



**FURG**

**Tese de Doutorado**

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA NAS INTERAÇÕES  
MOLECULARES E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE LIPOSSOMOS  
CONTENDO GENISTEÍNA**

---

**Carla Roberta Lopes de Azambuja Borges**

**PPGQTA**

**Rio Grande, RS - Brasil**

**2018**

**INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA NAS INTERAÇÕES  
MOLECULARES E PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE LIPOSSOMOS  
CONTENDO GENISTEÍNA**

**por**

**Carla Roberta Lopes de Azambuja Borges**

Tese 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 DOUTORA EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil



“... Às vezes a felicidade demora a chegar, aí é que a gente não pode deixar de sonhar. Guerreiro não foge da luta e não pode correr, ninguém vai poder atrasar quem nasceu pra vencer...”  
(Alexandre Assis / Carlos Rodrigues / Gilson Bernini).

“... Não é sobre chegar ao topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu...” (Ana Vilela)

Dedico este trabalho aos meus meninos: Meus filhos Pietro e Lucas Matheu (pulando na barriga), ao meu anjinho (que mesmo permanecendo tão pouco tempo em meu ventre me ensinou infinitas lições) e ao meu esposo e companheiro de todas as horas, Maurício. Sem eles esse caminho teria sido muito mais árduo e essa caminhada não faria tanto sentido. Amo vocês de um tamanho imensurável.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir que minha fé sempre fosse maior que meu medo, por ter me dado forças para vencer todos os obstáculos que me foram impostos e por ter me mantido de pé quando eu não tinha mais forças;

À todos que de alguma forma contribuíram para que este estudo fosse realizado;

À minha orientadora Vânia Lima por toda a parceria ao longo desses muitos anos de caminhada, por me conhecer tão bem e ser sempre tão compreensiva e companheira, por torcer pelo meu crescimento e vibrar com minhas conquistas e por ter me mostrado, nesta caminhada, que eu era capaz de superar limites e trilhar caminhos que nunca antes imaginei ser possível. Dedico-te minha eterna gratidão, respeito e admiração.

Aos professores membros da banca avaliadora, bem como a todos os professores que passaram pelo meu caminho durante essa jornada, contribuindo com meu crescimento enquanto pesquisadora, profissional e pessoa.

À Universidade Federal do Rio Grande e à Escola de Química e Alimentos pelo espaço cedido para que fosse possível a realização deste trabalho e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

Ao meu primogênito Pietro, que tem feito parte dessa caminhada com uma compreensão, uma sensibilidade e uma colaboração inacreditáveis. Obrigada por ter me escolhido pra ter a honra de ser tua mãe (cargo esse a que serei eternamente grata); Obrigada por ser tão compreensivo com minhas ausências e sempre me dizer que vai dar tudo certo quando bate o desespero (sim, é ele quem me conforta com sua maturidade extremamente precoce), por pedir que os amiguinhos falem baixo porque a mamãe está estudando (rsrsrs) e por me preparar o lanche, quando era eu que deveria fazer isso, mas percebe que estou tão envolvida com o trabalho que esqueci que precisamos comer. Enfim... Faltam-me palavras ou sentimentos para expressar o tamanho da força que tu me dá. Amo-te infinitamente meu menino lindo.

Ao meu pacotinho de amor Lucas Matheu por ter trazido novamente cor e luz para minha vida, por ter me mostrado que meu coração pode ainda ser maior para acomodar tanto amor e por estar se comportando tão bem na barriga da mamãe (isso tem facilitado tudo hehehe). Nem te conheço direito e te amo mais do que a mim mesma meu anjinho. Obrigada por ter me escolhido.

Ao meu esposo, companheiro, melhor amigo e eterno amor Maurício Borges muito obrigada por me aguentar 20 horas por dia na frente do computador, por saber a importância que minha carreira acadêmica tem na minha vida e compartilhar comigo os meus sonhos e devaneios. Obrigada por ter sido forte por nós dois e adiado tua dor para auxiliar na minha quando meu mundo desabou e achei que não teria mais forças pra nada e obrigada pelo presente de gerar uma semente do nosso amor e eternizar nossa história. Meu amor e admiração por ti crescem a cada dia mais.

À minha mãe, obrigada por acreditar tanto no meu potencial e se orgulhar (na maioria das vezes de forma exagerada) tanto de mim e obrigada por que sei (que à sua maneira) torce muito pela minha vitória. Obrigada minha companheirinha por estar sempre disposta a ajudar quando preciso. Te amo.

À minha parceira de toda essa jornada e de vida, minha irmã de outros pais Jaqueline Moura por toda parceria e companheirismo, por todas as noites em claro estudando, escrevendo, discutindo química (e foram muitas affff), por ser sempre a pessoa com quem sei que posso contar, obrigada por torcer por mim e vibrar com minhas conquistas.

À minha amiga, companheira e parceira de todas as horas (inclusive as mais dolorosas) e agora comadre Raquel Herreira, jamais terei palavras pra descrever toda gratidão e amor que tenho por ti.

Às sempre parceiras Sabrina, Muriele, Luciana e Cata pela torcida, pelo apoio mental e porque sei que posso contar sempre. Minha gratidão e amor.

Aos meus cunhados e compadres Samantha e Daniel por sempre torcerem pelas minhas conquistas e por confiarem a mim os nossos anjinhos Gustavo e Eitor. Amo vocês.

À minha amada filha gerada no coração Emaquièle, por sempre estar presente na minha vida, torcendo em cada luta e comemorando cada conquista. Amo-te minha princesa. Minha gratidão se estende à sua mãe Emanuele, obrigada minha amiga por toda a torcida sempre.

Ao meu grupo de pesquisa e segunda família GIIMM, obrigada por toda a parceria, obrigada por terem me proporcionado muita aprendizagem e obrigada por terem vivido comigo todas as minhas conquistas acadêmicas e meus piores momentos com um amor e um apoio que foram imprescindíveis. Em especial às minhas queridas Marinalva, Desirée e Nichole: Vocês são incríveis e as levarei eternamente no meu coração e na minha vida.

À Dona Maria e à Paulinha por me socorrerem nas horas de correria cuidando do meu filho Pietro com tanto carinho, meus sinceros agradecimentos.

Á todos aqueles que sabem que são especiais na minha vida e que certamente esquecerei porque não seria eu se não esquecesse (hehehehe), muito obrigada.



# SUMÁRIO

---

SUMÁRIO .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	xix
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	xxiv
2.1. GENISTEÍNA (Gen) .....	xxiv
2.2. LIPOSSOMOS E DINÂMICA LIPÍDICA .....	xxvi
2.3. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA LIPÍDICA DE MEMBRANAS xxxiv	xxxiv
3. OBJETIVOS .....	xxxviii
3.1. OBJETIVO GERAL .....	xxxviii
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	xxxviii
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	xl
4.1. REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	xl
4.2. MÉTODOS .....	xli
4.2.1. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMOS E ENCAPSULAMENTO DA GENISTEÍNA .....	xli
4.2.2. QUANTIFICAÇÃO DA MÁXIMA CONCENTRAÇÃO DE GENISTEÍNA INCORPORADA NOS LIPOSSOMOS (CONCENTRAÇÃO DE SATURAÇÃO) .....	xliii
4.2.3. ENSAIOS DE HATR-FTIR .....	xliv
4.2.4. MEDIDAS DE RMN DE <sup>31</sup> P E RMN DE <sup>1</sup> H .....	xlv
4.2.5. MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA .....	xlv
4.2.6. ENSAIOS COM ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO .....	xlvi
4.2.7. MEDIDAS DE DSC.....	xlvi
4.2.8. MEDIDAS DE TURBIDEZ .....	xlvii
4.2.9. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> .....	xlvii
4.2.10. ENSAIOS ANTITUMORAIS <i>IN VITRO</i> .....	xlviii

4.2.10.1.	CULTURA CELULAR E TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> .....	xlviii
4.2.10.2.	CONTAGEM CELULAR E MTT .....	xliv
4.2.10.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS ANTITUMORAIS .....	xliv
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	I
5.1.	<b>DETERMINAÇÃO DA MÁXIMA CONCENTRAÇÃO (CONCENTRAÇÃO DE SATURAÇÃO) DE GENISTEÍNA NOS LIPOSSOMOS FAZER ESTATISTICA .....</b>	<b>I</b>
5.2.	<b>AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA GENISTEÍNA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIPOSSOMOS .....</b>	<b>liv</b>
5.2.1.	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA NA REGIÃO POLAR DOS LIPOSSOMOS .....	lx
5.2.1.1.	ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMOS CONTENDO GENISTEÍNA A PARTIR DAS CARGAS DA REGIÃO POLAR E ANÁLISE DO TAMANHO VESICULAR.....	lxxvii
5.2.2.	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA NA REGIÃO DE INTERFACE DOS LIPOSSOMOS .....	lxxix
5.2.3.	AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA NA REGIÃO HIDROFÓBICA DOS LIPOSSOMOS .....	lxxxi
5.3.	<b>MEDIDAS DE TURBIDEZ ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>xc</b>
5.4.	<b>CONSIDERAÇÕES SOBRE O EFEITO DA GENISTEÍNA NA DINÂMICA LIPÍDICA DAS DIFERENTES REGIÕES DOS LIPOSSOMOS DE DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% E DMPC/POPC 10%.....</b>	<b>xciii</b>
5.5.	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DE LIPOSSOMOS CARREGADOS COM GENISTEÍNA ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>xcix</b>
5.6.	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i> DE LIPOSSOMOS CONTENDO GENISTEÍNA .....</b>	<b>civ</b>
5.6.1.	CONTAGEM CELULAR .....	civ
5.6.2.	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - MTT .....	cvii
6.	CONCLUSÕES .....	CX
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	CXIV

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1. Estrutura da genisteína (5,7,4' trihidroxiisoflavona).....XX
- Figura 2. Representação estrutural de um lipossomo .....XXi
- Figura 3. Representação estrutural de uma fosfatidilcolina ..... XXI
- Figura 4. Estrutura geral de uma isoflavona nas formas glicosilada e aglicona ..... XXiv
- Figura 5. Características estruturais da gen, responsáveis por sua capacidade de reagir com radicais livres e quelar metais..... XXv
- Figura 6. Estrutura do estrogênio ..... XXvi
- Figura 7. Fases e configurações resultantes da auto- organização dos fosfolipídios em solução aquosa ..... XXvii
- Figura 8. Influência da composição lipídica na configuração das vesículas ..... XXviii
- Figura 9. Estrutura da dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC, C14:0)..... XXX
- Figura 10. Estrutura da palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (POPC, C16:0/ C18:1)..... XXX
- Figura 11. Estrutura do colesterol (CHOL) ..... XXXi
- Figura 12. Representação da dinâmica conformacional dos lipídios..... XXXii
- Figura 13. Representação da transição de fase principal dos lipídios ..... XXXiii
- Figura 14. Esquema de preparação de lipossomos pelo método de evaporação por fase reversa ... XLii
- Figura 15. Esquema para ensaio de determinação da máxima concentração de Gen incorporada nos lipossomos (concentração de saturação) ..... XLiii
- Figura 16. Esquema representativo do ensaio de HATR-FTIR .....XLiv
- Figura 17. Curvas de saturação da genisteína (Gen) incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/ CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/ POPC 10%) ..... Li
- Figura 18. Influência da composição lipídica no encapsulamento de Gen em lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/ CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/ CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/ POPC 10%) ..... Liii
- Figura 19. Espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/ CHOL 10%), puros e contendo Gen ..... Lvi

- Figura 20. Espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/ CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil-oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/ POPC 10%), puros e contendo Gen ..... Lvii
- Figura 21. Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/ CHOL 10%), puros e contendo Gen na região do  $PO_2^-$  ..... LXiii
- Figura 22. Variações nos valores de largura de banda dos picos específicos presentes nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil-oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%). ..... LXv
- Figura 23. Espectros de RMN de  $^{31}P$  de lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/ CHOL 10%), puros e contendo Gen.....LXvii
- Figura 24. Espectros de RMN de  $^{31}P$  de lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/ CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil-oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/ POPC 10%), puros e contendo Gen .....LXviii
- Figura 25. Curvas referentes à recuperação dos sinais de FID dos hidrogênios da colina (3,2 ppm) nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/ CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/ CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/ POPC 10%), puros e contendo Gen. LXXi
- Figura 26. Variações nos valores de  $T_1$  dos H presentes nos grupos colina, provocadas pela incorporação de Gen nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/ CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/ CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/ POPC 10%) .....LXXiii
- Figura 27. Representação esquemática de diferentes orientações dos grupos colina e fosfato LXXiv
- Figura 28. Representação da interação eletrostática entre o grupo colina presente na molécula de fosfatidilcolina e o grupo fosfato presente na molécula de DNA.....LXXvi
- Figura 29. Localização da molécula de colesterol, entre as bicamadas fosfolipídicas .....LXXX
- Figura 30. Curvas referentes à recuperação do FID dos hidrogênios dos metilenos lipídicos (1-2 ppm) dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/ CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/ CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/ POPC 10%), puros e contendo Gen LXXXiii
- Figura 31. Variações nos valores de  $T_1$  dos H presentes nos metilenos, provocadas pela incorporação de Gen nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/ CHOL 10%),

dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/ CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%) ..... LXXXV

Figura 32. Curvas de DSC dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%), puros e contendo Gen ..... LXXXvii

Figura 33. Influência da Gen (em diferentes razões m/m Gen: lipídios) sobre a turbidez dos lipossomos (a 400 nm) compostos por dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristolfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristolfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristolfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%) ..... XC

Figura 34. Variações nos valores de turbidez dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristolfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%). Dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristolfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%) provocadas pela presença de Gen..... Xcii

Figura 35. Esquema ilustrativo dos efeitos da Gen na dinâmica lipídica de lipossomos compostos por DMPC..... Xcvi

Figura 36. Esquema ilustrativo dos efeitos da Gen na dinâmica lipídica de lipossomos compostos por DMPC/CHOL 10%..... Xcvi

Figura 37. Esquema ilustrativo dos efeitos da Gen na dinâmica lipídica de lipossomos compostos por DMPC/CHOL 40%.....Xcvii

Figura 38. Esquema ilustrativo dos efeitos da Gen na dinâmica lipídica de lipossomos compostos por DMPC/ POPC 10%.....Xcvii

Figura 39. Avaliação da influência da Gen (em diferentes concentrações iniciais), livre e incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%), na redução do radical DPPH ..... c

Figura 40. Atividade antioxidante da Gen livre e incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%), na concentração inicial de 3,6 mg/mL..... ci

Figura 41. Reação entre a genistéina e o radical 2,2 difenil 1-picril hidrazila (DPPH•) dando origem a um radical flavonóide estável e a espécie reduzida difenil-picril-hidrazina )..... ciii

**Figura 42. Contagem celular da linhagem C6, após 48h de tratamento com Gen, livre e incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), nas concentrações de 10, 20 e 100  $\mu$ M. C= células de glioma de rato (C6) e meio de controle (DMEM); CV= DMSO; CD= lipossomos de DMPC puros e; CDC= lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros. ... civ**

**Figura 43. Ensaio de viabilidade celular por MTT na linhagem C6, após 48h de tratamento com Gen, livre e incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), nas concentrações de 10, 20 e 100  $\mu$ M. C= células de glioma de rato (C6) e meio de controle (DMEM); CV= DMSO; CD= lipossomos de DMPC puros e; CDC= lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros. .... cvii**

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1. Valores de concentração de saturação de Gen em lipossomos compostos por dmPC, DMPC/ CHOL 10%, DMPC/ CHOL 40% e DMPC/ POPC 10%. ..... Lii
- Tabela 2. Atribuições de picos de FTIR, referentes aos modos vibracionais de fosfatidilcolina, colesterol e genisteína. . ..... Lix
- Tabela 3. valores de frequências dos grupos lipídicos específicos nos lipossomos de DMPC, DMPC/ CHOL 10%, DMPC/ CHOL 40% e DMPC/ POPC 10%, puros e contendo Gen. .... LXi
- Tabela 4. Valores de larguras de banda de FTIR referentes aos estiramentos axiais de grupos lipídicos específicos nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen .....LXiv
- Tabela 5. Influência da genisteína na anisotropia do deslocamento químico de lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%.. ..... LXX
- Tabela 6. Valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) dos hidrogênios presentes no grupo colina, dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen .....LXXii
- Tabela 7. Valores de Potencial Zeta dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen .....LXXiv
- Tabela 8. Diâmetro dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen ..... LXXvii
- Tabela 9. Valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) dos hidrogênios presentes nos metilenos dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen.....LXXXiv
- Tabela 10. Valores de temperatura de transição de fase principal ( $T_m$ ) dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen LXXXviii
- Tabela 11. Valores de turbidez dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10% puros e contendo Gen (concentração inicial 3,6 mg/ml) ..... Xci
- Tabela 12. Representação da intensidade dos efeitos da Gen (relacionados à ordem das membranas), em cada região específica (polar, interface e apolar) dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, onde F (forte), M (moderada) e D (discreta) .....Xcviii
- Tabela 13. Avaliação do potencial antioxidante da Gen, na sua forma livre e incorporada nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10% ci

**Tabela 14. Redução no número de células viáveis (via contagem celular), provocada por ação da Gen (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) livre e incorporada em lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%..... cv**

**Tabela 15. Redução da viabilidade de C6 (via MTT), provocada por ação da Gen (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) livre e incorporada em lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10% .. cviii**



## RESUMO

---

---

### **Título: Influência da composição lipídica nas interações moleculares e propriedades biológicas de lipossomos contendo genisteína**

Autora: Carla Roberta Lopes de Azambuja Borges

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Rodrigues de Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosilene Maria Clementin

Neste trabalho, realizou-se a incorporação e quantificação de genisteína (Gen) em lipossomos de diferentes composições lipídicas, assim como a caracterização das propriedades físico-químicas e biológicas destes sistemas. Três constituições lipossomais foram avaliadas: dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC); DMPC associada a colesterol (CHOL) em diferentes concentrações; DMPC associada à palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC). As propriedades físico-químicas foram caracterizadas segundo as interações moleculares da Gen em regiões específicas das membranas lipossomais, através de Infravermelho com Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada Horizontal (HATR- FTIR), Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo (RMN de  $^{31}\text{P}$ ) e de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ), Potencial Zeta, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) e Espectroscopia de Ultravioleta-visível (UV-vis). Os potenciais *in vitro* antioxidantes e antitumorais dos sistemas foram monitorados por métodos colorimétricos DPPH e MTT, assim como por contagem celular. Na concentração inicial de 3,6 mg/mL, a Gen ordenou todas as regiões dos lipossomos compostos por DMPC e DMPC/CHOL. No sistema contendo POPC, a Gen ordenou o grupo fosfato e desordenou a colina lipídica e as regiões de interface e hidrofóbica dos lipídios. A incorporação de Gen em todos os sistemas lipossomais testados aumentou a sua atividade antioxidante via redução do radical livre DPPH quando comparado à sua forma livre em solução. A maior atividade antioxidante foi observada quando a Gen (3,6 mg/mL) foi incorporada em lipossomos de DMPC contendo 10% de CHOL (DMPC/CHOL 10%), sendo tal atividade 26,22% superior à atividade de Gen na forma livre. Nesta mesma constituição lipídica, o sistema lipossomal contendo Gen na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , reduziu o número de células de glioma viáveis em 93,75%. Através do ensaio de MTT, o sistema DMPC/CHOL 10% contendo 100  $\mu\text{M}$  de Gen reduziu a viabilidade celular em 84,40%, valor similar ao observado em Gen contido em lipossomos de DMPC. Foi avaliada a sensibilidade dos sistemas lipossomais, à ação da Gen, de acordo com a influência da composição lipídica, a fim de contribuir no design de sistemas de liberação prolongada de Gen mais eficientes para o tratamento de tumores, tais como os gliomas.

Palavras- chave: genisteína, lipossomos, caracterização, espectroscopia, antitumoral, antioxidante.

## ABSTRACT

---

---

**Title: Influence of lipid composition on molecular interactions and biological properties of genistein-containing liposomes**

Author: Carla Roberta Lopes de Azambuja Borges

Advisor: Vânia Rodrigues de Lima, Ph.D.

Co- Advisor: Rosilene Maria Clementin, Ph.D.

In this work, the incorporation and quantification of genistein (Gen) into liposomes of different lipid compositions was carried out, and the physicochemical and biological properties of these systems were characterized. Three liposomal constitutions were evaluated: dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC); DMPC associated with cholesterol (CHOL) in different concentrations; and DMPC associated with palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine (POPC). The physicochemical properties were characterized according to the molecular interactions of Gen in specific regions of the liposomal membranes, through Fourier Transform Infrared with Horizontal Attenuated Total Reflectance (HATR-FTIR), Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance ( $^{31}\text{P}$  NMR) and Hydrogen ( $^1\text{H}$  NMR), Zeta Potential, Dynamic Light Scattering (DLS), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy. The *in vitro* antioxidant and antitumor potentials of the systems were monitored by colorimetric methods DPPH and MTT, as well as by cell counting. At the initial concentration of 3.6 mg / mL, Gen ordered all regions of the liposomes composed of DMPC and DMPC/CHOL. In the POPC-containing system, Gen ordered the lipid phosphate and disordered the choline, as well as interfacial carbonyl and hydrophobic methylene regions of the lipids. The incorporation of Gen in all the liposomal systems increased its antioxidant activity against DPPH when compared to its free form in solution. The highest antioxidant activity was observed when the Gen (3.6 mg/mL) was incorporated in DMPC liposomes containing 10% CHOL (DMPC/CHOL 10%), which was 26.22% higher than the free Gen. In this same lipid constitution, the liposomal system containing 100  $\mu\text{M}$  Gen, reduced the number of viable glioma cells by 93.75%. Through the MTT assay, the same system reduced cell viability by 84.40%, similar to that observed in Gen contained in DMPC liposomes. The sensitivity of the liposomal systems to the action of Gen, according to the influence of the lipid composition, was discussed in order to contribute to the design of more efficient Gen delivery systems for the treatment of tumors, such as gliomas.

**Keywords:** genistein, liposomes, characterization, spectroscopy, antitumor, antioxidant.

# 1. INTRODUÇÃO

---

Apesar das buscas constantes por novos fármacos antitumorais e dos avanços nas pesquisas científicas, o câncer causa milhões de mortes anualmente no mundo e é a segunda causa de morte em países ocidentais (INCA, 2011; Andresen et al., 2005). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), para o biênio 2018-2019, podem ocorrer cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil por ano (INCA, 2017).

Na região sul, os tumores do sistema nervoso central (SNC) são o oitavo tipo mais frequente entre os homens e o sexto tipo mais frequente entre as mulheres, sem considerar os cânceres de pele não-melanoma. Para o biênio 2018-2019, foram estimados no Brasil, por ano, 5.810 novos casos de câncer do SNC entre os homens e 5.510 entre as mulheres. Dentre os tumores do SNC estão os gliomas, tumores malignos com rápido desenvolvimento e responsáveis por altas taxas de mortalidade, que se originam nas células gliais (astrócitos). Estas protegem, nutrem e dão suporte aos neurônios (INCA, 2017; Krex et al., 2007; Souza et al., 2002).

Estes tumores estão associados a tratamentos agressivos e dificultados pela seletividade da barreira hematoencefálica (BHE), que permite apenas a passagem de moléculas hidrofóbicas e com tamanho inferior a 400 g/mol (INCA, 2015; Krex et al., 2007; Souza et al., 2002). Adicionalmente, a similaridade entre células saudáveis e tumorais dificulta a vetorização de fármacos ao tumor, provocando efeitos colaterais e favorecendo a resistência celular a estes fármacos (Mamot et al., 2003; López- Lázaro, 2002; Hanahan e Weinberg, 2000; Hartwell e Kastan, 1999).

Visto que os processos tumorais estão associados ao estresse oxidativo, a utilização de substâncias antioxidantes pode ser uma potente estratégia na terapia oncológica, pois podem prevenir e auxiliar no combate ao estresse oxidativo e reduzir a toxicidade dos tratamentos quimio- e radioterápicos. Além disso, os antioxidantes auxiliam na redução do tamanho do tumor, o que os torna vantajosos para promover e desenvolver fármacos/ sistemas farmacológicos eficientes e menos tóxicos para o tratamento do câncer (Drisko et al., 2003; Dragan et al., 2003; Hanahan e Weinberg, 2000; Hartwell e Kastan, 1999).

Dentre os antioxidantes naturais com propriedades antitumorais, a genisteína (5,7,4'-trihidroxiisoflavona, Gen, Figura 1), principal isoflavona da soja, tem sido destacada em diferentes estudos, pois tem a capacidade de inibir a progressão de inúmeros tipos de câncer, tais como câncer de mama, próstata, leucemia e cânceres de cabeça (como garganta e cérebro, por exemplo), entre outros (Li et al 2012).

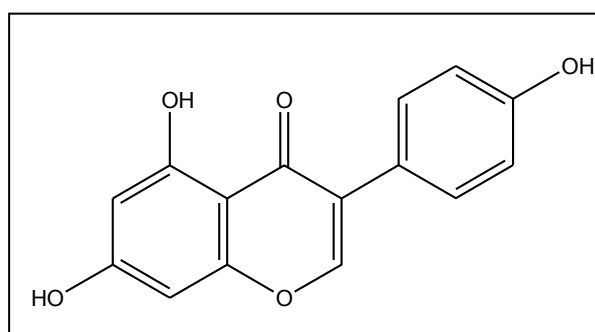


Figura 1: Estrutura da genisteína (5,7,4' trihidroxiisoflavona).

A Gen é uma molécula pequena e hidróbica, o que favorece sua entrada na BHE. No entanto, o seu grau de hidrofobicidade inviabiliza a administração via oral e diminui a biodisponibilidade para tratamento de gliomas (Azambuja et al., 2015; Adjakly et al., 2013; Li et al, 2012; Tsai, 2005; Li et al., 1999; Matsukawa et al., 1993).

A administração de Gen através do uso de sistemas lipossomais (Figura 2) pode aumentar a biodisponibilidade, aumentar a eficácia e facilitar a vetorização desta para células tumorais. Lipossomos são definições coloidais que se organizam em forma de concha esférica, cujos componentes são estruturados em bicamadas. Os lipossomos vetorizam os fármacos antineoplásicos aos tecidos específicos, o que influencia em sua distribuição no organismo, reduzindo as superdosagens e consecutivamente, os efeitos colaterais, além de contribuir na redução de índices de resistência aos medicamentos. Devido a estas características, eles são clinicamente aprovados na terapia antitumoral (Sapra e Allen, 2003; Mamot et al., 2003; Hope et al., 1986).

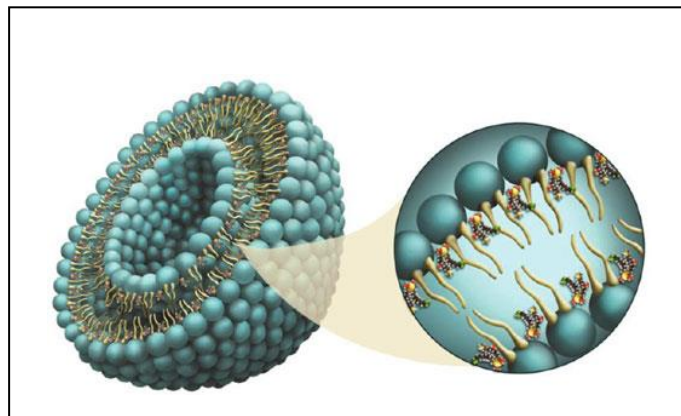


Figura 2: Representação estrutural de um lipossomo.

Lipossomos são majoritariamente compostos de lipídios. Dentre estes, o fosfolípido denominado fosfatidilcolina (Figura 3) é vantajoso por sua alta biocompatibilidade e, como todo fosfolípido, por sua estrutura permitir a incorporação de substâncias polares e apolares em um sistema (Santos e Castanho, 2002; Hope et al., 1986). Existem diferentes tipos de fosfatidilcolinas, em função da(s) constituição(ões) de ácidos graxos presentes em suas cadeias hidrofóbicas.

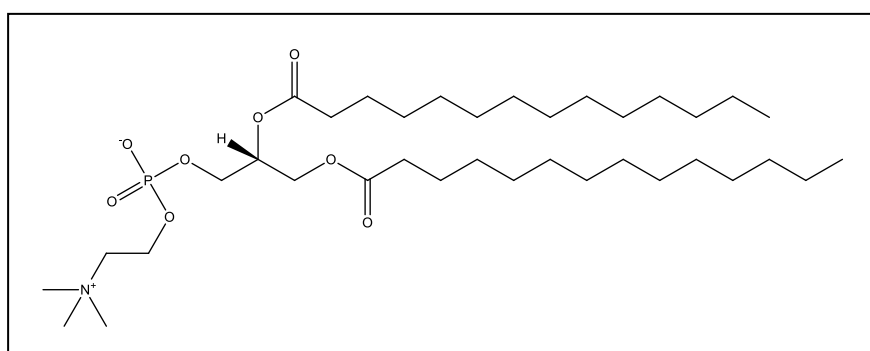


Figura 3: Representação estrutural de uma fosfatidilcolina.

A eficiência de um sistema de liberação prolongada de fármaco está diretamente relacionada com a cinética de liberação do mesmo no tecido alvo. Tal cinética, por sua vez é influenciada pela permeabilidade do sistema como um todo.

A permeabilidade de um sistema lipossomal varia de acordo com a sua constituição lipídica, visto que o número de insaturações e tamanho da cadeia hidrofóbica definem diferentes estados de fase do sistema (Vist e Davis, 1990; Hauser et al., 1981; Ghosh et al., 1973). Sendo assim, diferentes adaptações na composição lipídica podem ser realizadas a fim de modular a permeabilidade dos lipossomos e definir uma cinética de liberação de fármaco específica. Por exemplo, sistemas mais ordenados tendem a liberar o fármaco encapsulado de forma mais prolongada, enquanto que sistemas mais fluidos tendem a propiciar uma liberação maior em um espaço menor de tempo. Tal permeabilidade facilita a difusão do fármaco para o meio externo durante a circulação (Kulkarni et al., 1995).

Lipossomos compostos por fosfolípidios saturados, como o dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC, C 14:0), são menos permeáveis do que lipossomos compostos por fosfatidilcolinas insaturadas, como o palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC, C 16:0/ C 18:1). Neste contexto, podem ser feitas associações de fosfolípidios como DMPC e POPC, respectivamente, ou com outros tipos de lipídio, como o colesterol (CHOL) que tende a aumentar o grau de empacotamento das cadeias graxas e reduzir a permeabilidade do sistema lipossomal, tornando este mais estável (Vist e Davis, 1990; Hauser et al., 1981; Ghosh et al., 1973). Substâncias tais como a Gen, que possuem caráter hidrofóbico também podem alterar as propriedades físico-químicas e interações moleculares de lipossomos, pois interagem diretamente com a bicamada lipídica. Além disso, a composição lipídica pode influenciar nos efeitos provocados pela substância ativa na dinâmica da membrana (Kulkarni et al., 1995; Van Meer e Van Genderen, 1994).

Sendo assim, para desenvolver sistemas de liberação prolongada de fármacos eficientes é preciso caracterizar a influência do fármaco ou da substância ativa nas propriedades dos lipídios que compõem esta membrana (Mouritsen e Jorgensen, 1994).

Com este fim, o estudo das interações moleculares entre fármaco e lipídio(s) dos lipossomos é importante para aprimorar o design dos sistemas lipossomais a ser aplicado a uma terapia específica. Dentre as interações moleculares fármaco/lipossomos podem ser estudadas: localização do fármaco na membrana,

grau de hidratação, isomerização trans-gauche de ligações, parâmetros rotacionais e translacionais, cargas de superfície, e estado de fase (Nogueira et al., 2018; Azambuja et al., 2015; Dimitrios e Sophia, 2002).

Estes estudos podem ser realizados através de técnicas instrumentais, tais como Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada Horizontal (HATR- FTIR), Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo (RMN de  $^{31}\text{P}$ ), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de  $^1\text{H}$ ), Medidas de Potencial Zeta, Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) e Espectroscopia de Ultravioleta-visível (UV-vis).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. GENISTEÍNA (Gen)

As isoflavonas são membros da família dos flavonóides e encontram-se predominantemente nos alimentos sob forma glicosilada, não-absorvíveis pelo organismo humano. Somente as isoflavonas na forma aglicona, ou seja, sem a porção açúcar em sua estrutura, são capazes de atravessar a membrana plasmática. Ao serem consumidas, as isoflavonas presentes na soja são hidrolisadas no intestino e liberam sua correspondente aglicona, biologicamente ativa (Figura 4) (Esteves e Monteiro, 2001).

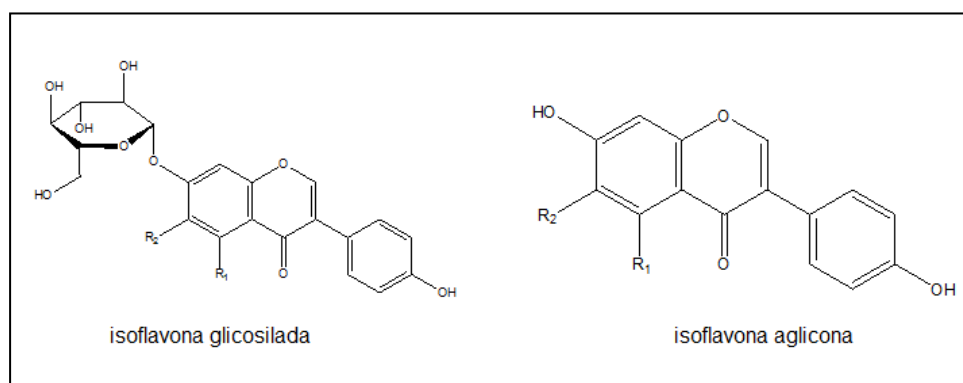


Figura 4: Estrutura geral de uma isoflavona nas formas glicosilada e aglicona.

A aglicona Gen é a principal isoflavona encontrada nos grãos de soja e derivados, destacando-se por apresentar significativas propriedades antioxidantes e antitumorais (Han et al., 2009; Tsao et al., 2003).

A estrutura química da Gen está diretamente relacionada com suas atividades biológicas (Fritsche e Steinhart, 1999; Villares et al., 2011). Dentre suas características estruturais, que favorecem a reação com radicais livres e a quelação de metais, estão os substituintes hidroxila nas posições 4' e 5 (circuladas em vermelho), o oxigênio do grupo cetona no C4 (circulado em verde) e a dupla ligação



nos carbonos 2 e 3 (circulado em azul), conforme demonstrado na Figura 5 (Ho et al., 2003; Qian e Shen, 2001; Tsao et al., 2003).

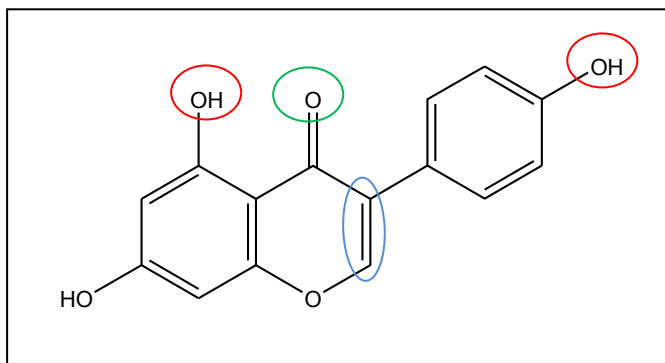


Figura 5: Características estruturais da Gen, responsáveis por sua capacidade de reagir com radicais livres e quelar metais.

A estrutura da Gen é semelhante ao estrogênio, um hormônio feminino que, ao se ligar nos receptores específicos de células de câncer de mama, nutre as células tumorais favorecendo o crescimento do tumor (Figura 6). Esta semelhança estrutural permite a ligação de Gen nos receptores de estrogênio e assim, a isoflavona pode atuar nas vias de sinalização celular, inibindo o crescimento de células tumorais (Eisenberg e Koifman, 2001).

Além disso, a Gen é capaz de quelar metais de transição (como ferro, níquel, cromo, cádmio, mercúrio e chumbo), inibir o fator nuclear kappa B (NF-kB, complexo proteico responsável pela regulação da resposta imune à infecção, cujo funcionamento desregulado é associado ao câncer), bem como enzimas como a tirosina quinase (responsável pelo crescimento e reprodução celular), além de induzir danos ao DNA (Li et al., 2012; Han et al, 2009).

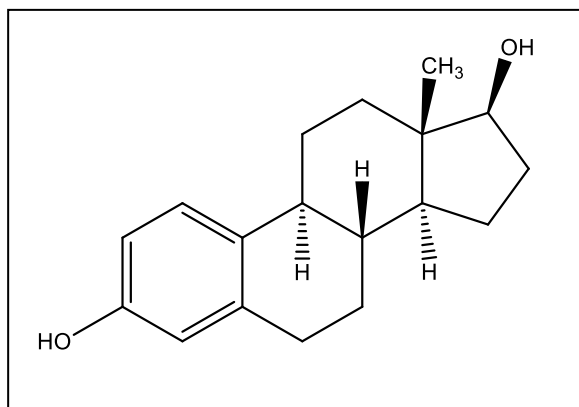


Figura 6: Estrutura do estrogênio.

A Gen é uma molécula pequena (com peso molecular de 270,24 g/mol) e com caráter hidrofóbico, o que facilita sua entrada na BHE e a torna promissora no tratamento contra gliomas. No entanto o seu grau de hidrofobicidade pode dificultar a administração oral e reduzir sua biodisponibilidade no organismo (Adjakly et al., 2013; Li et al, 2012; Tsai, 2005; Li et al., 1999; Matsukawa et al., 1993).

Uma forma de aumentar a biodisponibilidade da Gen, aumentar sua eficácia e facilitar a sua vetorização para células tumorais, é sua incorporação em sistemas carreadores como os lipossomos.

## 2.2. LIPOSSOMOS E DINÂMICA LIPÍDICA

Os lipossomos podem ser descritos como associações coloidais de fosfolipídios anfipáticos, compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas, separadas por um compartimento aquoso. Tais associações se organizam em estruturas fechadas, semelhantes a uma concha esférica. Os lipossomos possuem a capacidade de encapsular substâncias hidrofílicas (no compartimento aquoso) e lipofílicas (inseridas na bicamada lipídica), o que faz com que sejam vantajosos e versáteis como carreadores de fármacos (Ali et al., 2013; Santos e Castanho, 2002).

Os fosfolipídios tendem a se auto-agrupar em solução aquosa e, quando hidratados, podem adotar uma variedade de fases e configurações, podendo inclusive estar presente mais de uma fase em um único sistema (Figura 7) Estas configurações são influenciadas pela composição lipídica (Villasmil– Sánchez et al., 2013; Lasic, 1998).

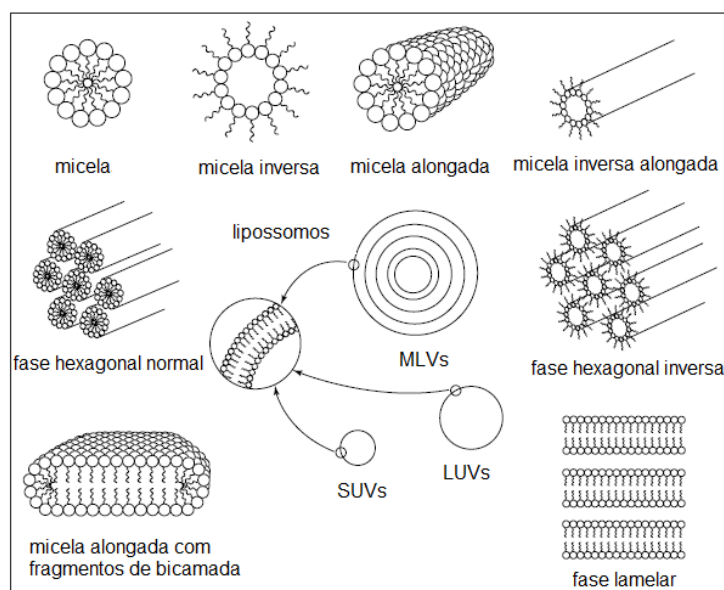


Figura 7: Fases e configurações resultantes da auto-organização dos fosfolipídios em solução aquosa (adaptado de Lasic, 1998).

A Figura 8 mostra a configuração das membranas, em função da sua composição lipídica.

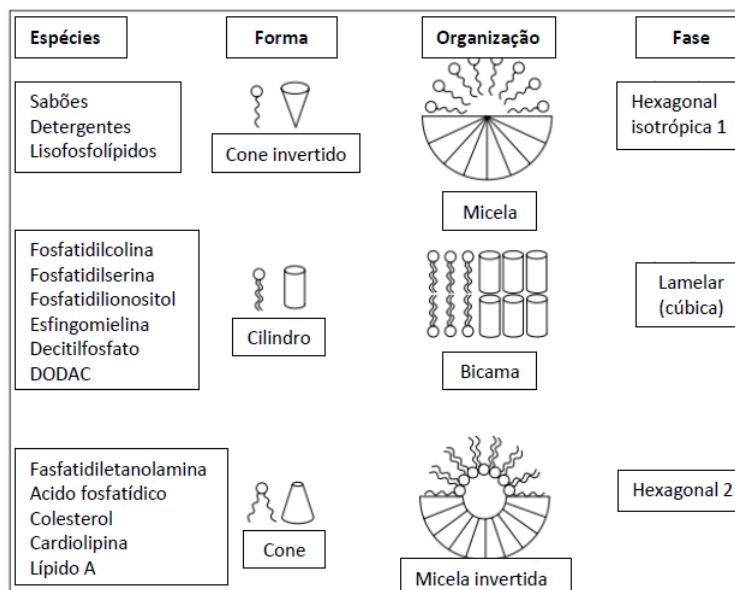


Figura 8: Influência da composição lipídica na configuração das vesículas (adaptado de Lasic, 1998).

Os lipossomos podem ser classificados de acordo com o tamanho e número de lamelas. Os tipos mais comuns estão descritos a seguir:

- Vesículas Multilamelares Grandes (MLVs - "*Multilamellar Large Vesicles*"): são compostas de várias bicamadas lipídicas e possuem tamanho entre 400 nm e 3.500 nm. As MLVs possuem um pequeno volume aquoso e por isso são carreadores mais adequados para o encapsulamento de substâncias hidrofóbicas, que se acomodam nas bicamadas lipídicas (Laverman et al., 1999; Stamp e Juliano 1979; Szoka e Papahadjopoulos, 1980). Costumam ser indicados para tratamentos via administração tópica.

- Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs - "*Large Unilamellar Vesicles*"): são compostas de apenas uma bicamada lipídica e possuem tamanho entre 50 nm e 400 nm. As vesículas, com tamanhos até 200 nm, têm maior facilidade para atravessar as membranas e circular pela corrente sanguínea, o que faz com que sejam os modelos de carreadores mais utilizados via parenteral (Hope et al., 1986; Barenholz, 2012). As LUVs possuem um grande volume de compartimento aquoso em seu interior, sendo eficaz para encapsular substâncias hidrofílicas, e são vesículas

apropriadas como carreadores, visto que são capazes de transportar uma grande concentração de substância ativa para liberação controlada no tecido alvo, o que potencializa a biodistribuição e reduz as superdosagens.

- Vesículas Unilamelares Pequenas (SUVs- "*Small Unilamellar Vesicles*"): As SUVs também possuem apenas uma bicamada lipídica em sua constituição, porém seu diâmetro varia de 20 a 50 nm. Estas vesículas não são consideradas eficazes como carreadores de substâncias hidrofílicas, pois possuem um volume aquoso muito pequeno. Além disso, são termodinamicamente instáveis, pois são mais suscetíveis a agregação e fusão das moléculas (Stamp e Juliano 1979; Szoka e Papahadjopoulos, 1980).

Os fosfolipídios mais utilizados para a formulação de lipossomos são as fosfatidilcolinas, que são os fosfolipídios de constituição majoritária nas membranas celulares. Seu uso faz com que os lipossomos sejam menos tóxicos e mais adequados como sistema de liberação prolongada. As fosfatidilcolinas (Figura 3) são estruturas anfipáticas, compostas por uma cabeça polar (onde se encontra um grupo colina ( $N^+(CH_3)_3$ ) e um grupo fosfato ( $PO_2^-$ )), uma região de interface (onde estão presentes os grupo éster (C-O-C) e carbonila (C=O) e duas cadeias graxas, simétricas ou não, que podem ser saturadas ou insaturadas (Janshoff e Steinem, 2006; Batista et al., 2007).

A composição dos ácidos graxos presentes na fosfatidilcolina pode variar, influenciando assim as propriedades da membrana lipossomal, como ordem e permeabilidade, o que influencia diretamente na cinética de liberação da substância ativa encapsulada. Por exemplo, os fosfolipídios contendo ácidos graxos saturados, tais como o DMPC (Figura 9), estão dispostos de forma ordenada na bicamada lipossomal, por apresentarem conformação trans na cadeia hidrofóbica, o que a torna menos permeável em comparação com membranas compostas por fosfatidilcolinas insaturadas (Ghosh et al., 1973; Hauser et al., 1981).

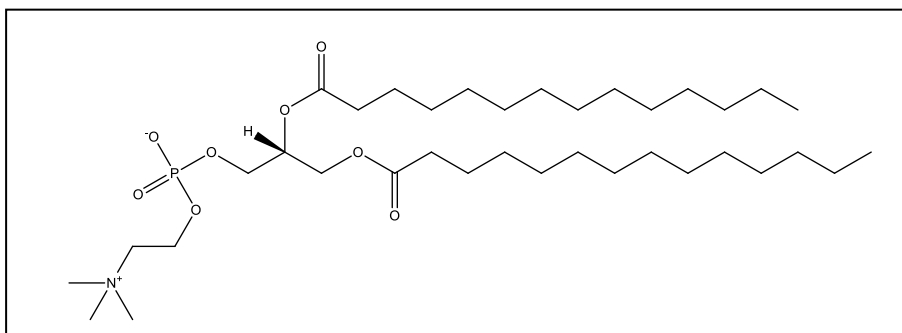


Figura 9: Estrutura da dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC, C14:0)

Já a presença de uma ou mais insaturações na cadeia de ácidos graxos, dificulta o empacotamento inter-cadeias, por suas conformações cis e gauche propiciando uma redução no grau de ordem, menor grau de rigidez na membrana, e conseqüentemente, maior permeabilidade (Ghosh et al., 1973; Hauser et al., 1981). Um exemplo de fosfatidilcolina insaturada é o POPC (Figura 10) que contém os ácidos palmítico (C 16:0) e oléico (C 18:1).

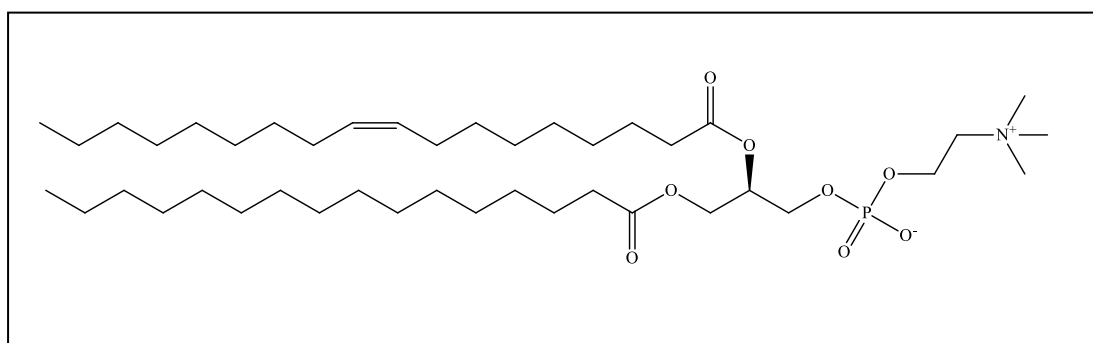


Figura 10: Estrutura da palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (POPC, C 16:0/ C 18:1).

Os lipossomos podem conter ainda em sua composição outros tipos de lipídios, como o CHOL (Figura 11), que tende a aumentar o empacotamento das cadeias graxas, reduzindo a permeabilidade das bicamadas e conseqüentemente, aumentando a estabilidade do sistema lipossomal (Vist e Davis, 1990).

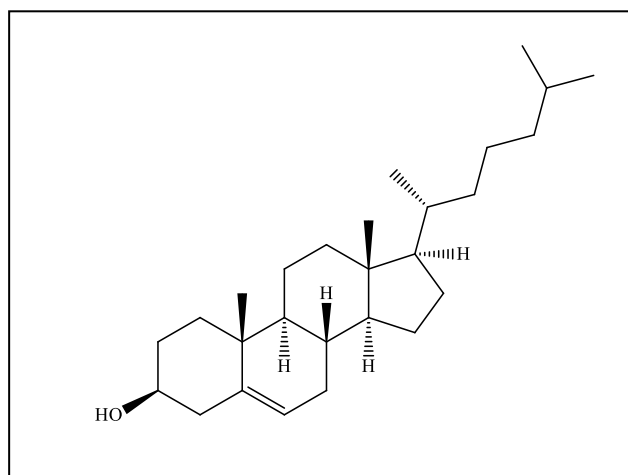


Figura 11: Estrutura do colesterol (CHOL)

O CHOL, por si, não constitui uma vesícula de fase lamelar, mas pode ser incorporado em membranas de fosfolipídios (em fase lamelar) em concentrações bastante altas. Porém, sua concentração pode influenciar na capacidade de incorporação e liberação de um fármaco (Anwekar et al., 2011; Demel e de Kruijff, 1976; Ohvo- Rekila et al., 2002; Cullis e de Kruijff, 1979; Sharma e Sharma, 1997). A presença de concentrações elevadas (> 30% molar) de CHOL pode diminuir a fluidez da membrana, conferindo maior estabilidade aos lipossomos e fazendo com que ocorra liberação mais lenta da droga após a administração (Roberts et al., 2009; Sharma e Sharma, 1997). No entanto, altas concentrações de CHOL podem reduzir a encapsulação de substâncias hidrofóbicas (visto que ambos tendem a competir pelos espaços livres na bicamada lipídica) (Mohamed et al., 2004).

Neste contexto, podem ser feitas associações lipídicas a fim de aperfeiçoar um sistema carreador para uma entrega específica a um tecido-alvo. No entanto, para se formular sistemas carreadores lipossomais eficientes, é importante levar em consideração a escolha dos componentes desta membrana, bem como conhecer a dinâmica lipídica desta membrana. A dinâmica lipídica envolve características conformacionais bem como parâmetros termodinâmicos, que podem sofrer alterações com a incorporação de uma substância exógena nestas membranas (Van Meer e Van Genderen, 1994).

A dinâmica conformacional envolve movimentos intramoleculares como rotação ao longo do eixo, vibração de estiramento simétrica e assimétrica e isomerização trans-gauche (Figura 12), que está diretamente relacionado a um aumento do grau de fluidez na membrana (Van Meer e Van Genderen, 1994). Gniadecka et al., 1998; Susi et al., 1980).

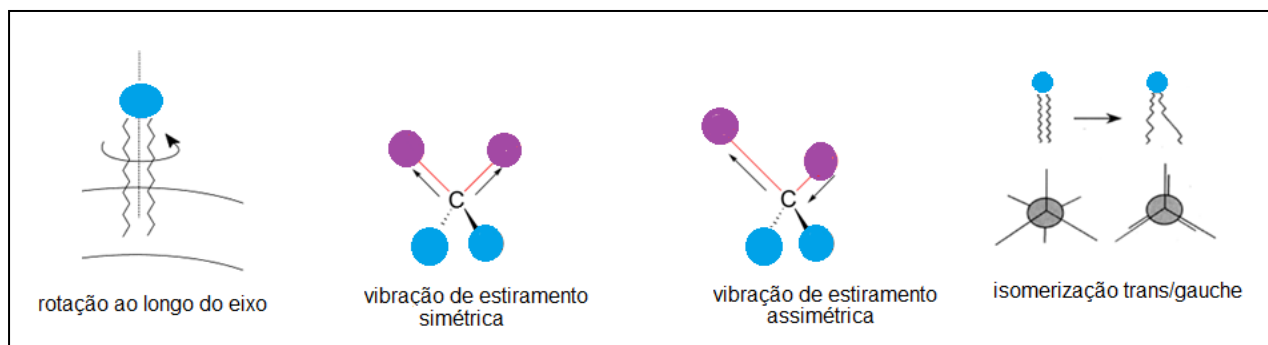


Figura 12: Representação da dinâmica conformacional dos lipídios

Já os parâmetros termodinâmicos estão relacionados com a transição de fase principal (Figura 13), que está associada a variações térmicas e refere-se à transição de uma bicamada lipídica na fase gel (ordenada) para a fase líquido-cristalina (fluida) (Van Meer e Van Genderen, 1994; Mouritsen, 1991).

Na fase gel, os lipídios apresentam cadeias apolares de mobilidade restrita, cujas ligações tendem a adotar uma configuração trans. Nesta fase, a conformação e orientação lipídica tornam-se altamente ordenadas. Na fase líquido-cristalina, os lipídios apresentam conformação cis e/ou gauche e auto-agregação desordenada. O estado líquido-cristalino, ou cristal-líquido, propicia um alto grau de mobilidade lateral aos lipídios de membrana (Mouritsen, 1991; McElhaney, 1982).



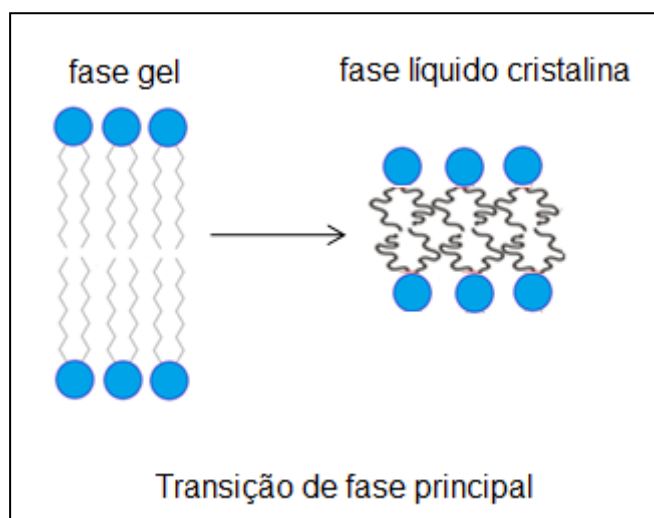


Figura 13: Representação da transição de fase principal dos lipídios

Assim, a composição lipídica está intimamente associada à temperatura das transições de fase e, conseqüentemente a um aumento ou redução do grau de fluidez das membranas. O comportamento termodinâmico de lipídios contendo cadeias apolares insaturadas é diferenciado do comportamento termodinâmico de lipídios saturados, visto que a presença de insaturações na cadeia metilênica reduz as temperaturas típicas de transição de fases dos lipídios para uma faixa abaixo de 0 °C (Ulrich et al., 1994; Lynch e Steponkus, 1989; Christie e Holman, 1967).

A caracterização físico-química de sistemas lipossomais, a partir de seus movimentos, dinâmica conformacional e parâmetros termodinâmicos, bem como a influencia exercida por uma substância exógena (como a Gen) nos mesmos pode ser investigada por diferentes técnicas instrumentais, brevemente descritas a seguir.

## 2.3. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA FÍSICO-QUÍMICA DE MEMBRANAS

Técnicas instrumentais como HATR-FTIR, RMN de  $^{31}\text{P}$ , RMN de  $^1\text{H}$ , Medidas de Potencial Zeta, DLS, DSC e UV-vis, são úteis para monitorar a influência de substâncias, como a Gen, no comportamento físico-químico de membranas de diferentes composições.

✓ A técnica de FTIR propicia o estudo vibracional das moléculas, fornecendo informações sobre a localização e a influência da substância ativa, nos graus de hidratação e ordem molecular dos grupos funcionais específicos dos lipídios (Manrique - Moreno et al., 2009). Quando o modo de Refletância Total Atenuada Horizontal (HATR) é acoplado ao FTIR, o raio de luz infravermelho incide no cristal de HATR, um material denso de seleneto zinco ( $\text{ZnSe}$ ) com alto índice de refração, e a refletância cria uma onda que se estende além da superfície do cristal, penetrando cerca de 10  $\mu\text{m}$  na amostra. A energia de cada onda é passada de volta para o feixe de luz IV e esse processo se repete ao longo do cristal. Assim sendo, essa técnica é considerada não invasiva e útil para o estudo de membranas, já que não as danifica (Tamm e Tatulian, 1997; Tatulian, 2003; Arsov e Quaroni, 2007).

Para o estudo da dinâmica lipídica em todas as regiões das membranas (polar, interface e apolar), são detectados e analisados os estiramentos axiais assimétricos dos grupos fosfato e colina ( $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$  e  $\nu_{\text{as}} \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) na região polar dos lipídios; o estiramento axial do grupo carbonila na região de interface ( $\nu \text{C}=\text{O}$ ), bem como os estiramentos axiais simétrico e assimétrico dos metilenos ( $\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$  e  $\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$ ) na cadeia apolar das membranas (Herec et al., 2007; Manrique – Moreno et al., 2010).

O grupo fosfato, na região polar dos lipídios e o grupo carbonila, na interface lipídica, podem interagir com o meio aquoso ou com a substância inserida no sistema por meio de ligações de hidrogênio. Essa interação reflete no grau de hidratação destas regiões e acaba influenciando no modo vibracional das moléculas. Os deslocamentos na frequência do  $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$  e do  $\nu \text{C}=\text{O}$  para valores menores,

indicam a formação ou o aumento no número de ligações de hidrogênio nas regiões polar e interfacial (Chen e Tripp, 2008; Choi et al., 1991; Severcan et al., 2005; Korkmaz e Severcan, 2005).

Ainda na região polar, o grupo colina pode sofrer alterações no modo como interage com o fosfato do lipídio vizinho, provocadas pela presença de uma molécula exógena, o que reflete em alterações nas frequências e na intensidade da banda referente ao  $\nu_{as} N^+(CH_3)_3$  (Gradolnik et al., 1991).

Na cadeia hidrofóbica lipídica, é possível monitorar as possíveis transições de fases, monitorando-se alterações na frequência dos grupos metilenos. Por exemplo, se as frequências dos  $\nu_s CH_2$  e  $\nu_{as} CH_2$  forem deslocadas para valores maiores a partir da interação com uma substância exógena, isto poderá indicar um aumento de ligações na conformação gauche na região, e vice-versa. No primeiro caso, a presença da substância incorporada no sistema torna a região apolar dos lipídios mais fluida, deixando os metilenos mais móveis (isomerização trans–gauche) (Manrique – Moreno et al., 2009, Lee e Chapman, 1986; Mannock et al., 2010).

Também é possível obter informações sobre a dinâmica do sistema, avaliando a liberdade de movimento das moléculas em seu ambiente, através de análise de alterações nas larguras de bandas dos grupos específicos dos lipídios. As larguras de bandas estão relacionadas com os efeitos rotacionais, translacionais e/ou de colisões das moléculas. Quando ocorre um aumento na mobilidade de um grupo lipídico, é possível observar também um aumento na largura de banda de estiramento do mesmo, com exceção da colina (Lee e Chapman, 1986; Toyran e Severcan, 2003; Arsov e Quaroni, 2007).

✓ Os experimentos de RMN de  $^{31}P$  fornecem informações sobre a influência de uma molécula, como a Gen, na anisotropia do deslocamento químico do fósforo presente no lipídio. Quando um núcleo de fósforo está com sua mobilidade restrita, como em um sistema mais ordenado (fase gel), o pulso de radiofrequência é detectado de forma diferente em diversas orientações do núcleo, originando um pico de RMN mais largo. Todavia, quando este núcleo está em um sistema mais fluido, o pulso de radiofrequência é detectado de maneira mais

uniforme pelas orientações do núcleo, o que origina um pico de RMN mais estreito (Debouzy et al., 2002, Timoszik et al., 2004). Além disso, a técnica de RMN de  $^{31}\text{P}$  é útil para monitorar o estado de fase, incluindo a lamelaridade, das membranas.

✓ A técnica de RMN de  $^1\text{H}$ , através de estudos de tempos de relaxação longitudinais ( $T_1$ ) pode ser aplicada para estudar o comportamento de hidrogênios presentes no grupo colina, localizado na região polar da membrana, e de metilenos, na região apolar da mesma. Quando pulsos de radiofrequência são emitidos no RMN de  $^1\text{H}$ , em diferentes intervalos de tempo, o núcleo de hidrogênio muda seu eixo de rotação. Quando cessam esses pulsos de radiofrequência, o núcleo tende a relaxar, liberando energia para o ambiente molecular e estrutural, retornando ao seu eixo de origem. O tempo que esse núcleo leva para relaxar por completo é então detectado e denomina-se tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ).

Os valores de  $T_1$  estão relacionados ao tempo de correlação ( $\tau_c$ ), definido como o tempo médio que o núcleo leva para girar em um (1,0) radiano em torno do próprio eixo (Skoog et al., 1998; Silverstein et al., 2005). Esta técnica, por meio do estudo dos movimentos rotacionais, pode nos fornecer informações sobre o efeito de uma substância na velocidade rotacional e ordem molecular de regiões específicas dos lipídios (de Lima et al., 2007).

✓ O Potencial Zeta é descrito como o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento (camada que se forma ao redor da partícula em suspensão e sob movimento browniano se move como parte da partícula), e é útil para monitorar a distribuição de cargas superficiais na membrana e, conseqüentemente, a orientação dos grupos colina e fosfato. A presença de uma substância exógena em um sistema lipossomal pode influenciar na organização dos grupos colina e fosfato (presentes na cabeça polar) do fosfolipídio para cima ou para baixo do plano da bicamada lipídica (Tatulian, 1983; Disalvo e Bouchet, 2014).

As Medidas de Potencial Zeta também podem fornecer informações sobre a estabilidade do sistema. Sabe-se que grandes forças de repulsão geralmente previnem a agregação das moléculas. Assim, valores de Potencial Zeta maiores que 30 mV (positivos ou negativos) indicam sistemas mais estáveis (Malvern, 2012).

✓ A técnica de DLS pode fornecer informações sobre a distribuição de tamanho das partículas, o que pode estar relacionado com a estabilidade do sistema. As partículas em suspensão estão em constante movimento, devido á colisão aleatória com as moléculas do líquido que as rodeia (movimento Browniano), um feixe de luz é incidido nesse sistema e a intensidade da luz espalhada pelas partículas forma um padrão de movimento.

A taxa de flutuação da luz espalhada pelas moléculas maiores tende a ser mais lenta do que a taxa de flutuação espalhada pelas moléculas menores, pois quanto maior o tamanho das moléculas, mais lentamente elas se movem. Com o DLS, é possível determinar a taxa de mudanças dessas flutuações e com isso, a distribuição de tamanho das partículas (Malvern, 2012).

✓ Com a técnica de DSC, é possível estudar o efeito da substância ativa no estado de fases do lipossomo, avaliando parâmetros termodinâmicos, através do estudo da variação energética do sistema amostra-referência (de Lima et al., 2010; Severcan et al., 1668; Marsh et al., 1977). Os lipídios se caracterizam por possuírem uma temperatura de transição de fase ( $T_c$ ), cujo valor está relacionado com o comprimento da cadeia acil bem como com o grau de saturação da mesma. A presença de uma molécula exógena (como a Gen) pode provocar variações na temperatura de transição de fase principal ( $T_m$ ), que é a temperatura em que o sistema possui 50% dos lipídios na fase gel e 50% dos lipídios na fase líquido cristalina, promovendo um maior grau de ordem ou uma maior fluidez nas cadeias apolares das membranas (Frézard, 2005; Lasic, 1998).

✓ A técnica de UV-vis pode ser usada para monitorar as transições de fase lipídica, através das alterações na turbidez do sistema. Um aumento nos valores de densidade ótica estão relacionados com a redução na fluidez do sistema e/ou com o aumento no diâmetro das partículas, o que pode estar associado ao processo de aglomeração das partículas (Yi e MacDonald, 1973; Kormaz e Severcan, 2005; Kazanci et al , 2000).

## 3. OBJETIVOS

---

### 3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a influência da Gen nas propriedades físico-químicas de lipossomos com diferentes constituições lipídicas, bem como as atividades *in vitro*, antioxidante e antitumoral destes sistemas. Investigar a influência da composição lipídica de cada sistema nos efeitos provocados pela isoflavona e descrever possíveis correlações entre propriedades físico-químicas e biológicas, contribuindo assim para o design de sistemas de liberação prolongada de fármacos baseados em Gen, mais eficientes e menos tóxicos para o tratamento de tumores, como os gliomas.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Incorporar e quantificar a Gen em sistemas lipossomais compostos por: DMPC, DMPC/CHOL em diferentes concentrações e DMPC/POPC;
- Investigar os efeitos da Gen nas propriedades físico-químicas dos lipossomos, avaliando sua influência no grau de hidratação, isomerização *trans-gauche* e mobilidade de grupos específicos dos lipídios;
- Avaliar a influência da Gen na lamelaridade das membranas e na liberdade de rotação do núcleo de fósforo, através do estudo da anisotropia do deslocamento químico, bem como na liberdade rotacional dos hidrogênios presentes nos grupos colina e metilenos;
- Monitorar o efeito da Gen na orientação dos grupos da região polar das membranas, diâmetro dos lipossomos e estabilidade dos sistemas, bem como sua influência nos parâmetros termodinâmicos;

- Avaliar a suscetibilidade de cada sistema aos efeitos da Gen, de acordo com sua composição lipídica e;

- Investigar o potencial redutor de radicais livres dos sistemas lipossomais propostos, contendo Gen e monitorar a capacidade antiproliferativa, contra a linhagem C6, de dois destes sistemas, por meio de testes *in vitro*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1. REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, a dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e, colesterol (CHOL) foram obtidos da Avanti Polar Lipids, Inc. A palmitoil-oleil-fosfatidilcolina (POPC), a genisteína (Gen), 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), água deuterada, 3-(trimetilsilil)-[2,2,3,3-2H<sub>4</sub>]-1-propionato de sódio (TSP, 0,05%) , o brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os solventes clorofórmio e metanol foram obtidos através da SYNTH do Brasil (São Paulo, Brasil). A linhagem de glioma de rato (C6) foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland, USA), o soro de bovino fetal (FBS, Gibco BRL) e o meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) foram adquiridos da Invitrogen Co. (Carlsbad, C.A, EUA). Os lipídios foram utilizados sem qualquer purificação adicional. Os demais reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica.

Os materiais e vidrarias utilizados foram béquers, erlenmeyers, pipetas, funis simples, provetas, kitassatos, balões volumétricos de 10 mL e 25 mL, garras, suportes, espátulas, eppendorfs, bastões de vidro, dentre outros.

Foram utilizados para a realização deste trabalho os seguintes equipamentos: placa de aquecimento e agitação magnética modelo 752A Fisatom com potência de 650W (de 120 a 1800 rpm), evaporador rotatório modelo 801A Fisatom de 70W, bomba de vácuo mod. XKM60-1 1/2HP FAMAC, espectrofotômetro de UV-visível Shimadzu UV-2550 e espectrofotômetro de FTIR Shimadzu-IR Prestige-21 disponíveis na Universidade Federal do Rio Grande (FURG); espectrômetro de RMN Bruker (400 MHz) disponível na CIA- FURG, equipamento Zetasizer- Malvern UK-nano Zs e calorímetro de varredura diferencial Equipamento Shimadzu DSC-60 (Tokyo, JP),disponíveis na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) .



## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMOS E ENCAPSULAMENTO DA GENISTEÍNA

Para este estudo, foram utilizadas as seguintes constituições lipossomais: 1) DMPC 30 mg/mL ; 2) DMPC 30 mg/mL contendo (i) 3 mg/mL e (ii) 12 mg/mL de CHOL (o que corresponde a 10% e 40% de CHOL em relação à concentração de DMPC) e 3) DMPC 30 mg/mL contendo 3 mg/mL de POPC (10% de POPC em relação à concentração de DMPC).

Vale ressaltar que, a fim de investigar a composição mais adequada para compor um carreador lipídico baseado em Gen, foram testadas diferentes tipos de lipídios e concentrações de CHOL, em função das informações descritas na revisão bibliográfica deste trabalho (item 2.2.).

Para este ensaio foram preparados lipossomos puros (ensaio controle) e lipossomos contendo Gen, em diferentes concentrações da isoflavona.

As concentrações iniciais de Gen incorporada no sistema variaram de 0,0 mg/mL a 4,8 mg/mL, respeitando a razão massa/massa (m/m) inicial Gen: lipídio(s) de 0,0 a 0,16. Para isto foi utilizado o método de Evaporação Por Fase Reversa, segundo metodologia de Szoka e Papahadjopoulos (1978) e Mertins e colaboradores (2005), esquematizado na Figura 14.

Os lipídios foram co-solubilizados com 700  $\mu$ L de clorofórmio, 300  $\mu$ L de metanol e posteriormente foi adicionado 20  $\mu$ L de água destilada, formando uma emulsão. Tal emulsão foi submetida a banho de ultrassom durante 3 minutos, para a formação de uma suspensão homogênea de micelas reversas. Esta suspensão foi rotaevaporada sob vácuo, para eliminação do solvente orgânico e o organogel resultante deste processo foi hidratado com 1000  $\mu$ L de água destilada e ressuspenso por meio de agitação em vórtex, resultando em vesículas unilamelares grandes (LUVs).

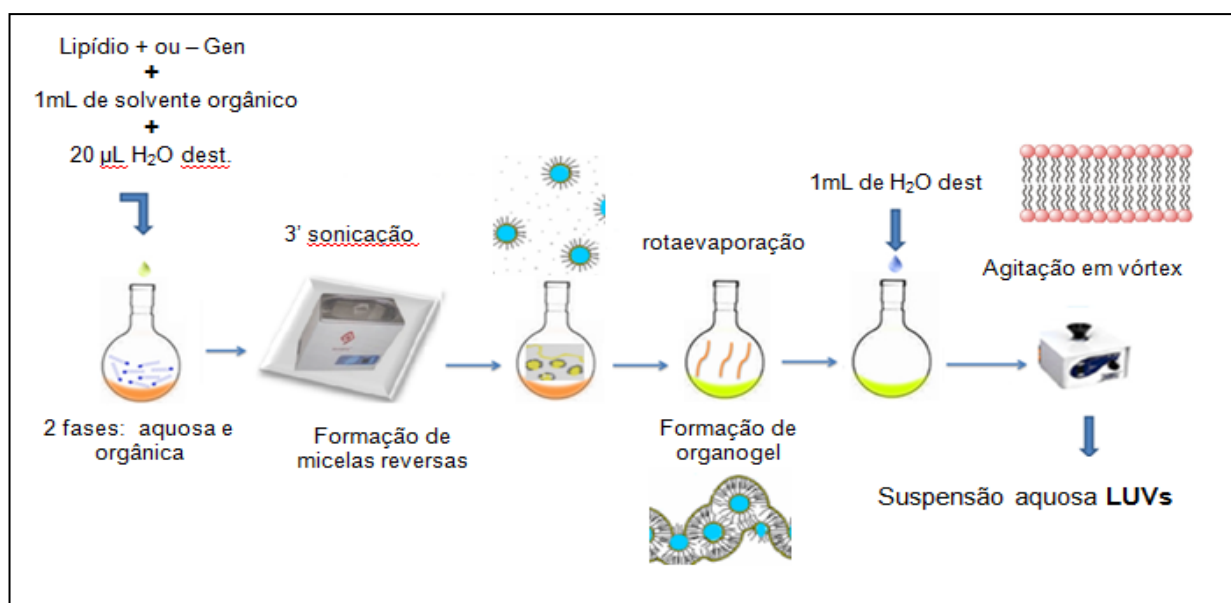


Figura 14: Esquema de preparação de lipossomos pelo método de Evaporação Por Fase Reversa.

A Gen foi incorporada nos lipossomos na etapa de solubilização dos lipídios, com os solventes orgânicos, devido à sua hidrofobicidade. Vale ressaltar que a hidratação das membranas foi realizada com água, visto que a utilização de solventes zwitteriônicos como o tampão tricina (utilizado em trabalhos anteriores), pode provocar um aumento na fluidez das membranas (Koerner et al., 2011).

Para uniformizar o tamanho, os lipossomos foram submetidos a três ciclos de congelamento com nitrogênio líquido (por 10 segundos) e descongelamento em banho-maria (por 40 segundos, a aproximadamente 27°C) (Azambuja et al., 2015; Hope et al., 1986).

#### 4.2.2. QUANTIFICAÇÃO DA MÁXIMA CONCENTRAÇÃO DE GENISTEÍNA INCORPORADA NOS LIPOSSOMOS (CONCENTRAÇÃO DE SATURAÇÃO)

Para determinar a concentração de Gen incorporada nos lipossomos, foram realizados três ciclos de lavagem e centrifugação (os lipossomos hidratados foram centrifugados e após, foi retirado o sobrenadante e adicionado o mesmo volume de água destilada) a fim de remover a Gen livre em solução (não incorporada nos lipossomos) Para a liberação da Gen incorporada nas vesículas, os lipossomos foram solubilizados com o surfactante triton X-100 a 0,6% (ver esquema na Figura 15) (He et al., 2005; Ruiz et al., 1988).

As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas e em seguida, foram realizadas leituras do sobrenadante por espectroscopia UV-vis a 262 nm (comprimento de onda máximo de absorção da Gen) e a concentração final de Gen nos lipossomos foi calculada pela lei de Beer, considerando o coeficiente de absorvidade molar da isoflavona,  $35842 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Franke et al., 2009). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

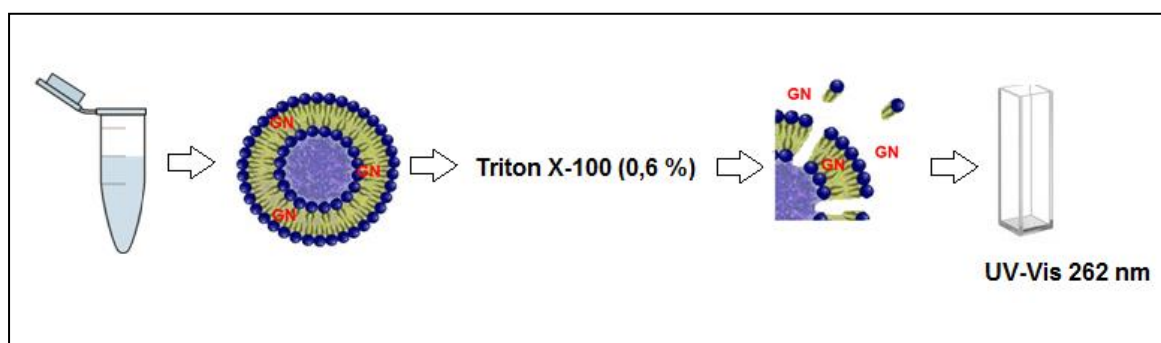


Figura 15: Esquema para ensaio de determinação da máxima concentração de Gen incorporada nos lipossomos (concentração de saturação).

### 4.2.3. ENSAIOS DE HATR-FTIR

A técnica de HATR-FTIR foi utilizada para determinar a localização da Gen e sua influência nos graus de hidratação e ordem dos grupos específicos dos lipídios. Para isto foram analisadas variações nos valores de frequências e larguras a  $\frac{3}{4}$  da altura de picos de estiramentos axiais dos grupos lipídicos (Bilge et al., 2014, Casal e Mantsch, 1984).

Assim, os lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros ou contendo Gen na máxima concentração incorporada (concentração obtida através do estudo descrito no item 4.2.2.), foram depositados em um cristal de ZnSe onde foi incidida a radiação infravermelho (Figura 16). Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente, em um equipamento Shimadzu IR Prestige-21 (Kyoto, JP). Para obtenção dos interferogramas, considerou-se a média de 50 varreduras, cada uma de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 2,0  $\text{cm}^{-1}$ . Para análise dos espectros, foi utilizado o software IR Shimadzu 1.5.

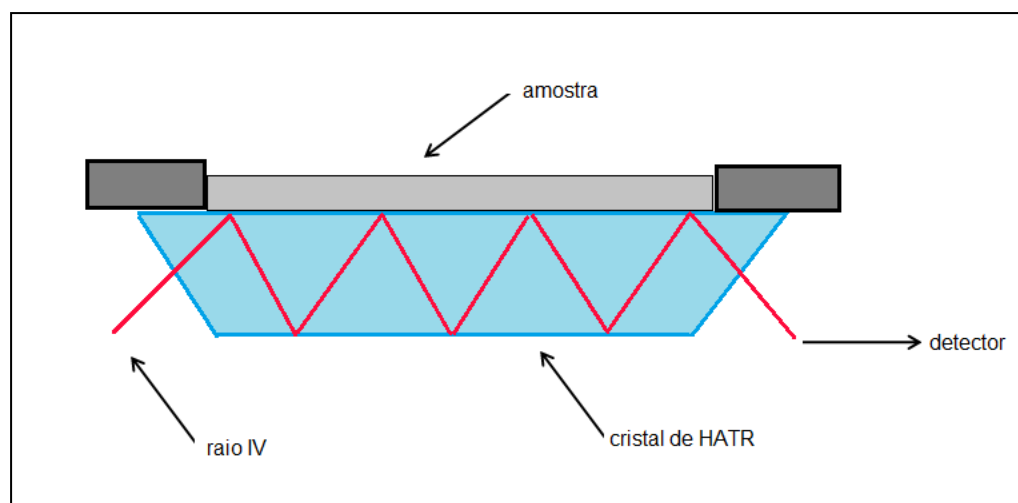


Figura 16: Esquema representativo do ensaio de HATR-FTIR.

#### 4.2.4. MEDIDAS DE RMN DE $^{31}\text{P}$ E RMN DE $^1\text{H}$

Informações sobre o efeito de Gen no grau de liberdade rotacional do grupo fosfato lipídico, e no grau de lamelaridade das membranas foram obtidas através de medidas de RMN de  $^{31}\text{P}$ . Os experimentos de RMN de  $^{31}\text{P}$  foram realizados em equipamento Bruker DPW 400 MHz (162 MHz) utilizando água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) como referência externa, tempo de intervalo entre pulsos de 15,0  $\mu\text{s}$  e foram realizadas 2048 varreduras. A influencia de Gen na anisotropia de deslocamento químico do núcleo de fósforo foi monitorada a partir da medida da largura do pico considerando as margens correspondentes às orientações de 0 e 90° do núcleo (Debouzy et al., 2002; Niederberger e Seelig, 1976).

O efeito da Gen no movimento de rotação dos núcleos de hidrogênio dos grupos lipídicos colina e metilenos foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$ , através de estudos de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ). As medidas foram realizadas a 400 MHz no mesmo aparelho descrito anteriormente. Foram realizadas sequências de pulsos de recuperação da inversão nas amostras com intervalos de tempo entre pulsos (de 14,0  $\mu\text{s}$  cada) de 0,2 a 102,4 segundos, utilizando-se como referência o ácido trimetilsilipropiônico (TSP), e foram realizadas 8 varreduras. (De Lima et al., 2010; Fraceto et al., 2005). Ambas as medidas de RMN (RMN de  $^{31}\text{P}$  e RMN de  $^1\text{H}$ ) foram realizadas a 20°C, utilizando como solvente água: água deuterada (80:20 v/v).

#### 4.2.5. MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA

Através da técnica de Potencial Zeta foi realizado o estudo de distribuição de cargas superficiais nas membranas lipossomais. As medidas da mobilidade eletroforética das membranas foram obtidas em equipamento Zetasizer Malvern UK-Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido), através da técnica de anemometria laser-doppler em modo monomodal e utilizando como capilar uma célula de quartzo com um par de eletrodos de paládio. Para a realização das medidas, foi retirada uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  da suspensão de lipídios, diluída em

1000  $\mu\text{L}$  de água milliQ e homogeneizada por agitação em vórtex. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e para cada corrida, dez medidas de Potencial Zeta foram feitas. Os experimentos foram realizados em triplicatas (Fatouros e Antimisiaris, 2002).

#### **4.2.6. ENSAIOS COM ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)**

A caracterização do diâmetro das partículas foi determinada por ensaios de DLS, em equipamento Zetasizer Nano Series of Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido). Para este ensaio, foi retirada uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  da suspensão de lipídios, essa alíquota foi diluída em 1000  $\mu\text{L}$  de água milliQ e homogeneizada por agitação em vórtex. As análises foram realizadas a 25°C, utilizando caminho óptico de 1,0 cm e ângulo fixo de 173°, os experimentos foram realizados em triplicatas e a obtenção do diâmetro das partículas foi considerada a partir da curva de correlação referente ao espalhamento de Luz.

#### **4.2.7. MEDIDAS DE DSC**

O efeito da Gen no estado de fase dos lipossomos foi monitorado através da investigação de parâmetros termodinâmicos  $T_m$ , considerando a variação energética entre duas células de DSC, uma referente à amostra e outra a uma referência caracterizada por uma célula de alumínio vazia (De Lima et al., 2010). Para este ensaio, as amostras foram depositadas em células de alumínio, que foram seladas. As medidas de DSC foram realizadas em um equipamento Shimadzu DSC-60 (Tóquio, JP), utilizando uma taxa de aquecimento de 5°C/ min, faixa de temperatura variando de 5°C a 60°C e fluxo de nitrogênio de 50/50 mL. min<sup>-1</sup> (Zhao et al., 2007; Koynova e Caffrey, 1998; Ulrich et al., 1994; Lynch e Steponkus, 1989).

#### 4.2.8. MEDIDAS DE TURBIDEZ

Por meio de medidas de densidade óptica, a 400 nm, foi investigado o efeito da Gen na turbidez das membranas de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%. Para tal foi avaliada a influência da Gen, em diferentes concentrações iniciais (variando de 0,0 mg/mL a 3,6 mg/mL, o que corresponde às razões m/m Gen/lipídios variando de 0,0 a 0,13) nos valores de turbidez dos diferentes sistemas lipossomais. As leituras foram realizadas por meio de espectroscopia de UV-vis em um aparelho Shimadzu UV-2550 (Kyoto, JP), a 400 nm (comprimento de absorção máxima do fosfato) utilizando células de quartzo com caminho óptico de 1cm (Azambuja et al., 2015; Souza et al., 2013; Kresheck et al., 1980). Para cada concentração inicial de Gen, foram preparadas e analisadas três amostras independentes.

#### 4.2.9. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

O potencial antioxidante *in vitro* dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10% contendo Gen, foi investigado através do método colorimétrico DPPH. Este método consiste na redução do radical 2,2 difenil 1-picril hidrazila (DPPH<sup>\*</sup>, coloração púrpura), por ação de uma substância antioxidante, formando o 2,2-difenil-1-picril-hidrazina, de coloração amarela (Brand-Williams et al., 1995).

Para este ensaio a Gen, incorporada nos lipossomos de diferentes composições lipídicas, em diferentes concentrações iniciais, variando de 0,0 a 3,6 mg/mL (o que corresponde às razões m/m Gen: lipídio(s) de 0,0 a 0,13), foi incubada com 1000 µL de metanol e 1000 µL de DPPH durante 40 minutos na ausência de luz. Após o período de incubação, foram realizadas leituras a 515 nm (absorbância do radical 2,2 difenil 1-picril hidrazila), em espectrofotômetro Shimadzu UV-2550 (Kyoto, Honshu, JP).

A atividade da Gen livre em solução também foi testada, nas mesmas concentrações e condições experimentais, e os resultados foram comparados. Foram analisadas três amostras independentes para cada concentração inicial de Gen testada e foram realizados ensaios controles com lipossomos na ausência de Gen.

#### **4.2.10. ENSAIOS ANTITUMORAIS *IN VITRO***

Os estudos *in vitro*, das propriedades antitumorais dos sistemas lipossomais contendo Gen foram realizados utilizando uma linhagem de células de glioma de rato (C6).

##### **4.2.10.1. CULTURA CELULAR E TRATAMENTO *IN VITRO***

O cultivo das células C6 foi realizado em meio Eagle modificado de Dulbecco de baixa glicose (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), a 37 °C e com atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> (da Silveira et al., 2013). As células C6 foram incubadas em placas de 96 poços, contendo 5x10<sup>3</sup> células por poço com DMEM contendo 10% de FBS por 24h. Para avaliar o efeito antiploriferativo da Gen em C6, as células foram tratadas com Gen, na forma livre, em solução de DMSO, e incorporada em lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL10%, nas concentrações de 10, 20 e 100 µM, durante 48h.

Para este estudo foram realizados os seguintes controles: C= células de glioma de ratos (C6) e meio de controle (DMEM); CV= DMSO; CD= lipossomos de DMPC puros e CDC= lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros.



#### **4.2.10.2. CONTAGEM CELULAR E MTT**

Após as 48h de tratamento, as células foram dissociadas com tripsina/EDTA. Alíquotas de 100 µL foram transferidas de cada um dos poços para uma Câmara de Neubauer, onde foi realizada a contagem das células viáveis. Os ensaios de viabilidade celular foram realizados considerando o método de redução colorimétrica Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT).

O método colorimétrico MTT quantifica a habilidade de células viáveis reduzirem o sal amarelo de tetrazólio a cristais de formazan (coloração púrpura) a partir da enzima mitocondrial succinato desidrogenase, (Mosmann, 1983). Para este ensaio, uma solução de MTT foi diluída com DMEM/ 10% de FBS) até a concentração de 0,5 mg/mL e acrescentada nas células tratadas (Mosmann, 1983). A densidade óptica de cada poço foi medida a 492 nm e os resultados foram expressos como absorbância (da Silveira et al., 2013).

Vale lembrar que para ambos os ensaios (contagem celular e MTT), foram considerados os seguintes controles: C= células C6 e meio de controle (DMEM); CV= DMSO; CD= lipossomos de DMPC puros e; CDC= lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros e os experimentos foram feitos em triplicatas.

#### **4.2.10.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS ANTITUMORAIS**

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

## **5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**

---

### **5.1. DETERMINAÇÃO DA MÁXIMA CONCENTRAÇÃO (CONCENTRAÇÃO DE SATURAÇÃO) DE GENISTEÍNA NOS LIPOSSOMOS**

A concentração de saturação é detectada a partir de gráficos que relacionam a razão (m/m) inicial de Gen: lipídio(s) com a concentração de Gen incorporada em lipossomos. Em geral, após o alcance da concentração máxima de substância ativa incorporada em lipossomos, observa-se uma queda gradual destes valores. Este comportamento é usado para detecção da concentração de saturação (Azambuja et al., 2015; Dimitrios e Sophia, 2002).

As concentrações de saturação de Gen nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10% foram determinadas a partir das curvas demonstradas na Figura 17 e estão listadas na Tabela 1.

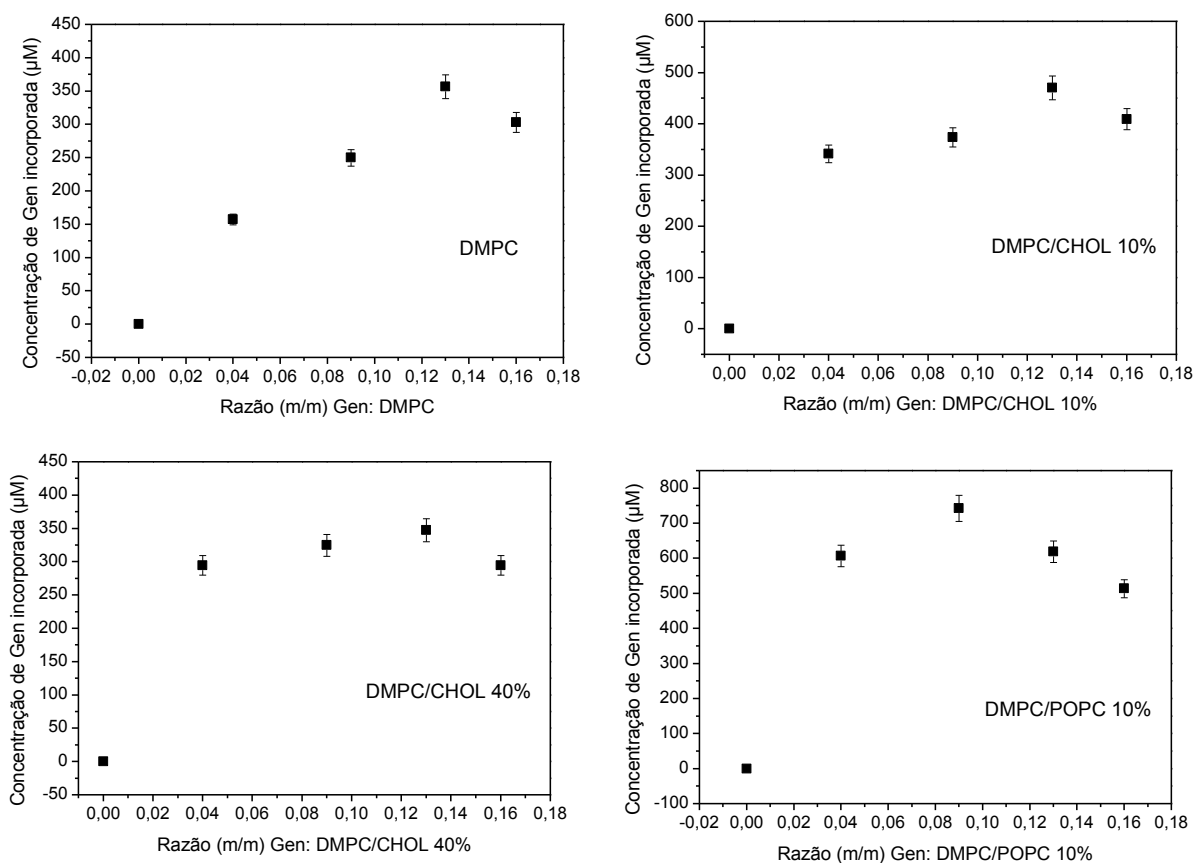


Figura 17: Curvas de saturação da genisteína (Gen) incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%).

Através das curvas apresentadas na Figura 17, é possível notar que a concentração máxima de Gen incorporada nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40%, foi alcançada na razão (m/m) inicial Gen: lipídio(s) 0,13 (concentração inicial de Gen de 3,6 mg/mL. Já em DMPC/POPC 10% a concentração final foi obtida em uma razão menor (0,09), que corresponde a uma concentração inicial de Gen de 2,4 mg/mL. As concentrações de saturação de Gen nos lipossomos, obtidas através da análise destas curvas estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1- Valores de concentração de saturação da Gen em lipossomos compostos por DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%.

Sistema lipossomal	Concentração de saturação ( $\mu\text{M}$ )
DMPC	356,56 $\pm$ 9,27
DMPC/CHOL 10%	470,39 $\pm$ 7,62
DMPC/CHOL 40%	347,36 $\pm$ 8,15
DMPC/POPC 10%	743,00 $\pm$ 12,01

Pode-se observar através dos dados listados da Tabela 1, que a eficiência de encapsulação de Gen nas membranas foi influenciada pela composição lipídica destas. Uma análise comparativa da eficiência de encapsulamento nas concentrações de saturação de Gen dos diferentes sistemas está apresentada na Figura 18.

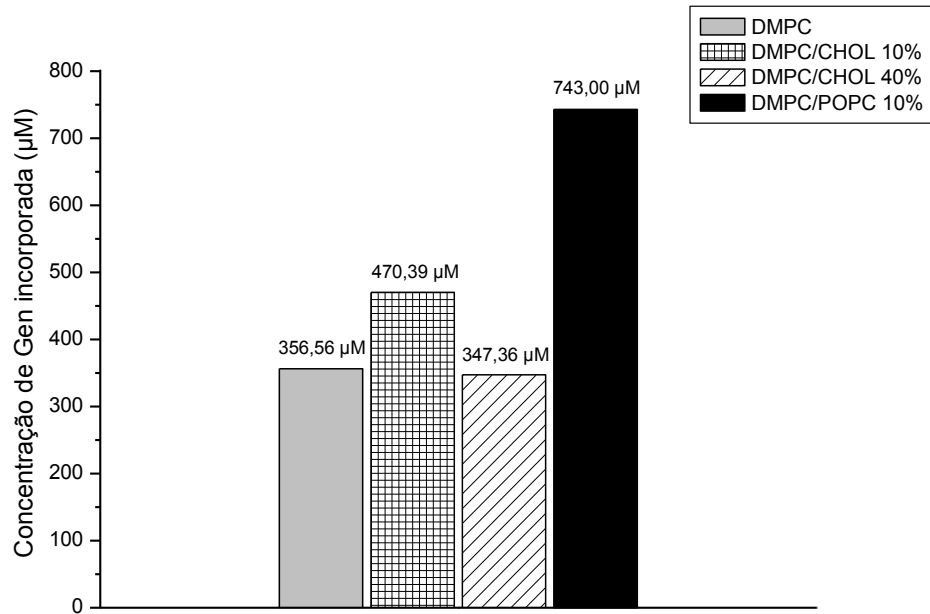


Figura 18: influência da composição lipídica no encapsulamento de Gen em lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%).

Com a inserção de 10% de CHOL nos lipossomos de DMPC, nota-se um aumento de 24,2% na incorporação de Gen no sistema, em comparação ao observado em lipossomos de DMPC. Quando a proporção de CHOL na composição da membrana foi aumentada para 40%, observa-se uma redução na eficiência de encapsulação da isoflavona, onde a concentração de saturação de Gen foi similar à concentração de saturação nos lipossomos de DMPC e 26,15% menor em comparação com os lipossomos de DMPC/CHOL 10%.

O CHOL provoca um maior grau de empacotamento na bicamada lipídica, aumentando sua estabilidade e reduzindo o grau de difusão de um fármaco para o meio externo. Isto pode justificar o maior percentual de encapsulamento de Gen nos lipossomos de DMPC/CHOL 10%. No entanto, em maiores concentrações, o CHOL pode dificultar a incorporação da substância, pois reduz os espaços intermoleculares livres na membrana (Mohammed et al., 2004). Sendo assim, nos lipossomos de DMPC/CHOL 40% uma possível competição entre a Gen e o CHOL, pelos compartimentos livres na bicamada, pode ser responsável pela redução da concentração da isoflavona no sistema.

Por outro lado, nos lipossomos de DMPC/POPC 10%, a presença do fosfolípido monoinsaturado (POPC) induziu a um aumento na eficiência de encapsulação de Gen no sistema. A concentração de saturação de Gen nestas membranas foi 52% maior do que nos lipossomos de DMPC e 36,7% maior do que em lipossomos de DMPC/CHOL 10%.

Ao contrário do efeito provocado pela presença de CHOL nos lipossomos, lipídios insaturados como POPC podem provocar um menor empacotamento da bicamada lipídica, aumentando a fluidez da membrana e conseqüentemente, proporcionando um maior encapsulamento, visto que apresentam mais “espaços livres” para o fármaco ocupar (Ghosh et al., 1973; Kulkarni et al., 1995).

Visto que dos quatro sistemas lipossomais testados, três deles obtiveram a saturação de Gen na razão (m/m) inicial de Gen: lipídio(s) 0,13, esta razão foi considerada para os ensaios de caracterização físico-química, para fins comparativos.

Vale ressaltar que nesta razão m/m, a concentração final de Gen incorporada nos lipossomos de DMPC/POPC 10% foi de 619,00  $\mu\text{M}$ , concentração esta, menor do que a concentração de saturação (743  $\mu\text{M}$ ).

## **5.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA GENISTEÍNA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS LIPOSSOMOS**

As propriedades físico-químicas dos lipossomos puros e contendo Gen na sua concentração de saturação (ver item 4.1.) foram comparadas, utilizando as técnicas instrumentais de HATR-FTIR, RMN de  $^{31}\text{P}$ , RMN de  $^1\text{H}$ , Medidas de Potencial Zeta, DLS, DSC e UV- vis, conforme descrito anteriormente.

Os espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, na ausência e na presença de Gen estão apresentados nas Figuras 19 e 20. As atribuições dos modos vibracionais da

fosfatidilcolina (estiramentos axiais presentes em todas as amostras analisadas) para cada sistema lipossomal, assim como da Gen e do CHOL, para reconhecimento de interferência na análise dos resultados, por sobreposição de picos, estão listadas na Tabela 2.

Vale ressaltar que os dados referentes às atribuições de HATR-FTIR de Gen e CHOL já estão documentados na literatura, de acordo com Azambuja e colaboradores (2015); Gupta e colaboradores (2014); Paradkar e Irudayaraj (2002).

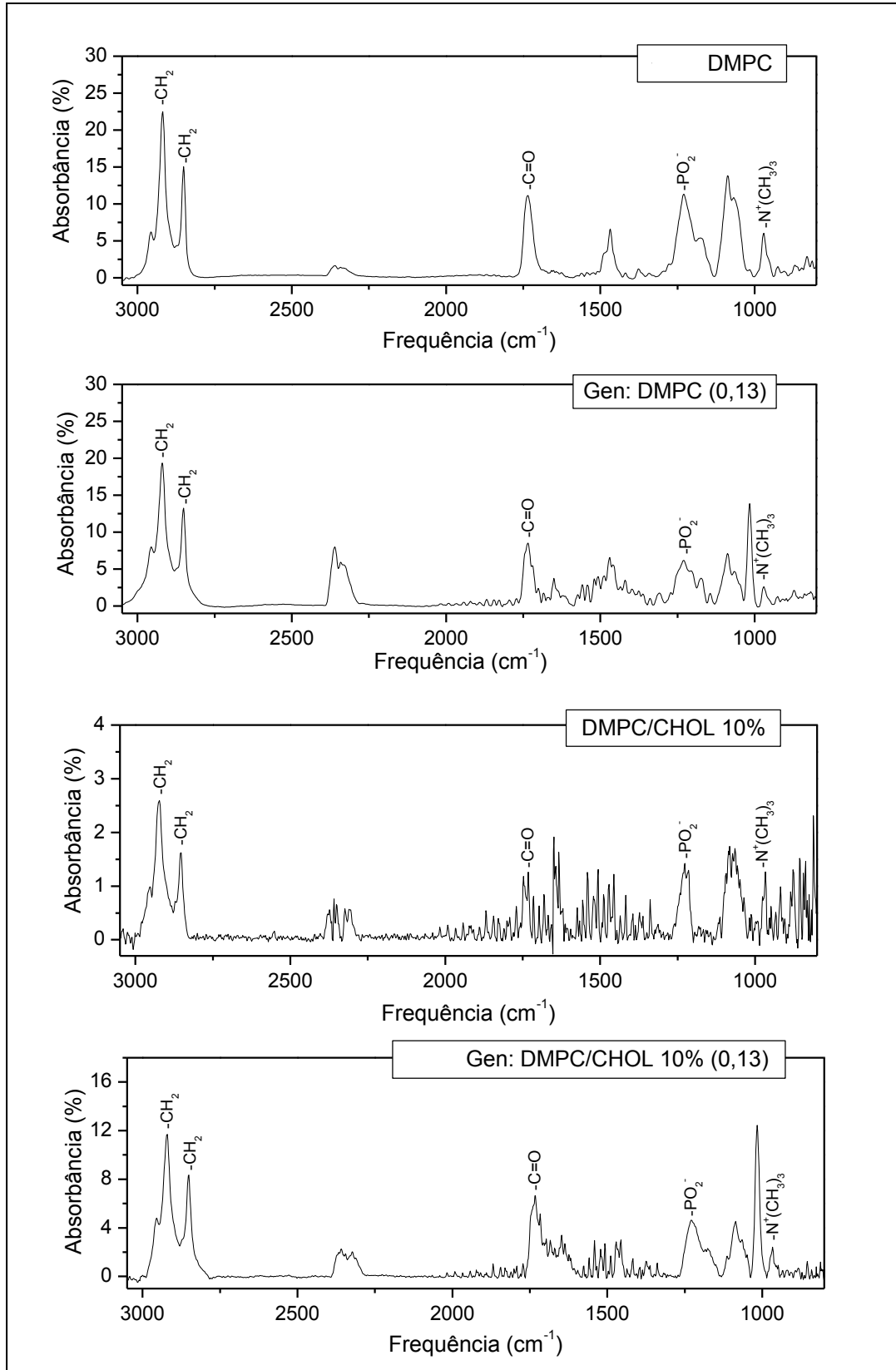


Figura 19: Espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), puros e contendo Gen.



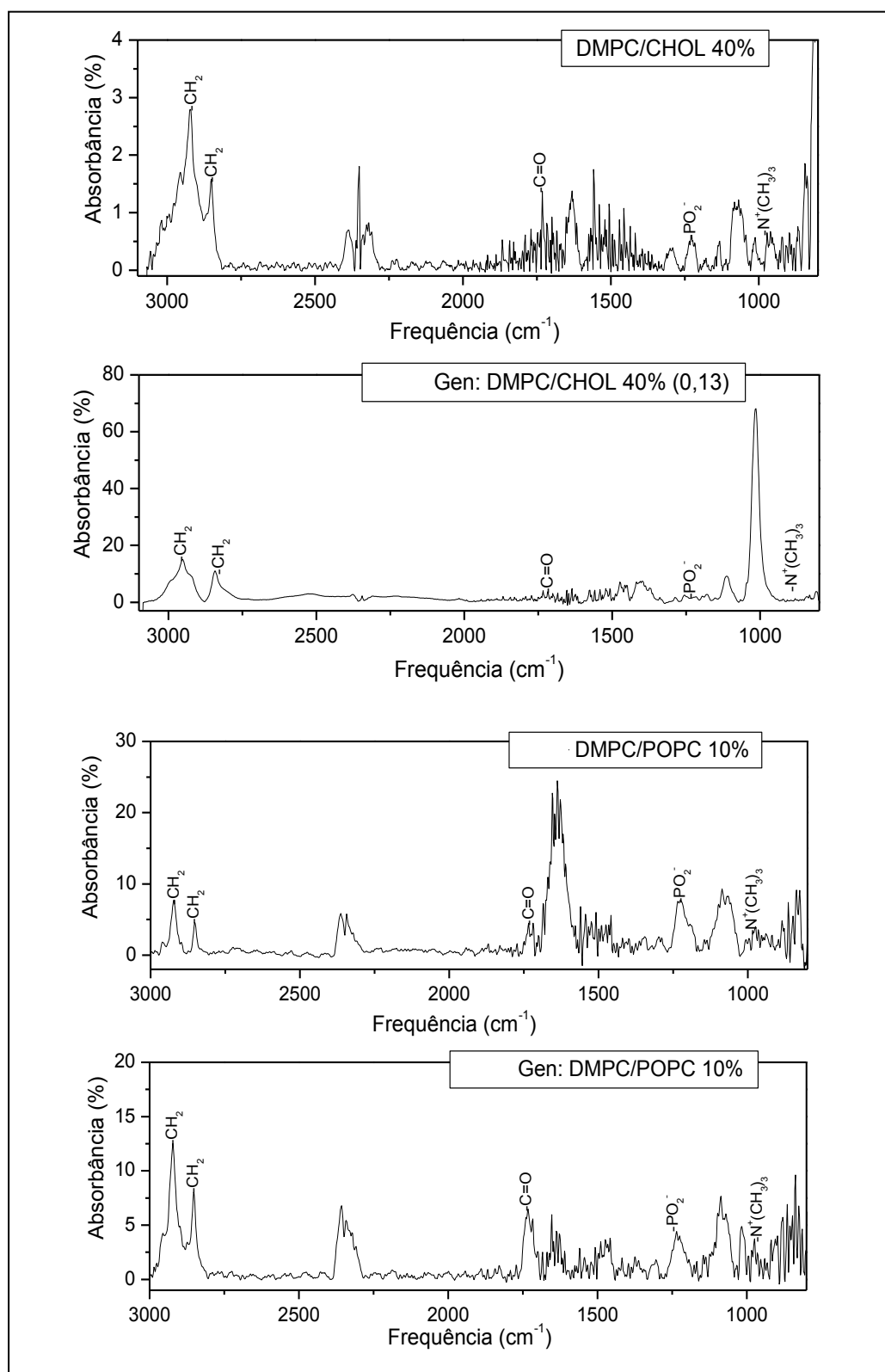


Figura 20: Espectros de HATR-FTIR dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil-oleoilfosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%), puros e contendo Gen.

Para os todos os lipossomos estudados, foram detectados e analisados os seguintes estiramentos, referentes aos grupos presentes na fosfatidilcolina: estiramento axial assimétrico do grupo fosfato ( $\nu_{as} PO_2^-$ ), estiramento axial assimétrico do grupo colina ( $\nu_{as} N^+ (CH_3)_3$ ), estiramento axial da carbonila ( $\nu C=O$ ), estiramentos axiais simétricos ( $\nu_s CH_2$ ) e assimétricos ( $\nu_{as} CH_2$ ) dos grupos metilênicos.

O espectro de CHOL puro apresenta os seguintes picos: deformação angular OCH ( $\delta OCH$ ), estiramento axial C-C-C ( $\nu C-C-C$ ), deformação angular CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> ( $\delta CH_2, CH_3$ ), estiramento axial assimétrico C-H ( $\nu_{as} C-H$ ), estiramento axial CH ( $\nu CH$ ), estiramento axial OH ( $\nu OH$ ).

O espectro da Gen pura apresenta os seguintes picos: estiramento axial da carbonila ( $\nu C=O$ ), estiramento axial C=C ( $\nu C=C$ ), deformação angular OH ( $\delta OH$ ), estiramento axial C-O-C ( $\nu C-O-C$ ) (Azambuja et al., 2015; Gupta et al., 2014; Paradkar e Irudayaraj, 2002).

As frequências de cada modo vibracional estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Atribuições de picos de FTIR, referentes aos modos vibracionais de fosfatidilcolina, colesterol e genisteína.

Composto	Frequência	Atribuição FTIR
Fosfatidilcolina	1222,35 cm <sup>-1</sup>	$\nu_{as} PO_2^-$
	973,90 cm <sup>-1</sup>	$\nu_{as} N^+(CH_3)_3$
	1736,94 cm <sup>-1</sup>	$\nu C=O$
	2853,51 cm <sup>-1</sup>	$\nu_s CH_2$
	2923,23 cm <sup>-1</sup>	$\nu_{as} CH_2$
Genisteína	1645,28 cm <sup>-1</sup>	$\nu C=O$
	1614,42 cm <sup>-1</sup>	$\nu C=C$
	1519,91–1419,61 cm <sup>-1</sup>	$\delta 5-OH$ e $\nu C=C$
	1307,74-1143,79 cm <sup>-1</sup>	$\nu C-O-C$
	3444,87–3165,19 cm <sup>-1</sup>	$\delta OH$
Colesterol	680 cm <sup>-1</sup> – 769 cm <sup>-1</sup>	$\delta OCH$
	859 cm <sup>-1</sup>	$\nu C-C-C$
	1372 cm <sup>-1</sup>	$\delta CH_2, CH_3$
	2882 – 2948 cm <sup>-1</sup>	$\nu_{as} C-H$
	3028 cm <sup>-1</sup>	$\nu CH$
	3611 cm <sup>-1</sup>	$\nu OH$

Através do estudo dos espectros apresentados nas Figuras 19 e 20, foi possível analisar a influência da Gen nos valores de frequência e nas larguras de banda a  $\frac{3}{4}$  da altura de cada pico dos lipídios, avaliando-se o grau de hidratação e mobilidade dos mesmos. Os resultados serão discutidos, a seguir, considerando cada região específica dos lipídios: região polar, interface e região apolar.

### **5.2.1. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA NA REGIÃO POLAR DOS LIPOSSOMOS**

A interação de uma molécula exógena com o grupo fosfato lipídico pode promover alterações na orientação e grau de hidratação deste. Isto é refletido em um espectro de FTIR, nas variações nos valores de frequência de  $\nu_{as} PO_2^-$  (Azambuja et al., 2015; Manrique-Moreno et al., 2010; Manrique-Moreno et al., 2009; Chen e Tripp, 2008; Herec et al., 2007; López-García et al., 1993). Os valores de frequências, referentes aos grupos específicos dos lipídios nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de frequências dos grupos lipídicos específicos nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen.

Sistema	Frequências (cm <sup>-1</sup> )				
	$\nu_{as} N^+(CH_3)_3$	$\nu_{as} PO_2^-$	$\nu C=O$	$\nu_s CH_2$	$\nu_{as} CH_2$
DMPC	973,90	1222,35	1736,94	2853,51	2923,23
Gen: DMPC	973,90	1226,77	1736,94	2849,00	2923,23
Variação $\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	-----	4,42	-----	4,51	-----
DMPC/CHOL 10%	966,32	1226,77	1732,03	2853,58	2924,23
Gen:DMPC/ CHOL 10%	966,34	1230,29	1733,05	2850,75	2921,02
Variação $\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	-----	3,52	1,02*	2,83	3,21
DMPC/CHOL40%	976,93	1227,03	1734,76	2851,77	2921,35
Gen:DMPC/ CHOL 40%	976,93	1251,48	1734,76	2843,31	2954,26
Variação $\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	-----	24,45	-----	8,46	32,91
DMPC/POPC 10%	973,82	1224,98	1734,09	2852,08	2922,28
Gen: DMPC/POPC 10%	973,14	1224,21	1732,85	2852,28	2922,20
Variação $\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	0,68*	0,77*	1,24*	0,2*	0,08*

\*Valores não significativos

Nos lipossomos de DMPC, a incorporação de Gen provocou um aumento nos valores de frequência de  $\nu_{as} PO_2^-$ , de 4,42 cm<sup>-1</sup> (ao comparar os valores do lipossomo puro com os do lipossomo contendo Gen). Nos sistemas contendo DMPC/ CHOL 10%, os valores de frequência de  $\nu_{as} PO_2^-$  aumentaram em 3,52 cm<sup>-1</sup>. Já nos lipossomos compostos de DMPC/CHOL 40%, observou-se uma variação maior na frequência referente ao  $\nu_{as} PO_2^-$ , de 24,35 cm<sup>-1</sup>.

Estes aumentos nos valores de frequência do  $\nu_{as} PO_2^-$  induzidos por Gen, indicaram que a presença da isoflavona contribuiu para uma redução na quantidade de ligações de hidrogênio entre o grupo fosfato e os átomos presentes na molécula de Gen ou de água, ou seja, uma redução no grau de hidratação do fosfato lipídico (Azambuja et al., 2015; López- Garcia et al., 1993). Vale ressaltar que ligações de

hidrogênio com o grupo fosfato lipídico podem ocorrer nos grupos hidroxila presentes em Gen.

Assim sendo, a presença de 10% de CHOL em lipossomos de DMPC parece ter induzido uma redução mais discreta nas ligações hidrogênio entre o grupo fosfato e Gen ou moléculas de água, quando comparado a sistemas compostos somente por DMPC. No entanto, ao aumentar-se o percentual de CHOL no sistema (em DMPC/CHOL 40%), a variação de frequência do  $\nu_{as} PO_2^-$  aumentou drasticamente, quando comparado a DMPC. Nos lipossomos de DMPC/CHOL 40% observamos uma variação nos valores de frequência do  $\nu_{as} PO_2^-$  81,9% maior do que a variação observada nos lipossomos de DMPC.

Nas membranas de DMPC/POPC 10%, não foram observadas alterações significativas nos valores de frequência do  $\nu_{as} PO_2^-$ , com a presença da Gen. Isto indica que, neste sistema, a isoflavona não promoveu variações no número de ligações hidrogênio do grupo fosfato lipídico.

De forma a monitorar a influência da Gen na liberdade de movimentos dos grupos lipídicos, foram realizadas medidas de larguras de bandas de FTIR dos grupos lipídicos específicos.

A Figura 21 mostra uma ampliação do espectro de HATR-FTIR (Figura 19), de lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros e contendo Gen, na região do grupo fosfato, para análises de largura de bandas. Vale ressaltar que este procedimento foi realizado para todos os grupos analisados, de todas as amostras investigadas.

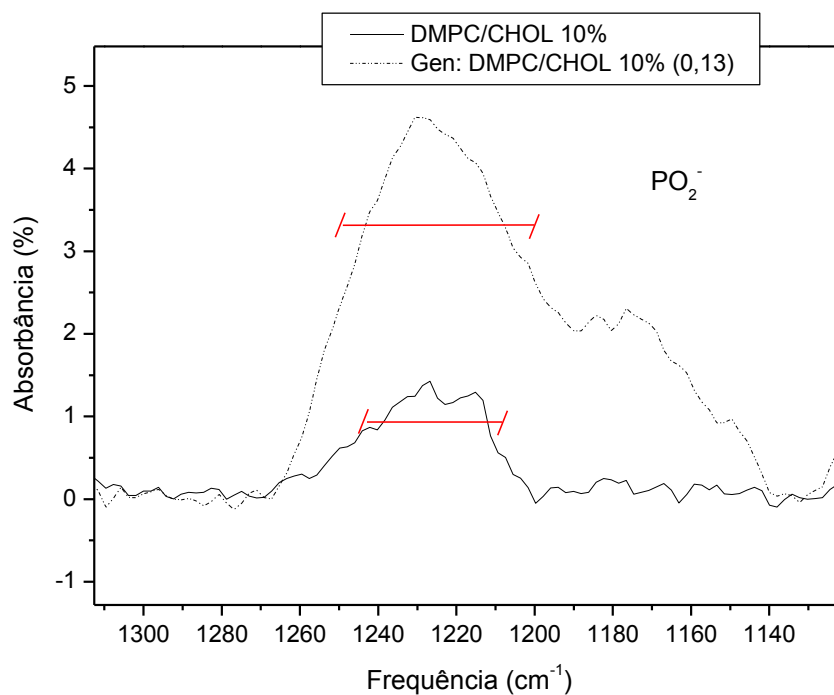


Figura 21: Ampliação dos espectros de HATR-FTIR de lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), puros e contendo Gen na região do  $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ .

Os valores de largura de banda e variações para cada sistema estão listados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de larguras de banda de FTIR referentes aos estiramentos axiais de grupos lipídicos específicos nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen.

Sistema	Larguras (cm <sup>-1</sup> )			
	$\nu_{as} PO_2^-$	$\nu C=O$	$\nu_s CH_2$	$\nu_{as} CH_2$
DMPC	31,00	22,28	9,65	12,33
Gen: DMPC	25,07	20,35	10,04	13,32
Variação (cm <sup>-1</sup> )	5,93	1,93	0,39*	0,99*
DMPC/CHOL 10%	24,43	-----	10,07	15,49
Gen:DMPC/ CHOL 10%	33,98	-----	9,85	13,54
Variação (cm <sup>-1</sup> )	9,55	-----	0,22*	1,95
DMPC/CHOL 40%	22,31	3,15	11,4	16,53
Gen:DMPC/ CHOL 40%	12,44	1,83	16,68	23,78
Variação (cm <sup>-1</sup> )	9,87	1,32	5,28	7,25
DMPC/POPC 10%	27,48	5,78	8,58	12,75
Gen: DMPC/POPC 10%	30,58	17,42	10,37	16,09
Variação (cm <sup>-1</sup> )	3,10	11,64	1,79	3,34

\*Valores não significativos

A Figura 22 mostra as variações nos valores de larguras de banda, provocadas pela presença de Gen, bem como a sensibilidade dos sistemas lipossomais à ação da isoflavona.



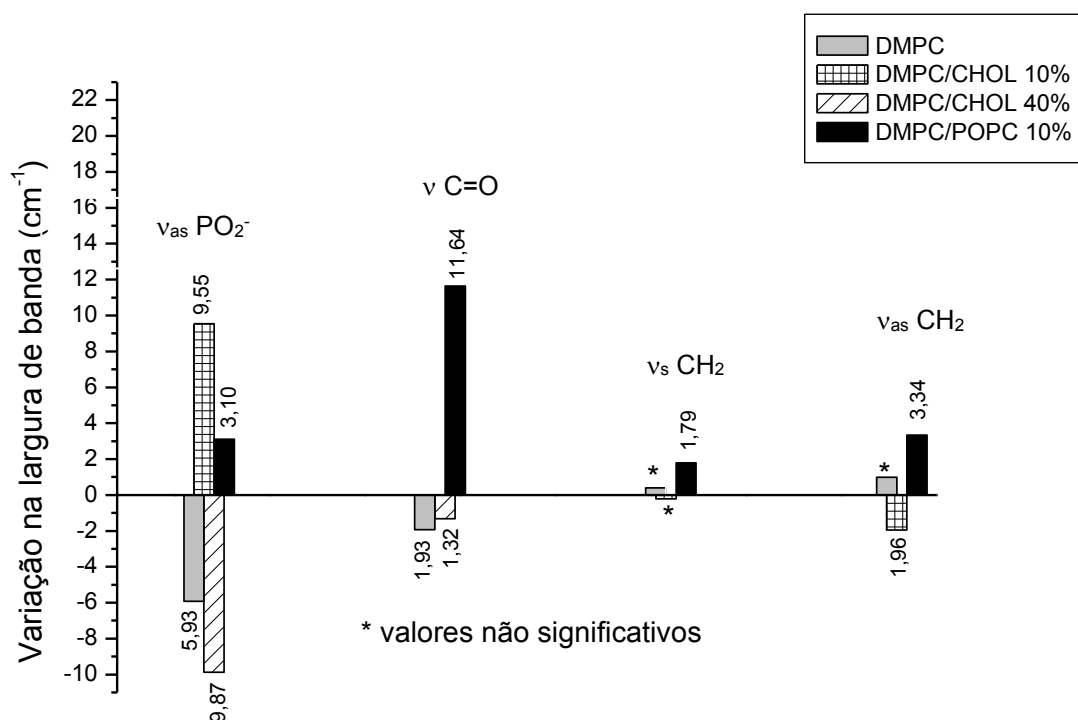


Figura 22: Variações nos valores de largura de banda dos picos específicos, presentes nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%).

Como se pode observar a partir dos dados da tabela 4 e no gráfico apresentado na Figura 22, a Gen reduziu a largura de banda de  $\nu_{as} PO_2^-$ , nos lipossomos de DMPC em  $5,93 \text{ cm}^{-1}$ . Isto sugere que a isoflavona ordenou a região do fosfato lipídico (Manrique-Moreno et al., 2009; Severcan et al., 2005).

A presença de 10% de CHOL no sistema lipossomal (DMPC/CHOL 10%) acarretou um efeito da Gen inverso ao observado nos lipossomos de DMPC, e também parece ter tornado o sistema mais sensível à ação da isoflavona (visto que a variação para este sistema foi de  $9,55 \text{ cm}^{-1}$ , 37,9% maior, quando comparada a variação de  $5,93 \text{ cm}^{-1}$  observada para lipossomos de DMPC). O aumento na largura de banda de  $\nu_{as} PO_2^-$  de  $9,55 \text{ cm}^{-1}$  sugeriu um aumento de fluidez na região induzido pela isoflavona.

O aumento do percentual de CHOL nos lipossomos de DMPC (DMPC/CHOL 40%), entretanto, influenciou para um efeito de ordenamento na região do grupo

fosfato lipídico, provocado pela Gen, tal como observado em lipossomos de DMPC. Assim como em DMPC/CHOL 10%, a presença de 40% de CHOL tornou a região fosfato lipídica mais sensível à ação de Gen (visto que houve uma variação de 9,87  $\text{cm}^{-1}$  na largura de  $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ , 39,92% maior do que a variação de 5,93  $\text{cm}^{-1}$  observada para lipossomos de DMPC).

Nos lipossomos de DMPC/POPC 10%, observou-se um aumento nos valores de largura de banda de  $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$  de 3,10  $\text{cm}^{-1}$ . Isto indicou que a presença de POPC tornou o grupo fosfato lipídico menos sensível à interação com Gen, comparada aos outros sistemas estudados (baseados em DMPC na ausência e na presença de CHOL).

A variação nos valores de largura de  $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$  nos lipossomos de DMPC/POPC 10% foi 47,7% menor do que nos lipossomos de DMPC, 67,5% menor do que nos lipossomos de DMPC/CHOL 10% e 68,6% menor do que nos lipossomos de DMPC/CHOL 40%. Assim como em DMPC/CHOL 10%, nos lipossomos de DMPC/POPC 10% a Gen induziu uma fluidificação das membranas, nesta região.

Vale ressaltar que os lipossomos de DMPC/CHOL 10% e DMPC/POPC 10%, possuem uma maior concentração de Gen incorporada (em comparação com os lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 40%). Sendo assim, visto que o espectro da Gen pura apresenta o  $\nu \text{C-O-C}$  na faixa entre 1307,74- 1143,79  $\text{cm}^{-1}$ , e a frequência de  $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$  dos sistemas estudados localiza-se entre 1222,35  $\text{cm}^{-1}$  e 1251,48  $\text{cm}^{-1}$ , deve-se considerar uma possível sobreposição entre estes dois picos.

Com o objetivo de obter maiores informações acerca da região do fosfato lipídico, bem como a lamelaridade das membranas, foram então realizadas medidas de RMN de  $^{31}\text{P}$  (Villasmil -Sánchez et al., 2013; Ghosh, 1988). Os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, na ausência e na presença de Gen estão apresentados nas Figuras 23 e 24.

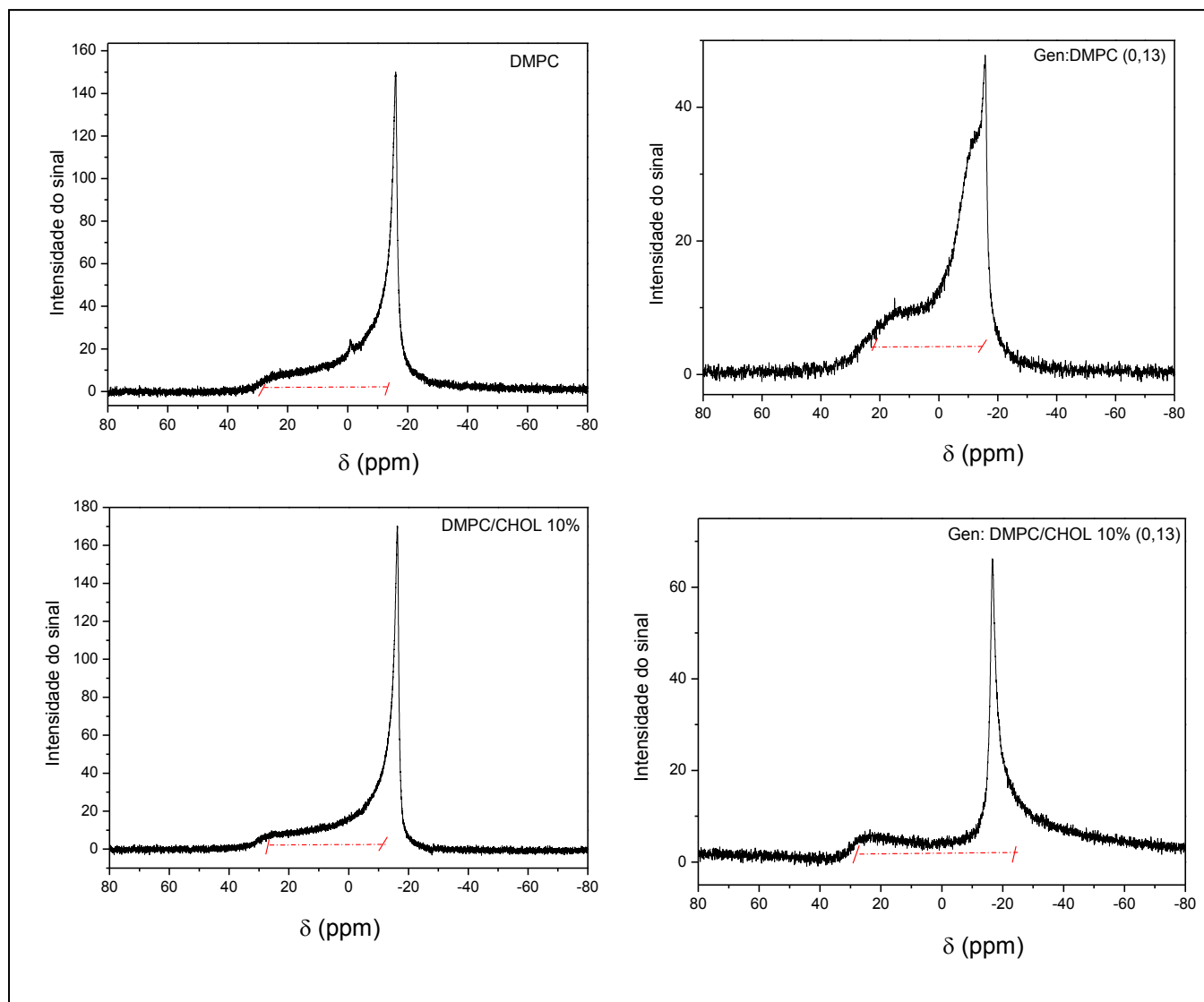


Figura 23: Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  de lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), puros e contendo Gen.

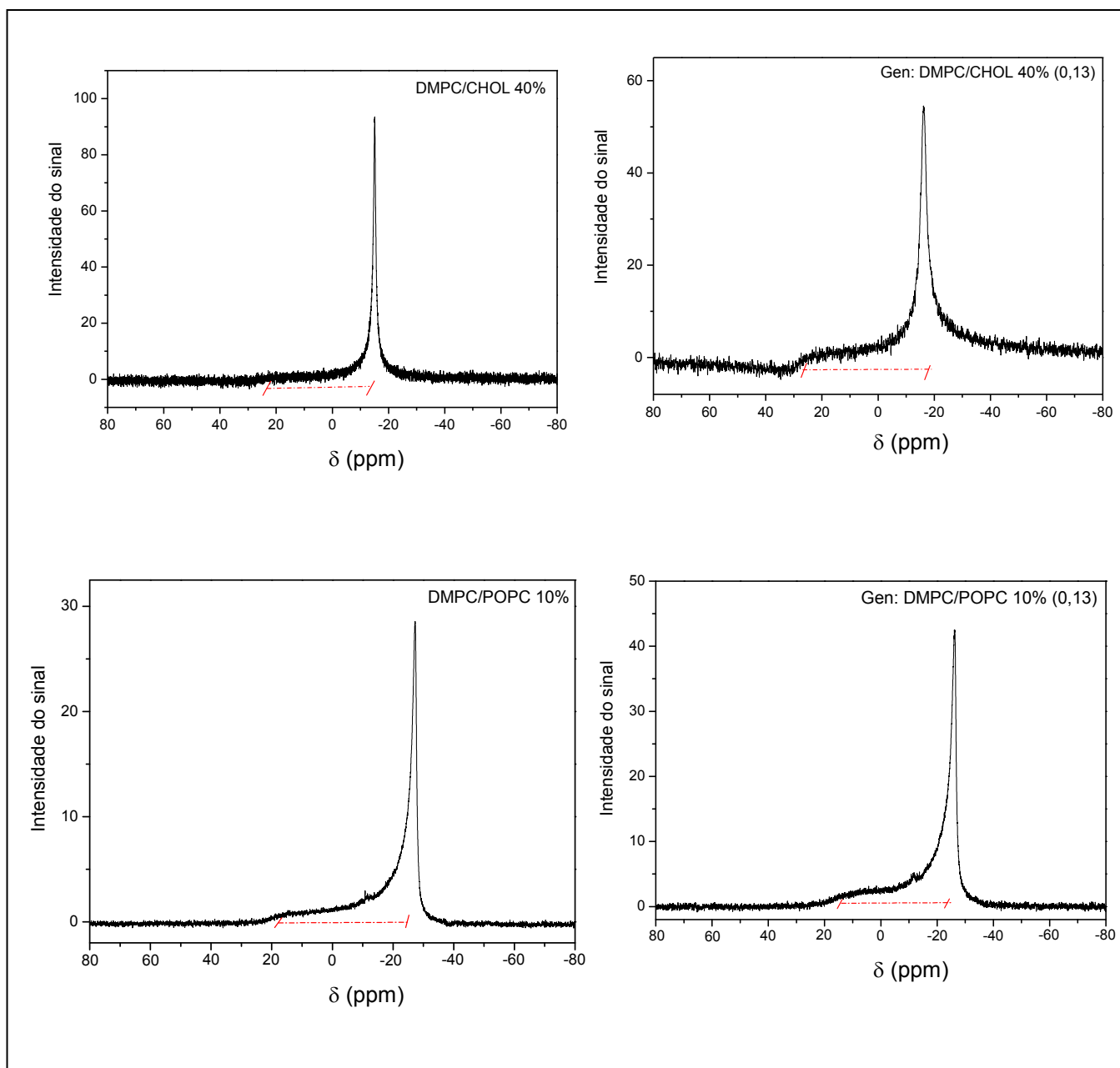


Figura 24: Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  de lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%) puros e contendo Gen.

Os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  dos lipossomos compostos por DMPC, DMPC/CHOL 10% (Figura 23) e DMPC/POPC 10% (Figura 24), apresentaram um ombro largo em baixo campo magnético e um pico mais estreito em alto campo, isso indica que as membranas estão em fase lamelar e organizadas em bicamadas, o que é característico de fosfatidilcolinas, como o DMPC (ver Figura 8, item 2.2.) (Villasmil – Sánchez et al., 2013; Lasic, 1998).

A presença de Gen nestes sistemas não alterou o seu estado de fases, visto que as formas dos espectros de  $^{31}\text{P}$  RMN não foram modificadas pela presença da isoflavona.

Os espectros de DMPC/CHOL 40%, sem Gen (Figura 24), apresentaram um espectro com características mais simétricas (onde a presença do ombro largo em baixo campo magnético é praticamente imperceptível), típico de lipídios em fase hexagonal isotrópica I ou em configurações cúbica ou micelar (ver Figura 8, item 2.2.). Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  simétricos também podem ser indicativos de que o sistema se encontra na fase líquido- cristalina (estado fluído) (Villasmil – Sánchez et al., 2013; Lasic, 1998).

Sabe-se que o colesterol tende a uma organização de micela inversa (Villasmil – Sánchez et al., 2013; Lasic, 1998), sendo assim, as características do espectro de DMPC/CHOL 40%, parecem ter sido influenciadas pela presença do alto percentual de colesterol no sistema.

Quando a Gen foi incorporada nos lipossomos de DMPC/CHOL 40%, observa-se a presença mais acentuada de um ombro mais largo em baixo campo magnético, indicando que a isoflavona promove uma reorganização da membrana para a fase lamelar, com a presença de bicamadas lipídicas (Villasmil -Sánchez et al., 2013; Cullis e de Kruijff, 1979; Seelig, 1978).

As medidas da anisotropia do deslocamento químico (CSA) de cada sistema lipossomal estudado, com seus respectivos controles, estão listadas na Tabela 5. Tais medidas estão relacionadas com a liberdade de rotação do núcleo de fósforo. Aumentos na CSA induzidos por um agente externo ou pela própria composição lipídica indicam um núcleo de fósforo com mobilidade rotacional restrita, assim como um pico mais estreito é típico de um núcleo em um ambiente mais desordenado (Mohan et al., 2014; Debouzy et al., 2002; Seelig et al., 1981).

Tabela 5: Influência da genisteína (Gen) na anisotropia do deslocamento químico do núcleo de  $^{31}\text{P}$  de lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%.

	$\sigma_{\parallel}$	$\sigma_{\perp}$	CSA (ppm)
DMPC	25,60	-15,94	41,54
Gen: DMPC	25,10	-15,94	41,04
DMPC/CHOL 10%	28,30	-16,54	44,84
Gen: DMPC/CHOL 10%	28,30	-16,54	44,84
DMPC/CHOL 40%	26,8	-15,07	41,87
Gen: DMPC/CHOL 40%	26,24	-16,21	42,45
DMPC/POPC 10%	19,30	-26,50	45,08
Gen: DMPC/POPC 10%	16,00	-26,00	42,00

Como se pode observar na Tabela 5, nos lipossomos de DMPC e DMPC contendo 10% e 40% de CHOL, a Gen não provocou alterações significativas nos valores de CSA enquanto que em DMPC/POPC 10%, a Gen induziu a uma redução na largura do pico de fósforo de 3,08 ppm, contribuindo para uma maior fluidez na região do fosfato lipídico.

Ainda na região polar das membranas, através das análises de HATR- FTIR (Figuras 19 e 20, Tabela 3), não foram observadas alterações nos valores de frequência e largura de banda, referente ao pico de  $\nu_{\text{as}} \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ .

Nesse contexto, a fim de se obter mais informações sobre a dinâmica da colina lipídica, foram realizados estudos de  $T_1$  (via RMN de  $^1\text{H}$ ) As curvas apresentadas na Figura 25, são referentes à recuperação dos sinais de decaimento da indução livre (FID) de hidrogênios da colina lipídica (3,2 ppm) . A partir destas curvas, os valores de  $T_1$  foram calculados e estão listados na Tabela 6.

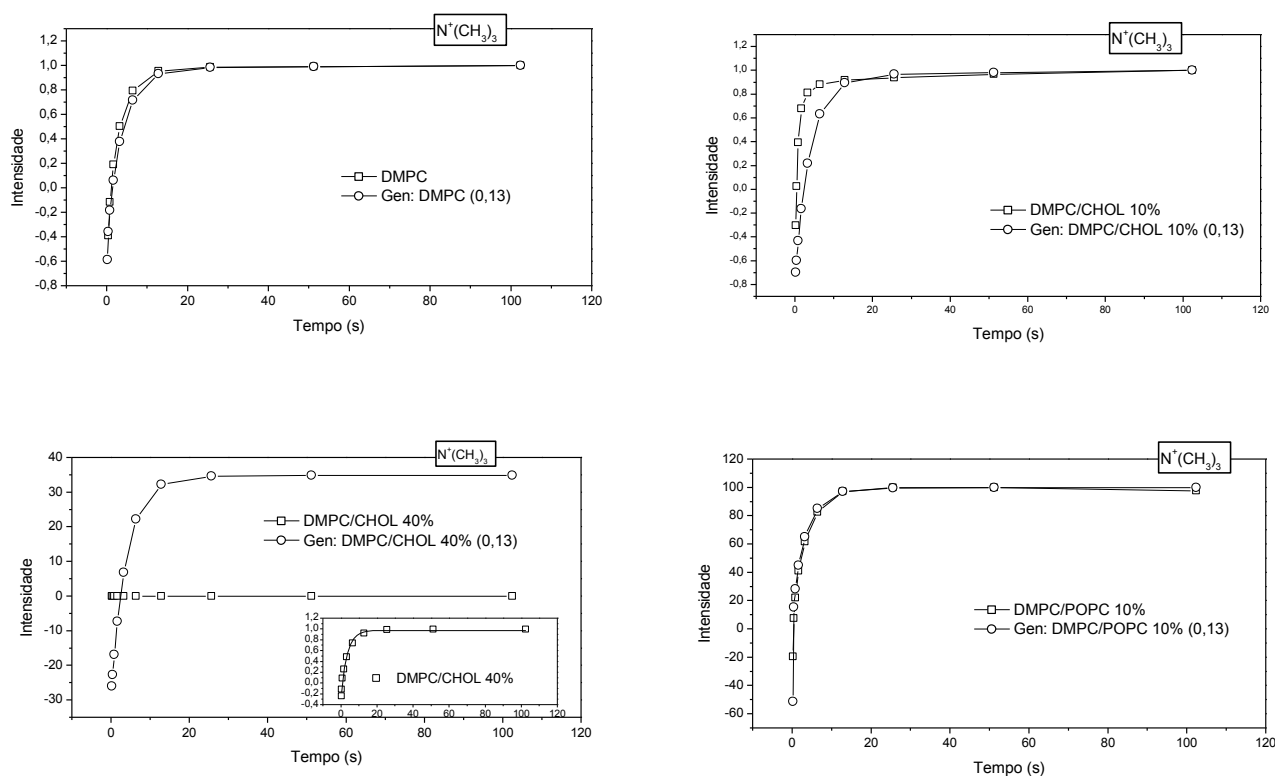


Figura 25: Curvas referentes à recuperação dos sinais de FID dos hidrogênios da colina (3,2 ppm) nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%), puros e contendo Gen.

Tabela 6: Valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) dos hidrogênios presentes no grupo colina, dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen.

Sistema lipossomal	$T_1$ (s)		Variação (s)
	Puro	Com Gen	
DMPC	2,24	3,11	0,87
DMPC/CHOL 10%	0,71	3,86	3,15
DMPC/CHOL 40%	3,51	3,88	0,37
DMPC/POPC 10%	2,62	1,30	1,32

Nos sistemas lipossomais de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40%, a Gen induziu um aumento nos valores de  $T_1$  de 28,0%, 81,6% e 9,54%, respectivamente (em comparação com os lipossomos puros), indicando que a isoflavona ordenou a região do grupo colina nestes sistemas. Nos lipossomos de DMPC/POPC 10% observamos um efeito inverso, provocado pela incorporação de Gen. A isoflavona provocou uma redução de 50,4% (comparado aos lipossomos puros) nos valores de  $T_1$ , o que aponta para um aumento na fluidez do sistema, na região da colina.

A Figura 26 mostra as variações, induzidas pela presença de Gen, nos valores de  $T_1$  dos hidrogênios da colina e a influência da composição lipídica na suscetibilidade de cada sistema aos efeitos provocados pela isoflavona.



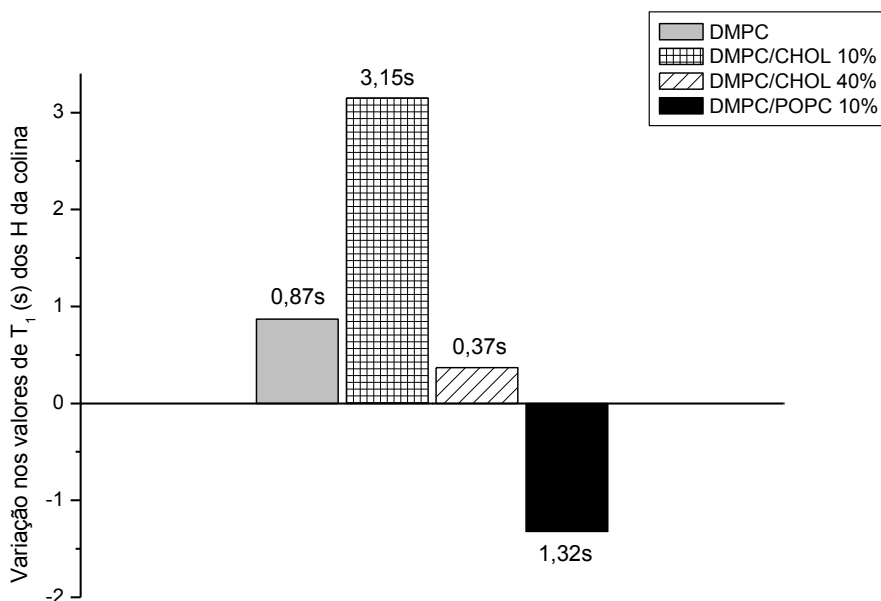


Figura 26: variações nos valores de  $T_1$  dos  $^1\text{H}$  presentes nos grupos colina, provocadas pela incorporação de Gen nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%).

Pode-se observar que a inserção de 10% de CHOL e 10% de POPC nos sistemas lipossomais contendo DMPC, parecem ter tornado a colina lipídica mais sensível à ação da isoflavona, posto que em DMPC/CHOL 10% e DMPC/POPC 10% as variações (em segundos) nos valores de  $T_1$  dos hidrogênios da colina foram 72,4% e 34,1%, respectivamente, maiores do que nos lipossomos de DMPC.

Todavia, uma maior concentração de CHOL inserido nas membranas (40%) tornou a colina lipídica menos sensível à ação da Gen. Nos lipossomos de DMPC/CHOL 40% a variação (em segundos) nos valores de  $T_1$  dos hidrogênios da colina lipídica foi 57,5% menor do que nos lipossomos de DMPC e 88,2% menor do que em DMPC/CHOL 10%. No entanto, vale ressaltar que nos lipossomos de DMPC/CHOL 40% a concentração de Gen incorporada nos lipossomos é menor do que a concentração de Gen incorporada nos demais sistemas avaliados neste estudo.

Através das técnicas de HATR-FTIR, RMN de  $^{31}\text{P}$  e RMN de  $^1\text{H}$ , observou-se que na região polar dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL

40%, a Gen promoveu um maior grau de ordem relacionado aos grupos fosfato e colina. Nos lipossomos de DMPC/POPC10% a Gen contribuiu para um discreto ordenamento na região do fosfato lipídico e tornou a região do grupo colina mais fluida.

A fim de monitorar a orientação dos grupos de cabeça (fosfato e colina) dos fosfolípidios, foi realizado o estudo de distribuição de cargas superficiais nas membranas, por meio de Medidas de Potencial Zeta.

Valores de Potencial Zeta negativos indicam que o plano da colina pode encontrar-se orientado abaixo do plano da bicamada e quando a colina está orientada acima do plano da bicamada lipídica, os valores de Potencial Zeta tendem a ser mais positivos, como mostra o esquema apresentado na Figura 27 (Dimitrios e Sophia, 2002; Legrand et al., 1999).

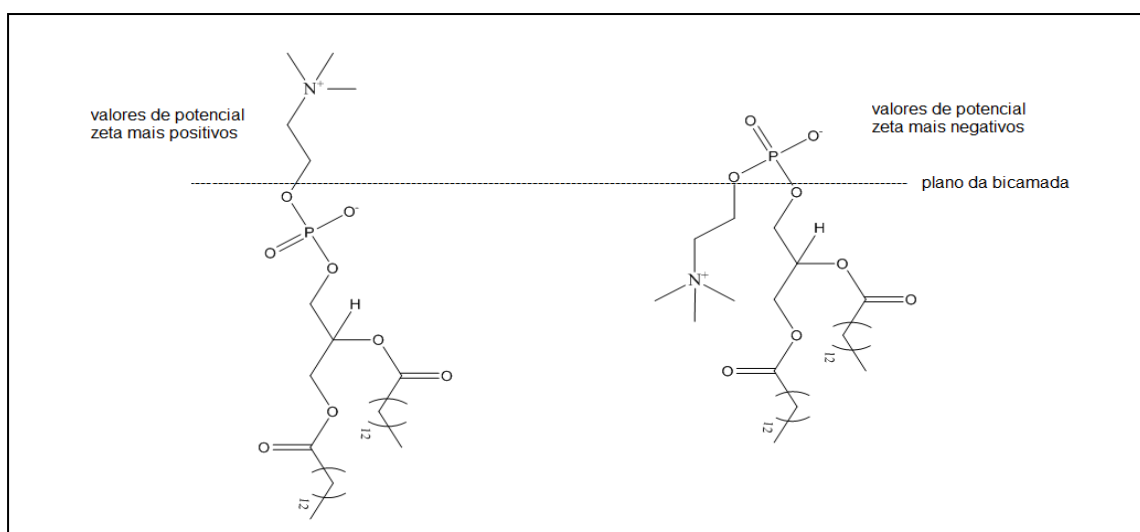


Figura 27: Representação esquemática de diferentes orientações dos grupos colina e fosfato.

Os valores de Potencial Zeta dos sistemas estudados, na ausência e na presença de Gen estão listados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de Potencial Zeta dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen.

Sistema lipossomal	Potencial zeta (mV)	
	Puro	Com Gen
DMPC	- 38,2±0,4	- 37,1±0,5
DMPC/CHOL 10%	- 10,4±0,9	- 18,2±0,8
DMPC/CHOL 40%	- 44,3±0,9	- 24,4±0,8
DMPC/POPC 10%	- 30,7±0,4	-18,2±0,4

De acordo com a Tabela 7, a Gen tornou os valores de Potencial Zeta dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10% mais positivos em 1,1 mV, 7,8 mV e 19,9 mV, respectivamente. Essas variações indicam que a isoflavona direcionou o grupo colina para a superfície da membrana, orientando-o para um plano acima do plano da bicamada lipídica.

O aumento da carga superficial nos lipossomos favorece uma maior circulação destes carreadores lipídicos na corrente sanguínea e facilita a interação com o ácido desoxirribonucléico (DNA), que possui carga negativa devido à presença de grupos fosfatos, via interações eletrostáticas (Figura 28) (Batista et al., 2007; Awasthi et al., 2004; Ulrich, 2002). Sendo assim o aumento nos valores de Potencial Zeta, provocado pela inserção da Gen nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, parece contribuir para um aumento na eficácia dos mesmos, como sistemas carreadores.

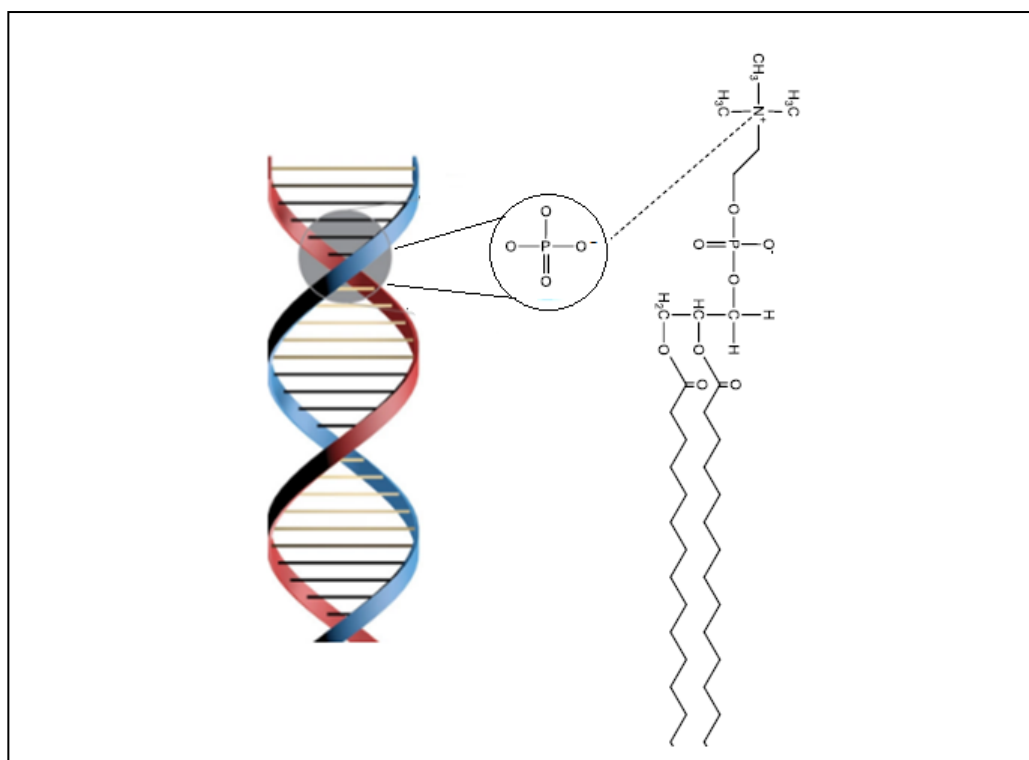


Figura 28: Representação da interação eletrostática entre o grupo colina presente na molécula de fosfatidilcolina e o grupo fosfato presente na molécula de DNA.

Todavia, nos lipossomos de DMPC/CHOL 10%, a presença de Gen deslocou os valores de Potencial Zeta para valores mais negativos (variação de 7,8 mV). É importante ressaltar que, através das medidas de  $T_1$  dos hidrogênios do grupo colina (discutido anteriormente), observamos uma interação da Gen consideravelmente mais acentuada com a colina lipídica nos lipossomos de DMPC/CHOL 10%, quando comparado aos demais sistemas estudados.

Sendo assim, parece que ao interagir mais fortemente com a colina lipídica, a Gen provocou uma modificação na orientação deste grupo.

### 5.2.1.1. ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMOS CONTENDO GENISTEÍNA A PARTIR DAS CARGAS DA REGIÃO POLAR E ANÁLISE DO TAMANHO VESICULAR

Análises de Potencial Zeta também fornecem informações relacionadas à estabilidade dos lipossomos. Os valores de Potencial Zeta acima de 30 mV (positivos ou negativos) são relacionados a suspensões mais estáveis, visto que estas apresentam repulsão entre as moléculas, prevenindo sua agregação (Malvern, 2012). Sendo assim, os lipossomos de DMPC, tanto puros quanto contendo Gen, se mostraram mais estáveis do que os lipossomos de DMPC contendo CHOL (10% e 40%) e POPC (10%).

Neste contexto, a fim de obter informações sobre a influência da Gen no diâmetro dos lipossomos, e por consequência, agregação e estabilidade, foram realizados experimentos de DLS. Através da técnica de DLS, detectou-se o diâmetro dos lipossomos estudados, que estão listados na Tabela 8.

Tabela 8: Diâmetro dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen.

Sistema lipossomal	Diâmetro (nm)	
	puro	Com Gen
DMPC	331,0±13,2	278,5±12,6
DMPC/CHOL 10%	1237,0±124,9	1187,0±116,5
DMPC/CHOL 40%	5220,5±678,64	4433,5±497,3
DMPC/POPC 10%	1157,0±104,5	3242,5±205,6

De acordo com a Tabela 8, nota-se que os lipossomos de DMPC (puros e contendo Gen) apresentaram um diâmetro consideravelmente menor do que os

lipossomos de DMPC contendo CHOL ou POPC (os lipossomos de DMPC contendo Gen apresentaram um diâmetro 76,53% menor do que os lipossomos de DMPC contendo 10% de CHOL, 93,72% menor do que os lipossomos de DMPC contendo 40% de CHOL e 91,41% menor do que os lipossomos de DMPC contendo 10% de POPC).

Sabe-se que tecidos com tumores sólidos possuem capilares mais permeáveis, com diâmetros que podem variar de 100 a 800 nm. Sendo assim, para que trafeguem do sangue para o espaço intersticial do tumor através dos poros, os carreadores precisam possuir diâmetros menores que 800 nm (Sapra e Allen, 2003). Neste contexto, os lipossomos de DMPC apresentaram um diâmetro adequado para ser vetorizado ao tumor, ao passo que a inserção de CHOL e/ou POPC provocou um aumento no diâmetro das membranas.

Observa-se ainda que a presença de Gen induziu a uma redução no tamanho dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40% em 15,9%, 4,04% e 15,06%, respectivamente, quando comparados aos lipossomos puros. , o que indica que a isoflavona não induziu a aglomeração das partículas nestes sistemas, indicando estabilidade das membranas. Por outro lado, nos lipossomos de DMPC/POPC 10% a Gen provocou um aumento de 64,32%, quando comparada aos lipossomos puros, o que pode estar associado a um processo de aglomeração.

Valenti e colaboradores (2001) observaram uma redução no tamanho de lipossomos de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e colesterol, com o encapsulamento do óleo essencial de *Santolina insularis*. O mesmo comportamento foi observado por Sinico e colaboradores (2005) ao incorporar o óleo essencial de *Artemisia arborescens* L. em lipossomos de fosfatidilcolina de soja hidrogenada e não hidrogenada. A redução do tamanho dos lipossomos foi atribuída a um maior empacotamento das cadeias apolares e conseqüentemente, maiores interações intermoleculares, induzidas pela incorporação dos óleos essenciais estudados (Sherry et al., 2013; Sinico et al. 2005; Valenti et al., 2001). Neste contexto, a partir dos resultados obtidos, pode-se correlacionar a redução no tamanho dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40% induzida por Gen, a um maior empacotamento das membranas, provocado pela isoflavona. Já em lipossomos de DMPC/POPC 10%, com a presença de um fosfolípido monoinsaturado, é possível

que esse empacotamento, induzido pela Gen, seja menos eficaz, resultando em um aumento no tamanho das partículas. Entretanto, para confirmação desta hipótese, fez-se necessário a caracterização do efeito de Gen nas outras regiões dos lipossomos, descrita a seguir.

### **5.2.2. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA NA REGIÃO DE INTERFACE DOS LIPOSSOMOS**

Os efeitos provocados pela Gen na região de interface dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10% foram investigados a partir de análises dos parâmetros de FTIR demonstrados nas Figuras 19 e 20 e Tabelas 3 e 4 (ver itens 5.2. e 5.2.1.).

Mudanças nas interações do grupo carbonila lipídico, tais como ligações de hidrogênio, refletem nos valores de frequência do  $\nu$  C=O (Arrondo e Goñi, 1998). Em todos os sistemas estudados, não foram observadas variações significativas nos valores de frequência, com a incorporação da Gen. A presença da isoflavona nas membranas não influenciou no grau de hidratação desta região.

O estado de fase dos lipídios está relacionado à largura da banda C=O. Um estreitamento na largura (sendo consideradas significantes, as variações de largura maiores que  $1,0\text{ cm}^{-1}$ ) da banda de FTIR referente ao pico de  $\nu$  C=O, corresponde à conversão dos lipídios, na fase líquido- cristalina para a fase gel (Lewis et al., 1990; Lewis e McElhaney, 2002). Nos lipossomos de DMPC, a incorporação da Gen provocou uma redução de  $1,93\text{ cm}^{-1}$  na largura de banda referente ao pico da C=O, indicando um aumento no grau de ordem na região de interface. No sistema composto por DMPC/CHOL 10% não foi possível detectar a largura de banda referente ao pico da carbonila.

Já nos lipossomos de DMPC/CHOL 40%, assim como em DMPC, a Gen reduziu a largura de banda da carbonila em  $1,32\text{ cm}^{-1}$  (variação 31,6% menor do que a variação observada nos lipossomos de DMPC) indicando um ordenamento ainda mais discreto na região de interface destas membranas. Assim, a inserção de 40%

de CHOL nos lipossomos de DMPC, tornou as membranas menos sensíveis à ação da Gen na região de interface (comparada aos lipossomos de DMPC).

Visto que o CHOL apresenta propriedades lipofílicas, assim como a Gen, ele tende a se orientar entre as moléculas de fosfolípido, na bicamada das membranas, com o grupo hidroxila direcionado para a fase aquosa e os anéis, entre os carbonos das cadeias graxas (Figura 29). Essa localização da molécula de CHOL resulta num maior empacotamento (ordenamento) da bicamada lipídica (Fornovi et al., 1989; Fornés e Procópio, 1987).

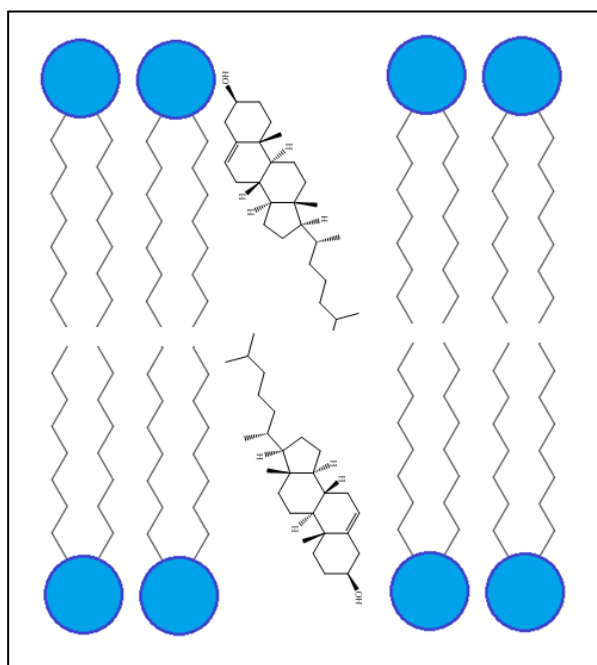


Figura 29: Localização da molécula de colesterol, entre as bicamadas fosfolipídicas.

Em estudos anteriores, observou-se que a Gen interagiu com todas as regiões (polar, interface e apolar) de lipossomos de asolecitina de soja (Aso), mostrando uma interação mais forte com as regiões de interface e apolar (Azambuja et al., 2015). Sendo assim, pode ser que a inserção de CHOL nas membranas tenha provocado uma competição por espaço, entre o CHOL e a isoflavona, acarretando em uma menor disponibilidade de Gen na região de interface, o que reduziu a ação da Gen na carbonila lipídica.



Todavia, no sistema lipossomal composto por DMPC/POPC 10% (sistema com maior concentração de Gen incorporada, ver item 4.1.), a incorporação da Gen promoveu um aumento  $11,64 \text{ cm}^{-1}$  (variação 83,42% maior do que nos lipossomos de DMPC) na largura de banda da C=O, o que indica um rearranjo dos lipídios da fase gel (mais ordenada) para o estado líquido cristalino (mais fluido). O comparativo das variações nos valores de largura de bandas referente ao grupo carbonila, está apresentado na Figura 22 (ver item 5.2.1.).

### **5.2.3. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA GENISTEÍNA NA REGIÃO HIDROFÓBICA DOS LIPOSSOMOS**

Os efeitos provocados, pela inserção de uma molécula exógena, no grau de ordem conformacional e na isomerização trans/gauche dos lipossomos foram monitorados pela análise das alterações nos valores de frequências e larguras de banda de HATR-FTIR referentes aos picos de  $\nu_s \text{ CH}_2$  e  $\nu_{as} \text{ CH}_2$  (Severcan et al., 2005). Tais dados estão demonstrados nas Figuras 19 e 20 e Tabelas 3 e 4 (ver itens 5.2. e 5.2.1.)

Conforme a Tabela 3, quando incorporada nos lipossomos de DMPC, a Gen provocou redução de  $4,51 \text{ cm}^{-1}$  nos valores de frequência do  $\nu_s \text{ CH}_2$ , o que indicou um ordenamento da membrana, promovida pela presença da isoflavona. Não foram observadas alterações nos valores de frequência do pico de  $\nu_{as} \text{ CH}_2$  induzidas por Gen. Com respeito às larguras de bandas dos picos de  $\nu_s \text{ CH}_2$  e  $\nu_{as} \text{ CH}_2$  nos lipossomos de DMPC, não foram observadas alterações significativas causadas pela presença da Gen (ver tabela 4).

Nos lipossomos de DMPC/CHOL 10%, a Gen promoveu reduções nos valores de frequência de  $2,83$  e  $3,21 \text{ cm}^{-1}$ , referentes aos picos de  $\nu_s \text{ CH}_2$  e  $\nu_{as} \text{ CH}_2$ , respectivamente. Isto indica uma redução na isomerização trans/gauche do sistema, ou seja, um aumento de ligações na conformação trans. Tal mudança de configuração sugere um aumento no grau de ordem da região hidrofóbica destes lipossomos, causado pela Gen. Neste sistema, não foram observadas alterações

significativas nos valores de largura de banda relacionados ao  $\nu_s$  CH<sub>2</sub>. Todavia, a presença de Gen provocou uma redução de 1,95 cm<sup>-1</sup> na largura de banda referente ao  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>, o que confirma um ordenamento nesta região.

Nos lipossomos de DMPC/CHOL 40%, observou-se uma redução de 8,46 cm<sup>-1</sup> nos valores de frequência referente ao  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> e o um aumento de 32,91 cm<sup>-1</sup> nos valores de frequência referente ao  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>, o que indica efeitos contraditórios para o mesmo grupo funcional (ordenamento e fluidificação na região apolar das membranas).

Sendo assim, visto que em DMPC/CHOL 40% há uma maior concentração de CHOL e que o espectro de CHOL puro apresenta o  $\nu_{as}$  C–H em 2882–2948 cm<sup>-1</sup> (na mesma frequência referente aos estiramentos dos metilenos presentes nos fosfolípidios, ver Tabela 2), o que possibilita a sobreposição dos picos, os dados de FTIR referentes aos  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> e  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub> não foram considerados neste sistema. Os grupos metilênicos foram então analisados por RMN <sup>1</sup>H e DSC.

Quando incorporada nos lipossomos compostos por DMPC/POPC 10%, a Gen não provocou alterações nos valores de frequência relacionados aos picos de  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> e  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>. Contudo, induziu um aumento nas larguras de banda referente aos  $\nu_s$  CH<sub>2</sub> e  $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub> em 1,79 cm<sup>-1</sup> e 3,34 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Tais aumentos indicaram que a Gen fluidificou a cadeia apolar dos lipossomos de DMPC/POPC 10%, comportamento este observado também nas porções polar e de interface. O comparativo das variações nos valores de largura de bandas referente aos metilenos da região apolar está apresentado na Figura 22 (ver item 5.2.1.).

Com o objetivo de obter informações sobre os parâmetros rotacionais da região apolar dos lipossomos, foi investigada a influência da Gen nos valores de  $T_1$  dos hidrogênios presentes nos metilenos da cadeia hidrofóbica (a 1-2 ppm), dos sistemas. A Figura 30 mostra as curvas referentes à recuperação do FID dos hidrogênios dos metilenos lipídicos após uma sequência de pulsos de recuperação da inversão nas amostras.

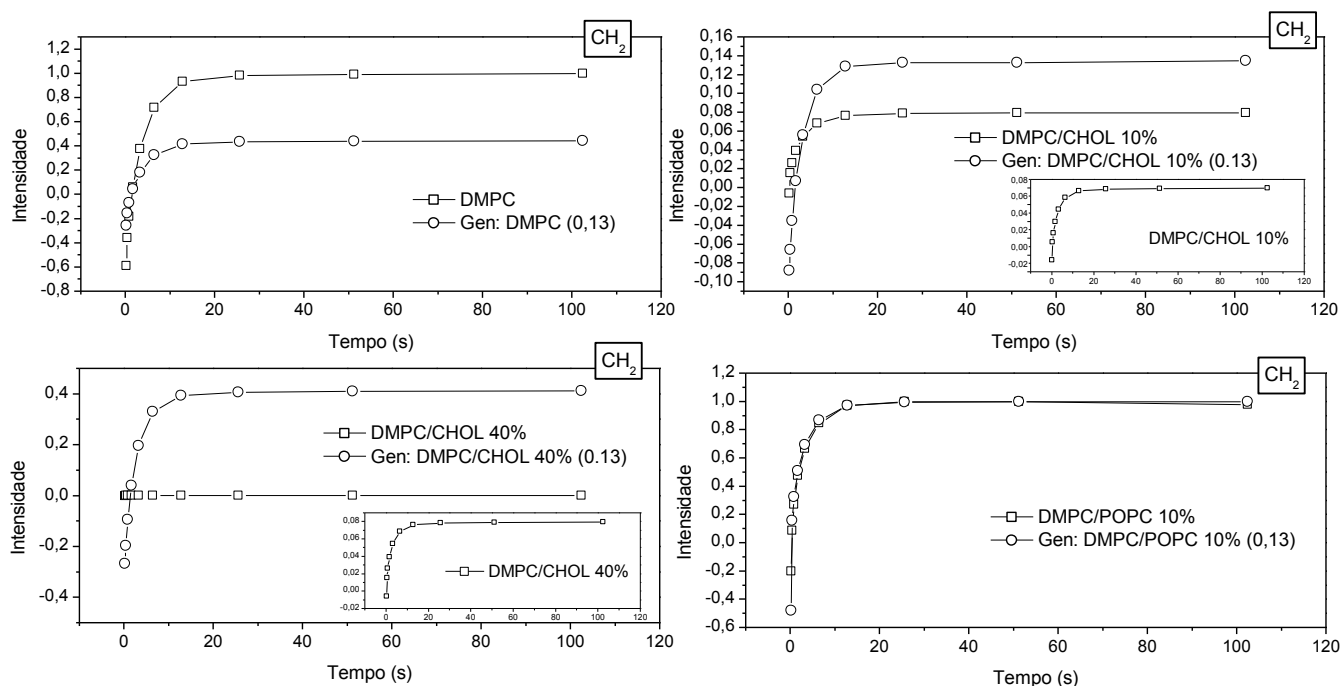


Figura 30: Curvas referentes à recuperação do FID dos hidrogênios dos metilenos lipídicos (1-2 ppm) dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de CHOL (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/ POPC 10%), puros e contendo Gen.

Através da análise das curvas apresentadas na Figura 30, foram calculados os valores de  $T_1$  dos hidrogênios dos metilenos presentes na cadeia apolar dos lipossomos puros e contendo Gen. Os valores de  $T_1$  estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) dos hidrogênios presentes nos metilenos dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen.

Sistema lipossomal	$T_1$ (s)		Variação (s)
	Puro	Com Gen	
DMPC	1,84	2,88	1,04
DMPC/CHOL 10%	0,65	2,90	2,25
DMPC/CHOL 40%	2,19	2,49	0,30
DMPC/POPC 10%	2,07	1,03	1,04

Nos lipossomos de DMPC, a Gen provocou um aumento de 1,04s no  $T_1$  dos hidrogênios metilênicos, o que indica uma discreta restrição nos movimentos rotacionais destes núcleos, ou seja, a Gen aumentou o grau de ordem, dos metilenos lipídicos.

Uma restrição rotacional ainda mais acentuada foi observada nos H dos metilenos presentes no sistema lipossomal de DMPC/CHOL 10%, onde a Gen aumentou os valores de  $T_1$  em 2,2s (variação 53,8% maior, comparada aos lipossomos de DMPC), o que indica que a inserção de 10% de CHOL tornou o sistema mais suscetível à ação da isoflavona.

No entanto, pode-se observar, a partir dos dados apresentados na Tabela 9, que quando a proporção de CHOL no sistema foi aumentada para 40%, o aumento nos valores de  $T_1$  dos hidrogênios metilênicos foi 71,15% menor do que nos lipossomos de DMPC e 86,7% menor do que nos lipossomos de DMPC/CHOL 10%. Isto indica que uma maior quantidade de CHOL no sistema, tornou-o menos sensível à ação da Gen, na região apolar da membrana e o ordenamento provocado pela presença da isoflavona foi bem mais discreto.

Quando incorporada nos lipossomos de DMPC/POPC 10%, a variação nos valores de  $T_1$  foi semelhante à variação observada nos lipossomos de DMPC (na

ausência de CHOL). Entretanto a Gen provocou uma redução de 1,04s no  $T_1$  dos hidrogênios metilênicos da membrana, o que aponta para um aumento na fluidez dos lipossomos, nesta região.

As variações, induzidas pela presença de Gen, nos valores de  $T_1$  dos hidrogênios metilênicos e a influência da composição lipídica na suscetibilidade de cada sistema aos efeitos provocados pela isoflavona estão apresentados na Figura 31.

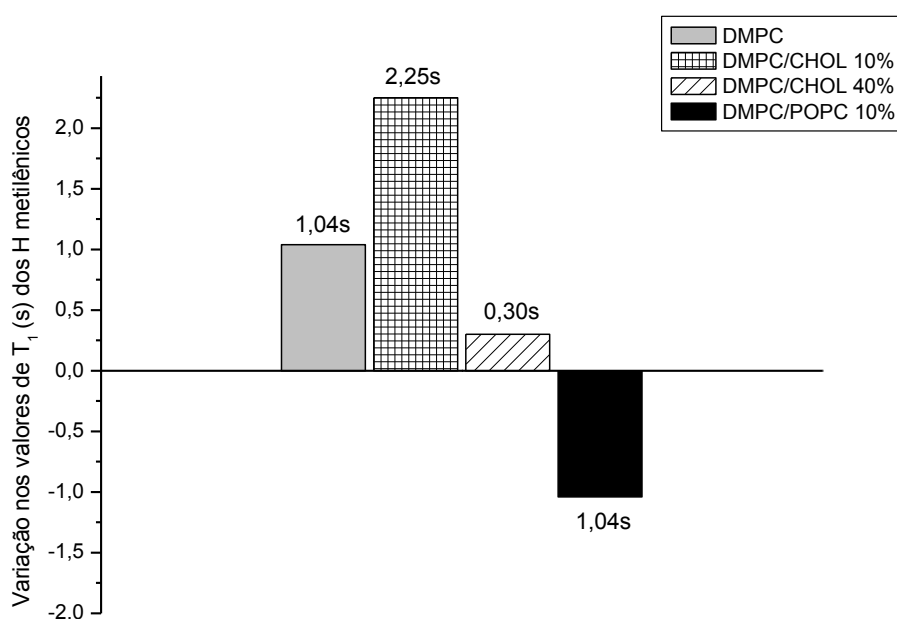


Figura 31: variações nos valores de  $T_1$  dos H presentes nos metilenos, provocadas pela incorporação de Gen nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%).

Vale ressaltar que tanto o efeito de ordenamento, observado na região apolar dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40%, quanto a redução no grau de ordem da mesma região, nos lipossomos de DMPC/POPC 10%, estão de acordo com os resultados obtidos nos experimentos de HATR-FTIR.

A influência da Gen na temperatura de transição de fase principal ( $T_m$ ) lipídica, diretamente associada ao comportamento termodinâmico da região apolar das membranas, foi avaliada por DSC. A presença de uma substância exógena,

como a Gen, pode contribuir com modificações estruturais nas bicamadas lipídicas, o que reflete em alterações na  $T_m$  dos lipídios (Lórinçzy et al., 2003).

O efeito provocado pela Gen nos valores de  $T_m$  foi analisado a partir das curvas de DSC dos lipossomos puros e contendo Gen (Figura 32). Tais valores estão demonstrados na Tabela 10.

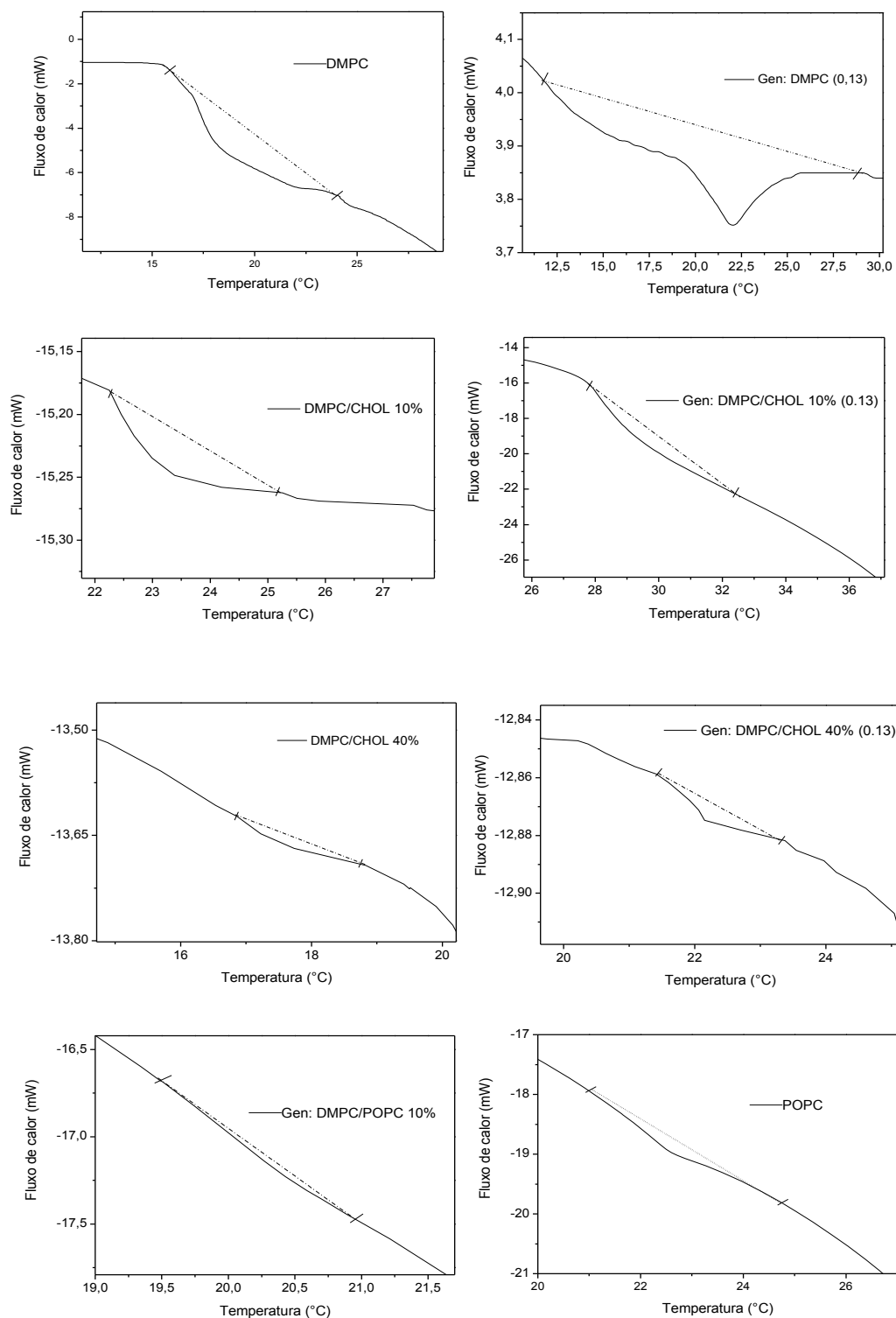


Figura 32: Curvas de DSC dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%), puros e contendo Gen.

Tabela 10: Valores de temperatura de transição de fase principal ( $T_m$ ) dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, puros e contendo Gen.

Sistema lipossomal	$T_m$ (°C)		Variação (°C)
	Puro	Com Gen	
DMPC	19,95	22,00	2,05
DMPC/CHOL 10%	22,30	26,00	3,70
DMPC/CHOL 40%	17,73	22,15	4,42
DMPC/POPC 10%	21,78	19,55	2,23

Nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40%, a Gen provocou aumento nos valores de  $T_m$  de 2,05°C, 3,70°C e 4,42°C, respectivamente. Pode-se observar, através da análise calorimétrica DSC, que a presença de CHOL (10% e 40%) tornou as membranas mais sensíveis à influência da Gen, pois nos lipossomos de DMPC/CHOL 10% a variação provocada pela isoflavona foi 44,6% maior do que nos lipossomos de DMPC (sem a presença de CHOL) e, nos lipossomos de DMPC/CHOL 40%, a alteração nos valores de  $T_m$  foi 53,62% maior do que em DMPC e 16,3% maior do que em DMPC/CHOL 10%.

Alterações na  $T_m$  para valores mais altos indicam uma redução na variação de entropia entre as duas fases do sistema, ou seja, um aumento global no empacotamento molecular (Lőrinczy et al., 2003). Sendo assim, a Gen propiciou um maior grau de ordem na região apolar dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40%, o que corrobora com os resultados observados por meio de HATR-FTIR e medidas de  $T_1$  (via RMN de  $^1\text{H}$ ).

Quando incorporada nos lipossomos de DMPC/POPC 10%, a Gen contribuiu para uma redução de 2,17°C (8,07% maior do que em DMPC), nos valores de  $T_m$ , ou seja, promoveu um rearranjo estrutural direcionado para uma configuração mais desordenada, mais fluida, o que está de acordo com os resultados obtidos em HATR-FTIR e  $T_1$  (RMN de  $^1\text{H}$ ).

Com os estudos de caracterização da dinâmica lipídica, discutidos acima, percebeu-se que nos lipossomos de DMPC e DMPC contendo CHOL (10% e 40%),



a Gen provocou um efeito de ordenamento em todas as regiões das membranas (polar, interface e apolar) enquanto que nos lipossomos de DMPC contendo 10% de POPC, a Gen provocou um discreto ordenamento na região do fosfato lipídico e aumentou a fluidez da membrana na região da colina lipídica e nas regiões de interface e apolar.

Estes dados confirmam os resultados obtidos através da técnica de DLS, onde sugeriu-se que a redução no tamanho dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40%, provocada pela Gen, poderia ser proveniente de um maior ordenamento nestas membranas, bem como o aumento do diâmetro observado nos lipossomos de DMPC/POPC10% seria proveniente de uma maior fluidez nas membranas.

Pawlikowska-Pawłęga e colaboradores (2012) avaliaram as interações da Gen com lipossomos compostos por dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC (16:0)), um fosfolipídio saturado que difere estruturalmente do DMPC (14:0), por apenas dois átomos de carbono em cada cadeia de ácido graxo. Os autores observaram em seu estudo, por meio de diferentes análises, que a Gen reduziu a fluidez das membranas de DPPC, tanto na região apolar quanto na cabeça polar dos lipossomos, o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo (Pawlikowska-Pawłęga et al., 2012).

O mesmo efeito de redução da fluidez, provocado pela inserção de Gen, foi observado por Arora e colaboradores (2000), que investigaram o efeito da Gen na fluidez de lipossomos compostos de 1-estearoil-2-linoleoilfosfatidilcolina (SLPC (18:0/ 18:2)), um fosfolipídio que difere do POPC (16:0/ 18:1) por apenas dois átomos de carbono em uma cadeia de ácido graxo e uma insaturação a mais na outra cadeia, e observaram um efeito significativo na redução da fluidez da membrana, tanto no interior da bicamada quanto nas porções externas da membrana, em menor proporção (Arora et al., 2000).

### 5.3. MEDIDAS DE TURBIDEZ

A Figura 33 apresenta as curvas de turbidez a 400 nm dos sistemas compostos por DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, em função das diferentes razões (m/m) iniciais de Gen: lipídio(s).

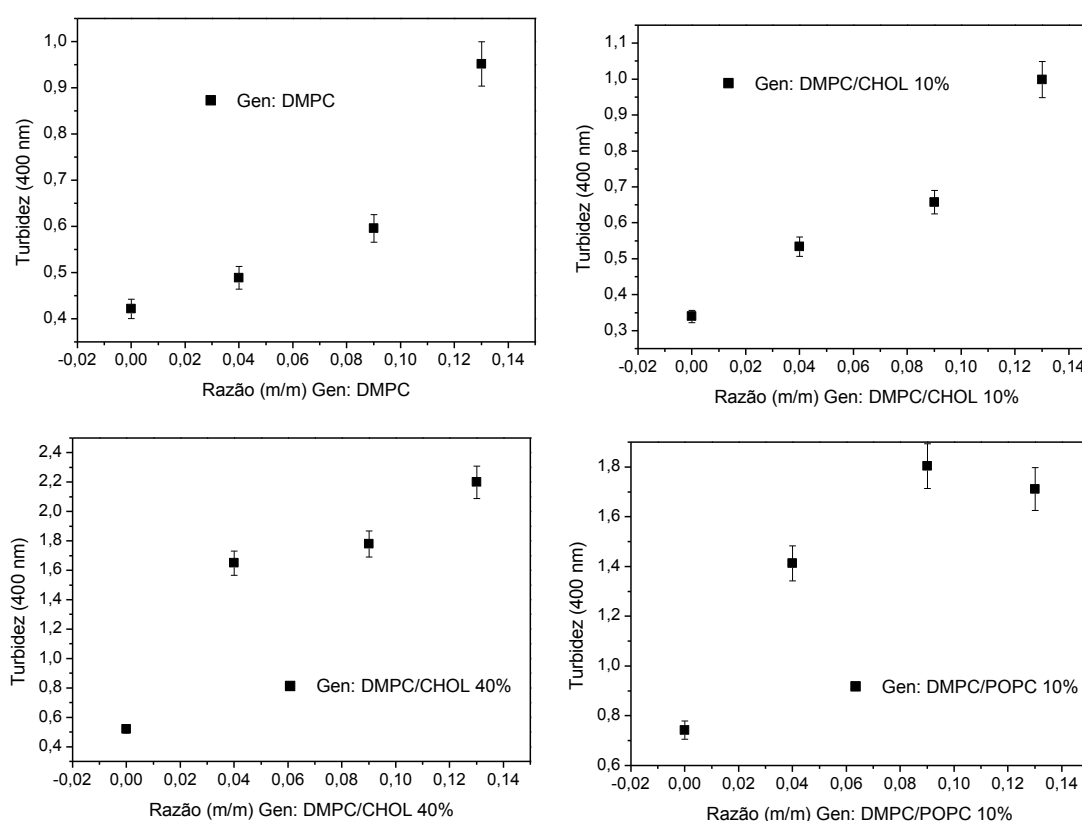


Figura 33: Influência da Gen (em diferentes razões m/m Gen: lipídios) sobre a turbidez dos lipossomos (a 400 nm) compostos por dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristolfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristolfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristolfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%).

Através das curvas apresentadas na Figura 33, pode-se notar um crescente aumento nos valores de turbidez dos lipossomos, diretamente proporcional ao aumento das concentrações iniciais de Gen nos sistemas.

A Tabela 11 mostra os valores de turbidez de cada sistema lipossomal avaliado, puro e contendo Gen (concentração inicial de 3,6 mg/mL ou 13321,5  $\mu$ M), o que corresponde a uma razão m/m inicial Gen: lipídio(s) 0,13.

Tabela 11: valores de turbidez dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10% puros e contendo Gen (concentração inicial 3,6 mg/mL).

Sistema lipossomal	Absorbância		Variação (%)
	Puro	Com Gen (3,6 mg/mL)	
DMPC	0,422±0,012	0,952±0,034	55,7
DMPC/CHOL 10%	0,340±0,015	0,999±0,036	65,9
DMPC/CHOL 40%	0,520±0,022	2,200±0,083	76,4
DMPC/POPC 10%	0,743±0,029	1,712±0,054	56,6

Como se pode observar na Tabela 11, a incorporação da Gen nos lipossomos de DMPC provocou um aumento nos valores de turbidez em 55,67%, comparada ao lipossomo puro. Com a inserção de 10% e 40% de CHOL nos lipossomos de DMPC, nota-se que as membranas ficaram mais sensíveis à ação da Gen.

Nos lipossomos de DMPC/CHOL 10%, a incorporação de Gen promoveu um aumento de 65,96% (em comparação com os lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros) nos valores de turbidez. Esta variação foi 15,6% maior do que nos lipossomos de DMPC. Quando incorporada nos lipossomos de DMPC/CHOL 40%, a Gen provocou um aumento de 76,36% nos valores de turbidez (em comparação com os lipossomos de DMPC/CHOL 40% puros), ou seja, foi responsável por um aumento na turbidez do sistema 27,1% maior do que nos lipossomos de DMPC e 13,62% maior do que nos lipossomos de DMPC/CHOL 10%.

Contudo, nos lipossomos de DMPC/POPC 10% o aumento nos valores de turbidez da membrana foi de 56,60%, variação semelhante à observada nos lipossomos de DMPC, o que demonstra que os lipossomos de DMPC/POPC 10% foram menos sensíveis a ação da Gen, quando comparados aos lipossomos de DMPC contendo CHOL.

As variações percentuais nos valores de turbidez dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10% estão mostradas na figura 34:

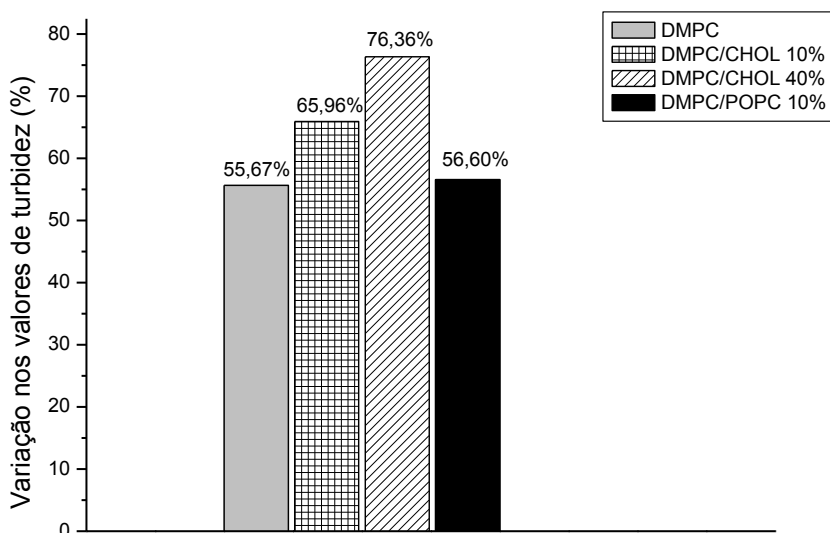


Figura 34: Variações nos valores de turbidez dos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%), provocadas pela presença de Gen.

A turbidez de um sistema lipídico pode estar relacionada com os estados de fase deste. Por exemplo, quando ocorre a transição dos lipídios na fase gel para a fase líquido- cristalina em uma membrana, observa-se uma redução na turbidez do sistema, devido às alterações no índice de refração dos lipídios (Yi e MacDonald, 1973). Sabe-se que um aumento na turbidez do sistema pode estar associado a um aumento na ordem desse sistema, bem como a um aumento no tamanho das partículas e/ou processos de aglomeração (Yi e MacDonald, 1973; Korkmaz e Severcan, 2005; Kazanciet al., 2000).

Sendo assim, o aumento nos valores de turbidez dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40%, provocados pela Gen, pode sugerir um

aumento na ordem destes sistemas lipossomais, o que está de acordo com as análises de HATR-FTIR, RMN de  $^{31}\text{P}$ , RMN de  $^1\text{H}$  e DSC.

Todavia, nos lipossomos de DMPC/POPC 10%, os valores crescentes de turbidez não estão associados á transições de fase do sistema, visto que nos experimentos de caracterização observou-se uma redução no grau de ordem destas membranas, provocada pela Gen.

Assim, a turbidez deste sistema pode estar relacionada com efeitos de aglomeração, bem como aumento no tamanho dos lipossomos, o que corrobora com os dados obtidos por Medidas de Potencial Zeta e experimentos de DLS.

#### **5.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE O EFEITO DA GENISTEÍNA NA DINÂMICA LIPÍDICA DAS DIFERENTES REGIÕES DOS LIPOSSOMOS DE DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% E DMPC/POPC 10%**

- REGIÃO POLAR: Nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40% observou-se que a presença da Gen provocou uma redução no grau de hidratação na região do fosfato lipídico (onde uma redução mais acentuada foi observada nos lipossomos de DMPC/CHOL 40%). Nos lipossomos de DMPC/POPC 10%, não se observou influência da Gen no grau de hidratação do grupo fosfato.

- A Gen ordenou a região do fosfato nos lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 40%, enquanto que nos lipossomos de DMPC/CHOL 10% não se observaram alterações a nível rotacional e nos lipossomos de DMPC/POPC 10%, a Gen fluidificou esta região.

- Na região do grupo colina, a Gen provocou um ordenamento nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40% e tornou a colina lipídica mais fluida nos lipossomos de DMPC/POPC 10%. O sistema lipossomal de

DMPC contendo 10% de CHOL se mostrou mais sensível à ação da Gen, na região da colina, quando comparada aos demais sistemas avaliados. A sensibilidade dos sistemas aos efeitos provocados pela isoflavona na região da colina lipídica segue a seguinte ordem: DMPC/CHOL 10% > DMPC/POPC 10% > DMPC > DMPC/CHOL 40%.

- Ao interagir mais fortemente com o grupo colina, a Gen parece ter influenciado para uma reorientação deste grupo, visto que nos lipossomos de DMPC/CHOL 10% observamos que a isoflavona orientou o grupo colina para um plano abaixo do plano da bicamada lipídica enquanto que nos sistemas compostos por DMPC, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, a Gen orientou a colina lipídica para um plano acima do plano da bicamada, direcionando-a para a superfície da membrana.

- REGIÃO INTERFACIAL: A Gen ordenou a região do grupo carbonila nos lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 40% e fluidificou a região de interface dos lipossomos de DMPC/POPC 10%. A presença de 10% de POPC nos lipossomos de DMPC tornou as membranas mais sensíveis à ação da Gen (quando comparadas aos lipossomos de DMPC e DMPC contendo 40% de CHOL) e a presença de CHOL tornou as membranas menos suscetíveis à ação da Gen, visto que neste sistema, os efeitos provocados pela isoflavona foram mais discretos. Nos lipossomos de DMPC/CHOL 10% não foi possível detectar alterações nas larguras de bandas de FTIR, referentes à carbonila lipídica.

Visto que as moléculas de CHOL e Gen tendem a se localizar na interface das membranas, é possível que a presença de CHOL nos lipossomos tenha dificultado a interação da Gen com o grupo carbonila (Azambuja et al., 2015; Fornovi et al., 1989; Fornés e Procópio, 1987).

- Assim como nas regiões polar e de interface, na REGIÃO APOLAR das membranas, observou-se que a Gen promoveu uma redução na fluidez, ou seja, contribuiu para um ordenamento na cadeia apolar dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40% e fluidificou a região apolar dos lipossomos de DMPC/POPC 10%. A sensibilidade dos lipossomos, de diferentes composições

lipídicas, à ação da Gen na cadeia apolar das membranas segue a ordem: DMPC/CHOL 40% > DMPC/CHOL 10% > DMPC/POPC 10% > DMPC.

Os efeitos provocados pela Gen na dinâmica dos lipídios presentes nos sistemas compostos por DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, estão ilustrados nas figuras 35, 36, 37 e 38 respectivamente:

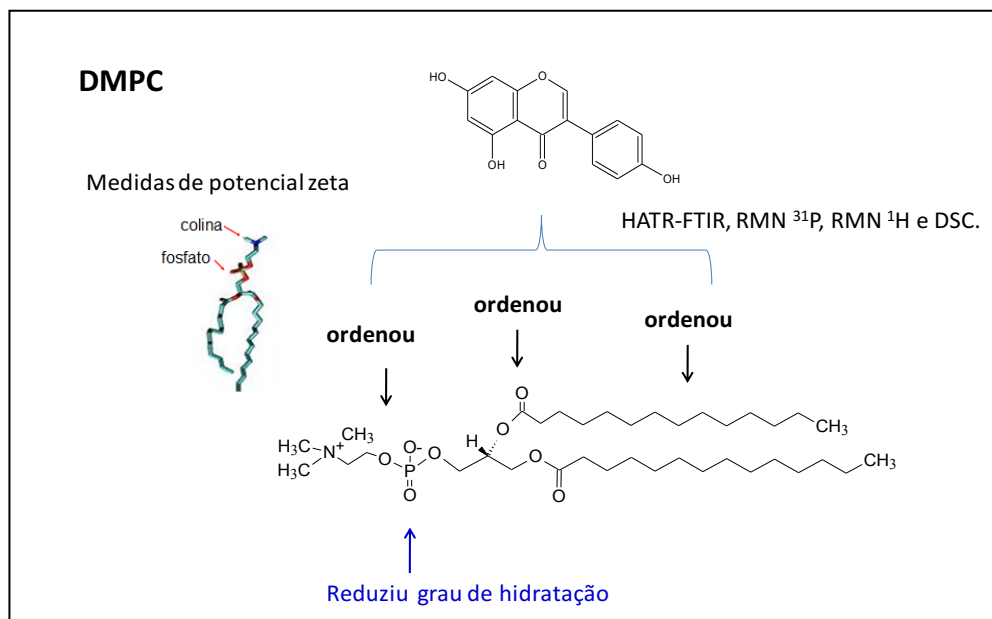


Figura 35: Esquema ilustrativo dos efeitos da Gen na dinâmica lipídica de lipossomos compostos por DMPC.

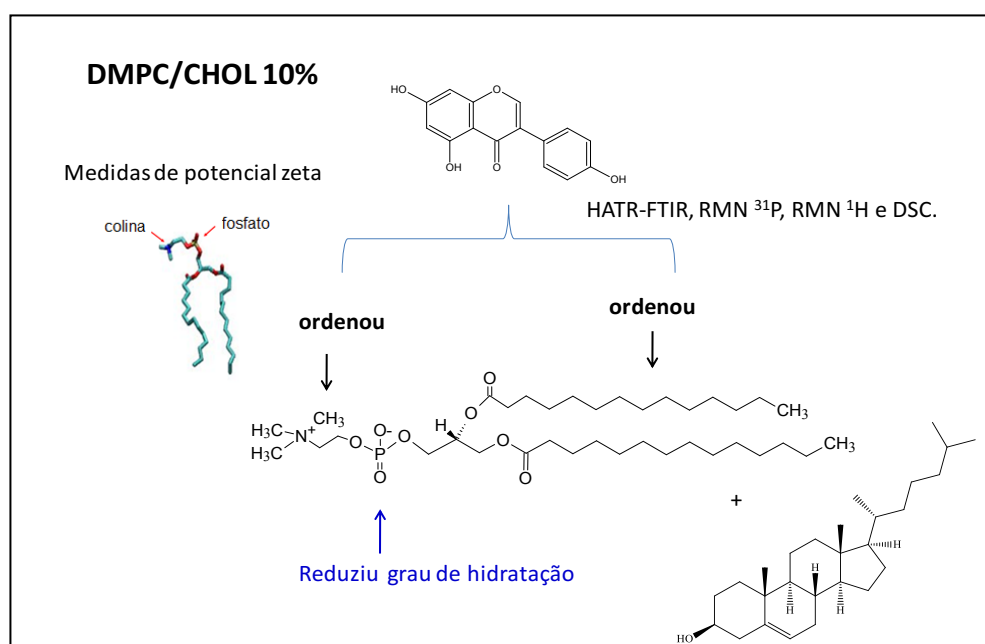


Figura 36: Esquema ilustrativo dos efeitos da Gen na dinâmica lipídica de lipossomos compostos por DMPC/CHOL 10%.



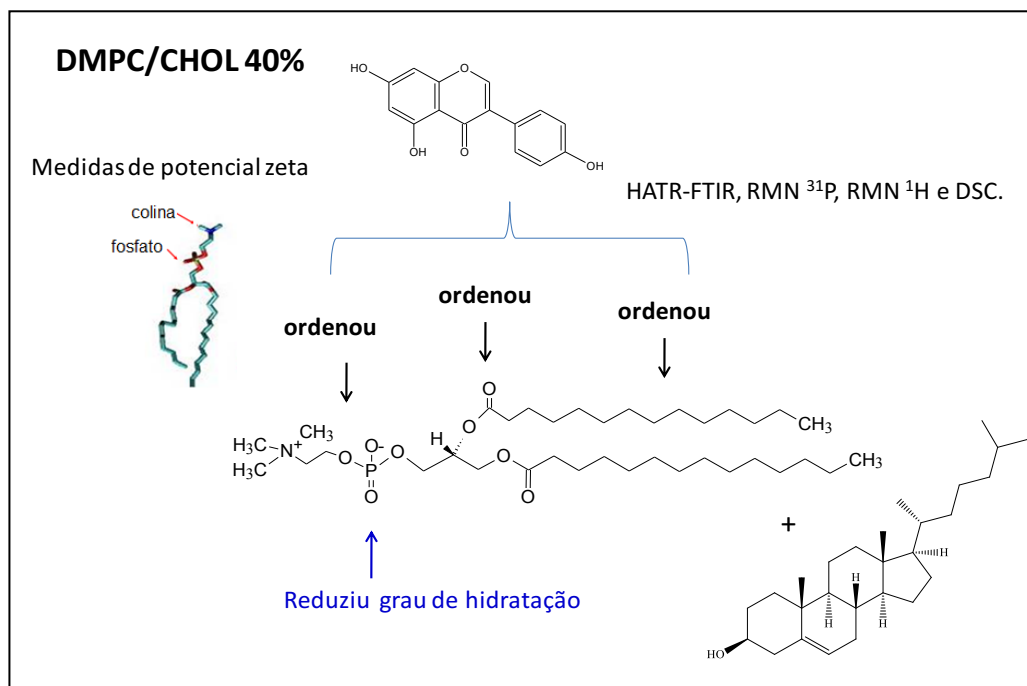


Figura 37: Esquema ilustrativo dos efeitos da Gen na dinâmica lipídica de lipossomos compostos por DMPC/CHOL 40%.

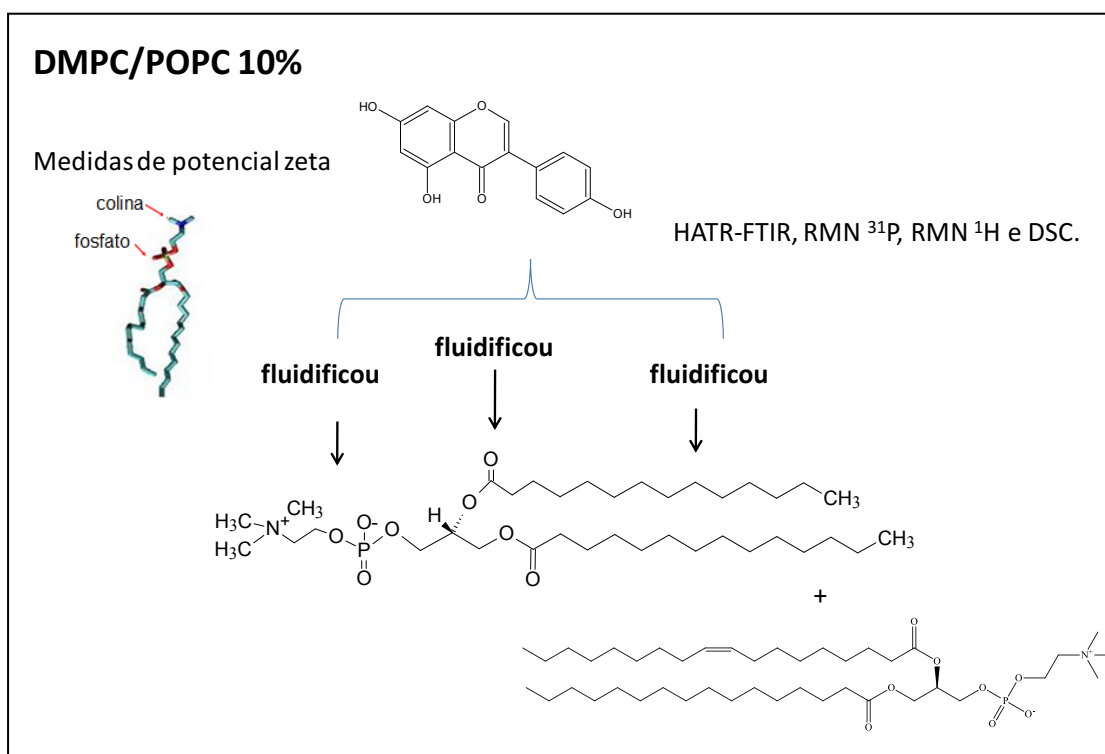


Figura 38: Esquema ilustrativo dos efeitos da Gen na dinâmica lipídica de lipossomos compostos por DMPC/POPC 10%.

A intensidade com que a Gen afetou a região específica de cada um dos sistemas lipossomais está demonstrada na Tabela 12. Vale ressaltar que estas intensidades foram consideradas de modo comparativo entre os sistemas.

Tabela 12: Representação da intensidade dos efeitos da Gen (relacionados à ordem das membranas), em cada região específica (polar, interface e apolar) dos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%, onde F (forte), M (moderada) e D (discreta).

Sistema	Região			
	Polar		Interface	Apolar
	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		
DMPC	F	D	M	M
DMPC/CHOL 10%	M	F	-----	F
DMPC/CHOL 40%	M	D	D	F
DMPC/POPC 10%	F	M	F	M

A partir da análise da tabela 12, pode-se perceber que a sensibilidade dos sistemas à ação da Gen foi dependente da composição lipídica de cada sistema. Nos lipossomos compostos por DMPC, a Gen provocou um efeito mais pronunciado na região polar da membrana, mais especificamente no grupo fosfato.

Com a inserção de 10% de CHOL nos lipossomos de DMPC, à ação da Gen foi mais pronunciada na região da colina lipídica e na região apolar da membrana. Um aumento na concentração de CHOL tornou a ação da Gen mais discreta na região polar dos lipossomos de DMPC/CHOL 40% e mais acentuada na região apolar dos mesmos. Como discutido anteriormente a localização do CHOL entre as

bicamadas lipídicas tende a ser semelhante à localização da Gen, portanto parece que a presença de CHOL na composição dos lipossomos, pode ter tornado a interação da isoflavona com a região de interface, mais discreta.

Por outro lado, nas membranas compostas por DMPC contendo 10% de POPC, observou-se forte interação da Gen com a região de interface da membrana, onde os efeitos provocados pela isoflavona foram consideravelmente mais acentuados do que nos outros três sistemas avaliados (compostos por DMPC e DMPC contendo CHOL).

Contudo, na região polar e apolar dos lipossomos de DMPC/POPC 10% observou-se que os efeitos provocados pela presença de Gen foram mais moderados. Sendo assim, parece que a redução no grau de empacotamento das bicamadas lipídicas, provocada pela inserção de um fosfolípido monoinsaturado, pode ter reduzido a ação da isoflavona nestas regiões da membrana.

Considerando que alterações na ordem das membranas podem influenciar no potencial antioxidante e antitumoral do sistema (Azambuja et al., 2015; Arora et al., 2000; Yu et al., 1999; Shinitzky et al., 1983), foram realizados ensaios *in vitro*, para avaliar a eficiência dos sistemas lipossomais carregados com Gen na redução do radical DPPH, bem como na viabilidade de células tumorais de glioma de ratos (C6), descritos a seguir.

## **5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LIPOSSOMOS CARREGADOS COM GENISTEÍNA**

As curvas que relacionam a atividade antioxidante (%) frente ao radical DPPH a diferentes concentrações iniciais de Gen, livre em solução e incorporada nos diferentes sistemas lipossomais testados estão apresentadas na Figura 39.

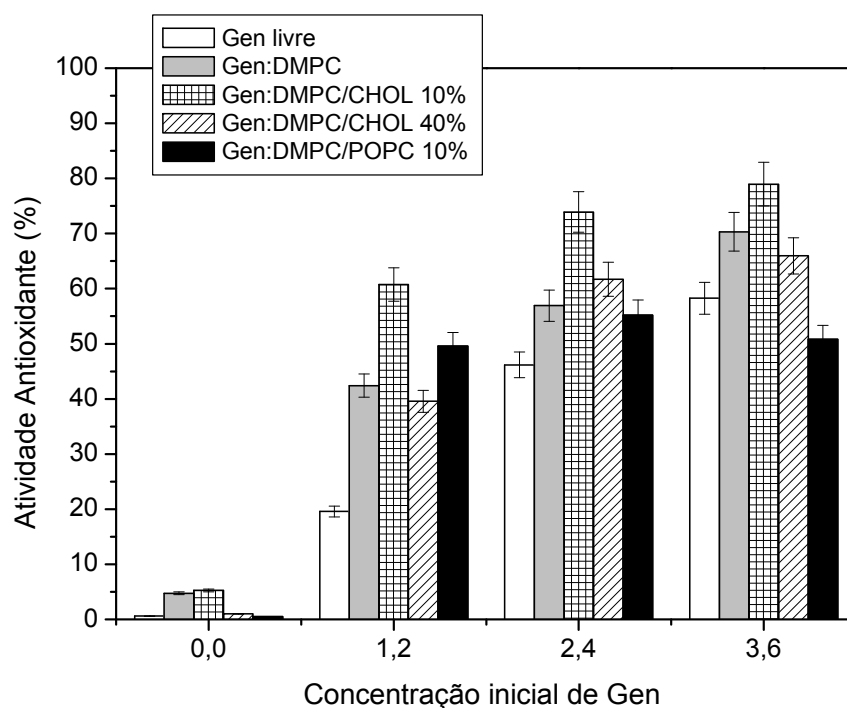


Figura 39: Avaliação da influência da Gen (em diferentes concentrações iniciais), livre e incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil- oleoil- fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%), na redução do radical DPPH.

A partir da análise das curvas apresentadas na Figura 39, percebe-se que a Gen, tanto na forma livre quanto incorporada em todos os lipossomos avaliados neste estudo, apresentou atividade antioxidante diretamente proporcional ao aumento da concentração inicial. À medida que se aumentou a concentração inicial de Gen nos sistemas, notou-se um aumento do potencial redutor da isoflavona.

Os dados relacionados ao potencial da Gen, na maior concentração inicial de Gen testada (3,6 mg/mL) estão apresentados na Tabela 13 (onde também estão listados os dados de concentração de Gen inibitória em 50% da atividade observada,  $IC_{50}$ ), bem como na Figura 40.

Tabela 13: Avaliação do potencial antioxidante da Gen, na sua forma livre e incorporada nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10%, DMPC/CHOL 40% e DMPC/POPC 10%.

Gen (3,6 mg/mL)	Atividade antioxidante (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Gen livre	58,26	3,08
Gen:DMPC	70,32	2,55
Gen:DMPC/CHOL 10%	78,97	2,27
Gen:DMPC/CHOL 40%	65,96	2,73
Gen:DMPC/POPC 10%	50,81	3,54

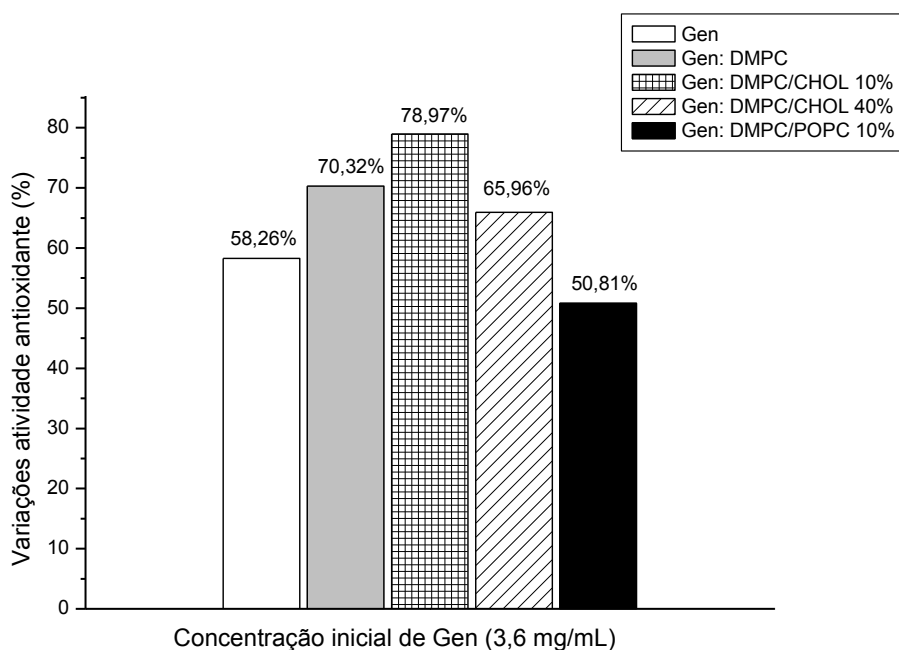


Figura 40: Atividade antioxidante da Gen livre e incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), dimiristoilfosfatidilcolina contendo 40% de colesterol (DMPC/CHOL 40%) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (DMPC/POPC 10%), na concentração inicial de 3,6 mg/mL.

Como pode-se observar na tabela 13 e na Figura 40, quando incorporada nos lipossomos de DMPC, a Gen apresentou uma atividade antioxidante 17,15% maior do que quando testada na sua forma livre e a IC<sub>50</sub> foi alcançada em 2,55 mg/mL (0,53 mg/mL a menos do que Gen livre). Nos lipossomos de DMPC/CHOL 10% a ação da Gen foi ainda mais pronunciada, visto que, incorporada neste sistema, a isoflavona apresentou uma atividade 26,22% maior do que quando testada livre e aproximadamente 11% maior do que nos lipossomos de DMPC. Em DMPC/CHOL 10% a IC<sub>50</sub> foi alcançada em 2,27 mg/mL (0,81 mg/mL a menos do que Gen livre).

Já no sistema composto por DMPC/CHOL 40%, a Gen apresentou uma atividade antioxidante mais discreta, quando comparada aos lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%. O potencial da Gen incorporada em DMPC/CHOL 40% foi 11,67% maior do que na sua forma livre, porém apresentou uma atividade 6,20% menor do que em DMPC e 16,5% menor do que em DMPC/CHOL 10%. A IC<sub>50</sub> da Gen encapsulada em lipossomos de DMPC/CHOL 40% foi detectada em 2,73 mg/mL (0,35 mg/mL a menos do que Gen livre).

Neste contexto, a Gen se mostrou mais eficiente quando incorporada nos lipossomos de DMPC, DMPC/CHOL 10% e DMPC/CHOL 40% do que na sua forma livre, respeitando à seguinte ordem: DMPC/CHOL 10% > DMPC > DMPC/CHOL 40%. Relembrando que a eficiência de encapsulamento (dentre estes três sistemas citados) e conseqüentemente, a maior concentração final de Gen incorporada nas membranas (ver item 5.1.), também segue esta ordem.

A Gen possui características estruturais que favorecem a estabilização de radicais livres, gerando um radical estável (Figura 41), como por exemplo, a presença de substituintes hidroxila e a dupla ligação no anel pirona (ver Figura 6) (Ho et al., 2003; Qian e Shen, 2001; Tsao et al., 2003).

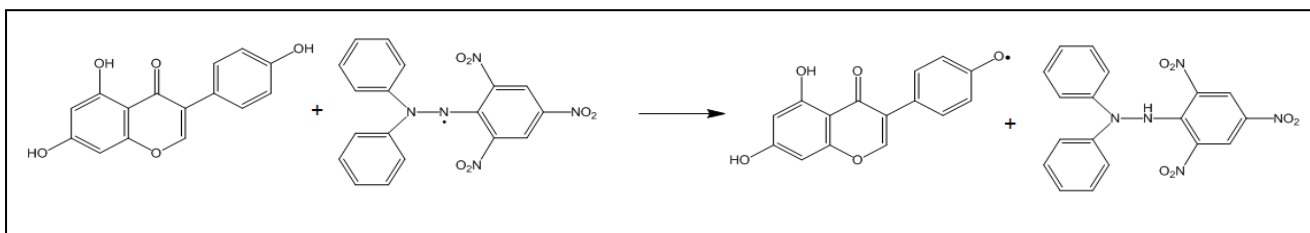


Figura 41: Reação entre a genisteína e o radical 2,2 difenil 1-picril hidrazila (DPPH<sup>•</sup>) dando origem a um radical flavonóide estável e a espécie reduzida difenil-picril-hidrazina.

Além disso, acredita-se que a incorporação da Gen em lipossomos possa potencializar sua atividade, pois o grau de hidrofobicidade da molécula de DPPH possibilita a inserção da mesma na membrana, facilitando a interação entre as moléculas de DPPH e Gen e conseqüentemente, facilitando a atividade antioxidante da isoflavona. No entanto mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Diferentemente do comportamento observado nos lipossomos de DMPC e DMPC contendo CHOL, quando incorporada nos lipossomos de DMPC/POPC 10%, a Gen apresentou um potencial redutor 12,8% menor do que quando testada na sua forma livre e a IC<sub>50</sub> da Gen, nesses lipossomos, foi detectada em 3,54 mg/mL (0,46 mg/mL a mais do que Gen livre). Sendo assim, ao comparar-se a ação da Gen incorporada em DMPC/POPC 10%, bem como incorporada nos demais sistemas avaliados e em sua forma livre em solução, têm-se a seguinte ordem: DMPC/CHOL 10% > DMPC > DMPC/CHOL 40% > Gen livre > DMPC/POPC 10%. Vale ressaltar que em DMPC/POPC 10% a concentração final de Gen incorporada foi maior dentre os quatro sistemas avaliados neste estudo (ver item 5.1.).

Sabe-se que fosfolipídios mais fluidos facilitam a difusão da substância encapsulada para o meio externo (Kulkarni et al., 1995). Sendo assim, a maior permeabilidade provocada pela Gen nos lipossomos de DMPC/POPC 10% pode ter facilitado uma liberação mais rápida da Gen para fora da bicamada lipídica e com isso, dificultado a interação entre a isoflavona e o radical DPPH. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar tal hipótese.

## 5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO* DE LIPOSSOMOS CONTENDO GENISTEÍNA

Tendo em vista que, dentre os quatro sistemas estudados, os lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10% apresentaram maior potencial antioxidante quando carregados com Gen, além de terem apresentado um maior grau de ordem com a incorporação da isoflavona, os ensaios biológicos foram realizados avaliando estes dois sistemas.

### 5.6.1. CONTAGEM CELULAR

A Figura 42 mostra a contagem das células tumorais C6, após tratamento com lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%, puros e contendo Gen nas concentrações de 10, 20 e 100  $\mu\text{M}$ .

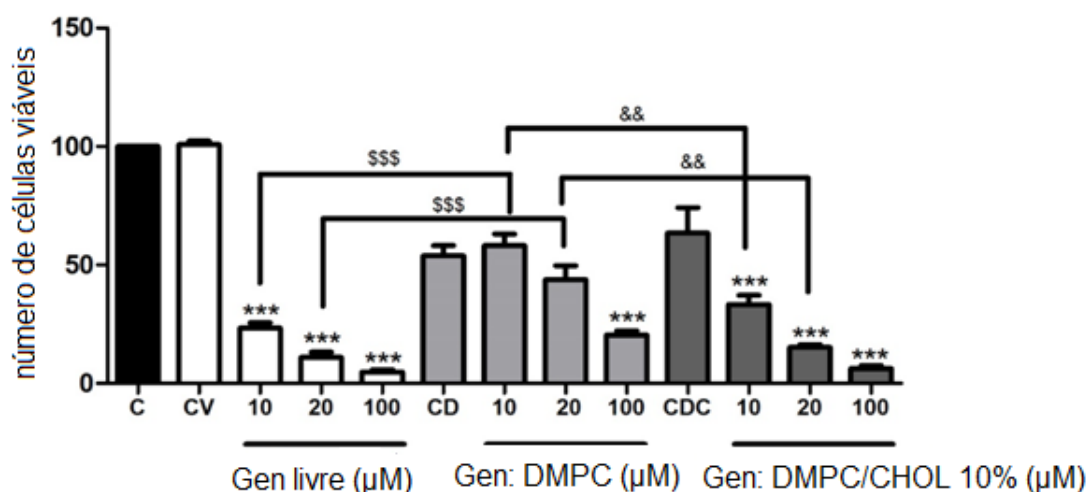


Figura 42: contagem celular da linhagem C6, após 48h de tratamento com Gen, livre e incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), nas concentrações de 10, 20 e 100  $\mu\text{M}$ . C= células de glioma de rato (C6) e meio de controle (DMEM); CV= DMSO; CD= lipossomos de DMPC puros e; CDC= lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros.



Os dados relacionados ao gráfico apresentado na Figura 42 estão listados na Tabela 14.

Tabela 14: Redução no número de células viáveis (via contagem celular), provocada por ação da Gen (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) livre e incorporada em lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%. Vale lembrar que CD= DMPC puro e CDC= DMPC/CHOL 10% puro.

Redução da viabilidade de C6 (via contagem celular)					
Amostra	Redução	Amostra	Redução	Amostra	Redução
DMSO	-----	DMSO	-----	DMSO	-----
C6 + DMEM	-----	CD	46,25%	CDC	36,62%
Gen (10 $\mu$ M)	76,75%	CD+Gen 10 $\mu$ M	41,87%	CDC+Gen 10 $\mu$ M	66,75%
Gen (20 $\mu$ M)	89,12%	CD+Gen 20 $\mu$ M	56,25%	CDC+Gen 20 $\mu$ M	84,87%
Gen (100 $\mu$ M)	95,25%	CD+Gen 100 $\mu$ M	79,62%	CDC+Gen 100 $\mu$ M	93,75%

Os lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10% sem Gen, apresentaram redução significativa no número de células viáveis, em comparação com o controle CV (redução de 46,25% e 36,62%, respectivamente), indicando que lipossomos de DMPC puros possuem um efeito antiproliferativo contra as células tumorais de glioma de ratos (C6).

Nagami e colaboradores (2006) avaliaram, *in vitro*, a influência de lipossomos de DMPC e lipossomos híbridos de DMPC, na proliferação da linhagem celular do tipo RAJI e observaram inibição no crescimento das células, provocada por DMPC, confirmando assim, o potencial antitumoral de DMPC (Nagami et al., 2006).

Em outro estudo, Nagami e colaboradores (2006) avaliaram, *in vitro*, o efeito de lipossomos híbridos (compostos por fosfolipídios e éter polioxietilenododecílico

(C<sub>12</sub> (EO)<sub>23</sub>) no crescimento de células de leucemia humana (HL60). Para este estudo, foram utilizados os fosfolipídios dilauroilfosfatidilcolina (DLPC, C 12:0), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC, C 14:0) e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, C 16:0), que diferem em apenas dois grupos metílenos em suas cadeias graxas.

Os autores verificaram que esta diferença de dois metílenos na cadeia apolar das fosfatidilcolinas, influenciou os mecanismos de ação dos híbridos entre apoptose e necrose das células tumorais. Foi verificado ainda que as células tratadas com os lipossomos híbridos, compostos por DMPC/C<sub>12</sub> (EO)<sub>23</sub> sofreram apoptose (Nagami et al, 2006).

Neste contexto, sugere-se que a ação do DMPC possa estar relacionada à sua cadeia apolar, visto que a hidrofobicidade pode aumentar a interação do lipídio com as células tumorais. No entanto, não se tem informações sobre o mecanismo de ação do fosfolipídio.

Os lipossomos de DMPC contendo Gen (nas concentrações de 10 e 20 µM) apresentaram diferença significativa em relação ao CV (DMSO), mas são estatisticamente iguais ao grupo CD (lipossomos de DMPC puros). Já o tratamento na concentração de 100 µM mostra redução no número de células viáveis de 79,62% em comparação com CV e 33,37% em comparação com CD indicando que, nesta concentração, pode ter ocorrido uma contribuição do efeito do lipídio, na redução das células C6.

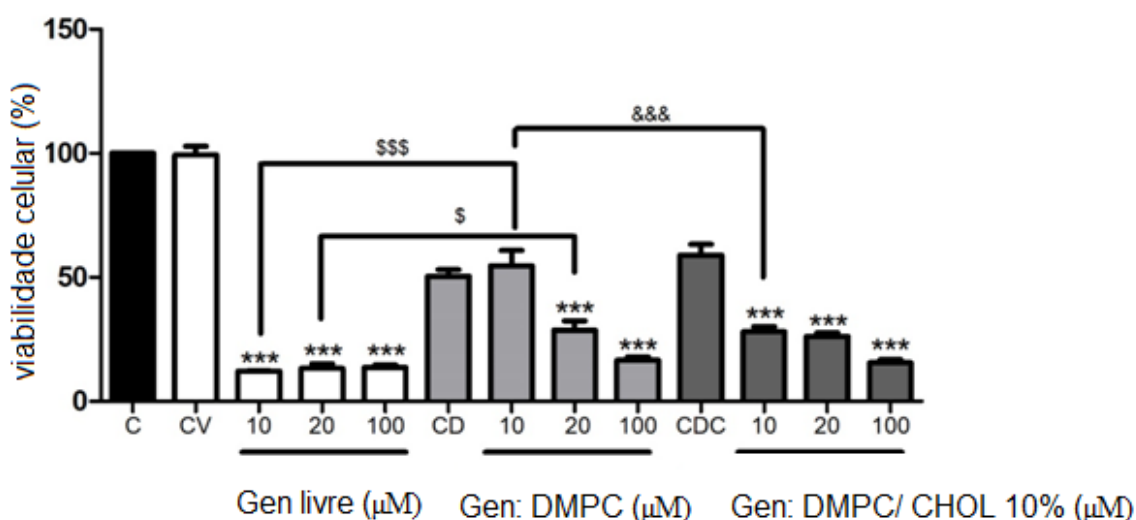
A Gen (10 µM, 20 µM e 100 µM), incorporada nos lipossomos de DMPC/CHOL 10%, provocou redução no número de células viáveis, tanto em relação ao CV (DMSO), quanto ao CDC (lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros). Em comparação ao CDC, os lipossomos contendo Gen promoveram uma redução de 30,13%, 48,25% e 57,13% no número de células viáveis, o que indica que a Gen e os lipossomos de DMPC/CHOL 10% atuam em conjunto na ação antiproliferativa das células tumorais de glioma de ratos.

Neste ensaio, a Gen livre (100 µM) se mostrou 16,41% mais eficiente do que incorporada em lipossomos de DMPC enquanto que nos lipossomos de DMPC/CHOL não foram observadas diferenças significativas.

Na mesma concentração (100  $\mu\text{M}$ ), a Gen incorporada em DMPC/CHOL 10% provocou uma redução no número de células viáveis 15,07% maior do que a redução observada quando incorporada em DMPC, se mostrando um sistema mais eficaz. Vale ressaltar que nos lipossomos de DMPC/CHOL 10% a Gen interagiu mais fortemente com a região apolar das membranas em comparação aos lipossomos de DMPC (ver Tabela 12, item 5.4.), o que pode ter facilitado a interação da Gen com as células tumorais, provocando um efeito antiproliferativo mais acentuado.

### 5.6.2. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR - MTT

Os resultados obtidos no ensaio de MTT, referentes à redução da viabilidade celular, induzida pela presença de Gen (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) livre e incorporada em lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%, estão mostrados na Figura 43.



.Figura 43: Ensaio de viabilidade celular por MTT na linhagem C6, após 48h de tratamento com Gen, livre e incorporada nos lipossomos de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilcolina contendo 10% de colesterol (DMPC/CHOL 10%), nas concentrações de 10,

20 e 100  $\mu\text{M}$ . C= células de glioma de ratos (C6) e meio de controle (DMEM); CV= DMSO; CD= lipossomos de DMPC puros e; CDC= lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros.

Os dados relacionados ao gráfico apresentado na Figura 43 estão listados na Tabela 15.

Tabela 15: Redução da viabilidade de C6 (via MTT), provocada por ação da Gen (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) livre e incorporada em lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%. Vale lembrar que CD= DMPC puro e CDC= DMPC/CHOL 10% puro.

Redução da viabilidade de C6 (via MTT)					
Amostra	Redução	Amostra	Redução	Amostra	Redução
DMSO	-----	DMSO	-----	DMSO	-----
C6 + DMEM	-----	CD	49,62%	CDC	41,03%
Gen (10 $\mu\text{M}$ )	87,77%	CD+Gen 10 $\mu\text{M}$	45,30%	CDC+Gen 10 $\mu\text{M}$	71,96%
Gen (20 $\mu\text{M}$ )	86,68%	CD+Gen 20 $\mu\text{M}$	71,30%	CDC+Gen 20 $\mu\text{M}$	73,83%
Gen (100 $\mu\text{M}$ )	86,30%	CD+Gen 100 $\mu\text{M}$	83,45%	CDC+Gen 100 $\mu\text{M}$	84,40%

Os resultados obtidos neste ensaio confirmam a ação do DMPC na redução da viabilidade das células tumorais C6, visto que os lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%, puros, promoveram uma redução na viabilidade celular de 49,62% e 41,03%, respectivamente.

A Gen, incorporada nas membranas de DMPC, na concentração de 10  $\mu\text{M}$  não apresentou diferença estatística em comparação ao CV (DMSO). Porém, nas concentrações de 20 e 100  $\mu\text{M}$  a Gen associada aos lipossomos de DMPC, reduziu a viabilidade celular em 71,30% e 83,45%, respectivamente, em relação ao CV e 21,62% e 33,83%, respectivamente, quando comparadas ao CD (lipossomos de

DMPC puros), o que acentua a eficácia do sistema lipossomal Gen: DMPC na citotoxicidade desta linhagem tumoral.

Quando incorporada em DMPC/CHOL 10%, pode-se observar que a Gen (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) apresentou uma redução de 30,93%, 32,80% e 43,37%, respectivamente, em comparação com o CDC (lipossomos de DMPC/CHOL 10% puros).

A Gen (100  $\mu$ M) apresentou resultados semelhantes, na redução da viabilidade celular, quando incorporada em DMPC e em DMPC/CHOL 10%. Neste ensaio não se observou diferenças significativas quando comparamos a redução da viabilidade das células C6 provocada pela Gen (100  $\mu$ M) livre e incorporada em DMPC e DMPC/CHOL 10%.

Em estudos anteriores, após 48 h de tratamento, a Gen incorporada em lipossomos de Aso, reduziu a viabilidade de C6 em apenas 39%, através de ensaio de MTT, o que reforça a contribuição dos lipídios nos lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10% (Azambuja et al., 2015).

Vale ressaltar que Azambuja e colaboradores (2015), testaram o efeito de Gen incorporada em lipossomos de asolecitina de soja na viabilidade dos astrócitos e não foram observadas alterações significativas.

Sabe-se que uma potente estratégia no tratamento do câncer pode ser a redução da fluidez das membranas, visto que a organização das membranas de células tumorais é menor do que as normais e, o ordenamento destas membranas promove a restauração da função imune de pacientes oncológicos (Yu et al., 1999; Shinitzky et al., 1983). Nesse contexto, o aumento no grau de ordem provocado pela Gen nos lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%, pode ter contribuído para sua atividade antitumoral.

## 6. CONCLUSÕES

---

A fim de contribuir para o aperfeiçoamento de um design de um sistema carreador baseado em Gen para o tratamento de gliomas, investigou-se neste estudo a influência da Gen nas propriedades físico-químicas dos lipídios, estabilidade e tamanho de lipossomos de diferentes composições lipídicas, bem como a suscetibilidade de cada sistema aos efeitos provocados pela isoflavona em cada região específica das membranas. Para tal, foram formulados lipossomos compostos por DMPC, DMPC contendo 10% e 40% de CHOL e DMPC contendo 10% de POPC. O potencial antioxidante destes sistemas contendo Gen foi testado *in vitro* via redução do radical DPPH e o efeito antiproliferativo de dois destes sistemas foi testado contra a linhagem celular de glioma de ratos C6, via contagem celular e MTT.

Nos lipossomos de DMPC e DMPC contendo 10% e 40% de CHOL, a Gen ordenou os lipossomos tanto na região polar, quanto nas regiões de interface e apolar com diferentes intensidades (o que evidencia a influência da composição lipídica nos efeitos que a Gen provocou nas membranas). Além disso, a incorporação de Gen nestes três sistemas lipossomais facilitou a interação da Gen com o radical DPPH, potencializando a atividade antioxidante da isoflavona, em comparação com sua forma livre, em solução.

No entanto vale ressaltar que uma maior concentração de CHOL reduziu a eficiência de encapsulamento da Gen, bem como seu potencial antioxidante. Nos lipossomos de DMPC/CHOL 40% a concentração de saturação de Gen foi 26,15% menor do que a concentração de saturação da isoflavona nos lipossomos de DMPC/CHOL 10%. Além disso, quando incorporada em DMPC/CHOL 40% a Gen apresentou um potencial antioxidante 6,20% menor do que quando incorporada em DMPC e 16,5% do que quando incorporada em DMPC/CHOL 10%.

Sendo assim, é provável que a inserção de uma maior concentração de CHOL nos lipossomos de DMPC possa ter neutralizado a incorporação da Gen, visto que ambos possuem caráter hidrofóbico e tendem a competir pelos espaços livres

na bicamada lipídica. Tal comportamento foi observado por outros autores com diferentes substâncias ativas (Mohammed et al., 2004; Fornovi et al., 1989; Fornés e Procópio, 1987).

A incorporação da Gen nos lipossomos de DMPC/POPC 10% tornou a membrana mais fluida, favoreceu a aglomeração dos lipossomos, reduzindo a estabilidade do sistema e reduziu seu potencial antioxidante, tornando sua atividade ainda menor do que quando testada na forma livre em solução, embora este sistema tenha apresentado maior eficiência de encapsulamento (ver item 5.1.). Sabe-se que carreadores lipossomais permeáveis possuem um menor empacotamento das bicamadas lipídicas e, conseqüentemente, menores interações intermoleculares. Isto pode reduzir a eficiência do sistema nos tratamentos de distúrbios crônicos, visto que pode facilitar a liberação da substância encapsulada durante a circulação ou até mesmo armazenamento (Kulkarni et al., 1995).

Neste contexto, sugere-se que o aumento na permeabilidade dos lipossomos de DMPC/POPC 10%, provocada pela Gen, possa ter facilitado a liberação da isoflavona para o meio e com isso reduzido a interação da Gen com o radical DPPH.

Adicionalmente, os lipossomos de DMPC/POPC 10% e DMPC/CHOL 40% apresentaram um diâmetro de partículas consideravelmente maior, em comparação com os lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%, o que reduz sua eficiência como sistemas carreadores a serem administrados por via parenteral, visto que impossibilita a passagem destes carreadores da corrente sanguínea para o interior do tecido tumoral (Sapra e Allen, 2003).

Sabe-se que o potencial antioxidante e antitumoral de uma substância ou sistema podem estar relacionados, pois o estresse oxidativo está intimamente ligado aos processos tumorais (Dragan et al., 2003). Além disso, alterações na ordem das membranas também podem influenciar no caráter antioxidante e antitumoral de um sistema. Membranas de células tumorais tendem a ser mais desorganizadas e fluidas do que as normais e uma boa estratégia para inibir o crescimento destas células é aumentar o grau de ordem das mesmas (Azambuja et al., 2015; Arora et al., 2000; Yu et al., 1999; Shinitzky et al., 1983).

Neste contexto, os lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10% foram selecionados (dentre os quatro sistemas investigados neste estudo) para a avaliação da atividade antitumoral *in vitro*.

Com o ensaio de contagem celular observou-se que os lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10% contendo Gen (100  $\mu$ M) reduziram o número de células viáveis (C6) em 79,62% e 93,75%, respectivamente. O maior efeito antiproliferativo da linhagem celular C6, observado em amostras de Gen incorporada nos lipossomos de DMPC/CHOL 10% (em comparação com o efeito observado nos lipossomos de DMPC contendo Gen) pode estar relacionado com a interação mais intensa da isoflavona com a região apolar das membranas de DMPC/CHOL 10%, o que pode ter facilitado a interação da Gen com as células tumorais de glioma de ratos.

Os controles (sem Gen) de DMPC (CD) e DMPC/CHOL 10% (CDC) reduziram o número de células viáveis em 46,25% e 36,62% respectivamente, demonstrando que os lipídios possuem um efeito contributivo com os efeitos da isoflavona na redução do número de células viáveis de C6.

Através do teste colorimétrico MTT, detectou-se uma redução no número de células tumorais viáveis de 83,45% e 84,40% quando tratadas com os sistemas compostos por DMPC e DMPC/CHOL 10% (contendo 100  $\mu$ M de Gen), respectivamente. Os controles CD e CDC reduziram o número de células viáveis em 49,62% e 41,03%, respectivamente, reforçando o efeito contributivo dos lipídios e da Gen, na redução da viabilidade de C6.

Assim, através dos resultados obtidos com este estudo, sugere-se que os lipossomos compostos por DMPC e DMPC/CHOL 10% possam ser promissores como sistemas carreadores de Gen para o tratamento de gliomas.

Sabe-se que o encapsulamento de substâncias ativas com potencial antitumoral, como a Gen, em lipossomos pode resultar em consideráveis reduções no volume de distribuição destas no organismo e um aumento significativo da substância ativa na região do tumor, contribuindo assim para a redução tanto de efeitos colaterais quanto dos mecanismos de resistência (Sapra e Allen, 2003).



A incorporação de Gen em lipossomos pode viabilizar a administração oral da isoflavona, aumentar os níveis de absorção desta e facilitar sua passagem na BHE (Azambuja et al., 2015; Garg et al., 2015; Tsai, 2005). De todos os sistemas estudados, os sistemas de DMPC e DMPC/CHOL 10% contendo Gen foram os mais promissores a serem viabilizados para a terapia anti-glioma.

Além disso, os lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10% foram sensíveis à ação na Gen tanto na região polar quanto na região apolar e a incorporação da Gen, nestes carreadores lipídicos, promoveu um maior grau de ordem na membrana bem como potencializou sua atividade antioxidante e antitumoral, onde se observou uma contribuição dos lipídios na redução da viabilidade de C6, promovida pela Gen.

Vale ressaltar que, ao comparar os lipossomos de DMPC e DMPC/CHOL 10%, os lipossomos de DMPC se mostraram mais estáveis e com tamanhos consideravelmente menores, o que o torna um sistema carreador mais adequado. Além disso, quando incorporada em DMPC, a Gen tornou os valores de Potencial Zeta mais positivos, o que pode favorecer uma maior circulação no organismo e facilitar a interação (por meio de interações eletrostáticas) com o DNA que possui uma carga efetiva negativa (Batista et al., 2007; Awasthi et al., 2004; Ulrich, 2002).

Porém, a inserção de 10% de CHOL aumentou a sensibilidade do sistema à ação da Gen na região apolar o que pode ter influenciado em uma maior interação com as células tumorais C6 e conseqüentemente, maior efeito antiproliferativo (via contagem celular) e potencializou a atividade antioxidante da Gen, em comparação com os demais sistemas. Neste contexto, sugere-se algumas adaptações no método de preparo destes lipossomos, como por exemplo, submetê-los a um processo de extrusão em membranas de policarbonato para reduzir o diâmetro dos lipossomos e aumentar sua eficiência como sistema carreador.

Sendo assim, este estudo contribuiu de forma significativa para conhecer as interações da Gen com sistemas lipossomais de diferentes composições lipídicas, bem como a sensibilidade destes sistemas à ação da isoflavona e a influência da composição lipídica nos efeitos provocados pela Gen, visando proporcionar conhecimento para a otimização e formulação de sistemas eficientes e menos tóxicos para o tratamento de gliomas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

1. Adjakly, M.; Ngollo, M.; Boiteux, J.P.; Bignon, Y.J.; Guy, L.; Bernard-Gallon, D. Genistein and daidzein: different molecular effects on prostate cancer. *Anticancer Res.* 33, 39-44, 2013.
2. Ali, M. H.; Behfar, M.; Kirby, D. J.; Mohammed, A. R.; Perrie, Y. The role of lipid geometry in designing liposomes for the solubilisation of poorly water soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics.* 453(1), 225-32, 2013.
3. Andresen, T. L.; Jensen, S. S.; Jorgensen, K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progress in Lipid Research.* 44, 68-97, 2005.
4. Anwekar, H.; Patel, S.; Singhai, A. K. Liposome- as drug carriers. *International Journal of Pharmacy e Life Sciences.* 2 (7), 945-951, 2011.
5. Arora, A.; Byrem, T. M.; Nair, M. G.; Strasburg, G. M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry Biophysics.* 373, 102-109, 2000.
6. Arrondo, J. L. R.; Goñi, F. M. Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes, *Chemistry and Physics of Lipids.* 96, 53-68, 1998.
7. Arsov, Z.; Quaroni, L. Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids.* 150, 35-48, 2007.
8. 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.* 309, 241-248, 2004.
9. Azambuja, C. R. L.; dos Santos, L. G.; Rodrigues, M. R.; Rodrigues, R. F. M.; Silveira, E. F.; Azambuja, J. H.; Flores, A. F. C.; Horn, A. P.; Dora, C. L.; Muccillo-Baisch, A. L.; Braganhol, E.; Pinto, L. S.; Parize, A. L.; de Lima, V. R. Physico-chemical characterization of asolectin–genistein liposomal system: An

- approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. *Chemistry and Physics of Lipids*. 193, 24-35, 2015.
10. Batista, M. C.; Carvalho, C. M. B.; Magalhães, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 43, 2, 2007.
  11. Bilge, D.; Sahin, I.; Kazanci, N.; Severcan, F. Interactions of tamoxifen with distearoyl phosphatidylcholine multilamellar vesicles: FTIR and DSC studies. *spectrochimica acta a mol biomol spectroscopy*. 130, 250-256, 2014.
  12. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *lebensm wiss u technology journal*. 28, 25-30, 1995.
  13. Brown, M. F. Theory of spin–lattice relaxation in lipid bilayers and biological membranes. Dipolar relaxation. *Journal of Chemical Physics*. 80, 2808-2831, 1984.
  14. Byun, Y.; Hwang, J. B.; Bang, S. H.; Darby, D.; Cooksey, K.; Dawson, P. L.; Park, H. J.; Whiteside, S. Formulation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles. *LWT-Food Science and Technology*. 44, 24-28, 2011.
  15. Casal, H. L.; Mantsch, H. H. Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*.. 779, 381-401, 1984.
  16. Chen, C.; Tripp, C. P. An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1778, 2266–2272, 2008.
  17. Choi, S. H.; Ware, W.; Lauterbach, S. R.; Phillips, W. M. Infrared spectroscopic studies on the phosphatidylserine bilayer interacting with calciumion — effect of cholesterol. *Biochemistry*. 30, 8563-8568, 1991.
  18. Christie, W. W.; Holman, R. T. Synthesis and characterization of the complete series of methylene-interrupted cis, cis- octadecadienoic acids. *Chemistry and Physics of Lipids*.1, 407-423, 1967.

19. Cullis, P. R.; de Kruijff, B.; Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 559, 399-420, 1979.
20. da Silveira, E. F.; Chassot, J. M.; Teixeira, F. C.; Azambuja, J. H.; Debom, G.; Beira, F. T.; Del Pino, F. A. B.; Lourenço, A.; Horn, A. P.; Cruz, L.; Spanevello, R. M.; Braganhol, E. Ketoprofen-loaded polymeric nanocapsules selectively inhibit cancer cell growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma multiforme. *investigational new drugs*. 31, 1424-1435, 2013.
21. Debouzy, J. C.; Aous, S.; Dabouis, V.; Neveux, Y.; Gentilhomme, E. Phospholipid matrix as a target for sulfur mustard (HD): NMR study in model membrane systems. *cell biology toxicology*. 18, 397-408, 2002.
22. De Lima, V. R.; Caro, M. S. B.; Munford, M. L.; Desbat, B.; Dufourc, E. J.; Pasa, A.; Creczynski-Pasa, T. B. Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine based membranes. *Journal of Pineal Research*. 49, 169-175, 2010.
23. de Lima, V. R.; Caro, M. S. B.; Tavares, M. I. B.; Creczynsky-Pasa, T.B. Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms. *Journal of Pineal Research*. 43, 276-282, 2007.
24. Demel, R. A.; de Kruijff, B. The Function of Sterols in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 457, 109-132, 1976.
25. Dimitrios, G. F.; Sophia, G. A. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *Journal of Colloid and Interface Science*. 251, 271-277, 2002.
26. Disalvo, E. A.; Bouchet, A. M. Electrophoretic mobility and zeta potential of liposomes due to arginine and polyarginine adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 170-174, 2014.
27. Dragan, A.; Dusanka, D.; Drago, B.; Nenad, T. Structure –radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemita Acta*. 76, 55-61, 2003.
28. Drisko, J. A.; Chapman, J.; Hunter, V. J. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecologic Oncology*. New York. 88, 434-439, 2003.

29. Eisenberg, A. L. A.; Koifman, S. Câncer de Mama: Marcadores Tumorais (Revisão da Literatura). *Revista Brasileira de Cancerologia*, 47(4), 377-88, 2001.
30. Elsayed, M. M. A.; Cevc, G. Turbidity spectroscopy for characterization of submicroscopic drug carriers, such as nanoparticles and lipid vesicles: size determination. *Pharmaceutical Research*. 28, 2204-2222, 2011.
31. Esteves, E. A.; Monteiro, J. B. R. Efeitos Benéficos das Isoflavonas de Soja em Doenças Crônicas. *Revista de Nutrição*. Campinas. 14(1), 43-52, 2001.
32. 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*. 251, 271-277, 2002.
33. Fornés, J. A.; Procópio, J. Influence of cholesterol on the surface charge density and surface potential of lipid bilayer membranes. *Journal of Colloid and Interface Science* 117(2), 570-573, 1987.
34. Fornovi, I. R.; Ramón, M. T. G.; Rivera, A. M. Métodos de preparación y caracterización de estructuras liposómicas. *Afinidad*. 46(424), 460-466, 1989.
35. Fraceto, L. F.; Spisnic, A.; Schreiere, S.; de Paula, E. Differential effects of uncharged aminoamide local anesthetics on phospholipid bilayers, as monitored by <sup>1</sup>H NMR measurements. *Biophysical Chemistry*115, 11-18, 2005.
36. Franke, A. A.; Halm, B. M.; Kakazu, K.; Xingnan, L.; Custer, L. J. Phytoestrogenic isoflavonoids in epidemiologic and clinical research. *Drug testing and analysis*. 1 (1), 14-21, 2009.
37. Frézard, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G. F.; Demicheli, C. Lipossomos: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química*. Nova. 28, 2005.
38. Fritsche, S.; Steinhart, H. Occurrence of hormonally active compounds food: a review. *European Food Research and Technology*. 209, 153-179, 1999.

39. Gardner, H. W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *free radical biology medicine*. 7, 65-86, 1989.
40. Ghosh, R.  $^{31}\text{P}$  and  $^2\text{H}$  NMR Studies of structure and motion in bilayers of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Biochemistry*. 27, 7750-7758, 1988.
41. Ghosh, D.; Williams, M. A.; Tinoco, J. *Biochimica et Biophysica Acta*. 291, 351-362, 1973.
42. Gniadecka, M.; Nielsen, O.F.; Christensen, D.H.; Wulf, H.C. Structure of water, proteins, and lipids in intact human skin, hair and nail. *Journal of Investigative Dermatology*. 10, 393-398, 1998.
43. Grdadolnik, J.; Kidric, J.; Hadzi, D. Hydration of phosphatidylcholine reverse micelles multilayers an infrared spectroscopic study. *Chemistry and Physics of Lipids*. 59, 57-68, 1991.
44. Gupta, U., Singh, V. K., Kumar, V., Khajuria, Y. Spectroscopic Studies of Cholesterol: Fourier Transform Infra-Red and Vibrational Frequency Analysis. *Materials Focus*. 3, 211-217, 2014.
45. Han, R. M.; Tian, Y. X.; Liu, Y.; Chen, C. H. H.; Ai, X. Ch.; Zhang, J.; Skibsted, L. H. Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57, 3780-3785, 2009.
46. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100, 57-70, 2000.
47. Hartwell, L.H.; Kastan, M.B. Cell cycle control and cancer. *Science*. 266, 1821-1828, 1999.
48. Hauser H.; Pascher, I.; Pearson, R. H.; Sundell, S. Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*. 650(1), 21-51, 1981.
49. He, H.; Lin, M.; Han, Z.; Muroya, Y.; Kudo, H.; Katsumura, Y. The formation and properties of the melatonin radical: a photolysis study of melatonin with 248 nm laser light. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 3, 1568-1574, 2005.
50. Herec, M.; Islamov, A.; Kuklin, A.; Gagos, M.; Gruszecki, W I. Effect of antibiotic amphotericin B on structural and dynamic properties of lipid

- membranes formed with egg yolk phosphatidylcholine. *Chemistry and Physics of Lipids*. 147, 78-86, 2007.
51. Ho, K. P.; Li, L.; Zhao, L.; Qian, Z. M. Genistein protects primary cortical neurons from iron-induced lipid peroxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 247, 219-222, 2003.
  52. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Mayer, L. D.; Janoff, A. S.; Cullis, P. R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*. 40, 89-107, 1986.
  53. INCA, 2011. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde. Estimativa: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2011.
  54. INCA, 2015: Instituto Nacional José Alencar Gomes da Silva; Ministério da Saúde: Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ.
  55. INCA, 2017: Instituto Nacional José Alencar Gomes da Silva; Ministério da Saúde: Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ.
  56. Janshoff, A.; Steinem, C. Transport across artificial membranes—an analytical perspective. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 385, 433-451, 2006.
  57. Kazanci, N.; Severcan, F.; Zorlu, F. Tamoxifen increases membrane fluidity at high concentrations. *Bioscience Reports*. 20, 177-184, 2000.
  58. Koerner, M. M.; Palacio, L. A.; Wright, J. W.; Schweitzer, K. S.; Ray, B. D. Electrodynamics of lipid membrane interactions in the presence of zwitterionic buffers. *Biophysical Journal*, 101, 362-369, 2011.
  59. Koppenol, W. H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. *FEBS Lett*. 264, 165-167, 1990.
  60. Korkmaz, F.; Severcan, F. Effect of progesterone on DPPC membrane: evidence for lateral phase separation and inverse action in lipid dynamics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 440, 141-147, 2005.
  61. Koynova, R.; Caffrey, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1376, 91-145, 1998.

62. Kresheck, G. C., Kale, K., Vallone, M.D. Calorimetric studies of the interaction between asolectin vesicles and surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*. 73, 460-466, 1980.
63. Krex, D.; Klink, B.; Hartmann, C.; Deimling, A. V.; Pietsch, T.; Simon, M.; Sabel, M.; Steinbach, J. P.; Heese, O.; Reifenberger, G.; Weller, M.; Schackert, G. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*. 130, 2596-2606, 2007.
64. Kulkarni, S. B.; Betageri, G. V.; Singh, M. Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes. *Journal of Microencapsulation* . 12 (3), 229-246, 1995.
65. Lasic, D. D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*. 16, 307-321, 1998.
66. Lee, D. C.; Chapman, D. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. *Bioscience Reports*. 6, 235-256, 1986.
67. Legrand, P.; Barratt, G.; Mosqueira, V.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. *S.T.P. Pharma sciences*. 9 (5), 411-418, 1999.
68. Lehtonen, J. Y. A.; Adlercreutz, H.; P. K, J. Kinnunen. Binding of daidzein to liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1285, 91-100, 1996.
69. Lewis, R. N. A. H.; Mannock, D. A.; MCellaney, R. N.; Wong, P. T. T.; Mantsch, H. H. Physical properties of glycosyldiacylglycerols: an infrared spectroscopic study of the gel-phase polymorphism of 1,2-di-O-acyl-3- - Dglucopyranosyl)- sn-glycerols. *Biochemistry*. 29, 8933-8943, 1990.
70. Lewis, R. N. A. H.; MCellaney, R. N. Vibrational spectroscopy of lipids, in: J. M. Chalmers, Griffiths, P.R. (Eds.), *The handbook of vibrational spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., 3447-3464, 2002.
71. Li, Q.; Li, C.; Li, Z.; Zhu, H. Genistein and its synthetic analogs as anticancer agents. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 12, 271-281, 2012.
72. Li, Y.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Sarkar, F.H. Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene*. 18, 3166-3172, 1999.



73. López-García, F.; Micol, V.; Villalaín, J.; Gómez-Fernández, J. C. Infrared spectroscopic study of the interaction of diacylglycerol with phosphatidylserine in the presence of calcium. *Biochimistry et Biophysics. Acta.* 1169, 264-272, 1993.
74. López-Lázaro, M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Current Medicinal Chemistry.* 2, 691-714, 2002.
75. Lőrinczy, D.; Kiss, M.; Belagy, J. DSC and EPR study on AMP.PNP, BeFx and AlF<sub>4</sub>containing myosin nucleotide complexes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 72, 565-572, 2003.
76. Lynch, D. V.; Steponkus, P. L. Lyotropic phase behavior of unsaturated phosphatidylcholine species: relevance to the mechanism of plasma membrane destabilization and freezing injury. *Biochimistry et Biophysics. Acta.* 984, 267-272, 1989.
77. Ma, J. C.; Dougherty, D. A. The cation- interaction. *Chemical Reviews.* 97, 1303-1324, 1997.
78. Malvern Instruments. 2012. Disponível em: <http://www.malvern.co.uk>. Acesso: Abril 2012.
79. Mamot C.; Drummond, D. C.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Park, J. W. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. *Drug Resistance Updates.* 6, 271-279, 2003.
80. Mannock, D. A.; Lewis, R. N. A. H.; McElhaney, R. N. A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochimistry et Biophysics. Acta.* 1798, 376-388, 2010.
81. Manrique-Moreno, M.; Garidel, P.; Suwalsky, M.; Howe, J.; Brandenburg, K. The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: a physico-chemical study with lecithin phospholipids. *Biochimistry et Biophysics. Acta.* 1788, 1296-1303, 2009.

82. Manrique-Moreno, M.; Howe, J., Suwalsky, M.; Garidel, P.; Brandenburg, K. Physicochemical interaction study of non-steroidal anti-inflammatory drugs with dimyristoylphosphatidylethanolamine liposomes. *letter drug design discovery*. 7, 50-56, 2010.
83. Matsukawa, Y.; Marui, N.; Sakai, T.; Satomi, Y.; Yoshida, M.; Matsumoto, K.; Nishino, H.; Aoike, A. Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Research*. 53, 1328-1331, 1993.
84. McElhaney, R. N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. 30, 229-259, 1982.
85. Mertins, O.; Sebben, M.; Pohlmann, A. R.; Silveira, N. P. Production of soybean phosphatidylcholine- chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. *Chemistry and Physics of Lipids*. 138, 29-37, 2005.
86. Mohammed, A. R.; Weston, N.; Coombes, A. G.; Fitzgerald, M.; Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics* 285, 23-34, 2004.
87. Mohan, A.; Narayanan, S.; Sethuraman, S.; Krishnan, U. M. Novel resveratrol and 5-fluorouracil coencapsulated in PEGylated nanoliposomes improve chemotherapeutic efficacy of combination against head and neck squamous cell carcinoma. *BioMed Research International*. 2014, 1-14, 2014.
88. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65, 55-63, 1983.
89. Mouritsen, O. G. Theoretical models of phospholipids phase transitions. *Chemistry and Physics of Lipids*. 57, 179-194, 1991.
90. Mouritsen, O. G.; Jorgensen, K.. Dynamical order and disorder in lipid bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*. 73, 3-25, 1994.

91. Nagami, H.; Matsumoto, Y.; Ueoka, R. Chemotherapy with hybrid liposomes for lymphoma without drugs in vivo. *International Journal of Pharmaceutics*. 315, 167-172, 2006.
92. Niederberger, W.; Seelig, J. Phosphorus-31 chemical shift anisotropy in unsonicated phospholipid bilayers. *JACS*. 98, 3704-3706, 1976.
93. Nogueira, A. O. M.; de Sousa, R. S.; Pereira, L. S.; Mallmann, C.; Ferreira, A. S.; Clementin, R. M.; de Lima, V. R. Physicochemical interactions among  $\alpha$ -eleostearic acid-loaded liposomes applied to the development of drug delivery systems. *Journal of Molecular Structure*, 1154, 248-255, 2018.
94. Ohvo-Rekilä, H.; Ramstedt, B.; Leppimäki, P.; Slotte, J. P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research*. 41, 66-97, 2002.
95. Paradkar, M. M. and Irudayaraj, J. Determination of cholesterol in dairy products using infrared techniques: 1. FTIR spectroscopy. *International Journal of Dairy Technology*. 55 (3), 127-132, 2002.
96. Pawlikowska-Pawlega, B.; Misiak, L.E.; Jarosz-Wilkolazka, A.; Zarzyka, B.; Paduch, R.; Gawron, A.; Gruszecki, W. I. Biophysical characterization of genistein– membrane interaction and its correlation with biological effect on cells—the case of EYPC liposomes and human erythrocyte membranes. *Biochimistry et Biophysics Acta*. 1838, 2127-2138, 2012.
97. Qian, Z. M.; Shen, X. Brain iron transport and neurodegeneration. *Trends in Molecular Medicine*. 7, 103-108, 2001.
98. Roberts, M. F.; Redfield, A. G.; Mohanty, U. Phospholipid Reorientation at the Lipid/Water Interface Measured by High Resolution  $^{31}\text{P}$  Field Cycling NMR Spectroscopy. *Biophysical Journal*97(1), 132-141, 2009.
99. Ruiz, J.; Goñi, F. M.; Alonso, A. Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results. *Biochimistry et Biophysics Acta*. 937, 127-134, 1988.
100. Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. Liposomes: has the magic bullet hit the Target? *Quimica Nova*. 25, 1181-1185, 2002.

101. Sapra, P. Allen, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*. 42, 439-462, 2003.
102. Seelig, J.; Tamm, L.; Hymel, L.; Fleischer, S. Deuterium and phosphorus nuclear magnetic resonance and fluorescence depolarization studies of functional reconstituted sarcoplasmic reticulum membrane vesicles. *Biochemistry*. 20, 3922-3932, 1981.
103. Seelig, J. <sup>31</sup>P Nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 515, 105-140, 1978.
104. Severcan, F.; Sahin, I.; Kazanci, N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes-evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1668, 215-222, 2005.
105. Sharma, A.; Sharma, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 154, 123-140, 1997.
106. Sherry, M.; Charcosset, C.; Fessi, H.; Greige-Gerges, H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. *J Liposome Res*, Early Online: 1-8, 2013.
107. Shinitzky, M.; Skomick, Y.; Gorelik, E.; Sindelar, W. Regulation of membrane function by lipids; implications for tumor development. *Progress in clinical and biological research*. 132B, 425-33, 1983.
108. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.
109. Sinico, C.; De Logu, A.; Lai, F.; Valenti, D.; Manconi, M.; Loy, G.; Bonsignore, L.; Fadda, A. M. Liposomal incorporation of *Artemisia arborescens* L. essential oil and in vitro antiviral activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 59, 161-168, 2005.
110. Skoog, D. A.; Holler, F. J., Nieman, T. A. *Principles of instrumental analysis*. USA: Hartcourt Brace & Company, 1998.

111. Sousa, R. S.; Nogueira, A. O. M.; Marques, V. G.; Clementin, R. M., de Lima, V. R. Effects of  $\alpha$ -eleostearic acid on asolectin liposomes dynamics: relevance to its antioxidant activity. *Bioorganic Chemistry*. 51, 8-15, 2013.
112. Souza, G.; Rocha, A.; Alfaiate, T.; Carvalho, T.; Veiga, A.; Moura, M. R. F. Glioblastoma Multiforme com Apresentacao Multifocal. *Acta Medica Portuguesa*. 15, 321-324, 2002.
113. Stamp, D.; Juliano, R. L. Factors affecting the encapsulation of drugs within liposomes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 57, 535-539, 1979.
114. Susi, H.; Byler, D. M.; Damert, W.C. Raman intensities of carbon-carbon stretching modes in a model membrane. *Chemistry and Physics of Lipids*. 27, 337-344, 1980.
115. Szoka, F. C.; Papahadjopoulos, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual Review of biophysics and Bioengineering*, 9, 467-508, 1980.
116. Szoka, F. J.; Papahadjopoulos, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Biochemistry*. 75, 4194-419, 1978.
117. Tamm, L. K.; Tatulian, S. A. Q. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Rev. Biophys. J.* 30, 365-429, 1997.
118. Tatulian, S. A. Effect of lipid phase transition on the binding of anions to dimyristoylphosphatidylcholine liposomes, *Biochimistry et Biophysics. Acta*. 736, p.189-195, 1983.
119. Tatulian, S. A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: A method of choice for studying membrane proteins and lipids. *Biochemistry*. 42, 11898-11907, 2003.
120. Timoszyk, A.; Gdaniec, Z.; Latanowicz, L. The effect of polysialic acid on molecular dynamics of model membranes studied by  $^{31}\text{P}$ -NMR spectroscopy. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. 25, 142-145, 2004.

121. Toyran, N.; Severcan, F. Competitive effect of vitamin D<sub>2</sub> and Ca<sup>2+</sup> on phospholipid model membranes: an FTIR study. *Journal of Molecular Structure*. 123, 165-176, 2003.
122. Tsai, T. H. Concurrent measurement of unbound genistein in the blood, brain and bile of anesthetized rats using microdialysis and its pharmacokinetic application. *Journal of Chromatography*. 1073, 317-322, 2005.
123. Tsao, R.; Yang, R.; Young, J. C. Antioxidant isoflavonoids in osage orange, *maclura pomifera* (Raf) schneid. *Journal agricultural and Food Chemistry*. 51, 6445-6451, 2003.
124. Ulrich, A. S. Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles. *Bioscience Reports*. 22, 129, 2002.
125. Ulrich, A. S.; Sami, M.; Watts, A. Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. *Biochimistry et Biophysics Acta*. 1191, 225-230, 1994.
126. Valenti, D.; de Logu, A.; Loy, G.; Sinico, C.; Bonsignore, L.; Cottiglia, F.; Garau, D.; Fadda, A. M. Liposome-incorporated *Santolina Insularis* essential oil: preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *Journal of Liposome Research*. 11 (1), 73-90, 2001.
127. Van Meer, G.; Van Genderen, I. L. Physicochemical questions in lipid sorting. In: Hildeson, H.J.; Ralston, G. B. *Physicochemical methods in the study of biomembranes*. New York, 1994.
128. Villares, A.; Rostagno, M. A.; Garcia- Lafuente, A.; Guillamón, E.; Martínez, J. A. Content and profile of isoflavones in soy- based foods as a function of the production process. *Food Bioprocess Technology*. 4, 27-38, 2011.
129. Villasmil -Sánchez, S; Rabasco, A. M.; Rodriguez, 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*. 105, 14-23, 2013.
130. Vist, M. R.; Davis, J. H. Phase equilibria of cholesterol/ dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: deuterium nuclear magnetic

- resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*. 29, 451-464, 1990.
131. Wagner, A.; Vorauer-uhl, K. Liposome technology for industrial purposes. *J. Drug Delivery*. 2011, 1-9, 2011.
  132. Yi, P.N.; MacDonald, R. C. Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine. *Chemistry and Physics of Lipids*. 11, 114-134, 1973.
  133. Yu, J.; Cheng, Y.; Xie, L.; Zhang, R. Effects of genistein and daidzein on membrane characteristics of HTC cells. *Nutrition and Cancer*. 33, 100-104, 1999.
  134. Zhao, L.; Feng, S.; Kocherginsky, N.; Kostetski, I. DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 338, 258-266, 2007.