), caseína (proteína do leite), dentre outros, ou origem sintética como o docosanato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub> (DAL-BÓ *et al.*, 2011; DAL-BÓ *et al.*, 2012), um polímero baseado em polietileno glicol (PEG) com uma porção glicídica.

#### 3.3.2. Polímeros docosanato de $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub> inseridos em lipossomos

Com os avanços nos estudos dos carreadores lipídicos, o uso de polímeros neste tipo de matriz é cada vez mais assíduo. O desenvolvimento de novas moléculas poliméricas tornou-se útil e essencial, pois os polímeros permitem estabilidade as vesículas lipossomais e favorecem a sua farmacocinética. Neste contexto, Dal-Bó e colaboradores (2011, 2012, 2015) desenvolveram o polímero docosanato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>. Tal polímero é composto por monossacarídeo, heterociclo 1,2,3-triazól, modificador covalente do tipo polietileno glicol (PEG) e uma cadeia de hidrocarboneto que contam de 22 átomos de carbono. As **Figuras 28 e 29** apresentam as fórmulas estruturais do docosanato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub> baseados em monossacarídeos do tipo manose ou galactose.



**Figura 28:** Fórmula estrutural do docosanoato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>, ou seja, docosanoato de  $\beta$ -D-manose-PEG<sub>900</sub> (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose).

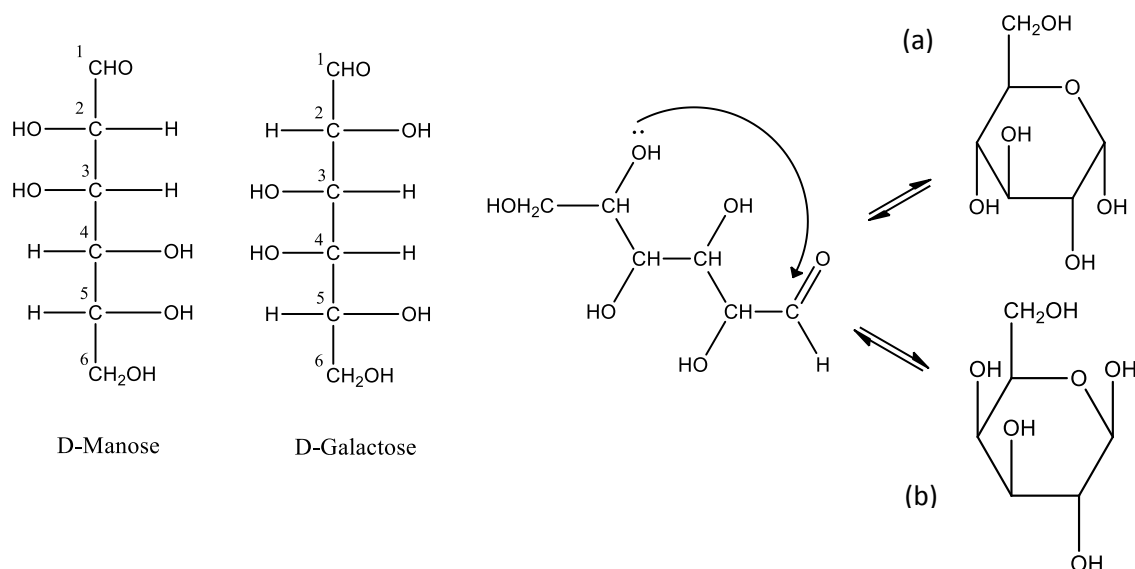


**Figura 29:** Fórmula estrutural do docosanoato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>, ou seja, docosanoato de  $\beta$ -D-Galactose-PEG<sub>900</sub> (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose).

Várias composições são estudadas para ser utilizada no preparo de novos sistemas de liberação prolongada de fármacos, seja por via intramuscular, subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa. Neste contexto, é importante a aplicação de polímeros como o docosanoato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub> em lipossomos que encapsulem a lectina extraída de *Bauhinia variegata*, a BVL como fármaco ou vetorizadoras do sistema (**Figuras 28 e 29**) (DAL-BÓ *et al.*, 2011; DAL-BÓ *et al.*, 2012). Estes polímeros peguilados contém uma porção glicídica, que pode variar entre glicosamina, manose ou galactose, cujo objetivo é ampliar o reconhecimento e a estabilidade entre a BVL e os lipossomos e direcionar a tecidos específicos.

Os monossacarídeos possuem quatro ou mais carbonos que em solução formam estruturas cíclicas (CAMPBELL *et al.*, 2009; LEHNINGER *et al.*, 2000). Sendo assim, os monossacarídeos manose e a galactose formam hemiacetais internos (por reações intramoleculares entre o grupo álcool e o grupo carbonila). O grupo aldeído C1 liga-se ao grupo hidroxil C5 da mesma molécula, formando uma estrutura cíclica, em solução

aquosa (**Esquema 1**). O carbono anomérico pode assumir uma de duas configurações,  $\alpha$  ou  $\beta$  (LEHNINGER *et al.*, 2000).



**Esquema 1:** Representação da ciclização dos glicídios (a)  $\beta$ -D-Manose e (b)  $\beta$ -D-Galactose.

A manose e a galactose são epímeros, desta forma se diferem na rotação de um carbono quiral. Na forma de anel, o epímero é chamado de anômero.

Os PEGs são obtidos por reação de condensação, onde dois monômeros (óxido de etileno) irão condensar para formar um dímero (dois do mesmo monômero unidos) em presença de um iniciador (que pode ser etileno glicol, álcool ou água). A reação é catalisada por ácidos ou bases. Dependendo do catalisador, o mecanismo da polimerização pode ser do tipo catiônico ou aniônico. O mecanismo aniônico é mais preferível porque permite a obtenção de PEG com baixa polidispersividade.

Estes modificadores covalentes que são obtidos pela polimerização de óxido de etileno, são nomeados de acordo com o seu peso molecular, cuja faixa varia entre 200 a 10.000 Daltons (Da). O peso molecular e a temperatura ambiente definem seus estados físicos. Os polímeros de baixo peso (600 Da) possuem geralmente a forma de um líquido transparente. Os que se encontram na faixa de 600 a 800 Da, possuem a consistência de graxa ou cera, e os que possuem peso molecular maior que 800 Da, são sólidos esbranquiçados. O nome polietileno glicol está associado ao peso molecular de até 20.000

Da. Podem assumir diversas formas como discos, cilindros, vesículas, entre outros, determinadas por seu meio de solvatação, concentração e interações moleculares (GIACOMELLI *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2009).

O PEG possui número relativamente reduzido de repetição de unidades de monômero, embora um maior número de unidades repetidas também seja possível, permitindo que o etileno glicol seja usado em diferentes produtos, dentre os quais destacam-se os fármacos. A utilidade deste polímero como material de partida para a produção de fármacos está relacionada ao fato deles degradarem antes de entrarem em ebulição (NAG *et al.*, 2013). Sobrevivem no corpo humano quando este sofre uma variação para temperaturas elevadas, como as que proporcionam estado de febre.

Considerado um dos melhores polímeros biocompatíveis, o PEG é aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Possui um conjunto de propriedades dentre os quais destacam-se a ampla gama de solubilidades em meios orgânicos e aquosos (POWELL, 1980), falta de toxicidade, imunogenicidade e facilidade de excreção de organismos vivos (YAMAOKA *et al.*, 1994).

Como dito anteriormente, o PEG é geralmente utilizado como um modificador covalente de uma variedade de substratos. É também usado como transportador de fármacos a sítios ativos de reconhecimento específicos por receptores (DAL-BO *et al.*, 2011). Lipossomos constituídos por PEGs, são denominados por lipossomos peguilados, furtivos ou estabilizados.

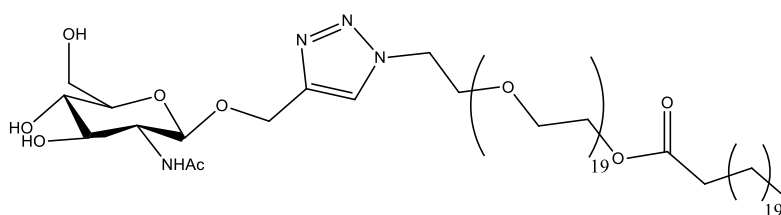
A porção PEG do polímero modifica a superfície destas vesículas lipossomais, definindo a farmacocinética, estabilidade e tempo de meia vida do sistema.

Lipossomos com polímeros peguilados diminuem o atrito ao passar pelos poros de membranas, como as barreiras hematoencefálicas. No organismo, reduz a velocidade de captação dos lipossomos furtivos, estabelecendo uma barreira estérica, que atrasa o seu reconhecimento e depuração da corrente sanguínea pelos macrófagos dos órgãos do sistema fagocítico mononuclear (fígado, baço, medula óssea). Isto diminui, portanto, o nível de opsonização (processo pelo qual os microorganismos ou partículas são recobertos por anticorpos e complementos ou outros fatores, para a atuação das células fagocíticas) dos lipossomos (BATISTA *et al.*, 2007, ULRICH *et al.*, 2002). O PEG associado ao lipossomo, permite maior estabilidade ao sistema e sua circulação prolongada no plasma sanguíneo (AWSTHI *et al.*, 2004).

A meia-vida plasmática dos lipossomos, contendo um polímero peguilado, depende de vários fatores, como o peso molecular que deve ter um valor próximo de 2000 Da e o diâmetro médio de vesículas na faixa de 150 a 200 nm (WOODLE *et al.*, 1992).

Para desenvolver carreadores lipídicos com tal capacidade melhorada de vetorização dirigida ao local, é necessário compreender as propriedades físico-químicas moleculares e os efeitos que podem influenciá-la, tais como ordem, mobilidade, estado de fase, tamanho, potencial de carga entre outros (CHAKRABORTY *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Micheletto e colaboradores (2015) analisaram um sistema nanoestruturado composto por lipossomos de Asolecitina de soja (Aso) e o polímero docosanato de N-acetilglicosamina PEG<sub>900</sub> (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc) (**Figura 30**). O polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc, possui a mesma estrutura do C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, porém diferenciam-se na porção sacarídica. Enquanto que o C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose possui uma porção sacarídica do tipo manose e o C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose do tipo galactose o docosanato de N-acetilglicosaminaPEG<sub>900</sub> possui a porção sacarídica do tipo glicosamina. O C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc mostrou estar inserido no lipossomo através da inclusão da sua região apolar (cadeia hidrofóbica, com 22 átomos de carbonos), de modo que a porção glicosamina ficasse na superfície do lipossomo. As análises concluíram que este novo polímero interagiu com toda a membrana, sendo mais evidentes suas interações na interface, indicando um efeito de desordem induzido pelo polímero.



**Figura 30:** Fórmula estrutural do docosanato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>, ou seja, docosanato de N-acetilglicosaminaPEG<sub>900</sub> (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc).

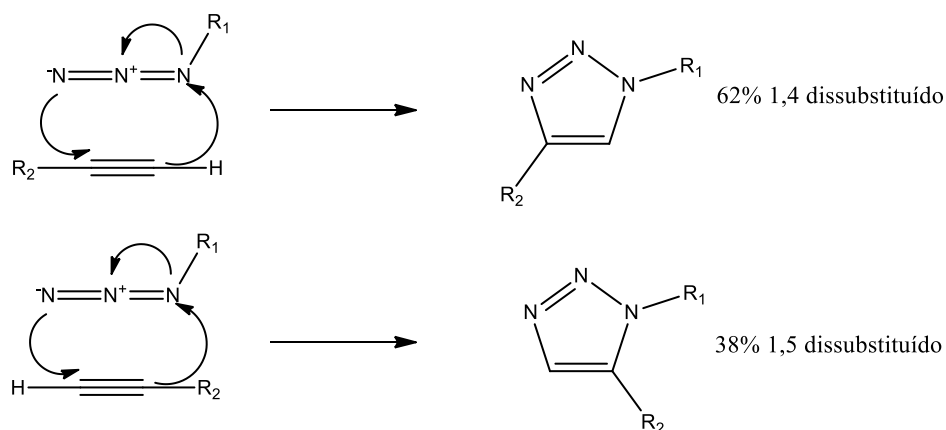
### 3.3.3. Formação do heterociclo 1,2,3-triazol, via reação de ciclo adição 1,3 dipolar ao gerar a molécula de docosanato de $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>.

O 1,2,3-triazol é um heterociclo de origem exclusivamente sintética. Os 1,2,3-triazóis com três átomos de nitrogênio vicinais, apresentam seis elétrons  $\pi$ .

Um dos métodos utilizados para sua obtenção é a reação de cicloadição 1,3-dipolar envolvendo azidas orgânicas e alcinos terminais. O heterocíclico (1,2,3-triazóis), possui um vasto campo de aplicações, com destaque para o desenvolvimento de novos fármacos (SHARPLES *et al.*, 2001), que a partir da reação “*Click Chemistry*” ao formar o 1,2,3 triazol, pode propiciar uma biblioteca de variedades de descobertas de inúmeras moléculas com funções variadas. E é por meio desta, que ocorre a inclusão do glicídio na molécula polimérica (docosanato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>).

Originalmente observada por Michael em 1893, e desenvolvida por Huisgen em 1967, a Reação de *Huisgen* (reação de cicloadição 1,3-dipolar) segue um esquema particular, em que a reação de cicloadição, a partir de 1,3-dipolos com alcenos ou alcinos, envolve quatro elétrons  $\pi$  do 1,3-dipolo (dipolo) e dois elétrons  $\pi$  do alceno ou alcino (dipolarófilo) (HOUK *et al.*, 1995; BROCKSON *et al.*, 2010). Este mecanismo é concertado, mas não necessariamente sincronizado. Há formação de um estado de transição de seis elétrons, formando um ciclo-aducto. Quanto à geometria do estado de transição, o dipolo e o dipolarófilo estão dispostos em planos paralelos, deixando os orbitais perpendiculares em posição favorável à formação das novas ligações sigmas (MELO *et al.*, 2006).

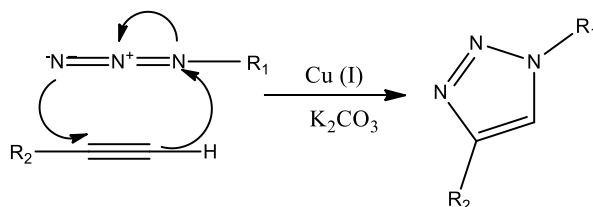
A velocidade da reação depende da concentração dos componentes e a entropia da reação é fortemente negativa. A reação apresenta baixos rendimentos e há formação de uma mistura de regioisômeros triazólicos 1,4 e 1,5-dissubstituídos, quando alcinos assimétricos estão envolvidos (**Esquema 2**), onde R<sub>1</sub> é igual ou diferente de H e R<sub>2</sub> é diferente de H.



**Esquema 2:** Representação esquemática da Reação de *Huisgen* (reação de cicloadição 1,3-dipolar): formação de heterociclo triazólico 1,4 e 1,5-dissubstituídos, respectivamente.

Os problemas desta reação como o baixo rendimento, a formação de subprodutos como por exemplo o triazolotriazóis e a necessidade de longos tempos reacionais e de altas temperaturas, dentre outros fatores, foram contornados por Sharpless (2001). Ao utilizarem Cu (I) ou pela formação deste *in situ*, a reação aumentou a taxa de velocidade na ordem de 7 vezes e obtiveram maiores rendimentos.

O método clássico de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen, após adição de cobre como catalisador, resultou em uma reação rápida comumente chamada de Reação “*Click Chemistry*”. A reação nestas condições leva à formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissubstituído (**Esquema 3**).

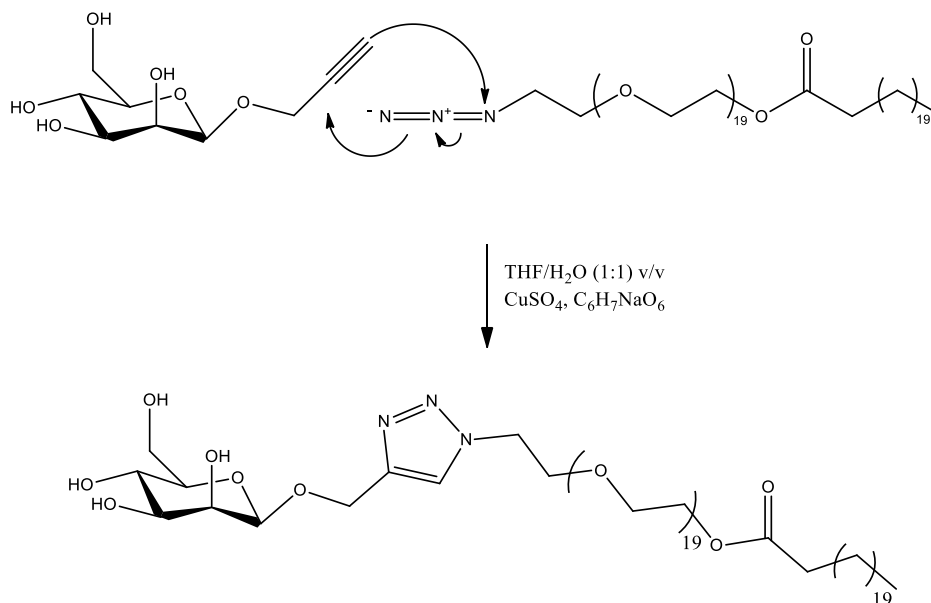


**Esquema 3:** Representação esquemática da Reação “*Click Chemistry*”. Formação de heterociclo triazólico 1,4-dissubstituído.

### 3.3.4. Variação do sacarídeo, via Reação “Click Chemistry”, na molécula de docosanato de $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>

A variação da porção sacarídica no polímero docosanato de  $\beta$ -D-glicosil-PEG<sub>900</sub>, foi obtida tendo por base a reação de cicloadição 1,3-dipolar; Reação “Click Chemistry”.

Segundo Sharpless (2001), a reação Click é uma reação rápida, termodinamicamente favorável e estereoespecífica. Esta reação tende a gerar altos rendimentos e co-produtos inofensivos. A reação 1,3-dipolar entre um alcino terminal e uma azida orgânica é em geral catalisada por cobre, com formação regioespecífica de 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos (SHARPLESS *et al.*, 2001). Levando em consideração o Esquema 3, R<sub>1</sub> é composta pelo polietileno glicol e a cadeia hidrofóbica, enquanto que R<sub>2</sub> é composta pela cadeia sacarídica que consta do alcino terminal, resultando no Esquema 4.



**Esquema 4:** Representação esquemática da Reação “Click Chemistry”, para a introdução da porção sacarídica na cadeia polimérica.



## 4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 4.1. Reagentes e solventes utilizados

A asolecitina de soja (Aso) e a água deuterada (D<sub>2</sub>O) foram obtidas da empresa Sigma-Aldrich Ltda (Brasil). O clorofórmio foi obtido da SYNTH (São Paulo, Brasil). Todos os reagentes usados no trabalho apresentam alto grau de pureza (PA).

A lectina *Bauhinia variegata*, BVL foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Luciano Pinto, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Os polímeros docosanato de  $\beta$ -D-Galactose-PEG<sub>900</sub> e o docosanato de  $\beta$ -D-Manose-PEG<sub>900</sub>, foram cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Alexandre Dal-Bó, da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

### 4.2. Método de preparação de lipossomos por evaporação por fase reversa.

Os lipossomos contendo Aso possuíam concentração de 5 mg/mL; em lipossomos contendo docosanato de  $\beta$ -D-manose-PEG<sub>900</sub> (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose) e lipossomos de docosanato de  $\beta$ -D-galactose-PEG<sub>900</sub> (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose), possuem concentração de 7,5 mg/mL (5 mg/mL de Aso e 2,5 mg/mL de polímero), enquanto que na presença de BVL, apresentaram concentração total 10 mg/mL, sendo a razão entre os componentes 2:1:1 (m/m, ou seja, 5 mg/mL de Aso, 2,5 mg/mL de polímero e 2,5 mg/mL de BVL).

Para a preparação dos lipossomos, primeiramente foi obtido o lipossomo de Aso (controle). A Aso foi solubilizada em 1 mL de CHCl<sub>3</sub> (clorofórmio) e 20  $\mu$ L de água destilada, dentro de um balão de fundo redondo (volume de 25 mL). O balão foi levado ao banho de ultrassom por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o sistema foi submetido à rotaevaporação e temperatura do banho não superior a 30 ° C, sob vácuo de aproximadamente 450 mmHg, para evaporação do solvente. O filme lipídico formado foi então ressuspendido em 1 mL de água destilada.

Para a obtenção dos sistemas lipossomais poliméricos (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose), cada polímero foi adicionado na etapa de solubilização do lipídio em clorofórmio. E as etapas seguiram conforme descrito anteriormente, obtendo-se os dois sistemas lipossomais poliméricos (**Esquema 5**).

Para a obtenção dos sistemas lipossomais poliméricos (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose) incorporados de BVL, cada polímero foi adicionado na etapa de

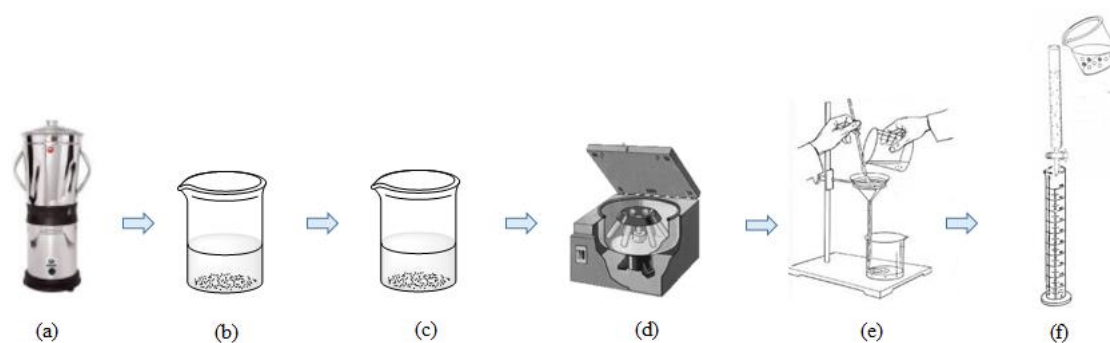
solubilização do lipídio em clorofórmio, enquanto que a BVL foi previamente solubilizada em 1 mL de água destilada, e este incorporada durante a etapa de hidratação do filme lipídico (**Esquema 5**). As etapas seguiram conforme descrito para a obtenção dos lipossomos de Aso, obtendo-se os dois sistemas lipossomais poliméricos incorporados da BVL.



**Esquema 5:** Representação esquemática do método de preparação de lipossomos por Evaporação por Fase Reversa. (a) Solubilização do lipídio, (b) formação do filme lipídico e (c) suspensão lipossomal.

#### 4.3. Extração e purificação da BVL

As sementes de *Bauhinia variegata* foram descascadas, trituradas e peneiradas. Em seguida foi adicionado a estas hexano, para retirar por afinidade de polaridade os componentes hidrofóbicos, como por exemplo gorduras. O solvente foi rotaevaporado, e foram então adicionados 0,1 M de Tris-HCl a pH 7,4 (em baixa temperatura, para evitar a degradação da proteína) e 0,15M de cloreto de sódio (NaCl) (para evitar o rompimento das hemácias). A solução com a BVL foi levada para a câmara fria, de forma a ocorrer a precipitação máxima das proteínas e em seguida foi centrifugada e filtrada. Para a purificação da BVL, utilizou-se uma coluna de agarose- lactose, onde a BVL foi eluída com 100 mM de lactose em tampão, até que o efluente da coluna ficasse com absorvância inferior a 0,05. A eluição foi monitorada a 280 nm. As frações foram reunidas, passaram extensivamente por diálise em água destilada e foram liofilizadas (PINTO *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2008). Um esquema desta extração está demonstrado no **Esquema 6**.



**Esquema 6:** Representação esquemática de método de extração e purificação da BVL. (a) trituração das sementes de BVL; (b) 1<sup>o</sup>- adição de hexano e evaporação deste por rotaevaporador, (c) 2<sup>o</sup>- adição de tampão Tris-HCl (pH 7,6) e NaCl 0,15 M e Câmara fria; (d) Centrifugação, 30 min; (e) filtração; (f) Coluna de agarose-lactose, BVL eluidas com tampão- Proteínas dializadas e armazenadas (30°C).

#### 4.4. Síntese dos polímeros

Os polímeros C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose foram sintetizados sob supervisão do Prof. Dr. Alexandre Dal-Bó, na Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). **Pode-se dividir a síntese do polímero** docosanato de β-D-glicosil-PEG<sub>900</sub> em quatro partes: **(i)** obtenção do PEG<sub>900</sub>N<sub>3</sub>; **(ii)** obtenção do docosanato de PEG<sub>900</sub>N<sub>3</sub> e **(iii)** funcionalização do sacarídeo com uma cadeia lateral, que possui um alcino terminal e **(iv)** inclusão do sacarídeo no polímero (glicosilação) (Dal-Bó *et al*, 2011, 2012).

##### 4.4.1. Método experimental de obtenção do monoazida de polietileno glicol (PEG<sub>900</sub>N<sub>3</sub>)

Para obtenção do monoazida de polietileno glicol (PEG<sub>900</sub>N<sub>3</sub>), o Tosilato de PEG (PEGTs) (7,6 g) sob refluxo, em banho de óleo, foi solubilizado em tetrahidrofurano (THF) (40 mL). Quando foi alcançada a temperatura de 55°C, foi adicionada a azida sódica (NaN<sub>3</sub>) (2,12g). Após 24 horas de refluxo, a reação foi filtrada e foram efetuadas sucessivas lavagens em diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). O CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi rotaevaporado (a 50°C). Os cristais formaram precipitados ao serem adicionados CHCl<sub>3</sub> e acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) (20:10, v/v).

#### **4.4.2. Método experimental de obtenção do docosanoato de monoazida de polietileno glicol (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>N<sub>3</sub>)**

O PEG<sub>900</sub>N<sub>3</sub> obtido a partir do procedimento descrito anteriormente, foi solubilizado em 40 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. O solvente foi rotaevaporado e a massa obtida pesada (3,44g).

À PEG<sub>900</sub>N<sub>3</sub> (3,44g) adicionou-se CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40mL), 4-dimetilaminopiridina (DMPA) (0,08g) e o ácido docosanoico (C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>) (2,4g). O sistema foi mantido por agitação constante durante 24 horas.

Em seguida, sucessivas lavagens com diclorometano foram realizadas. O solvente foi rotaevaporado a 45°C. À massa obtida desta reação, foram adicionados CHCl<sub>3</sub> e C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O (20:10, v/v) para a precipitação do produto. Este produto, C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>N<sub>3</sub>, foi purificado em coluna de cromatografia flash (fase móvel, metanol (CH<sub>3</sub>OH) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:9, v/v).

#### **4.4.3. Funcionalização do glicídio para inserção no polímero**

Os glicídios manose e galactose foram primeiramente acetilados, para proteger as hidroxilas que são suscetíveis a reações que possam a vir ocorrer no meio. Para a acetilação, os glicídios foram adicionados em seu respectivo balão (cada um, pesados em 5g), cada um contendo acetato de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) (4g) e o anidrido acético (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) (25 mL), mantidos sob aquecimento de 70°C, por 24 horas.

A extração foi realizada em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, água destilada e bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (pH ≈ 7). Foi adicionado em seguida sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, como agente dessecante), seguido de filtração. Esta reação proporcionou 11,64 g de glicídios acetilados. A esta massa, foram adicionados álcool propargílico (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O) (1,6 mL) e trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>) (5,13 mL), e a solução ficou sob agitação por uma hora. Em seguida foram adicionados carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (10,5g) e NaHCO<sub>3</sub> para neutralização, em seguida a solução foi filtrada e concentrada (16,18g). A desacetilação na estrutura glicídica resultante, foi efetuada ao adicionar CH<sub>3</sub>OH (100mL) e metóxido de sódio 1M (MeONa,) (1 mL). Depois de 24 horas a solução esteve em contato por 10 minutos com uma resina ativada (com 2,3 g de sódio metálico em metanol), em seguida

foi filtrada e concentrada (14,17g), seguida de purificação em coluna de cromatografia flash (fase móvel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / CH<sub>3</sub>OH, 8:2 v/v) e rotaevaporada.

#### **4.4.4. Inclusão do glicídio no polímero**

Em um balão de fundo redondo contendo os solventes THF (25 mL) e água destilada (25 mL), foi adicionado o produto obtido a partir do procedimento anterior (glicídio funcionalizado) (0,05 g) e a solução foi agitada até solubilização completa dos reagentes. Após, foi adicionado o ascorbato de sódio (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>) (0,03g) para prevenir a formação de subprodutos e adição de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) (0,02g) com a geração de Cu (I) *in situ*. Estes foram agitados até completa solubilização e levados posteriormente ao refluxo por 48 horas, a 40 °C. A purificação do polímero glicosilado foi realizada por cromatografia flash (fase móvel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / CH<sub>3</sub>OH, 8:2 v/v), seguido de rotaevaporação.

#### **4.5. Medidas de FTIR- HATR**

Os espectros de FTIR dos sistemas lipossomais (Aso, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL) foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu-IR Prestige-21 (disponível na FURG), com cristal de Reflexão Total Atenuada Horizontal (HATR). As análises foram realizadas depositando-se 1 mL da amostra em cristal de Seleneto de Zinco. Os interferogramas foram obtidos através de 45 varreduras com resolução de 2 cm<sup>-1</sup>. As leituras foram realizadas na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> (CHEN *et al.*, 2000). Pelos espectros de FTIR analisou-se a variação das frequências e largura (a 75% da altura do pico) das bandas referentes aos estiramentos axiais dos principais grupos lipídicos, causadas pela presença dos polímeros glicosilados (manose ou galactose) na ausência e presença de lectina (CHEN *et al.*, 2000; MORENO *et al.*, 2009).

#### **4.6. Medidas de DSC**

Os ensaios de DSC para os sistemas lipossomais foram realizados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As transições de fase foram analisadas através de um equipamento DSC-50 Shimadzu, com uma taxa de aquecimento de 2,5 °C / min. A faixa

de temperatura usada foi de  $-50^{\circ}$  a  $60^{\circ}$  C. O Índio foi usado para calibração do aparelho e o nitrogênio ( $N_2$ ) como gás de purga, a um fluxo de  $50/50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Assim, como nos ensaios de FTIR foram realizadas medidas em lipossomos de Aso (controle), de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (associação de lipídio com polímero glicosilado), bem como de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL (associação de lipídio, polímero e BVL).

#### **4.7. Medidas de turbidez**

As medidas de turbidez dos lipossomos em estudo (Aso, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL) foram obtidas por espectrofotometria de UV-Vis., em aparelho Shimadzu UV-2550 (disponível na FURG). Os valores de absorbância das amostras foram medidos em comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 400nm (SKOOG *et al.*, 1998). Foram utilizadas células de quartzo, com caminho óptico de 1 cm.

#### **4.8. Medidas de DLS e potencial zeta ( $\zeta$ )**

As medidas do diâmetro e de potencial zeta ( $\zeta$ ) dos sistemas lipossomais foram realizadas na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob supervisão do Prof. Dr. Alexandre Luis Parize. Foi utilizado um equipamento Zetasizer-Malvern UK- Nano ZS a  $25^{\circ}$  C, com dispersante água miliQ, caminho óptico de 1 cm e ângulo fixo de  $173^{\circ}$  C. Um volume de 25  $\mu\text{L}$  de cada suspensão (amostra) foi adicionado em 1 mL de água miliQ. Após homogeneização foram realizadas as respectivas análises.

#### **4.9. Medidas de RMN $^1\text{H}$ e $^{31}\text{P}$**

Os lipossomos foram analisados por RMN com referência interna  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  (80:20, v/v), em equipamento Bruker 400 MHz (disponível na FURG). As medidas de  $T_1$  de  $^1\text{H}$  do grupo colina lipídico ( $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ,  $\delta=3,2$  ppm) foram obtidas a 400 MHz através da sequência de pulsos de recuperação da inversão (DE LIMA *et al.*, 2007).

As medidas de anisotropia de deslocamento químico de  $^{31}\text{P}$  foram realizadas a 161 MHz em temperatura de  $25^{\circ}$  C.

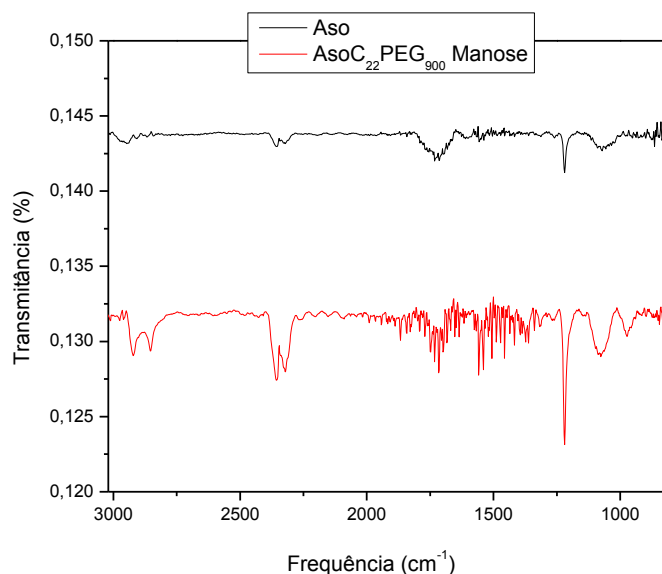
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises foram realizadas inicialmente de forma a caracterizar os efeitos dos polímeros glicosilados ( $C_{22}PEG_{900}Manose$  e  $C_{22}PEG_{900}Galactose$ ) no lipossomo de Aso. Assim, comparou-se os valores obtidos por diversas técnicas instrumentais (descritas a seguir), para lipossomos de Aso e de  $AsoC_{22}PEG_{900}Manose$  e  $C_{22}PEG_{900}Galactose$ . Posteriormente, foi caracterizado o efeito da BVL nos lipossomos de  $AsoC_{22}PEG_{900}Manose$  e  $C_{22}PEG_{900}Galactose$ , ou seja, lipossomos de  $AsoC_{22}PEG_{900}ManoseBVL$  e  $C_{22}PEG_{900}GalactoseBVL$ , pelas mesmas técnicas instrumentais supracitadas.

### 5.1. Medidas de HATR-FTIR

Para obter informações sobre a localização de  $C_{22}PEG_{900}Manose$ ,  $C_{22}PEG_{900}Galactose$  e BVL em membranas de Asolecitina de soja (Aso), assim como as alterações induzidas por esses, tais como na ordem e grau de hidratação do lipídio, foram realizados ensaios de HATR-FTIR.

Os espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de Aso,  $AsoC_{22}PEG_{900}Manose$  constam na **Figura 31**. Com base nestes espectros, foram calculadas as variações das frequências e larguras dos principais picos referentes aos estiramentos axiais ( $\nu$ ) dos grupos lipídicos que o polímero interagiu: colina,  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$  (estiramento assimétrico); éster,  $\nu C-O$  e carbonila,  $\nu C=O$ . As atribuições referentes a estes grupos, bem como os valores das variações citadas anteriormente, estão citadas na **Tabela 1** e **2** respectivamente.



**Figura 31:** Espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose

**Tabela 1:** Variação da frequência de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose), em cm<sup>-1</sup>

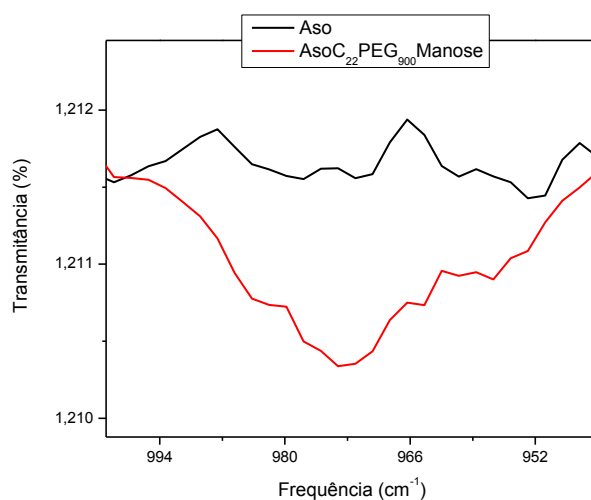
<i>Grupo funcional</i>	<i>Aso (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Δ (cm<sup>-1</sup>)</i>
v C-O	1070,49	1076,28	5,79
v <sub>as</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	977,91	974,05	3,86

**Tabela 2:** Variação de largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose), em cm<sup>-1</sup>.

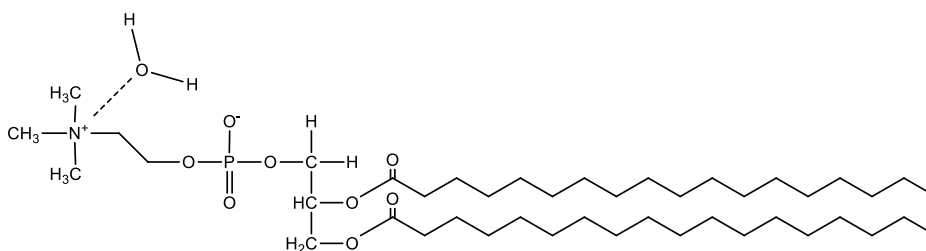
<i>Grupo funcional</i>	<i>Aso (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Δ (cm<sup>-1</sup>)</i>
v C=O	12,5	4,16	8,34
v C-O	41,66	45,83	4,17



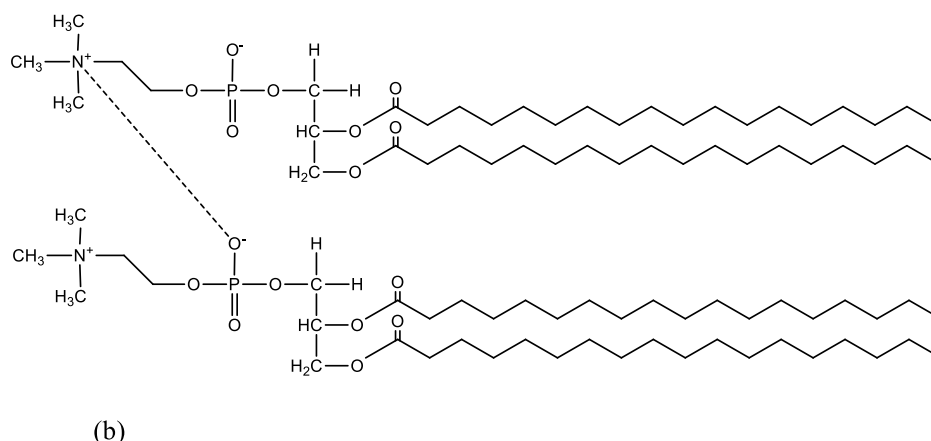
A variação da frequência ocorrida no  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$ , (**Figura 32**) referente à colina localizada na região polar do lipossomo, demonstrou que o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose promove mudanças conformacionais no grupo em relação à moléculas de água ou ainda altera interações do tipo dipolo-dipolo que ocorrem entre este grupo e o grupo fosfato (PO<sub>2</sub><sup>-</sup>) do lipídio mais próximo (**Esquema 7** (a) e (b), respectivamente) (MORENO *et al.*, 2009; POPOVA *et al.*, 2011).



**Figura 32:** Ampliação da região de absorção de número de onda do  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$  do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose



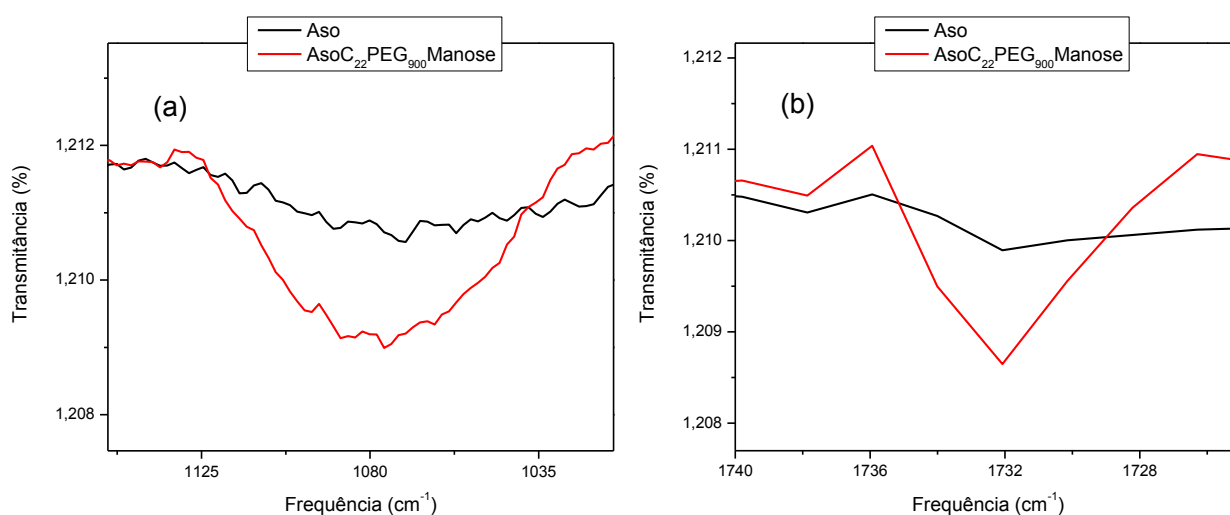
(a)



**Esquema 7:** Representação esquemática de (a) interação com molécula de água ou (b) com o grupo fosfato do lipídio próximo.

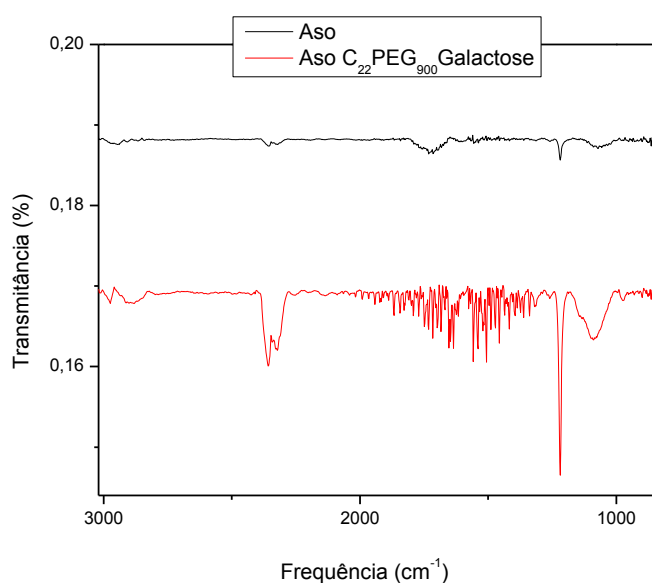
Em relação ao efeito do polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose na interface lipídica, monitorada nas análises do pico referente ao  $\nu$  C-O (**Figura 33**, (a)), observou-se o deslocamento do pico para maiores valores de frequência, assim como um aumento da largura de sua banda inicial (esta última, referente à uma variação de 4,17 cm<sup>-1</sup>). Isto indicou que o polímero influenciou fortemente a região de interface lipídica.

A análise de  $\nu$  C=O lipídico demonstrou um maior efeito do polímero nesta região, visto que reduziu a largura do pico em 8,34 cm<sup>-1</sup> (**Figura 33**, (b)), restringindo sua mobilidade.



**Figura 33:** Ampliação da região de absorção de número de onda em (a) do  $\nu$  C-O e (b) do  $\nu$  C=O do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose

Considerando o efeito do polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose nos lipossomos de Aso, estes constam nos espectros de FTIR apresentados na **Figura 34**. Assim como para AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, o C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose afetou os mesmos grupos de Aso: colina,  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$  (estiramento assimétrico); éster,  $\nu C-O$  e carbonila,  $\nu C=O$ . As atribuições referentes a estes grupos, bem como os valores das variações em frequência e largura das bandas de FTIR após inserção do polímero, estão descritas na **Tabela 3** e **4**, respectivamente.



**Figura 34:** Espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose.

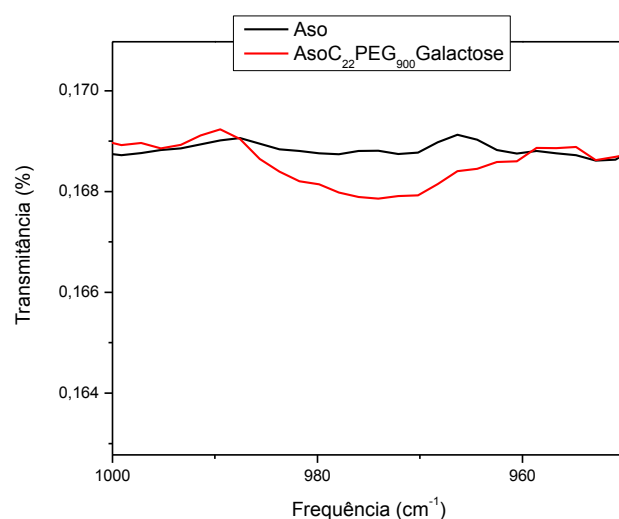
**Tabela 3:** Variação de frequência de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose), em cm<sup>-1</sup>

<i>Grupo funcional</i>	<i>Aso (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Δ frequência (cm<sup>-1</sup>)</i>
$\nu C-O$	1070,49	1087,85	17,36
$\nu_{as} N^+(CH_3)_3$	977,91	974,05	3,86

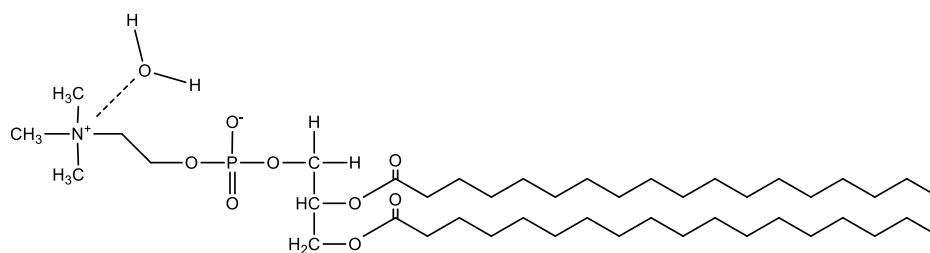
**Tabela 4:** Variação de largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose), em cm<sup>-1</sup>.

<i>Grupo funcional</i>	<i>Aso (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Δ lg. bandas (cm<sup>-1</sup>)</i>
v C=O	12,5	4,16	8,34
v C-O	41,66	58,33	16,67

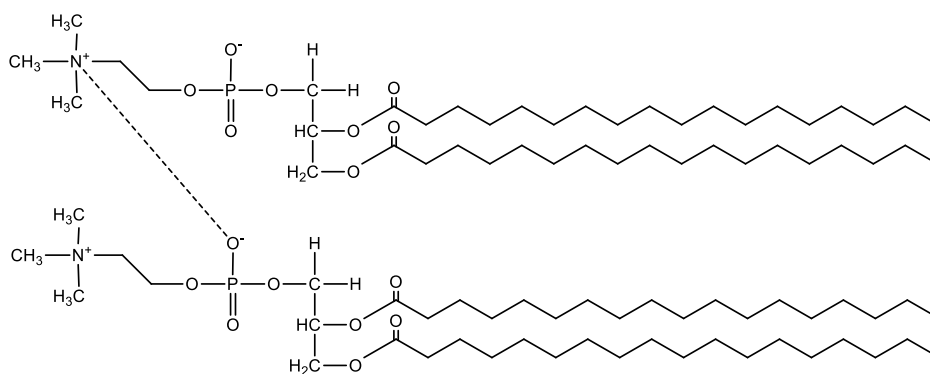
O polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose afetou o grupo colina da membrana lipídica (**Figura 35**), de forma semelhante ao C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, indicando o mesmo tipo de interação com a água ou com o grupo fosfato do lipídio vizinho (**Esquema 8** (a) e (b), respectivamente) (MORENO *et al.*, 2009; POPOVA *et al.*, 2011). Esta comunicação pode atuar no dipolo elétrico do grupo da cabeça do lipídio, desta forma a cabeça do lipídio pode inclinar-se devido à atração que o fosfato exerce sobre o grupo colina. A técnica de Potencial Zeta ( $\zeta$ ), que fornece informações sobre a carga superficial da membrana, pode esclarecer sobre o quanto estas interações influenciaram na carga superficial da membrana lipossomal. As técnicas usadas para avaliar o comportamento da região polar da membrana lipossomal (colina e fosfato), como potencial zeta e RMN <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P serão discutidas a seguir.



**Figura 35:** Ampliação da região de absorção de número de onda do  $\nu_{as}$  N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose



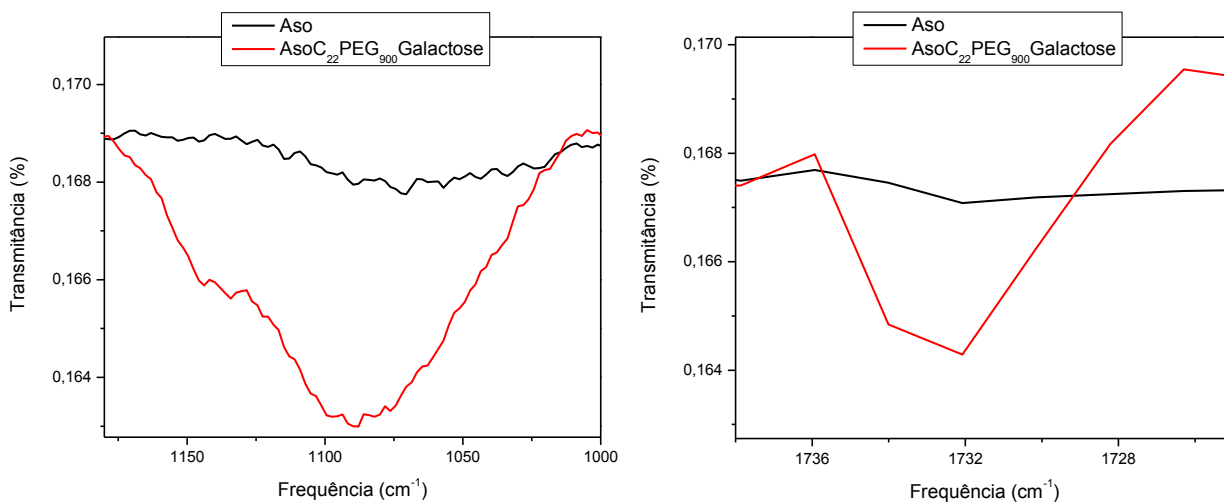
(a)



(b)

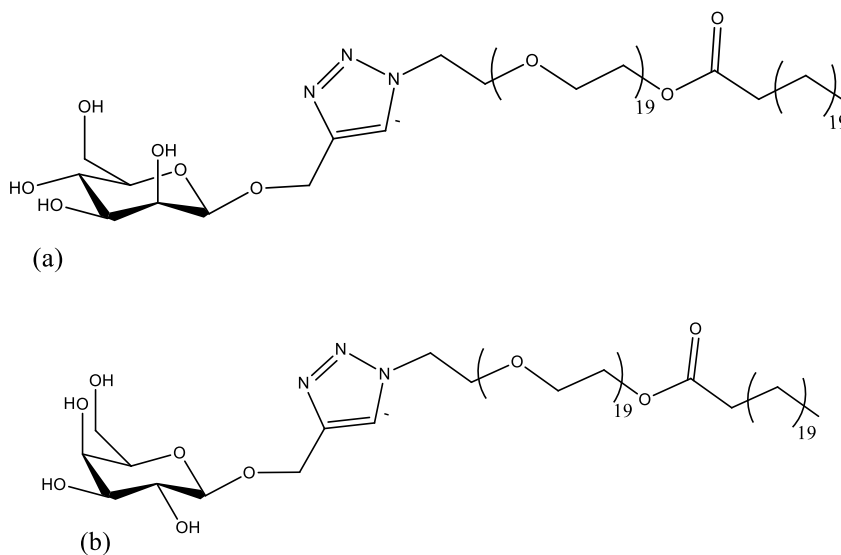
**Esquema 8:** Representação esquemática de interação com molécula de água ou com o grupo fosfato do lipídio próximo.

O polímero influenciou significativamente a região de interface ( $\nu$  C-O) (**Figura 36 (a)**), deslocando a faixa de frequência de absorção da banda desta vibração em  $17,36 \text{ cm}^{-1}$ . Em comparação à interação do  $\text{C}_{22}\text{PEG}_{900}\text{Manose}$  nesta região do lipossomo, a interação do  $\text{C}_{22}\text{PEG}_{900}\text{Galactose}$  é quatro (4) vezes maior na interface da membrana lipídica. Entretanto, a mesma extensão de ordenamento do grupo carbonila lipídico, detectada nos estudos com  $\text{C}_{22}\text{PEG}_{900}\text{Manose}$  (variação da largura de pico de  $\nu$  C=O em  $8,34 \text{ cm}^{-1}$ ), foi observada no grupo da carbonila após interação lipídica do  $\text{C}_{22}\text{PEG}_{900}\text{Galactose}$  (**Figura 36 (b)**).



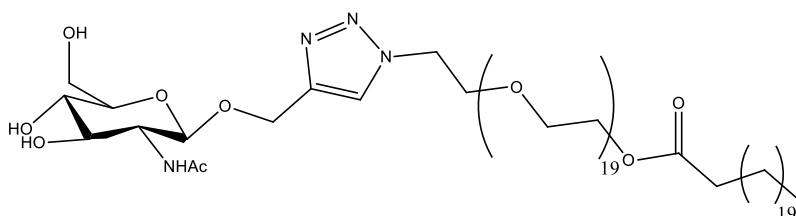
**Figura 36:** Ampliação da região de absorção de número de onda em (a) do  $\nu$  C-O e (b) do  $\nu$  C=O do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose

Sendo assim a diferença observada pode ser em função, ou devido a diferença de posição do grupamento OH no carbono C4 e C2 (**Figura 37**).



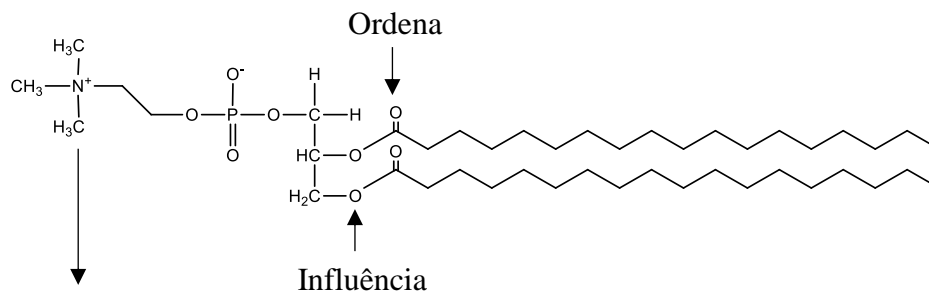
**Figura 37:** Fórmula estrutural do (a) C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e (b) C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose

Estudos realizados por Micheletto e colaboradores (2015) analisaram um sistema nanoestruturado composto por lipossomos de Aso e o polímero docosanato de N-acetilglicosaminaPEG<sub>900</sub> (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc) (**Figura 38**). O polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc diferencia-se dos polímeros analisados neste trabalho, na porção sacarídica.



**Figura 38:** Fórmula estrutural do docosanato de N-acetilglicosaminaPEG<sub>900</sub> (C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc)

O C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc interagiu fortemente com a interface, mas também, com as outras regiões (polar e hidrofóbica) da membrana. Este polímero, em lipossomos de Aso, aumentou o grau de hidratação de  $\nu$  C=O, demonstrando-se sensível às condições de hidratação, ao contrário de C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose. Isto pode ser influência do grupo amino na formação de ligações hidrogênio com o grupo lipídico carbonila. Na ausência deste grupo, as interações dos polímeros em estudo nesta dissertação, demonstraram as mesmas interações dipolo-dipolo que possivelmente ocorrem entre os grupos hidroxila dos sacarídeos e a região colina (MICHELETTO *et al.*, 2015) (da mesma forma para ambos os polímeros). Na região próxima ao glicerol, entretanto, a orientação do grupo hidroxila da galactose parece afetar mais esta porção do que a orientação da hidroxila da manose, e assim o C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose provoca uma maior variação em  $\nu$  C-O, entretanto os resultados de ambos os polímeros em seus respectivos sistemas lipossomais influenciam nas mesmas regiões (**Figura 39**).

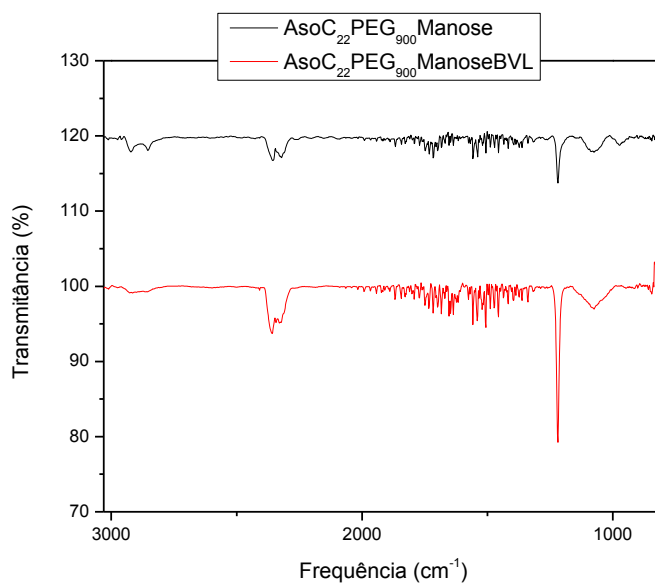


Interações com moléculas de água ou interações com o fosfato do lipídio mais próximo, ou ainda, entre as hidroxilas dos sacarídeos presente no polímero.

**Figura 39:** Resumo das interações moleculares do C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub> Manose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose.

Os resultados a seguir descrevem os efeitos da BVL na membrana de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, monitorados por HATR-FTIR.

Os espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose na presença da BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL) constam na **Figura 40**. Os estiramentos axiais dos grupos lipídicos presentes no sistema lipossomal influenciados pela BVL foram:  $\nu_{as} PO_2^-$ ,  $\nu C-O$  e  $\nu C=O$ . As atribuições referentes a estes grupos, bem como os valores das variações citadas anteriormente, estão na **Tabela 5 e 6**, respectivamente.



**Figura 40:** Espectro de HATR-FTIR de lipossomos Aso, na presença do polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e incorporado a BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL)



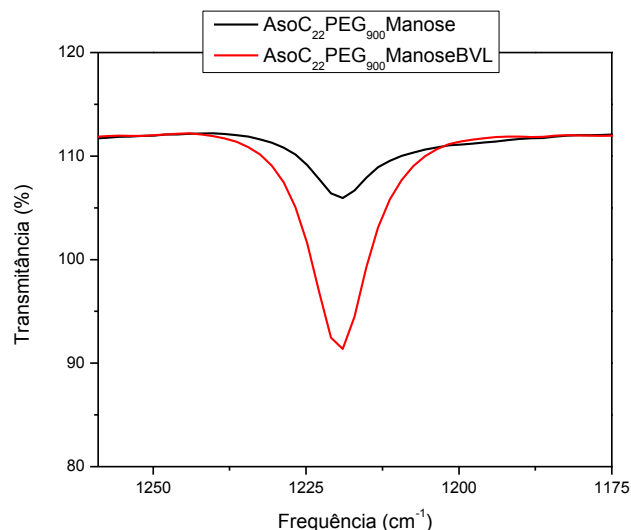
**Tabela 5:** Variação de frequência de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose) e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e a BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL), em cm<sup>-1</sup>.

<i>Grupo funcional</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose BVL (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Δ frequência (cm<sup>-1</sup>)</i>
v C=O	1732,08	1734,01	1,93

**Tabela 6:** Variação de largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose) e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e a proteína BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL), em cm<sup>-1</sup>.

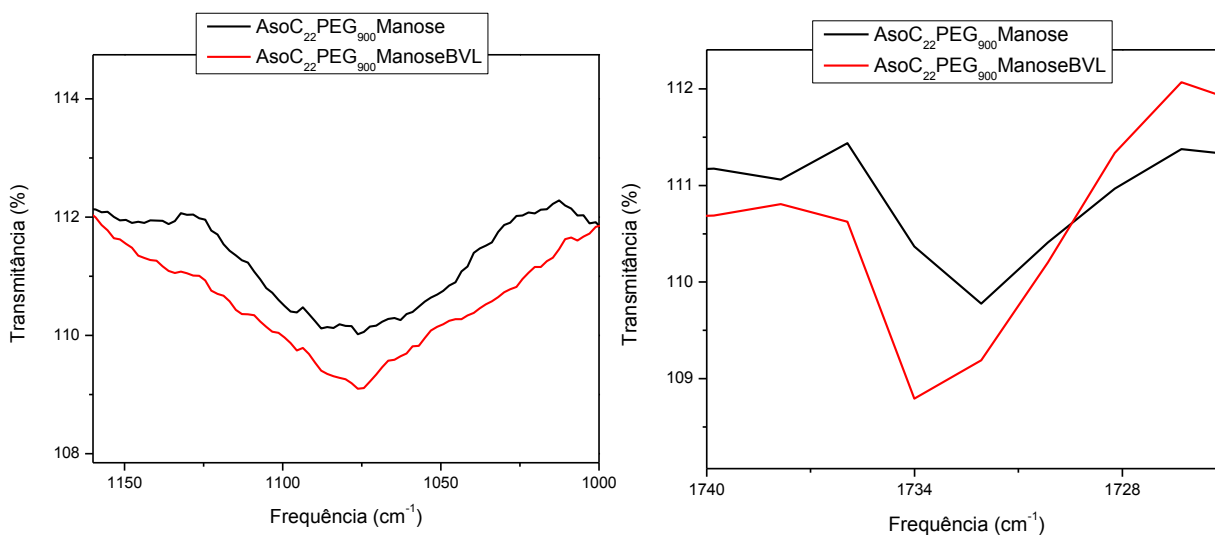
<i>Grupo funcional</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose BVL (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Δ lg. bandas (cm<sup>-1</sup>)</i>
v <sub>as</sub> PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	9,16	6,72	2,44
v C-O-C	45,83	42,01	3,82

A BVL foi responsável pelo ordenamento da região polar do sistema lipossomal. Tal fato foi demonstrado pela redução da largura v PO<sub>2</sub><sup>-</sup> de 2,44 cm<sup>-1</sup> (**Figura 41**). Este resultado pode estar relacionado ao fato de que os grupos fosfato poderem interagir com grupos hidroxilos presentes nos aminoácidos (aa) da BVL (no caso, prolina e lisina) formando ésteres de fosfato. A ligação covalente de um grupo fosfato a um ou mais aa da cadeia lateral de uma proteína é comum. A carga negativa do grupo fosfato atrai os aa de cadeia lateral positiva (LEHNINGER *et al.*, 2000).



**Figura 41:** Ampliação da região de absorção de número de onda do  $\nu_{as}PO_2^-$  do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL

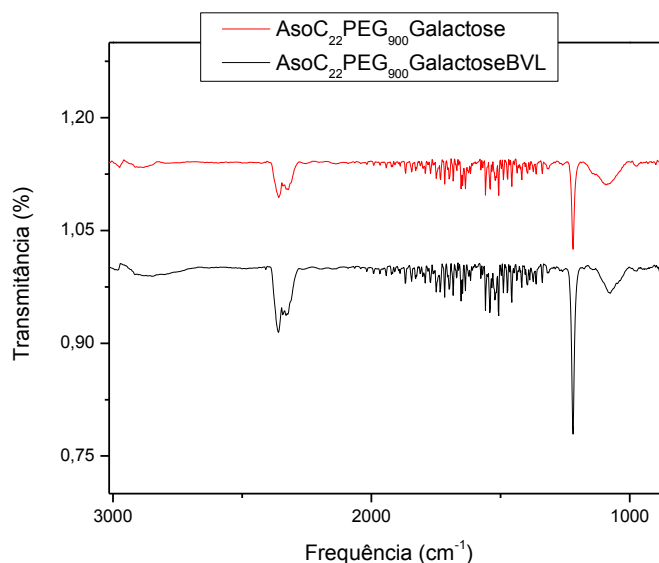
O aumento do ordenamento também foi observado na região de interface no estiramento C-O (redução de 3.82 cm<sup>-1</sup> da largura de banda) (**Figura 42**).



**Figura 42:** Ampliação da região de absorção de número de onda em (a) do  $\nu$  C-O e (b) do  $\nu$  C=O do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL

A BVL quando inserida no sistema lipossomal de Aso C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, propiciou um efeito discreto no  $\nu$  C=O, referente à redução na quantidade de ligação de hidrogênios.

Os espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL, são apresentados na **Figura 43**. Neste sistema, a BVL influenciou os estiramentos axiais dos grupos lipídicos:  $\nu$  PO<sub>2</sub><sup>-</sup>,  $\nu$  C-O e  $\nu$  C=O. As atribuições referentes a estes grupos, bem como os valores das variações citadas anteriormente, estão na **Tabela 7 e 8**, respectivamente.



**Figura 43:** Espectro de HATR-FTIR de lipossomos Aso, na presença do polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e incorporado a BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL)

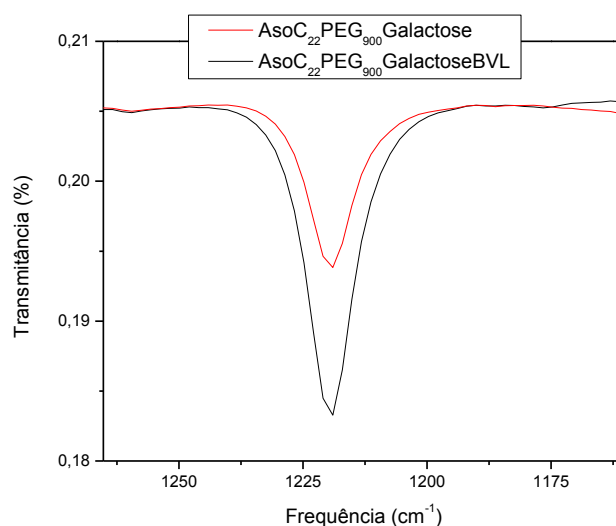
**Tabela 7:** Variação de frequência de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose) e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e a proteína BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL), em cm<sup>-1</sup>

<i>Grupo funcional</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEGGalactose (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose BVL (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Δ frequência (cm<sup>-1</sup>)</i>
$\nu$ C=O	1732,08	1734,01	1,93
$\nu$ C-O	1087,85	1076,29	11,56

**Tabela 8:** Variação de largura de bandas de grupos específicos, presentes nos lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose) e lipossomos de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e a proteína BVL (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL), em cm<sup>-1</sup>.

<i>Grupo funcional</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose BVL (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Δ lg. bandas (cm<sup>-1</sup>)</i>
PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	8,33	6,66	1,67
v C-O	58,33	41,66	16,67

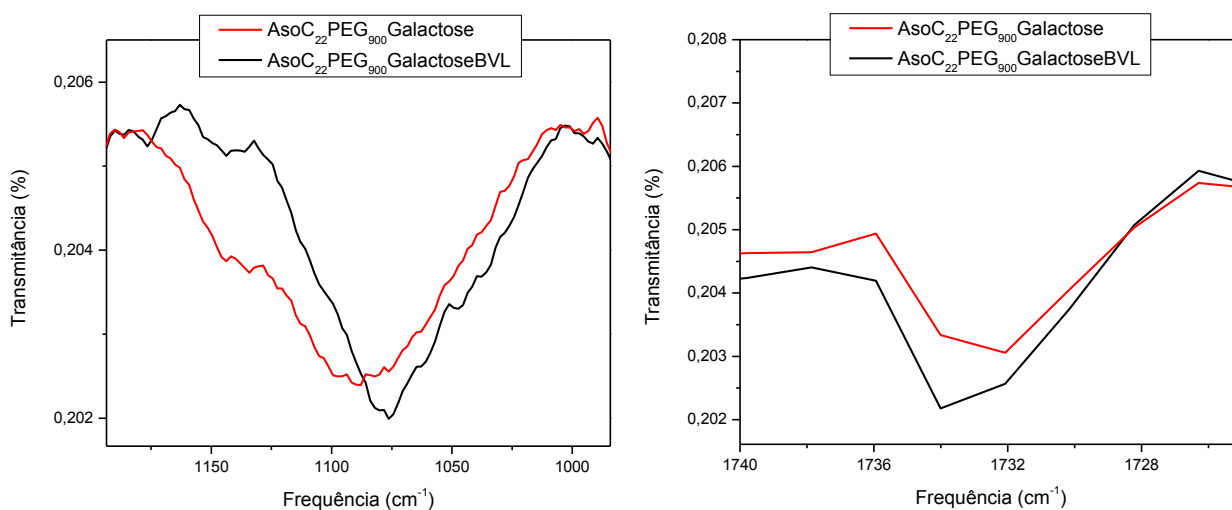
Na região polar, o ordenamento foi considerado em virtude de uma discreta redução da variação de largura da banda do grupo fosfato (PO<sub>2</sub><sup>-</sup>) de 8,33cm<sup>-1</sup> para 6,66 cm<sup>-1</sup> (**Figura 44**).



**Figura 44:** Ampliação da região de absorção de número de onda do  $\nu_{as}PO_2^-$  do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL

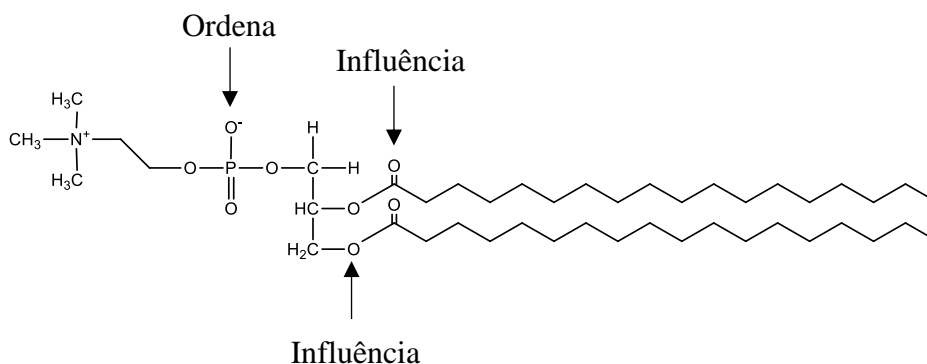
A adição da BVL no sistema lipossomal de Aso composto por C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, influenciou a região de interface do sistema, tanto para o v C-O quanto para o v C=O. No v C-O foi verificado uma variação de frequência de 11,56 cm<sup>-1</sup>, para maiores faixas de absorção e uma redução na variação da largura de 16,67 cm<sup>-1</sup> induzida pela proteína (**Figura 45 (a)**). Os resultados indicaram um aumento discreto do valor de frequência do v C=O (1,93 cm<sup>-1</sup>) (**Figura 45 (b)**), proporcionando uma discreta

redução do grau de hidratação do grupo carbonila lipídico, promovido pela presença da BVL no sistema.



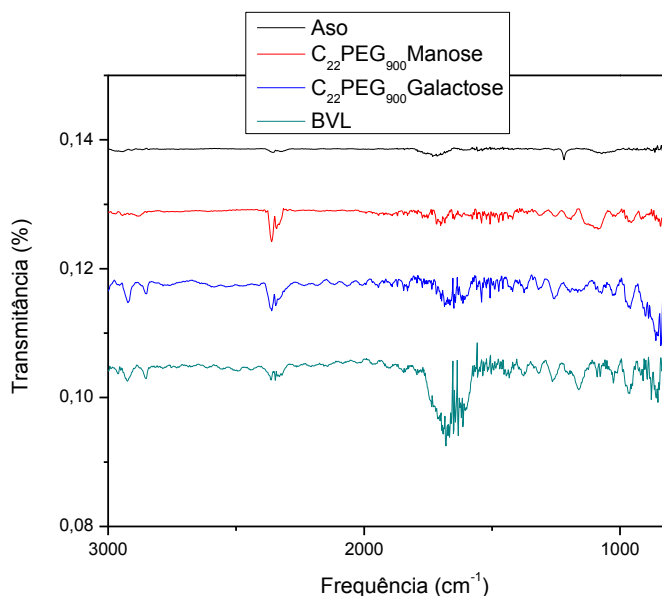
**Figura 45:** Ampliação da região de absorção de número de onda em (a) do  $\nu$  C-O e (b) do  $\nu$  C=O do espectro de HATR-FTIR de lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL.

Os estudos dos espectros de HATR- FTIR dos respectivos sistemas lipossomais constituídos dos lipídios e os respectivos polímeros glicosilados, demonstraram que a BVL interage principalmente na região de interface da membrana de Aso contendo ambos os polímeros, sendo que as interações são mais fortes, quando o polímero é composto pela porção sacarídica galactose. A BVL influencia também a região polar de ambos sistemas lipossomai (**Figura 46**).

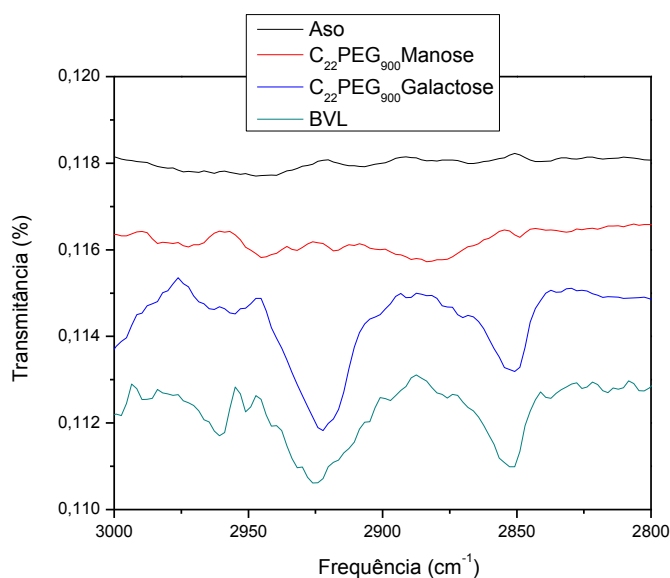


**Figura 46:** Resumo das interações moleculares do lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub> ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL.

Os polímeros  $C_{22}PEG_{900}Manose$ ,  $C_{22}PEG_{900}Galactose$  e a proteína BVL, apresentam grupos metilênicos em sua estrutura, da mesma forma que a membrana lipídica de Aso (**Figura 47**) (**Figura 48**, ampliação da região dos metilenos).



**Figura 47:** Espectro de HATR-FTIR lipossomo de Aso, polímero  $C_{22}PEG_{900}Manose$ , polímero  $C_{22}PEG_{900}Galactose$  e BVL.



**Figura 48:** Ampliação da região de absorção dos metilenos: espectro de HATR-FTIR de lipossomos de Aso, polímero  $C_{22}PEG_{900}Manose$ , polímero  $C_{22}PEG_{900}Galactose$  e BVL.

Quando os compostos (polímero e proteína) foram submetidos ao mesmo sistema lipossomal, houve sobreposição destas bandas no espectro de FTIR ( $\nu$  CH<sub>2</sub>), o que influenciou a obtenção dos dados da região apolar. Por isto, não foram avaliados os estiramentos de  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub> e  $\nu_s$  CH<sub>2</sub>. Sendo assim, esta região foi caracterizada pelas técnicas de DSC.

## 5.2. Medidas de Potencial Zeta - Estudo da distribuição de cargas na membrana ( $\zeta$ ).

A técnica de potencial zeta permitiu monitorar alterações provocadas pela inserção dos polímeros e/ou BVL na membrana, na carga superficial dos lipossomos de Aso. Os resultados estão descritos na **Tabela 9**.

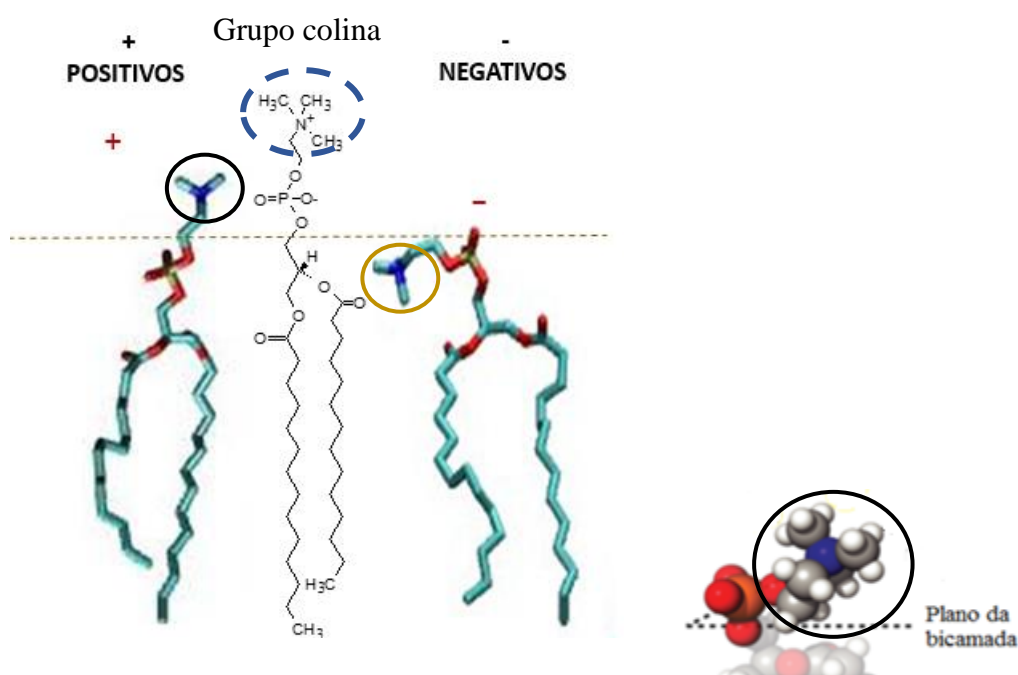
**Tabela 9:** Influência dos polímeros e da BVL, quanto a distribuição de cargas na superfície de lipossomos de Aso.

<i>Lipossomos</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>	<i><math>\Delta</math> (mV)</i>
Aso	-68,2	
Aso+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Manose	-56,8	11,4
Aso+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> Galactose	-53,9	14,3
Aso+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> ManoseLectina	-32,5	24,3
Aso+C <sub>22</sub> PEG <sub>900</sub> GalactoseLectina	-45,4	8,5

A Aso apresenta naturalmente um potencial negativo na superfície das membranas lipídicas, devido a presença de 5% de ácido fosfatídico e fosfatidilinositol fosfato em sua composição (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; FATOUROS *et al.*, 2002; MERTINS *et al.*, 2010). É válido ressaltar que a estabilidade de uma suspensão é indicada pelas partículas que apresentam potencial zeta maior do que -30 mV ou + 30 mV, em módulo (MALVERN, 2012).

Os resultados apresentados na **Tabela 9** demonstram que todos os sistemas analisados foram estáveis, devido à repulsão eletrostática entre partículas.

Ao adicionar o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose no sistema lipossomal contendo Aso, houve uma redução do valor absoluto do potencial zeta em 11,4 mV. Já o C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, reduziu o valor absoluto em 14,3 mV (2.9 mV a mais que o polímero glicosilado por Manose). O aumento desta carga superficial, indica que a porção glicídica do polímero, está inserido funcionalizando a interface e a região polar da membrana. Estas variações indicaram que tais polímeros, influenciaram na orientação do grupo colina (N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), direcionando-o mais para a superfície da membrana (**Figura 49**, destaque em preto, valores positivos), visto que os valores de potencial zeta do lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose tornaram-se mais positivos. O aumento da carga superficial, permite aos lipossomos maior estabilidade, para que os carreadores lipídicos permaneçam mais tempo na corrente sanguínea, além de aumentar os sítios de reconhecimento para a incorporação da BVL (AWSTHI *et al.*, 2004; SHARON *et al.*, 1993; ULRICH *et al.*, 2002).

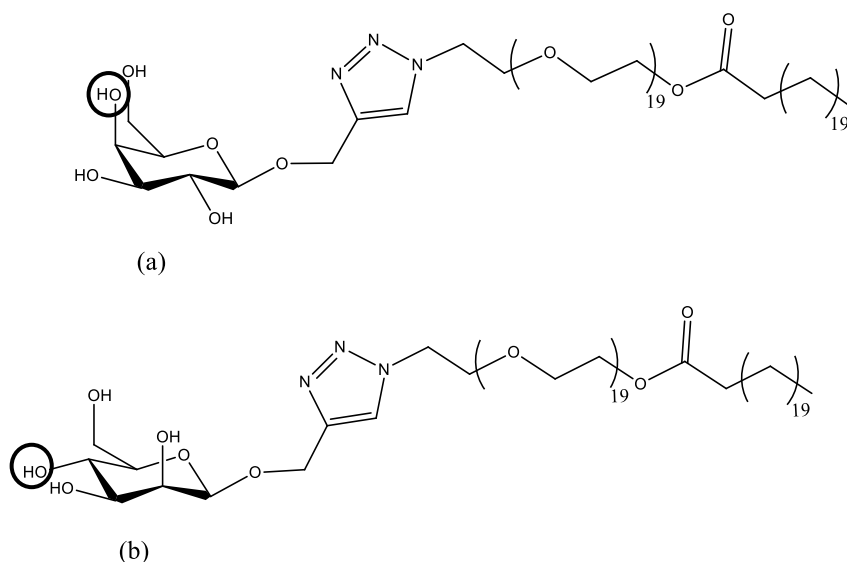


**Figura 49:** Representação da orientação do grupo colina (N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), destaque em preto, acima do plano da bicamada lipídica e em destaque amarelo, abaixo do plano da bicamada lipídica. Adaptado de CHENG *et al.*, 2015

Os resultados de FTIR indicaram que ambos os polímeros influenciaram da mesma forma as interações dipolo-dipolo do grupo colina lipídico. O maior valor de



potencial zeta demonstrado para a presença do C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose pode ser um efeito das posição do grupo hidroxila (em C4) do monossacarídeo na orientação mais acentuada do grupo colina em direção à superfície da membrana (acima do plano da bicamada lipídica), ou da conformação das hidroxilas do monossacarídeo (**Figura 50 (a)**).



**Figura 50:** Fórmula estrutural (a) do C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e (b) C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose.

Um maior efeito na colina também pode justificar a maior influencia do polímero na região glicerol lipídica, tendo deixado estes dois grupos mais próximos entre si (visto que houve maior efeito na banda de FTIR de  $\nu$  C-O), quando comparado ao sistema com C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose.

A presença dos polímeros ao reduzirem a carga superficial negativa da membrana, pode promover mudanças nas propriedades físico-químicas e nas características da superfície destas partículas, reduzindo a hidrofobicidade da superfície destas partículas. Além da influência da porção glicosídica, vale ressaltar que possíveis interações com o polímero hidrofílico de PEG, pode aumentar a permanência do lipossomo na corrente sanguínea (ULRICH *et al.*, 2002).

A BVL quando inserida no sistema AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, aumentou consideravelmente o potencial zeta em 24,3 mV. Este potencial zeta mais positivo, pode estar sendo determinado por uma maior reorientação em direção à superfície da membrana do grupo colina lipídico, mas também pode estar associado ao fato de ter

ocorrido interações eletroestáticas entre a proteína e o polímero (FATOUROS & ANTIMISIARIS, 2002).

O efeito mais positivo de superfície de membrana no lipossomo, não está relacionado a presença de aa catiônicos (como por exemplo a lisina, prolina, arginina e histidina) que estão presentes na BVL, visto que deve-se levar em consideração o potencial isoelétrico (PI). A suspensão lipossomal possui um pH próximo de 7,4 e a BVL possui um PI de 6,31, desta forma uma solução com o pH maior que o PI, proporciona um potencial de superfície de carga total negativa, enquanto que uma solução com o pH menor que o PI, proporciona um potencial de superfície de carga total positiva (CHANG, 2010). A contribuição da BVL para um potencial zeta mais positivo, a partir da inserção da proteína em lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, foi menor (8,5 mV), em relação ao sistema AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose. Isto pode estar relacionado ao maior efeito na reorientação da colina que o polímero promove. É então provável que a BVL tenha maior efeito na reorientação do grupo colina presente no sistema de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose do que no AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose.

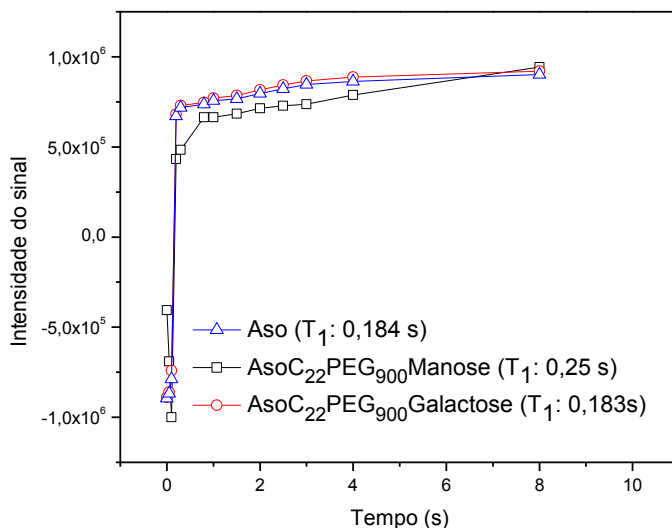
O potencial de superfície de carga total mais positiva, adquirida pelos lipossomos e seus respectivos polímeros com ou sem a adição da BVL, permite maior estabilidade ao retardar a atuação de captura destes sistemas (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL) pelos macrófagos (BATISTA *et al.*, 2007) e assim aumenta o tempo de meia-vida do lipossomo no organismo, além de diminuir a sua toxicidade e proteger as vesículas dos atritos ao passar pelos poros das membranas (AWSTHI *et al.*, 2004; BARENHOLZ, 2012; FRÉZARD *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2008).

Mais informações sobre o efeito dos polímeros e da BVL no grupo colina, bem como fosfato lipídicos, foram obtidas por ensaios de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P, respectivamente e estão descritas a seguir.

### 5.3. Medidas de RMN <sup>1</sup>H

De forma a complementar a investigação relacionada à influência dos polímeros C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, bem como a da BVL na região polar do lipossomo de Aso, foi investigado por RMN de <sup>1</sup>H seus efeitos no tempo de relaxação do tipo spin-rede, ou longitudinal da colina lipídica (N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). As curvas de recuperação do sinal de FID, respectivas aos hidrogênios presentes no grupo colina lipídico ( $v_{as}$

$N^+(CH_3)_3$ , pico a 3,2 ppm), estão apresentadas nas **Figuras 51, 52** (a) e (b). As variações dos valores de  $T_1$  foram calculadas a partir destas curvas (SKOOG *et al.*, 1998; SILVERSTEIN *et al.*, 2005) e estão descritas na **Tabela 10**.



**Figura 51:** Recuperação dos sinais de RMN de  $^1H$  (de FID) da colina em lipossomo de: Aso, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose.

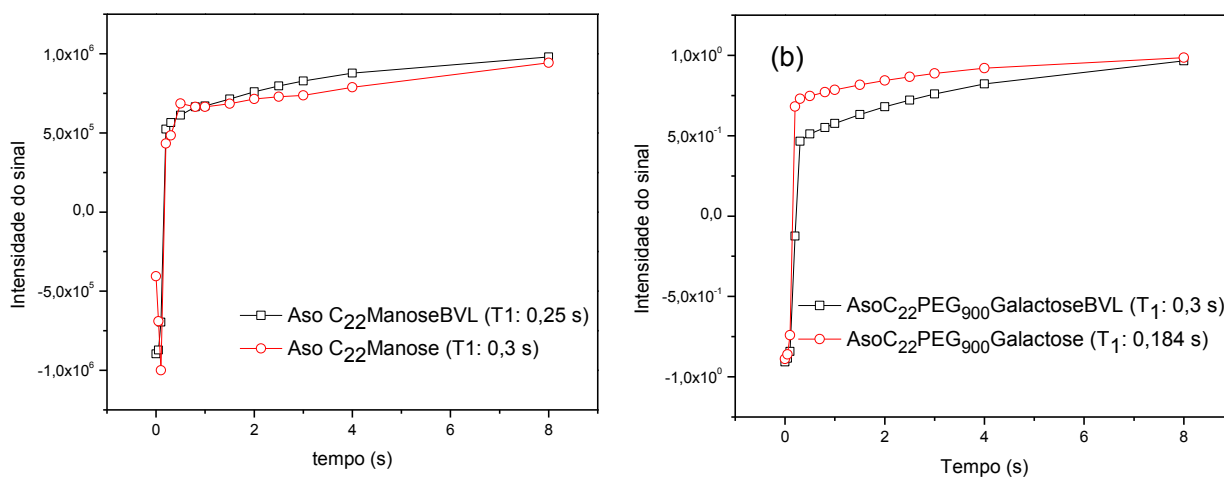
**Tabela 10:** Valores de  $T_1$  dos prótons da colina presentes nos lipossomos de: Aso, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL.

<i>Lipossomos</i>	$T_1$ (s)	$\Delta T_1$ (s)
<i>Aso</i>	0,184	
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose</i>	0,25	0,066
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose</i>	0,183	0,001
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseLectina</i>	0,2	0,05
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseLectina</i>	0,3	0,12

A partir dos valores de  $T_1$ , foi possível obter informação sobre a dinâmica de regiões específicas dos lipídios que constituem a membrana lipossomal de Aso (DE LIMA *et al.*, 2007). Para os estudos que refletem a velocidade de rotação da região polar, foram investigados os hidrogênios do grupo colina dos lipossomos de Aso, cujo valor de

$T_1$  foi de 0,184 s. Ao inserir neste lipossomo o C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, os valores de  $T_1$  aumentaram para 0,25 s (**Figura 51; Tabela 10**). Este acréscimo no tempo de relaxação sugere uma redução discreta da mobilidade, induzida por este polímero na região polar dos lipossomos de Aso.

Não foram obtidos resultados relevantes, quanto a variação dos valores de  $T_1$  no sistema lipossomal de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, pois a variação de  $T_1$  foi de 0,8%.



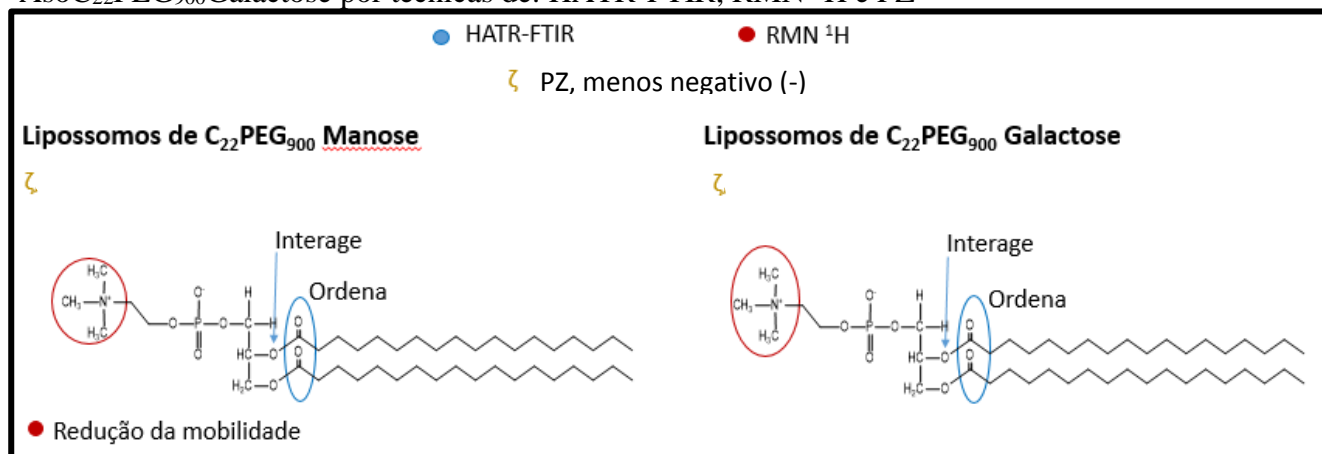
**Figura 52:** Recuperação dos sinais de RMN de <sup>1</sup>H (de FID) da colina, em lipossomo de: (a) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e (b) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose BVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose

Quando a BVL foi incorporada no lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (**Figura 52** (a)), reduziu o valor de  $T_1$  do lípido em 0,5 s ( $T_1$  variou de 0,25 s para 0,20 s), aumentando discretamente a mobilidade do grupo colina. A integração da BVL no sistema de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose aumentou o valor de  $T_1$  dos hidrogênios presentes na colina lipídica duas vezes mais do que a proteína inserida em AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose (variação de 0,12 s nos valores de  $T_1$ ). Assim, a BVL inserida na vesícula de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose reduziu a mobilidade do grupo colina. É possível que o maior efeito na reorientação por parte da BVL no grupo colina em sistemas compostos por AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, observados por potencial zeta, deva-se a este efeito de desordenamento discreto no grupo polar.

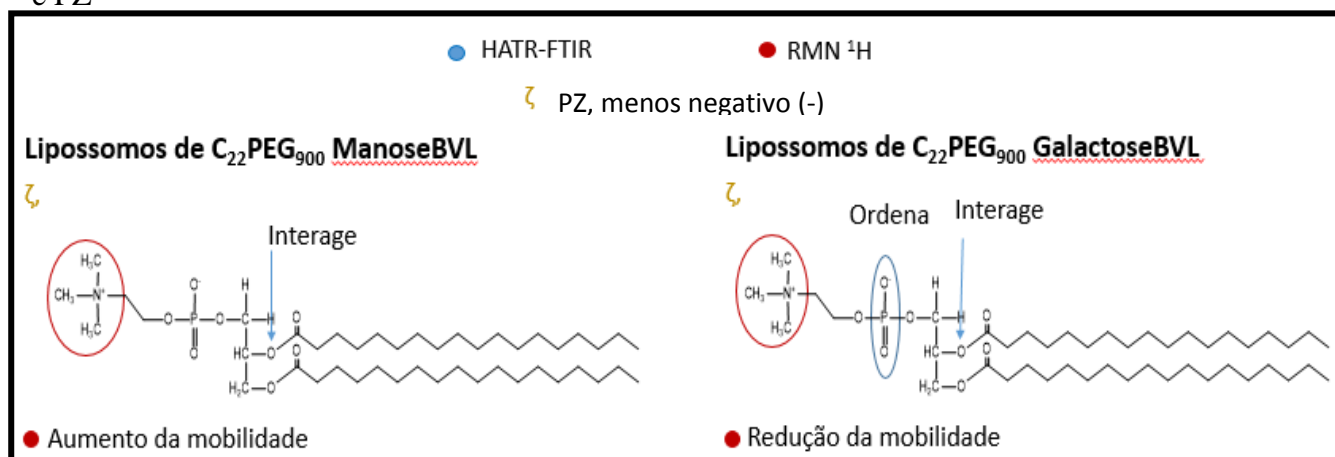
Nos **Quadros 2 e 3** estão representados, as análises das técnicas apresentadas até o momento (HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H e PZ), referente as interações moleculares dos

sistemas lipossomais de Aso e seus respectivos polímeros, bem como a influência da BVL nestes, respectivamente.

**Quadro 2:** Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H e PZ



**Quadro 3:** Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVC e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H e PZ



#### 5.4. Medidas de RMN <sup>31</sup>P

A espectroscopia de RMN <sup>31</sup>P representa uma técnica viável para estudos referente ao ambiente eletrônico do átomo <sup>31</sup>P (GHOSH, 1988; SÁNCHEZ *et al.*, 2013).

As formas lineares obtidas dos espectros permitiram avaliar o efeito que os polímeros e a BVL causaram na anisotropia do deslocamento químico (CSA) da região do fosfato dos fosfolipídios que constituem a membrana, bem como as restrições na liberdade de movimento do núcleo. A partir dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  (**Figura 53** (a), **54** (b) e (c) e **55** (d), (e)), foram calculadas, as variações das larguras dos picos a 75% de sua altura (**Tabela 11**).

Um pico isotrópico, em campo alto, característico de lipossomos de fosfatidilcolina em estado de fase líquido-cristalino, aparece em torno de 0,20 ppm. Adicionalmente, um pico anisotrópico com um ombro de intensidade reduzida, ocorre em campo baixo próximo de 0,30 ppm, Fig. 53 (a). Um segundo pico isotrópico, é observado próximo a 1,7 ppm. A presença destes dois picos nos lipossomos de Aso resulta de duas orientações magneticamente não-equivalentes de fosfatidilcolina.

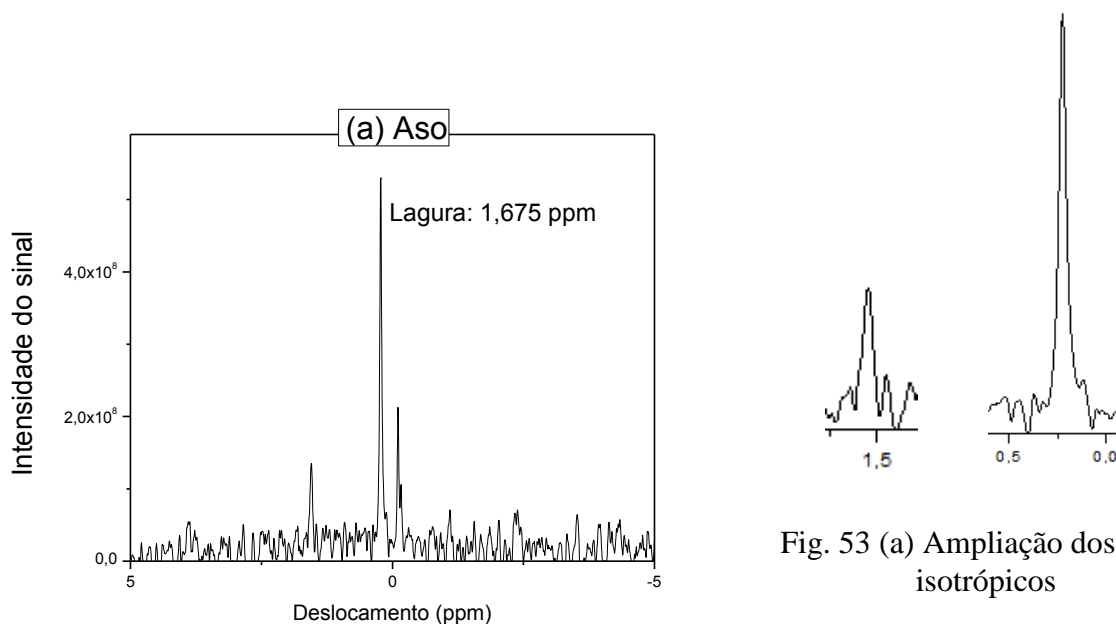
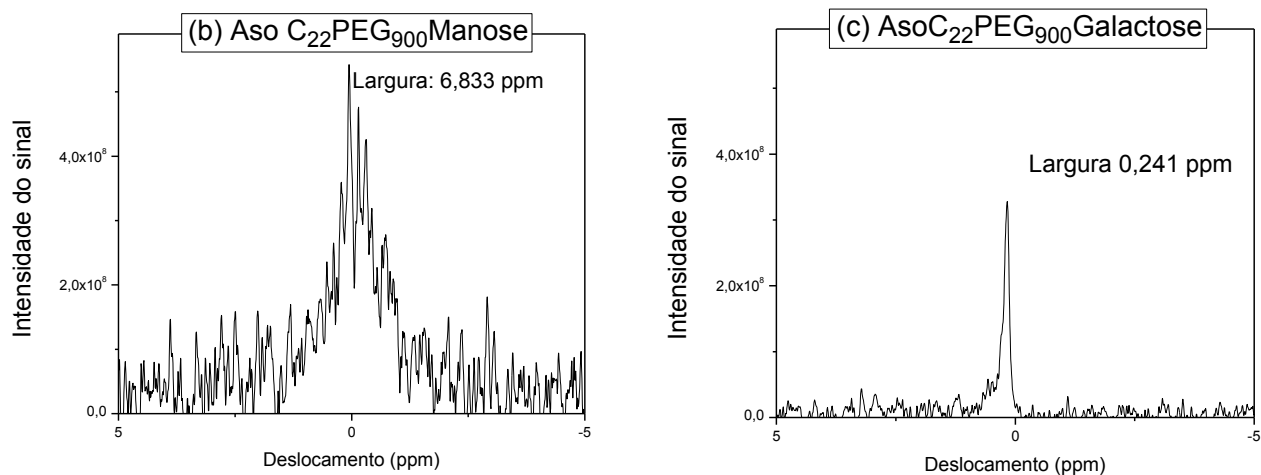
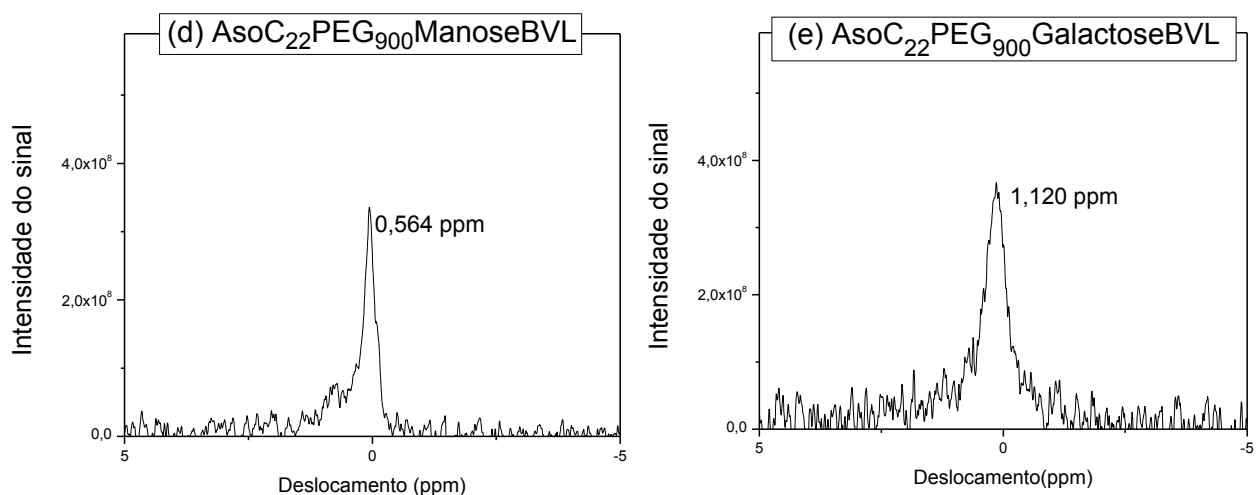


Fig. 53 (a) Ampliação dos picos isotrópicos

**Figura 53:** Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$ - anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de (a) asolecitina de soja (Aso).



**Figura 54:** Espectros de RMN  $^{31}\text{P}$ - anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de: (b) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e (c) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose.



**Figura 55:** Espectros de RMN  $^{31}\text{P}$ - anisotropia do deslocamento químico da região do fosfato dos fosfolipídios de lipossomos de: (d) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e (e) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL.

**Tabela 11:** Valores das larguras dos picos referente a anisotropia do deslocamento químico presentes nos lipossomos de: Aso, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL, em ppm.

<i>Lipossomos</i>	<i>Largura dos deslocamentos químicos (região PO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (ppm)</i>	<i>Δ de Largura dos deslocamentos químicos (região PO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (ppm)</i>
<i>Aso</i>	1,67	
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose</i>	6,83	5,16
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose</i>	0,24	1,43
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL</i>	0,56	6,27
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL</i>	1,12	0,88

O C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose no lipossomo de Aso modificou o perfil do pico (**Figura 54 (b)**; **Tabela 11**), tornando-o mais largo em 5,16 ppm, ordenando assim a região do fosfato. A liberdade de movimento do grupo fosfato foi então reduzida.

A adição do polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose no lipossomo de Aso, reduziu a largura do pico do fósforo de 1,67 ppm para 0,24 ppm (**Figura 53 (a)** e **54 (c)**; respectivamente, **Tabela 11**), o que indicou a alteração da mobilidade da região do fósforo para mais fluido.

A redução da largura do pico de 6,83 ppm para 0,56 ppm no RMN <sup>31</sup>P, dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, foi observada após a adição da BVL no sistema, o que permitiu maior liberdade de movimento para grupo fosfato (**Figura 54 (b)** e **55 (d)**, respectivamente; **Tabela 11**).

A BVL, quando inserida no sistema liposomal AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, reduziu a liberdade de movimento do grupo fosfato em 0,88 ppm (**Figura 54 (c)** e **55 (e)**, respectivamente; **Tabela 11**). Este efeito discreto pode estar relacionado a uma consequência da redução da mobilidade do grupo colina (observado pela técnica de RMN de <sup>1</sup>H), causada pela inserção desta mesma proteína.

A BVL interagiu de forma diferente com o núcleo de fósforo nos sistemas lipossomais de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, ao aumentar e reduzir a sua mobilidade, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado nas análises de RMN de <sup>1</sup>H. Quando a BVL foi incorporada no lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose,

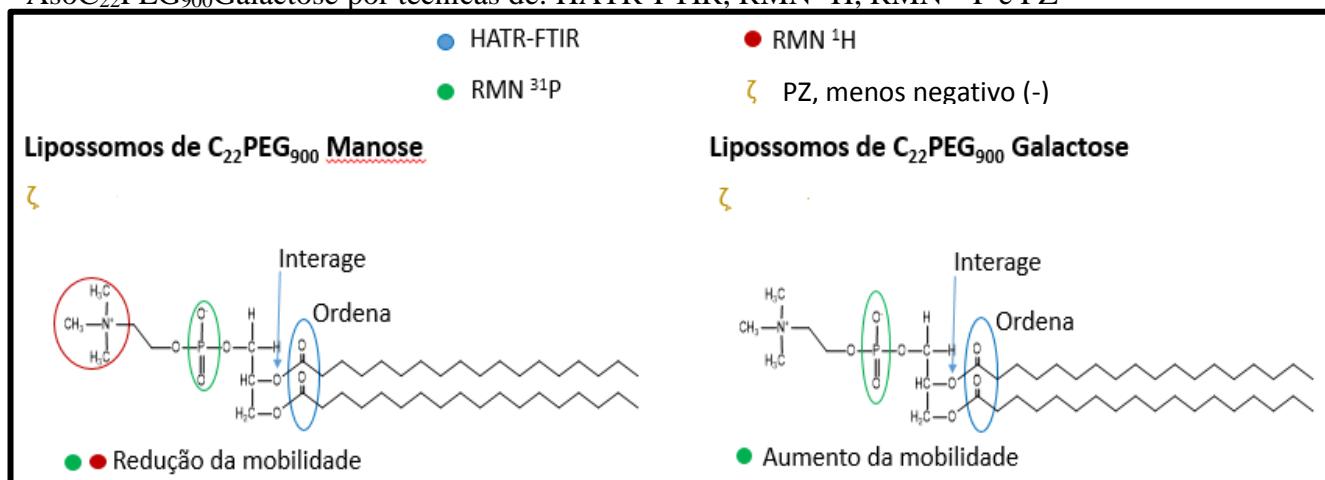


reduziu o valor de  $T_1$  (RMN  $^1\text{H}$ ) dos hidrogênios presentes na colina lipídica em 0,5 s, indicando o aumento da mobilidade neste grupo e reduziu a largura do pico do fosfato (RMN  $^{31}\text{P}$ ) em 6,27 ppm, indicando o aumentando da mobilidade do grupo fosfato. A fluidez do grupo colina (região polar), pode estar relacionado com o potencial de superfície da membrana lipossomal menos negativo. A integração da BVL no sistema de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose aumentou o valor de  $T_1$  (RMN  $^1\text{H}$ ) dos hidrogênios presentes na colina lipídica em 0,12 s, reduzindo a mobilidade do grupo colina e aumentou a largura do pico do fosfato (RMN  $^{31}\text{P}$ ) em 0,88 ppm, indicando a redução da mobilidade do grupo fosfato. Desta forma o potencial de superfície da membrana lipossomal menos negativa pode estar relacionado a neutralização das cargas por interações eletrostáticas.

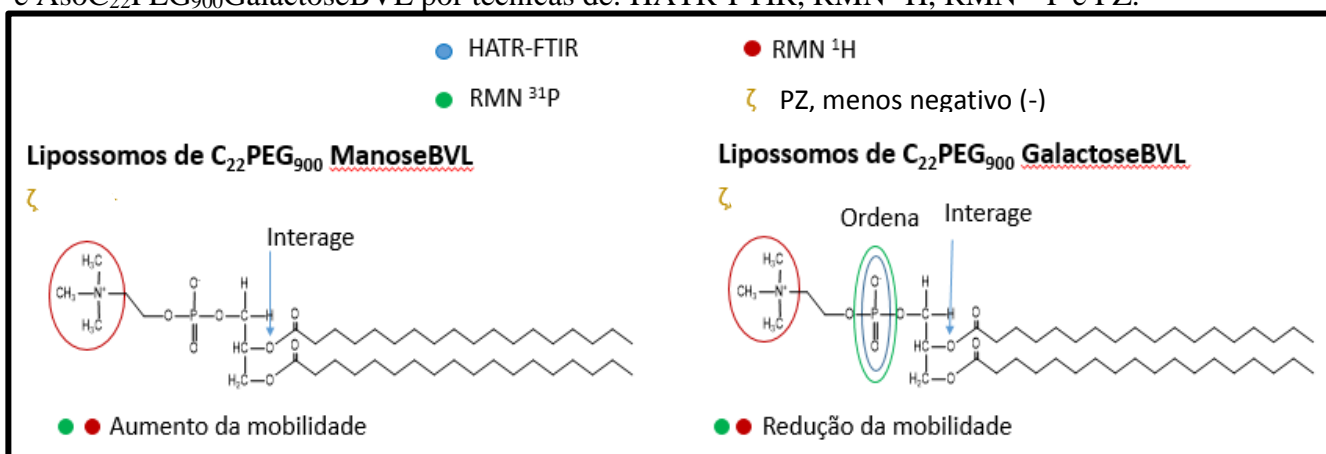
Tal fato, pode estar relacionado a posição das hidroxilas nos sacarídeos, como também pode estar relacionado à disposição espacial do anél glicídico (LIS *et al.*, 1998; WEIS *et al.*, 1996). Estas diferenças de interações que podem ocorrer quanto ao arranjo espacial do glicídio, podem causar distintas interações moleculares no sistema lipossomo-polímero-proteína, e conseqüentemente na sua mobilidade (SHARON *et al.*, 1998; WEIS *et al.*, 1996).

Nos **Quadros 4 e 5** estão representados, as análises das técnicas apresentadas até o momento (HATR-FTIR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{31}\text{P}$  e PZ), referente as interações moleculares dos sistemas lipossomais de Aso e seus respectivos polímeros, bem como a influência da BVL nestes, respectivamente.

**Quadro 4:** Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose por técnicas de: HATR-FTIR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{31}\text{P}$  e PZ



**Quadro 5:** Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>31</sup>P e PZ.

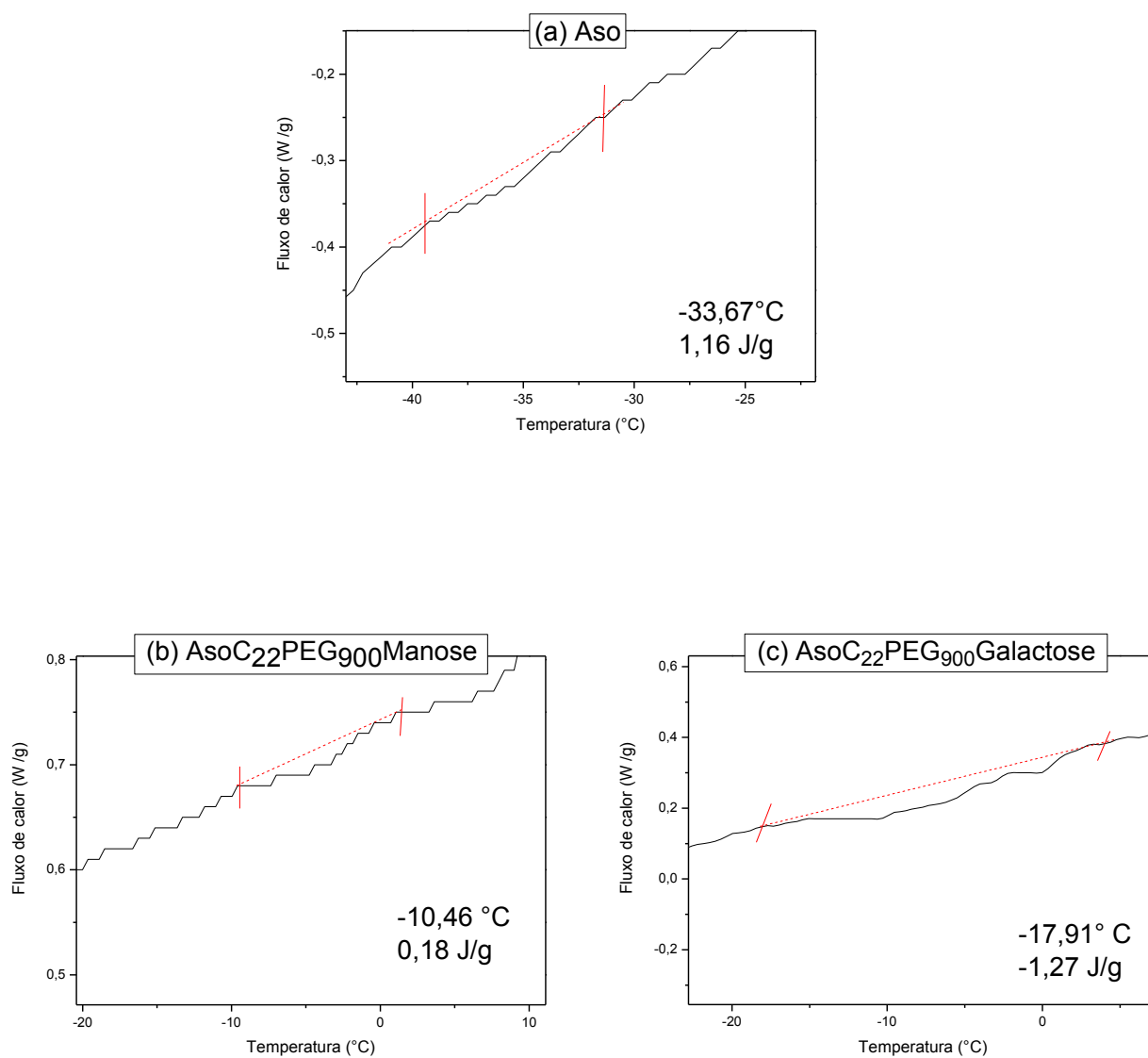


### 5.5. Caracterização dos parâmetros termodinâmicos dos sistemas, analisados por Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC)

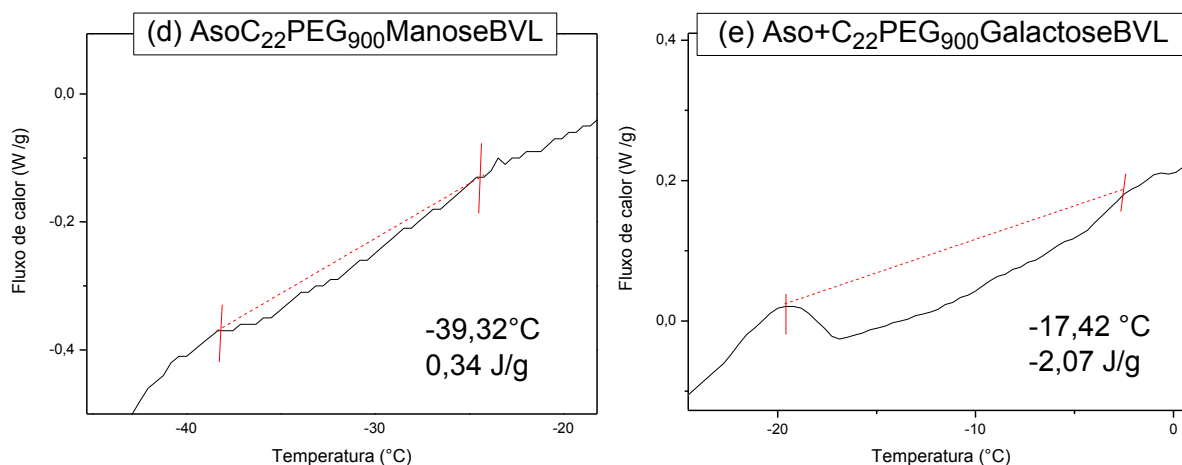
Devido à possíveis sobreposições das bandas de FTIR referentes ao estiramento dos grupos metilênicos lipídicos, conforme mencionado anteriormente, a técnica de DSC permitiu obter maiores informações sobre o grau de ordem nesta região, já que as alterações de transição de fase são atribuídas ao núcleo hidrofóbico da membrana e não às demais regiões de interface e polar (ZHAO *et al.*, 2007).

Os eventos térmicos das amostras de lipossomo de Aso, e lipossomo de Aso contendo o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, assim como o contendo o C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, estão representados na **Figura 56**. Os eventos térmicos dos respectivos lipossomos em presença da BVL estão representados na **Figura 57**. As curvas demonstram picos endotérmicos (HOHNE *et al.*, 1996) referentes à transição de fase do ácido oleico presente na fosfatidilcolina, que está contida em Aso. Através destes eventos térmicos, foi possível observar a contribuição de cada constituinte da membrana, na sua região hidrofóbica.

As variações das temperaturas de transição de fase (T<sub>m</sub>), calculadas a partir das curvas do DSC (**Figuras 56 e 57**) estão listadas na **Tabela 12**.



**Figura 56:** Curva de DSC referente aos lipossomos de: (a) Aso, (b) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e (c) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose.



**Figura 57:** Curva de DSC referente aos lipossomos de: (d) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e (e) AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL.

**Tabela 12:** Tabela de variação de temperatura de transição de fase ( $T_m$ , °C) dos sistemas Aso, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL.

<i>Lipossomos Aso</i>	<i>T<sub>m</sub> (°C)</i>	<i>Δ, T<sub>m</sub>(°C)</i>
<i>Aso</i>	33,67	
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose</i>	10,46	23,18
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose</i>	17,91	15,76
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL</i>	39,32	28,86
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL</i>	17,42	0,49

O polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, quando incorporado nas vesículas de Aso, provocou redução da  $T_m$ , em módulo de 33,67 °C para 10,46 °C. O polímero promoveu assim um rearranjo da bicamada lipídica de Aso para um estado mais desordenado, indicando maior fluidez na região apolar da membrana.

O polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, quando inserido no lipossomos de Aso, reduziu a  $T_m$  em 15,76 °C, promovendo também um estado mais desordenado da região

hidrofóbica lipídica, porém aumentando a mobilidade de Aso em uma menor proporção que o C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose.

Quando a BVL foi adicionada no sistema AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, elevou a T<sub>m</sub> de 10,46 °C para 39,32 °C. A integração da proteína no sistema favoreceu um ordenamento da região hidrofóbica lipídica. O efeito da BVL na membrana, parece ter se sobreposto ao efeito de fluidificação de C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose.

A presença da BVL no sistema AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, não propiciou alterações na região hidrofóbica tão consideráveis como em AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose. A presença da proteína tornou discretamente mais fluida a região hidrofóbica da membrana, visto que reduziu em 0,49°C a T<sub>m</sub> do sistema lipossomal. O efeito da BVL no sistema AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, foi próximo ao observado em trabalhos prévios com lipossomos de Aso contendo docosanato de N-acetilglucosamina-PEG<sub>900</sub>(C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlcNAc), na qual a proteína reduziu em 0,15 °C a T<sub>m</sub> das vesículas, desordenando discretamente sua região apolar. Tal resultado foi atribuído a sua localização na interface e região polar do lipossomo (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

A partir dos resultados de caracterização das propriedades físico-químicas dos lipossomos de Aso na ausência e presença dos polímeros C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, bem como a destes sistemas na ausência e presença da lectina, pode-se constatar que:

- O polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose afeta mais a região polar (colina e fosfato) e a região hidrofóbica (cadeia metilênica) dos fosfolipídios de Aso, quando comparado ao efeito de C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose. Após a inserção da BVL no sistema lipossomal constituída pelo polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, a proteína desordena a região do fosfato e ordena a cadeia hidrofóbica. A presença da proteína parece orientar mais o grupo colina para a superfície da membrana quando inserida em AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, talvez em função do efeito de desordenamento deste grupo e do grupo fosfato. Na carbonila (interface) foi observado efeito de ordenamento pela presença do polímero AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose nos lipossomos de Aso.
- A BVL propiciou igualmente o grau de hidratação dos sistemas C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e reduziu discretamente a sua mobilidade.
- O polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose parece afetar mais a região glicerol do fosfolipídio de Aso, quando comparado ao C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose. O efeito da BVL também ocorre de forma mais intensa nesta região. C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose fluidifica a região apolar de lipossomos

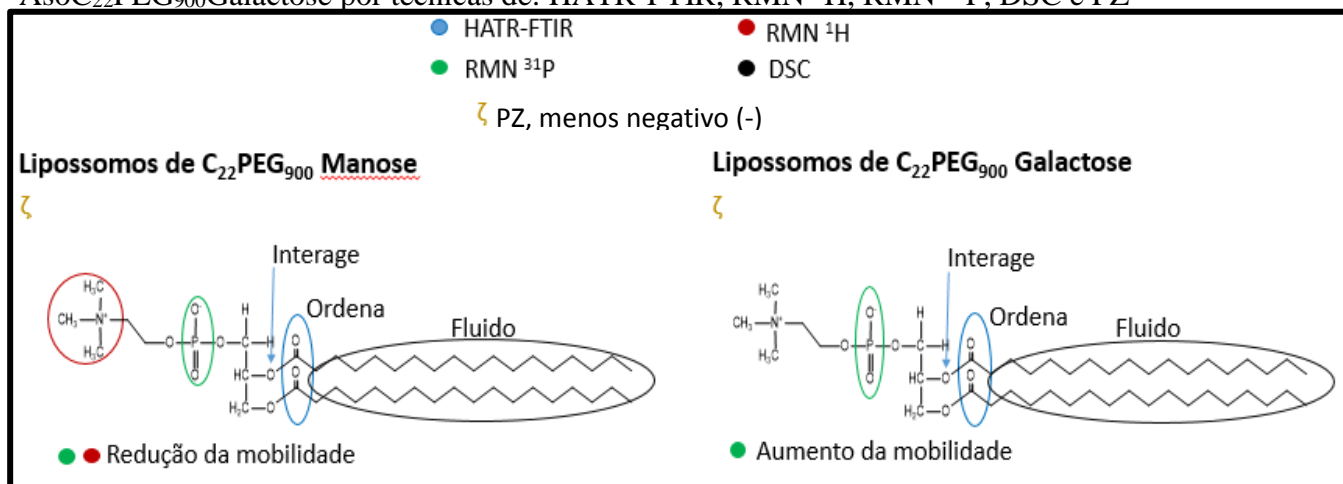
de Aso, entretanto a BVL tem pouco efeito fluidificante no sistema AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose.

A BVL apresenta 36,9% de frequência de aa hidrofóbicos, que incluem alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, valina e triptofano. É possível que pelo maior efeito de fluidificação do C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose na membrana de Aso (em relação ao C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose), a BVL tenha se inserido mais facilmente em direção à região hidrofóbica da membrana e houve maior interação com os aa hidrofóbicos da proteína, ordenando o sistema.

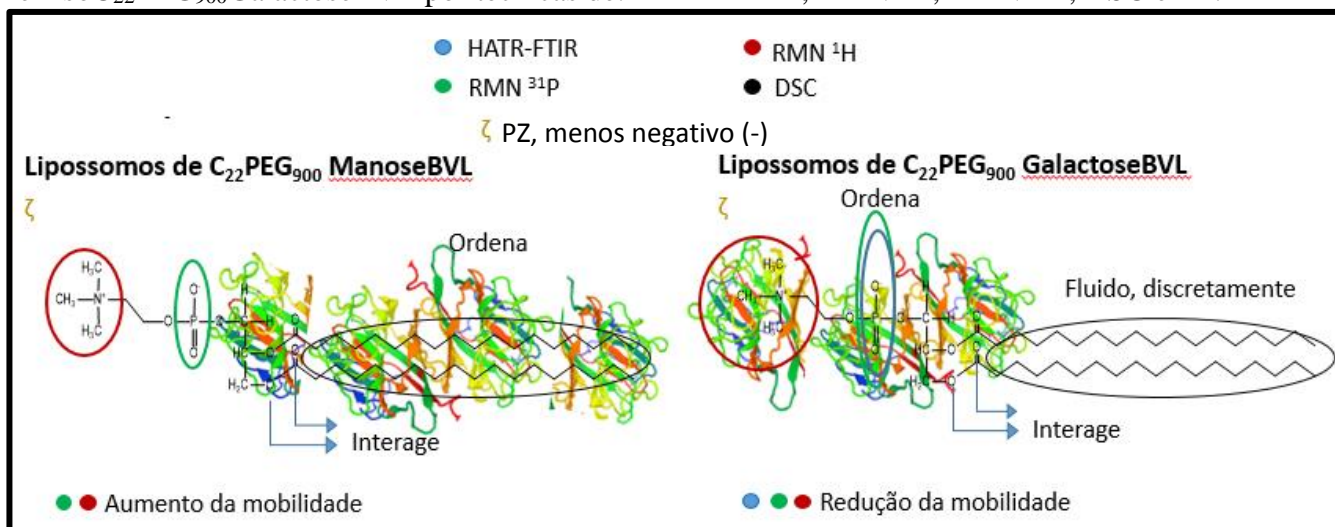
A disposição espacial dos glicídios, bem como a posição das hidroxilas, podem influenciar na aproximação e nas interações entre a porção glicídica do polímero e a BVL (LIS *et al.*, 1998; WEIS *et al.*, 1996).

Nos **Quadros 6 e 7** estão representados, as análises das técnicas apresentadas até o momento (HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>31</sup>P, DSC e PZ), referente as interações moleculares dos sistemas lipossomais de Aso e seus respectivos polímeros, bem como a influência da BVL nestes, respectivamente.

**Quadro 6:** Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>31</sup>P, DSC e PZ

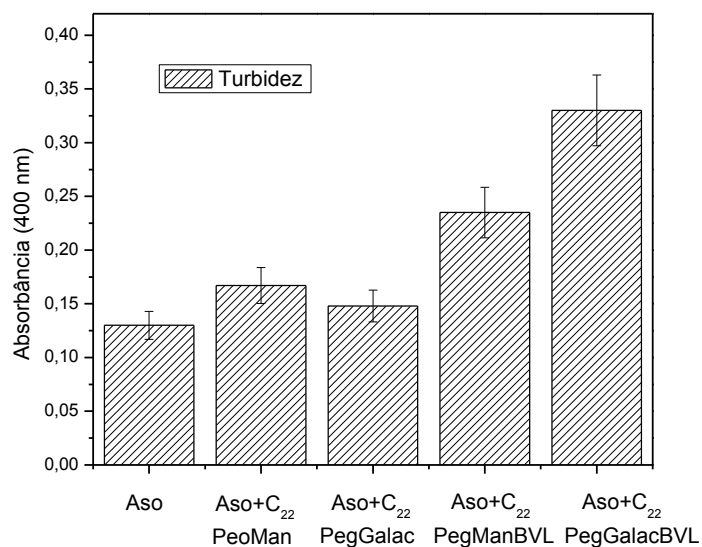


**Quadro 7:** Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>31</sup>P, DSC e PZ.



### 5.6. Medidas de Turbidez: Espectrofotometria de Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Os resultados obtidos, com base nas absorvâncias a 400 nm dos sistemas lipossomais estão representados na **Figura 58** e descritos na **Tabela 13**.



**Figura 58:** Gráfico de absorvância de lipossomos de Aso na presença de: C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GactoseBVL.

Os cálculos referentes a variação de turbidez, ou seja, valores de absorvância foram feitos com base na média dos valores de turbidez, que foram realizadas em triplicata (**Tabela 13**).

A presença do polímero constituído do açúcar manose elevou os valores de turbidez do sistema de Aso em cerca de 37,43%, enquanto que o sistema AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose elevou 29,33%. Entretanto, a BVL quando foi integrada ao sistema composto por AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose elevou a turbidez de 0,171 par 0,233, já no sistema lipossomal de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, a BVL variou a sua turbidez em cerca de 0,186 quando comparado ao sistema lipossomal de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose.

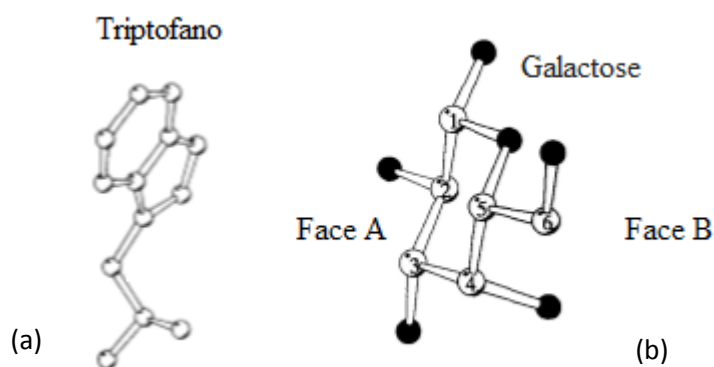
O aumento dos valores de absorvância, conforme os dados na **Tabela 13**, mostram uma influência com relação à estabilidade dos sistemas (CHORILLI *et al.*, 2007). Neste contexto, é importante ressaltar que o aumento dos valores de turbidez pode estar relacionado ao diâmetro dos lipossomos (SOUSA *et al.*, 1990), ou seja, ao aumento do seu tamanho ou aglomeração (MAZA *et al.*, 1994; MAZA *et al.*, 1996).



**Tabela 13:** Valores de turbidez dos lipossomos de Aso na presença: do C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GactoseBVL

<i>Lipossomos</i>	<i>Valores de turbidez</i>	$\bar{X}$	<i>Desvio padrão</i>	<i>Δ dos valores de turbidez</i>	<i>% de turbidez</i>
<i>Aso</i>	0,103; 0,101; 0,113	0,106	± 0,0064		
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose</i>	0,167; 0,164; 0,183	0,171	± 0,011	0,065	37,43
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose</i>	0,148; 0,139; 0,162	0,150	± 0,012	0,044	29,33
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL</i>	0,235; 0,205; 0,258	0,233	± 0,027	0,062	26,61
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL</i>	0,330; 0,314; 0,363	0,336	± 0,025	0,186	55,36

A partir dos dados descritos, é possível afirmar que a galactose presente no AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, indica estar localizada mais na superfície do sistema lipossomal, promovendo maiores interações com a BVL aproximando e aglomerando os lipossomos. É provável que esta aglomeração seja resultado de interações de denominada de  $\pi$ - $\pi$  stacking (empilhamento apolares) entre a face A do anel glicídico (anômero) galactose do polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose e o anel triptofano (**Figura 59**) (ou felilalanina), presente na BVL, superpondo-se (LIS *et al.*, 1998; WEIS *et al.*, 1996). Por vezes, estes estão um pouco deslocados desta posição paralela (WEIS *et al.*, 1996). O empilhamento apolar, ratifica a preferencia de interação da BVL com o monossacarídeo galactose, o que justifica o maior valor de turbidez do lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL.



**Figura 59:** Fórmula estrutural de triptofano (a) componente da BVL e galactose (b) componente do polímero, constituinte do lipossomo. Adaptado de WEIS *et al.*, 1996.

Para averiguar o efeito dos polímeros e inserção da BVL nos lipossomos e tentar uma correlação entre os dados, foram realizadas medidas de Espalhamento de Luz.

### 5.7. Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

As medidas de DLS permitiram averiguar as inserções dos polímeros e da BVL na membrana lipídica. De acordo com os resultados obtidos, os parâmetros foram avaliados e mostraram alterações significativas por influência da composição dos

sistemas avaliados (**Tabela 14**). Tanto a presença dos polímeros quanto a da BVL, aumentaram o tamanho dos lipossomos, demonstrando que foram encapsulados.

No lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose a fluidez na região apolar, bem como a interação do polímero com a membrana na região polar e interface podem ser responsáveis pelo aumento do diâmetro dos lipossomos.

O lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose com interações mais fortes, quando comparado ao lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose proporcionou uma dinâmica mais empacotada reduzindo o diâmetro do sistema.

A presença da BVL aumentou o tamanho dos lipossomos compostos por AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose em cerca de 200 nm, em relação ao aumento provocado pela proteína em AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose. Este aumento de tamanho pode estar relacionado ao comportamento observado nos ensaios de turbidez, sugerindo a localização da BVL na superfície lipossomal composta por AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, que pode facilitar a aglomeração deste sistema. Este polímero indica estar na região de interface e região polar.

A BVL quando foi integrada nos lipossomos compostos por AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, interagiu entre as cadeias de hidrocarbonetos lipídica (conforme as análises de DSC, que indicou ordenamento na região apolar). O polímero em questão viabilizou a expansão da proteína, para mais internamente na membrana. Desta forma, o lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose aumentou consideravelmente o diâmetro.

A BVL ao integrar a membrana lipídica composta pelo AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, propiciou ordenamento da região polar (grupo colina, N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, e fosfato, PO<sub>4</sub><sup>-2</sup>). Tal ordenamento foi responsável pelo aumento expressivo das vesículas, a partir da possibilidade de interação entre a BVL com o monossacarídeo (galactose) (ULRICH *et al.*, 2002) que compõem o polímero no sistema lipossomal.

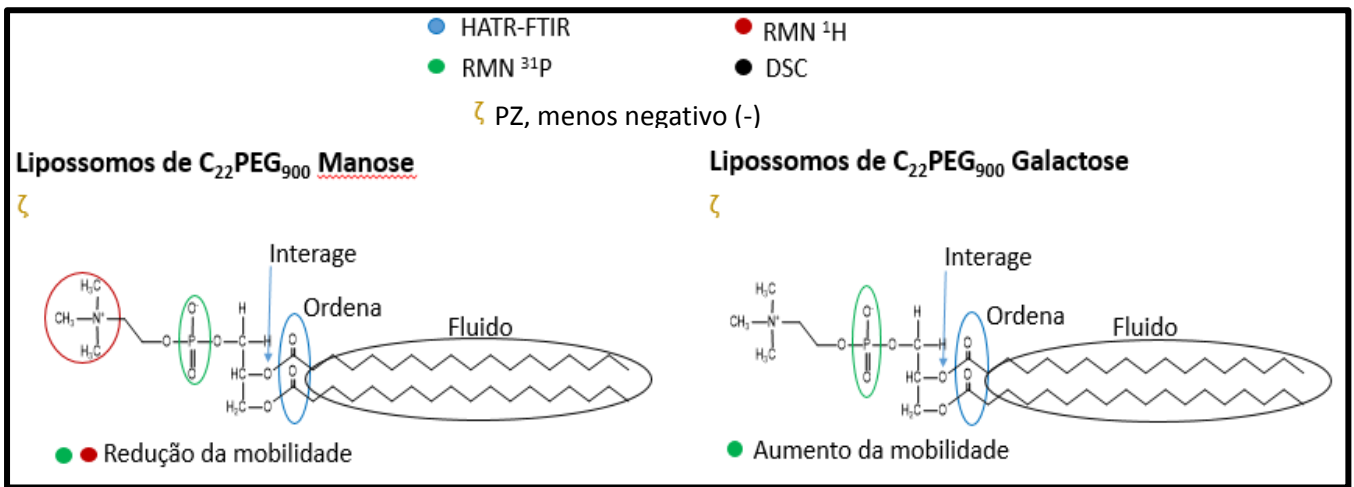
Os valores de PDI (**Tabela 14**) indicaram a homogeneidade das vesículas do tipo LUVs, ou seja, quanto o diâmetro dos lipossomos, desviaram da média (ELSAYED *et al.*, 2011).

**Tabela 14:** Influência dos polímeros e da proteína no diâmetro das vesículas lipossomais de Aso, em nm.

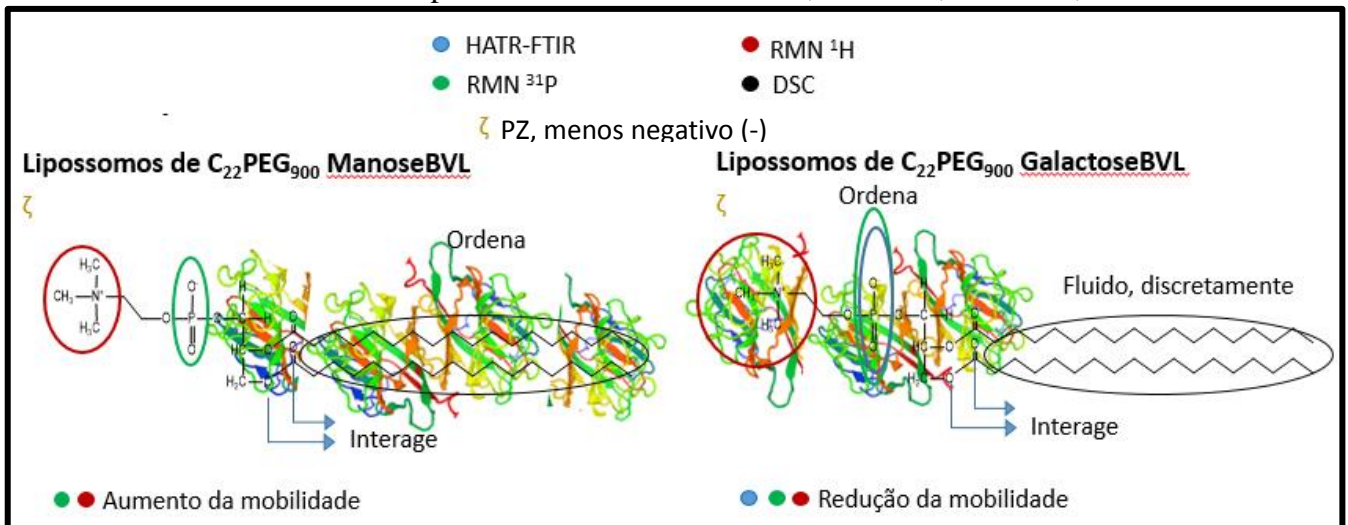
<i>Lipossomos</i>	<i>Diâmetro (nm)</i>	$\bar{X}$	<i>Desvio padrão</i> <i>(diâmetro)</i>	<i>PDI</i>	$\bar{X}$	<i>Desvio</i> <i>padrão (PDI)</i>	$\Delta$ <i>diâmetro</i> <i>(nm)</i>
<i>Aso</i>	587,9; 649,4; 601,2	612,8	$\pm 32,36$	0,787; 0,554; 0,818	0,720	$\pm 0,144$	
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose</i>	603,8; 692,2; 666,6	654,2	$\pm 45,49$	0,832; 0,584; 0,566	0,658	$\pm 0,143$	41,4
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose</i>	462,2; 408,2; 510,2	460,2	$\pm 51,03$	0,968; 0,842; 0,762	0,857	$\pm 0,104$	152,6
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL</i>	1403; 909,5; 936,5	1083	$\pm 277,5$	0,874; 0,689; 0,708	0,757	$\pm 0,102$	428,8
<i>Aso+C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL</i>	1319; 980,5; 975,3	1092	$\pm 196,8$	0,841; 0,925; 0,764	0,843	$\pm 0,843$	631,8

Nos **Quadros 8 e 9** estão representados, as análises das técnicas realizadas nesta dissertação (HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>31</sup>P, DSC e PZ), referente as interações moleculares dos sistemas lipossomais de Aso e seus respectivos polímeros, bem como a influência da BVL nestes, respectivamente.

**Quadro 8:** Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>31</sup>P, DSC e PZ



**Quadro 9:** Resumo da dinâmica molecular das análises dos lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL e AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL por técnicas de: HATR-FTIR, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>31</sup>P, DSC e PZ.



## 6. CONCLUSÃO

O anfifílico C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose interagiu com a membrana lipídica de Aso. Na região polar, permitiu interações entre o grupo colina e o grupo fosfato (PO<sub>2</sub><sup>-</sup>) do lipídio mais próximo. Pelos dados de RMN <sup>1</sup>H e <sup>31</sup>P, esta interação causou a redução da mobilidade da região polar; na interface lipídica, também foi constatado o ordenamento da mesma em função da adição deste polímero; observou-se também o aumento discreto da mobilidade na cadeia de hidrocarbonetos (região hidrofóbica) lipídica. A fluidez na região de apolar, bem como a interação do polímero na região polar e interface podem ser responsáveis pelo aumento do diâmetro dos lipossomos. Portanto, o C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, está localizado preferencialmente na região de interface e região polar. Esta preferência pode influenciar em tornar mais positiva a carga superficial da membrana, considerando uma reorientação do grupo colina. Tal funcionalização, permite aos lipossomos maior estabilidade, para que os carreadores lipídicos permaneçam mais tempo na corrente sanguínea, além de aumentar os sítios de reconhecimento para a incorporação da BVL (AWSTHI *et al.*, 2004; SHARON *et al.*, 1993; ULRICH *et al.*, 2002).

O anfifílico C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose ordenou a região de interface de lipossomos de Aso, como também observado nos estudos com lipossomos contendo AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, porém suas interações foram mais fortes, permitindo assim um empacotamento mais efetivo e reduzindo o diâmetro do sistema. O aumento do potencial de superfície da membrana, assim como observado para o polímero C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose no lipossomo de Aso, permite maior estabilidade ao retardar a atuação de captura deste sistema vetorizador (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose) pelos macrófagos (BATISTA *et al.*, 2007; ULRICH *et al.*, 2002). Além de aumentar os sítios de reconhecimento para a incorporação da BVL.

A BVL quando foi integrada nos lipossomos compostos por AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, interagiu com a interface e ordenou região apolar lipídicas. O polímero em questão viabilizou a expansão da proteína, para mais internamente na membrana, de forma, que o lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose aumentou consideravelmente o diâmetro das LUVs e potencial de superfície da membrana.

A BVL ao integrar a membrana lipídica composta pelo AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, propiciou ordenamento da região polar (grupo colina, N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, e fosfato, PO<sub>4</sub><sup>-2</sup>). Tal ordenamento foi responsável pelo aumento expressivo das vesículas LUVs, a partir da

possibilidade de interação entre a BVL com este sistema lipossomal. A proteína aumentou discretamente o potencial de superfície do sistema lipossomal de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, quando comparado à incorporação desta mesma proteína nos lipossomos Aso associados de C<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose.

Apesar da similaridade das estruturas e das características físico-químicas, os glicídios manose e galactose que constituem os respectivos polímeros possuem a capacidade de reconhecer e interagir com a BVL de formas distintas. Enquanto que a BVL interage em lipossomos de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose na região de interface e na região de hidrocarbonetos, no lipossomo contendo AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, a BVL interage na região polar e interface lipídicas. Deste modo, a BVL quando em um sistema lipossomal de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Manose, pode ser utilizada como um fármaco com maior tempo de meia vida dentro do lipossomo. Ao aumentar a carga superficial da membrana, a BVL também aumenta a probabilidade do lipossomo ficar por um maior período de tempo na circulação sanguínea. Ao aumentar o potencial deste sistema para valores mais positivos, a lectina pode atuar de forma eficiente em células mais negativamente carregadas, tais como as tumorais. A proteína ao está localizada mais internamente, em uma região empacotada (região apolar) do lipossomo, pode permanecer na membrana lipossomal até a chegada deste sistema a célula alvo.

Quando a BVL compõe um lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>Galactose, a proteína aumenta a carga superficial da membrana, e assim também aumenta a probabilidade deste ficar por um maior período de tempo na circulação sanguínea. Localizada mais na superfície da membrana (AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL), a proteína pode reconhecer mais facilmente glicoproteínas presentes em tecidos-alvo do organismo, quando comparado ao sistema lipossomal de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>ManoseBVL. Desta forma, o lipossomo de AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GalactoseBVL pode ser usado como um sistema vetorizador, e carrear um outro fármaco, que esteja localizado na região hidrofóbica, ou no compartimento aquoso do lipossomo.

Assim sendo, os resultados obtidos contribuem para a escolha adequada de materiais de forma a aumentar a eficiência do sistema composto por lipídio, polímero glicosilado e BVL, seja como agente terapêutico (BVL como um fármaco) ou como um sistema vetorizador para carrear fármacos antitumorais. O uso destes polímeros, aumentam o tempo de meia-vida do lipossomo no organismo, diminui a sua toxicidade e protege as vesículas dos atritos ao passar pelos poros das membranas (AWSTHI *et al.*, 2004; BARENHOLZ, 2012; FRÉZARD *et al.*, 2005; LIM *et al.*, 2008). Este trabalho

sugere perspectivas no âmbito de averiguar a atividade antitumoral de sistemas compostos por AsoC<sub>22</sub>PEG<sub>900</sub>GlicídioBVL, bem como a de tais sistemas associados a um segundo fármaco antitumoral de forma a detectar possível efeito sinérgico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T. M., AUSTIN, G.A., CHONN, A., LIN, L., LEE, K. C. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: Influence of liposome composition and size. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1061, p. 56-57, 1991.

ALONSO, M. J., LOSA C., CALVO, P., VILA-JATO, J. L. Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 68, p. 69-76, 1991.

AMBROSI, N., CAMERON, N. R., DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic Biomolecular Chemistry.**, v. 3, p. 1593-1608, 2005.

ATKINS, P., DE PAULA, J. **Físico-química**. Tradução da 8ª Ed. Rio de Janeiro. v. 2, 2008.

ATKINS, P., DE PAULA, J. FRIEDMAN, R. Quanta, Matéria e Mudança. Uma Abordagem Molecular para a Físico-química. Tradução do V. 1. Rio de Janeiro. LTC v. 1, 2008.

AWASTHI, V. D., GARCIA, D., KLIPPER, R., GOINS, B. A., PHILLIPS, W. T. Neutral and anionic liposome-encapsulated hemoglobina: effect of post-inserted poly (ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine on distribution and circulation kinetics. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 309, p. 241-248, 2004.

BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M., WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v. 13, p. 238, 1965.

BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences.**, Oxford, v. 13, p. 480-482, 1988.

BATISTA, M. C., CARVALHO, C. M. B., MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v. 43, p. 2, 2007.

BOROWSKI, F. W. S. From beans to weapon: The discovery of ricin. **Scientia.**, 2012.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste especialmente do Ceará. Fortaleza: Imprensa Oficial, 2ª Ed., p. 425, 1960.

BARENHOLZ, Y. Doxil (R)-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of Controlled Release.** v.2, p. 117-134, 2012.

BROCKSOM, T. J., DANATONI, M. C., ULIANA, M. P., VIEIRA, Y. W. A reação de Diels-Alder no início do século vinte um. **Quim. Nova.**, v. 33, p. 2211-2218, 2010.

CALVO, P., GOURITIN, B., CHACUN, H., DESMAELE, D., D'ANGELO, J., NOEL, J. P., GEORGIN, D., FATTAL, E., ANDREUX, J. P., COUVREUR. Long-circulating

PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. **Pharm. Res.**, v. 18, p. 1157-66, 2001.

CAMPBELL, M. K., FARREL, S. O. **Bioquímica básica**. 5ª Ed. São Paulo: Cengage Learning. v. 1, 2011.

CARIBÉ, J. & CAMPO, A. J. M. Plantas que ajudam ao homem: Guia prático para a época atual. **Cultrix / Pensameno.**, p.321, 1991.

CAREY, F. A. Química Orgânica. 7ª Ed. AMGH Ltda. v. 2, 2011.

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.

CASTELLI, F., TROMBETTA, D., TOMAIANO, A., BONINA, F., ROMEO, G., UCCELLA, N., SAIJA, A. Dipalmitoylphosphatidylcholine/ linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. **J.Pharmacol. Toxicol.**, v. 37, p. 135-141, 1997.

CEVC, G. Hydration force and the interfacial structure of the polar surface. **Chem.Soc. Faraday Trans.**, v. 97, p. 2733–2739, 1991.

CHAKRABORTY, S., STALIN, S. Das N., CHOUDHURY, S. T., GHOSH, S., SWARNAKAR, S. **Biomaterials**, v.33, p. 2991-3001, 2012.

CHENG, C-Y., SONG, J., PAS, J., MEIJER, L. H. H., HAN, S. DMSO Induces dehydration near lipid membrane surfaces. **Biophysical Journal**, v. 109, p. 330-339, 2015.

CHANG, R., Físico-Química- Para as Ciências Químicas e Biológicas. 3ª Ed. AMGH Ltda. v. 2, 2010.

CHORILLI, M., RIMEIRO, T. C., OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V. Stability study of small unilamellar liposomes with caffeine by turbidity. **Rev. Bras. Farm.**, v. 4, p. 88, 2007.

CLARKE, R. J. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 89–90, p. 263–281, 2001.

COELHO, L. C. B. B. & SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of Bauhinia monandra. **Phytochem.**, v. 11, p. 295–300, 2000.

CRUZ, G. L., Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 3ª Ed., p.559, 1985.

DAL-BÓ, A.G, SOLDI, V., GIACOMELLI, F. C., TRAVELET, C., BORSALI, R., FORT, S. Synthesis, micellization and lectin binding of new glycosurfactants. **ScienceDirect.**, v. 31-36, p. 397, 2014.

DAL-BÓ, A. G., SOLDI, V., GIACOMELLI, F. G., JEAN, B., PIGNOT-PAINTRAND, I., BORSALI, R., FORT S. Self-assembled carbohydrate-based micelles for lectin targeting. **Soft Matter.**, v. 7, p. 3453-3461, 2011.

DE LIMA, V. R., CARO, M. S. B., MUNFORD, M. L., DESBAT, B., DUFOURC, E.J., PASA, A., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Influence of melatonina on the order of phosphatidylcholine based membranes. **J. Pineal Res.**, v. 49, p. 169-175, 2010.

DE LIMA, V. R., CARO, M. S. B., TAVARES, M. I. B., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms. **Jornal of Pineal Research.**, v. 43, p. 276-282, 2007.

DISALVO, E. A., BOUCHET, A. M. Electrophoretic mobility and zeta potential of liposomes due to arginine and polyarginine adsorption. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.**, v. 440, p. 170-174, 2014.

DOS SANTOS, M. C., MICHELETO, Y. M. S., DA SILVEIRA, N. P., PINTO, L. da S., GIACOMELLI, F. C., DE LIMA, V. R., FRIZONE, T. E. A., DAL-BÓ, A. G. Self-assembled carbohydrate-based vesicles for lectin targeting. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 148, p. 12-18, 2016.

DUFOURC, E. J., MAYER, C., STOHRER, J., ALTHOFF, G., KOTHEL, G. Dynamics of phosphate head groups in biomembranes: Comprehensive analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements. **Biophys. J.**, v. 61, p. 42-57, 1992.

DWEK, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. **Chem. Rev.**, v. 96, p. 683-720, 1996.

EGBARIA, K., WEINER, N. Topical application of liposomal preparation. **Cosm.Toil**, v. 106, p. 79-93, 1991.

ELORZA, B., ELORZAI, M., SAINZ, M., CHANTRES, J. Analysis of the particle size distribution and internal volume of liposomal preparations. **J. Pharm. Sci.**, v. 82, p. 1160-1163, 1993.

ELSAYEDI, M. M. A., CEVC, G. Turbidity Spectroscopy for Characterization of Submicroscopic Drug Carriers, Such as Nanoparticles and Lipid Vesicles: Size Determination. **Pharm Res.**, v. 28, p. 2204-2222, 2011.

FATOUROS, D. G., ANTIMISIARIS, S. G. Effect of Amphiphilic Drugs on the Stability and Zeta-Potential of Their Liposome Formulations: A Study with Prednisolone, Diazepam, and Griseofulvin. **Journal of Colloid and Interface Science.**, v. 251, p. 271-277, 2002.

FRÉZARD, F., SCHETTINI, D. A., ROCHA, O. G. F., DEMICHELI, C. LIPOSSOMAS: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FARMACOLÓGICAS, APLICAÇÕES NA QUIMIOTERAPIA À BASE DE ANTIMÔNIO. **Quim. Nova.**, v. 28, p. 511-518, 2005.

FU, L., ZHOU, C., YAO, S., YU, J., LIU, B., BAO, J. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**., v. 43, p. 1442-1449, 2011.

GABIUS, H. J. Non-carbohydrate binding partners/domains of animal lectins. **International Journal of Biochemistry**., v. 80, p. 131-135, 1994.

GHOSH, R. <sup>31</sup>P and <sup>2</sup>H NMR Studies of Structure and Motion in Bilayers of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine. **Biochemistry**., v. 27, p. 7750-7758, 1988.

GIACOMELLI, C., SCHMIDT, V., AISSOU, K., BORSALI, R. Block Copolymer Systems: From Single Chain to Self-Assembled Nanostructures. **Langmuir**., v. 26, p. 15734-15744, 2010.

GOLDSTEIN, I. J, HUGHES, R. C, MONSIGNY, M., OZAWA, T., SHARON, N. What should be called a lectin. **Nature**., v. 285, p. 66-66, 1980.

HEROLD, D. A, KEIL, K., BRUNS, D. E. Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase. **Biochem Pharmacol.**, v. 38, p. 73, 1989.

HOHNE, G. W. H., HEMMINGER, W., FLAMMERSHEIM, H. J. Differential scanning calorimetry : an introduction for practitioners. Germany: Springer, 1996.

HOPE, M. J., BALLY, M. B., MAYER, L. D., JANOFF, A. S., CULLIS, P. R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. **Chem. Phys. Lipids**., v. 40, p. 89-107, 1986.

HOUK, K. N., JAVIER, G., LI, Y. Pericyclic Reaction Transition States: Passions and Punctilios. **Chem. Res.**, v. 28, p. 81-90, 1995.

JAYARAM, B., DHINGRA, P., LAKHANI, B., SHEKHAR, S. Bhageerath-Targeting the near impossible: Pushing the frontiers of atomic models for protein tertiary structure prediction. **Journal Chemical Sciences**., v. 124, p. 83-91, 2012.

KLAUDA, J. B., ROBERTS, M. F., REDFIELDZ, A. G., BROOKS, B. R., PASTOR, R. W. Rotation of Lipids in Membranes: Molecular Dynamics Simulation, <sup>31</sup>P Spin-Lattice Relaxation, and Rigid-Body Dynamics. *Biophysical Journal*, v. 94, p. 3074-3083, 2008.

KOMATSU, H., OKADA, S. Etanol-induced aggregation and fusion of small phosphatidylcholine liposome: participation of interdigitated membrane formation in their processes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1235, p. 270-280, 1995.

LAMPRECHT, A., UBRICH, N., HOMBREIRO P. M., LEHR, C., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**., v. 184, p. 97-105, 1999.

LAOINI, A., JAAFAR-MAALEJ, C., LIMAYEM-BLOUZA, I., SFAR, S., CHARCOSSET, C., FESSI, H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**. v. 1, p. 147-168, 2012.

LASIC, D. D. Liposomes: from physics to applications. 1<sup>a</sup> Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1993.

LASIC, D. D. Recent developments in medical applications of liposomes: sterically stabilized liposomes in cancer therapy and gene delivery in vivo. **J. Control. Release.**, v. 48, p. 203-222, 1997.

LASIC, D. D., PAPAHAJIOPOULOS, D. Medical applications of liposomes. Amsterdam, Elsevier Science, 1998.

LAVERMAN, P., BOERMAN, O. C., OYEN, W. J. G., DAMS, E. Th. M., STORM, G., CORSTENS, F. H. M. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 37, p. 225-235, 1999.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2<sup>a</sup>. Ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LEPORE, L. S.; ELLENA, J. F.; CAFISO, D. S. Comparison of the lipid acyl chain dynamics between small and large unilamellar vesicles. **Biophys. J.**, v. 61, p. 767-775, 1992.

LIM, Y. B., MOON, K. S., LEE, M. Recent Advances in Functional Supramolecular Nanostructures Assembled from Bioactive Building Blocks. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p. 925-934, 2009.

LIS, L. J., McALISTER, M., FULLER, N., RAND, R. P., PARSEGAN, V.A. Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes. **Biophys. J.**, v. 37, p. 657-666, 1982.

LIS, H., SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry.**, v. 55, p. 35-67, 1986.

LIS, H., SHARON, N. Lectins; Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Review.**, v. 98, p.637-674, 1998.

MAKHLOF, A., FUJIMOTO, S., TOZUKA, Y., TAKUCHI, H. In vitro and in vivo evaluation of WGA-carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.**, v. 77, p. 216-224, 2011.

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

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

MAZA, A. & PARRA, J. L. Changes in phosphatidylcholine liposomes caused by a mixture of Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1300, p. 125-134, 1996.

MAZA, A. & PARRA, J.L. Vesicle-micelle structural transition of phosphatidylcholine bilayers and Triton X-100. **Biochem. J.**, v. 303, p. 907-914, 1994.

McELHANEY, R. N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 30, p. 229-259, 1982.

MELO, J. O. F., DONNICI, C. L., AUGUSTI, R., FERREIRA, V. F., DE SOUSA, M. C. B. V., FERREIRA, M. L. G., CUNHA, A. C. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Quím. Nova.**, v. 29, p.3, 2006.

MEEROVICH, G. A., MEEROVICH, I. G., PEVGOV, V. G., LUKYANETS, E. A., OBOROTOVA N. A., GUREVICH, D. G., ZORIN, A. A., DERKACHEVA, V. M., SMIRNOVA, Z. S., LOSCHENOV, V. B., VOROZHISOV, G. N., BARYSHNIKOV, A. YU. (2008) Influence of liposome size on accumulation in tumor and therapeutic efficiency of liposomal near-ir photosensitizer for PDT based on aluminum hydroxide tetra-3-phenylthiophthalocyanine. **NSTI**, v. 2, p. 41-44, 2008.

MERTINS, O., LIONZO, M. I. Z., MICHELLETO, Y. M. S., POHLMANN, A. R., SILVEIRA, N. P. D. Chitosan effect on the mesophase behavior of phosphatidylcholine supramolecular systems. **Elsevier.**, v. 29, p. 463-469, 2009.

MERTINS, O., SCHNEIDER, P. H., POHLMANN, A. R., DA SILVEIRA, N. P. Interaction between phospholipids bilayer and chitosan in liposomes investigated by <sup>31</sup>P NMR spectroscopy, Colloids. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces.**, v. 75, p. 294-299, 2010.

MEYER, J., WHITCOMB, L., COLLINS, D. Efficient encapsulation of proteins within liposomes for slow release in vivo. **Biochem. Biophys.**, v. 199, p. 433-438, 1994.

MEYERS, D. Surfaces, Interfaces, and Colloids: **Principles and Applications**. 2<sup>a</sup> Ed. New York: Wiley-VCH, 1999.

MICHELLETO, Y. M. S., SILVEIRA, N. P., BARBOZA, D. M., SANTOS, M. C., DE LIMA, V. R., GIACOMELLI, F. C., MARTINEZ, J. C. V., FRIZON, T. E. A., DAL BÓ, A. G. Investigation of self-association between new glycosurfactant N-acetyl-β-D-glucosaminyl-PEG-docosanate and soybean phosphatidylcholine into vesicles. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.**, v. 467, p. 166-172, 2015.

MOREIRA, G. M. S. G., CONCEIÇÃO, F. R., McBRIDE, A. J. A., PINTO, L. S. Structure Predictions of Two Bauhinia variegata Lectins Reveal Patterns of C-Terminal Properties in Single Chain Legume Lectins. **Plos One.**, v. 8, p. e81338, 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.

MORENO, M. 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.

MOURITSEN, O. G. & JORGENSEN, K. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. **Chemistry and Physics of Lipids.**, v. 73, p. 3-25, 1994.

MÜLLER-GOYMAN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.**, v. 58, p. 343-346, 2004.

NAG, O. K., YADAV, V. R., HEDRICK, A., AWASTHI, V. Post-modification of preformed liposomes with novel non-phospholipid poly(ethylene glycol)-conjugated hexadecylcarbamoylmethyl hexadecanoic acid for enhanced circulation persistence in vivo. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 446, p. 119-129, 2013.

NAGLE, J. F. Theory of the Main Lipid Bilayer Phase Transition. **Annual Review of Physical Chemistry.**, v. 31, p. 157-196, 1980.

NEEDHAM, D., McINTOSH, T. J., LASIC, D. D. Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. **Biochim. Biophys.**, v. 1108, p. 40-48, 1992.

NEW, R. R. C. Liposomes: a practical approach. Oxford: Oxford University Press. p.1-23, 1997.

ONG, S. G. M., MING, L. C., Lee, K. S., YUEN, K. H. Influence of the Encapsulation Efficiency and Size of Liposome on the Oral Bioavailability of Griseofulvin-Loaded Liposomes. **Pharmaceutics**, v. 8, p. 25-42, 2016.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. Tradução da 4ª Ed. note-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PFEIFFER, H., WEICHERT, H., KLOSE, G., HEREMANS, K. Hydration behaviour of POPC/C (12)-Bet mixtures investigated by sorption gravimetry, 31 P NMR spectroscopy and X-ray diffraction. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 165, p. 244-251, 2012.

PINTO, L.S., NAGANO, C.S., OLIVEIRA, T.M., MOURA, T.R., SAMPAIO, A. H., DEBRAY, H., PINTO, V. P., DELLAGOSTIN, O. A., CAVADA, B. S. Purification and

molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **J Biosci.**, v. 33, p. 355-363, 2008.

PINTO, L. S., NETO, M. A., BACARIN, M. A., CASTELLÓN, R. R., GADELHA, T. S., GADELHA, C. A., CAVADA, B. S. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.**, v. 9, p. 385-390, 2005.

POPOVA, A. V. & HINCHA, D. K. Intermolecular Interactions in Dry and Rehydrated Pure and Mixed Bilayers of Phosphatidylcholine and Digalactosyldiacylglycerol: A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. **Biophysical Journal.**, v. 85, p. 1682–1690, 2003.

POPOVA, A. V. & HINCHA, D. K. Thermotropic phase behavior and headgroup interactions of the nonbilayer lipids phosphatidylethanolamine and monogalactosyldiacylglycerol in the dry state. **BMC Biophysics.**, p. 4-11, 2011.

QUI, X. & PIDGEON, C. Membrane Properties of Antiviral Phospholipids Containing Heteroatoms in the Acyl Chains. **Biochemistry.**, v. 33, p. 960-972, 1994.

QUIOCHO, F. A., Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. **Annual Reviews of Biochemistry.**, v. 55, p. 287-315, 1986.

RINI, J. M. Lectin structure; **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.**, v. 24. p. 551-577, 1995.

RODRIGUES, J. S., SANTOS-MAGALHAES, N. S., COELHO, L. C. B. B., COUVREUR, P., PONCHEL, G., GREF, R. Novel core (polyester)-shell (polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release.**, v. 92, p. 103-112, 2003.

ROLLENHAGEN, A., CZANIERA, R., ALBERT, M., WINTERGERST, E. S., REYNOSO-CAMACHO, R., MEJIA, E. G. DE., LOARCA-PINA. Purification and acute toxicity of lectina extracted from therapy bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicology.**, v. 41, p. 21-27, 2003.

SÁNCHEZ, S. V., RABASCOA, A. M., RODRÍGUEZ, M. L. G. Thermal and <sup>31</sup>P-NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in Phosphatidylcholine/Cholesterol liposomes. Comparative <sup>31</sup>P-NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 105, p.14-23, 2013.

SANFORD, S., DBORSHI, R., MELVIN, S. Intracellular pH and the control of multidrug resistance. **Cell Biology.**, v. 91 p. 1128-1132, 1993.

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



SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L., POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726737, 2003.

SEELIG, J. <sup>31</sup>P Nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 515, p. 105-140, 1978.

SELL, A.M. & DA COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum.**, v. 22, p. 297-303, 2000.

SESSA, G. & WEISSMANN, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. **J. Lipid Res.**, v. 9, p. 310-318, 1968.

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.

SHARON, N. Lectins-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochemical Sciences.**, v. 18, p. 221-226, 1993.

SHARON, N. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, v. 268, p. 82-89, 1993.

SHARON, N. & LIS, H. How protein Bind Carbohydrates: Lessons from legume Lectins. **Journal of Agriculture food Chemistry.**, v. 50, p. 6586-6591, 2002.

SHARPLESS, K. B., KOLB, H. C., FINN, M. G. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angew. Chem. Int.**, v. 40, p. 2004–2021, 2001.

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. Singapore: John Wiley & Sons, 1991.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

SKOOG, D.A., HOLLER, F.J., NIEMAN, T.A. **Principles of instrumental analysis**. USA: Hartcourt Brace & Company, 1998.

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

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

TEXTER, J. **Reactions And Synthesis In Surfactant Systems**. Nova York: CRC Press, 2001.

TIMOSHENKO, A.V., LAN, Y., GABIUS, H.J., LALA, P.K. Immunotherapy of C<sub>3</sub>H/He mammary adenocarcinoma with interleukin-2, mistletoe lectin or their combination: effects on tumor growth, capillary leakage and nitric oxide (NO) production. **Eur. J. Cancer.**, v. 37, p. 1910-1920, 2001.

TIMOSZYK, A., GDANIEC, Z., LATANOWICZ, L. Solid State Nucl. Magn. **Reson.**, v. 25, p. 142-145, 2004.

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.

TYRRELL, D. A., HEATH T. D., COLLEY, C. M., RYMAN, B. E. New aspects of liposomes. **Biochimica Biophysica Acta.**, v. 457, p. 259-302, 1976.

ULRICH, A. S. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. **Bioscience Reports.**, v. 22, p. 129, 2002.

VAN, D E. Structure and function of leguminosae lectins, in franz. **Advances in lectin Research, Berlin**: Springer-Verlag, Heidelberg., v. 1, p. 73-134, 1988.

VEMURI, S. & RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharm. Acta Helvetica, Berne.**, v. 70, p.95-111, 1995.

VOLLHARDT, P. & SCHORE, N. E. Química Orgânica: Estrutura e Função Bookman Editora, 1 de jun de 2013- 6.ed.

VONARBOURG, A., PASSIRANI, C., SAULNIER, P., BENOIT, J. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. **Biomaterials, Surrey.**, v. 27, p.4356-4373, 2006.

WILLIAM, I., DRICKAMER, K. STRUCTURAL BASIS OF RECOGNITION LECTIN-CARB OHYDRATE. **Anna Rev. Biochen.**, v. 65, p. 441-73, 1996.

WOODLE, M. C. & LASIC, D. D. Sterically stabilized liposomes. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1113, 171 -99, 1992.

YAMAOKA, T., TABATA, Y., IKADA, Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration in mice. **J. Pharm. Sei.**,v. 83, p. 601-606,1994.

ZALIPSKY, S., Functionalized Poly(ethylene glycol) for Preparation of Biologically Relevant Conjugates. **Bioconjugate Chem.**, v. 6, p. 150-165, 1995.

ZHAO, L., FENG, Si-S., KOCHERGINSKY, N., KOSTETSKII. DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between

paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 338, p. 258-266, 2007.