

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS E ESTRUTURAIS  
DE LIPOSSOMAS COMPÓSITOS DE FOSFATIDILCOLINA  
E QUITOSANA**

**TESE DE DOUTORADO**

**Omar Mertins**

**Porto Alegre, 2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS E ESTRUTURAIS  
DE LIPOSSOMAS COMPÓSITOS DE FOSFATIDILCOLINA  
E QUITOSANA**

**OMAR MERTINS**

**Mestre em Química**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Doutor em Química.**

**Porto Alegre, julho de 2008.**

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor entre julho/2004 e junho/2008 no Instituto de Química da UFRGS, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádyá Pesce da Silveira e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Raffin Pohlmann. No período de maio/2006 a abril/2007, o trabalho foi desenvolvido no *Institut Charles Sadron*, em Strasbourg, França, sob supervisão do Prof. Dr. Carlos M. Marques.

*Omar Mertins*

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nádyá Pesce da Silveira

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Raffin Pohlmann

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos M. Marques

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Watson Loh  
Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Izabel Cristina Riegel  
Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas – Centro Universitário Feevale (FEEVALE)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Magdolna Maria Vozari Hampe  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Clarisse Maria Sartori Piatnicki  
Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Dimitrios Samios  
Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*“We are not defined without each other.”*

*Madonna*

*Ao Futuro*

## Agradecimentos

À Nádyá, pela amizade constante, incentivo e orientação.

À Adriana, pela amizade, apoio e co-orientação.

Ao Carlos, pela amizade, co-orientação e por ajudar a me fazer sentir em casa numa terra estrangeira.

A todos os colegas do LINDIM, pelos inúmeros auxílios e por fazerem do laboratório um lugar de companheirismo e amizade.

À Yasmine e à Maria pela colaboração e auxílios em alguns experimentos.

Ao Mateus, ao Fernando e à Aline, pela amizade, ajuda e força.

Ao professor Paulo Henrique pela obtenção dos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$ .

À professora Irene pela amizade e o exemplo de determinação.

À professora Maria Helena pelos incentivos e por acreditar neste trabalho.

Ao professor Dimitrios pela amizade e estímulo.

À Capes e ao CNPq pelas bolsas, à Solae do Brasil S.A. pela fosfatidilcolina, ao LNLS pelas medidas de SAXS e às Redes de Nanobiotecnologia e Nanocosmética (CNPq/MCT) pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais e irmão, pelo apoio. Em especial à minha mãe Nair pelo afeto e compreensão.

Ao Jorge, pela amizade incondicional, força e honestidade.

Ao Alexandre, pela amizade e confiança.

À Lislaine, por me mostrar que podemos sobreviver a muitas coisas e voltar a crescer.

Ao Nuno e ao Ernesto, pela amizade e ajudas.

Merci aussi à André, pour l'amitié et tous les enseignements à l'ICS.

Merci à Thierry, pour l'amitié et les mesures de FRAP.

Merci à Marc Schmutz, pour la TEM.

Merci à M. Rinaudo, pour les conseils et références.

Merci à François, pour les expériences de microscopie.

Merci à Marc Basler, Lea et tout le personnel à l'ICS pour l'amitié et tout l'aide.

Thanks to Christopher for all the help on the microscope.

Merci bien à Martine, pour l'amitié et l'accueil maternel.

Merci beaucoup à Jean François de m'avoir montré le bonheur de la vie.

## Produção científica gerada a partir dos resultados descritos na Tese

**Omar Mertins**, Marcelo Sebben, Adriana R. Pohlmann, Nádyá Pesce da Silveira.

Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study

*Chemistry and Physics of Lipids*, 138, 29-37, 2005.

**Omar Mertins**, Mateus B. Cardoso, Adriana R. Pohlmann, Nádyá Pesce da Silveira.

Structural evaluation of phospholipidic nanovesicles containing small amounts of chitosan

*Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 2425-2421, 2006.

**Omar Mertins**, Maria I.Z. Lionzo, Yasmine M.S. Micheletto, Adriana R. Pohlmann, Nádyá Pesce da Silveira.

Chitosan effect on the mesophase behaviour of phosphatidylcholine supramolecular systems

*Materials Science and Engineering C*, in press.

## Outras publicações

Adriana R. Pohlmann, Valéria Weis, **Omar Mertins**, Nádyá Pesce da Silveira, Sílvia S. Guterres.

Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models

*European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16, 305-312, 2002.

Liliam B. Marón, Carlos P. Covas, Nádyá P. Silveira, Adriana R. Pohlmann, **Omar Mertins**, Leonardo N. Tatsuo, Osvaldo A.B. Sant'anna, Ana M. Moro, Célia S. Takata, Pedro S. Araújo, Maria H.B. Costa.

LUVs recovered with chitosan: a new preparation for vaccine delivery

*Journal of Liposome Research*, 17, 155-163, 2007.

**Omar Mertins**, Marcelo Sebben, Paulo H. Schneider, Adriana R. Pohlmann, Nádyá Pesce da Silveira.

Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{31}\text{P}$

*Química Nova*, in press.

# Índice Geral

## Capítulo 1. Introdução

1.1. Considerações Preliminares .....	1
1.2. Lipossomas .....	3
1.2.1. Breve Histórico .....	6
1.2.2. Composições Molecular e Estrutural .....	7
1.2.3. Dinâmica Molecular e Transições de Fase .....	14
1.2.4. Importância Científica e Tecnológica .....	20
1.3. Quitina e Quitosana .....	23
1.3.1. Revisão Bibliográfica .....	23
1.3.2. Importância Científica e Tecnológica .....	30
1.4. Quitossomas .....	33
1.5. Referências .....	36

## Capítulo 2. Metodologias

2.1. Obtenção de Quitosana Fluorescente .....	42
2.2. Lipossomas e Quitossomas Nanométricos .....	45
2.2.1. Método da Evaporação em Fase Reversa .....	45
2.3. Espalhamento de Luz .....	50
2.3.1. Espalhamento de Luz Estático .....	53
2.3.2. Espalhamento de Luz Dinâmico .....	58
2.3.3. Recuperação de Fluorescência Após Foto-Branqueamento .....	62
2.4. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo .....	69

<b>2.5. Microscopia Óptica</b>	<b>75</b>
<b>2.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão</b>	<b>76</b>
<b>2.7. Potencial Zeta</b>	<b>77</b>
<b>2.8. Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo</b>	<b>80</b>
<b>2.9. Lipossomas Gigantes</b>	<b>83</b>
<b>2.9.1. Eletroformação</b>	<b>84</b>
<b>2.9.2. Proposta de Eletroformação a Partir da Fase Reversa</b>	<b>87</b>
<b>2.9.3. Microscopia Óptica e de Fluorescência</b>	<b>89</b>
<b>2.9.4. Calibração da Fluorescência</b>	<b>93</b>
<b>2.10. Referências</b>	<b>96</b>

## **Capítulo 3. Resultados e Discussões**

<b>3.1. Lipossomas e Quitossomas Nanométricos</b>	<b>99</b>
<b>3.1.1. Avaliação Estrutural</b>	<b>99</b>
<b>3.1.1.1. Espalhamento de Luz</b>	<b>99</b>
<b>3.1.1.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo</b>	<b>111</b>
<b>3.1.1.3. Microscopia Óptica e Eletrônica</b>	<b>125</b>
<b>3.1.2. Transições de Fase</b>	<b>130</b>
<b>3.1.2.1. Espalhamento de Luz Estático</b>	<b>130</b>
<b>3.1.2.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo</b>	<b>135</b>
<b>3.1.3. Dinâmica e Interações Moleculares</b>	<b>142</b>
<b>3.1.3.1. Potencial Zeta</b>	<b>143</b>
<b>3.1.3.2. Recuperação de Fluorescência Após Foto-Branqueamento</b>	<b>145</b>
<b>3.1.3.3. Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo</b>	<b>148</b>
<b>3.2. Lipossomas e Quitossomas Gigantes</b>	<b>154</b>
<b>3.2.1. Avaliação da Eletroformação a Partir da Fase Reversa</b>	<b>155</b>



3.2.2. Localização da Quitosana nos Lipossomas Gigantes .....	158
3.2.3. Avaliação da Concentração de Quitosana .....	168
3.2.4. Estabilidade .....	172
3.3. Aspectos Aplicativos do Sistema Desenvolvido .....	174
3.4. Referências .....	176

## **Capítulo 4. Conclusões**

4. Conclusões .....	178
---------------------	-----

## **Anexos**

Artigos Publicados .....	182
--------------------------	-----

## Índice de Figuras

Figura 1.1. Representação de um lipossoma dividido ao meio para evidenciar a sua estruturação interna constituída de um núcleo polar cercado por uma dupla camada de fosfolipídios.....	5
Figura 1.2. Representação de diferentes organizações estruturais de moléculas anfifílicas e as suas respectivas nomenclaturas.....	8
Figura 1.3. Representação de possíveis formas de moléculas anfifílicas relacionadas com a simetria da organização estrutural e respectivas fases mais prováveis de estruturas coloidais.....	9
Figura 1.4. Estruturas moleculares da 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (DPPC) (a) e do 1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-[fosfo- <i>rac</i> -(1-glicerol)] (DOPG) (b).....	10
Figura 1.5. Representação das diferentes mesofases da bicamada fosfolipídica juntamente com suas respectivas simbologias e nomenclaturas e indicação da variação da distância de repetição ( <i>d</i> ). A dependência do aumento do fornecimento de energia externa necessária para que uma mesofase se transforme em outra está indicada pelo caminho das flechas.....	17
Figura 1.6. Estruturas moleculares da quitina 100% acetilada (a), da quitosana 100% desacetilada (b) e da quitosana 100% desacetilada e ionizada (c).....	24
Figura 2.1. Reação entre quitosana e isotiocianato de fluorosceína com a obtenção da quitosana fluorescente.....	43
Figura 2.2. Representação das diferentes etapas do método de evaporação em fase reversa.....	46
Figura 2.3. Representação das diferentes etapas do método de evaporação em fase reversa com a adição de quitosana na etapa 2.....	47
Figura 2.4. Estruturas moleculares da 1,2-diestearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (DSPC) (a), L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina (LPC) (b), 1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfato (DPPA) (c) e da 1-oleoil-2-[12-[(nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoil]- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (NBDPC) (d).....	48

Figura 2.5. Geometria básica de espalhamento onde a radiação incidente sobre um objeto consiste num vetor de onda $k_i$ e a radiação espalhada consiste num vetor de onda $k_f$ num ângulo $\theta$ em relação à radiação incidente.....	<b>51</b>
Figura 2.6. Vista superior do equipamento de espalhamento de luz. O laser incide sobre a amostra localizada no centro do goniômetro. A luz espalhada em determinado ângulo é coletada e amplificada pela fotomultiplicadora que envia os dados ao computador.....	<b>58</b>
Figura 2.7. Comparação entre raio de giro ( $R_g$ ) e raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) para duas cadeias poliméricas isoladas (linhas contínuas) representando uma cadeia tipo novelo (esquerda) e uma cadeia estendida (direita).....	<b>61</b>
Figura 2.8. Representação gráfica do perfil da intensidade de fluorescência ( $I$ ) em função do tempo ( $t$ ) num experimento de FRAP. A linha de base (1) sofre um decaimento abrupto no momento do foto-branqueamento (2). Com o passar do tempo a intensidade de fluorescência no ponto foto-branqueado volta a aumentar com a difusão de entidades que não foram foto-branqueadas (3) até a estabilização da recuperação de fluorescência num valor constante (4) que é menor do que o inicial. A fluorescência perdida no foto-branqueamento é $x$ e a recuperada é $y$ . A mobilidade das entidades fluorescentes pode ser determinada pela declividade da curva 3.....	<b>64</b>
Figura 2.9. Representação esquemática do equipamento de FRAP. As distâncias $a$ e $b$ são reguláveis.....	<b>66</b>
Figura 2.10. Representação esquemática da geometria de difração de raios-X sobre uma camada ordenada com distância de repetição $d$ .....	<b>72</b>
Figura 2.11. Representação da distribuição de íons em torno de uma partícula esférica negativamente carregada dispersa num líquido ionizado.....	<b>78</b>
Figura 2.12. Representação da célula utilizada para medidas de Potencial Zeta (a) e esquema do equipamento (b).....	<b>80</b>
Figura 2.13. Representação do aparato experimental para a produção de vesículas gigantes. A célula de eletroformação é conectada ao gerador de tensão que fornece o campo elétrico, o qual estimula a formação das estruturas a partir do filme de fosfolipídios.....	<b>85</b>
Figura 3.1. Função de autocorrelação temporal representativa, obtida para uma amostra de quitossomas em suspensão aquosa através do Espalhamento de Luz Dinâmico.....	<b>100</b>

Figura 3.2. Variação do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) obtido por Espalhamento de Luz Dinâmico para lipossomas e quitossomas em função da concentração de quitosana para amostras filtradas a 0,45 e 1,20 $\mu\text{m}$ e amostras não filtradas, conforme indicado.....	<b>101</b>
Figura 3.3. Representação seqüencial (esquerda para direita) da passagem de uma vesícula através do poro de um filtro menor do que a estrutura a ser filtrada. A membrana da vesícula rompe durante a passagem da mesma e assim duas novas estruturas menores são formadas. As flechas indicam a direção do fluxo da filtração.....	<b>105</b>
Figura 3.4. Distribuições do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) em função da amplitude do volume de distribuição ( $A$ ) obtidas a partir da análise das funções de correlação temporal do Espalhamento de Luz Dinâmico para amostras de lipossomas (a, c, e) e quitossomas (b, d, f) submetidas a diferentes tempos de ultrasonicação sob energia constante: 30 segundos (a, b); 1 minuto (c, d); 5 minutos (e, f).....	<b>109</b>
Figura 3.5. Representação do resultado de Cromatografia em Camada Delgada em placas de sílica gel (eluente: clorofórmio:metanol:água (6,5:2,5:0,4)) reveladas em atmosfera saturada de iodo para eluição de amostra de lipossomas e quitossomas antes e após ultrasonicação durante 10 minutos. As manchas correspondem ao ácido fosfatídico ( $R_f = 0,72$ ) (1), fosfatidilcolina (95%, $R_f = 0,21$ ) (2) e lisofosfatidilcolina ( $R_f = 0,07$ ) (3).....	<b>110</b>
Figura 3.6. Espectros de SAXS obtidos para uma série de amostras de lipossomas e quitossomas com crescente concentração de quitosana, conforme indicado, filtradas com membrana de 0,45 $\mu\text{m}$ . Os perfis de espalhamento são demonstrados como intensidade de radiação espalhada ( $y$ ) em função do vetor de onda $q$ ( $x$ ) sem redução do ruído de fundo.....	<b>112</b>
Figura 3.7. Espectros de SAXS com aplicação de funções Lorentzianas (linhas contínuas) para quitossomas não filtrados e preparados com a solução de quitosana de 1,00 mg/mL (a), quitossomas filtrados a 1,20 $\mu\text{m}$ e preparados com a solução de quitosana de 0,50 mg/mL (b) e lipossomas filtrados a 0,45 $\mu\text{m}$ (c).....	<b>114</b>
Figura 3.8. Representação idealizada de duas bicamadas de fosfolipídios separadas por uma camada de moléculas de água. A distância de repetição $d$ considera a espessura da bicamada mais a porção aquosa.....	<b>117</b>

Figura 3.9. Evolução percentual relativa das áreas da curva estendida (acima) e do primeiro pico de difração (abaixo) obtidas pela aplicação de funções Lorentzianas nos espectros de SAXS das diferentes amostras de vesículas estudadas em função da concentração de quitosana e da filtração, conforme indicado.....	<b>119</b>
Figura 3.10. Variação do número médio de bicamadas fosfolipídicas ( $\langle N \rangle$ ) obtido pela largura à meia altura do primeiro pico de espalhamento nos espectros de SAXS em estruturas multilamelares para as diferentes amostras de vesículas estudadas em função da concentração de quitosana e da filtração, conforme indicado.....	<b>121</b>
Figura 3.11. Imagens de Microcopia Óptica obtidas para amostras em suspensão aquosa de lipossomas (L) e quitossomas (Q) (1,00 mg/mL de quitosana) não filtrados e filtrados a 0,45 $\mu\text{m}$ (LF e QF). A barra representa expansão de 10 $\mu\text{m}$ para todas as imagens.....	<b>125</b>
Figura 3.12. Imagem de Microcopia Óptica de Luz Polarizada obtida para uma amostra de quitossomas não filtrada (1,00 mg/mL de quitosana). A textura em mosaico com a presença de cruz de Malta caracteriza a organização do sistema como fase lamelar num líquido isotrópico. A barra representa expansão de 0,1 $\mu\text{m}$ .....	<b>126</b>
Figura 3.13. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão obtidas para amostras de lipossomas (a, b, e, f) e quitossomas (c, d, g, h) (1,00 mg/mL de quitosana) sem nenhum pós-tratamento (a, b, c, d) e com aplicação de 5 minutos de ultrasonicação sob energia constante (e, f, g, h). A barra representa expansão de 100 nm.....	<b>128</b>
Figura 3.14. Representação de uma porção da superfície externa de vesícula fosfolipídica onde as extremidades polares conferem uma superfície homogênea em determinada fase 1 e uma superfície não homogênea com as extremidades polares desalinhas na fase 2. As fases podem ser relacionadas com a intensidade de luz espalhada ( $I_S$ ) em função da temperatura ( $T$ ), onde o ponto à meia altura da curva corresponde à temperatura de transição de fase do sistema.....	<b>131</b>
Figura 3.15. Evolução da intensidade de luz espalhada ( $I_S$ ) observada no ângulo de espalhamento de $135^\circ$ em função do aumento da temperatura ( $T$ ) obtida por Espalhamento de Luz Estático para lipossomas (a) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) (b).....	<b>132</b>

Figura 3.16. Perfis de difração de intensidade ( $I$ ) em função do vetor de onda ( $q$ ) obtidos por SAXS em diferentes temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ ), conforme indicado, para amostras de lipossomas (a) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) (b).....	<b>136</b>
Figura 3.17. Perfis de espalhamento de intensidade em função do vetor de onda ( $q$ ) obtidos por SAXS em diferentes temperaturas, conforme indicado, para amostras de lipossomas (a, c, e) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) (b, d, f). As linhas contínuas mostram o ajuste com funções Lorentzianas que evidenciam a presença de picos e curvas. A flecha indica a presença de um ombro estendido ao lado do primeiro pico para os quitossomas na temperatura de 75 $^{\circ}\text{C}$ .....	<b>137</b>
Figura 3.18. Evolução das distâncias de repetição das bicamadas fosfolipídicas ( $d$ ) obtidas por SAXS para lipossomas ( $\square$ ) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) ( $\blacktriangle$ ) submetidos ao aquecimento.....	<b>139</b>
Figura 3.19. Evolução da intensidade de luz espalhada ( $I_s$ ) ( $\blacksquare$ ) observada no ângulo de espalhamento de 135 $^{\circ}$ em função do aumento da temperatura ( $T$ ) obtida por Espalhamento de Luz Estático para lipossomas (a) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) (b). Evolução comparativa das distâncias de repetição das bicamadas fosfolipídicas ( $d$ ) ( $\blacktriangle$ ) obtidas por SAXS e normalizadas em relação ao maior valor encontrado para lipossomas (a) e quitossomas (b) submetidos ao aquecimento.....	<b>140</b>
Figura 3.20. Variação do Potencial Zeta ( $\zeta$ ) para lipossomas e quitossomas com crescente concentração polimérica para amostras filtradas a 0,45 $\mu\text{m}$ .....	<b>144</b>
Figura 3.21. Tempos de recuperação de fluorescência característicos ( $\tau_q$ ) em função do inverso do vetor de onda ao quadrado ( $q$ ) obtidos por FRAP para lipossomas com 0,1% de NBDPC ( $\blacklozenge$ ) e quitossomas com quitosana fluorescente (1,00 mg/mL) ( $\circ$ ) em suspensão aquosa e sonicados por 5 minutos sob energia constante e quitosana fluorescente em solução tampão (7).....	<b>146</b>
Figura 3.22. Espectros de RMN de $^{31}\text{P}$ obtidos para lipossomas (coluna esquerda) e quitossomas preparados com 1,00 mg/mL de quitosana (coluna direita) em diferentes temperaturas conforme indicado. Os deslocamentos químicos perpendicular ( $\sigma_{\perp}$ ) e paralelo ( $\sigma_{\parallel}$ ) são indicados nos espectros superiores.....	<b>149</b>

Figura 3.23. Variação do deslocamento químico de anisotropia ( $\Delta\sigma$ ) obtido por RMN de $^{31}\text{P}$ em função da temperatura ( $T$ ) para lipossomas (■) e quitossomas (▲). O desvio máximo do $\Delta\sigma$ é de $\pm 2$ ppm para todos os pontos.....	<b>152</b>
Figura 3.24. Imagens de Microscopia Óptica do interior das células de eletroformação na produção de vesículas gigantes pelo método tradicional (a) e pelo método modificado com a adição de quitosana (b) após três horas sob ação de campo elétrico constante (1,5 V e 10 Hz) em solução de sacarose (0,095 M) na temperatura ambiente (20 °C). A barra expande 10 micrômetros.....	<b>155</b>
Figura 3.25. Imagens de Microscopia Óptica de Contraste de Fase de lipossomas gigantes (a) e quitossomas gigantes (b) dispersos em solução de glicose (0,099 M). A barra expande 20 micrômetros.....	<b>156</b>
Figura 3.26. Imagens de Microscopia Óptica de Contraste de Fase (a) e de Fluorescência (b) para um quitossoma gigante contendo quitosana fluorescente. A barra expande 10 micrômetros.....	<b>159</b>
Figura 3.27. Imagem de Microscopia Óptica de Fluorescência (a) e de Microscopia Óptica de Contraste de Fase (b) de um quitossoma gigante fluorescente em solução de glicose (0,099 M). A sobreposição das imagens (c) mostra a co-localização da quitosana fluorescente com a membrana da estrutura pela comparação do perfil de intensidade de fluorescência (gráfico superior) com o perfil da variação de intensidade de cinza (gráfico inferior) de uma linha equatorial sobre ambas as imagens. Nos gráficos, em $y$ é medida a intensidade de cinza e em $x$ o número de pixels. A barra expande 10 micrômetros.....	<b>161</b>
Figura 3.28. Imagens de Microscopia Óptica de Fluorescência de uma vesícula gigante contendo 1% de NBDPC na membrana (a) e de uma vesícula gigante contendo fluoresceína encapsulada no volume do núcleo aquoso (c) e o correspondente perfil de distribuição da intensidade de fluorescência sobre uma linha equatorial de cada imagem (b e d). Os pontos nos gráficos representam os resultados experimentais e as linhas cheias os cálculos teóricos obtidos pela convolução da função de propagação pontual do microscópio e a intensidade de fluorescência emitida unicamente pela membrana (b) ou unicamente pelo volume (d) de cada vesícula.....	<b>162</b>

Figura 3.29. Intensidade de fluorescência em função da área de superfície de quitossomas gigantes para concentrações relativas de 3 ( $\Delta$ ), 6 ( $\bullet$ ) e 12 % ( $\square$ ) de quitosana fluorescente adicionada na produção das estruturas.....	<b>164</b>
Figure 3.30. Fluorescência por unidade de superfície ( $\beta = F/S$ ) obtida a partir da extrapolação das contribuições de quitossomas gigantes de variados diâmetros em função da concentração relativa de quitosana ( $f$ ) adicionada na produção das estruturas.....	<b>165</b>
Figura 3.31. Imagem de Microscopia Óptica de Fluorescência de um quitossoma gigante com as análises do perfil de distribuição da intensidade de fluorescência sobre a linha horizontal em cinco diferentes regiões de alto a baixo da vesícula. Nos gráficos, em $y$ é medida a intensidade de cinza e em $x$ o número de pixels. A linha expande 50 micrômetros.....	<b>166</b>
Figura 3.32. Imagens de Microscopia Óptica de Fluorescência de dois quitossomas gigantes com as respectivas análises do perfil de distribuição da intensidade de fluorescência sobre as linhas horizontais. As setas indicam agregados de quitosana fluorescente. Nos gráficos, em $y$ é medida a intensidade de cinza e em $x$ o número de pixels. As linhas expandem 100 micrômetros.....	<b>167</b>
Figura 3.33. Intensidade de fluorescência ( $I$ ) em função da concentração de quitosana fluorescente em solução tampão (filtrada a 0,22 $\mu\text{m}$ ) a 515 ( $\blacksquare$ ) e 533 nm ( $\bullet$ ).....	<b>169</b>
Figura 3.34. Intensidade de fluorescência ( $I$ ) em função da concentração de NBDPC contida em lipossomas nanométricos em suspensão aquosa a 515 ( $\blacksquare$ ) e 533 nm ( $\bullet$ ).....	<b>170</b>
Figura 3.35. Variação temporal da intensidade de fluorescência por unidade de superfície ( $\beta$ ) para quitossomas gigantes preparados com três diferentes concentrações de quitosana fluorescente: 0,94 ( $\Delta$ ), 1,88 ( $\bullet$ ) e 3,75% ( $\square$ ) (m/m). As linhas horizontais pontilhadas mostram os valores médios para cada $\beta$ .....	<b>174</b>



## Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Temperaturas de transição de fase características de fosfolipídios de extremidade polar e cadeias hidrocarbonadas idênticas e saturadas relacionadas com o número de carbonos presentes em cada cadeia.....	19
Tabela 3.1. Variação da intensidade de luz espalhada ( $I_S$ ), do coeficiente de difusão à diluição infinita ( $D_o$ ), do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), do índice de polidispersão (Poly), do raio de giro ( $R_g$ ) e da relação entre os raios ( $\rho = R_g/R_h$ ) para as diferentes amostras estudadas através do Espalhamento de Luz: vesículas filtradas a 0,45 $\mu\text{m}$ (a), vesículas filtradas a 1,20 $\mu\text{m}$ (b) e vesículas não filtradas (c).....	102
Tabela 3.2. Coeficiente virial dinâmico ( $k_D$ ) obtido por Espalhamento de Luz Dinâmico para amostras de lipossomas e quitossomas com concentração polimérica crescente.....	106
Tabela 3.3. Variação da intensidade de luz espalhada ( $I_S$ ), do coeficiente de difusão à diluição infinita ( $D_o$ ), do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), do índice de polidispersão (Poly), do raio de giro ( $R_g$ ), da relação entre os raios ( $\rho = R_g/R_h$ ), obtidos por Espalhamento de Luz e da distância de repetição das bicamadas fosfolipídicas ( $d$ ), da razão de área entre a curva estendida (2) e o primeiro pico de difração (1) e o número médio de bicamadas fosfolipídicas em vesículas multilamelares ( $\langle N \rangle$ ), obtidos por SAXS, para as diferentes amostras estudadas: vesículas filtradas a 0,45 $\mu\text{m}$ (a), vesículas filtradas a 1,20 $\mu\text{m}$ (b) e vesículas não filtradas (c).....	116
Tabela 3.4. Resultados para diâmetro do núcleo aquoso ( $D_n$ ) e volume aquoso encapsulado ( $V$ ) no núcleo das vesículas filtradas a 0,45 $\mu\text{m}$ em função da concentração de quitosana. Os valores são médios e foram obtidos pela relação entre resultados de Espalhamento de Luz e SAXS.....	122
Tabela 3.5. Valores obtidos para os coeficientes de difusão ( $D$ ) para as diferentes amostras fluorescentes estudadas por FRAP e raios hidrodinâmicos aparentes ( $R_h$ ) para vesículas não fluorescentes (média $\pm$ distribuição) e quitosana não fluorescente obtidos por Espalhamento de Luz Dinâmico.....	147

## Resumo

Lipossomas são vesículas coloidais onde uma membrana formada por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas encapsula um núcleo aquoso. Através do método da evaporação em fase reversa foram produzidos lipossomas nanométricos modificados com a incorporação de quitosana, um polissacarídeo com características vantajosas para o sistema compósito resultante. Lipossomas micrométricos compósitos também foram produzidos através de uma modificação no método da eletroformação de vesículas gigantes a partir de uma emulsão precursora.

Os estudos físico-químicos e estruturais desenvolvidos identificaram uma série de alterações no sistema vesicular geradas pela presença da quitosana sob diferentes condições energéticas e de métodos de padronização estrutural. Lipossomas nanométricos compósitos apresentaram tamanhos, número de bicamadas, distâncias de repetição de bicamadas, coeficiente de difusão em suspensão aquosa, interação com o meio aquoso e volume aquoso encapsulado que variaram com a presença e concentração do polímero e com a utilização ou não de filtração e ultrasonicação na sua preparação. As modificações foram avaliadas considerando aspectos energéticos e de organização molecular.

Com um significativo aumento de temperatura foram obtidas variações estruturais atenuadas nas vesículas compósitas em comparação com vesículas isentas de quitosana. Desta forma foi identificada uma estabilidade física maior como resultado da dissipação de energia térmica devido à presença do polímero.

O potencial superficial e o diferenciado coeficiente de difusão em suspensão aquosa mostraram a incorporação efetiva da quitosana nas estruturas. As alterações de mobilidade do grupo fosfato indicaram interações eletrostáticas entre o polímero e os fosfolipídios.

A modificação do método da eletroformação mostrou a viabilidade de incorporação da quitosana na produção de vesículas micrométricas. A localização do polímero nas vesículas resultantes foi identificada na membrana das estruturas e o mesmo mostrou estabilidade de incorporação. Assim, pôde ser procedida a determinação quantitativa de polímero por unidade de superfície da membrana fosfolipídica das vesículas compósitas que correspondeu a 0,2 mg de quitosana por metro quadrado de área de superfície, considerando os dois lados da membrana fosfolipídica.

## Abstract

Liposomes are colloidal vesicles where a membrane formed by one or more phospholipid bilayers encapsulates an aqueous core. Using the reverse phase evaporation method, modified nanometric liposomes were produced with the incorporation of chitosan, a polysaccharide with profitable characteristics for the resulting composite system. Micrometric composite liposomes were also produced by a modification on the electroformation method used to prepare giant vesicles through the application of a precursor emulsion.

Structural and physico-chemical studies identified a series of alterations in the vesicular system generated by the presence of chitosan under different energetic conditions and methods of structure standardization. Nanometric composite liposomes featured sizes, number of bilayers, repeat distances of bilayers, diffusion coefficient in aqueous suspension, interactions with the aqueous media and encapsulated aqueous volume which varied with the presence and concentration of the polymer and with the application or not of filtration and sonication on the preparation method. The modifications were evaluated considering properties of energy and organization at the molecular level.

Under a considerable increase of temperature, attenuated structural variations were obtained in the composite vesicles in comparison with the vesicles free of chitosan. In this way, a higher physical stability was identified as a result of thermal energy dissipation due to the presence of the polymer.

The superficial potential and the distinguished diffusion coefficient in aqueous suspension showed the effective incorporation of chitosan in the structures. The alteration of the mobility of the phosphate group indicated electrostatic interactions between the polymer and the phospholipids.

The modification of the electroformation method showed the practicable of chitosan incorporation in the production of micrometric vesicles. The localization of the polymer in the resulting vesicles was identified on the membrane of the structures, which showed stability of incorporation. Besides, it was possible to determine the quantity of polymer per unit of phospholipidic membrane surface of the composite vesicles corresponding to 0.2 mg of chitosan per square meter of phospholipids, considering the two sides of the membrane.

## Resumé

Les liposomes sont des objets du monde colloïdal, composés d'une membrane comportant une ou plusieurs bicouches de phospholipides qui encapsule un noyau aqueux. Grâce à la méthodologie de l'évaporation en phase inverse, des liposomes nanométriques modifiés par l'incorporation de chitosane ont été fabriqués. Ce polysaccharide confère des propriétés intéressantes au système composite résultant. Des liposomes composites micrométriques ont également été produits, par une modification de la méthodologie d'électroformation de vésicules géantes, à partir d'une émulsion inverse comme précurseur.

Les études physico-chimiques et structurales que nous avons réalisées ont permis d'identifier de nombreuses altérations dans le système vésiculaire, comme conséquence de la présence du chitosane, mais aussi sur des différentes conditions de transfert d'énergie et d'homogénéisation structurale. Nous avons caractérisé la variation i) de la taille, ii) du nombre de bicouches, iii) de la distance moyenne entre bicouches, iv) du coefficient de diffusion en suspension, v) de l'interaction avec le milieu aqueux et vi) du volume aqueux encapsulé, des liposomes nanométriques composites en fonction des paramètres de préparation suivants : concentration en polymère, utilisation éventuelle de filtration et d'ultrasons. Les modifications observées ont été interprétées en considérant les caractéristiques d'énergie et d'organisation moléculaire.

Nous avons démontré que lors d'une considérable augmentation de température, les importantes variations structurales observées pour les vésicules sans chitosane sont très atténuées dans le cas des vésicules composites. Ainsi, une plus grande stabilité physique a été attribuée aux vésicules composites, comme résultat de la dissipation d'énergie thermique par le polymère incorporé. Les études du potentiel de surface, et du coefficient de diffusion différencié en suspension aqueuse, montrent l'efficacité de l'incorporation du chitosane dans les liposomes. La mesure de l'altération de mobilité du groupe phosphate indique l'existence d'interactions électrostatiques entre le polymère et les phospholipides.

Nous avons ainsi prouvé la viabilité de l'incorporation de chitosane dans des vésicules micrométriques au moyen d'une méthode d'électroformation modifiée. Nous avons pu localiser le polymère sur la membrane de ces structures, et nous avons montré leur grande stabilité temporelle. Nous avons enfin déterminé de façon quantitative la densité de surface de polymère sur les membranes de phospholipide dans ces vésicules composites.

# Capítulo 1. Introdução

## 1.1. Considerações Preliminares

Os sistemas vesiculares representam uma vasta área de estudos multidisciplinares que têm produzido conceitos fundamentais na interface entre a Física, a Química e a Biologia que muitas vezes resultam em aplicações na Farmácia, Medicina e Engenharias. Cada sistema vesicular é único e deve ser descrito quanto às suas propriedades físicas e estruturais, dentro de situações específicas e através de parâmetros definidos e razoavelmente controlados, objetivando um desempenho adequado sob condições pré-estabelecidas.

Os estudos físico-químicos e estruturais desenvolvidos na presente tese, têm como objetivo principal o desenvolvimento de um sistema vesicular específico no qual a introdução de um polímero de propriedades conhecidas proporciona características diferenciadas e que podem ser vantajosas em determinadas condições ambientais de aplicação. O sistema vesicular, definido como lipossoma, é estruturalmente constituído de fosfolipídios e foi aqui estudado em suspensão aquosa. O polímero quitosana, um polissacarídeo que tem atraído um interesse crescente especialmente em sistemas aplicáveis nas áreas de Farmácia e Medicina, foi incorporado em lipossomas na produção de um sistema vesicular composto polímero-fosfolipídio, aqui nomeado como quitossoma. A incorporação do polímero foi efetivada através de uma metodologia peculiar e os efeitos resultantes dessa incorporação foram investigados através de uma diferenciada gama de técnicas experimentais, relevantes para os estudos físico-químicos e estruturais.

Nas Sessões subseqüentes do Capítulo 1, através da revisão bibliográfica, são introduzidas as definições do sistema vesicular em questão com a descrição de variáveis estruturais pertinentes. Um breve histórico também resume o estado da arte desse tipo de sistema desde a sua descoberta e evolução até os dias atuais.

A partir de um contexto mais fundamental, a composição molecular e estrutural é detalhada visando a compreensão do sistema na sua organização molecular. As diferentes interações moleculares são relacionadas com aspectos físico-químicos na interpretação da estruturação energeticamente mais favorecida, bem como na avaliação de parâmetros de estabilidade.

A dinâmica molecular inerente ao sistema fosfolipídico, representado pelos lipossomas, é considerada através de diferentes fenômenos de difusão. Os processos de transição de fase, típicos de sistemas lipídicos, são descritos em função dos fatores moleculares e energéticos que resultam em conformações características das diferentes mesofases. A importância científica e tecnológica dos lipossomas é descrita para diversas áreas, evidenciando o potencial aplicativo destes sistemas vesiculares.

De forma paralela, também é apresentada uma revisão bibliográfica da quitosana, bem como do seu polímero precursor, a quitina. Aspectos importantes como origem, propriedades físicas e estruturais e solubilidade são considerados. Igualmente é descrita a importância científica e tecnológica com a variada gama de aplicações.

A incorporação da quitosana em lipossomas vem sendo desenvolvida na pesquisa há alguns anos. Diferentes formas dessa incorporação são descritas juntamente com resultados promissores de potenciais de aplicação apresentados na literatura.

No Capítulo 2 são descritas as metodologias, materiais e equipamentos utilizados em todos os procedimentos experimentais efetuados, bem como as fundamentações das técnicas empregadas para os diversos estudos desenvolvidos. A modificação de uma metodologia de preparação de um tipo específico de vesícula foi desenvolvida para proporcionar a incorporação da quitosana e as etapas envolvidas são detalhadas.

No Capítulo 3, nos resultados e discussões, são avaliados primeiramente aspectos estruturais das vesículas a partir dos dados obtidos pelas técnicas de Espalhamento de Luz, Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo, Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Transmissão. Os resultados das diferentes técnicas são inter-relacionados para a proposição de um modelo supramolecular dos sistemas.

As transições de fase, que qualificam propriedades físico-químicas e estruturais de sistemas vesiculares sob variação de condições energéticas, são discutidas a partir dos parâmetros e resultados de Espalhamento de Luz Estático e Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo. Os resultados das duas técnicas também são relacionados na avaliação das diferenças ocasionadas no sistema pela presença da quitosana.

A dinâmica resultante da composição molecular e organização supramolecular é relacionada com a estabilidade física dos sistemas e juntamente com a avaliação da localização da quitosana nas vesículas compósitas, a interação molecular entre fosfolipídios e quitosana é discutida. Nestas questões, os resultados produzidos pelas técnicas de Potencial

Zeta, Recuperação de Fluorescência Após Foto-Branqueamento e Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo mostram-se significativamente produtivas.

Nos estudos com vesículas gigantes, observáveis com microscópio óptico, é feita a avaliação da modificação do seu processo de formação aqui proposto. Por meio da Microscopia Óptica de Fluorescência é procedida a localização, a quantificação e o estudo da estabilidade física da quitosana nas estruturas compósitas.

A avaliação de aspectos aplicativos é procedida a partir de perspectivas geradas das investigações na presente Tese e igualmente de resultados preliminares gerados por estudos *in vitro* e *in vivo*.

Por fim, no Capítulo 4, são relatadas as conclusões principais resultantes de cada tópico específico. A abordagem remete aos objetivos de forma que o sistema vesicular compósito é avaliado em diversos aspectos da sua físico-química e estruturação em função das modificações resultantes da incorporação da quitosana.

## **1.2. Lipossomas**

Lipossomas são vesículas lipídicas coloidais organizadas por interações de polaridade e apolaridade. As estruturas mais conhecidas, como ilustradas na Figura 1.1, consistem em uma membrana formada por uma dupla camada de fosfolípidios, moléculas que apresentam uma ou duas longas cadeias hidrocarbonadas apolares ligadas a uma extremidade polar contendo um grupo fosfato. As cadeias apolares das moléculas das duas camadas interagem entre si. Desta forma, as moléculas das duas camadas ficam posicionadas de forma invertida com as extremidades polares voltadas para fora nos dois lados da membrana. Esta membrana ou lamela, por sua vez, forma uma esfera que normalmente contém um líquido polar no seu interior e que pode ser o mesmo líquido onde a esfera está dispersa. Os tamanhos dos lipossomas podem variar dentro de uma relativa ampla faixa de dimensões: de algumas dezenas de nanômetros a algumas centenas de micrômetros.<sup>1,2</sup>

Existe uma gama variada de lipossomas no que concerne à sua composição molecular, estruturação e tamanhos. Lipossomas clássicos ou convencionais, formados apenas por uma ou por mais de uma membrana fosfolipídica, são diferenciados de acordo com seus tamanhos, morfologias, número e disposição das bicamadas fosfolipídicas. Os lipossomas mais comumente produzidos são distinguidos pelas seguintes categorias.<sup>2-4</sup>

- a. Lipossomas unilamelares pequenos (*Small Unilamellar Vesicles* – SUVs): a membrana é formada por uma única bicamada fosfolipídica; são os menores na escala de tamanhos, com diâmetros variando entre 20 e 80 nm.
- b. Lipossomas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles* – LUVs): a membrana é formada por uma única bicamada fosfolipídica; são intermediários na escala de tamanhos, com diâmetros variando entre 80 nm e 1  $\mu\text{m}$ .
- c. Lipossomas multilamelares (*Multilamellar Vesicles* – MLVs): a membrana é formada por várias bicamadas fosfolipídicas dispostas de forma concêntrica; apresentam um diâmetro médio que varia entre 400 nm e alguns micrômetros.
- d. Lipossomas multivesiculares (*Multivesicular Liposomes* – MVLs): de certa forma semelhantes aos MLVs, porém as bicamadas não são concêntricas, o que torna a vesícula uma estrutura mais complexa, com um lipossoma que contém vários lipossomas encapsulados de forma aleatória e inclusive com membranas bastante curvadas ou deformadas; também podem ser chamados de sistemas de vesícula em vesícula e normalmente são estruturas mal formadas nos processos de obtenção dos outros tipos; a faixa de diâmetros também varia como para MLVs, entre 400 nm e alguns micrômetros.
- e. Lipossomas gigantes (*Giant Vesicles* – GVs): normalmente são formados por uma única bicamada fosfolipídica sendo assim designados como lipossomas unilamelares gigantes (*Giant Unilamellar Vesicles* – GUVs); são os maiores com diâmetros superiores a 1  $\mu\text{m}$  podendo chegar a dezenas de micrômetros.

O processo de preparação de lipossomas é crucial para delinear o tipo de estrutura a ser obtida. Na preparação clássica,<sup>5</sup> a qual continua sendo a mais difundida na literatura, os fosfolipídios são dissolvidos num solvente orgânico dentro de um balão de vidro. O solvente é evaporado sob rotação constante do balão de forma a produzir um filme fino de fosfolipídios na parede interna do balão. A seguir, adiciona-se água ou tampão para hidratação do filme. Agitação, ultra-agitação, sonicação e aquecimento podem ser aplicados nessa etapa para auxiliar no processo de formação das duplas camadas que irão se auto-organizar nos lipossomas encapsulando a água ou o tampão no seu interior. Este processo de preparação é designado como método da hidratação do filme.



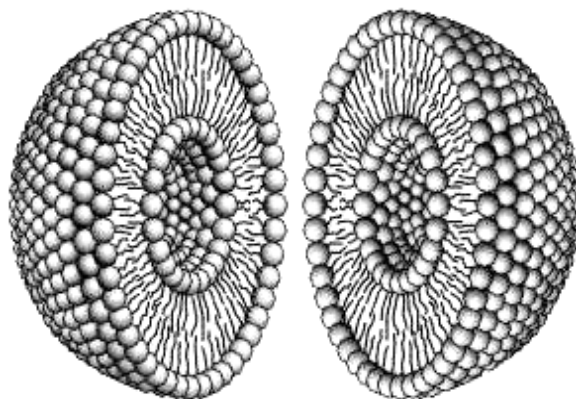


Figura 1.1. Representação de um lipossoma dividido ao meio para evidenciar a sua estrutura interna constituída de um núcleo polar cercado por uma bicamada de fosfolípidios.

Normalmente os lipossomas obtidos por esse processo clássico são malformados e apresentam uma enorme variação de tamanhos, parâmetros que limitam a sua aplicação tanto na pesquisa como na indústria. Assim, após a preparação, os lipossomas podem ser submetidos a tratamentos como agitação, ultra-agitação, sonicação, filtração, extrusão e diálise, para a sua homogeneização estrutural.<sup>1-4</sup>

Porém, uma diferenciada gama de processos de preparação tem sido desenvolvida para otimização estrutural, capacidade de encapsulamento e retenção de material encapsulado, rendimento e adaptação ao escalonamento.<sup>2</sup> A maioria desses processos é específica para a produção de lipossomas de características peculiares e podem ser facilmente encontrados na literatura. Alguns dos mais importantes já foram descritos na Dissertação de Mestrado do mesmo autor.<sup>3</sup> Aqui será tratada a evaporação em fase reversa (Sessão 2.2.1) desenvolvida por Szoka e Papahadjopoulos em 1978 para a obtenção de lipossomas unilamelares grandes com alta capacidade de encapsulamento de substâncias hidrofílicas.<sup>6</sup> O processo foi adaptado para a incorporação de quitosana nos trabalhos da Dissertação e da presente Tese.<sup>3,7</sup>

A eletroformação, metodologia desenvolvida por Angelova e Dimitrov em 1986 para a produção de lipossomas unilamelares gigantes,<sup>8</sup> também será abordada (Sessão 2.9.1), sendo que a mesma foi aperfeiçoada para a incorporação de quitosana (Sessão 2.9.2).

### 1.2.1. Breve Histórico

Em meados de 1965 Alec Bangham e colaboradores publicaram os resultados de uma investigação fundamental a respeito da difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais.<sup>5</sup> Neste trabalho foi caracterizado um sistema de vesículas fosfolipídicas que três anos mais tarde foram denominadas de lipossomas, embora estas estruturas multilamelares obtidas da hidratação de fosfolipídios já fossem conhecidas como “figuras de mielina”.<sup>9,10</sup>

Nos anos seguintes os lipossomas passaram a assumir um sistema modelar simples para o estudo de membranas biológicas. A incorporação de enzimas em lipossomas<sup>11</sup> despertou o interesse da comunidade científica para fins de aplicação médica e farmacológica.

Com o objetivo de desenvolver um sistema eficaz para o encapsulamento e transporte de fármacos, o que já vinha sendo idealizado há muitos anos, Gregory Gregoriadis propôs em 1971 a utilização de lipossomas com essa finalidade.<sup>12</sup> Seguiu-se uma euforia na década de 70 e início da década de 80, devido ao potencial de aplicação dos lipossomas na indústria farmacêutica, o que resultou em questionamentos e mesmo dúvidas a respeito de alguns resultados da época.<sup>10,13</sup>

Nos anos seguintes foram surgindo sistemas variados, complexos e de alta especificidade para aplicação como carreadores de fármacos. Alguns exemplos: nanopartículas poliméricas, co-polímeros, lipoproteínas, emulsões, peptídeos e anticorpos.<sup>14-18</sup> Os lipossomas seguiram a mesma tendência de aumento da sua especificidade para a aplicação com um objetivo pré-estabelecido, o que significa dizer que o *design* estrutural, físico-químico e molecular tornou-se diretamente dependente do desempenho esperado num meio de ação específico.

Grandes centros de pesquisa dedicados ao desenvolvimento de lipossomas carreadores de fármacos surgiram especialmente nos Estados Unidos, tendo amplos subsídios governamentais e principalmente o patrocínio da indústria farmacêutica.<sup>19</sup> Através da pesquisa direcionada, o mundo viu nascer os primeiros lipossomas comerciais de eficácia comprovada e com aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA). Os exemplos clássicos são o Doxil® (carreador do agente anti-cancerígeno doxorubicina, utilizado no tratamento do sarcoma de Kaposi e câncer ovariano, no mercado desde 1995), Daunoxome® (carreador do anti-cancerígeno citrato de daunorubicina para tratamento quimioterápico do

sarcoma de Kaposi em pacientes de baixa imunidade, no mercado desde 1996) e Ambisome® (para tratamento de infecções causadas por fungos, no mercado desde 1990). Estes lipossomas específicos atingiram os objetivos de otimização do tratamento com drástica ou mesmo total eliminação dos efeitos colaterais relacionados com a administração do fármaco.<sup>19-25</sup>

Paralelamente, a pesquisa fundamental lançou mão de lipossomas como um sistema modelo de alta potencialidade para estudos de interações moleculares, de membranas celulares, de fotosínteses, de catálise, transições de fase de lipídios e muitos outros como detalhado na Sessão 1.2.4.<sup>26-35</sup> A pesquisa básica, tendo sua importância fundamental na compreensão fenomenológica e no desenvolvimento de qualquer produto ou metodologia, foi e sempre será a ferramenta necessária para abrir caminhos e proporcionar soluções em todas as áreas do conhecimento.

### 1.2.2. Composições Molecular e Estrutural

De forma geral as moléculas podem ser divididas em polares ou apolares considerando a sua simetria e a distribuição das suas nuvens eletrônicas. Algumas moléculas, porém, são constituídas de uma região polar e uma região apolar na mesma estrutura, ligadas de forma covalente. Estas últimas são chamadas de moléculas anfifílicas e justamente devido a esta característica elas apresentam a propriedade de auto-organização produzindo diferentes estruturas em solventes ou soluções. No processo auto-associativo a orientação das moléculas evidentemente obedece ao estado de menor energia termodinâmica: as regiões polares em contato com regiões polares e meio polar e as regiões apolares com as apolares e meio apolar. Representando uma molécula anfifílica numa configuração de círculo (parte polar) com cauda (parte apolar), a Figura 1.2 exemplifica distintas organizações estruturais de moléculas anfifílicas e as suas respectivas nomenclaturas.<sup>2,4,19</sup>

A simetria da auto-organização está relacionada com a forma da molécula anfifílica. Assim, definindo a área da região polar como  $A_p$  e a da região apolar como  $A_{ap}$ , em situações onde  $A_p > A_{ap}$  a formação de estruturas de alta curvatura, tais como micelas, é favorecida. Para áreas semelhantes, com  $A_p \cong A_{ap}$ , a organização em bicamadas ou lamelas é mais provável. Quando  $A_p < A_{ap}$ , micelas inversas são mais favorecidas. A Figura 1.3 ilustra como a geometria molecular pode influenciar a simetria da organização molecular.<sup>19</sup>

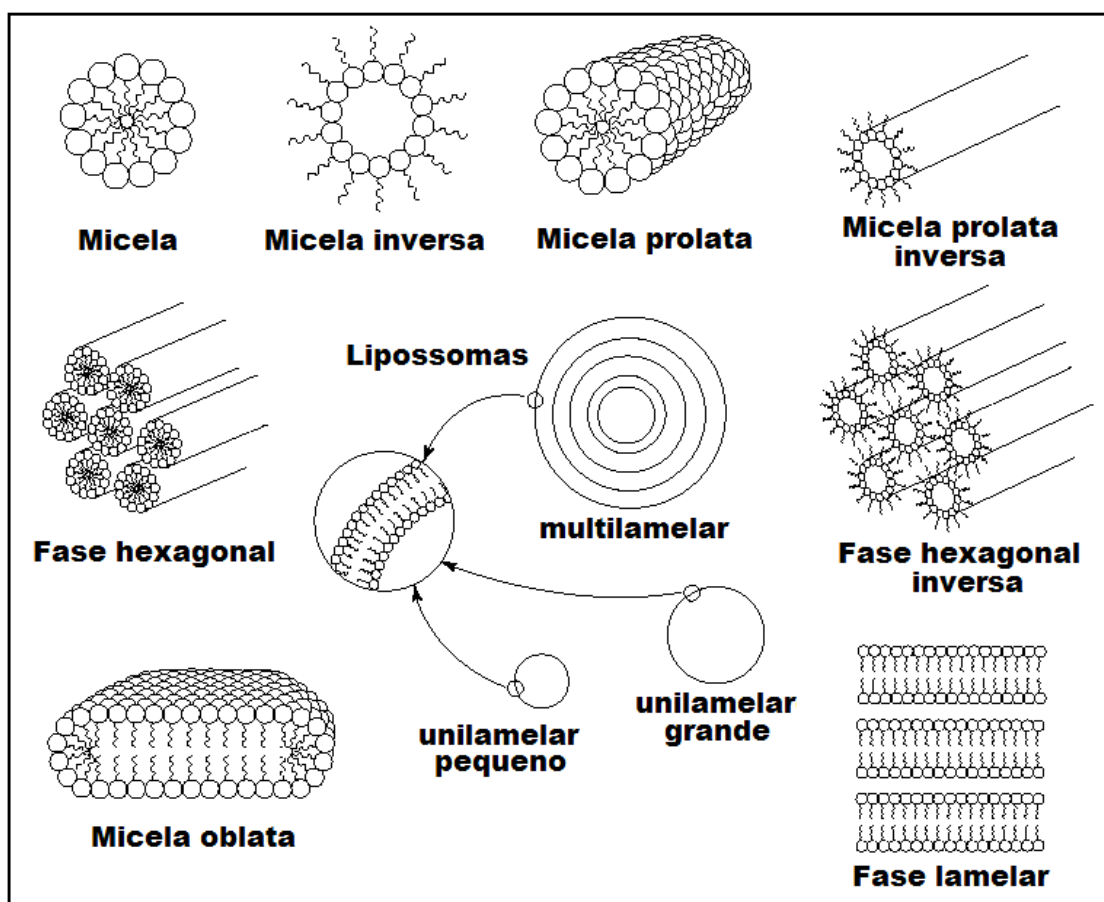


Figura 1.2. Representação de diferentes organizações estruturais de moléculas anfifílicas e as suas respectivas nomenclaturas.<sup>2,4,19</sup>

As moléculas anfifílicas mais comuns que se organizam em bicamadas ou lamelas são os fosfolípídios de duas cadeias hidrocarbonadas. Um fosfolípídio comum, como apresentado na Figura 1.4, apresenta duas moléculas de ácido graxo esterificadas ao primeiro e ao segundo grupo hidroxila do glicerol. O terceiro grupo hidroxila do glicerol forma uma ligação éster com o ácido fosfórico. Os fosfoglicerídios ainda contêm um segundo álcool esterificado ao ácido fosfórico formando assim a parte polar da molécula. Na Figura 1.4.a é apresentada a estrutura da dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), onde a região polar é formada pelo grupo alcoólico colina ( $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) e as cadeias hidrocarbonadas por dois ácidos palmíticos (cadeia acíclica de 16 carbonos).

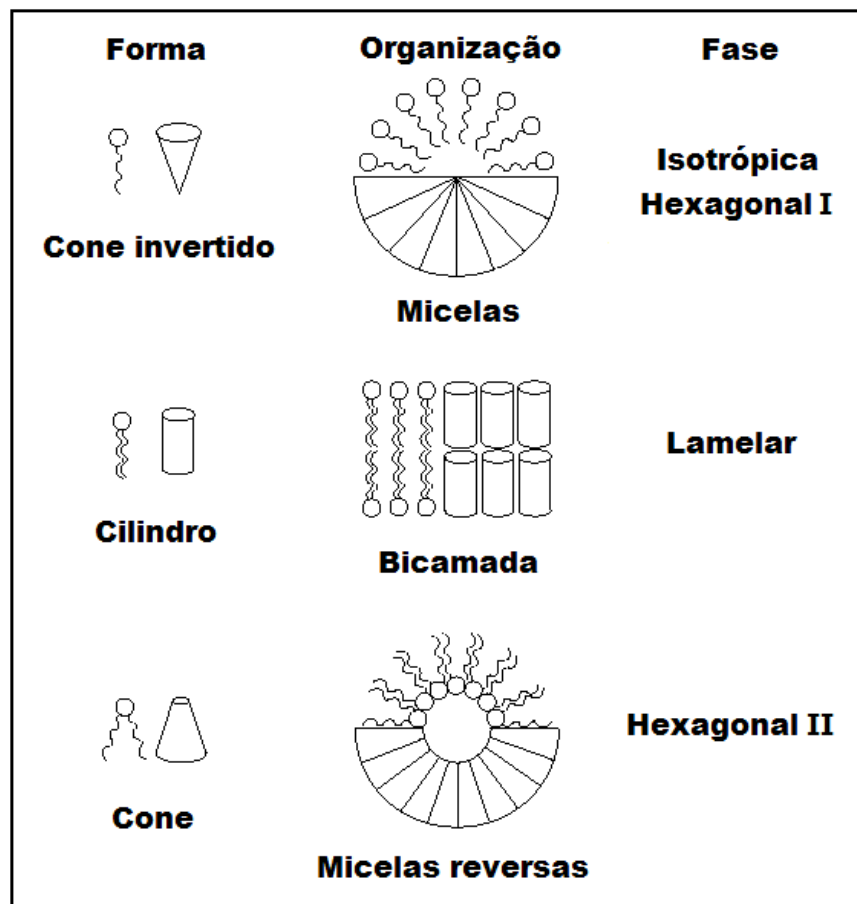


Figura 1.3. Representação de possíveis formas de moléculas anfifílicas relacionadas com a simetria da organização estrutural e respectivas fases mais prováveis de estruturas coloidais.<sup>19</sup>

A classificação dos fosfolipídios está relacionada com aspectos estruturais dos grupos polares e das cadeias acílicas. Os grupos polares podem ser zwitteriônicos (nêutros) ou carregados. A fosfatidilcolina apresentada na Figura 1.4.a é um fosfolipídio zwitteriônico, pois o grupo fosfato tem carga negativa em pH 7 e o grupo colina é carregado positivamente. Em fosfolipídios carregados, a região polar possui uma única carga, como exemplificado na Figura 1.4.b com o dioleoil fosfatidilglicerol (DOPG). Já na região apolar, as cadeias hidrocarbonadas variam pelo número de carbonos e pelo grau de saturação. Com a variação desses parâmetros estruturais são obtidas bicamadas que constituem membranas sintéticas ou biológicas de fluidez e características específicas ajustadas de acordo com a sua designada função.<sup>2,4</sup>

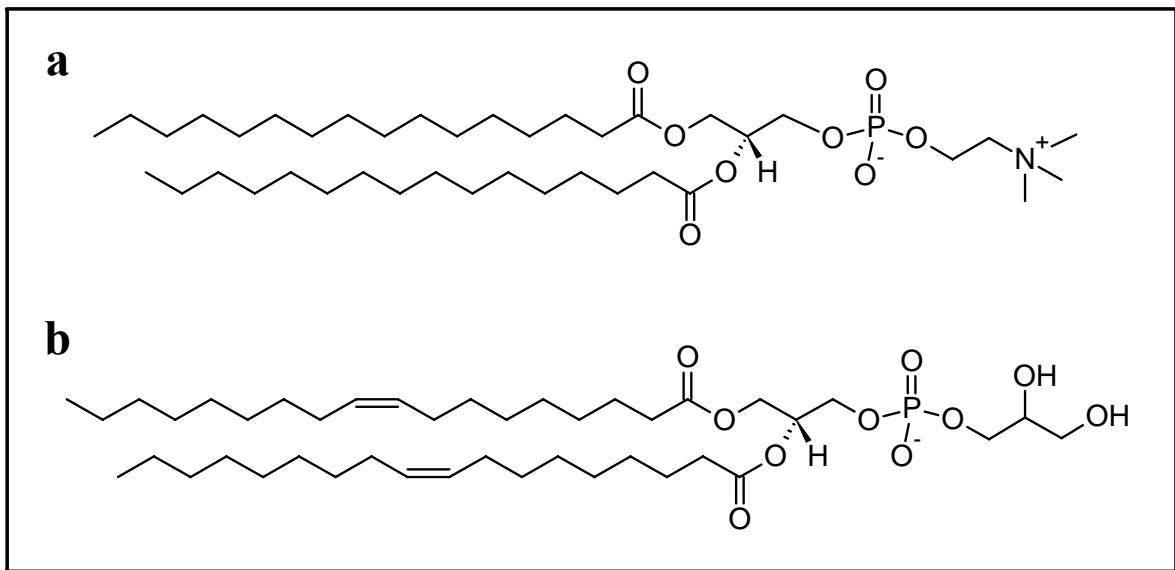


Figura 1.4. Estruturas moleculares da 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC) (a) e do 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (DOPG) (b).

O modelo clássico de membrana biológica formada por bicamada de fosfolípidios é a membrana celular, chamada de modelo do mosaico fluido devido à sua composição fosfolípídica de alta fluidez incrustada de grupos funcionais como as proteínas.<sup>36</sup> Os esforços da biologia no sentido de compreender as paredes celulares contribuíram de maneira determinante para a compreensão moderna de membranas auto-associadas.

Para a formação das membranas ou bicamadas fosfolípídicas, considerando um meio aquoso, as interações de polaridade e apolaridade apresentam as suas peculiaridades. Interações polares ocorrem entre as partes polares das moléculas com o meio polar formando ligações de hidrogênio com a água, o que pode ser denominado como interação hidrofílica. As partes polares também interagem entre si por atração eletrostática bem como através de ligações de hidrogênio, no sentido de estabilizar a estrutura da membrana.<sup>1,2,19,37</sup>

Porém a formação das membranas é governada principalmente pelas interações apolares entre as cadeias hidrocarbonadas, que podem ser designadas como interações hidrofóbicas num meio aquoso. Quando os fosfolípidios são colocados na água, o fenômeno da auto-associação acontece principalmente devido ao vigor das ligações de hidrogênio da água que devem ser rompidas para proporcionar a dissolução de alguma molécula. Em se tratando de um soluto iônico ou polar, ocorrem ligações fortes do mesmo com as moléculas

de água e que são energeticamente favoráveis para romper as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. Por outro lado, em se tratando de moléculas apolares, não existe compensação energética para o rompimento das ligações de hidrogênio da água. Assim, a chamada interação hidrofóbica, que proporciona a auto-associação das bicamadas fosfolipídicas, é governada pelo favorecimento energético da manutenção das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água, ou seja, no estado de menor energia as regiões apolares permanecem unidas para proporcionar uma menor superfície de contato destas regiões com as moléculas de água.<sup>37,38</sup>

De menor importância devido à sua natureza de ligação fraca são as forças de van der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas. Embora fracas, elas também contribuem de maneira significativa devido à grande quantidade de interações desse tipo que se formam no sistema, especialmente pelo elevado número de metilas das cadeias apolares.<sup>37,38</sup>

Teoricamente, na termodinâmica da interação hidrofóbica, a energia livre de transferência  $\Delta G_{tr}$  de um composto apolar a partir de um estado de referência, como um solvente orgânico, para a água, é composta de um termo de entalpia  $\Delta H_{tr}$  e de um termo de entropia  $-T\Delta S$ :

$$\Delta G_{tr} = \Delta H_{tr} - T\Delta S \quad (1.1)$$

Na temperatura ambiente a entalpia de transferência é desprezível, pois a entalpia de interação é equivalente na solução orgânica e na solução aquosa. A variação de entropia, entretanto, é negativa. A água tende a organizar os grupos apolares em compartimentos ordenados o que leva a uma diminuição da entropia. Por outro lado, em temperatura elevada (acima de 100 °C) estes compartimentos podem ser rompidos porque a matriz formada pelas ligações de hidrogênio não é mais estável e assim a contribuição da entropia tende a zero. A entalpia de transferência, porém, é positiva neste caso (desfavorável).<sup>37,38</sup>

No processo de auto-associação de bicamadas fosfolipídicas num sistema aquoso, as estruturas resultantes termodinamicamente mais favorecidas são os lipossomas, onde as bicamadas formam esferas nano ou micrométricas. As esferas habitam no meio aquoso e possuem o mesmo meio aquoso encapsulado no seu núcleo. Embora muitos autores sustentem que lipossomas podem ser obtidos de forma espontânea pela hidratação de lipídios, na prática poucas estruturas são formadas sem a transferência de alguma energia significativa. De fato, lipossomas não representam estruturas termodinamicamente estáveis,

assim não podem ser obtidas de forma espontânea. A curvatura da membrana, necessária para que a estrutura assumira a forma esférica, necessita de energia para ser viabilizada. Portanto, para a produção de lipossomas alguma energia, seja ela térmica ou mecânica por meio de aquecimento, agitação, sonicação ou extrusão, deve ser fornecida ao sistema.<sup>1,19</sup>

Por outro lado, após a formação, os lipossomas são considerados cineticamente estáveis apesar da sua baixa estabilidade termodinâmica. Isso pode ser interpretado considerando que a energia necessária para abrir um orifício na membrana do lipossoma, suficiente para romper ou desestruturar a membrana, seria maior do que a energia despendida para manter a estrutura esférica.<sup>1,19</sup>

A estabilidade de lipossomas pode ser dividida em estabilidade física, química e biológica, sendo que todas elas estão relacionadas. Do ponto de vista industrial, para a obtenção de produtos farmacêuticos e cosméticos, as estabilidades física e química são delineadas pela uniformidade de distribuição de tamanhos (baixo índice de polidispersão de tamanho de vesículas), eficiência de encapsulamento e degradação mínima de todos os compostos. Pela otimização da distribuição de tamanhos, ajustes de pH e força iônica, bem como a adição de anti-oxidantes e agentes de gelificação, formulações em suspensão líquida de lipossomas podem ser estabilizadas por vários anos. Mais além, a adição de crioprotetores permite a liofilização de lipossomas (processo de congelamento brusco seguido de sublimação do líquido de suspensão e recuperação de lipossomas em pó) e o seu armazenamento em temperaturas baixas.<sup>19,39-41</sup>

A estabilidade biológica, porém, depende de fatores mais complexos, pois está relacionada com a presença de agentes que interagem com os lipossomas no seu meio de aplicação. Para situações de aplicação *in vivo*, por exemplo, a estabilidade biológica também depende da forma como os lipossomas são administrados.<sup>19,41</sup>

Problemas de instabilidade coloidal, como fenômenos de agregação, podem ser resolvidos pela adição de cargas (uso de fosfolípidios carregados) ou modificações na força iônica do meio de dispersão. De forma alternativa, a estabilização estérica com o uso de moléculas quimicamente ligadas ou que interagem com a superfície do lipossoma tem-se mostrado significativamente vantajosa. Desta forma, tanto a estabilidade coloidal ou em suspensão, como a estabilidade biológica, foram drasticamente modificadas pelo revestimento dos lipossomas com polímeros inertes e hidrofílicos.<sup>1,19,42,43</sup>



Especificamente para lipossomas designados para aplicações intravenosas, a estabilização estérica com o uso de polímeros tornou-se crucial para a produção de lipossomas de prolongada circulação sanguínea. A estabilização estérica confere a propriedade de extravasar os sistemas de defesa do organismo como as células do sistema fagocitário mononuclear, responsáveis pela captação e transporte até o fígado e baço para eliminação de qualquer substância estranha na corrente sanguínea. Tais lipossomas são designados como lipossomas furtivos ou de longa circulação.<sup>19,43,44</sup>

O lipossoma furtivo mais desenvolvido possui o polímero poli(etilenoglicol) (PEG) revestindo as esferas. As cadeias hidratadas de PEG criam uma barreira retardando a absorção de opsinas, que são reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear.<sup>19,44,45</sup>

No caso de revestimento polimérico, a estabilidade desejada depende da densidade da cadeia polimérica ou a distância entre os pontos de ligação de uma cadeia polimérica com a membrana do lipossoma ( $D$ ) e do grau de polimerização ( $N$ ). Assim, a espessura do revestimento polimérico ( $E$ ) pode ser calculada:

$$E = DN (f / D)^{3/5} \quad (1.2)$$

onde  $f$  representa o tamanho do monômero.<sup>19,46,47</sup> Resultados de pesquisa demonstram que um revestimento polimérico com espessura aproximada de 10% do diâmetro da partícula representa boa estabilidade.<sup>44</sup>

Além dos lipossomas furtivos, muitas outras variáveis surgiram e estão sob investigação e desenvolvimento: os imunolipossomas, que possuem ligantes específicos na superfície externa, como anticorpos que interagem com células de determinados tecidos; lipossomas fusogênicos, compostos de lipídios catiônicos que podem condensar moléculas de DNA e aumentar a transfecção de gens; magnetolipossomas, os quais encapsulam um ferro fluído coloidal permitindo que as estruturas sejam orientadas a pontos específicos pela ação de um campo magnético; lipossomas elásticos, compostos de fosfolipídios e surfactantes que proporcionam alta elasticidade e deformabilidade na estrutura; quitossomas, revestidos com o polímero quitosana que lhes confere propriedades específicas, descritas na Sessão 1.4.<sup>3,7,48-58</sup>

### 1.2.3. Dinâmica Molecular e Transições de Fase

Para o estudo físico-químico de lipossomas, a compreensão de fenômenos físico-estruturais inerentes à bicamada fosfolipídica são de suma importância. A bicamada fosfolipídica, seja ela de uma membrana celular ou produzida artificialmente no caso de lipossomas, constitui uma estrutura dinâmica passível de sofrer deformações, de abrir e fechar poros, de sofrer fusões e permitir o deslocamento lateral de seu material estrutural. A fluidez da bicamada é delineada por diferentes tipos de movimentos moleculares:<sup>4,59</sup>

a. Difusão lateral: as moléculas da bicamada, os fosfolipídios, se deslocam de forma aleatória dentro da camada em que estão localizadas; esta é a forma de difusão que requer a menor energia para acontecer, sendo assim a mais freqüente; coeficientes de difusão lateral considerados de longa distância podem ser estudados com técnicas como a Recuperação de Fluorescência Após Foto-branqueamento (FRAP) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) utilizando-se fosfolipídios marcados (fluorescentes ou modificados quimicamente) e valores comuns para esse coeficiente encontram-se na ordem de  $10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ; coeficientes de difusão lateral de curta distância podem ser obtidos por técnicas empregando espalhamento de nêutrons.

b. Difusão rotacional: os fosfolipídios, dentro da sua monocamada, giram em relação a eles mesmos; os coeficientes de difusão rotacionais mais comuns encontram-se na ordem de  $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ .

c. Movimento *flip-flop*: os fosfolipídios passam de uma monocamada para outra monocamada; o movimento de *flip-flop* é muito raro e pode levar até vários dias para se concluir; o mesmo necessita da passagem da região polar do fosfolipídio através da região apolar da bicamada o que à primeira vista parece impossível, porém o fenômeno existe e o mesmo pode configurar até certo ponto a simetria da distribuição dos fosfolipídios entre as duas camadas da bicamada; o processo ocorre na ordem de  $10^{-8} \text{ s}^{-1}$ ; nas membranas celulares as proteínas podem estimular este movimento.

d. Flexão das cadeias hidrocarbonadas dos fosfolipídios.

A importância e freqüência de todos estes movimentos estão relacionadas com a forma estrutural da molécula fosfolipídica. O comprimento das cadeias hidrocarbonadas bem como o grau de insaturação são as características mais importantes. Cadeias curtas interagem menos entre elas do que cadeias longas. Ligações duplas em configuração *cis* possuem um

alto impedimento estérico. De forma geral, a fluidez da membrana aumenta com o aumento da quantidade de ligações duplas. Assim, determinadas bicamadas com alto grau de insaturação nas cadeias hidrocarbonadas podem apresentar alta fluidez mesmo em temperaturas reduzidas.

A temperatura também constitui um fator importante a ser considerado. A temperatura baixa limita os movimentos moleculares e como conseqüência a fluidez da bicamada é reduzida. As bicamadas fosfolipídicas apresentam transições de fase que estão relacionadas com a temperatura e pressão externa. Uma transição de fase é caracterizada pela mudança conformacional das cadeias hidrocarbonadas. Os grupos metileno podem assumir diferentes conformações devido às rotações das ligações C-C resultantes de variações de temperatura e pressão.<sup>37,60</sup>

Considerando a isomeria conformacional das cadeias, as conformações *anti*, de menor energia prevalecem em relação às *syn*, de maior energia. Para a efetivação de uma rotação de um grupo CH<sub>2</sub> em torno da ligação C-C, a energia da molécula deve ser alterada. As interações independentes de ligação, como as interações entre os hidrogênios ligados aos átomos de carbono, devem ser vencidas, ou seja, uma energia maior do que a energia envolvida nessas interações deve ser fornecida para que ocorra a rotação em torno da ligação.

Quando a temperatura do sistema é baixa, existe maior probabilidade de encontrar as cadeias na conformação de menor energia, *anti*. Com o aumento da temperatura, ou seja, com o fornecimento de energia, aumenta a probabilidade de ocorrência de rotações em torno das ligações C-C. Porém, as interações entre as cadeias hidrocarbonadas, discutidas na Sessão 1.2.2, impedirão grandes mudanças de conformação de *anti* para *syn* até uma temperatura suficientemente alta onde o fornecimento de energia seja suficiente para uma transição de fase cooperativa. Essa temperatura efetiva de transição de fase depende de vários fatores:<sup>37,60</sup>

a. Tamanho das cadeias hidrocarbonadas: as cadeias mais longas interagem mais fortemente entre si, necessitando portanto de maior energia para uma transição.

b. Grau de saturação das cadeias hidrocarbonadas: cadeias saturadas são mais organizadas e interagem mais; cadeias insaturadas de origem natural não apresentam um ordenamento muito compacto devido às dobras nas cadeias nos pontos de insaturação produzindo bicamadas mais fluídas e de menor resistência à transição de fase; assim, quanto

maior o grau de insaturação das cadeias, menor será a temperatura de transição de fase da bicamada.

c. Natureza do grupo polar: as interações entre os grupos polares dos fosfolipídios dependem da geometria e das cargas; quanto maior a interação entre esses grupos, o que acontece por exemplo entre grupos zwitteriônicos, maior a temperatura de transição de fase.

d. Grau de hidratação do grupo polar: moléculas de água formando ligações de hidrogênio com os grupos polares podem diminuir a interação entre os grupos polares, reduzindo assim a temperatura de transição de fase.

e. Composição: a presença de compostos misturados aos fosfolipídios confere alterações de organização e de interações moleculares na bicamada; determinados compostos podem fornecer uma blindagem entre os grupos polares reduzindo a temperatura de transição; outros podem formar altas energias de interação com os fosfolipídios promovendo um aumento na temperatura de transição de fase.

f. Força iônica do meio: a presença de íons no meio de dispersão também pode agir sobre os grupos polares aumentando ou diminuindo as interações entre os grupos e alterando assim a temperatura de transição de fase; cada situação vai apresentar suas peculiaridades.

As bicamadas fosfolipídicas, mais comumente denominadas de lamelas, apresentam diferentes fases lamelares ou mesofases. A transição de uma fase para outra necessita de energia e depende de fatores como os acima discutidos. A nomenclatura utilizada para distinguir as diferentes fases está bem estabelecida na literatura. A simbologia representativa de cada fase é composta de uma letra maiúscula seguida de mais uma letra. As letras maiúsculas caracterizam o tipo de ordenamento a longo alcance, ou seja, a estrutura a baixo ângulo com dimensões de algumas dezenas de ângstroms formada pelos planos que contém as regiões polares. Assim temos:<sup>60-61</sup>

L: fase lamelar, em uma dimensão;

P: fase oblíqua ou centrada, em duas dimensões.

A segunda letra significa o estado conformacional das cadeias hidrocarbonadas:

c,  $\beta$  e  $\beta'$ : parcialmente ordenado;

$\alpha$ : líquido-cristalino ou altamente desordenado.

A Figura 1.5 representa as diferentes mesofases juntamente com suas respectivas simbologias e nomenclaturas. A dependência do aumento do fornecimento de energia externa

necessária para que uma mesofase se transforme em outra, ou seja, para que ocorra uma transição de fase, está indicada pelo caminho das flechas. A variação da espessura da distância de repetição da bicamada lamelar ( $d$ ), também está representada e a mesma se modifica ao longo do processo de transições de fases.

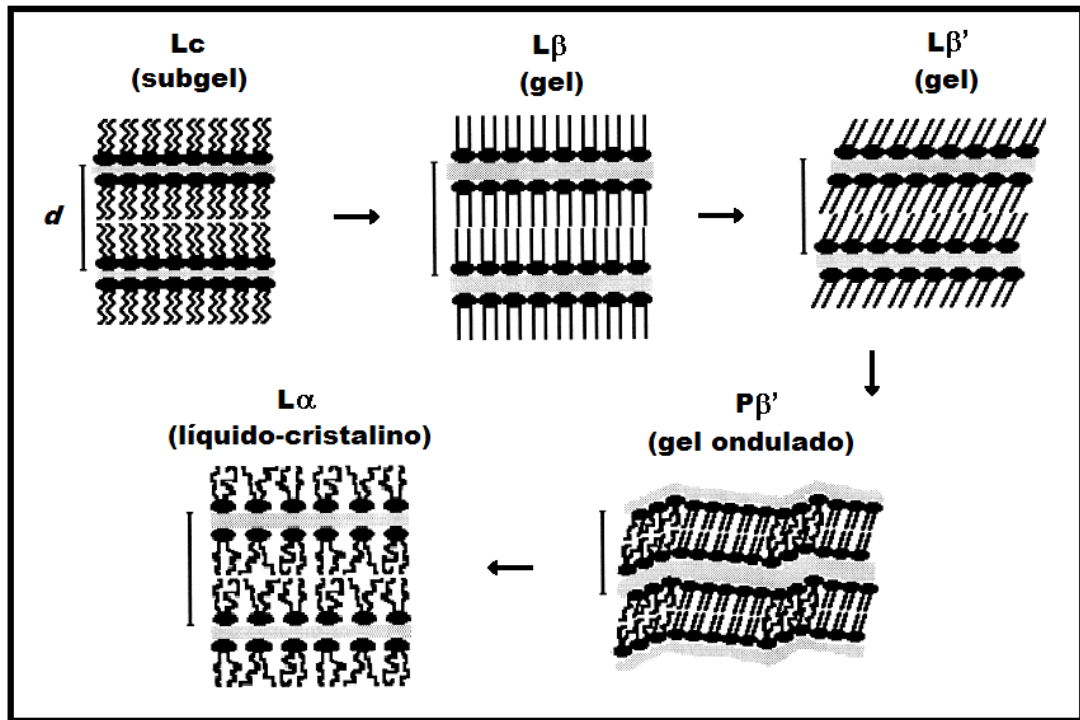


Figura 1.5. Representação das diferentes mesofases da bicamada fosfolipídica juntamente com suas respectivas simbologias e nomenclaturas e indicação da variação da distância de repetição ( $d$ ). A dependência do aumento do fornecimento de energia externa necessária para que uma mesofase se transforme em outra está indicada pelo caminho das flechas.

A conformação das cadeias hidrocarbonadas caracteriza cada mesofase:<sup>37,60,61</sup>

a. A conformação c ou a mesofase Lc (subgel) representa o estado em que a energia externa é mínima: as moléculas fosfolipídicas estão organizadas de acordo com suas características e sob a influência do meio tendendo para um estado de menor energia como anteriormente discutido.

b. A mesofase Lβ (gel) representa o estado em que todos os grupos metileno das cadeias hidrocarbonadas estão na conformação *anti*, submetendo as mesmas à sua forma

mais alongada e proporcionando distâncias bastante regulares entre elas. Como consequência, a espessura da bicamada lamelar aumenta.

c. A mesofase  $L\beta'$  (gel) difere da  $L\beta$  na inclinação das cadeias ao plano das bicamadas. A espessura da bicamada é reduzida.

d. Na mesofase  $P\beta'$  (gel ondulado) as cadeias hidrocarbonadas iniciam um processo de desordenamento molecular que provoca rotações C-C dentro da bicamada e também ondulações na membrana como um todo. A espessura média da bicamada pode diminuir mais em função de interpenetrações de cadeias hidrocarbonadas entre uma monocamada e outra.

Nas conformações  $\beta$  e  $\beta'$ , as propriedades das fases são bastante sensíveis às variações que ocorrem nas regiões hidrofóbicas pela presença de diferentes compostos ou impurezas que influenciarão diretamente o ordenamento das cadeias.

e. Na mesofase  $L\alpha$  (líquido-cristalino) as cadeias hidrocarbonadas estão altamente desordenadas, na conformação de maior isotropia, com rotações C-C em alta frequência; devido à alta desorganização molecular resultante da aplicação de energia externa, as propriedades desta fase não são muito sensíveis às heterogeneidades químicas das cadeias nem mesmo à presença de outros compostos misturados ao sistema; a espessura da bicamada pode aumentar em relação à mesofase  $P\beta'$  e a ondulação da bicamada como um todo é reduzida; porém, ocorre um efeito bastante peculiar: à medida em que é fornecida mais energia para esta fase, especificamente com aumento de temperatura, a espessura da bicamada diminui; o fenômeno pode ser comparado com certos polímeros altamente desordenados: o aumento da temperatura aumenta a desordem e diminui a alongação.<sup>62</sup> Um mecanismo similar explica o efeito nos lipídios: a temperaturas moderadas a tensão interfacial tende a diminuir a área por grupo polar na interface lipídio-água, aproximando e alongando as cadeias hidrocarbonadas; a temperaturas altas a conformação desordenada das cadeias tende a reduzir a alongação; aumentar a temperatura significa, portanto, aumentar a desordem e diminuir a anisotropia das cadeias.<sup>60</sup> Geometricamente as cadeias devem se dobrar da melhor forma possível buscando preencher os espaços oferecidos sem resistência ao ordenamento a longo alcance, ou seja, à periodicidade no espaçamento entre as camadas que contém os grupos polares.

Considerando sistemas lamelares formados por fosfolipídios puros de cadeias saturadas contendo de 15 a 22 átomos de carbono, submetidos ao aumento de temperatura, pelo menos três transições de fase podem ser detectadas:<sup>61</sup>

1. sub-transição: a mesofase L<sub>c</sub> passa para as mesofases L<sub>β</sub> e L<sub>β'</sub>;
2. pré-transição: a mesofase L<sub>β'</sub> passa para a mesofase P<sub>β'</sub>;
3. transição principal: a mesofase P<sub>β'</sub> passa para a L<sub>α</sub>.

A Tabela 1.1 exemplifica temperaturas de transição de fase características de fosfolipídios de extremidade polar e cadeias hidrocarbonadas idênticas e saturadas correspondentes ao número de átomos de carbono presentes em cada cadeia. Valores de temperaturas de transições de fases podem ser determinados por diferentes técnicas como DSC, especialmente MDSC, espectroscopia, difração de raios-X, FTIR e espalhamento de luz (discutido na Sessão 3.1.2.1).<sup>63-70</sup> Os valores encontrados na literatura oscilam dependendo do tipo de técnica utilizada para a sua determinação, das condições experimentais e do tipo de sistema investigado (filmes, gel, vesículas, lipossomas). Um amplo levantamento de valores de temperaturas de transição de fase encontra-se disponível *on-line* no *site* LIPIDAT (<http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>) bem como no review publicado por Koynova e Caffrey em 1998.<sup>61</sup>

Tabela 1.1. Temperaturas de transição de fase características de fosfolipídios de extremidade polar e cadeias hidrocarbonadas idênticas e saturadas relacionadas com o número de carbonos presentes em cada cadeia.<sup>61</sup>

Número de carbonos	Sub-transição (°C)	Pré-transição (°C)	Transição principal (°C)
15	20,2 ± 3,0	22,0 ± 2,5	33,7 ± 0,8
16	18,8 ± 3,1	34,4 ± 2,5	41,3 ± 1,8
17	21,6 ± 3,8	42,7 ± 1,1	48,6 ± 0,6
18	26,3 ± 5,2	49,1 ± 2,9	54,5 ± 1,5
19	30,0 ± 4,3	57,2 ± 1,1	60,2 ± 1,1
20	36,9 ± 1,3	63,2 ± 0,8	65,3 ± 1,5

As transições de fase representam um parâmetro importante no *design* e no desempenho de lipossomas para fins específicos. Fosfolipídios podem ser escolhidos para a formação de lipossomas pensando-se no aproveitamento de determinada transição de fase para a satisfação de um comportamento desejado como, por exemplo, a liberação controlada

de material encapsulado. Assim as transições de fase podem ser exploradas para controlar a liberação de fármacos. De forma geral, a liberação é máxima em torno da transição de fase principal devido aos inúmeros “defeitos” estruturais e de interação entre as moléculas, como discutido acima. Por conseguinte, a escolha dos fosfolipídios torna-se um fator determinante para fins aplicativos.<sup>71-73</sup>

#### **1.2.4. Importância Científica e Tecnológica**

Lipossomas são estruturas que apresentam grandes similaridades às membranas celulares, tanto do ponto de vista estrutural como de composição. De maneira geral são produzidos com fosfolipídios encontrados na natureza, biodegradáveis, não tóxicos e não imunogênicos. Assim, os lipossomas adquiriram uma larga aceitação tanto na ciência fundamental como em áreas mais aplicadas.<sup>1-4,19</sup>

A utilização de lipossomas como sistemas modelo de membranas está largamente consagrada, tendo como resultado a publicação de milhares de artigos científicos e o desenvolvimento de metodologias.<sup>10</sup> Os lipossomas constituem sistemas estruturais para estudos físico-químicos de lipídios, formação de domínios lipídicos em membranas, interações celulares e deformabilidade de sistemas lipídicos.<sup>10,26-28,69</sup>

Os lipossomas gigantes, com diâmetros micrométricos (detalhados na Sessão 2.9), ocupam um lugar importante na pesquisa científica por representarem objetos facilmente observáveis no microscópio óptico. Esta vantagem permite a realização de uma gama de estudos físicos e estruturais sob diferentes condições experimentais.<sup>4,27,34,74-76</sup>

No aspecto mais fundamental, os estudos envolvendo energia térmica na difusão e dispersão destas estruturas coloidais, contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento teórico da física de membranas, que por sua vez contribuiu para o desenvolvimento da física estatística nas últimas décadas. As questões abordadas pela física também encontraram correntes na matemática, onde a geometria diferenciada ou a topologia de objetos bi-dimensionais de alta elasticidade constituem assuntos de alto interesse de pesquisa.<sup>4,75,76</sup>

Nas áreas de bioquímica e biologia é importante ressaltar a grande quantidade de estudos envolvendo proteínas presentes nas membranas celulares, modificações de conformação induzidas por mudanças nas condições de pH, salinidade, luz, etc. em



lipossomas incorporando diferentes moléculas, estudos de reconstituição do histórico celular da evolução das espécies, desenvolvimentos de sistemas de fotossíntese artificiais, ou ainda a atividade de bombas iônicas membranares utilizando lipossomas.<sup>77-79</sup>

Na química os lipossomas representam um sistema de significativa importância como um meio reacional dentro de um espaço reduzido e limitado, encontrando aplicações para estudos de síntese molecular e catálise.<sup>1-80</sup>

Do ponto de vista de aplicação tecnológica e comercial, deve ser considerada a capacidade que os lipossomas possuem de encapsular moléculas hidrofílicas no núcleo aquoso e moléculas hidrofóbicas na região apolar das bicamadas e liberar estas moléculas dentro de determinadas condições ambientais e energéticas. Por consequência, estas propriedades tornam o lipossoma um veículo extremamente atrativo para o transporte de fármacos para locais específicos, processo que vem sendo designado como vetorização de fármacos.<sup>1,2</sup>

Alteração da biodistribuição, farmacocinética (velocidades para atingir o sítio de ação e para ser eliminado) e tempo de meia vida (tempo no qual 50% da concentração permanece no organismo antes da sua eliminação total) de fármacos são alcançados com lipossomas. De forma mais avançada, lipossomas específicos, que irão atuar em órgãos ou alvos específicos dentro do organismo, concorrem para uma sensível redução do grau de toxicidade relacionada à administração do fármaco, bem como seus efeitos colaterais, menores perdas de fármaco com redução de custo e consequente otimização do tratamento.<sup>1,2,19,81</sup>

Para a efetiva aplicação de lipossomas como sistema carreador e vetorizador de fármacos devem ser considerados os parâmetros físico-químicos e coloidais tais como composição, tamanho, capacidade e eficiência de encapsulamento ou incorporação do fármaco, estabilidade no armazenamento e no meio de aplicação e interações com células e o meio de aplicação.<sup>1,2,19,81</sup>

Lipossomas podem ser formulados em suspensões, como aerosol, gel ou mesmo em pó. A administração *in vivo* pode ser tópica ou parenteral, sendo que a aplicação intravenosa tem sido a forma mais promissora em tratamentos. Para esta última rota de administração, o desenvolvimento de lipossomas capazes de escapar ao sistema fagocitário mononuclear culminou na produção dos lipossomas furtivos e estericamente estáveis revestidos com PEG. A hidrofilia conferida à superfície de lipossomas furtivos estende a meia-vida do fármaco em

meio biológico de poucos minutos, no caso de lipossomas convencionais, para várias horas.<sup>19-25,44,45,57</sup>

De fato, foi na aplicação intravenosa para a vetorização de fármacos anticancerígenos que os lipossomas encontraram possibilidades aplicativas com resultados altamente satisfatórios. Tem sido demonstrado que os lipossomas de longo tempo de circulação podem ser direcionados para vários tipos de tumores pelo fato de poderem circular por tempo prolongado e extravasar nos tecidos com permeabilidade vascular elevada. Tumores sólidos crescentes, bem como regiões de infecção e inflamação, apresentam capilares com permeabilidade aumentada, com diâmetros de poros variando entre 100 e 800 nm. Lipossomas furtivos podem ser produzidos com diâmetros entre 60 e 150 nm, suficientemente pequenos para extravasar do sangue para os espaços intersticiais de tumores passando através dos poros.<sup>19-25,44,45,57</sup>

Uma outra estratégia em desenvolvimento é o direcionamento ativo de lipossomas. Consiste em acoplar um ligante específico na superfície externa aumentando sua seletividade de ação com determinadas células ou com tecidos tumorais, através da ligação destes com marcadores específicos localizados na membrana da célula ou do tecido. Em terapias fotodinâmicas, por exemplo, que promove o tratamento de tumores superficiais envolvendo a administração sistêmica de fotossensores, o direcionamento ativo de lipossomas aumenta a acumulação seletiva do fármaco no tumor. Os lipossomas potencializam o efeito fotodinâmico devido à internalização celular do fotossensor, minimizando os efeitos colaterais observados na terapia fotodinâmica convencional.<sup>82</sup>

Aplicações como veículos para vacinas também têm sido largamente estudadas, tanto para aplicação por via intravenosa como por via oral. Deve ser mencionada também a importância na biomedicina, para testes diagnósticos e desintoxicação através da utilização de agentes quelantes; na agricultura, para estabilização de fertilizantes; na pecuária, para maturação de laticínios e na indústria química, em processos de solubilização, purificação, recuperação, catálise ou conversão de energia.<sup>19,31,33,80,83-88</sup>

Por fim, uma área ampla de aplicação encontra-se na cosmetologia. Os primeiros produtos cosméticos à base de lipossomas foram lançados por duas indústrias francesas em 1987. Desde então a gama de produtos só tem aumentado. O mecanismo de ação de lipossomas no transporte de ativos hidratantes, nutrientes e outras substâncias através da pele, está associado à composição epidérmica, o que permite a fusão das vesículas nos espaços intercelulares da pele. Entretanto, deve ser salientado que muitos dos mecanismos

responsáveis pela eficácia de inúmeros produtos cosméticos lipossomados não são suficientemente esclarecidos e que a pretendida eficácia é muitas vezes questionável. Lipossomas com propriedades diferenciadas têm sido desenvolvidos. Como detentores de uma alta deformabilidade estrutural, os lipossomas elásticos podem atingir camadas mais profundas da pele atravessando os espaços intersticiais entre as células. Já lipossomas sólidos, formados por lipídios sólidos na temperatura do corpo humano, também denominados de nanopartículas lipídicas, têm sido desenvolvidas para proporcionar uma estabilidade maior em formulações cosméticas.<sup>3,4,19,53,89-94</sup>

Por fim, considerando dados estatísticos da importância científica e tecnológica de lipossomas, aproximadamente 1500 artigos científicos são publicados por ano envolvendo estudos com lipossomas e mais de 20 mil patentes foram depositadas somente nos Estados Unidos.

### **1.3. Quitina e Quitosana**

#### **1.3.1. Revisão Bibliográfica**

A quitina (Figura 1.6.a) representa o segundo polímero natural mais abundante no planeta, depois da celulose. Foi isolada pela primeira vez em 1881 por Braconnot, 30 anos antes do isolamento da celulose. Durante muitos anos a falta de conhecimentos fundamentais da sua química e propriedades limitou o seu uso como um produto de aplicação industrial. Somente nos anos 70 ocorreu um crescimento do interesse pela quitina e com o desenvolvimento de técnicas de caracterização, sua estrutura e propriedades puderam ser estudadas.<sup>95,96</sup>

A quitina, poli( $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-*N*-acetil-D-glucosamina), é sintetizada por um imenso número de organismos vivos. Sua ocorrência na natureza representa microfibrilas cristalinas formando componentes estruturais no exoesqueleto de artrópodes ou de paredes celulares de fungos e leveduras. Dependendo da fonte, a quitina ocorre nos estados alomorfos  $\alpha$  e  $\beta$ , que podem ser diferenciados por infravermelho e espectroscopia de RMN de estado sólido, bem como por difração de raios-X. A quitina  $\gamma$  também foi identificada, embora a mesma possa ser considerada como uma variante da  $\alpha$ .<sup>95-98</sup>

Apesar da vasta ocorrência da quitina, as principais fontes da sua obtenção para aplicação comercial têm sido cascas de siri e camarão. No processamento industrial, a quitina é extraída dos crustáceos com tratamento ácido para a dissolução de carbonato de cálcio seguida de extração alcalina, para solubilização de proteínas. Tratamentos para eliminação de pigmentos também podem ser procedidos dependendo das exigências conferidas ao produto final.<sup>95,96,99</sup>

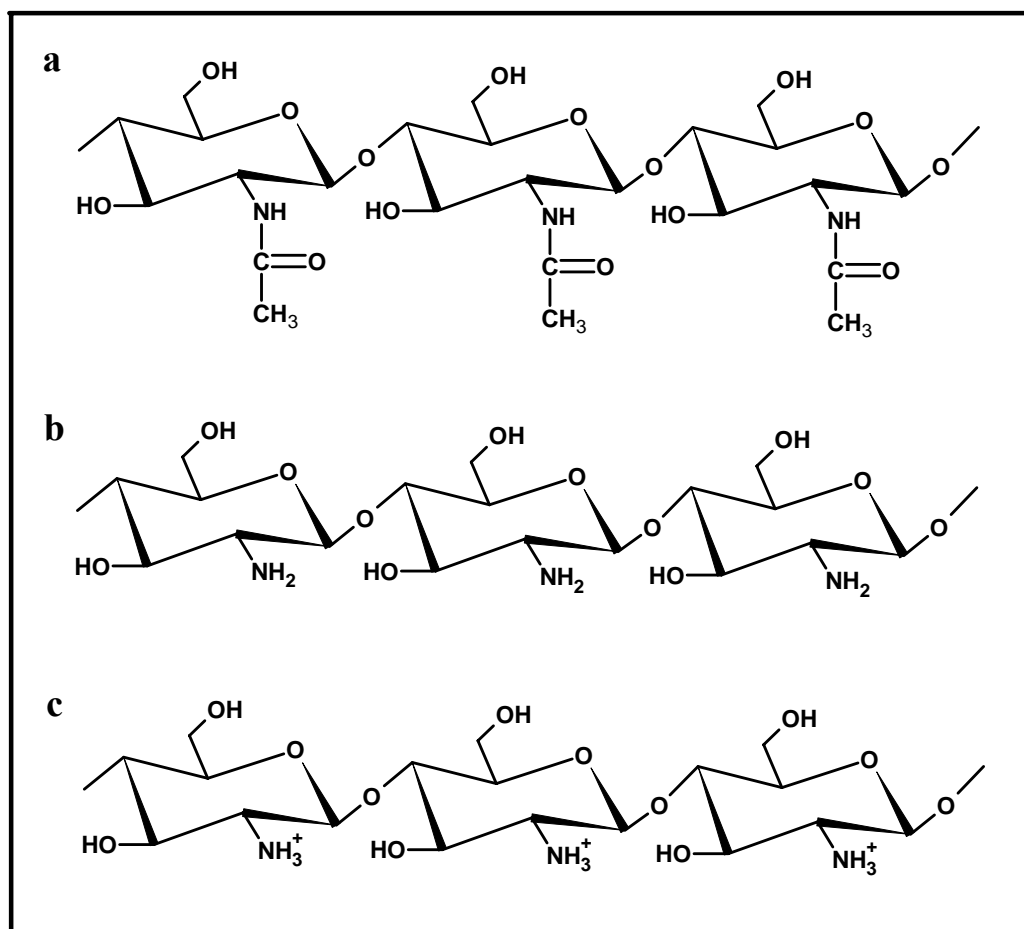


Figura 1.6. Estruturas moleculares da quitina 100% acetilada (a), da quitosana 100% desacetilada (b) e da quitosana 100% desacetilada e ionizada (c).

A quitina ocorre naturalmente com um reduzido grau de desacetilação, ou seja, grupos acetila substituídos por grupos amino ao longo das cadeias do polímero (Figura 1.6.b). Variações do grau de desacetilação dependem da fonte de obtenção. Porém, tanto a forma  $\alpha$  como a  $\beta$  são insolúveis na maioria dos solventes, o que limita estudos de propriedades físicas de quitina em solução. Um estudo aprofundando da questão de

solubilidade foi desenvolvido por Austin, inclusive com o depósito de uma patente, em 1975. Austin obteve um complexo entre quitina e LiCl, o qual é coordenado com o grupo acetila. O complexo é solúvel em dimetilacetamida e em *N*-metil-2-pirrolidona. O emprego de ácido fórmico e ácidos di e tricloroacéticos também foi avaliado por Austin.<sup>96,100,101</sup>

Quando o grau de desacetilação da quitina atinge 50% ou mais, a mesma torna-se solúvel em soluções aquosas ácidas e passa a ser denominada de quitosana. A quitosana também pode ser considerada um polímero natural, pois é encontrada em alguns fungos. Porém, a sua maior fonte de obtenção comercial tem sido pela desacetilação da quitina, o que pode ser facilmente procedido por tratamento em forte meio alcalino.<sup>95,96,99,102,103</sup>

O tratamento alcalino, portanto, é utilizado para a modificação do grau de desacetilação da quitina para a produção de quitosana que, apresentando solubilidade em meio aquoso, proporciona uma vasta gama de aplicações. A solubilização ocorre com a protonação dos grupos amino, convertendo o polissacarídeo em polieletrólito em meio ácido (Figura 1.6.c).<sup>95,96,104-106</sup>

Para a obtenção da quitosana a partir da quitina, o processo mais comum emprega solução aquosa de NaOH em alta concentração. A quitina é dispersa nesta solução e permanece em refluxo sob intensa agitação e aquecimento por períodos prolongados que podem variar muitas horas dependendo do resultado pretendido.<sup>3,99,102,103,107-109</sup>

Após a reação, o precipitado é filtrado e lavado exaustivamente com água até a água de lavagem atingir um pH em torno de 8,0. O precipitado é então disperso em solução ácida para a dissolução da quitosana, permitindo assim a separação, por filtração, de parte da quitina que pode não ter suficientemente desacetilada.<sup>3,7,99</sup> O ajuste do pH da solução final de quitosana em torno de 7,5 pela adição de solução de NaOH provoca a floculação da quitosana obtida, resultante da desprotonação dos grupos amino, com conseqüente precipitação do polímero que pode então ser filtrado, lavado e seco, oferecendo um estado físico de um pó de aspecto arenoso ou floculado.<sup>3,7,99</sup>

O grau de desacetilação resultante depende de muitas condições experimentais como a concentração do meio alcalino, temperatura, tempo de reação e agitação, tamanho e densidade de partículas. Simultaneamente ao processo de desacetilação, a despolimerização, ou seja, quebra das cadeias com conseqüente redução da massa molecular média, também pode ocorrer. Quitosanas de altos graus de desacetilação são de difícil obtenção quando se pretende obter um polímero de alto peso molecular. Condições de reação em atmosfera inerte

e adição de captadores de oxigênio, como tiofenol, são recomendadas.<sup>95,102,107,109</sup> Uma patente de 1993 propõe um processo em que múltiplas desacetilações são procedidas durante pouco tempo seguidas por lavagens, secagem e dissolução, resultando em desacetilações maiores do que 95% com reduzido teor de despolimerização.<sup>110</sup>

A protonação dos grupos amino da quitosana em meio ácido, ocorre normalmente em valores de pH abaixo de 5,5. A dissolução do polímero vai evidentemente depender de fatores como o grau de desacetilação, a distribuição dos grupos acetila remanescentes ao longo das cadeias, distribuição de massa molecular e massa molecular média, além do pH da solução. Ácidos orgânicos ou inorgânicos podem ser empregados, sendo que ácido acético e ácido clorídrico representam os mais comuns.<sup>105,106</sup> Rinaudo e colaboradores demonstraram que a concentração de prótons deve ser no mínimo igual à concentração de grupos amino a serem protonados pra que ocorra a dissolução do polímero.<sup>106</sup>

Apesar da propriedade vantajosa de dissolução em meio aquoso ácido, o emprego de quitosana em meio neutro e alcalino é restrito. Para contornar esta limitação, sais de quitosana têm sido obtidos e os mesmos podem ser submetidos a uma variação de pH mais ampla.<sup>95,111</sup> Solução aquosa de quitosana em pH 7 também foi obtida com o uso de glicerol-2-fosfato.<sup>112-114</sup>

O grau de desacetilação pode ser caracterizado por diferentes formas. Metodologias descritas na literatura lançam mão de técnicas como infravermelho,<sup>115,116</sup> ultravioleta,<sup>117</sup> RMN de <sup>1</sup>H no estado líquido<sup>118</sup> e de <sup>13</sup>C e <sup>15</sup>N no estado sólido.<sup>119-121</sup> Pelletier e colaboradores também propõem o uso de uma reação enzimática.<sup>122</sup>

Entre as técnicas espectroscópicas para a determinação do grau de desacetilação, o infravermelho é o mais popular devido à facilidade de preparação das amostras (em pastilhas de KBr ou filmes) e obtenção dos espectros. Deve-se apenas tomar os cuidados requeridos e fazer uma boa escolha das linhas de base e bandas de referência.<sup>3,7,99,115,116</sup>

Pelo método proposto por Moore e Roberts em 1980,<sup>115</sup> o grau de desacetilação pode ser determinado relacionando-se a banda de amida I a 1655 cm<sup>-1</sup> e a banda de hidroxila a 3450 cm<sup>-1</sup>, que serve como banda de referência interna, pois é relativamente isolada e a sua intensidade é aproximadamente constante para todas as faixas de graus de desacetilação. A porcentagem dos grupos amino-acetilados (%*N-acetila*) é obtida pela equação:

$$\% N\text{-acetila} = (A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33 \quad (1.3)$$

onde:  $A_{1655}$  = absorvância a  $1655\text{ cm}^{-1}$ ;  $A_{3450}$  = absorvância a  $3450\text{ cm}^{-1}$  e  $1,33$  é uma constante que representa a razão  $A_{1655} / A_{3450}$  para amostras de quitina completamente acetiladas.

Atualmente a RMN de  $^1\text{H}$  é considerada a metodologia de maior exatidão para amostras em solução. A quitosana é dissolvida em água deuterada acidificada com ácido clorídrico. O pico dos átomos de hidrogênio ligados ao carbono do grupo acetila que ocorre em  $1,95\text{ ppm}$  é utilizado como referência em relação aos picos em  $4,79$  (H-1 para D-glucosamina) e  $4,50\text{ ppm}$  (H-1 para N-acetil-D-glucosamina), o que permite a determinação do grau de desacetilação pelo uso das integrações dos sinais.<sup>118</sup> Para a avaliação de graus de acetilação amplos, variando desde  $0$  até  $100\%$ , a RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^{15}\text{N}$  em estado sólido tem se mostrado muito satisfatória.<sup>119-121</sup>

A distribuição dos grupos acetila ao longo das cadeias poliméricas, que pode ser de forma aleatória ou em blocos, influencia a solubilidade bem como as interações entre as cadeias por ligações de hidrogênio e hidrofobia dos grupos acetila. Esta distribuição também foi avaliada por RMN de  $^{13}\text{C}$ .<sup>123,124</sup>

Para a determinação da massa molecular média, métodos como cromatografia de exclusão de tamanhos,<sup>125</sup> viscosimetria<sup>108</sup> e espalhamento de luz<sup>126</sup> são os mais difundidos.<sup>95</sup> As duas primeiras técnicas representam metodologias de obtenção simplificada e não constituem medidas absolutas para a massa molecular, pois empregam curvas padrão relativas. Por outro lado, o espalhamento de luz constitui uma técnica absoluta para a determinação da massa molecular de macromoléculas, embora a obtenção de dados e a interpretação dos resultados sejam mais complexas. A maior dificuldade está ligada aos fenômenos de agregação e de solvatação. Assim, a dissolução do polímero deve ser procedida de maneira a evitar a agregação e promover uma ótima solvatação, o que pode ser obtido pela escolha correta do solvente e das concentrações do polímero em solução, bem como eliminação de impurezas como poeira, fibras e outras partículas com uso de filtrações e centrifugação.<sup>126</sup> Rinaudo e colaboradores propuseram uma solução  $0,3\text{ M}$  ácido acético/ $0,2\text{ M}$  acetato de sódio (pH  $4,5$ ) como tampão ideal para soluções de quitosana livre de agregados.<sup>127</sup> A determinação do incremento no índice de refração  $dn/dc$  (onde  $c$  significa a concentração) é necessária para a obtenção da massa molar média por espalhamento de luz e o parâmetro pode ser obtido com uso de refratômetro convencional.

Em uma solução polimérica a flexibilidade e a conformação das cadeias em solução determinam suas propriedades hidrodinâmicas e reológicas.<sup>128</sup> As dimensões das cadeias de

quitosana e seus correspondentes volume hidrodinâmico e viscosidade dependem do caráter semi-rígido das cadeias do polissacarídeo. A concentração de sal pode influenciar de forma drástica estes parâmetros e a determinação de viscosidades intrínsecas em soluções contendo excesso de eletrólitos de baixo peso molecular é largamente empregada na avaliação do efeito da força iônica nas dimensões de cadeias de polieletrólitos. A *worm-like theory* permite uma estimativa do comprimento de cadeias de polieletrólitos a partir de medidas de viscosidade em função de diferentes forças iônicas.<sup>125,127,128</sup> Esta teoria estende o modelo *worm-like* incluindo o efeito da carga eletrostática, a qual modula as conformações novo e estendida do polieletrólito em solução em função da força iônica do solvente. O comprimento total da cadeia polimérica em solução ( $L_T$ ) é definido pelas contribuições do comprimento intrínseco ( $L_o$ ) e o comprimento eletrostático ( $L_e$ ):

$$L_T = L_o + L_e \quad (1.4)$$

com  $L_o$  correspondendo à característica rígida da cadeia polimérica independente de interações eletrostáticas e  $L_e$  variando com o inverso da raiz quadrada da força iônica.<sup>95</sup>

A aplicação desta teoria à quitosana forneceu valores para  $L_o$  entre 5 e 10 nm,<sup>127</sup> embora valores maiores, como 22 nm, também tenham sido caracterizados.<sup>129-131</sup> Foi demonstrado que  $L_o$  depende de forma moderada do grau de acetilação do polímero, sendo que a mesma aumenta com o número de grupos acetila presentes na cadeia.<sup>130,131</sup>

A rigidez estrutural da quitina e da quitosana está relacionada com a conformação molecular e depende principalmente da rede de ligações de hidrogênio formada dentro de cada cadeia. A mesma decresce com o aumento da temperatura sendo que uma temperatura crítica em torno de 40 °C foi determinada para quitosana, onde  $L_o$  começa a decrescer mais rapidamente com o aumento da temperatura, resultado da desestabilização das ligações de hidrogênio.<sup>132</sup>

De forma geral, a rigidez das cadeias representa um parâmetro significativo no seu comportamento reológico, mesmo em sistema diluído. Os fenômenos de ligações de hidrogênio bem como interações de caráter hidrofóbico influenciam as características em solução, sendo que a agregação molecular também pode estar relacionada, qualquer que seja o grau de acetilação do polímero.<sup>133</sup>



A questão da força iônica deve ser considerada com cautela e cuidados especiais, como o uso de soluções tampão para dissolução de quitosana, são recomendados. Soluções tampão de pH em torno de 4,5 e de força iônica definida são empregadas para dissolução, assegurando um ambiente de força iônica constante. Entre os solventes mais utilizados destacam-se tampões de acetato como NaOAc/HOAc 0,3 M,<sup>127</sup> soluções diluídas de ácido acético<sup>134</sup> e de ácido clorídrico.<sup>135</sup>

A influência da concentração de NaCl em solução aquosa para a dissolução de quitosana foi avaliada por Signini e colaboradores.<sup>136</sup> Amostras de quitosanas foram dissolvidas em várias soluções de NaCl de 0,06 a 0,30 M e medidas de viscosidade foram obtidas. Com o comportamento característico de um polieletrólito, a viscosidade intrínseca diminui com o aumento da força iônica do meio. Este comportamento é descrito pela equação:

$$[\eta]_{\mu} = [\eta]_{\infty} + S \mu^{-1/2} \quad (1.5)$$

onde:  $[\eta]_{\mu}$  é a viscosidade intrínseca na força iônica  $\mu$ ,  $[\eta]_{\infty}$  é a viscosidade intrínseca extrapolada à força iônica infinita e  $S$  é a tolerância ao sal.

Em suma, para a faixa de concentração de NaCl investigada, ou seja, com força iônica  $0,06 \text{ M} \leq \mu \leq 0,30 \text{ M}$ , boas soluções são obtidas. Assim, os processos de agregação são evitados, o que permite uma avaliação concisa das características dinâmicas e estruturais da quitosana em solução.<sup>136</sup>

Nos últimos anos, uma gama de novos solventes tem sido proposta tanto para quitina como para quitosana. Consequentemente, reações dos polímeros em meio homogêneo ou semi-homogêneo têm sido desenvolvidas.<sup>129</sup> Particularmente no caso da quitosana, a presença dos grupos amino fornece sítios de fácil modificação química. Alterações de propriedades físico-químicas providas por modificações a nível molecular e supramolecular fornecem estruturas de características e comportamentos específicos.

Modificações químicas de quitina e quitosana procedidas sob condições moderadas, objetivando a proteção das ligações glicosídicas e acetamídicas, fornecem polímeros de diferenciados graus de solubilização. De forma geral, as propriedades são delineadas visando aplicações tanto no estado sólido como em solução.

### 1.3.2. Importância Científica e Tecnológica

Conhecimentos importantes a respeito da quitina, suas modificações químicas, propriedades físicas e aplicações foram descritas em dois livros publicados nos anos 70: “Natural Chelating Polymers”<sup>137</sup> e “Chitin”.<sup>138</sup> Mais adiante devem ser citados “Chitin Chemistry”<sup>139</sup> e “Chitin Handbook”,<sup>140</sup> com dados atualizados dos anos 90.<sup>95</sup>

Trabalhos científicos e de cunho mais aplicativo podem ser encontrados em periódicos especializados, especialmente os que tratam de polímeros. De considerável importância devem ser citados também livros e *proceedings* de congressos internacionais em quitina e quitosana, sendo que o primeiro deles ocorreu em 1977 nos Estados Unidos e os trabalhos submetidos foram editados em 1978 por Muzzarelli e Pariser.<sup>141</sup> Por ocasião da sétima conferência internacional de quitina e quitosana, organizada pela Sociedade Européia de Quitina, os trabalhos apresentados foram lançados no livro “Advances in Chitin Chemistry”.<sup>142</sup> Portanto, a importância científica de quitina e quitosana tem sido altamente valorizada com a criação da “European Chitin Society” e da “Sociedad Latinoamericana de Quitina y Quitosana”.<sup>95</sup>

A quitina é considerada como um polímero de baixa toxicidade e inerte no sistema gastrointestinal de mamíferos. É biodegradável devido à existência na natureza de processos degradativos (quitinase) gerados por fungos e bactérias que também estão presentes no sistema digestivo de muitos animais. Processos de quitinase estão envolvidos em sistemas de defesa contra invasão bacteriana nos organismos que a promovem. Lisoenzimas encontrados em claras de ovos, figueiras e mamoeiros papaya também degradam quitina.<sup>96,143,144</sup>

Quitina foi utilizada em coluna cromatográfica para a separação de lectinas. Quitina e 6-O-carboximetilquitina ativam macrófagos *in vivo*, suprimem o crescimento de células cancerígenas em camundongos e estimulam a resistência contra infecções por *Escherichia Coli*. Quitina também acelera a cura de ferimentos.<sup>145,146</sup>

A quitina é largamente empregada para a imobilização de enzimas e células. No caso de imobilização enzimática, aplicações são encontradas na indústria de alimentos para clarificação de sucos de frutas e no processamento do leite, onde  $\alpha$  e  $\beta$  amilases ou invertase são ligadas em quitina.<sup>147</sup> Considerando suas propriedades de biodegradabilidade, baixa toxicidade, inércia fisiológica, propriedades anti-bacterianas, capacidade de formação de géis e afinidade por proteínas, a quitina tem sido aplicada em muitas outras áreas além da indústria

de alimentos. Devem ser destacado o seu uso como biosensores, no tratamento de poluentes industriais e na recuperação de complexos de tiosulfato de prata.<sup>147-149</sup>

Fibras de quitina foram desenvolvidas por Austin<sup>150</sup> e Hirano.<sup>151</sup> As fibras, juntamente com celulose ou seda, produzem um material anti-alérgico, desodorizante, antibacteriano e controlador de umidade.<sup>152</sup> Derivados de fibras de quitina são utilizados como ligantes no processo de fabricação de papel: a adição de 10% de n-isobutilquitina melhora a resistência mecânica do papel.<sup>153</sup>

Tanto da forma de fibras como de filmes, a quitina encontrou uma vasta aplicação nas áreas médica e farmacêutica, como material de revestimento para ferimentos e sistemas carreadores de fármacos.<sup>154</sup> Quitina tem sido empregada como excipiente e carreador de fármaco em forma de filme, gel ou mesmo em pó em aplicações envolvendo mucoadesividade.<sup>155</sup> Um compósito produzido com hidroxiapatita/quitina/quitosana é utilizado como material de recuperação estrutural de ossos no tratamento de defeitos ósseos.<sup>156</sup> Quitinas modificadas têm sido investigadas como potenciais fármacos anticancerígenos.<sup>157</sup>

Quanto à quitosana, ainda considerada como a principal derivada da quitina, esta encontra aplicações na maioria das áreas em que a quitina está presente. Além disso, com a sua vantagem de solubilizar em meio aquoso, a sua gama de aplicações torna-se ainda muito maior do que a da quitina. O caráter catiônico da quitosana em solução lhe confere uma propriedade única: consiste no único polímero natural catiônico. Suas propriedades biológicas e a facilidade em formar filmes e géis promovem um amplo espectro aplicativo.<sup>95,96,158</sup>

A aplicação da quitosana está ligada a pelo menos uma de suas características. Consiste num polímero biocompatível, biodegradável, formador de filmes, pode atuar como agente hidratante, é não tóxico, possui alta tolerância biológica, é hidrolisado por lisozimas, age na cura de ferimentos, é eficiente contra bactérias, vírus e fungos. Detentora de todas estas vantagens, a quitosana encontra-se largamente inserida na biomedicina em suportes e acessórios cirúrgicos, agentes hemostáticos e anticoagulantes, implantes dentários, peles artificiais, filmes para reconstrução estrutural de ossos, revestimentos para ferimentos, lentes de contato bem como sistemas de encapsulamento e liberação controlada de fármacos.<sup>95,96,143,159,160</sup>

No carregamento de fármacos e vacinas, a quitosana toma parte em sistemas designados para todas as vias de administração: oral, nasal, parenteral, transdermal bem como em implantes e distribuição de gens. A administração pelas mucosas tem sido cogitada considerando a alta mucoadesividade da quitosana e de seus derivados catiônicos.<sup>160-163</sup>

Taxol, um importante fármaco anticancerígeno, porém hidrofóbico, foi solubilizado em micelas de *n*-lauril-carboximetilquitosana o que aumentou suas propriedades terapêuticas.<sup>164</sup> O mesmo foi observado para micelas de *N*-mPEG-*N*-octil-*O*-sulfato de quitosana para solubilização de paclitaxel, um derivado do taxol.<sup>165</sup> Ainda considerado sistemas carreadores de fármacos, uma vasta produção de micro e nanopartículas estruturalmente formadas por quitosana ou tendo quitosana na sua composição, podem ser encontradas na literatura.<sup>166-168</sup> No mesmo sentido em forma de géis.<sup>159,169</sup>

Quitosanas modificadas também encontram aplicação em sistemas de transfecção de gens. A atração eletrostática entre quitosana e DNA negativamente carregado induz um processo associativo entre os dois polieletrólitos, levando à formação de nanopartículas de quitosana-DNA biodegradáveis. Foi demonstrado que estas partículas têm a capacidade de extrapolar as barreiras de membranas celulares e assim induzir transfecção de gens.<sup>170</sup>

A atividade biológica da quitosana, considerando seu efeito antivírus como exemplo, favorece seu uso na agricultura inibindo o crescimento de bactérias e infecções bacterianas e estimulando a defesa natural de plantas. Ainda na mesma área, o crescimento de plantas também pode ser estimulado com quitosana, sementes revestidas com quitosana podem ser protegidas de temperaturas muito baixas e o tempo ideal da disponibilidade de fertilizantes no solo pode ser controlado.<sup>171</sup>

No tratamento de água e efluentes industriais a quitosana é empregada em processos de purificação de água potável e de piscinas, remoção de íons metálicos, redução de odores e eliminação de contaminantes como polímeros sintéticos.<sup>172,173</sup>

Por não ser digerível ao ser humano, a quitosana é comercializada como fibra alimentar para pessoas em dieta. Lipídios podem se ligar na quitosana e assim o colesterol pode ser absorvido. Em alimentos e bebidas encontram-se aplicações como agente estabilizante e espessante de molhos, em forma de revestimento para frutas como conservante, fungicida e antibacteriano.<sup>174,175</sup>

Por fim, uma outra grande área de aplicação que merece destaque é a cosmetologia. Com o seu poder eletrostático, a quitosana entra em formulações de xampus para a redução

da eletricidade estática dos cabelos. Também em produtos hidratantes, tratamento de acne, tonificação da pele e produtos de uso oral como creme dental e gomas.<sup>96</sup>

#### 1.4. Quitossomas

A presença de polissacarídeos nas superfícies celulares e os conseqüentes estudos funcionais levaram também ao interesse em estudar interações entre lipossomas e diferentes grupos de polissacarídeos.<sup>48,176,177</sup>

Processos de agregação de lipossomas induzidos por polissacarídeos foram estudados por Sunamoto e colaboradores.<sup>177</sup> Os pesquisadores observaram a agregação na presença de vários polissacarídeos sob diferentes condições de temperatura, força iônica e carga superficial das vesículas.

Polissacarídeos também foram adicionados a lipossomas objetivando sua estabilização para aplicação como carreadores de fármacos e como glóbulos vermelhos artificiais.<sup>178,179</sup> Muitos destes estudos empregaram derivados de quitina como polissacarídeo. Kato e colaboradores utilizaram carboximetilquitina na produção de glóbulos vermelhos artificiais encapsulando hemoglobina em lipossomas e revestindo os mesmos com esta quitina negativamente carregada.<sup>178</sup> Alamelu e Panduranga Rao utilizaram um processo semelhante para encapsulamento de um fármaco.<sup>179</sup> Ambos os grupos encontraram como resultado um aumento considerável na estabilidade de retenção de material encapsulado comparando com lipossomas não revestidos.

Já a quitosana, com as suas cargas positivas em solução aquosa ácida, foi estudada como um polissacarídeo com alta capacidade de ligação em uma grande variedade de células microbianas e de mamíferos. Essa propriedade de interação com membranas celulares está relacionada com a estrutura catiônica característica de polieletrólito, apresentada pela quitosana em solução. Assim a quitosana passou a ser empregada para floculação de suspensões celulares e mesmo em floculações seletivas de células proporcionando desempenho altamente satisfatório.<sup>180,181</sup>

A propriedade de mucoadesividade da quitosana também foi estudada. Lehr e colaboradores avaliaram essa característica em mucosa intestinal de porcos.<sup>182</sup> Assim, lipossomas bioadesivos para aplicações de uso tópico, tratamento de ferimentos e

queimaduras e para administração nos olhos e narinas e em alguns tumores, têm sido sugeridos.<sup>168,183-185</sup>

As propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade tornam a quitosana um polímero de real aplicabilidade na associação com lipossomas, principalmente considerando o aperfeiçoamento de características como estabilidade, retenção de material encapsulado e especificidade para meios onde a bioadesividade é requerida.<sup>51,168,183-185</sup> O termo “quitossoma” tem aparecido com frequência na literatura na designação de lipossomas contendo quitosana como parte integrante da sua estrutura. Portanto, deve-se considerar que dentre os vários tipos de lipossomas descritos, definidos como convencionas, furtivos, direcionados, fusogênicos, elásticos, polimerizados ou magnéticos, os quitossomas são identicamente estabelecidos como uma espécie distinta com características e propriedades específicas e vantagens em relação às outras espécies.

As interações entre lipossomas e quitosana têm sido estudadas por diferentes metodologias.<sup>48,51,186-188</sup> Porém, os parâmetros físicos da interação entre o polímero e a bicamada fosfolipídica da membrana da vesícula ainda permanecem como objeto de larga investigação, sendo que os mesmos ainda não estão totalmente esclarecidos.<sup>188</sup> O assunto é abordado nas discussões da presente tese.

A maioria dos trabalhos da literatura aborda parâmetros aplicativos para os sistemas formados por quitossomas e uma gama diferenciada de estruturas é desenvolvida. A quitosana pode estar revestindo a membrana do lipossoma externamente, internamente ou ambos os casos.<sup>3,7,48,51,58,189,190</sup> Também pode estar inserida entre as bicamadas de vesículas multilamelares ou mesmo dentro da bicamada, ou seja, na região hidrofóbica.<sup>187,188</sup> A localização da quitosana, portanto, depende da metodologia de preparação das estruturas propostas.

O quitossoma “clássico” é formado por um lipossoma revestido externamente com quitosana, por interação eletrostática da região polar dos fosfolipídios com as cargas da quitosana ionizada. Comumente os lipossomas são preparados separadamente e após são dispersos em solução aquosa contendo quitosana.<sup>183-185,189-192</sup> Perugini e colaboradores investigaram a liberação de ácido glicólico a partir de lipossomas revestidos com quitosana.<sup>189</sup> Um significativo controle de liberação foi apresentado em relação à lipossomas sem quitosana. Takeuchi e colaboradores testaram quitossomas carreadores de fármacos peptídicos por via oral em camundongos e observaram uma liberação mais prolongada em comparação com lipossomas.<sup>183-185</sup> Feng e colaboradores revestiram lipossomas com

quitosana para serem encapsulados em microesferas formadas por um copolímero. O revestimento de quitosana protege a integridade da vesícula no processo de encapsulamento que emprega solvente orgânico.<sup>192</sup>

Sistemas diferenciados, obtidos com metodologias mais apuradas, também têm sido descritos. McPhail e colaboradores prepararam um interessante sistema de nanopartículas de quitosana modificada para o encapsulamento de agentes bioativos no seu núcleo aquoso. Essas nanopartículas, por sua vez, foram encapsuladas em lipossomas unilamelares. O sistema, denominado de vesícula dentro de vesícula, retardou a liberação do material encapsulado em mais de 50% em comparação com as nanopartículas de quitosana não encapsuladas em lipossomas.<sup>193</sup> Huang e colaboradores também investigaram um sistema semelhante onde lipossomas encapsulam um núcleo sólido de quitosana contendo um fármaco hidrofílico. Os estudos *in vitro* e *in vivo* constataram uma farmacocinética vantajosa.<sup>194</sup> No mesmo sentido, Diebold e colaboradores produziram nanopartículas de quitosana revestidas com bicamada de fosfolípidios para vetorização de fármacos no sistema ocular. Um alto potencial para a aplicação sugerida foi observado nos estudos *in vitro* e *in vivo* com redução de toxicidade e alteração da distribuição de fármaco.<sup>168</sup>

Um gel termo-sensível de quitosana modificada contendo lipossomas foi desenvolvido por Ruel-Gariépy e colaboradores como sistema carreador de fármacos. Eles demonstraram que a associação dos dois sistemas, favorece uma vetorização mais controlada, sendo que os lipossomas difundem lentamente no gel de quitosana retendo o material encapsulado por períodos que podem variar de algumas horas até vários dias.<sup>169</sup>

Uma estrutura diferenciada foi proposta por Magdassi e colaboradores, consiste numa micro-cápsula com núcleo oleoso: micro-gotas de óleo são estabilizadas com moléculas de lecitina em meio aquoso; quitosana é adicionada e pela interação com a parte polar da lecitina que está formando a camada externa das micro-gotas, ocorre um revestimento polimérico produzindo micro-partículas aplicáveis no encapsulamento e carregamento de substâncias hidrofóbicas.<sup>195</sup>

Por fim, os trabalhos desenvolvidos na presente Tese propõem a estruturação de quitossomas uni e multilamelares com quitosana revestindo a membrana de fosfolípidios interna e externamente. Os quitossomas obtidos já têm demonstrado aplicabilidade como sistemas para carreadores de vacinas, proporcionando um significativo aumento da eficácia da vacina como agente imunológico em testes *in vitro* e *in vivo*.<sup>88</sup>

Quitossomas gigantes, ou vesículas gigantes contendo quitosana, têm sido descritos recentemente na literatura em estudos de interação do polissacarídeo com a membrana da vesícula.<sup>196,197</sup> O tema também é explorado aqui a partir de uma modificação do processo de obtenção de quitossomas gigantes tendo como base uma metodologia empregada na produção de lipossomas unilamelares grandes.

## 1.5. Referências

1. Lasic D.D. *Liposomes: from Physics to Applications*. Amsterdam: Elsevier, **1993**.
2. Delattre, J.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Philippot, J.R.; Shuber, F. *Les Liposomes*. Paris: INSERM, **1993**.
3. Mertins, O. *Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina da Lecitina de Soja e Quitosana*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2004**.
4. Fa, N. *Micro-rhéologie de vésicules géantes*. PhD Thesis. Strasbourg: Université Louis Pasteur, **2003**.
5. Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. *Journal of Molecular Biology*. **1965**, 13, 238.
6. Szoka, F.C.; Papahadjopoulos, D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1978**, 75, 4194.
7. Mertins, O.; Sebben, M.; Pohlmann A.R.; Silveira, N.P. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2005**, 138, 29.
8. Angelova, M.I.; Dimitrov, D.S. *Faraday Discussions of the Chemical Society*. **1986**, 81, 303 and 345.
9. Stoeckenius, W. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. **1959**, 5, 491.
10. Santos, N.C.; Castanho, M.A.R.B. *Química Nova*. **2002**, 25, 1181.
11. Sessa, G.; Weissmann, G. *Journal of Biological Chemistry*. **1970**, 245, 3295.
12. Gregoriadis, G.; Leathwood, P.D.; Ryman, B.E. *FEBS Letters*. **1971**, 14, 95.
13. Lasic, D. *American Scientist*. **1992**, 80, 20.
14. Van Berkel, T.J.; De Smidt, P.C.; Van Dijk, M.C.M.; Ziere, G.J.; Bijsterbosch, M.K. *Biochemical Society Transactions*. **1990**, 18, 748.
15. Vyas, S.P.; Jaitely, V.; Kanaujia, P. *Pharmazie*. **1997**, 52, 259.
16. Johnsson, M.; Silvander, M.; Karlsson, G.; Edwards, K. *Langmuir*. **1999**, 15, 6314.
17. Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R.; Rudzinski, W.E. *Journal of Controlled Release*. **2001**, 70, 1.
18. Pohlmann, A.R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Silveira, N.P.; Guterres, S.S. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2002**, 16, 305.
19. Lasic, D.D. *Trends in Biotechnology*. **1998**, 16, 307.
20. Adler-Moore, J.P.; Proffitt, R.T. *Journal of Liposome Research*. **1993**, 3, 429.
21. Lasic, D.D. *Nature*. **1996**, 380, 561.
22. Drummond, D.C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D.B.; Papahadjopoulos, D. *Pharmacological Reviews*. **1999**, 51, 691.
23. Lequaglie, C.; Giudice, G.; Massone, P.P.B.; Cataldo, I. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **2000**, 16, 541.
24. Griese, N.; Blaschke, G.; Boss, J.; Hempel, G. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 979, 379.
25. Charrois, G.J.R.; Allen, T.M. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2003**, 1609, 102.
26. Margolis, L.B. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1984**, 779, 161.



27. Haverstick, D.M.; Glaser, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1987**, 84, 4475.
28. Glaser, M. *Comments on Molecular and Cell Biophysics*. **1992**, 8, 37.
29. Lasic, D.D.; Papahadjopoulos, D. *Science*. **1995**, 267, 1275.
30. Lasic, D.D. *Nature*. **1997**, 387, 26.
31. Sallovitz, J.M.; Menghini, M.I.Z.; Lanusse, C.E. *Veterinary Research*. **1998**, 29, 409.
32. Winslow, R.M. *Annual Review of Medicine*. **1999**, 50, 337.
33. Chang, T.M.S. *Trends in Biotechnology*. **1999**, 17, 61.
34. Bagattoli, L.A.; Gratton, E. *Biophysical Journal*. **2000**, 79, 434.
35. Toraya, S.; Nagao, T.; Norisada, K.; Tuzi, S.; Saitô, H.; Izumi, S.; Naito, A. *Biophysical Journal*. **2005**, 89, 3214.
36. Singer, S.J.; Nicholson, G.L. *Science*. **1972**, 175, 720.
37. Cavalcanti, L.P. *Estudo Estrutural de Membranas Modelo Utilizando Radiação Síncrotron*. Tese de Doutorado. Campinas: UNICAMP, **2001**.
38. Tanford, C. *The Hydrophobic Effect*. New York: John Willey and Sons, **1979**.
39. Vemuri, S.; Rhodes, C.T. *Pharmaceutisch Acta Helvetica*. **1995**, 70, 95.
40. Sharma, A.; Sharma, U.S. *International Journal of Pharmaceutics*. **1997**, 154, 123.
41. Batista, C.M.; Carvalho, C.M.B.; Magalhães, N.S.S. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2007**, 43, 167.
42. Klibanov, A.M.; Maruyama, M.; Torchilin, V.P.; Huang, L. *FEBS Letters*. **1990**, 268, 235.
43. Papahadjopoulos, D.; Allen, T.M.; Gabizon, A.; Mayhew, E.; Matthay, K.; Huang, S.K.; Lee, K.D.; Woodle, M.C.; Lasic, D.D.; Redemann, C.; Martin, F.J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1991**, 88, 11460.
44. Lasic, D.D. *Angewandte Chemie International Edition in English*. **1994**, 33, 1785.
45. Sadzuka, Y.; Sugiyama, I.; Tsuruda, T.; Sonobe, T. *International Journal of Pharmaceutics*. **2006**, 312, 83.
46. de Gennes, P.G. *Advances in Colloid and Interface Polymer Science*. **1987**, 27, 189.
47. Goulian, M.; Bruinsma, R.; Pincus, P. *Europhysics Letters*. **1993**, 22, 145.
48. Henriksen, I.; Smistad, G.; Karlsen, J. *International Journal of Pharmaceutics*. **1994**, 101, 227.
49. Mizuguchi, H.; Nakagawa, T.; Nakanishi, M.; Imazu, S.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1996**, 218, 402.
50. Allen, T.M.; Hansen, C.B.; Kao, G.Y.; Ma, J.; Marjan, J.M.J.; Menezes, D.L.; Moase, E.H.; Qi, W.; Stuart, D. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **1997**, 24, 243.
51. Henriksen, I.; Vagen, S.R.; Sande, S.A.; Smistad, G.; Karlsen, J. *International Journal of Pharmaceutics*. **1997**, 146, 193.
52. Cuyper, M.D.; Hødenius, M.; Lacava, Z.G.M.; Azevedo, R.B.; Silva, M.F.; Morais, P.C.; Santana, M.H.A. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2002**, 245, 274.
53. Essa, E.A.; Bonner, M.C.; Barry, B.W. *International Journal of Pharmaceutics*. **2002**, 240, 55.
54. Trotta, M.; Peira, E.; Debernardi, F.; Gallarate, M. *International Journal of Pharmaceutics*. **2002**, 241, 319.
55. Crommelin, D.J.A.; Storm, G.; Jiskoot, W.; Stenekes, R.; Mastrobattista, E.; Hennink, W.E. *Journal of Controlled Release*. **2003**, 87, 81.
56. Romanowski, S.A.; Chiaramoni, N.S.; Lioy, V.S.; Gargini, R.A.; Viera, L.I.; Taira, M.C. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2003**, 122, 191.
57. Sapra, P.; Allen, T.M. *Progress in Lipid Research*. **2003**, 42, 439.
58. Mertins, O.; Cardoso, M.B.; Pohlmann, A.R.; Silveira, N.P. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **2006**, 6, 2425.
59. Haibel, A.; Nimtz, G.; Pelster, R.; Jaggi, R. *Physical Review E*. **1998**, 57, 4838.

60. Tardieu, A.; Luzzati, V.; Reman, F.C. *Journal of Molecular Biology*. **1973**, 75, 711.
61. Koynova, R.; Caffrey, M. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1998**, 1376, 91.
62. Flory, P.J. *Principles of Polymer Chemistry*. New York: Cornell University Press, **1983**.
63. Simon, S.A.; Lis, L.J.; Kauffman, J.W.; Macdonald, R.C. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1975**, 375, 317.
64. Biltonen, R.L.; Lichtenberg, D. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1993**, 64, 129.
65. Dimitrova, G.T.; Tadros, T.F.; Luckham, P.F.; Kipps, M.R. *Langmuir*. **1996**, 12, 315.
66. McDonald, P.M.; Strashko, V. *Langmuir*. **1998**, 14, 4758.
67. Hird, G.S.; McIntosh, T.J.; Ribeiro, A.A.; Grinstaff, M.W. *Journal of the American Chemical Society*. **2002**, 124, 5983.
68. Chong, P.L.G.; Zein, M.; Khan, T.K.; Winter, R. *Journal of Physical Chemistry B*. **2003**, 107, 8694.
69. Michel, N.; Fabiano, A.S.; Polidori, A.; Jack, R.; Pucci, B. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2006**, 139, 11.
70. Lewis, R.N.A.H.; Zweytick, D.; Pabst, G.; Lohner, K.; McElhaney, R.N. *Biophysical Journal*. **2007**, 92, 3166.
71. Papahadjopoulos, D.; Jacobson, K.; Nir, S.; Isaac, T. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1973**, 311, 330.
72. Yatvin, M.B.; Weinstein, J.N.; Dennis, W.H.; Blumenthal, R. *Science*. **1978**, 202, 1290.
73. Evans, E.; Needham, D. *Journal of Physical Chemistry*. **1987**, 91, 4219.
74. Dimova, R.; Dietrich, C.; Hadjiisky, A.; Danov, K.; Pouligny, B. *The European Physical Journal B*. **1999**, 12, 589.
75. Fa, N.; Marques, C.M.; Mendes, E.; Schroder, A.P. *Physical Review Letters*. **2004**, 92, Art. No. 108103.
76. Billot, V. *Deux Approches de l'Interaction Entre Membranes et Supra-Molécules: Effets de Polymères et de Cyclodextrines*. PhD Thesis. Strasbourg: Université Louis Pasteur, **2005**.
77. Fendler, J.H. *Chemical Reviews*. **1987**, 87, 877.
78. Manneville, J.B.; Bassereau, P.; Rmaswamy, S. *Physical Review E*. **2001**, 64, 21908.
79. Nomura, S.M.; Yoshikawa, Y.; Ourisson, G.; Nakatani, Y. *Cellular and Molecular Biology Letters*. **2002**, 7, 245.
80. Monnard, P.A. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2005**, 62, 520.
81. Cohen, S.; Langer, R. *Journal of Liposome Research*. **1995**, 5, 813.
82. Derycke, A.S.L.; Witte, P.A.M. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2004**, 56, 17.
83. Lichtenberg, D.; Barenholz, Y. *Methods of Biochemical Analysis*. **1988**, 33, 337.
84. Gibbs, B.F.; Kermasha, S.; Alli, I.; Mulligan, C.N. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **1999**, 50, 213.
85. Kaneda, Y. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2000**, 43, 197.
86. Minato, S.; Iwanaga, K.; Kakemi, M.; Yamashita, S.; Oku, N. *Journal of Controlled Release*. **2003**, 89, 189.
87. Weiss, J.; Takhistov, P.; McClements, D.J. *Journal of Food Science*. **2006**, 71, 107.
88. Maron, L.B.; Covas, C.P.; Silveira, N.P.; Pohlmann, A.; Mertins, O.; Tatsuo, L.N.; Sant'anna, O.A.B.; Moro, A.M.; Takata, C.S.; Araujo, P.S.; Costa, M.H.B. *Journal of Liposome Research*. **2007**, 17, 155.
89. Cevc, G.; Schatzlein, A.; Blume, G. *Journal of Controlled Release*. **1995**, 36, 3.
90. Brisaert, M.; Gabriels, M.; Matthijs, V.; Vercammen, J.P. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2001**, 26, 909.
91. Cevc, G.; Blume, G. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2001**, 1514, 191.
92. Redziniak, G. *Pathologie Biologie*. **2003**, 51, 279.
93. Cevc, G. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2004**, 56, 675.
94. Müller, R.H.; Petersen, R.D.; Hommos, A.; Pardeike, J. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2007**, 59, 522.
95. Campana Filho, S.P.; Desbrières, J. *Chitin, Chitosan and Derivatives*. In: *Natural Polymers and Agrofibrils Based Composites*. São Carlos: Suprema Gráfica, **2000**, p. 41-71.

96. Rinaudo, M. *Progress in Polymer Science*. **2006**, 31, 603.
97. Rudall, K.M.; Kenchington, W. *Biological Reviews*. **1973**, 40, 597.
98. Atkins, E.D.T. *Journal of Bioscience*. **1985**, 8, 375.
99. Canella, K.M.N.C.; Garcia, R.B. *Química Nova*. **2001**, 24, 13.
100. Austin, P.R. *Solvents for and Purification of Chitin*. USpatent 3,892,731; **1975**.
101. Austin, P.R. *Purification of Chitin*. USpatent 3,879,377; **1975**.
102. Domard, A.; Rinaudo, M. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1983**, 5, 49.
103. Methacanon, P.; Prasitsilp, M.; Pothsree, T.; Pattaraarchachai, J. *Carbohydrate Polymers*. **2003**, 52, 119.
104. Errington, N.; Harding, S.E.; Varum, K.M.; Illum, L. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1993**, 15, 113.
105. Rinaudo, M.; Pavlov, G.; Desbrières, J. *International Journal of Polymer Analytical Characterization*. **1999**, 5, 267.
106. Rinaudo, M.; Pavlov, G.; Desbrières, J. *Polymer*. **1999**, 40, 7029.
107. Mima, S.; Miya, M.; Iwamoto, R.; Yoshikama, S. *Journal of Applied Polymer Science*. **1983**, 28, 1909.
108. Wang, W.; Bo, S.; Li, S.; Qin, W. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1991**, 13, 281.
109. Prashanth, K.V.H.; Kittur, F.S.; Tharanathan, R.N. *Carbohydrate Polymers*. **2002**, 50, 27.
110. Rinaudo, M.; Le Dung, P.; Milas, M. FRpatent 9302182; **1993**.
111. Signini, R.; Campana Filho, S.P. *Polymer Bulletin*. **1999**, 42, 159.
112. Chenite, A.; Chaput, C.; Wang, D.; Combes, C.; Buschmann, M.D.; Hoemann, C.D. *Biomaterials*. **2000**, 21, 2155.
113. Chenite, A.; Buschmann, M.D.; Wang, D.; Chaput, C.; Kandani, N. *Carbohydrate Polymers*. **2001**, 46, 39.
114. Molinaro, G.; Leroux, J.C.; Damas, J.; Adam, A. *Biomaterials*. **2002**, 23, 2717.
115. Moore, G.K.; Roberts, G.A.F. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1980**, 2, 115.
116. Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycooleta, F.M.; Arguelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. *Polymer*. **2001**, 42, 3559.
117. Muzzarelli, R.A.A.; Rochetti, R. *Carbohydrate Polymers*. **1985**, 5, 461.
118. Rinaudo, M.; Le Dung, P.; Gey, C.; Milas, M. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1992**, 14, 122.
119. Saito, H.; Tabeta, R.; Ogawa, K. *Macromolecules*. **1987**, 20, 2424.
120. Raymond, L.; Morin, F.G.; Marchessault, R.H. *Carbohydrate Research*. **1993**, 246, 331.
121. Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Versali, M.F.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules*. **2000**, 1, 746.
122. Pelletier, A.; Lemire, I.; Sygusch, J.; Chornet, E.; Overend, R.P. *Biotechnology and Bioengineering*. **1990**, 36, 310.
123. Varum, K.M.; Anthonsen, M.W.; Grasdalen, H.; Smisrod, O. *Carbohydrate Research*. **1991**, 211, 17.
124. Varum, K.M.; Anthonsen, M.W.; Grasdalen, H.; Smisrod, O. *Carbohydrate Research*. **1991**, 217, 19.
125. Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Roberts, G.; Rinaudo, M. *Polymer*. **2001**, 42, 9921.
126. Berth, G.; Dautzenberg, H.; Peter, M.G. *Carbohydrate Polymers*. **1998**, 36, 205.
127. Rinaudo, M.; Milas, M.; Le Dung, P. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1993**, 15, 281.
128. Milas, M.; Rinaudo, M.; Knipper, M.; Schuppiser, J.L. *Macromolecules*. **1990**, 23, 2506.
129. Terbojevich, M.; Carraro, C.; Cosani, A.; Marsano, E. *Carbohydrate Research*. **1988**, 180, 73.
130. Mazeau, K.; Perez, S.; Rinaudo, M. *Journal of Carbohydrate Chemistry*. **2000**, 19, 1269.
131. Mazeau, K.; Rinaudo, M. *Food Hydrocolloids*. **2004**, 18, 885.
132. Brugnerotto, J.; Desbrières, J.; Heux, L.; Mazeau, K.; Rinaudo, M. *Macromolecular Symposia*. **2001**, 168, 1.

133. Philippova, O.E.; Volkov, E.V.; Sitnikova, N.L.; Khokhlov, A.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules*. **2001**, *2*, 483.
134. Roberts, G.A.F.; Domszy, J.G. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1982**, *4*, 374.
135. Tsaih, M.L.; Chen, R.H. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1997**, *20*, 233.
136. Signini, R.; Desbrières, J.; Campana Filho, S.P. *Carbohydrate Polymers*. **2000**, *43*, 351.
137. Muzzarelli, R.A.A. *Natural Chelating Polymers*. Oxford: Pergamon, **1973**.
138. Muzzarelli, R.A.A. *Chitin*. Oxford: Pergamon, **1977**.
139. Roberts, G.A.F. *Chitin Chemistry*. London: Mc Millan Press, **1992**.
140. Muzzarelli, R.A.A.; Petter, M.G. *Chitin Handbook*. European Chitin Society, **1997**.
141. Muzzarelli, R.A.A.; Pariser, E.R. *Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan*. USA: Cambridge, **1978**.
142. Domard, A.; Roberts, G.A.F.; Varum, K.M. *Advances in Chitin Chemistry*. Vol. I and II. Lyon: Jacques André Publisher, **1998**.
143. Hirano, S.; Seino, H.; Akiyama, Y.; Nonaka, I. *Polymer Engineering and Science*. **1988**, *59*, 897.
144. Sashiva, H.; Saimoto, H.; Sgigemasa, Y.; Ogawa, R.; Tokura, S. *International Journal of Biological Macromolecules*. **1990**, *12*, 295.
145. Datta, P.K.; Basu, P.S.; Datta, T.K. *Preparative Biochemistry*. **1984**, *14*, 373.
146. Hudson, S.M.; Jenkins, D.W. *Chitin and Chitosan*. In: Mark, H.F., editor. EPST. Vol. 1, 3rd ed. New York: Wiley, **2003**, p. 569-580.
147. Krajewska, B. *Enzyme and Microbial Technology*. **2004**, *35*, 126.
148. Kosyakov, V.N.; Yakovlev, N.G.; Veleshko, I.E. *Journal of Nuclear Science and Technology*. **2002**, *3*, 508.
149. Songkroach, C.; Nakbanpote, W.; Thiravetyan, P. *Process Biochemistry*. **2004**, *35*, 1553.
150. Austin, P.R.; Brine, J. *Chitin films and fibers*. Usapatent 4,029,727; **1977**.
151. Hirano, S.; Nakahira, T.; Nakagawa, M.; Kim, S.K. *Journal of Biotechnology*. **1999**, *70*, 373.
152. Yoshino, H.; Ishii, S.; Nishimura, S.; Kurita, K. *Preparation and Characterization of Mercapto-Chitin Derivatives*. In: *Advances in Chitin and Chitosan*. London and New York: Elsevier, **1992**, p. 556-564.
153. Tokura, S.; Nishi, N. *Preparation and Properties of Alkyl-Chitin Fibers*. In: *Proceedings of the International Conference of the Japanese Society of Chitin and Chitosan*. Tattori, **1982**, p. 244-247.
154. Yusof, N.L.; Wee, A.; Lim, L.Y.; Khor, E. *Journal of Biomedical Materials Research A*. **2003**, *66A*, 224.
155. Kato, Y.; Onishi, H.; Machida, Y. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. **2003**, *4*, 303.
156. Ito, M.; Matahira, Y.; Sakai, K. *The Application of Chitin-Chitosan to Bone Filling Materials*. Vol. 4. Tokyo: Nippon, **1998**, p. 142-143.
157. Ouchi, T.; Inosaka, K.; Murata, J.; Nishimoto, T.; Ohya, Y. *Polymer Preparation*. **1992**, *33*, 537.
158. Torres, M.A. *Propriedades Viscosas e Viscoelásticas de Soluções de Géis de Quitosana*. Dissertação de Mestrado. Campinas: UNICAMP, **2001**.
159. Risbud, M.; Hardikar, A.; Bhonde, R. *Journal of Bioscience*. **2000**, *1*, 25.
160. Ravi Kumar, M.N.V.; Muzzarelli, R.A.A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A.J. *Chemical Reviews*. **2004**, *104*, 6017.
161. Illum, L.; Jabbal-Gill, I.; Hinchcliffe, M.; Fisher, A.N.; Davis, S.S. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2001**, *51*, 81.
162. Janes K.A.; Calvo, P.; Alonso, M.J. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2001**, *47*, 83.
163. Gan, Q.; Wang, T. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2007**, *59*, 24.
164. Miwa, A.; Ishibe, A.; Nakano, M.; Yamahira, T.; Itai, S.; Jinno, S. *Pharmaceutical Research*. **1998**, *15*, 1844.
165. Yao, Z.; Zhang, C.; Ping, Q.; Yu, L.L. *Carbohydrate Polymers*. **2007**, *68*, 781.

166. Kaur, I.P.; Garg, A.; Singla, A.G.; Aggarwal, D. *International Journal of Pharmaceutics*. **2001**, 224, 1.
167. Dass, C.R.; Contreras, K.G.; Dunstan, D.E.; Choong, P.F.M. *Biomaterials*. **2007**, 28, 3026.
168. Diebold, Y.; Jarrin, M.; Saez, V.; Carvalho, E.L.S.; Orea, M.; Calonge, M.; Seijo, B.; Alonso, M.J. *Biomaterials*. **2007**, 28, 1553.
169. Ruel-Gariépy, E.; Leclair, G.; Hildgen, P.; Gupta, A.; Leroux, J.C. *Journal of Controlled Release*. **2002**, 82, 373.
170. Mao, H.Q.; Roy, K.; Troung-Le, V.L.; Janes, K.A.; Lin, K.Y.; Wang, Y.; August, J.T.; Leong, K.W. *Journal of Controlled Release*. **2001**, 70, 399.
171. Doares, S.H.; Syrovets, T.; Weiler, E.W.; Ryan, C.A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1995**, 92, 4095.
172. Juang, R.S.; Shao, H.J. *Water Research*. **2002**, 36, 2999.
173. Laus, R.; Geremias, R.; Vasconcelos, H.L.; Laranjeira, M.C.M.; Fávere, V.T. *Journal of Hazardous Materials*. **2007**, 149, 471.
174. Shahidi, F.; Arachchi, J.K.V.; Jeon, Y. *Trends in Food Science and Technology*. **1999**, 10, 37.
175. Wang, J.; Wang, B.; Jiang, W.; Zhao, Y. 2007; 13; 317 *Food Science and Technology International*. **2007**, 13, 317.
176. Huges, R.C. *Essays Biochemistry*. **1975**, 11, 1.
177. Sumamoto, J.; Iwamoto, K.; Kondo, H. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **1980**, 94, 1367.
178. Kato, A.; Isao, T.; Arakawa, M.; Kondo, T. *Biomaterial Medical Devices for Artificial Organs*. **1985**, 13, 61.
179. Alamelu, S.; Panduranga Rao, K. *Journal of Microencapsulation*. **1991**, 8, 505.
180. Baran, A.A. *Colloids and Surfaces*. **1988**, 31, 259.
181. Agerkvist, I.; Eriksson, L.; Enfords, S. *Enzyme and Microbial Technology*. **1990**, 12, 584.
182. Lehr, C.; Bouwstra, J.A.; Schacht, E.H.; Junginger, H.E. *International Journal of Pharmaceutics*. **1992**, 78, 43.
183. Takeuchi, H.; Matsui, Y.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. *Journal of Controlled Release*. **2003**, 86, 235.
184. Takeuchi, H.; Matsui, Y.; Sugihara, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. *International Journal of Pharmaceutics*. **2005**, 303, 160.
185. Takeuchi, H.; Thongborisute, J.; Matsui, Y.; Sugihara, H.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. *Advanced Drug Delivey Reviews*. **2005**, 57, 1583.
186. Chan, V.; Mao, H.Q.; Leong, K.W. *Langmuir*. **2001**, 17, 3749.
187. Fang, N.; Chan, V.; Mao, H.Q.; Leong, K.W. *Biomacromolecules*. **2001**, 17, 3749.
188. Fang, N.; Chan, V. *Biomacromolecules*. **2003**, 4, 581.
189. Perugini, P.; Genta, I.; Pavanetto, F.; Conti, B.; Scalia, S.; Baruffini, A. *International Journal of Pharmaceutics*. **2000**, 196, 51.
190. Guo, J.; Ping, Q.; Jiang, G.; Huang, L.; Tong, Y. *International Journal of Pharmaceutics*. **2003**, 260, 167.
191. Rengel, R.G.; Barisic, K.; Pavelic, Z.; Grubisic, T.Z.; Cepelak, I.; Filipovic-Grcic, J. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2002**, 15, 441.
192. Feng, S.S.; Ruan, G.; Li, Q.T. *Biomaterials*. **2004**, 25, 5181.
193. McPhail, D.; Tetley, L.; Dufes, C.; Uchegbu, I.F. *International Journal of Pharmaceutics*. **2000**, 200, 73.
194. Huang, Y.Z.; Gao, J.Q.; Liang, W.Q.; Nakagawa, S. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2005**, 28, 387.
195. Magdassi, S.; Bach, U.; Mumcuoglu, K.Y. *Journal of Microencapsulation*. **1997**, 14, 189.
196. Quemeneur, F.; Rammal, A.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. *Biomacromolecules*. **2007**, 8, 2512.
197. Quemeneur, F.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. *Biomacromolecules*. **2008**, 9, 396.

## Capítulo 2. Metodologias

### 2.1. Obtenção de Quitosana Fluorescente

Os grupos amino ao longo das cadeias da quitosana representam uma região de alta reatividade química.<sup>1</sup> A interação entre a quitosana e glicoproteínas tem sido estudada na investigação das propriedades mucoadesivas da quitosana, sendo que glicoproteínas formam uma camada de gel que reveste as células epiteliais das mucosas. As interações entre diferentes moléculas adesivas e as mucosas foram caracterizadas como forças de van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas.<sup>2</sup>

Qaquis e Amiji estudaram as forças de atração envolvidas na ligação entre quitosana e glicoproteínas sob diferentes condições de pH e força iônica através de espectrofotometria de fluorescência.<sup>1</sup> Para tanto, quitosana foi modificada pela reação com isotiocianato de fluoresceína (Figura 2.1), uma molécula fluorescente. No presente estudo a mesma modificação foi procedida objetivando o monitoramento da localização da quitosana por Microscopia Óptica de Fluorescência (Sessão 3.2), bem como seu efeito na dinâmica dos sistemas vesiculares investigados, através da Recuperação de Fluorescência Após Foto-branqueamento (Sessão 3.1.3.2).

A reação entre o grupo isotiocianato da fluoresceína e o grupo amino da quitosana (Figura 2.1) ocorre em meio ácido com a protonação do nitrogênio da fluoresceína que deixa o carbono do grupo isotiocianato eletronegativo. O nitrogênio da quitosana, positivamente carregado em meio ácido, é atraído pela densidade eletrônica do carbono formando a ligação N-C entre as duas moléculas.

No procedimento experimental, 1 g de quitosana (Sigma-Aldrich, 99%, 85% desacetilada) com massa molar média de 150 000 g/mol determinada conforme descrito na Sessão 2.3.1, foi dissolvido em 100 mL de solução de ácido acético (Merck) 0,1 M por agitação com barra magnética durante três horas. Da mesma forma, 40 mg de isotiocianato de fluoresceína isômero I (FITC) (Fluka BioChemika, 90%) foram dissolvidos em 40 mL de metanol (Normapur). Uma porção de 100 mL de metanol foi misturada à solução de quitosana após a dissolução do polímero para favorecer a ambientação da fluoresceína. Assim, a solução de fluoresceína em metanol foi lentamente adicionada na solução de

quitosana sob intensa agitação. O sistema permaneceu sob agitação durante uma hora na ausência de luz e na temperatura ambiente.

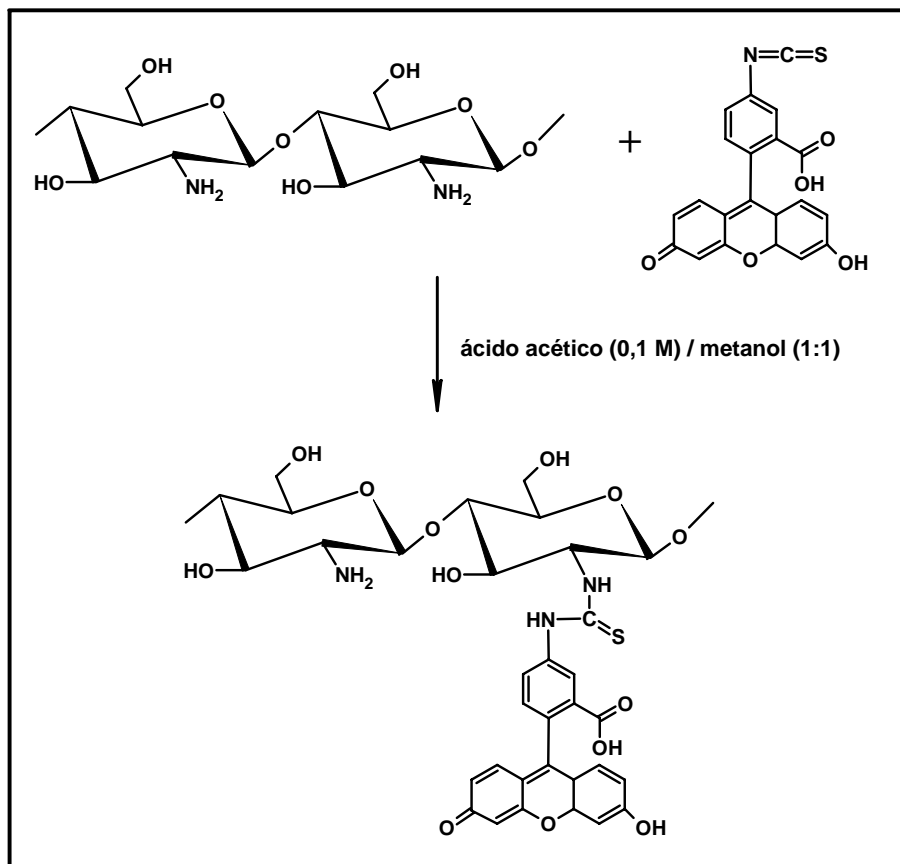


Figura 2.1. Reação entre quitosana e isotiocianato de fluoresceína com a obtenção da quitosana fluorescente.<sup>1</sup>

A concentração de FITC no meio reacional foi calculada em relação à concentração de quitosana considerando uma substituição de grupos amino protonados por grupos amino fluorescentes na relação aproximada de 1:50, ou seja, a cada 50 grupos amino, um foi modificado com a ligação à molécula fluorescente. Para isso, foi considerada uma massa molar de 150 000 g/mol e um grau de desacetilação de 85%. A massa molar do monômero desacetilado é de 161 g enquanto que a massa do monômero acetilado é de 203 g. Em uma molécula de quitosana, portanto, temos aproximadamente 792 grupos amino considerando que em 150 000 g 85% da massa representam o monômero de 161 g e 15% o monômero de

203 g. A massa de 40 mg de FITC (389 g/mol) representa uma molécula do composto para aproximadamente 50 monômeros desacetilados de quitosana.

Após a agitação, a quitosana fluorescente obtida foi precipitada em 500 mL de solução de hidróxido de sódio (Merck, 99%) 0,1 M sob agitação inicial seguida de decantação natural. Em seguida o precipitado foi separado por filtração com filtro sinterizado (porosidade G4, Schott Duran) sob vácuo e vigorosamente lavado com grande quantidade de água MilliQ até que a água de lavagem apresentou-se incolor. O precipitado de quitosana fluorescente, de coloração laranja intenso, foi seco em dessecador de silicagel (Merck) sob vácuo durante 24 horas. A massa final foi de 0,8 g representando uma recuperação de 80% da massa de quitosana. Ocorreram perdas nos processos de precipitação e filtração.

Um procedimento complementar foi efetuado para garantir o polímero livre de moléculas de fluoresceína, que poderiam não estar quimicamente ligadas na quitosana. Para isso, após a secagem, o polímero em forma de flocos foi disperso em 50 mL de metanol e permaneceu sob agitação durante 15 minutos. Em seguida a porção líquida foi separada e uma nova quantidade de metanol foi adicionada repetindo-se o processo cinco vezes. Com isso garantiu-se a separação de FITC livre, solúvel em metanol, da quitosana, insolúvel em metanol. Por fim, o polímero fluorescente foi seco no dessecador por 24 horas e após transferido para um frasco âmbar fechado e acondicionado em geladeira.

Os comprimentos de onda de excitação e emissão da quitosana fluorescente foram verificados através de espectrofotometria de fluorescência. A quitosana fluorescente foi dissolvida na solução tampão padrão, utilizada em todos os experimentos. A solução tampão de pH  $4,5 \pm 0,1$  consiste de ácido acético 0,02 M e acetato de sódio (Aldrich, 98%) 0,02 M contendo 0,1 M de NaCl (Merck, 99%). Tipicamente, para a preparação de 100 mL de solução, 0,17 g de acetato de sódio e 0,6 g de NaCl são dissolvidos em água MilliQ, 120  $\mu$ L de ácido acético são adicionados e o volume é completado e homogeneizado.

A dissolução do polímero na solução tampão, em proporção de até 2,5 mg/mL, ocorreu por agitação vigorosa com barra magnética durante 3 horas na temperatura ambiente. Em seguida, a solução de quitosana foi filtrada através de membranas hidrofílicas (Millipore) de 0,45 e 0,22  $\mu$ m de porosidade. Uma porção de 5  $\mu$ L da solução filtrada foi diluída a 3 mL com a solução tampão numa célula de quartzo e a análise dos comprimentos de onda foi procedida em espectrofluorímetro (Hitachi F-4010) na temperatura ambiente. A avaliação da perda de polímero pela filtração está descrita na Sessão 2.9.4.



## **2.2. Lipossomas e Quitossomas Nanométricos**

### **2.2.1. Método da Evaporação em Fase Reversa**

O método clássico para a produção de lipossomas nanométricos, descrito por Bangham e colaboradores,<sup>3</sup> continua sendo utilizado na pesquisa devido a sua simplicidade e baixo custo. Para contornar as desvantagens da distribuição de tamanhos elevada e tipos de lipossomas obtidos, sonicação, extrusão e ultra-agitação têm sido aplicadas para a padronização das estruturas.

Porém, esses procedimentos de pós-tratamento não resolvem um parâmetro importante para fins de aplicação. Normalmente os lipossomas preparados pelo método da hidratação do filme são caracterizados por taxas de encapsulamento de substâncias hidrofílicas geralmente inferiores a 15%.<sup>4</sup> Uma tentativa para resolver o problema do reduzido encapsulamento e da baixa proporção entre volume encapsulado e área de superfície foi proposta em 1978 por Szoka e Papahadjopoulos com o desenvolvimento do processo da evaporação em fase reversa para a produção de lipossomas unilamelares grandes.<sup>5</sup>

Nesta metodologia os seguintes passos são seguidos como ilustrado na Figura 2.2:

1. Os fosfolipídios são dissolvidos em solvente orgânico.
2. Uma porção aquosa é adicionada, ocorrendo a formação de duas fases; a tendência dos fosfolipídios é de se depositarem sobre a interface água/solvente orgânico pelas interações de polaridade das extremidades polares com a água e interações de apolaridade entre as cadeias hidrocarbonadas e o solvente orgânico.
3. A mistura é submetida à sonicação; ocorre formação de micelas reversas onde gotículas de água são cercadas pelos fosfolipídios; a mistura torna-se transparente ou opalescente, porém de aspecto homogêneo.
4. O solvente orgânico é evaporado; as micelas reversas concentram.
5. Com a eliminação total do solvente orgânico, muitas micelas colapsam e ocorre a formação de um organogel de alta viscosidade.
6. Na etapa final, sob agitação, os lipossomas são formados e o sistema torna-se um líquido leitoso; uma porção aquosa pode ser adicionada para acelerar a formação das estruturas.

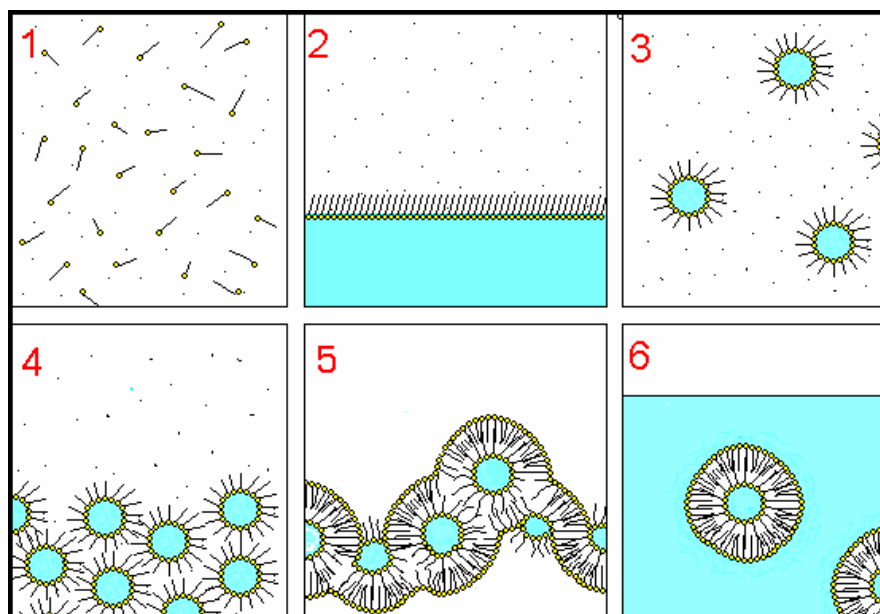


Figura 2.2. Representação das diferentes etapas do método de evaporação em fase reversa.<sup>5,6</sup>

Neste processo, substâncias hidrofílicas a serem encapsuladas nos lipossomas podem estar presentes na porção aquosa adicionada na etapa 2. A metodologia foi investigada para diferentes compostos hidrofílicos e percentuais de encapsulamento entre 24 e 68% foram observados.<sup>4,5</sup> Esses percentuais são elevados se comparados com os obtidos em outras metodologias para as mesmas substâncias e desta forma a evaporação em fase reversa continua sendo um processo de produção de lipossomas acessível caracterizado pela alta capacidade de encapsulamento.<sup>4</sup>

Analisando as desvantagens desta metodologia em relação às técnicas mais modernas, a evaporação em fase reversa necessita do uso de solvente orgânico que, apesar da evaporação na etapa 4, pode permanecer como elemento traço contaminando a região apolar da membrana dos lipossomas. Outra desvantagem é o uso da sonicação, que pode não ser adequada para determinadas moléculas que podem desestruturar ou sofrer reações indesejadas sob ação da energia dissipada.<sup>7,8</sup>

Nos trabalhos desenvolvidos com lipossomas e quitossomas nanométricos na presente Tese, o método da evaporação em fase reversa foi empregado para a incorporação da quitosana.<sup>6</sup> Enquanto a maioria dos trabalhos desenvolvidos com quitossomas prepara as vesículas separadamente e após dispersa as mesmas em solução aquosa contendo o polímero,

a adição de uma solução aquosa contendo quitosana na etapa 2 da evaporação em fase reversa permite a obtenção de quitossomas contendo polímero também no interior das estruturas (Figura 2.3).

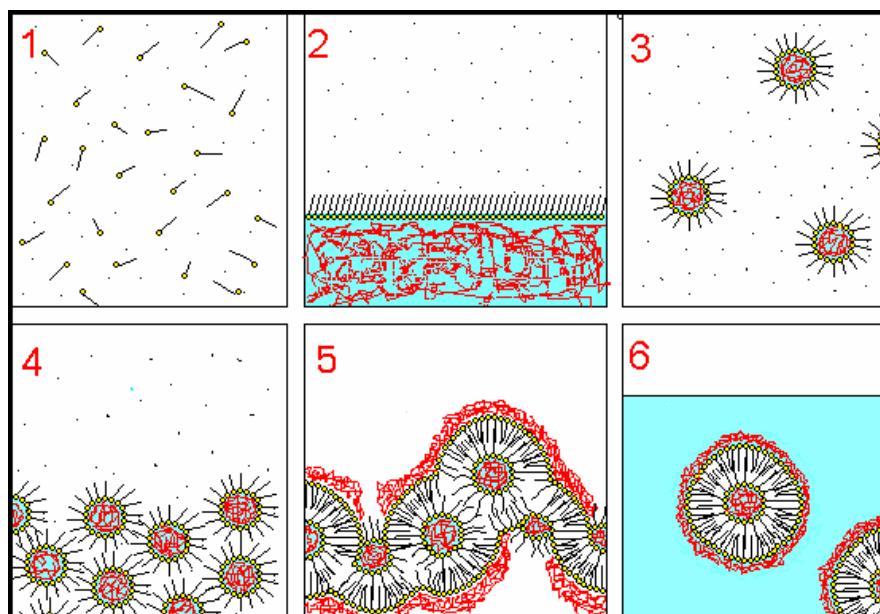


Figura 2.3. Representação das diferentes etapas do método de evaporação em fase reversa com a adição de quitosana na etapa 2.<sup>6</sup>

Para a preparação de quitossomas nanométricos, soluções de quitosana entre 0,1 e 1,0 mg/mL foram preparadas com tampão ácido acético de  $\text{pH} = 4,5 \pm 0,1$  conforme descrito na Sessão 2.1. A quitosana utilizada na maioria dos trabalhos foi obtida pela reação de hidrólise da quitina, o que foi procedido durante o desenvolvimento da Dissertação de Mestrado do mesmo autor.<sup>6</sup> A caracterização do polímero também foi feita, sendo que o grau de desacetilação de 83% foi determinado por Infra Vermelho. Quitosana comercial (Sigma-Aldrich, 99%) também foi empregada assumindo-se o grau de desacetilação de 85% conforme informado pelo fabricante. Parâmetros físicos e dinâmicos para os dois polímeros em solução foram determinados conforme descrito na Sessão 2.3.1.

O fosfolipídio fosfatidilcolina da lecitina de soja, fornecido pela Solae do Brasil S. A., foi utilizado para a preparação dos lipossomas e quitossomas nanométricos. O composto apresenta um aspecto pastoso, amarelado e higroscópico sendo que o mesmo é mantido congelado ( $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sob atmosfera inerte. O grau de pureza da fosfatidilcolina é de

aproximadamente 95% e uma estrutura característica está representada na Figura 2.4.a. A molécula representa um fosfolípídio de massa molar  $M = 790 \text{ g/mol}$ . O grau de hidratação de 6,2% foi determinado pelo método de Karl Fisher. As impurezas presentes consistem na lisofosfatidilcolina (LPC), o primeiro produto de degradação (Figura 2.4.b), e no ácido fosfatídico (DPPA) (Figura 2.4.c).

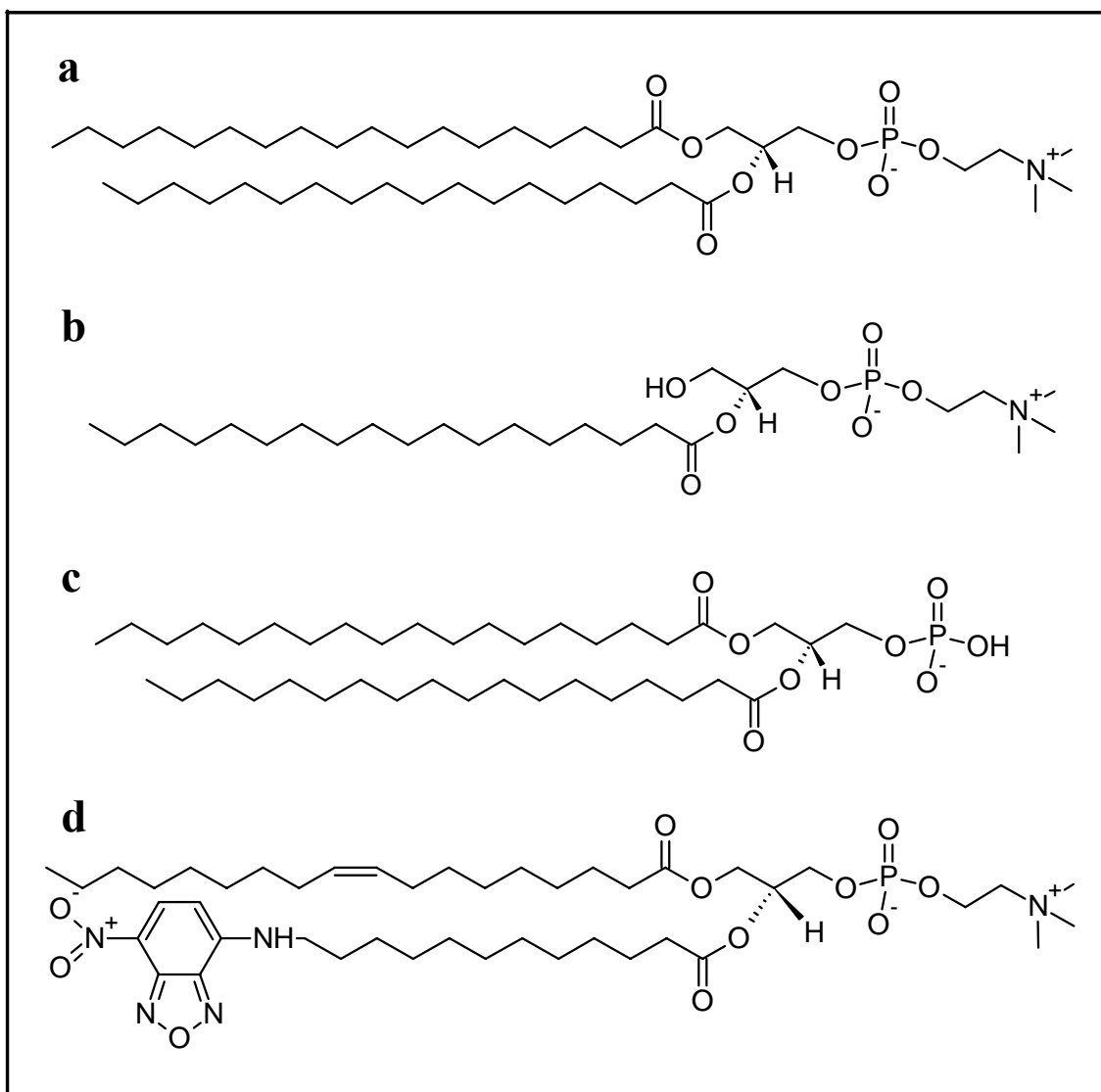


Figura 2.4. Estruturas moleculares da 1,2-diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DSPC) (a), L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina (LPC) (b), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfato (DPPA) (c) e da 1-oleoil-2-[12-[(nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoil]-*sn*-glicero-3-fosfocolina (NBDPC) (d).

A lisofosfatidilcolina é resultante da hidrólise da função éster no carbono de posição 1 ou 2 do glicerol, o que produz uma molécula com apenas uma cadeia apolar.<sup>9</sup> Sua presença aumenta consideravelmente a permeabilidade das membranas de lipossomas, diminuindo a capacidade de retenção de material encapsulado.<sup>4</sup> Além disso, possui relativa toxidez.<sup>10</sup>

O ácido fosfatídico apresenta carga negativa na região polar e pode alterar o potencial superficial das vesículas. Sua presença modifica as características de interação dos lipossomas em suspensão, podendo ser empregado para evitar processos de agregação das estruturas, sendo que as mesmas irão repelir umas as outras com a presença da carga superficial. A mesma carga também pode ser vantajosa para a promoção de interações entre os lipossomas e outras moléculas.

O grau de pureza da fosfatidilcolina foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD) com placas de sílica (Merck) através da metodologia proposta por Marinetti em que o eluente consiste numa mistura de clorofórmio, metanol e água nas proporções de 6,5:2,5:0,4.<sup>11</sup> A mistura também se mostrou eficiente para a purificação da fosfatidilcolina a partir da lecitina de soja bruta em coluna cromatográfica de sílica-gel.<sup>6,12</sup>

Para a preparação dos lipossomas, 60 mg de fosfatidilcolina foram dissolvidos em 10 mL de acetato de etila (Nuclear) ou clorofórmio (Sigma-Aldrich) em balão de fundo redondo para evaporador rotatório; 200 µL de água (MilliQ) ou de solução tampão contendo quitosana foram adicionados para produzir respectivamente lipossomas e quitossomas. A mistura foi submetida ao ultrassom de banho (Brason 1200) durante 3 minutos fornecendo dispersões opalescentes e homogêneas de micelas reversas.

O solvente orgânico foi evaporado em evaporador rotatório sob vácuo, com rotação constante e aquecimento do banho em até 35 °C. Um organogel de aspecto altamente viscoso foi obtido. Em seguida, uma porção de água pura foi adicionada e um líquido visivelmente leitoso de lipossomas ou quitossomas foi obtido sob agitação manual. A porção de água adicionada variou de acordo com a diluição necessária para a técnica de análise procedida e a mesma está descrita em cada Sessão respectiva. Para as análises de RMN, por exemplo, o gel foi diluído a 2 mL com água deuterada (Aldrich).

Estudos do efeito da filtração foram procedidos através de espalhamento de luz e SAXS.<sup>13</sup> Para isso, amostras de lipossomas e quitossomas de diferentes concentrações poliméricas foram filtradas por filtros de porosidade 0,45 e 1,20 µm (Millipore).

Estudos do efeito da ação da ultrasonicação também foram procedidos através de espalhamento de luz e microscopia eletrônica. Amostras diluídas a 5 mL foram sonicadas empregando-se um ultrassom de ponta (VibraCell 72412 tip Bioblock Scientific) com ponta de 2 mm de diâmetro aplicando-se uma energia de 50 mW, frequência nominal de 40 kHz sob amplificação de 10%. Os tempos de sonicação foram variados entre 30 segundos e 10 minutos à temperatura ambiente.

Estes foram os únicos pós-tratamentos procedidos nas vesículas. Eventualmente, as mesmas permaneceram acondicionadas em frascos fechados sob atmosfera de argônio e em geladeira durante no máximo 15 dias, porém, normalmente as análises foram procedidas logo após a preparação das amostras.

Lipossomas e quitossomas fluorescentes também foram preparados pela mesma metodologia. Para lipossomas fluorescentes uma porção de 600  $\mu\text{L}$  do fosfolipídio fluorescente 1-oleoil-2-[12-[(nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoil]-*sn*-glicero-3-fosfocolina (NBDPC, Avanti Polar Lipids, 99%) (Figura 2.4.d), dissolvido em clorofórmio à concentração de 0,1 mg/mL, foi adicionada na etapa 1 da preparação, juntamente com a fosfatidilcolina da soja dissolvida igualmente em clorofórmio. Para quitossomas fluorescentes foi utilizada a quitosana fluorescente preparada conforme descrito na Sessão 2.1 e adicionada em solução tampão na etapa 2.

### 2.3. Espalhamento de Luz

A luz pode ser descrita como uma onda eletromagnética, pois é resultante da soma vetorial do campo elétrico e do campo magnético que se propagam pelo espaço perpendicularmente entre si. Esta onda pode exercer forças elétrica e magnética em partículas carregadas e sobre dipolos magnéticos.<sup>14,15</sup>

Na interação da luz com as moléculas, o campo elétrico da luz fornece uma energia que estimula os movimentos dos elétrons. Dessa forma, os elétrons excitados comportam-se como dipolos oscilantes que emitem energia na forma de radiação para retornar ao seu estado fundamental. As possíveis interações entre a luz e uma molécula dependem da variação de energia de oscilação dos elétrons da molécula. Tipicamente, as frequências nas quais os elétrons oscilam estão na faixa de  $10^{15}$  a  $10^{16}$   $\text{s}^{-1}$ . Estas frequências correspondem àquelas da luz com comprimentos de onda na região fotoquímica de 200 a 700 nm, ou seja, nas regiões

do ultravioleta e do visível. Assim, com a indução de um momento de dipolo com a ação do campo elétrico, é produzida uma radiação eletromagnética secundária que é espalhada por uma molécula quando a mesma é iluminada com luz monocromática. O fenômeno do espalhamento de luz é, por conseguinte, uma característica da matéria.

A relação entre comprimento de onda da radiação eletromagnética incidente e o tamanho do objeto que está espalhando luz é estabelecida pelo vetor de onda  $q$ . A geometria básica do espalhamento (Figura 2.5) consiste no vetor de onda da radiação incidente sobre o objeto ( $k_i$ ) e no vetor de onda da radiação espalhada pelo objeto observado ( $k_f$ ).<sup>16-18</sup>

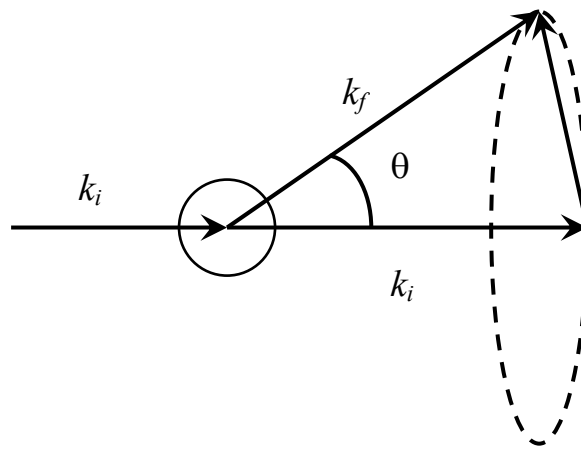


Figura 2.5. Geometria básica de espalhamento onde a radiação incidente sobre um objeto consiste num vetor de onda  $k_i$  e a radiação espalhada consiste num vetor de onda  $k_f$  num ângulo  $\theta$  em relação à radiação incidente.

Assim o vetor de onda num experimento de espalhamento é definido:

$$|q| = k_f - k_i \quad (2.1)$$

Para a luz visível, as magnitudes de  $k_i$  e  $k_f$  são respectivamente  $2\pi n/\lambda_i$  e  $2\pi n/\lambda_f$  onde  $n$  representa o índice de refração. Porém, no espalhamento definido como elástico, o comprimento de onda da radiação incidente  $\lambda_i$  é igual ou muito próximo ao da radiação espalhada  $\lambda_f$ , então:

$$|k_i| = |k_f| \quad (2.2)$$

Aplicando-se a lei dos cossenos, o vetor de onda  $q$  é calculado:<sup>16-18</sup>

$$q = 2k_i \operatorname{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) = \frac{4\pi n}{\lambda} \operatorname{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.3)$$

Na luz visível os comprimentos de onda da radiação estão entre 400 e 700 nm. As técnicas de espalhamento de luz empregam uma fonte de luz de alta intensidade, como um laser, dentro dessa faixa de comprimentos de onda. Desta forma é possível observar e caracterizar macromoléculas e estruturas particuladas que se encontram incluídas na faixa dimensional nanométrica em solução ou em suspensão num solvente apropriado.

A intensidade da luz espalhada depende da direção de polarização do feixe incidente, do ângulo de espalhamento e das características das amostras.<sup>16,19</sup>

Com a luz incidente linearmente polarizada, ou seja, com o campo elétrico incidente e espalhado perpendiculares ao plano de espalhamento, a intensidade de luz espalhada  $I_s$  por uma única molécula com dimensões muito menores do que o comprimento de onda da radiação incidente assume a forma:<sup>16,20,21</sup>

$$I_s = \frac{4\pi^2 M^2 (\operatorname{sen}^2 \phi) (dn/dc)^2 I_0}{N_A^2 \lambda^4 R^2} = \frac{SI_0}{R^2} \quad (2.4)$$

onde  $M$  é a massa molecular,  $dn/dc$  é o incremento no índice de refração da solução em que a molécula se encontra,  $I_0$  é a intensidade da luz incidente,  $N_A$  é o número de Avogadro,  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz incidente,  $R$  é a distância entre o ponto de espalhamento e o ponto de observação e  $\phi$  é o ângulo formado entre a direção de propagação da luz espalhada com o campo elétrico da radiação incidente.

A forma de aquisição da intensidade de luz espalhada por uma amostra é que define o tipo de técnica de espalhamento de luz. Quando a forma de aquisição leva em consideração as pequenas flutuações de intensidade geradas pela difusão Browniana do sistema, temos o



Espalhamento de Luz Dinâmico, também denominado de espalhamento quase-elástico. Na situação em que as flutuações de intensidade não são consideradas temos o Espalhamento de Luz Estático, também denominado de espalhamento elástico. Quando grandes modificações na frequência da luz espalhada são analisadas, temos as técnicas como Brillouin e Raman, conhecidas como formas de espalhamento inelástico.<sup>22,23</sup>

No que concerne a parâmetros dimensionais das estruturas que podem ser observadas por técnicas de espalhamento, deve-se considerar a relação inversa entre o vetor de onda  $q$  e a dimensão  $L$  do objeto. Nas condições em que  $qL > 1$ , a radiação espalhada contém informações sobre a estruturação interna de macromoléculas. Quando  $qL < 1$ , a radiação espalhada contém informações sobre a região do espaço maior do que uma macromolécula ou partícula. Já com  $qL \ll 1$ , informações de várias macromoléculas, agregados e conjuntos de partículas podem ser acessadas. Para o ajuste da condição desejada, o vetor de onda pode ser modificado pela alteração do ângulo de observação, pelo índice de refração da solução ou pelo comprimento de onda do feixe de luz empregado. Nas condições experimentais dos trabalhos desenvolvidos nesta Tese, foi estabelecida a relação  $qL \leq 1$  para as técnicas de espalhamento de luz.<sup>14,16</sup>

### 2.3.1. Espalhamento de Luz Estático

No espalhamento de luz elástico considera-se apenas a quantidade média da luz espalhada em uma determinada direção, sem levar em conta a modificação na distribuição de frequências. Neste caso, tem-se o Espalhamento de Luz Estático (*Static Light Scattering – SLS*) onde é medido o excesso de intensidade da luz espalhada por uma solução comparada à intensidade de luz espalhada pelo solvente puro.

A teoria de espalhamento de luz para líquidos puros e soluções contendo macromoléculas foi descrita por Smoluchowski, Einstein e Debye na teoria da flutuação-dissipação. A partir desta teoria a seguinte relação é estabelecida:<sup>16,18</sup>

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M} + 2A_2c + 3A_3c + \dots \quad (2.5)$$

onde  $K$  é uma constante óptica calculada a partir do incremento no índice de refração específico das amostras em solvente ( $dn/dc$ ) no mesmo comprimento de onda da luz incidente na amostra ( $\lambda_o$ ):

$$K = \frac{4\pi^2 n_o^2 (dn/dc)}{N_A \lambda_o^4} \quad (2.6)$$

$c$  é a concentração,  $R_\theta$  é a razão de Rayleigh ( $R_\theta = I_S / I_0 = 16 \pi \alpha^2 / \lambda^4 R^2$ ),  $A_2$  é o segundo coeficiente virial,  $n_o$  é o índice de refração do meio,  $I_S$  é a intensidade de luz espalhada total menos a intensidade de luz espalhada pelo solvente puro,  $I_0$  é a intensidade de luz incidente,  $\alpha$  é a polarizabilidade da molécula e  $R$  é a distância entre o detector e o centro espalhador.

Na prática a determinação do valor absoluto da intensidade primária é muito difícil, assim o  $R_\theta$  é determinado em relação à  $R_\theta$  de um padrão, como benzeno ou tolueno. Então a razão de Rayleigh é obtida:

$$R_\theta = \frac{I_{solução} - I_{solvente}}{I_{padão}} R_{\theta \text{ padrão}} \quad (2.7)$$

O segundo coeficiente virial  $A_2$  descreve o afastamento da equação limite (2.7) resultante das interações intermoleculares entre as partículas e o solvente. O terceiro coeficiente virial  $A_3$  é muito pequeno, assim como os subseqüentes, portanto podem ser desprezados.

O Espalhamento de Luz Estático é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de polímeros em solução. A técnica é considerada uma metodologia absoluta para a determinação da massa molar média de macromoléculas. Um dos métodos mais empregados para a análise da luz espalhada é a relação de Zimm:<sup>24,25</sup>

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left[ 1 + \left( \frac{R_s^2 q^2}{3} \right) \right] + 2A_2 c \quad (2.8)$$

onde  $M_w$  é a massa ponderal média e  $R_g$  é o raio de giro.

A relação de Zimm requer medidas do excesso de intensidade de luz espalhada pela solução comparada à intensidade de luz espalhada pelo solvente puro a diferentes ângulos de espalhamento e diferentes concentrações da solução polimérica. Desta forma, o conhecimento da média das intensidades espalhadas pelas  $n$  partículas contidas no volume de espalhamento, juntamente com o incremento no índice de refração polímero-solvente, fornece através do método de Zimm a massa molar ponderal média, o raio de giro e o segundo coeficiente virial.

Na prática, é traçado um gráfico de  $Kc / R_\theta$  versus  $\text{sen}^2 (\theta / 2) + kc$ , onde  $k$  é uma constante aleatória para proporcionar a separação gráfica das curvas de espalhamento individuais obtidas a diferentes concentrações. Com a extrapolação dos dados para concentração zero e ângulo zero, a massa ponderal média é obtida pela intersecção das curvas no eixo das ordenadas. Pelas inclinações das curvas desta extrapolação, também são obtidos o raio de giro e o segundo coeficiente virial.

O raio de giro descreve a distribuição estatística das distâncias entre os extremos da superfície externa de uma macromolécula ou partícula e o centro de massa. Em suma, o  $R_g$  é a medida da média dos raios da estrutura a partir do seu centro de massa. Para uma cadeia polimérica isso significa a média das distâncias de cada um dos segmentos da cadeia ao seu centro de massa.

Uma outra forma de obter o  $R_g$  de partículas em suspensão é através do método da dissimetria angular, que considera:

$$d_s(\theta) = I(\theta) / I(180^\circ - \theta) \quad (2.9)$$

onde  $I(\theta)$  é a intensidade de luz espalhada no ângulo de observação e  $I(180^\circ - \theta)$  é a intensidade de luz espalhada no ângulo de  $180^\circ$  subtraído da intensidade de luz espalhada no ângulo de observação. Pela relação:

$$d_s(\theta) \cong 1 + 2 (R_g^2 / 3) q^2 \quad (2.10)$$

obtem-se o raio de giro aproximado.<sup>6,12,13,26,27</sup>

O Espalhamento de Luz Estático, através do método de Zimm, foi utilizado para a caracterização do polímero quitosana em solução tampão. Da mesma forma como procedido para a caracterização da quitosana obtida pela hidrólise da quitina,<sup>6,26</sup> a quitosana comercial (Sigma-Aldrich) foi dissolvida na solução tampão, conforme descrito na Sessão 2.1, em concentrações variando entre 0,1 e 1,0 mg/mL. A presença de impurezas como contaminantes, poeira, fibras e partículas, prejudicam as medidas de espalhamento de luz, por isso as amostras em solução devem ser cuidadosamente filtradas e/ou centrifugadas antes da realização das medidas. Desta forma, as amostras foram filtradas a 0,45 e 0,22  $\mu\text{m}$  para cubetas ópticas e centrifugadas por 99 min a 4000 rpm (ALC Centrifuge PK120) na temperatura ambiente.

Para a obtenção do gráfico de Zimm, a intensidade da luz espalhada foi medida a temperatura de 20 °C em intervalos angulares de 10° entre os ângulos de 30° e 150° para cada amostra. O tolueno foi usado como padrão para a determinação da razão de Rayleigh. Para o cálculo da constante óptica  $K$ , o incremento no índice de refração em função da concentração foi obtido refratometricamente (Brookhaven Instruments BI-DNDCW) para as mesmas concentrações a 620 nm como  $dn/dc = 0,198 \text{ mL/g}$  a temperatura de 20 °C.<sup>6</sup>

Com a obtenção da  $M_w$  e do  $R_g$  também foi calculada a concentração crítica ( $c^*$ ) das amostras de quitosana através da relação:  $c^* = M_w / N_A R_g^3 4\pi/3$ .<sup>6,26</sup> A  $c^*$ , assim como o  $A_2$ , é um parâmetro de avaliação da qualidade do solvente para o polímero em solução. O  $A_2$  está relacionado à interação entre soluto e solvente, quanto maior o seu valor, maior será essa interação. De forma simplificada, valores positivos de  $A_2$  significam que temos um bom solvente e valores negativos significam um mau solvente, onde pode ocorrer a formação de agregados ou precipitados. Já a  $c^*$ , o inverso da viscosidade intrínseca, significa a concentração máxima do soluto no solvente em questão onde há ausência de interações entre as macromoléculas. O soluto está bem dissolvido até a  $c^*$ , ou seja, está no regime diluído. O sistema não se encontra mais em regime diluído acima da  $c^*$ . Portanto, quanto maior a  $c^*$ , melhor será o solvente para manter o sistema no regime diluído.

Este estudo detalhado do polímero em solução foi procedido nos trabalhos de Mestrado do mesmo autor,<sup>6</sup> sendo aqui novamente descrito por ter sido repetido para o polímero comercial (Sigma-Aldrich, 99%). Foi obtida uma massa molar média  $M_w = 150\,000 \text{ g/mol}$ ,  $A_2 = 1,55 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol/g}^2$ ,  $R_g = 48 \text{ nm}$  e  $c^* = 0,53 \text{ mg/mL}$ , o que demonstra que o

polímero comercial apresenta características semelhantes ao polímero obtido pela hidrólise da quitina:  $M_w = 164\,000$  g/mol,  $A_2 = 2,87 \cdot 10^{-3}$  cm<sup>3</sup>.mol/g<sup>2</sup>,  $R_g = 44$  nm e  $c^* = 0,79$  mg/mL.

O método da dissimetria angular foi empregado para a avaliação do raio de giro dos lipossomas e quitossomas nanométricos em suspensões aquosas altamente diluídas. Para tanto, o organogel obtido na etapa 5 da preparação em fase reversa (Sessão 2.2.1) foi diluído a 100 mL em água MilliQ para a formação das vesículas. Porções de 10, 50 e 100 µL foram diluídas a 10 mL de água e transferidas para as cubetas ópticas sob filtração quando requerido. A dissimetria foi medida entre os ângulos de 35° e 155° em intervalos de 10° na temperatura de 20 °C.

Medidas simples de intensidade de luz espalhada ( $I_s$ ) também foram obtidas para lipossomas e quitossomas com variação de temperatura para a determinação das temperaturas de transição de fase das bicamadas das vesículas. Para isso, porções da diluição a 100 mL foram transferidas para cubetas ópticas. O equipamento de espalhamento de luz dispõe de um sistema de circulação de água que permite, através de um banho externo acoplado (Science Electronics), submeter amostras a diferentes temperaturas. Assim, as amostras foram aquecidas entre 20 e 87 °C seguindo uma rampa de 1 °C/min com intervalos de 10 minutos a cada 2 °C quando foram efetuadas as medidas de intensidade de luz em 10 repetições a cada 0,1 minuto. As medidas foram obtidas no ângulo de espalhamento de 135°.

O equipamento de espalhamento de luz utilizado (Figura 2.6) consiste de um laser He-Ne de 35 mW e comprimento de onda de 632,8 nm, modelo 127 da Spectra-Physics acoplado a um goniômetro BI-200M versão 2.0 e com correlador digital BI-9000AT da Brookhaven Instruments.

O goniômetro é montado sobre uma base circular e conectado a um motor que permite a seleção automática dos ângulos de medida. As cubetas ópticas de vidro contendo as amostras permanecem no centro do goniômetro dentro de uma cuba também de vidro e imersas em decaidronaftaleno (Aldrich, 99%), cujo índice de refração é semelhante ao do vidro, para impedir a interferência das paredes da cubeta.

O correlador dispõe de uma fotomultiplicadora (BI-9863 Brookhaven Instruments) que faz a detecção e amplificação da luz espalhada. O sistema é ligado a um computador que através de um *software* faz a armazenagem e o tratamento dos pulsos provenientes do equipamento.

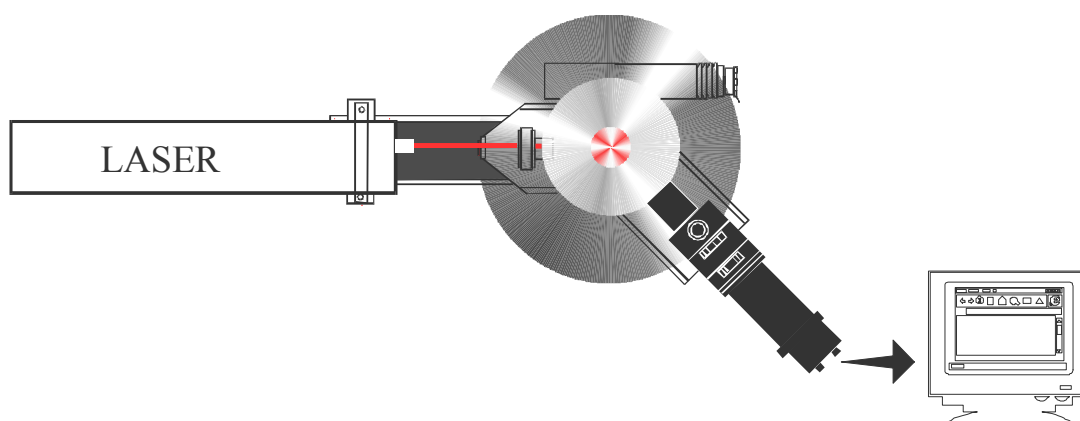


Figura 2.6. Vista superior do equipamento de espalhamento de luz. O laser incide sobre a amostra localizada no centro do goniômetro. A luz espalhada em determinado ângulo é coletada e amplificada pela fotomultiplicadora que envia os dados ao computador.

### 2.3.2. Espalhamento de Luz Dinâmico

No espalhamento quase-elástico são consideradas as pequenas variações de intensidade da luz espalhada, resultantes das flutuações do índice de refração da solução dentro do volume de espalhamento. As flutuações do índice de refração podem ser resultantes da difusão translacional das moléculas ou partículas em solução ou suspensão, o denominado movimento browniano. Essas flutuações podem ser correlacionadas e avaliadas em termos de vários processos de relaxação através de uma função de correlação temporal, obtida por um correlador, caracterizando a espectroscopia de correlação de fótons, mais conhecida com Espalhamento de Luz Dinâmico (*Dynamic Light Scattering – DLS*).<sup>17,18,20</sup>

A função de correlação temporal estabelece uma periodicidade entre os sinais de intensidade obtidos durante certo tempo, correlacionando-os, considerando que existe uma similaridade entre os movimentos das partículas que espalham luz. As flutuações de sinal podem ser registradas no domínio do tempo através de uma função de correlação de intensidade temporal  $G^{(2)}(\tau)$ :<sup>16,28</sup>

$$G^{(2)}(\tau) = \langle I(t)J(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T I(t)J(t + \tau) dt \quad (2.11)$$

onde  $I(t)$  e  $J(t)$  são sinais que dependem do tempo,  $2T$  é o período no qual é feita a medida e  $\tau$  é o tempo de retardo, cujo valor é muito pequeno se comparado ao período das flutuações.

A  $G^{(2)}(\tau)$  é chamada de função de autocorrelação de intensidades ou de correlação cruzada, dependendo se  $I(t)$  e  $J(t)$  são iguais ou diferentes, respectivamente, e a mesma pode ser relacionada com a função de correlação temporal do campo elétrico,  $|g^{(1)}(\tau)|$ , pela relação de Siegert:<sup>16,28</sup>

$$G^{(2)}(\tau) = A \left[ 1 + \beta |g^{(1)}(\tau)|^2 \right] \quad (2.12)$$

onde  $A$  é a linha de base medida e  $\beta$  é o fator de coerência óptica, um parâmetro que depende da óptica de detecção.

A função de correlação temporal pode ser aproximada a um único decaimento exponencial relacionado a uma única taxa de relaxação  $\Gamma$ :

$$G^{(2)}(\tau) = A_0 + Ae^{-\Gamma\tau} \quad (2.13)$$

Porém, a equação (2.13) é válida somente para sistemas onde as partículas, movendo-se num fluido, são rígidas, esféricas, não interatuantes e monodispersas. Como na maioria dos casos as soluções e dispersões de partículas são polidispersas, a  $G^{(2)}(\tau)$  é definida por uma distribuição de exponenciais, que podem ser representadas como uma integral de Laplace do tipo:

$$G^{(2)}(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma)e^{-\Gamma\tau} \quad (2.14)$$

Através de métodos matemáticos de análise da equação (2.14) é determinada a frequência de relaxação  $\Gamma$ . Nas rotinas mais comuns têm sido empregados os métodos dos cumulantes<sup>29,30</sup> e da inversão da integral de Laplace, sendo este último mais elaborado que os cumulantes e bastante utilizado através da análise de histograma pela amostragem

exponencial, o que foi aplicado neste trabalho através do programa computacional CONTIN.<sup>31</sup>

Com o valor de  $\Gamma$ , considerando-se  $qL < 1$  conforme discutido na Sessão 2.3, pode-se determinar o valor do coeficiente de difusão aparente:<sup>17</sup>

$$D_{ap} = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (2.15)$$

onde  $\Gamma$  corresponde a meia largura a meia altura da curva de distribuição de frequências.

O coeficiente de difusão à diluição infinita,  $D_o$ , pode ser determinado a partir da extrapolação do  $D_{ap}$  para concentração zero e  $q$  zero.  $D_o$  possui uma relação linear com o coeficiente de difusão a uma dada concentração,  $D_c$ :

$$D_c = D_o(1 + k_D c) \quad (2.16)$$

onde  $k_D$  é o coeficiente virial dinâmico relacionado com as interações termodinâmicas entre as partículas e o solvente.

Com a determinação do  $D_o$ , o raio hidrodinâmico  $R_h$  das partículas é facilmente obtido através da relação de Stokes-Einstein:<sup>17</sup>

$$D_o = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (2.17)$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura e  $\eta$  a viscosidade do solvente.

De forma hipotética, o raio hidrodinâmico define o raio de uma esfera rígida que difunde com a mesma velocidade da partícula que está sendo examinada pelo Espalhamento de Luz Dinâmico. Na prática, macromoléculas e também muitas partículas, não são rígidas, pois possuem dinâmica interna com movimentos entre cadeias que podem estender ou contrair com a difusão, por exemplo. Macromoléculas e partículas também são solvatadas, ou



seja, possuem certa interação com o meio solvente, sendo que uma porção deste último pode difundir juntamente com a partícula. Sendo assim, o raio hidrodinâmico representa o raio médio de uma partícula dentro da sua dinâmica de difusão, considerando a camada de solvatação. Em comparação com o raio de giro, o mesmo pode ser maior ou menor, dependendo das características estruturais e de interação das partículas com o solvente ou líquido de suspensão. A Figura 2.7 ilustra de forma comparativa os dois tipos de raios obtidos pelas técnicas de espalhamento de luz para duas espécies de cadeia polimérica.

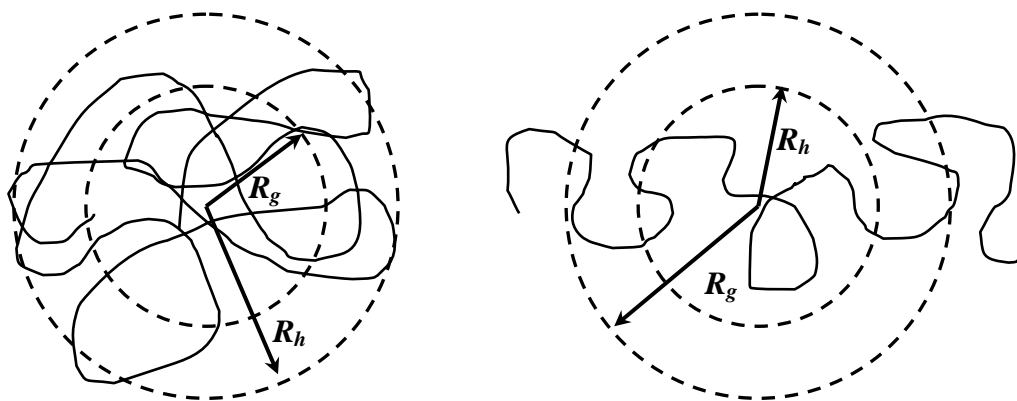


Figura 2.7. Comparação entre raio de giro ( $R_g$ ) e raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) para duas cadeias poliméricas isoladas (linhas contínuas) representando uma cadeia tipo novelo (esquerda) e uma cadeia estendida (direita).

A relação entre  $R_g$ , obtido por Espalhamento de Luz Estático (Sessão 2.3.1), e  $R_h$ , obtido por Espalhamento de Luz Dinâmico, fornece o parâmetro  $\rho = R_g / R_h$  que é um indicativo da conformação de cadeias poliméricas em solução. Um amplo estudo relacionando valores de  $\rho$  com a estruturação de polímeros em solução foi desenvolvido por Burchard e Richtering.<sup>32</sup> Assim, uma classificação do tipo de cadeia polimérica em solução tem se estabelecido em função de diferentes valores de  $\rho$ .<sup>32-35</sup>

Nas medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico, as funções de correlação temporal foram obtidas em modo multi- $\tau$  pelo correlador analógico multicanal. O correlador está acoplado ao computador que dispõe de um *software* denominado BI-ISDA, o qual contém um programa baseado em cumulantes (BI-PCS), um programa para análise exponencial múltipla (NNLS) e uma versão simplificada do programa CONTIN.<sup>31</sup> Uma

versão completa do programa CONTIN também foi aplicada para avaliação posterior dos resultados das medidas. Eventualmente o programa REPES, variante atualizado, foi aplicado para esta avaliação.<sup>8,36</sup>

Os valores de  $R_h$  foram obtidos para quitosana em solução tampão, com amostras preparadas conforme descrito na Sessão 2.3.1. Para lipossomas e quitossomas, o gel obtido na etapa 5 da preparação em fase reversa (Sessão 2.2.1) foi diluído a 100 mL em água MilliQ para a formação das vesículas. Porções de 1, 2, 3, 5 e 7 mL foram diluídas a 10 mL de água e transferidas para as cubetas ópticas sob filtração quando requerido.

Medidas efetuadas no ângulo de espalhamento de 90° forneceram  $R_h$  aparentes. Para a determinação dos  $R_h$  absolutos, medidas com variação angular entre 30° e 150° foram procedidas com amostras de diferentes concentrações e extrapoladas a ângulo e concentração zero. Para as vesículas, os valores do  $k_D$  também foram obtidos.<sup>13</sup> Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente de 20 °C no mesmo equipamento descrito na Sessão 2.3.1.

### **2.3.3. Recuperação de Fluorescência Após Foto-Branqueamento**

A Recuperação de Fluorescência Após Foto-Branqueamento (*Fluorescence Recovering After Photobleaching* – FRAP) consiste numa técnica óptica que analisa a perda de fluorescência sobre um objeto fluorescente que foi submetido a uma irradiação que induziu a perda. O foto-branqueamento significa a perda da capacidade de fluorescência de uma molécula fluorescente, que pode ser resultante de uma degradação química induzida pela exposição a um fluxo de fótons.<sup>37</sup>

De forma concisa, no processo de fluorescência um fóton é absorvido por uma molécula criando um estado eletrônico excitado. Durante o tempo de vida do estado excitado, a molécula pode experimentar mudanças conformacionais e interações com o ambiente molecular imediato. Ambos os processos modificam as probabilidades de transição para o estado fundamental e as interações moleculares podem inclusive reduzir a população de moléculas excitadas promovendo sua desativação não radioativa. No estágio final, um fóton é emitido como resposta energética e a molécula retorna ao seu estado fundamental.<sup>14</sup>

Normalmente o fenômeno de fluorescência consiste num processo reversível e assim a mesma molécula pode ser repetidamente excitada. Porém, no foto-branqueamento, a energia fornecida faz com que as moléculas no estado excitado sofram efetivamente

mudanças conformacionais, interações e reações (de oxidação, por exemplo) que levam as mesmas a um estado irreversível com a conseqüente perda da fluorescência. A taxa de perda da fluorescência é proporcional ao número de fótons recebidos, ou seja, depende da energia do foto-branqueamento e do tempo de exposição.<sup>37</sup>

A FRAP é uma técnica que se beneficia desse fenômeno com a irradiação de uma região delimitada de um material ou amostra através de um laser de alta energia (tipicamente  $1 \text{ W/mm}^2$  durante 1 segundo) que destrói a capacidade de fluorescência naquela região. Com o tempo, a região que perdeu a fluorescência acaba se homogeneizando com as regiões que continuam fluorescentes. Medindo essa “recuperação” progressiva da fluorescência, torna-se possível estudar a mobilidade de moléculas fluorescentes no sistema em análise e, por extrapolação, de todas as moléculas que o constituem. A metodologia possui uma alta versatilidade, pois medidas podem ser efetuadas em amostras líquidas ou em superfícies. A técnica tem sido empregada na determinação da difusão de polímeros e partículas em solução, bem como no estudo da mobilidade de proteínas em membranas modelo ou celulares.<sup>37-41</sup>

Dois parâmetros fundamentais podem ser determinados conforme ilustrado na Figura 2.8:

1. A quantidade de fluorescência recuperada, ou seja, o percentual de fluorescência após a homogeneização do sistema submetido a foto-branqueamento em relação à fluorescência inicial.

2. A velocidade com que as moléculas fluorescentes migram para a região que foi foto-branqueada, ou seja, a velocidade de difusão.

A forma e o tamanho da região sob foto-branqueamento dependem do aparato experimental e do tipo de amostra. A técnica pode ser aplicada em microscopia óptica de fluorescência ou em equipamento específico, semelhante ao espalhamento de luz com uso de luz laser, fotomultiplicadora e tratamento da intensidade da luz pela correlação de fótons. Neste caso, considera-se a FRAP também como uma técnica de espalhamento de luz dinâmico, mas que detecta a dinâmica de moléculas ou partículas fluorescentes.

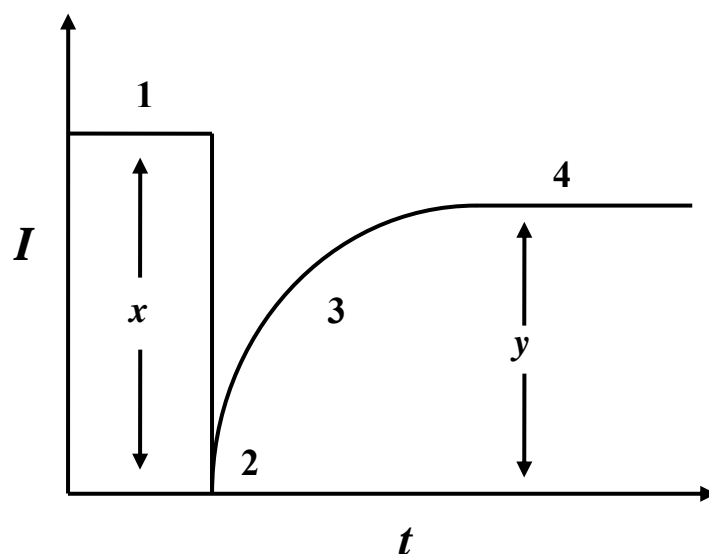


Figura 2.8. Representação gráfica do perfil da intensidade de fluorescência ( $I$ ) em função do tempo ( $t$ ) num experimento de FRAP. A linha de base (1) sofre um decaimento abrupto no momento do foto-branqueamento (2). Com o passar do tempo a intensidade de fluorescência no ponto foto-branqueado volta a aumentar com a difusão de entidades que não foram foto-branqueadas (3) até a estabilização da recuperação de fluorescência num valor constante (4) que é menor do que o inicial. A fluorescência perdida no foto-branqueamento é  $x$  e a recuperada é  $y$ . A mobilidade das entidades fluorescentes pode ser determinada pela declividade da curva 3.

Nos trabalhos aqui realizados com o uso de moléculas fluorescentes foi empregado o equipamento de FRAP representado na Figura 2.9. O feixe de luz laser de argônio de 488 nm com potência de 1 W (Spectra Physics) é dividido em dois sendo que um segmento segue uma trajetória até atingir a amostra e o outro reflete sobre um espelho localizado a uma distância variável da lâmina semi-refletora antes de ser re-orientado sobre o sistema estudado. Os dois feixes coerentes criam uma figura de grades sobre a amostra com o espaçamento entre as grades definido como:

$$i = \frac{\lambda}{2 \operatorname{sen} \frac{\theta}{2}} \quad (2.18)$$

onde  $\theta$  é o ângulo entre os dois feixes incidentes. Considerando o vetor de onda:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2} \quad (2.19)$$

temos:

$$q = \frac{2\pi}{i} \quad (2.20)$$

A intensidade dos feixes pode ser regulada e para as medidas experimentais a mesma é significativamente atenuada através de um polarizador/analizador cruzado de modo a produzir um feixe incidente de alguns miliwatts. Uma célula *Pockels* é intercalada entre o polarizador e o analisador e a mesma consiste num dispositivo dotado de um cristal orientado que, sob efeito de uma tensão elevada, torna-se fortemente birrefringente. Assim é possível controlar a polarização do feixe incidente em função da tensão. Com a aplicação de tensão nas bordas da célula é possível aumentar consideravelmente a potência incidente a partir de alguns miliwatts até algumas centenas de miliwatts produzindo-se assim, a energia necessária para o foto-branqueamento.

O espelho refletor está sobre um cristal sobre o qual é possível aplicar uma tensão senoidal o que resulta na variação da defasagem entre os dois feixes e tem como resultado a oscilação da posição da grade de foto-branqueamento sobre a amostra sem, no entanto, variar as distâncias entre as barras da grade. A fluorescência emitida pela amostra é integrada e coletada por uma fibra óptica para a fotomultiplicadora.

Na prática a experiência passa pelas seguintes etapas:

1. Antes do foto-branqueamento as estruturas ou moléculas fluorescentes estão homogeneamente distribuídas no volume da amostra.

2. A intensidade luminosa sobre a amostra aumenta consideravelmente por um instante; uma tensão de alta frequência é aplicada na célula *Pockels* alterando a polarização do feixe que por consequência incide sobre a amostra em alta intensidade e assim as partículas iluminadas são foto-branqueadas; as grades do foto-branqueamento são

“impressas” sobre a amostra; a eficácia do foto-branqueamento depende de fatores como a intensidade de irradiação, a concentração de moléculas fluorescentes e ordem da reação química envolvida no processo de perda da fluorescência; conseqüentemente, o perfil da concentração de partículas fluorescentes logo após o foto-branqueamento é periódico, porém mais complexo do que uma senoidal; mesmo assim, por razões de simplicidade, é assumido um perfil senoidal.

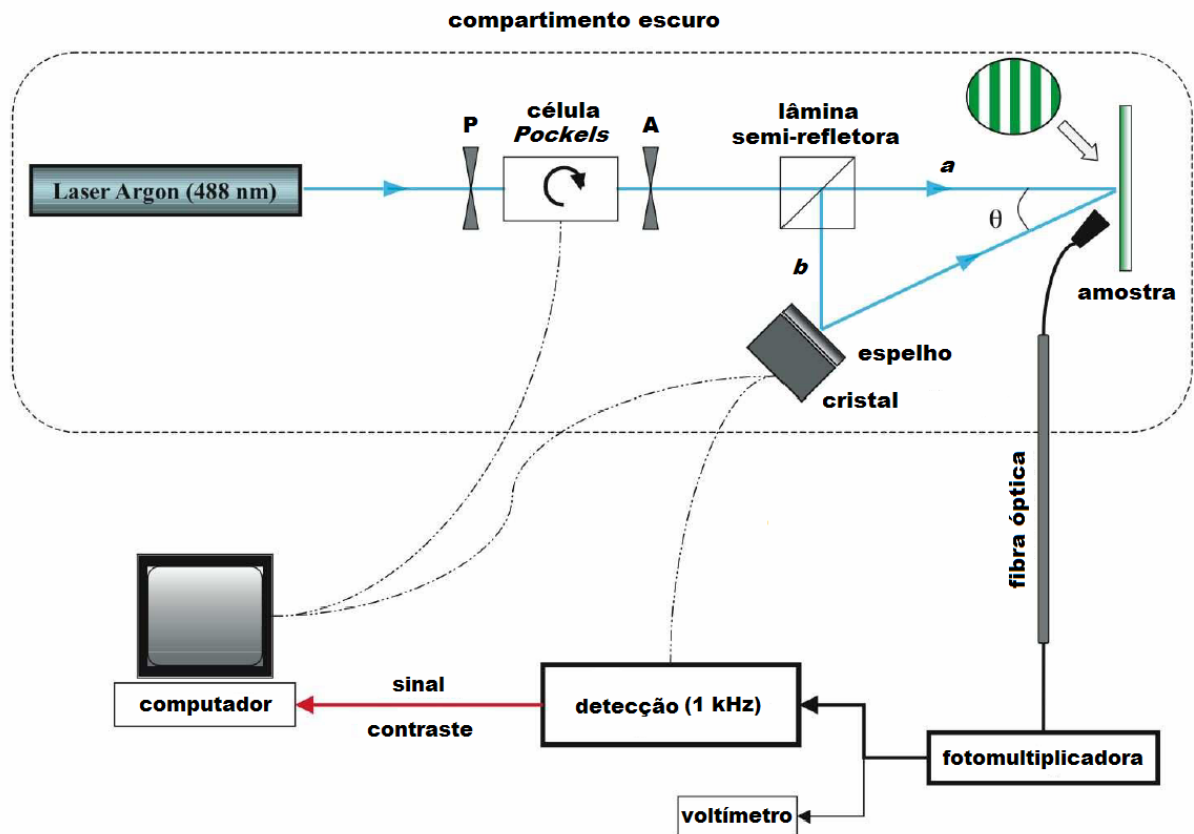


Figura 2.9. Representação esquemática do equipamento de FRAP. As distâncias  $a$  e  $b$  são reguláveis.

3. O feixe retorna à sua intensidade inicial interrompendo o foto-branqueamento; o cristal é submetido a uma tensão senoidal de frequência 1 kHz que provoca as oscilações da grade sobre diferentes regiões da amostra; as posições em fase (foto-branqueamento) e fora de fase (intensidade irradiada mínima, sem foto-branqueamento) se alternam; assim, a intensidade coletada pela fibra óptica é revezada pela intensidade máxima ( $I_{max}$ ) e pela intensidade mínima ( $I_{min}$ ) e a diferença entre as duas fornece o contraste produzido pela grade; uma detecção sincronizada permite a filtração do sinal recebido que é restringido à

freqüência característica de vibração de 1 kHz, o que permite uma redução considerável no ruído de fundo melhorando a qualidade das medidas.

Após o foto-branqueamento, as moléculas ou partículas branqueadas bem como as fluorescentes difundem pelo movimento Browniano passando de uma grade para outra. A fluorescência é re-homogeneizada e o contraste das grades diminui com um tempo característico relacionado com a difusão das partículas.

Considerando a difusão Browniana, a equação de conservação do número de moléculas fluorescentes associadas à lei fenomenológica de Fick fornece a equação que rege a difusão no sistema:

$$\frac{dc(\vec{r}, t)}{dt} = D\Delta c(\vec{r}, t) \quad (2.21)$$

onde  $c(\vec{r}, t)$  é a concentração local de moléculas fluorescentes e  $D$  é o coeficiente de difusão das mesmas.

Supondo um meio infinito, pela transformada de Fourier da equação (2.21) temos:

$$\frac{dc(\vec{q}, t)}{dt} = -q^2 Dc(\vec{q}, t) \quad (2.22)$$

sendo  $c(\vec{q}, t) = (2\pi)^{2/3} \int c(\vec{r}, t) e^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} d^3r$ .

A resolução da equação (2.22) fornece:

$$c(\vec{q}, t) = c(\vec{q}, 0) e^{-Dq^2 t} \quad (2.23)$$

onde  $c(\vec{q}, 0)$  é a concentração de moléculas fluorescentes no espaço de Fourier no tempo  $t=0$ , ou seja, imediatamente após o foto branqueamento.

Por conseguinte, a forma da região foto branqueada assume um papel muito importante. Na maioria das técnicas essa forma é uma mancha correspondente à forma da

fonte que ilumina a amostra, como o feixe do laser ou o diafragma no microscópio. Neste caso a concentração em moléculas fluorescentes  $c(\vec{q},0)$  é semelhante a uma gaussiana; uma infinidade de modos de  $q$  são excitados e evoluem simultaneamente com tempos característicos diferentes tornando a análise dos dados extremamente complexa.

Por outro lado, o equipamento de FRAP utilizado na presente Tese, com foto-branqueamento em forma de grades e medidas de intensidade conforme descrito acima, permite medidas dos coeficientes de difusão com alta precisão. Mesmo com a presença de uma infinidade de modos, tendo cada um seus tempos de recuperação de fluorescência característicos, a leitura através de uma figura em forma de grades de interferência permite a seleção de um único valor de  $q$ . Assim, para um sistema uniforme de apenas um componente, o sinal de recuperação de fluorescência coletado evolui com um tempo característico bem definido:

$$\tau_q = \frac{1}{Dq^2} \quad (2.24)$$

As curvas de recuperação de fluorescência obtidas são ajustadas pela equação:

$$C(t) = C_\infty + (C_0 - C_\infty)e\left(\frac{-t}{\tau_q}\right) \quad (2.25)$$

onde  $C_0$  e  $C_\infty$  são respectivamente os contrastes logo após e um tempo infinitamente depois da iluminação laser do foto-branqueamento. Desta forma é determinado o tempo de recuperação de fluorescência  $\tau_q$  com uma precisão superior à das medidas convencionais.

Lecuyer constatou o bom funcionamento deste equipamento de FRAP durante seus trabalhos de doutoramento. A pesquisadora verificou a lei de Stokes-Einstein, equação (2.17), através de medidas de foto-branqueamento de esferas fluorescentes comerciais de tamanhos padronizados. O resultado experimental obtido para o coeficiente de Stokes foi de  $2,17 \pm 0,37 \times 10^{-19} \text{ m}^3/\text{s}$ , bem próximo ao teórico,  $2,45 \times 10^{-19} \text{ m}^3/\text{s}$ .<sup>37</sup>

Nos trabalhos desenvolvidos na presente Tese, foram analisados os coeficientes de difusão de amostras de lipossomas e quitossomas fluorescentes em suspensão aquosa (Sessão



2.2.1), bem como de quitosana fluorescente em solução tampão (Sessão 2.1). Para as vesículas, o organogel obtido na etapa 5 da preparação em fase reversa contendo NBDPC ou quitosana fluorescente, foi dissolvido em 5 mL de água. Como pós-tratamento foi adotado um procedimento de ultrasonicação através do uso de um ultrasonicador de ponta, conforme descrito na Sessão 2.2.1, sendo que as amostras consideradas ideais para as medidas de FRAP foram sonicadas durante 5 minutos. Após, uma alíquota de 10  $\mu$ L de cada amostra foi diluída em 3 mL de água MilliQ em cubeta de quartzo para a realização das medidas. Para a quitosana foi utilizada a mesma diluição descrita na Sessão 2.1 igualmente em cubeta de quartzo. As medidas foram procedidas na temperatura ambiente (23-25 °C).

## 2.4. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

O Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (*Small Angle X-ray Scattering* – SAXS) representa uma das técnicas mais adequadas para estudos estruturais a nível atômico e molecular. A ordem dos comprimentos de onda dos raios-X está dentro do intervalo de alguns ângstrons até algumas centenas de ângstrons.

O SAXS consiste num processo de espalhamento elástico que ocorre quando os raios-X de alta energia (da ordem de 1,5 Å) atingem um material e interagem com os elétrons do mesmo.<sup>42</sup> A radiação espalhada pelos elétrons nesse caso é isotrópica e as ondas espalhadas interferem entre si de forma construtiva ou destrutiva, dependendo da fase relativa das diferentes ondas. As interferências produzidas dependem das relativas posições atômicas e por conseqüência, a amplitude e intensidade da onda difratada em uma determinada direção estarão relacionadas com a distribuição espacial dos átomos do material.<sup>43</sup> Quando existe alta organização a nível atômico, com todas as unidades espalhantes em fase, ocorre um espalhamento cooperativo que produz um perfil de difração onde as chamadas reflexões de Bragg apresentam uma alta definição. Num material que apresenta desorganização a nível atômico, as unidades espalhantes estarão fora de fase, o que resulta num espalhamento difuso ou não-cooperativo e de baixa intensidade, ocorrendo numa ampla faixa angular.<sup>44</sup>

Para a situação onde todas as ondas estão exatamente em fase, a curva de espalhamento em função do ângulo tem um máximo em zero e a mesma decresce suavemente à medida que o ângulo aumenta. Supondo os centros espalhantes no vácuo, a

amplitude de espalhamento é proporcional ao número de mols de elétrons por unidade de volume, ou seja, à densidade eletrônica. Com os centros espalhadores imersos em outro meio, apenas a diferença de densidade eletrônica entre os meios será considerada. Neste caso, os centros espalhadores são vistos como inomogeneidades de densidade eletrônica. No caso de análise de partículas em suspensão ou em solvente, o espalhamento é resultante do contraste de densidade eletrônica entre a partícula e o solvente. Este contraste pode ser muito fraco para alguns sistemas constituídos de átomos leves como H, C, N, O e P, constituintes de muitas macromoléculas biológicas de interesse. Para os casos de contraste fraco, a utilização de raios-X provenientes de radiação síncrotron possibilita a realização de medidas com maior eficiência devido ao alto fluxo do feixe que incide sobre o material.<sup>45</sup>

A amplitude de uma onda espalhada elasticamente na direção do vetor de espalhamento  $q$  por um átomo localizado na posição  $r$  pode ser definida como:

$$A(\vec{q}) = \rho(\vec{r})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} \quad (2.26)$$

onde  $\rho(r)$  é a densidade eletrônica média do sistema.

A amplitude total espalhada na direção do vetor  $q$  é a integração das ondas espalhadas por todos os átomos da amostra:

$$F(\vec{q}) = \int \rho(\vec{r})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} d\vec{r} \quad (2.27)$$

Portanto, essa amplitude, mais conhecida como fator forma, é a transformada de Fourier da distribuição eletrônica da amostra. O SAXS fornece a intensidade da onda representada pelo módulo ao quadrado do fator forma:

$$I(\vec{q}) = |F(\vec{q})|^2 = \int \rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_2)e^{-i\vec{q}\cdot(\vec{r}_1-\vec{r}_2)} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \quad (2.28)$$

Introduzindo-se a função  $\Delta\bar{\rho}^2(r)$  como uma integral de convolução:

$$\Delta\bar{\rho}^2(r) = \int \rho(\vec{r}_1)\rho(\vec{r}_1 - \vec{r})d\vec{r}_1 \quad (2.29)$$

temos que:

$$I(\vec{q}) = \int \Delta\bar{\rho}^2(\vec{r})e^{-i\vec{q}\cdot\vec{r}} d\vec{r} \quad (2.30)$$

Calculando a média do fator de fase considerando um sistema com simetria esférica, temos:

$$I(q) = \int 4\pi p(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} dr \quad (2.31)$$

onde  $p(r) = r^2\Delta\bar{\rho}^2(r)$  é a função de autocorrelação (*pair distance distribution function*) que expressa a probabilidade de encontrar um par de elétrons separados pela distância  $r$ .

Com a introdução da integral de convolução no cálculo, é considerada a diferença de densidade eletrônica que expressa as inomogeneidades dos centros espalhadores imersos em outro meio. Como resultado, o espalhamento vai ser mais intenso quanto maior for o contraste entre as inomogeneidades e o meio.<sup>45</sup>

Para o tratamento das medidas de SAXS é determinado a  $p(r)$  pela transformada de Fourier da  $I(q)$  medida, e pela deconvolução de  $\Delta\bar{\rho}^2(r)$  é deduzida a distribuição de densidade eletrônica do sistema. Programas computacionais de rotinas numéricas como a transformação de Fourier indireta e a técnica de convolução da raiz quadrada (DECON), podem ser aplicados.<sup>46</sup>

A estrutura em bicamadas ou lamelas apresentada pelos sistemas vesiculares aqui estudados, representa um sistema de relativo ordenamento atômico com unidades de repetição da ordem de alguns angstroms. A Figura 2.10 representa uma camada ordenada com distância de repetição  $d$  submetida a um feixe de radiação de comprimento de onda  $\lambda$  que incide em uma direção que forma um ângulo  $\theta$  com os planos do ordenamento. Interferências construtivas entre os feixes refletidos irão ocorrer se todos os parâmetros satisfazem a

condições de Bragg, ou seja, quando  $2d\text{sen}\theta$  for igual a um número inteiro vezes o comprimento de onda.<sup>42,43</sup>

$$2d\text{sen}\theta = n\lambda \quad (2.32)$$

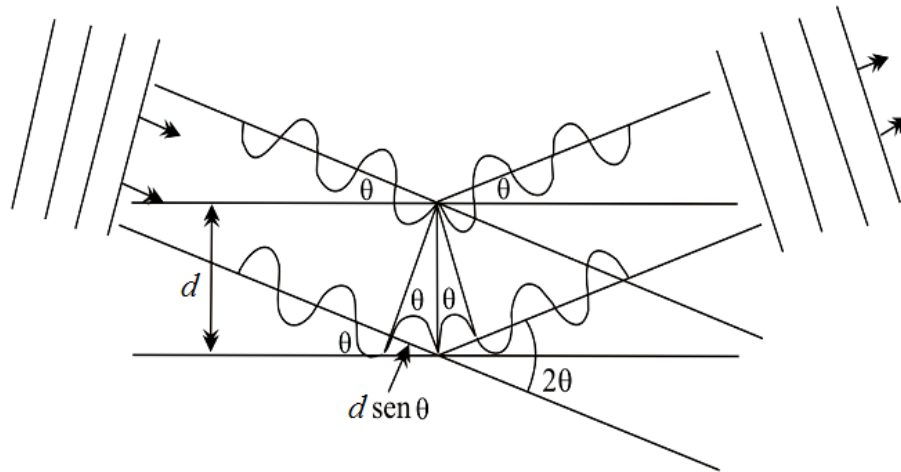


Figura 2.10. Representação esquemática da geometria de difração de raios-X sobre uma camada ordenada com distância de repetição  $d$ .

Os feixes incidente e difratados são especificados pelos seus vetores de onda, cujos módulos são  $|\vec{k}_i| = |\vec{k}_s| = 2\pi / \lambda$ . A intensidade difratada pode ser traçada como uma função do vetor de espalhamento  $q$ , que representa a mudança no vetor de onda do feixe difratado. Assim, o módulo do vetor de onda fornece:

$$q = 4\pi \text{sen } \theta / \lambda \quad (2.33)$$

No SAXS, os valores de  $q$  são menores do que  $0,1 \text{ \AA}^{-1}$  o que significa valores de  $\theta$  em torno de  $1^\circ$ .

Uma equação equivalente para a lei de Bragg é definida como:

$$q = n (2\pi / d) \quad (2.34)$$

Considerando uma série de planos ou bicamadas igualmente espaçados, a intensidade espalhada  $I(q)$  é quase sempre zero, exceto onde a lei de Bragg é satisfeita. Nesta condição o perfil de difração fornece uma série de picos igualmente espaçados a uma distância  $2\pi/d$  ao longo de uma direção normal aos planos.<sup>43</sup>

Para um sistema constituído de muitos microdomínios, com diversas orientações distribuídas aleatoriamente, as condições de Bragg serão satisfeitas para todos os valores de  $n$  e assim todos os picos de difração serão obtidos. Cada projeção em duas dimensões estará num anel em torno do feixe incidente, já que o sistema representa muitos domínios diferentes alinhados a um determinado ângulo  $\theta_n$ , com ângulos aleatórios de rotação em torno do feixe. A média é equivalente a rodar o vetor  $q$  em torno do feixe incidente  $k_i$ , produzindo um anel de possíveis feixes espalhados  $k_s$ , para cada pico de Bragg. Consequentemente, tais projeções de difração são intrinsicamente unidimensionais e especificadas pelo raio de vários anéis, ou seja, os ângulos de difração  $2\theta$ . Assim, a intensidade medida no detector de SAXS varia somente com a magnitude de  $q$ , não com sua direção. Portanto, o perfil de espalhamento pode ser representado por um gráfico de  $I(q)$  versus  $q$ .<sup>16,43</sup>

Em sistemas vesiculares multilamelares ou de multicamadas com distância de repetição da ordem de 60 Å, a primeira ordem de difração que representa o primeiro pico de Bragg com  $n = 1$ , é observada em torno de  $2\theta = 1,5^\circ$  numa radiação incidente de  $\lambda = 1,54$  Å.

Considerando o interior da dupla camada fosfolipídica, a matriz dos grupos metilenos das cadeias hidrocarbonadas também constitui uma estrutura ordenada dentro dos sistemas de vesículas. O espaçamento entre as cadeias hidrocarbonadas, menor do que o espaçamento interlamelar, apresenta valores da ordem de 5 Å. Nas mesmas condições anteriores, a primeira ordem de difração neste caso é observada em torno de  $2\theta = 22^\circ$ , que não é mais considerado baixo ângulo e sim alto ângulo, o que caracteriza a geometria de outra técnica.<sup>45</sup>

O SAXS foi empregado para uma avaliação criteriosa das distâncias de repetição das bicamadas dos lipossomas e quitossomas com o objetivo de investigar as modificações provocadas pela presença do polímero. Os estudos foram procedidos num primeiro momento na temperatura constante de 20 °C. Numa segunda abordagem, foi estudada a transição de fase da bicamada das vesículas sob temperatura crescente.

As amostras de lipossomas e quitossomas foram preparadas conforme descrito na Sessão 2.2.1 sendo que o gel obtido na etapa 5 da preparação foi diluído em 10 mL de água MilliQ. Amostras não filtradas e filtradas a 1,20 ou 0,45  $\mu\text{m}$  foram obtidas. Para quitossomas, as concentrações de polímero de 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 mg/mL na solução tampão adicionada na etapa 2, foram preparadas fornecendo amostras de variadas concentrações poliméricas. Para o estudo da transição de fase, o gel também foi diluído a 10 mL, porém apenas uma amostra de lipossomas e uma de quitossomas com a maior concentração polimérica foram preparadas e sem o uso da filtração no final. As amostras foram mantidas em frascos âmbar sob atmosfera de argônio até a hora das medidas, normalmente entre 24 e 48 horas após a preparação.

Todas as medidas foram realizadas na linha de luz SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). As amostras foram introduzidas por meio de seringa em porta-amostras de aço inoxidável de aproximadamente 0,5 mL com janelas de mica<sup>47</sup> e termostatizadas a  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O tempo de exposição foi de 15 minutos. Para o estudo da transição de fase, foi aplicada uma rampa de aquecimento semelhante à rampa aplicada no mesmo estudo pelo Espalhamento de Luz Estático (Sessão 3.1.2.1), com tempo de exposição de 10 minutos a cada  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O comprimento de onda da radiação incidente foi de  $1,605\text{ \AA}$  e o detector linear (Princeton Instruments) foi posicionado a 43,5 cm da amostra, correspondendo a uma região de  $q$  entre 0,01 e  $0,4\text{ \AA}^{-1}$ . As intensidades foram corrigidas com relação à resposta do detector, aos sinais de corrente escura, bem como para a transmissão da amostra e o espalhamento de fundo. Os perfis de difração obtidos pelo SAXS em  $I(q)$  versus  $q$  foram analisados por funções Lorentzianas através do *software* Microcal Origin.<sup>6,13,26</sup>

As distâncias de repetição  $d$  foram determinadas através da relação de Bragg (2.34) para o primeiro pico de difração. O número médio das distâncias de repetição  $\langle N \rangle$  para cada vesícula também foi determinado através da metodologia proposta por Bouwstra e colaboradores, que emprega a largura à meia altura do primeiro pico de difração.<sup>48</sup>

Os empilhados de bicamadas fosfolipídicas apresentados por sistemas multilamelares produzem um efeito considerável no padrão de difração do SAXS. Neste caso as curvas de difração também dependem das diferenças de fase introduzidas nas ondas difratadas pela sobreposição das bicamadas da membrana. Assim, para a intensidade, o fator forma é multiplicado por uma função de interferência que depende unicamente do número das distâncias de repetição  $N$  e da distância de repetição  $d$ :

$$I(\vec{q}) = |F(\vec{q})|^2 \times \sum \left[ W_N \text{sen}^2\left(\frac{1}{2} Nqd\right) / \text{sen}^2\left(\frac{1}{2} qd\right) \right] \quad (2.35)$$

onde  $W_N$  é a fração de vesículas com  $N$  bicamadas e  $\sum W_N$  é igual a 1.<sup>48</sup>

Numa sobreposição de bicamadas ideal, onde não existem distorções ou ondulações, a amplitude da função de interferência é igual a  $N^2$  e com isso a largura à meia altura do primeiro pico de Bragg assume  $2\pi/Nd$ , sendo portanto, inversamente proporcional ao número de bicamadas na vesícula. Desta forma, foi calculado o número médio das bicamadas  $\langle N \rangle$  nas vesículas multilamelares. A partir deste resultado, bem como do resultado de  $R_g$  obtido por Espalhamento de Luz, também foi possível calcular a média do diâmetro do núcleo aquoso  $D_n$  no interior das vesículas, pela relação:

$$D_n = 2R_g - (2d \langle N \rangle) \quad (2.36)$$

e conseqüentemente, o volume médio encapsulado também pôde ser calculado:

$$V = 4/3 \pi (D_n/2)^3 \quad (2.37)$$

## 2.5. Microscopia Óptica

A Microscopia Óptica foi empregada para uma avaliação microscópica das vesículas estudadas através de um microscópio óptico convencional. Numa análise preliminar de lipossomas e quitossomas foi utilizado um Olympus BX-43 sob luz normal, para observação direta, e sob luz polarizada, para a caracterização das cruces de Malta, as quais indicam a organização lamelar.<sup>49</sup> O microscópio dispõe de objetivas de 10X e 40X. As imagens foram registradas através de uma câmera fotográfica (Olympus PM20), com controlador de tempo de exposição, acoplada ao microscópio.

As amostras foram preparadas da mesma forma como para as medidas de SAXS, porém no momento da visualização, uma pequena alíquota de cada amostra concentrada foi depositada sobre uma lâmina de vidro apropriada de 10x3 cm, uma porção considerável de água MilliQ foi adicionada para dispersão da amostra e uma outra lâmina foi sobreposta. Amostras de lipossomas e quitossomas (contendo a maior concentração polimérica) não filtrados e filtrados a 0,45  $\mu\text{m}$  foram observadas na temperatura ambiente (20 °C).

## **2.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Estudos de crio-Microscopia Eletrônica de Transmissão (*cryo-Transmission Electronic Microscopy* – cryo-TEM) foram efetuados para a investigação estrutural de lipossomas e quitossomas, bem como para avaliar o efeito da ultrasonicação na morfologia, nos tamanhos e na distribuição de tamanhos das vesículas.

As vesículas observadas por crio-microscopia eletrônica apresentam imagens em forma de discos. O contraste entre as vesículas e o fundo ocorre por espalhamento de elétrons pela matéria e o mesmo é diretamente proporcional ao número atômico. Sendo assim, não existe emprego de agente contrastante nesta técnica. A imagem observada é a projeção em duas dimensões de um objeto em três dimensões. A mesma é obtida quando um feixe de elétrons atravessa uma vesícula tangencialmente ao seu volume. Os elétrons interagem com as moléculas que a constituem, produzindo um contraste mais elevado nas bordas da vesícula (a membrana), que conseqüentemente é visualizada como um anel cinza.

As amostras de lipossomas e quitossomas contendo a maior concentração de polímero foram preparadas conforme descrito na Sessão 2.2.1. O gel obtido na etapa 5 foi diluído em 5 mL de água MilliQ. Amostras sonicadas durante 5 minutos e amostras sem nenhum pós-tratamento foram observadas. Para a preparação das mesmas para a observação no microscópio eletrônico, algumas gotas da dispersão foram depositadas sobre um suporte poroso. O excesso foi absorvido com material absorvente. Em seguida, o suporte contendo amostra foi mergulhado em nitrogênio líquido e seguiu-se o procedimento habitual de Microscopia Eletrônica de Transmissão.



## 2.7. Potencial Zeta

Sistemas coloidais como lipossomas em suspensão aquosa podem apresentar comportamentos variados no que concerne a fenômenos de agregação. Uma forma de investigar a relativa estabilidade coloidal dessas partículas é determinar o Potencial Zeta das mesmas que, dependendo da sua intensidade, pode contribuir significativamente nos processos de agregação ou não agregação.

A presença de uma carga superficial em partículas suspensas num líquido afeta a distribuição de íons que estão numa região muito próxima da partícula, ou seja, na interface entre a superfície da partícula e o meio de suspensão. O efeito resultante é um acúmulo de íons de carga oposta à carga da superfície, na região que cerca a partícula. Esses íons acabam formando uma “camada elétrica” que reveste a partícula e a mesma é dividida em duas partes (Figura 2.11): uma camada interna, onde os íons estão fortemente ligados à partícula, e uma camada externa, onde os íons difundem e estão fracamente ligados. A camada externa representa uma barreira de proteção dentro da qual a partícula e os íons formam uma entidade com relativa estabilidade iônica. Quando a partícula difunde no líquido, sob ação de uma diferença de potencial na ordem de 150 V, os íons contidos dentro dessa barreira difundem juntamente com a partícula, o que não acontece com os íons externos à barreira. O potencial que existe nesta barreira é denominado de potencial eletrocinético, mais conhecido como Potencial Zeta.<sup>50</sup>

Potencial Zeta é, portanto, a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada externa. A magnitude deste potencial permite uma avaliação da estabilidade das partículas em suspensão considerando que, se todas as partículas apresentam um valor altamente positivo ou altamente negativo de Potencial Zeta, elas irão repelir umas às outras evitando a agregação. No caso de valores de Potencial Zeta muito baixos, próximos à zero, a ausência de carga superficial pode favorecer, em alguns casos, interações entre partículas o que promove processos de floculação ou agregação. De forma geral, a fronteira entre suspensões estáveis e não estáveis é considerada como sendo o valor de Potencial Zeta de  $\pm 30$  mV. Sendo assim, suspensões com valores acima de +30 mV, bem como com valores inferiores a -30 mV, são consideradas estáveis. Já as suspensões com valores entre -30 e +30 mV são instáveis, sendo o valor de 0 mV como o de maior instabilidade, o chamado ponto isoelétrico.<sup>50</sup> Evidentemente essa não é uma regra, considerando que partículas também podem ser preparadas com materiais que proporcionam um impedimento estérico que

desfavorece fenômenos de agregação. Assim, as especificidades de cada sistema devem ser avaliadas para conclusões a respeito de estabilidade.

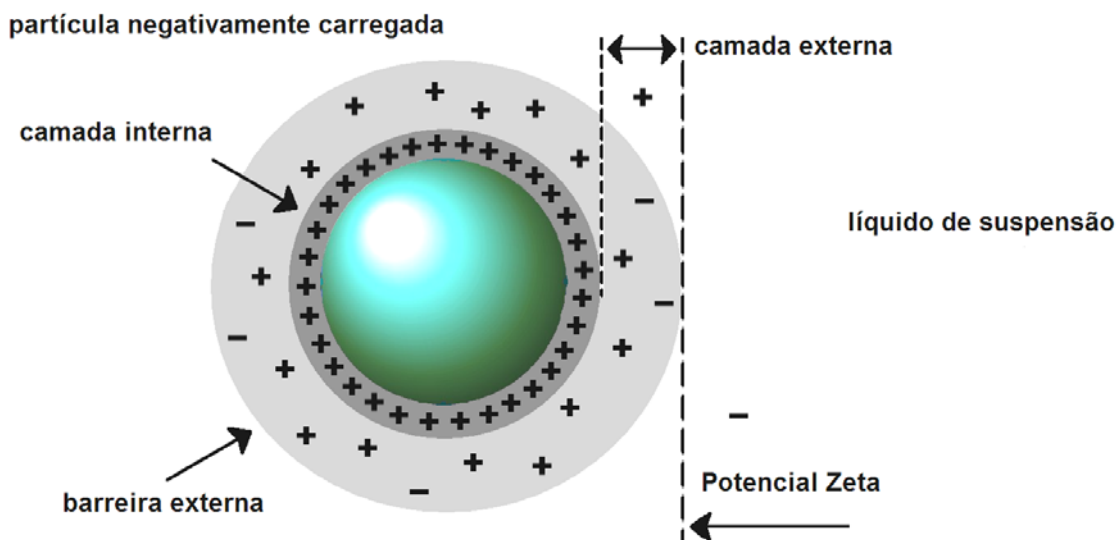


Figura 2.11. Representação da distribuição de íons em torno de uma partícula esférica negativamente carregada dispersa num líquido ionizado.<sup>50</sup>

O parâmetro mais influente no Potencial Zeta é o pH. Considerando que o pH do líquido de suspensão pode fornecer cargas positivas ou negativas que irão interagir com as partículas, o mesmo deve ser conhecido nas avaliações de estabilidade.

O Potencial Zeta pode ser obtido pela mobilidade eletroforética das partículas em suspensão. A presença de cargas na superfície externa das partículas faz com que as mesmas apresentem determinados efeitos sob a ação de um campo elétrico. Esses efeitos são definidos como efeitos electrocinéticos. A mobilidade eletroforética, ou eletroforese, constitui, portanto, o movimento de partículas carregadas relativo ao líquido de suspensão, sob a influência de um campo elétrico aplicado.<sup>50</sup>

A eletroforese pode ser promovida através de um campo elétrico aplicado numa suspensão contendo eletrodos positivo e negativo. As partículas carregadas são atraídas pelo eletrodo de carga oposta, embora algumas forças, como a viscosidade do meio, possam retardar esse movimento. Enfim, quando um equilíbrio de forças é estabelecido, as partículas se movem em direção ao eletrodo de carga oposta com velocidade constante. Essa velocidade de uma partícula num campo elétrico é denominada de mobilidade eletroforética e a mesma

depende da potência do campo elétrico, da constante dielétrica do meio, da viscosidade do meio e do Potencial Zeta.<sup>50</sup>

Desta forma, o Potencial Zeta de partículas em suspensão é obtido pela aplicação da equação de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (2.38)$$

onde  $U_E$  é a mobilidade eletroforética,  $\varepsilon$  a constante dielétrica,  $\zeta$  o Potencial Zeta,  $\eta$  a viscosidade e  $f(ka)$  a função de Henry.<sup>50</sup>

Valores aproximados de 1,5 ou 1,0 são assumidos para a função de Henry. Basicamente, nas determinações de Potencial Zeta em meio aquoso de moderada concentração de eletrólito, o valor de 1,5 é empregado. Nesta condição considera-se o modelo de Smoluchowski com partículas de tamanhos em torno de 200 nm ou mais, dispersas em eletrólitos contendo uma concentração de sal maior de que  $10^{-3}$  M. Para partículas menores, dispersas num meio de baixa constante dielétrica (geralmente meios não aquosos), o valor de 1,0 é utilizado e o mesmo refere-se à aproximação de Huckel.<sup>50</sup>

Na prática o Potencial Zeta é determinado pelas medidas de mobilidade eletroforética das partículas em suspensão. O equipamento utilizado (Zetasizer Malvern Instruments ZEN3500) dispõe de uma célula contendo eletrodos de cargas opostas, um em cada terminal de um tubo em forma de U (Figura 2.12.a). A metodologia de análise consiste na velocimetria de Laser Doppler (*Laser Doppler Velocimetry* – LDV). Conforme representado na Figura 2.12.b, um laser de 633 nm (He-Ne, 4.0 mV) é utilizado e o feixe é dividido em dois: o feixe de referência e o incidente que passa por um atenuador automático, que modula a intensidade de luz de acordo com as características da amostra, e em seguida atinge a amostra no centro da parte inferior do tubo (Figura 2.12.a). A luz espalhada no ângulo de  $17^\circ$  é detectada e combinada com o feixe de referência. Quando um campo elétrico é aplicado na célula contendo a amostra, o movimento das partículas causará flutuações de intensidade da luz espalhada. Essas flutuações têm frequência proporcional à velocidade das partículas. O detector envia essa informação ao processador de sinal digital e através do computador um *software* produz um espectro de frequência calculando o Potencial Zeta resultante.

Amostras de lipossomas e quitossomas para todas as concentrações poliméricas foram preparadas (Sessão 2.2.1). O gel obtido na etapa 5 foi diluído a 100 mL em água MilliQ e a solução resultante foi filtrada a 0,45  $\mu\text{m}$ . Para as medidas de Potencial Zeta, porções de 200  $\mu\text{L}$  foram novamente diluídas a 10 mL em solução aquosa de NaCl (1 mM) para proporcionar um meio eletrolítico. Em seguida, foram transferidas para as células eletroforéticas de aproximadamente 1 mL. As medidas foram obtidas em triplicata sob 150 V, a 25 °C, com  $\text{pH} = 5,8$  e  $f(ka) = 1,5$ .

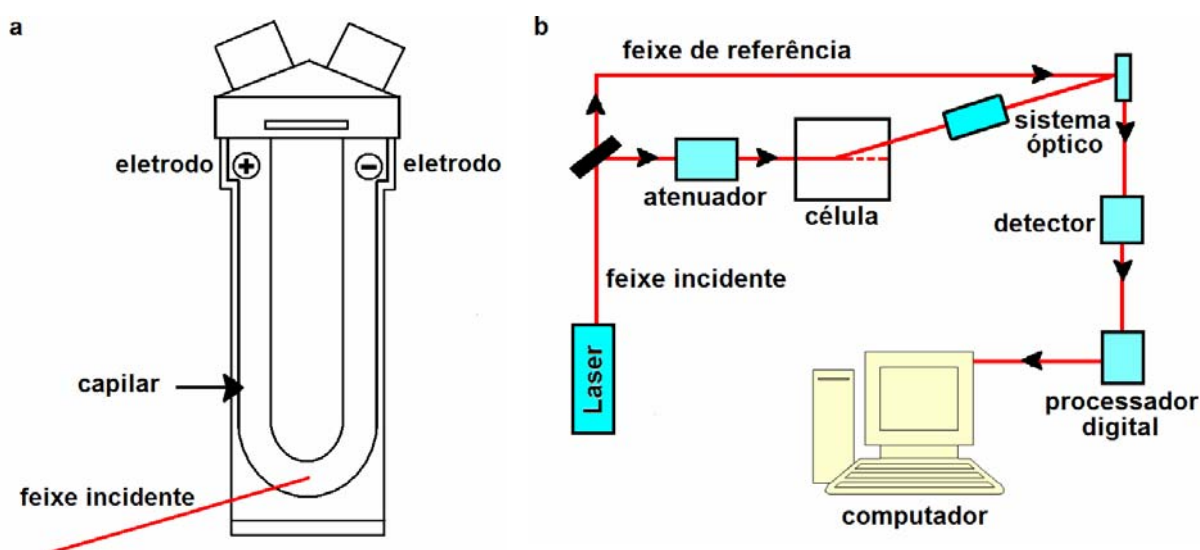


Figura 2.12. Representação da célula utilizada para medidas de Potencial Zeta (a) e esquema do equipamento (b).<sup>50</sup>

## 2.8. Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo

A Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo (RMN de  $^{31}\text{P}$ ) representa uma técnica muito útil para acessar o ambiente químico do átomo de fósforo. O  $^{31}\text{P}$  constitui o único isótopo natural do fósforo e o nuclídeo tem spin  $\frac{1}{2}$  e razão giromagnética positiva de 10.840.<sup>51</sup> Em dispersões de fosfolípidios é possível obter informações sobre a ordem local e a mobilidade da região do fosfato presente na extremidade polar da molécula.<sup>52</sup>

A RMN de  $^{31}\text{P}$  também fornece dados interessantes no estudo de lipossomas, sendo que os espectros resultantes do núcleo de fósforo apresentam formatos e deslocamentos químicos que estão relacionados com fatores como tamanho e polimorfismo (tipo de fase)

das estruturas.<sup>53,54</sup> Para sistemas lamelares fosfolipídicos em suspensão, a RMN de  $^{31}\text{P}$  fornece um resultado característico representado por um pico estendido (isotrópico) juntamente com um ombro estendido de menor intensidade ao lado esquerdo (anisotrópico). Assim, temos um máximo em campo alto definido com o seu deslocamento químico como deslocamento químico perpendicular  $\sigma_{\perp}$  e um ombro estendido em campo baixo definido com o seu deslocamento químico como deslocamento químico paralelo  $\sigma_{\parallel}$ . Esse formato característico do espectro denota os lentos tempos de relaxação longitudinal dos núcleos de fósforo num sistema lamelar. A diferença entre  $\sigma_{\parallel}$  e  $\sigma_{\perp}$  fornece o deslocamento químico de anisotropia do sistema.<sup>53-56</sup>

$$\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \quad (2.39)$$

O  $\Delta\sigma$  depende da liberdade de mobilidade do grupo fosfato, quanto menor o seu valor, maior será a mobilidade. Considerando que movimentos atômicos podem ser termicamente ativados, o  $\Delta\sigma$  decresce com o aumento da temperatura em uma amostra de lipossomas.<sup>57,58</sup> A transição de fase da bicamada lipídica, de gel para cristal líquido, também foi caracterizada com uma significativa redução do  $\Delta\sigma$ .<sup>59,60</sup>

Em sistemas onde não há uma boa resolução espectral para a obtenção do valor do  $\sigma_{\parallel}$ ,  $\Delta\sigma$  pode ser obtido indiretamente:

$$\Delta\sigma = 3 (\sigma_i - \sigma_{\perp}) \quad (2.40)$$

onde  $\sigma_i$  é o deslocamento químico isotrópico do fosfolipídio que forma as vesículas.<sup>54,55</sup> Porém, os valores do  $\sigma_i$  são dependentes do pH, temperatura e força iônica, o que requer cautela na utilização deste parâmetro.<sup>61,62</sup>

A relação entre  $\Delta\sigma$  e tamanho de vesículas tem sido explorada na literatura. Burnell e colaboradores determinaram  $\Delta\sigma = 25$  ppm para vesículas com 500 nm de diâmetro.<sup>63</sup> Quanto menores as estruturas, menor será o valor de  $\Delta\sigma$ . Modificações qualitativas dos espectros de  $^{31}\text{P}$  também têm sido analisadas na interpretação de mudanças estruturais em

vesículas sob a influência da temperatura,<sup>55,56</sup> da adição de outras moléculas<sup>64,65</sup> e da degradação dos fosfolípidios resultante da hidrólise.<sup>59</sup>

Diferentes arquiteturas de fases lamelares produzem espectros de formatos peculiares. Desta forma, é possível distinguir entre organizações lamelares, hexagonal e cúbica.<sup>53,54</sup> Fases hexagonais produzem um ombro estendido no lado direito do pico (campo alto) e fases cúbicas fornecem picos isotrópicos no lado esquerdo (campo baixo).<sup>65</sup> Pereira e colaboradores observaram a transição da fase lamelar para a fase hexagonal inversa H<sub>II</sub> (estruturas cilíndricas), da bicamada fosfolipídica, com o surgimento de um ombro no lado direito do pico estendido.<sup>65</sup> Lopes e colaboradores observaram mudanças consideráveis nos espectros de RMN de <sup>31</sup>P com a adição de um fármaco hidrofílico.<sup>66</sup> Os resultados foram interpretados em função de uma maior blindagem ou desblindagem do fósforo de acordo com os deslocamentos químicos, resultante da interação da extremidade polar do fosfolípido com o fármaco.

A RMN de <sup>31</sup>P também permite o estudo de transições estruturais entre sistemas lamelares e micelares. No caso de micelas fosfolipídicas em suspensão aquosa, a extremidade polar de todas as moléculas está submetida a um único ambiente químico. Além disso, devido às características estruturais inerentes às micelas, a alta curvatura da superfície fornece um volume espacial muito elevado para a extremidade polar. Como resultado dessa organização molecular é produzido um pico característico de alta intensidade e reduzido valor de largura à meia altura. Zuidam e colaboradores observaram a transformação da curva estendida com o pico alargado em um único pico estreito na conversão de lipossomas em micelas, como resultado de hidrólise química sob aquecimento.<sup>59</sup>

Nos trabalhos desenvolvidos na presente Tese, a RMN de <sup>31</sup>P foi utilizada para a investigação dos efeitos resultantes da presença de quitosana nos lipossomas na temperatura ambiente e sob aquecimento até 60 °C. As amostras foram preparadas conforme descrito na Sessão 2.2.1, porém, o gel obtido na etapa 5 foi diluído em 2 mL de água deuterada (Sigma-Aldrich, 99%). Quitossomas foram preparados com a maior concentração polimérica (1 mg/mL). Em seguida, as amostras foram transferidas para um frasco apropriado com tampa e centrifugadas em repetidos ciclos de 5 minutos a 4000 rpm para a concentração das vesículas no sobrenadante, o qual foi subsequentemente transferido para o tubo de RMN (0,5 mm) através de uma pipeta Pasteur após cada centrifugação. O processo foi repetido de três a quatro vezes até completar aproximadamente 0,3 mL de amostra no tubo de RMN. A alta concentração de vesículas na suspensão é necessária para a obtenção do sinal na RMN <sup>31</sup>P.

Os espectros foram obtidos em equipamento Varian de 300 MHz (Inova-300) e observados a 121,42 MHz. O pulso utilizado foi de 16,0  $\mu$ s a 45° com um tempo de aquisição de 1,600 s, largura espectral de 15785,3 Hz com 5000 repetições em 6 h e 24 min. A temperatura foi controlada com precisão de  $\pm 0,5$  °C e espectros foram obtidos nas temperaturas de 25, 40, 50 e 60 °C.

O ácido fosfórico a 85% (Merck) foi diluído a aproximadamente 5% e utilizado como referência externa. A alta diluição foi necessária devido aos sinais pouco intensos produzidos pelas amostras. Espectros foram obtidos com a presença do padrão externo e sem a presença do mesmo. Os deslocamentos químicos foram comparados utilizando a posição do pico do ácido fosfórico a 0 ppm como posição de referência.

## **2.9. Lipossomas Gigantes**

Lipossomas Gigantes são vesículas formadas por bicamada fosfolipídica e que apresentam tamanhos na escala micrométrica, conforme descrito na Sessão 1.2. Para a preparação destas vesículas existem basicamente dois métodos: a formação espontânea e a Eletroformação.

Na formação espontânea é feita uma simples hidratação de um filme de fosfolipídios. Após algumas horas as moléculas se auto-organizam pelas interações de polaridade e apolaridade, formando as bicamadas que constituem a membrana das vesículas, conforme discutido na Sessão 1.2.2. O filme pode ser facilmente obtido com a deposição de alguns microlitros de uma solução de fosfolipídios em solvente orgânico sobre uma lâmina de vidro. Deixa-se o solvente secar sob vácuo e após a lâmina com o filme seco pode ser mergulhada num recipiente com água ou solução aquosa durante várias horas ou alguns dias. As vesículas são formadas dentro da solução.<sup>67</sup> Uma variação desta metodologia é utilizar uma pastilha rugosa de teflon.<sup>67</sup> O filme de fosfolipídios sobre a superfície rugosa, produzido da mesma forma como sobre a lâmina de vidro, é pré-hidratado sob uma atmosfera de vapor d'água. Após, a pastilha também é imersa em solução aquosa para a formação das vesículas.<sup>67</sup>

Entretanto, as vesículas obtidas por formação espontânea são na maioria estruturas altamente inhomogêneas, constituindo estruturas uni e multilamelares, vesículas mal formadas com defeitos ou agregados de fosfolipídios e estruturas não esféricas.

Por outro lado, a Eletroformação proporciona a estruturação de uma grande quantidade de vesículas gigantes esféricas e unilamelares, com tamanhos variados, mas que podem atingir até centenas de micrômetros. Angelova e colaboradores otimizaram as condições experimentais desta metodologia<sup>68</sup> e a mesma foi aplicada nos trabalhos desenvolvidos na presente Tese para a investigação da interação da bicamada com a quitosana.

### 2.9.1. Eletroformação

O procedimento de Eletroformação pode variar ligeiramente quanto a algumas características ou tipos de aparatos experimentais, temperatura, tempo de exposição do filme, tipo de solução aquosa, dentre outros. A metodologia descrita aqui foi aplicada como procedimento padrão para a preparação dos lipossomas gigantes unilamelares investigados.

Dioléoilfosfatidilcolina (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine* – DOPC) (Sigma-Aldrich, 99%) foi o fosfolípido utilizado na produção dos lipossomas gigantes. A DOPC foi dissolvida em clorofórmio (Sigma-Aldrich) numa concentração de 1 mg/mL. A solução foi vedada sob atmosfera de argônio e mantida a -14 °C. Para os estudos de lipossomas gigantes pela Microscopia de Fluorescência, o fosfolípido fluorescente NBDPC (Sessão 2.2.1) a 0,1 mg/mL foi misturado à uma concentração de 1% na solução de DOPC.

Dois lâminas de vidro de 10 por 3 cm revestidas em um lado com óxido de índio e titânio (*Indium Titane Oxide* – ITO) são empregadas para a formação de uma célula condutora. Através de uma microseringa, 10 µL da solução de DOPC (ou de DOPC contendo 1% de NBDPC) foram espalhados sobre a superfície revestida com ITO de uma das lâminas. O clorofórmio evapora imediatamente, porém a lâmina foi depositada em dessecador de silicagel submetido sob vácuo durante pelo menos 30 minutos à temperatura ambiente para a completa remoção do solvente. Eventualmente esse procedimento foi efetuado nas duas lâminas para a produção de uma quantidade maior de lipossomas gigantes.

A célula condutora (Figura 2.13) é formada com a sobreposição das duas lâminas com as faces revestidas com ITO uma contra a outra, separadas por um anel de massa de modelagem (Vitrex) depositado nas bordas das lâminas. A espessura interna da célula variou entre 1 e 3 mm. A célula foi preenchida com uma solução aquosa de sacarose (Sigma-



Aldrich, 99%) a 0,095 M de pressão osmótica  $0,095 \pm 0,003$  medida pelo menos três vezes à pressão osmótica constante em Osmômetro (Osmomat 030 Gonotec).

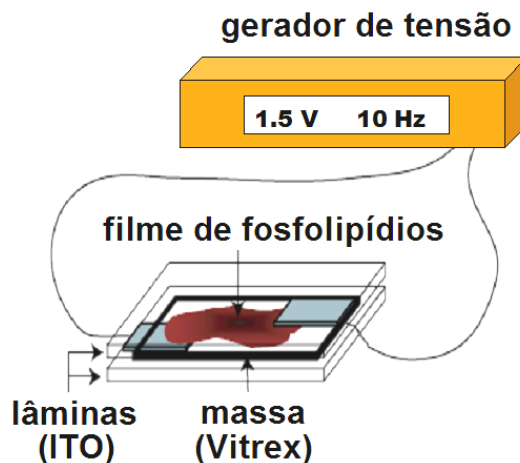


Figura 2.13. Representação do aparato experimental para a produção de vesículas gigantes. A célula de eletroformação é conectada ao gerador de tensão que fornece o campo elétrico, o qual estimula a formação das estruturas a partir do filme de fosfolipídios.

Em uma extremidade de cada lâmina foram conectadas as extensões que, ligadas a um gerador de tensão alternada, fornecem o campo elétrico que estimula a produção dos lipossomas gigantes. Assim, a célula condutora é formada conforme ilustrado na Figura 2.13. A tensão é aplicada com a regulagem do gerador a uma amplitude de 1,5 V e frequência de 10 Hz.

O revestimento de ITO sobre as lâminas de vidro no interior da célula proporciona uma superfície condutora. Com a ação do campo elétrico, o filme de fosfolipídios vibra na direção do campo e incha, formando bolhas. Concomitantemente, os fosfolipídios se organizam nas duplas camadas que constituem a membrana dos lipossomas. Pequenas vesículas uni e multilamelares surgem na superfície do filme e as mesmas continuam a aumentar de tamanho com o passar do tempo incorporando mais fosfolipídios. As vesículas unilamelares que atingem entre 20 e 30  $\mu\text{m}$  de diâmetro são facilmente desestabilizadas pelos movimentos do ambiente fluído no interior da célula e conseqüentemente fundem com as vesículas que estão a sua volta o que acaba produzindo estruturas maiores. Após um tempo aproximado de 30 minutos, uma considerável quantidade de lipossomas gigantes está

formada e os mesmos continuam a aumentar de tamanho com o passar do tempo. Observando a célula de eletroformação no microscópio óptico é possível visualizar as diferentes etapas de crescimento e inclusive os movimentos de vibração das membranas e as fusões. As vesículas formadas apresentam uma alta polidispersão, sendo que as maiores podem atingir algumas centenas de micrômetros. Como procedimento rotineiro, a Eletroformação foi mantida durante três horas sob o campo elétrico e na temperatura ambiente (20-25 °C).

Os mecanismos de formação de lipossomas gigantes unilamelares sob a ação de um campo elétrico oscilante ainda não estão totalmente desvendados. Diferentes interpretações sugerem, por exemplo, a interação eletrostática entre os eletrodos e a bicamada fosfolipídica, ou a ocorrência de reações eletroquímicas, ou ainda a incorporação pela bicamada de cargas provenientes dos eletrodos. Sens e Isambert sugerem uma desestabilização do filme de fosfolipídios provocada por um acúmulo de cargas sobre a bicamada, sendo que o campo aplicado produziria uma tensão sobre a bicamada suficientemente forte para proporcionar flutuações que incham o filme e fazem com que o mesmo se curve para produzir as vesículas.<sup>69</sup> Este processo seria apenas uma primeira etapa na formação das estruturas, pois diferentes parâmetros influenciam a formação de vesículas uni e multilamelares: as propriedades elétricas dos lipídios, seu impedimento estérico, o comprimento das cadeias hidrocarbonadas, a organização da bicamada e a pressão osmótica do meio.<sup>67,69</sup>

Um modelo que considera a geometria e a termodinâmica de sistemas dispersos foi desenvolvido por Vila e colaboradores<sup>70,71</sup> e o mesmo descreve a energia necessária para a formação de um lipossoma como sendo a soma da energia mecânica de superfície com a energia de curvatura e com a energia da variação do excesso de potencial químico, resultante da modificação da tensão de superfície da água pela presença de fosfolipídios. Vila e colaboradores definiram uma relação entre a variação do potencial químico, a superfície ocupada pela extremidade polar do fosfolipídio, o raio da vesícula e a espessura da sua membrana. Os cálculos obtidos mostram uma boa concordância com dados experimentais obtidos para vários fosfolipídios. Também é demonstrado que as fusões de vesículas são termodinamicamente favorecidas sendo que as mesmas levam à formação de vesículas de tamanhos maiores, as quais apresentam maior estabilidade.<sup>70,71</sup>

Após a Eletroformação, os lipossomas podem permanecer estocados na célula à temperatura ambiente durante algumas horas. Porém, devido à utilização da solução aquosa de sacarose, é recomendado o armazenamento das vesículas em geladeira para retardar a

multiplicação de bactérias. Normalmente, a solução de sacarose contendo as vesículas foi transferida para um frasco *Eppendorf* e mantida na geladeira a 4 °C para uso em no máximo dez dias.

Para a observação dos lipossomas no microscópio óptico, foi utilizada uma célula composta de duas lâminas de vidro ultrafinas de 10 por 3 cm. Um suporte de borracha semi-aderente e plano (3 por 3 cm e 1 mm de espessura), com um grande orifício esférico (2 cm de diâmetro), é depositado sobre uma das lâminas. Através de um pipetador uma pequena quantidade (~20 µL) da solução de sacarose contendo lipossomas gigantes foi depositada em forma de gotas sobre a primeira lâmina, dentro do orifício da borracha. Uma outra solução constituída de glicose em água a 0,099 M com pressão osmótica constante de  $0,099 \pm 0,003$  também foi gotejada lentamente sobre a lâmina já contendo a solução de vesículas, de forma a preencher o orifício esférico sobre a lâmina (~100 µL). Em seguida a segunda lâmina foi depositada sobre o suporte de borracha, formando assim uma célula semelhante à célula de eletroformação, porém não condutora e mais fina.

O emprego de solução de sacarose na célula de eletroformação e de glicose na célula de observação tem uma razão importante. Existe uma diferença de densidade entre sacarose e glicose, sendo que a densidade da sacarose é um pouco maior. Isso faz com que as vesículas, contendo sacarose no seu núcleo, fiquem mais “pesadas” dentro da solução de glicose, e assim as mesmas tendem a se depositar na superfície inferior da célula, permitindo uma boa observação no microscópio óptico utilizado. Além disso, a solução de glicose é quase iso-osmótica à solução de sacarose. A pequena diferença de pressão osmótica foi considerada apropriada para uma melhor estabilização das vesículas no sentido de redução de flutuações da membrana e de preservação estrutural. Uma outra vantagem é a diferença de índice de refração entre as duas soluções, que favorece uma boa definição óptica em contraste de fase do contorno das vesículas.

### **2.9.2. Proposta de Eletroformação a Partir da Fase Reversa**

A Eletroformação clássica, descrita na Sessão anterior, permite a obtenção de lipossomas gigantes cuja membrana é formada por fosfolipídios. Contudo, neste trabalho objetivamos o estudo dos efeitos da presença de quitosana no sistema, bem como as formas

de interação da quitosana com a bicamada fosfolipídica. Desta forma, torna-se importante a introdução do polímero nos lipossomas gigantes.

Nos trabalhos em que são feitos estudos de lipossomas gigantes com polímeros, as vesículas são preparadas previamente e em seguida o polímero em questão é adicionado por solubilização na dispersão das vesículas ou as vesículas são dispersas na solução polimérica.<sup>72,73</sup> Essa metodologia apresenta suas vantagens, porém as interações entre as vesículas e as cadeias poliméricas dependem de uma série de variáveis relacionadas com a concentração de componentes e com a termodinâmica, o que torna as investigações extremamente complexas e de difícil padronização e interpretação.

Na presente Tese, a intenção foi investigar mais profundamente a interação entre a membrana das vesículas gigantes e a quitosana. Sabe-se que na preparação em fase reversa (Sessão 2.2.1), para a obtenção de quitossomas nanométricos, as interações entre os fosfolipídios e a quitosana são significativamente estimuladas considerando a adição prévia do polímero na etapa 2, antes mesmo da formação das micelas reversas, do organogel e das vesículas propriamente ditas.

Desta forma, consideramos que para os estudos envolvendo lipossomas gigantes com quitosana, uma interação mais acentuada entre polímero e vesículas seria extremamente vantajosa para proporcionar efeitos diferenciados no sistema e permitir uma avaliação mais consistente.

Sendo assim, objetivando a introdução de quitosana em lipossomas gigantes, desenvolveu-se uma modificação do método da Eletroformação baseada na preparação de lipossomas em fase reversa. O objetivo foi produzir quitossomas gigantes onde a estruturação vesicular a nível molecular pudesse ser comparável à dos nanoquitossomas, mesmo considerando a grande diferença de tamanhos.

A metodologia foi desenvolvida com a introdução de uma solução precursora. A solubilização prévia de quitosana comercial ou quitosana fluorescente foi feita em solução tampão de acetato de pH 4,5 (Sessão 2.1) a uma concentração de 2,5 mg/mL e sob agitação vigorosa com barra magnética durante 3 horas. A solução foi filtrada a 0,45 e 0,22  $\mu\text{m}$  e mantida em geladeira até a utilização. A perda de polímero devido à filtração foi determinada por calibração através de fluorometria empregando-se solução de quitosana fluorescente filtrada e não filtrada, conforme descrito na Sessão 2.9.4.

A solução precursora foi então obtida pela adição de 5, 10 ou 20  $\mu\text{L}$  da solução polimérica filtrada em 400  $\mu\text{L}$  de solução de DOPC a 1 mg/mL. A mistura foi sonicada em sonicador de banho (Brason 1200) durante dois minutos para a formação das micelas reversas contendo polímero. Esta emulsão foi empregada como solução precursora na Eletroformação de quitossomas gigantes.

Uma porção de 10  $\mu\text{L}$  da solução precursora foi espalhada sobre a lâmina de vidro revestida com ITO e secada em dessecador de silicagel sob vácuo, durante pelo menos 30 minutos. Em seguida, seguiu-se o processo normal de Eletroformação sob as mesmas condições descritas na Sessão 2.9.1.

### **2.9.3. Microscopia Óptica e de Fluorescência**

A Microscopia Óptica foi extensivamente aplicada na presente Tese para os estudos com vesículas gigantes. As células de observação, preparadas conforme descrito na Sessão 2.9.1, contendo lipossomas gigantes ou quitossomas gigantes (Sessão 2.9.2), foram observadas no microscópio óptico invertido Nikon TE 200 com objetivas 40X em contraste diferencial de interferência (*Differential Interference Contrast – DIC*) e 40X em contraste de fase.

A microscopia em modo DIC é possível através de um prisma birrefringente que divide o feixe de luz polarizada em dois feixes parciais que incidem sobre a amostra com um deslocamento lateral um em relação ao outro. Numa superfície totalmente plana, nada é observado no microscópio. Porém, onde existe algo acima da superfície, um contraste acentuado é produzido em forma de relevos. Desta forma, a DIC fornece imagens nítidas das vesículas gigantes evidenciando a membrana das mesmas em acentuado contraste com o fundo.

A microscopia de contraste de fase também gera um contraste adequado nas imagens das vesículas gigantes. Isto é proporcionado pela modificação da defasagem e da amplitude dos feixes de luz diretos e difratados do microscópio, permitindo que a interferência seja totalmente construtiva ou destrutiva, tornando detectável a morfologia do material. A lente do sistema de contraste de fase contém no seu plano focal posterior uma placa com um anel de fase, o qual produz um atraso ou um avanço de  $90^\circ$  nas ondas e reduz sua intensidade luminosa. Como o percurso do feixe direto não é afetado pelas dimensões

nem pela forma da estrutura difratora da amostra, é o próprio feixe direto que deve passar no anel de fase para ser retardado ou avançado relativamente aos feixes difratados.<sup>74</sup>

Para a Microscopia Óptica de Fluorescência foi empregado o mesmo microscópio, o qual possui um sistema constituído de lâmpada fluorescente de mercúrio com caminho óptico dotado de filtros (EX 450-490 nm/BA 520 nm) para a seleção do comprimento de onda da luz incidente na amostra, bem como um bloqueador da passagem da luz fluorescente. Ao microscópio é acoplada uma câmara de vídeo (Diagnostic Instruments NDIAG 1800) que filma e automaticamente grava as imagens na memória de um computador.

Para a determinação das condições ideais de análise no microscópio, uma série de medidas preliminares foi efetuada para os ajustes de cada parâmetro. Com a observação de vesículas “teste” foram otimizados os valores de abertura do diafragma, filtro nêutro de cinza, ganho de imagem da câmara e tempo de exposição. Desta forma foram estabelecidas as melhores condições para a obtenção de imagens fluorescentes com reduzido ruído de fundo. O tempo de exposição da câmara apresenta uma precisão de aquisição de imagem de 1 ms, o que permite uma alta precisão em medidas quantitativas de intensidade de fluorescência com um erro inferior a 1%.

Nas análises de vesículas fluorescentes, o processo de *quenching*, correspondente à perda indesejada de fluorescência das amostras devido à incidência da radiação da luz fluorescente durante a observação, foi evitado pela adoção de um procedimento padronizado. Primeiramente a célula de observação permaneceu em repouso durante pelo menos dez minutos, já devidamente posicionada para a microscopia e na ausência de luz incidente, de forma a permitir a decantação das vesículas dentro da célula. Em seguida, a fonte de luz visível do microscópio foi acesa em baixa intensidade e então foi localizada uma vesícula adequada, esférica, unilamelar, sem defeitos aparentes, de tamanho razoável, sem flutuações visíveis da membrana, estática e completamente isolada de outras vesículas. O foco foi ajustado para o contraste máximo entre a membrana e o fundo. Com a vesícula localizada e em foco, a câmara de vídeo foi acionada e um curto filme de imagens da amostra foi gravado. Em seguida a fonte de luz visível foi desligada e imediatamente o bloqueador da luz fluorescente foi aberto durante poucos segundos e logo fechado. Todo o processo foi gravado pela câmara e assim, as vesículas fluorescentes puderam ser analisadas pelas primeiras imagens filmadas pela câmara, ou seja, quando ainda não houve *quenching*. As mesmas também foram comparadas com as correspondentes imagens sob luz visível.

Para a avaliação das imagens de microscopia, o computador acoplado ao microscópio possui um *software* (Magneto) desenvolvido no laboratório (*Institut Charles Sadron*). O programa analisa as imagens gravadas pela câmera na memória do computador. O mesmo permite a determinação de tamanho das vesículas nas imagens não fluorescentes através da avaliação dos contrastes de cinza entre a membrana e o fundo da imagem. Através de um gráfico de distribuição de intensidades que variam do branco ao preto, integrando os *pixels* de uma linha sobre a diagonal da vesícula, é possível determinar com exatidão o diâmetro da estrutura pela transformação da quantidade de *pixels*, envolvidos entre um extremo e outro da vesícula, em micrômetros, usando um fator de conversão adequado.

Para as imagens fluorescentes, a análise também leva em conta o perfil da escala de cinza, subtraindo o fundo. Neste caso, o programa permite uma análise global ou parcial do perfil de fluorescência, através da integração dos *pixels* dentro de uma área selecionada sobre a imagem. Na prática, seleciona-se a área da vesícula fluorescente mais uma pequena área do seu contorno. Primeiramente, a intensidade média por *pixel* do fundo  $I_0$  é computada. Em seguida, a intensidade total é calculada:

$$F = \sum (I_i - I_0) \quad (2.41)$$

onde  $I_i$  é o teor de cor cinza do pixel  $i$ . Desta forma foi obtida a intensidade total de fluorescência das vesículas gigantes, descontada da intensidade de fundo.

A distribuição de fluorescência sobre a vesícula pode ser relacionada com o teor de cor cinza, considerando  $O(x, y, z)$  como a função tri-dimensional que descreve a distribuição de fluorescência sobre o objeto. Para uma fluorescência total  $F$  distribuída sobre a superfície de uma esfera temos:

$$O(r, \theta, \phi) = F \times (4\pi R^2)^{-1} d(r - R) \quad (2.42)$$

onde  $R$  é o raio da esfera. Para a mesma intensidade distribuída no volume da esfera temos:

$$O(r, \theta, \phi) = F \times 3 / (4\pi R^3) \quad (2.43)$$

para  $r < R$ . Assim, a imagem observada  $I(x, y, 0)$  no plano focal, é o produto da convolução da imagem do objeto  $O(x, y, z)$  e a função de propagação pontual (*FPP*) do microscópio:<sup>75</sup>

$$I(x, y, 0) = \int dx' dy' dz' FPP(x - x', y - y', 0 - z') O(x', y', z') \quad (2.44)$$

A *FPP* é a capacidade do microscópio em considerar as contribuições de fluorescência da vesícula que estão fora de foco. Sendo que a vesícula está focalizada no seu equador, é necessário considerar também a quantidade de fluorescência acima e abaixo do equador.

A *FPP* pode ser determinada, em condições de observação devidamente ajustadas no microscópio, pela obtenção da função  $I(x, y, z)$  da área delimitada de uma mancha fluorescente:

$$FPP(x, y, z) = \int dx' dy' dz' FPP(x - x', y - y', z - z') d(x', y', z') \quad (2.44)$$

Para as condições experimentais utilizadas nos trabalhos de microscopia de fluorescência, a *FPP* foi determinada e a mesma pôde ser aproximada pela função simétrica:

$$FPP(\rho, z) = (2\pi(0,05 + 0,17|z|)^2)^{-1} e^{-\rho^2 / (2(0,05 + 0,17|z|)^2)} \quad (2.45)$$

onde  $\rho = x^2 + y^2$  e todas as distâncias são medidas em micrômetros. Para toda quantidade fora de foco, a integração da intensidade total é constante:

$$\int 2\pi\rho d\rho FPP(\rho, z) = 1 \quad (2.46)$$

e assim, a dimensão da *FPP* varia linearmente com a distância do plano focal.



Resumidamente, os ajustes são padronizados e as condições ideais de obtenção da intensidade de fluorescência das vesículas são estabelecidas. A fluorescência sobre toda área da vesícula é então calculada, sendo que a fluorescência proveniente da região fora de foco é considerada pela *FPP*.

#### **2.9.4. Calibração da Fluorescência**

A Calibração da Fluorescência foi procedida para a determinação da fração em massa de polímero fluorescente presente na bicamada dos quitossomas gigantes. Sendo que o processo de Eletroformação pode levar a uma transferência variável dos componentes aplicados sobre a lâmina para a efetiva estrutura das vesículas, uma determinação quantitativa desta ordem torna-se importante para a avaliação das propriedades, vantagens e desvantagens da modificação da Eletroformação proposta na Sessão 2.9.2. Para tanto, a dependência da fluorescência em relação à concentração foi comparada entre as diferentes espécies fluorescentes estudadas aqui. As amostras foram diluídas em diferentes concentrações em célula de quartzo e as medidas de comprimentos de onda foram efetuadas em espectrofluorímetro (Hitachi F-4010) na temperatura ambiente.

A quitosana fluorescente, obtida e preparada em solução tampão conforme descrito na Sessão 2.1, foi avaliada quanto ao comprimento de onda de emissão na porção de 5  $\mu$ L da solução filtrada e diluída a 3 mL na célula de quartzo. Os comprimentos de onda característicos para a quitosana fluorescente são de 470 nm para excitação e de 515 nm para emissão.<sup>1</sup> Diferentes concentrações, entre 0,003 e 0,030 mg/mL, também foram preparadas e medidas foram realizadas para a obtenção da variação da intensidade de emissão em função da concentração. As medidas de intensidade foram efetuadas nos comprimentos de onda de 515 nm e 533 nm. Este segundo comprimento de onda corresponde ao máximo de emissão do fosfolipídio fluorescente NBDPC.

As mesmas medidas foram feitas com solução de quitosana não filtrada, usando-se as mesmas concentrações descritas acima. Este procedimento permitiu a determinação da perda de polímero pela filtração, através das membranas de 0,45 e 0,22  $\mu$ m, pela avaliação comparativa das variações de intensidade em função da concentração entre a amostra filtrada e a não filtrada. Desta forma foi possível conhecer a massa real de quitosana aplicada sobre a placa de eletroformação para a produção de quitossomas gigantes.

O NBDPC foi utilizado, na concentração de 0,1%, para a preparação de lipossomas nanométricos fluorescentes (Sessão 2.2.1). O gel obtido na etapa 5 foi diluído em 100 mL de água e pequenas porções foram novamente diluídas na célula de quartzo, resultando em concentrações entre  $6 \times 10^{-4}$  e  $6 \times 10^{-5}$  mg/mL de NBDPC. As intensidades de fluorescência também foram medidas nos comprimentos de onda de 515 e 533 nm.

Também foram medidas as intensidades a 515 e 533 nm para uma amostra de quitossomas gigantes contendo a maior concentração de quitosana fluorescente, mais 1% de NBDPC na mesma vesícula (Sessão 2.9.2), sendo que o NBDPC foi previamente misturado na solução de DOPC (Sessão 2.9.1). A massa de NBDPC aplicada sobre a lâmina de eletroformação também é conhecida. As vesículas foram transferidas da célula de eletroformação para a célula de quartzo do fluorímetro e o volume foi completado a 3 mL com a solução de glicose 0,099 M.

As variações da intensidade em função da concentração para os dois comprimentos de onda foram, portanto, graficadas para a quitosana em solução e para lipossomas nanométricos contendo NBDPC. A calibração foi procedida considerando o comportamento linear de aumento de intensidade de emissão em função da concentração para cada comprimento de onda.

Considerando a equação da reta obtida pelas intensidades de emissão  $I = \beta + \alpha x$ , (onde  $x$  representa a concentração  $c$  do componente fluorescente), para o primeiro comprimento de onda ( $\lambda_1 = 515$  nm) e para o segundo comprimento de onda ( $\lambda_2 = 533$  nm), respectivamente para os lipossomas nanométricos contendo NBDPC e a solução de quitosana filtrada, temos:

$$\begin{aligned} {}_{NB}I^{\lambda_1} &= {}_{NB}\beta^{\lambda_1} + {}_{NB}\alpha^{\lambda_1} {}_{NB}c \\ {}_{NB}I^{\lambda_2} &= {}_{NB}\beta^{\lambda_2} + {}_{NB}\alpha^{\lambda_2} {}_{NB}c \\ {}_QI^{\lambda_1} &= {}_Q\beta^{\lambda_1} + {}_Q\alpha^{\lambda_1} {}_Qc \\ {}_QI^{\lambda_2} &= {}_Q\beta^{\lambda_2} + {}_Q\alpha^{\lambda_2} {}_Qc \end{aligned}$$

As intensidades de fluorescência medidas para os quitossomas gigantes contendo quitosana fluorescente filtrada e NBDPC, nos dois comprimentos de onda, correspondem ao

somatório das intensidades de fluorescência provenientes de cada componente em cada comprimento de onda:

$$I^{\lambda_1} = {}_{NB}\beta^{\lambda_1} + {}_{NB}\alpha^{\lambda_1} {}_{NB}C + {}_Q\beta^{\lambda_1} + {}_Q\alpha^{\lambda_1} {}_QC$$

$$I^{\lambda_2} = {}_{NB}\beta^{\lambda_2} + {}_{NB}\alpha^{\lambda_2} {}_{NB}C + {}_Q\beta^{\lambda_2} + {}_Q\alpha^{\lambda_2} {}_QC$$

Resolvendo o sistema acima para as concentrações, temos:

$${}_{NB}C = \frac{{}_Q\alpha^{\lambda_1} (I^{\lambda_2} - {}_{NB}\beta^{\lambda_2} - {}_Q\beta^{\lambda_2}) - {}_Q\alpha^{\lambda_2} (I^{\lambda_1} - {}_{NB}\beta^{\lambda_1} - {}_Q\beta^{\lambda_1})}{{}_{NB}\alpha^{\lambda_2} {}_Q\alpha^{\lambda_1} - {}_Q\alpha^{\lambda_2} {}_{NB}\alpha^{\lambda_1}} \quad (2.47)$$

$${}_QC = \frac{{}_{NB}\alpha^{\lambda_1} (I^{\lambda_2} - {}_{NB}\beta^{\lambda_2} - {}_Q\beta^{\lambda_2}) - {}_{NB}\alpha^{\lambda_2} (I^{\lambda_1} - {}_{NB}\beta^{\lambda_1} - {}_Q\beta^{\lambda_1})}{{}_{NB}\alpha^{\lambda_2} {}_Q\alpha^{\lambda_1} - {}_Q\alpha^{\lambda_2} {}_{NB}\alpha^{\lambda_1}} \quad (2.48)$$

Desta forma foi possível obter as concentrações efetivas de fosfolipídio fluorescente e quitosana fluorescente nas vesículas gigantes. Por um cálculo simples de proporções obteve-se a concentração total de fosfolipídio, evidentemente considerando que NBDPC representa 1% deste total. A comparação com as concentrações aplicadas sobre a placa de eletroformação permitiu a determinação aproximada do percentual de transferência de massa dos componentes. Assim, com as quantidades em massa conhecidas, foi possível calcular também a distribuição de polímero sobre a membrana das vesículas, ou seja, a massa de polímero pela área de fosfolipídios considerando a área de uma molécula de DOPC como sendo  $0,725 \text{ nm}^2$ .<sup>76</sup>

## 2.10. Referências

1. Qaqish, R.B.; Amiji, M.M. *Carbohydrate Polymers*. **1999**, 39, 99.
2. Mikos, A.G.; Peppas, N.A. *Scaling Concepts and Molecular Theories of the Adhesion of Synthetic Polymers to Glycoprotein Networks*. In: *Bioadhesive Drug Delivery Systems*. Boca Raton: CRC Press, **1990**, p. 25-42.
3. Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. *Journal of Molecular Biology*. **1965**, 13, 238.
4. Delattre, J.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Philippot, J.R.; Shuber, F. *Les Liposomes*. Paris: INSERM, **1993**.
5. Szoka, F.C.; Papahadjopoulos, D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1978**, 75, 4194.
6. Mertins, O. *Desenvolvimento e Caracterização de Nanovesículas Lipossômicas Compósitas de Fosfatidilcolina da Lecitina de Soja e Quitosana*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2004**.
7. Almog, R.; Forward, R.; Samsonoff, C. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1991**, 60, 93.
8. Pereira-Lachataignerais, J.; Pons, R.; Panizza, P.; Courbin, L.; Rouch, J.; López, O. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2006**, 140, 88.
9. Kishimoto, T.; Soda, Y.; Matsuyama, Y.; Mizuno, K. *Clinical Biochemistry*. **2002**, 35, 411.
10. Lutz, J.; Augustin, A.J.; Jager, L.J.; Bachmann, D.; Brandi, M. *Life Sciences*. **1995**, 56, 99.
11. Marinetti, G.V. *Journal of Lipid Research*. **1962**, 8, 181.
12. Mertins, O.; Sebben, M.; Schneider, P.H.; Pohlmann A.R.; Silveira, N.P. *Química Nova*. **2008**, in press.
13. Mertins, O.; Cardoso, M.B.; Pohlmann, A.R.; Silveira, N.P. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **2006**, 6, 2425.
14. Martins de Martins, R. *Estrutura e Dinâmica da Interação de Éteres de Celulose com Surfactantes*. Tese de Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, **2006**.
15. Turro, N.J. *Modern Molecular Photochemistry*. Califórnia: University Science Books, **1991**.
16. Pereira, F.V. *Comportamento Mesomorfo, Estrutura e Ordenação de Cristais Líquidos Poliméricos em Massa e em Solução: Um Estudo Através de Espalhamento de Luz e Raios-X*. Tese de Doutorado. Porto Alegre: UFRGS, **2004**.
17. Pecora, R.; Berne, B.J. *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics*. New York: Dover Publications, **2000**.
18. Brown, W. *Light Scattering: Principles and Development*. New York: Oxford University Press, **1996**.
19. Bodor, G. *Structural Investigations of Polymers*. England: Ellis Horwood Limited, **1991**.
20. Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*. New York: Plenum Press, **1985**.
21. Tanford, C. *Physical Chemistry of Macromolecules*. New York: John Wiley and Sons, **1961**.
22. Brillouin, L. *Annalen der Physics*. **1922**, 17, 88.
23. Long, D.A. *Raman Spectroscopy*. New York: McGraw-Hill, **1977**.
24. Pereira, F.V. *Espalhamento de Luz Estático e Dinâmico em Polímeros Líquido-Cristalinos*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2000**.
25. Zimm, B.H. *The Journal of Chemical Physics*. **1948**, 16, 12.
26. Mertins, O.; Sebben, M.; Pohlmann A.R.; Silveira, N.P. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2005**, 138, 29.
27. Hellweg, T.; Eimer, W. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **1998**, 136, 97.
28. Chu, B. *Laser Light Scattering, Basic Principles and Practice*. San Diego: Academic Press, **1991**.
29. Phillies, G.D.J. *The Journal of Chemical Physics*. **1988**, 89, 91.
30. Koppel, D.E. *The Journal of Chemical Physics*. **1972**, 57, 4814.
31. Provencher, S.W. *Computer Physics Communications*. **1982**, 27, 229.

32. Burchard, W.; Richtering, W. *Progress in Colloid and Polymer Science*. **1989**, 80, 151.
33. Mezzalana, G. *Caracterização de Suspensões de Nanopartículas Poliméricas Estudadas como Carreadores de Fármacos Através de Técnicas de Espalhamento de Luz e de Raios-X a Baixo Ângulo*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2005**.
34. Burchard, W. *Cellulose*. **2003**, 10, 213.
35. Schulz, L.; Seger, B.; Burchard, W. *Macromolecular Chemistry and Physics*. **2000**, 201, 2008.
36. Schillén, K.; Brown, W.; Johnsen, R.M. *Macromolecules*. **1994**, 27, 4825.
37. Lecuyer, S. *Fluctuation et Déstabilisation d'Une Bicouche Lipidique Supporté*. PhD Thesis. Strasbourg: Université Louis Pasteur, **2006**.
38. Benkoski, J.J.; Hook, F. *Journal of Physical Chemistry B*. **2005**, 109, 9773.
39. Nkodo, A.E.; Tinland, B. *Electrophoresis*. **2002**, 23, 2755.
40. Ladha, S.; Mackie, A.R.; Harvey, L.J.; Clark, D.C.; Lea, E.J.A.; Brullemans, M.; Duclouhier, H. *Biophysical Journal*. **1996**, 71, 1364.
41. Ladha, S.; Mackie, A.R.; Clark, D.C. *Journal of Membrane Biology*. **1996**, 71, 1364.
42. Guinier, A. *X-Ray Diffraction in Crystals, Imperfect Crystals and Amorphous Bodies*. New York: Dover Publications, **1994**.
43. Demus, D.; Goodby, J.; Gray, G.W.; Spiess, H.W.; Vill, V. *Handbook of Liquid Crystals*. Vol. 1 New York: Wiley-VHC, **1998**.
44. Davidson, P. *Selected Topics in X-Ray by Liquid Crystalline Polymers*. In: *Liquid Crystals II*. Berlin: Springer, **1999**.
45. Cavalcanti, L.P. *Estudo Estrutural de Membranas Modelo Utilizando Radiação Síncrotron*. Tese de Doutorado. Campinas: UNICAMP, **2001**.
46. Glatter, O. *Progress in Colloid and Polymer Science*. **1991**, 84, 46.
47. Cavalcanti, L.P.; Torriani, I.L.; Plivelic, T.S.; Oliveira, L.P.; Kellerman, G.; Neuenschwander, R. *Review of Scientific Instruments*. **2004**, 75, 4541.
48. Bouwstra, J.A.; Gooris, G.S.; Bras, W.; Talsma, H. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1993**, 64, 83.
49. Caboi, F.; Amico, G.S.; Pitzalis, P.; Monduzzi, M.; Nylander, T.; Larsson, K. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2001**, 109, 47.
50. Zetasizer Nano Series. *User Manual*. England: Malvern Instruments, **2004**.
51. Silverstein, R.M.; Webster, F.X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC, **2000**.
52. Smith, I.C.P.; Ekiel, I. *Phosphorus-31 NMR. Principle and Applications*. New York: Academic Press, **1984**.
53. Cullins, P.R.; Kruijff, B. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1979**, 559, 399.
54. Seelig, J. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1978**, 515, 105.
55. Fa, N.; Ronkart, S.; Schanck, A.; Deleu, M.; Gaigneaux, A.; Goormaghtigh, E.; Mingeot-Leclercq, M.P. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2006**, 144, 108.
56. Qiu, X.; Pidgeon, C. *Biochemistry*. **1994**, 33, 960.
57. Tyteca, D.; Schanck, A.; Dufrene, Y.F.; Deleu, M.; Courtoy, P.J.; Tulkens, P.M. Mingeot-Leclercq, M.P. *Journal of Membrane Biology*. **2003**, 192, 203.
58. Montenez, J.P.; Van Bambeke, F.; Piret, J.; Schanck, A.; Brasseur, R.; Tulkens, P.M.; Mingeot-Leclercq, M.P. *European Journal of Pharmacology*. **1996**, 314, 215.
59. Zuidam, N.J.; Gouw, H.K.M.E.; Barenholz, Y.; Crommelin, D.J.A. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1995**, 1240, 101.
60. Dufourc, E.J.; Mayer, C.; Stohrer, J.; Althoff, G.; Kothe, G. *Biophysical Journal*. **1992**, 61, 42.
61. Traikia, M.; Warschawski, D.E.; Recouvreux, M.; Cartaud, J.; Devaux, P.F. *European Biophysical Journal*. **2000**, 29, 184.

62. Traikia, M.; Langlais, D.B.; Cannarozzi, G.M.; Devaux, P.F. *Journal of Magnetic Resonance*. **1997**, 125, 140.
63. Burnell, E.E.; Cullins, P.R.; Kruijff, B. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1980**, 603, 63.
64. Timoszyk, A.; Gdaniec, Z.; Latanowicz, L. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. **2004**, 25, 142.
65. Pereira, F.B.; Valpuesta, J.M.; Basanez, G.; Goni, F.M.; Nieva, J.L. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1999**, 103, 11.
66. Lopes, L.B.; Scarpa, M.V.; Silva, G.V.J.; Rodrigues, D.C.; Santilli, C.V.; Oliveira, A.G. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **2004**, 39, 151.
67. Fa, N. *Micro-rhéologie de vésicules géantes*. PhD Thesis. Strasbourg: Université Louis Pasteur, **2003**.
68. Angelova, M.I.; Soléau, S.; Méléard, P.; Faucon, J.F.; Bothorel, P. *Progress in Colloid and Polymer Science*. **1992**, 89, 127.
69. Sens, P.; Isambert, H. *Physical Review Letters*. **2002**, 88, 128102.
70. Vila, A.O.; Rodriguez-Flores, C.; Figueruelo, J.; Molina, F. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2001**, 189, 1.
71. Vila, A.O.; Rodriguez-Flores, C.; Figueruelo, J.; Molina, F. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2001**, 191, 233.
72. Quemeneur, F.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. *Biomacromolecules*. **2008**, 9, 396.
73. Quemeneur, F.; Rammal, A.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. *Biomacromolecules*. **2007**, 8, 2512.
74. Oliveira, M.J. *Microscopia Óptica*. Em: *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo: Artliber Editora, **2004**, p. 147-164.
75. Ploem, J.S.; Tanke, H.J. *Fluorescence Microscopy (Royal Microscopy Society Microscopy Handbook No 10)*. New York: BIOS Scientific Publ. **2004**.
76. Petrache, H.I.; Tristram-Nagle, S.; Gawrisch, K.; Harries, D.; Parsegian, V.A.; Nagle, J.F. *Biophysical Journal*. **2004**, 86, 1574.

## **Capítulo 3. Resultados e Discussões**

### **3.1. Lipossomas e Quitossomas Nanométricos**

#### **3.1.1. Avaliação Estrutural**

A estruturação dos lipossomas e quitossomas preparados pela evaporação em fase reversa foi estudada para que se pudesse inferir sobre as características morfológicas e de tamanho de cada espécie. Independentemente do método de preparação empregado para a formação de vesículas, as estruturas obtidas devem ser criteriosamente estudadas para viabilizar não somente as informações sobre parâmetros fundamentais, mas também propiciar o desenvolvimento de características aplicativas.

No caso particular de quitossomas, a avaliação estrutural torna-se de suma importância considerando que as modificações inferidas nas vesículas com a presença do polissacarídeo são desconhecidas, especialmente com a sua introdução pela metodologia aplicada nos trabalhos da presente Tese. A constante comparação de quitossomas com lipossomas, permitiu avaliar também as vantagens e desvantagens decorrentes da introdução da quitosana na estrutura das vesículas.

##### **3.1.1.1. Espalhamento de Luz**

O Espalhamento de Luz representa uma técnica experimental importante no estudo de características estruturais de vesículas em suspensão. Através do Espalhamento de Luz Dinâmico, as funções de correlação temporal obtidas mostraram-se unimodais, ou seja, com um único tempo de relaxação representativo de uma população de estruturas de tamanhos relativamente próximos. A Figura 3.1 mostra uma função de correlação característica obtida para uma amostra de quitossomas. Todas as amostras estudadas apresentaram funções semelhantes. A partir das mesmas foram calculados os demais parâmetros apresentados a seguir.

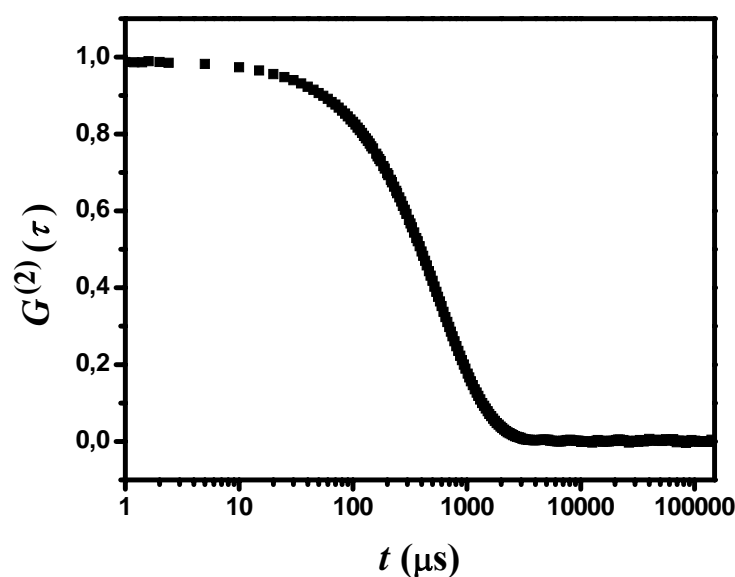


Figura 3.1. Função de autocorrelação temporal representativa, obtida para uma amostra de quitossomas em suspensão aquosa através do Espalhamento de Luz Dinâmico.

Primeiramente começamos por avaliar os tamanhos das estruturas em suspensão através do raio hidrodinâmico  $R_h$ . É importante lembrar que as vesículas foram obtidas pela evaporação em fase reversa seguida ou não de algum pós-tratamento para a homogeneização estrutural. A Figura 3.2 mostra a variação do  $R_h$  sob influência da filtração através de membranas de diâmetros de poros de 0,45 e 1,20  $\mu\text{m}$  para lipossomas e quitossomas preparados com diferentes concentrações de quitosana. Para todas as amostras, fica evidenciado um aumento do  $R_h$  com a presença do polímero, bem como um contínuo aumento com a concentração do mesmo para as amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$ . Para as amostras filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$  e para as amostras não filtradas, o aumento de  $R_h$  ocorre até a concentração de 0,5 mg/mL de quitosana e, acima dessa concentração, foi observada uma relativa estabilização do tamanho médio das vesículas. Os resultados indicam que o polímero perturba fisicamente o sistema até uma concentração limite. Porém, o processo não foi observado para as amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$ .

A característica fundamental evidenciada por este estudo consiste na considerável diferença não só do tamanho médio, mas também da distribuição de tamanhos, obtidos para as vesículas filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$ , quando comparadas aos sistemas não filtrados. Ambos os



parâmetros foram drasticamente reduzidos quando a suspensão passou pela filtração. Por outro lado, entre as amostras filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$  e não filtradas, as diferenças não foram significativas, sendo que para as concentrações 0,10, 0,25 e 0,50 mg/mL de quitosana, as variações médias estão dentro da variação da distribuição de tamanhos. Como esta variação de distribuição é igualmente elevada para todas as amostras destes dois casos, os resultados sugerem que a filtração a 1,20  $\mu\text{m}$  praticamente não altera o sistema não filtrado, ou seja, a filtração a 1,20  $\mu\text{m}$  pode ser considerada desnecessária em relação ao  $R_h$ .

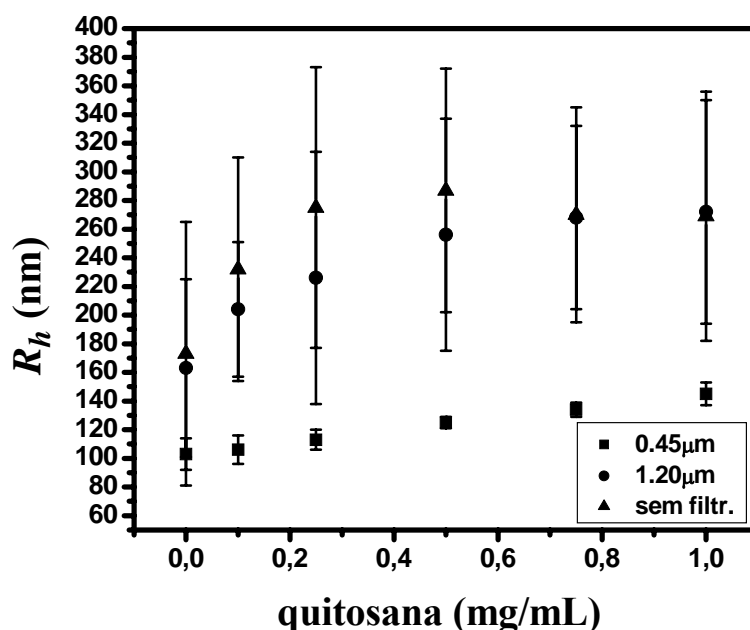


Figura 3.2. Variação do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) obtido por Espalhamento de Luz Dinâmico para lipossomas e quitossomas em função da concentração de quitosana para amostras filtradas a 0,45 e 1,20  $\mu\text{m}$  e amostras não filtradas, conforme indicado.<sup>1</sup>

A extensão da variação de tamanhos também pode ser avaliada pelo valor do índice de polidispersão (Poly), mostrado na Tabela 3.1. O mesmo está diretamente relacionado com variação no  $R_h$ , representando a distribuição de tamanhos das vesículas em suspensão.

A outra característica demonstrada aqui, é o aumento do  $R_h$  das vesículas com a presença da quitosana e o aumento da sua concentração. Este resultado indica que o polímero está efetivamente presente nas estruturas e de alguma forma está delineando a estruturação das mesmas.

Outro dado importante fornecido pelo Espalhamento de Luz Dinâmico é o coeficiente de difusão à diluição infinita  $D_o$ . Considerando o movimento Browniano das vesículas em suspensão, o  $D_o$  atua de forma inversa ao  $R_h$ , ou seja, com o aumento do  $R_h$  o  $D_o$  diminui.<sup>2</sup>

Tabela 3.1. Variação da intensidade de luz espalhada ( $I_S$ ), do coeficiente de difusão à diluição infinita ( $D_o$ ), do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), do índice de polidispersão (Poly), do raio de giro ( $R_g$ ) e da relação entre os raios ( $\rho = R_g/R_h$ ) para as diferentes amostras estudadas através do Espalhamento de Luz: vesículas filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  (a), vesículas filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$  (b) e vesículas não filtradas (c).

a)

quitosana (mg/mL)	$I_S$ (kcts/s)	$D_o \cdot 10^{-8}$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )	$R_h$ (nm)	Poly ( $\pm\%$ )	$R_g$ (nm)	$\rho = R_g/R_h$
1,00	37 $\pm$ 3	1,48	145 $\pm$ 8	0,2 $\pm$ 5	102 $\pm$ 3	0,71
0,75	35 $\pm$ 2	1,60	134 $\pm$ 5	0,3 $\pm$ 7	107 $\pm$ 4	0,80
0,50	28 $\pm$ 4	1,72	125 $\pm$ 4	0,2 $\pm$ 9	99 $\pm$ 7	0,80
0,25	25 $\pm$ 5	1,90	113 $\pm$ 7	0,1 $\pm$ 10	92 $\pm$ 4	0,82
0,10	20 $\pm$ 2	2,02	106 $\pm$ 10	0,3 $\pm$ 6	88 $\pm$ 7	0,84
0,00	14 $\pm$ 5	2,08	103 $\pm$ 11	0,3 $\pm$ 5	81 $\pm$ 5	0,79

b)

quitosana (mg/mL)	$I_S$ (kcts/s)	$D_o \cdot 10^{-8}$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )	$R_h$ (nm)	Poly ( $\pm\%$ )	$R_g$ (nm)	$\rho = R_g/R_h$
1,00	76 $\pm$ 3	0,79	272 $\pm$ 78	0,5 $\pm$ 8	106 $\pm$ 4	0,41
0,75	64 $\pm$ 6	0,80	268 $\pm$ 64	0,4 $\pm$ 17	106 $\pm$ 3	0,42
0,50	56 $\pm$ 6	0,84	256 $\pm$ 81	0,5 $\pm$ 15	92 $\pm$ 3	0,37
0,25	41 $\pm$ 4	0,95	226 $\pm$ 88	0,5 $\pm$ 9	98 $\pm$ 7	0,44
0,10	34 $\pm$ 5	1,05	204 $\pm$ 47	0,6 $\pm$ 12	98 $\pm$ 6	0,49
0,00	21 $\pm$ 4	1,31	163 $\pm$ 62	0,5 $\pm$ 10	91 $\pm$ 5	0,57

c)

quitosana (mg/mL)	$I_S$ (kcts/s)	$D_o \cdot 10^{-8}$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )	$R_h$ (nm)	Poly ( $\pm\%$ )	$R_g$ (nm)	$\rho = R_g/R_h$
1,00	95 $\pm$ 2	0,80	269 $\pm$ 87	0,4 $\pm$ 6	106 $\pm$ 8	0,40
0,75	84 $\pm$ 3	0,79	270 $\pm$ 75	0,5 $\pm$ 7	101 $\pm$ 7	0,39
0,50	71 $\pm$ 5	0,75	287 $\pm$ 85	0,6 $\pm$ 10	104 $\pm$ 15	0,38
0,25	55 $\pm$ 4	0,78	275 $\pm$ 98	0,5 $\pm$ 8	98 $\pm$ 5	0,37
0,10	39 $\pm$ 4	0,92	232 $\pm$ 78	0,6 $\pm$ 9	103 $\pm$ 5	0,46
0,00	26 $\pm$ 6	1,24	173 $\pm$ 92	0,6 $\pm$ 18	79 $\pm$ 10	0,47

A Tabela 3.1 ilustra este comportamento comparando os dados de  $R_h$  com o  $D_o$ . Sendo assim, vesículas com  $R_h$  maior difundem com uma velocidade menor e vice-versa. A presença de quitosana concorre, portanto, para a redução do  $D_o$  em função da sua concentração. Como pode ser observado na Tabela 3.1, este efeito é mais pronunciado para as amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$ , onde a distribuição de tamanhos mais estreita resulta em dados de maior linearidade.

Além do Espalhamento de Luz Dinâmico, o Espalhamento de Luz Estático também forneceu dados importantes para as vesículas em suspensão. A intensidade de luz espalhada  $I_S$  aumentou consideravelmente com a presença de quitosana e o aumento da sua concentração (Tabela 3.1). Considerando por exemplo a amostra filtrada a 0,45  $\mu\text{m}$ , a  $I_S$  média passou de 14 kcts/s para as amostras sem quitosana, até 37 kcts/s para as amostras com a maior concentração de quitosana. A diferença significa um aumento médio de 164%. Aqui deve ser lembrado que as amostras foram diluídas à mesma concentração de vesículas em água, ou seja, a diluição do gel obtido na evaporação em fase reversa foi a mesma para todas as amostras. Evidentemente existe uma diferença considerável de concentração de partículas entre amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$ , 1,20  $\mu\text{m}$  e não filtradas, considerando a possibilidade de perdas no processo de filtração. Porém, o aumento de  $I_S$  com a concentração polimérica ocorre dentro da mesma série de amostras. Como a concentração de fosfolipídios na preparação das vesículas é mantida constante, lembrando que o  $R_h$  das vesículas com quitosana também aumentou, não seria razoável supor que o número de partículas produzidas com a presença de quitosana seria maior. Pelo contrário, o número de vesículas deve ser menor. Sendo assim, as amostras com quitosana possuem uma tendência de apresentar menos vesículas, porém maiores, sem levar em conta efeitos morfológicos, ou seja, supondo que temos somente vesículas esféricas, onde o  $R_h$  conta com uma camada de solvatação semelhante para todas as amostras da mesma série. Supondo o sistema nesta situação ideal, uma amostra com menor concentração de partículas, porém de  $R_h$  maior, apresentaria  $I_S$  maior do que uma amostra de  $R_h$  menor, o que corresponde aos resultados obtidos.

De acordo com a equação 2.4 (Sessão 2.3), a  $I_S$  depende diretamente da massa molar da estrutura espalhante, considerando um  $dn/dc$  pouco variável entre as diferentes amostras da mesma série. Na mesma situação espera-se uma massa molar maior para estruturas maiores, as quais contêm um número maior de moléculas da mesma espécie. Por fim, o que pode ser afirmado a respeito do comportamento da variação da  $I_S$ , é que o

parâmetro corrobora com os resultados de espalhamento dinâmico, confirmando o comportamento de aumento de  $R_h$  proporcionado pela concentração do polímero.

Através da  $I_S$  medida a diferentes ângulos de espalhamento, aplicando o método da dissimetria angular (Sessão 2.3), foi obtido também o raio de giro  $R_g$  das vesículas em suspensão. Como pode ser observado na Tabela 3.1, de forma geral o  $R_g$  também aumenta com a presença de quitosana e com a sua concentração. Porém, nenhuma diferença significativa foi observada entre as diferentes séries de amostras, ou seja, o  $R_g$  manteve-se aparentemente independente do uso da filtração ou não.

Na prática, foi observada certa dependência angular na determinação das intensidades de luz espalhada a diferentes ângulos. Essa dependência angular foi maior para vesículas de  $R_h$  maiores. Em função do tamanho da vesícula e do vetor de onda utilizado, sabe-se que  $R_g q \cong 1$ , indicando que a  $I_S$  contém informações sobre o fator estrutura da suspensão. Isso significa que uma parte da intensidade provém da interação entre partículas. Sabe-se que  $I_S \cong P(q) S(q)$ , onde  $P(q)$  é conhecido como o fator forma e  $S(q)$  fator estrutura. Enquanto o primeiro relaciona-se à estrutura interna da partícula, o segundo corresponde às interações inter-partículas. Este comportamento é totalmente esperado no fenômeno de espalhamento de luz, sendo que partículas maiores espalham mais luz em ângulos menores (abaixo de  $90^\circ$ ) do que em ângulos maiores (acima de  $90^\circ$ ). Essa dependência angular acaba gerando uma incerteza maior na determinação do  $R_g$  pelo método da dissimetria.

De qualquer forma, os valores de  $R_g$  foram determinados e com isso pôde-se também calcular a relação  $\rho = R_g / R_h$  para inferir sobre a morfologia das vesículas em solução. De acordo com a Tabela 3.1, os valores de  $\rho$  para as amostras filtradas estão próximos ao valor de 0,77 que foi determinado por Burchard como sendo correspondente a uma estrutura esférica rígida e homogênea.<sup>3,4</sup> Neste caso a combinação das técnicas de Espalhamento de Luz Estático e Dinâmico fornece um resultado de definição estrutural para as vesículas em suspensão aquosa.

Para as amostras filtradas a  $1,20 \mu\text{m}$  e não filtradas, o valor de  $\rho$  forneceu resultados bem menores e que sugerem a presença de estruturas mais complexas, com regiões alongadas, de alta massa molar, agregados ou mesmo microgéis. Burchard determinou valores de  $\rho$  entre 0,3 e 0,5 para agregados e microgéis de celulose onde cadeias poliméricas estendidas fora do agregado principal atuam como uma espécie de esponja, retendo uma camada de solvatação considerável, o que aumenta significativamente o  $R_h$  e

consequentemente reduz o valor de  $\rho$ .<sup>3</sup> Neste caso, os valores de  $\rho$  encontrados aqui demonstram um sistema de homogeneidade estrutural menor com a presença de estruturas não esféricas. A presença de agregados micrométricos e microgéis pode ser descartada, já que não foram observadas estruturas desta ordem no Espalhamento de Luz Dinâmico.

Como conclusão mais abrangente, os resultados de  $\rho$  demonstram que existe uma necessidade de pós-tratamento das vesículas para que as mesmas possam ser estruturalmente homogeneizadas. Pelos resultados obtidos, a filtração das vesículas pela membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  mostra-se bastante adequada para a seleção de estruturas esféricas. Mais além, considerando a Figura 3.2, os resultados também demonstram que a filtração reduz o  $R_h$  das vesículas para valores abaixo dos obtidos para as amostras filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$  e não filtradas. Esse resultado sugere que a filtração a 0,45  $\mu\text{m}$  promove uma re-estruturação das partículas através da passagem das mesmas pela membrana porosa que constitui uma submissão a um estado de estresse físico pela ação de pressão durante a filtração com o uso de seringa.<sup>5</sup> Sendo que as bicamadas fosfolipídicas das vesículas foram determinadas como sistemas de alta coesão mecânica, ou seja, dotadas de alta elasticidade e compressibilidade,<sup>6</sup> essa re-estruturação pela filtração pode ser devidamente compreendida. As vesículas dimensionalmente maiores do que os poros do filtro podem ser parcialmente desestruturadas com a pressão e o fluxo da filtração. Após a passagem pelo filtro, as mesmas se reorganizam em vesículas menores. A membrana de uma vesícula pode, por exemplo, romper durante a passagem pelo poro e assim se reorganizar novamente em duas vesículas menores, como representado na Figura 3.3.

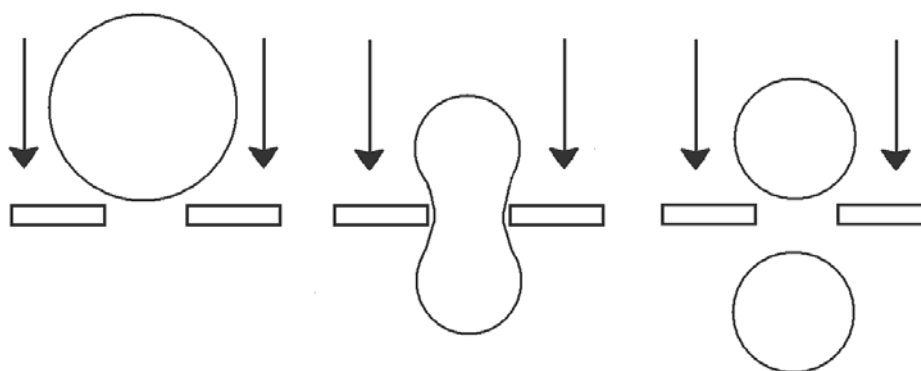


Figura 3.3. Representação sequencial (esquerda para direita) da passagem de uma vesícula através do poro de um filtro menor do que a estrutura a ser filtrada. A membrana da vesícula rompe durante a passagem da mesma e assim duas novas estruturas menores são formadas. As flechas indicam a direção do fluxo da filtração.

A energia conferida pelo processo de filtração é suficiente para moldar as vesículas sendo que a mesma pode atuar a nível molecular, rompendo ou estimulando interações entre as moléculas envolvidas na estruturação das vesículas. Deve-se considerar que para vesículas fosfolipídicas em água a estruturação de energia livre mais favorecida consiste na estruturação da bicamada em uma vesícula esférica,<sup>7</sup> conforme discutido na Sessão 1.2.2. Desta forma, a re-estruturação das vesículas em estruturas esféricas pode ser devidamente justificada.<sup>1</sup>

De qualquer forma, o processo de filtração não parece estar atuando no sentido de excluir o efeito provocado pela quitosana, considerando novamente as variações de todos os parâmetros discutidos aqui. Em vista destes resultados, é razoável afirmar que as amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  são mais adequadas para viabilizar estudos nos quais as vesículas estão sujeitas à menores variações em sua estrutura e capazes, portanto, de proporcionar processos reprodutíveis. Assim, um outro parâmetro foi determinado para estas amostras. Consiste no coeficiente virial dinâmico  $k_D$ , apresentado na Tabela 3.2.

Através dos valores de  $k_D$  é possível inferir sobre a qualidade do solvente empregado na manutenção das partículas em solução, já que o mesmo está relacionado com as interações termodinâmicas entre as partículas e o solvente. Quanto maiores os valores de  $k_D$  melhor é a interação termodinâmica, ou seja, o solvente atua de forma mais eficaz na dissolução das partículas e é, portanto, considerado um bom solvente. Para valores negativos as interações termodinâmicas são fracas ou desfavorecidas e assim o solvente é considerado um mal solvente ou mesmo um não solvente. Neste caso significa que temos um líquido de suspensão onde as partículas estão dispersas e não dissolvidas.

Tabela 3.2. Coeficiente virial dinâmico ( $k_D$ ) obtido por Espalhamento de Luz Dinâmico para amostras de lipossomas e quitossomas com concentração polimérica crescente.<sup>1</sup>

quitosana (mg/mL)	$k_D$ (L/g)
1,00	-0,070
0,75	-0,062
0,50	-0,050
0,25	-0,034
0,10	-0,021
0,00	-0,013

Todos os valores de  $k_D$  obtidos para as amostras de vesículas filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  foram negativos (Tabela 3.2). Este resultado significa que o sistema vesicular em água forma uma suspensão de partículas onde as estruturas difundem sob reduzida influência termodinâmica das moléculas de água, por baixa afinidade com o solvente. Outro resultado interessante reside no decréscimo do valor de  $k_D$  com o aumento da concentração de quitosana. Por conseguinte, as interações entre as vesículas e a água são ainda menores quando existe quitosana na estrutura vesicular. Considerando o pH do meio igual a  $5,8 \pm 1$ , o mesmo não constitui um ambiente favorável para interações com a quitosana, já que a mesma normalmente precipita em pH acima de 5,5.<sup>8</sup> De forma global, este resultado também sugere que existe quitosana interagindo ou revestindo a região externa das vesículas que foram preparadas na presença da mesma.

Para alguns estudos efetuados na parte mais avançada da presente Tese, a ultrasonicação foi utilizada como processo de homogeneização estrutural das vesículas. A filtração pela membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ , sem desconsiderar todas as suas vantagens discutidas nesta Sessão, pode ocasionar perda em massa dos componentes que estão sendo filtrados, como normalmente ocorre nos processo de filtração. Sendo assim, a ultrasonicação foi aplicada como um processo diferenciado para a obtenção de vesículas esféricas.

Na ultrasonicação alguns parâmetros devem ser padronizados para que os resultados possam ser reproduzíveis. Normalmente a energia despendida pelo processo de ultrasonicação é alta para estruturas vesiculares como as aqui estudadas. Em outras palavras, a energia aplicada, dependendo da sua intensidade, pode facilmente produzir fenômenos indesejados a nível molecular, como quebra de moléculas, especialmente as longas cadeias hidrocarbonadas dos fosfolipídios, bem como as cadeias poliméricas da quitosana. Processos de oxidação molecular e reações entre moléculas e/ou entre fragmentos de moléculas produzidos pela ultrasonicação também podem facilmente ocorrer assim como a hidrólise.<sup>9,10</sup>

Além da energia aplicada na ultrasonicação, um tempo excessivamente prolongado das amostras sob a ação da ultrasonicação pode gerar os mesmos problemas acima enunciados. Ainda mais considerando que a ultrasonicação também aquece o sistema, depois de um determinado tempo, como forma de dissipar parte da energia transferida ao mesmo.

Os parâmetros de ultrasonicação de vesículas fosfolipídicas foram cuidadosamente estudados por Pereira-Lachataignerais e colaboradores para a obtenção de vesículas com reduzido índice de polidispersão.<sup>11</sup> As condições de energia aplicada e tempo de

ultrasonicação foram otimizadas. Para as sonicações procedidas na presente Tese, foi utilizada uma energia menor do que a energia máxima proposta por Pereira-Lachataignerais e colaboradores. O tempo de ultrasonicação, também menor, foi otimizado medindo-se a distribuição de tamanhos obtidos para diferentes tempos através do Espalhamento de Luz Dinâmico.

Lipossomas e quitossomas (contendo a maior concentração polimérica, 1,0 mg/mL) foram ultrasonificados com ultrasonicador de ponta metálica com tempos variando entre 30 segundos e 10 minutos sob energia constante de 50 mW, frequência nominal de 40 kHz sob amplificação de 10%. As distribuições de  $R_h$  foram medias logo em seguida a 90° e foi observada uma nítida redução de  $R_h$  e principalmente da sua distribuição.

A Figura 3.4, onde foram graficadas as distribuições de  $R_h$  em função da amplitude do volume de distribuição obtidas pelo tratamento matemático (REPES) das curvas de correlação temporal, demonstra as diferenças geradas pela energia da ultrasonicação para os dois tipos de amostras investigadas. As funções de correlação temporal obtidas também foram unimodais e da mesma forma como no estudo anterior, as amostras não submetidas a nenhum pós-tratamento resultaram num  $R_h$  médio característico e de larga distribuição nanométrica.

Na Figura 3.4 são apresentadas as distribuições para os tempos de ultrasonicação de 30 segundos, 1 minuto e 5 minutos. Pode ser observado que houve uma contínua e considerável redução de  $R_h$  médio e um estreitamento do pico de distribuição com o aumento do tempo de sonicação.

Os tempos intermediários entre 1 minuto e 5 minutos seguiram a mesma tendência de redução de  $R_h$  médio e estreitamento do pico de distribuição. Os tempos acima de 5 minutos apresentaram a mesma tendência, porém de forma menos acentuada. Como resultado, as amostras sonicadas a 10 minutos apresentaram  $R_h$  e distribuição menores para ambas as amostras, porém não significativamente menores. Por esta razão o tempo de 5 minutos de ultrasonicação foi considerado ideal para os objetivos aqui propostos: estruturas esféricas, nanométricas, com uma distribuição de  $R_h$  razoavelmente estreita e sem indícios de degradação molecular.



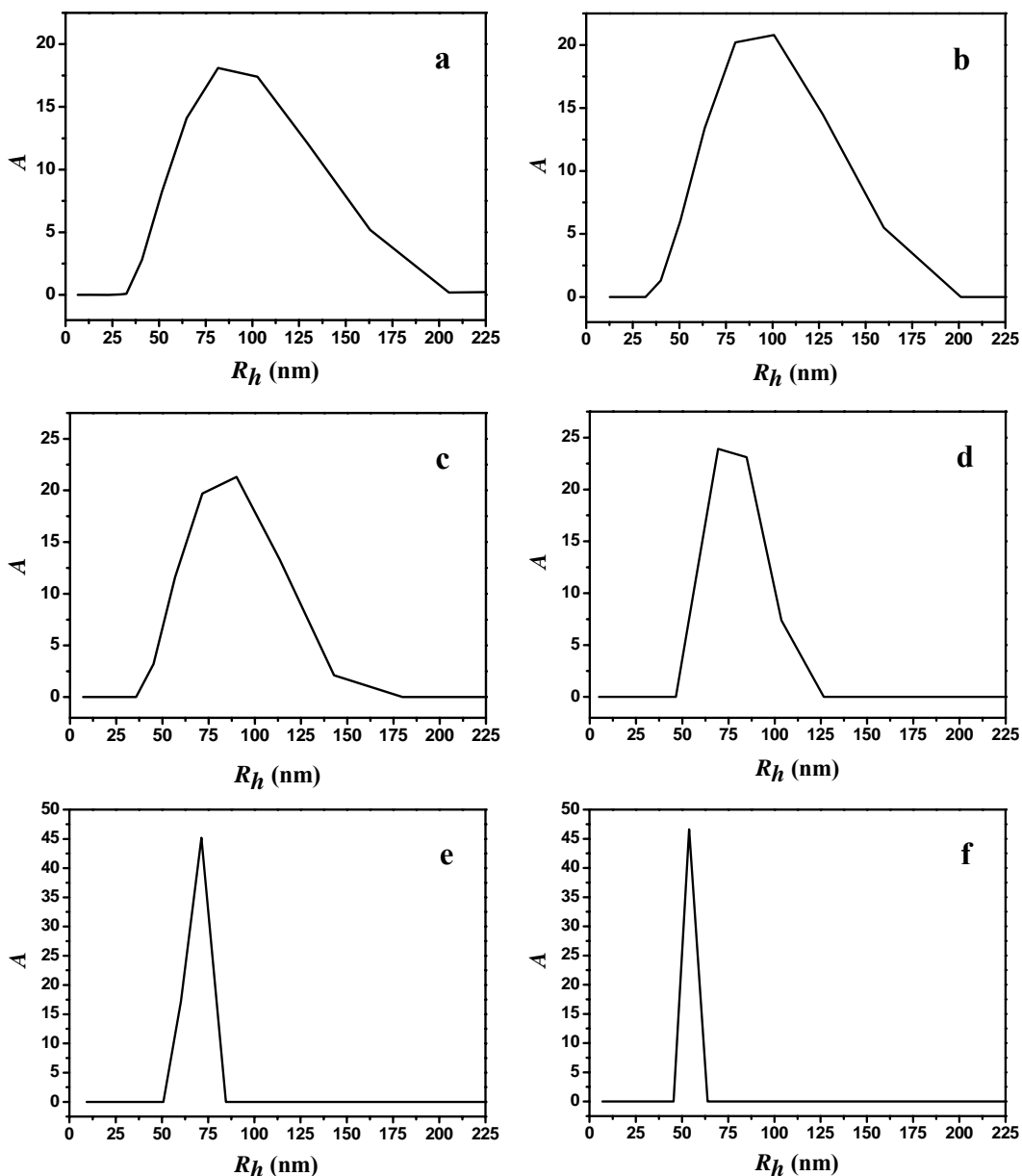


Figura 3.4. Distribuições do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) em função da amplitude do volume de distribuição ( $A$ ) obtidas a partir da análise das funções de correlação temporal do Espalhamento de Luz Dinâmico para amostras de lipossomas (a, c, e) e quitossomas (b, d, f) submetidas a diferentes tempos de ultrasonicação sob energia constante: 30 segundos (a, b); 1 minuto (c, d); 5 minutos (e, f).

As amostras sonicadas durante 5 minutos ou mais sofreram um leve aquecimento, porém o mesmo não ultrapassou os 35 °C, temperatura eventualmente utilizada para a evaporação do solvente orgânico no processo de preparação em fase reversa. Essa temperatura aplicada durante um tempo relativamente curto, não demonstrou gerar produtos

de degradação fosfolipídica detectáveis pela Cromatografia em Camada Delgada, sendo que amostras de vesículas eluídas antes e após aquecimento sob sonicação apresentaram resultados equivalentes conforme representado na Figura 3.5. Estes resultados de eluição são igualmente idênticos aos apresentados para a eluição do fosfolipídio utilizado, simplesmente dissolvido em clorofórmio, o que demonstra que a produção de vesículas a princípio não gera degradações fosfolipídicas perceptíveis pela CCD. Deve ser considerado que o fosfolipídio utilizado apresenta um grau de pureza aproximado de 95%, sendo que uma das impurezas constitui o produto de degradação, conforme discutido na Sessão 2.2.1.

Na prática, a energia de ultrasonicação provoca a desestruturação das bicamadas fosfolipídicas das vesículas, com rompimentos de membranas as quais acabam se auto-organizando em estruturas menores para voltar ao estado de menor energia livre, onde as interações de polaridade e apolaridade são otimizadas. O processo pode ser comparado até certo ponto com a filtração sob pressão, porém na ultrasonicação, a energia fornecida provoca agitações moleculares intensas que resultam nos rompimentos das membranas.

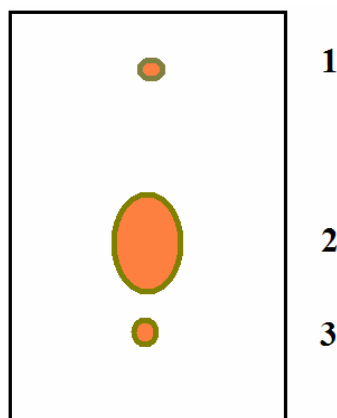


Figura 3.5. Representação do resultado de Cromatografia em Camada Delgada em placas de sílica gel (eluente: clorofórmio:metanol:água (6,5:2,5:0,4)) reveladas em atmosfera saturada de iodo para eluição de amostra de lipossomas e quitossomas antes e após ultrasonicação durante 10 minutos. As manchas correspondem ao ácido fosfatídico ( $R_f = 0,72$ ) (1), fosfatidilcolina (95%,  $R_f = 0,21$ ) (2) e lisofosfatidilcolina ( $R_f = 0,07$ ) (3).

Um aspecto diferenciado observado neste estudo estrutural de vesículas submetidas à ultrasonicação pode ser percebido pela comparação entre as Figuras 3.4 e e f. Os valores de  $R_f$  e também a sua distribuição foram levemente inferiores para a amostra contendo

quitosana. O resultado é oposto ao obtido pelo processo de filtração e sugere a existência de algum efeito gerado pela presença do polímero sob a ação da energia de sonicação. Considerando que a energia de ultrasonicação provoca agitações a nível molecular, uma possibilidade seria a desestruturação mais eficiente dos quitossomas justamente pela presença do polímero que, interagindo com a membrana das vesículas e sendo susceptível a uma agitação molecular maior do que a membrana, colaboraria para o rompimento da mesma. Uma outra possibilidade seria a perda de polímero sob a ação da ultrasonicação. Neste caso, quitossomas poderiam estar sendo transformados em lipossomas. Para a avaliação destas hipóteses, as amostras sonicadas a 5 minutos foram investigadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (Sessão 3.1.1.3) e Recuperação de Fluorescência Após Foto-branqueamento (Sessão 3.1.3.2). Para esta segunda técnica as amostras foram preparadas com fosfolipídio fluorescente NBDPC a 0,1% para lipossomas e com quitosana fluorescente para quitossomas (Sessão 2.2.1). As vesículas fluorescentes apresentaram resultados de  $R_g$  semelhantes sob a ação da ultrasonicação.

### **3.1.1.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo**

O Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo, SAXS, consiste numa técnica fundamental para o estudo da organização de sistemas vesiculares a nível molecular. A interação da radiação com a estrutura eletrônica e o seu subsequente espalhamento fornece informações detalhadas de aspectos estruturais que dificilmente poderiam ser obtidas por outras técnicas.

Nos estudos estruturais das vesículas nanométricas deste trabalho o SAXS foi empregado para a avaliação das séries de amostras já discutidas na Sessão anterior, ou seja, os lipossomas e os quitossomas filtrados a 0,45 ou 1,20  $\mu\text{m}$  e não filtrados, apresentados na Tabela 3.1.

A Figura 3.6 mostra perfis de espalhamento de SAXS obtidos para a série de amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$ . Pode ser observado um comportamento peculiar apresentado sistematicamente para todas as séries de amostras. Este comportamento evidencia o aumento da definição dos picos de espalhamento com o concomitante crescimento da concentração de quitosana utilizada na preparação dos quiossomas. Conforme discutido na Sessão 2.4, picos de Bragg bem definidos estão relacionados com uma maior organização a nível molecular,

pois o espalhamento é coerente. Por outro lado, curvas extendidas denotam uma inconstância na organização molecular, e são o resultado de um espalhamento incoerente.

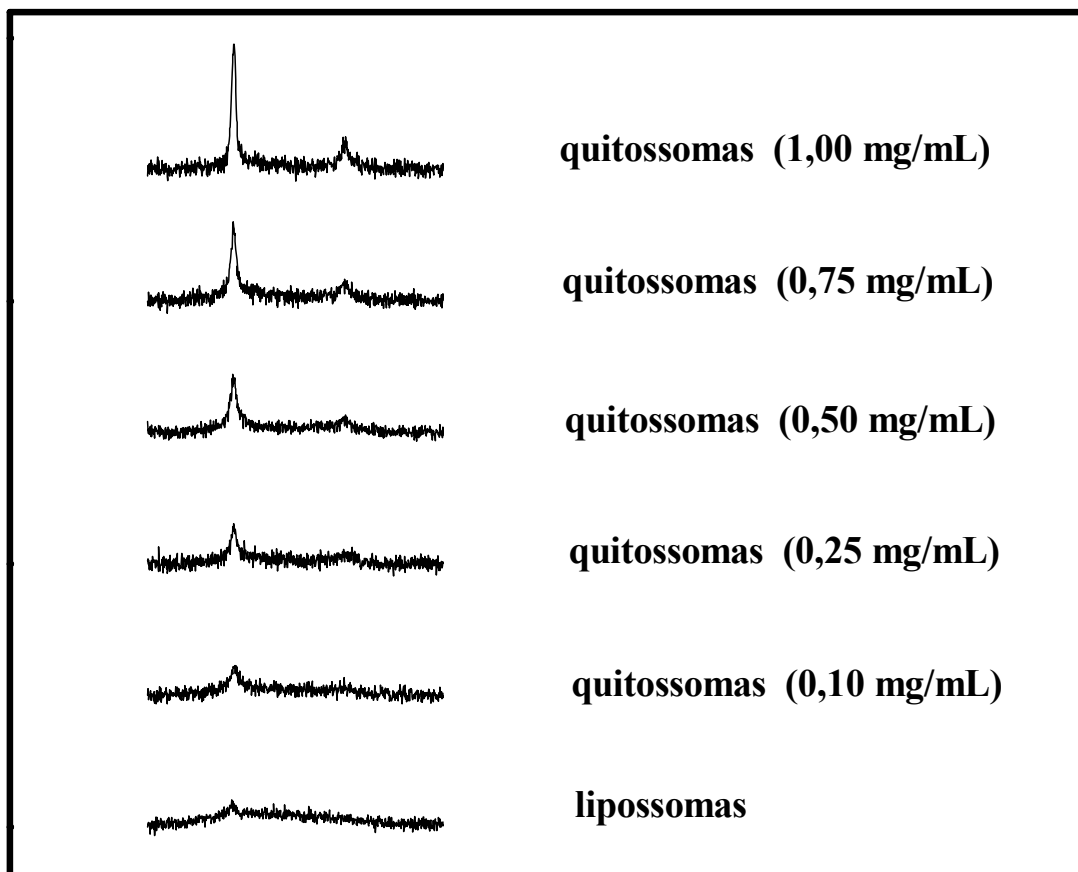


Figura 3.6. Espectros de SAXS obtidos para uma série de amostras de lipossomas e quitossomas com crescente concentração de quitosana, conforme indicado, filtradas com membrana de  $0,45 \mu\text{m}$ . Os perfis de espalhamento são demonstrados como intensidade de radiação espalhada ( $y$ ) em função do vetor de onda  $q$  ( $x$ ) sem redução do ruído de fundo.

Bouwstra e colaboradores procederam a um estudo detalhado de SAXS aplicado para lipossomas.<sup>12</sup> Os espectros de SAXS foram relacionados com o perfil de densidade eletrônica das bicamadas das vesículas. Dados como a distância de repetição das bicamadas e o número de bicamadas sobrepostas em estruturas multilamelares foram determinados e a influência da curvatura da bicamada das vesículas no perfil de espalhamento foi avaliada.

No que concerne à influência da curvatura da membrana, apenas lipossomas com diâmetros inferiores à  $50 \text{ nm}$  foram caracterizados por influenciarem significativamente os

perfis de espalhamento.<sup>12</sup> Como neste trabalho as vesículas apresentaram diâmetros muito acima deste valor, o parâmetro curvatura da membrana foi desconsiderado.

Através de cálculos aplicando modelos teóricos, Bouwstra e colaboradores obtiveram perfis de espalhamento de SAXS teóricos que puderam ser relacionados com os resultados experimentais. Assim, foi estabelecido que espectros de SAXS com picos intensos, de boa definição, correspondem à lipossomas multilamelares, enquanto que curvas extendidas de relativa baixa intensidade significam lipossomas unilamelares. O perfil de espalhamento de lipossomas multivesiculares corresponderia também ao de unilamelares.<sup>12</sup>

Por conseguinte, analisando os dados obtidos para as vesículas estudadas aqui, os perfis de espalhamento demonstram que a presença de quitosana produz vesículas multilamelares, já que os picos de Bragg aumentam com o aumento da concentração do polímero.<sup>13</sup>

Os resultados mostram que a quitosana influencia o sistema a nível molecular. As bicamadas fosfolipídicas são mais organizadas e desta forma produzem um espalhamento mais coerente que resulta nos picos bem definidos. Esta maior organização molecular pode ser obtida em estruturas multilamelares, onde a sobreposição concêntrica de bicamadas requer uma organização maior. Como efeito global, a rigidez da membrana de uma vesícula multilamelar acaba sendo maior do que a rigidez de uma vesícula unilamelar. Em outras palavras, a sobreposição de bicamadas produz vesículas mais rígidas em que a membrana está menos sujeita às oscilações termodinâmicas. No caso de estruturas unilamelares, a rigidez da membrana é menor. A bicamada única, detentora de alta flexibilidade, é passível de deformações constantes com a difusão das vesículas na suspensão. O resultado, neste caso, é o espalhamento difuso que produz uma curva extendida nos espectros de SAXS.

Para a avaliação dos perfis de espalhamento foram aplicadas funções Lorentzianas que permitiram analisar os picos e as curvas de forma padronizada para a obtenção de dados estruturais e avaliação da proporção de formação de estruturas multilamelares.<sup>1,13</sup> A Figura 3.7 apresenta três espectros de SAXS que são representativos para os resultados obtidos para as amostras estudadas. As funções Lorentzianas também são apresentadas. A Figura 3.7a foi obtida para a amostra não filtrada e de maior concentração de quitosana. Os picos de Bragg apresentaram a maior definição encontrada e a relação 1/2 entre os valores de  $q$  para o primeiro e o segundo pico indica que o sistema é lamelar, ou seja, organizado em bicamadas fosfolipídicas.<sup>12</sup>

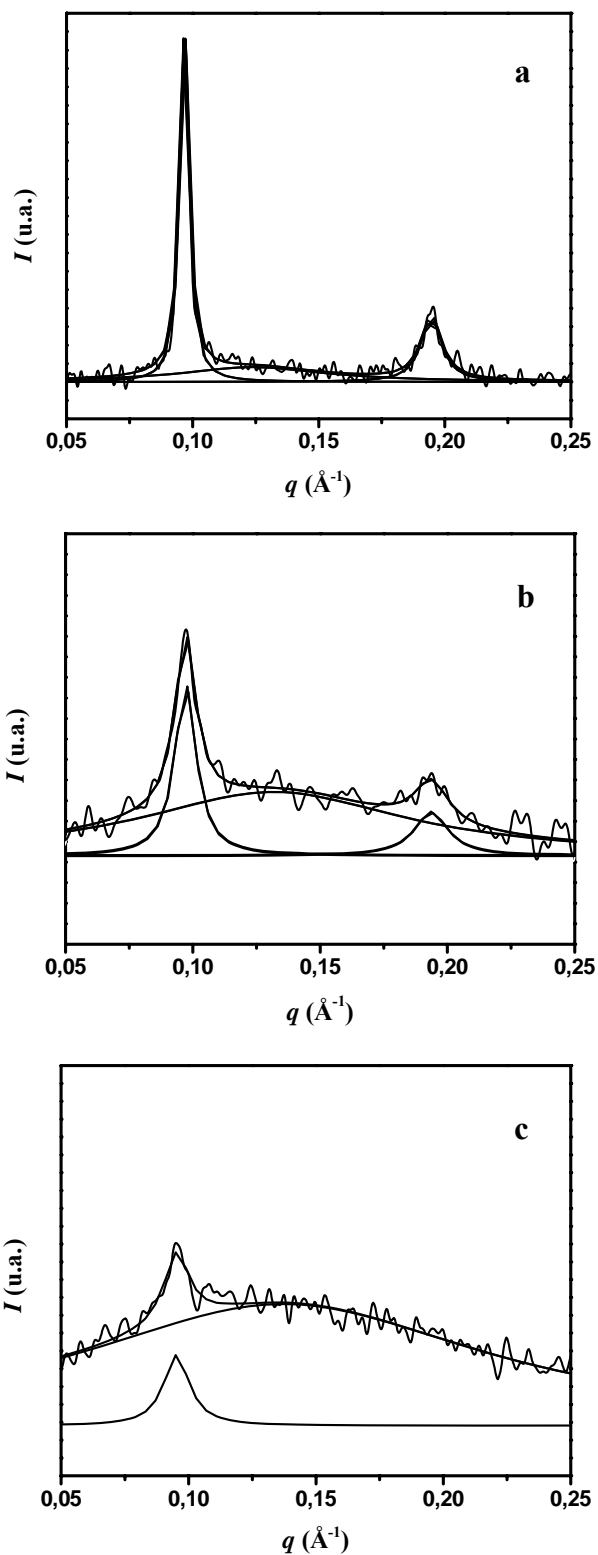


Figura 3.7. Espectros de SAXS com aplicação de funções Lorentzianas (linhas contínuas) para quitossomas não filtrados e preparados com a solução de quitosana de 1,00 mg/mL (a), quitossomas filtrados a 1,20  $\mu\text{m}$  e preparados com a solução de quitosana de 0,50 mg/mL (b) e lipossomas filtrados a 0,45  $\mu\text{m}$  (c).<sup>1</sup>

Entre o primeiro e o segundo pico é possível observar uma discreta elevação, ou seja, a intensidade não corresponde à linha de base. Através das funções Lorentzianas foram determinadas três contribuições, nomeadamente dois picos e uma curva estendida bastante discreta entre eles.

A Figura 3.7b mostra o resultado para a amostra filtrada a 1,20  $\mu\text{m}$  e preparada com a concentração intermediária de quitosana e representa bem a situação de transição entre os espectros de maior e menor definição dos picos. As funções Lorentzianas forneceram dois picos de bases estendidas e uma curva mais elevada entre eles.

Já a Figura 3.7c, que corresponde à amostra de lipossomas filtrada a 0,45  $\mu\text{m}$ , mostra a situação em que o pico de difração é muito discreto. Um pequeno sinal pode ser observado entre o ruído de fundo com a ampliação do espectro. Porém, o que prevalece é uma acentuada curva estendida por toda a região de  $q$  investigada.

É interessante observar que a curva central, estendida, cresce aproximadamente na mesma região em todos os espectros.

A posição do primeiro pico de difração obtida pelo ajuste Lorentziano, forneceu o valor de  $q$  utilizado para o cálculo da distância de repetição  $d$  das bicamadas fosfolipídicas das vesículas. As áreas do primeiro pico (1), também obtidas pelas Lorentzianas, foram calculadas e comparadas com as áreas da curva estendida (2). Os resultados dos parâmetros obtidos pelo SAXS estão na Tabela 3.3, que retoma novamente os resultados de Espalhamento de Luz discutidos na Sessão anterior para que se possa estabelecer uma avaliação estrutural baseada nos resultados das duas técnicas.

Como demonstrado na Tabela 3.3, as distâncias de repetição  $d$  das bicamadas das vesículas sofreram uma pequena, porém contínua redução com o aumento da concentração de quitosana. A relação de área entre a curva estendida (2), que corresponde às estruturas unilamelares, e o primeiro pico (1), relacionado com as estruturas multilamelares, também decresce com o aumento da concentração de quitosana para as três séries de amostras. O outro parâmetro, obtido pela largura à meia altura do primeiro pico de difração, representa o número médio de bicamadas sobrepostas nas vesículas multilamelares  $\langle N \rangle$ , que aumenta significativamente com o aumento da concentração de quitosana.

Estes resultados estão evidentemente todos relacionados entre si. Considerando que a quitosana aumenta a proporção de estruturas multilamelares, a área da curva estendida deve diminuir, enquanto que a área do pico deve aumentar. Com o aumento da sobreposição de

bicamadas numa vesícula, aumenta a organização molecular, conforme discutido anteriormente. Esta maior organização molecular acaba refletindo também nas distâncias de repetição entre as bicamadas, que são conseqüentemente reduzidas. A menor movimentação molecular numa estrutura multilamelar, mais rígida, impede grandes oscilações de  $d$ , colaborando com a redução do seu valor efetivo.

Tabela 3.3. Variação da intensidade de luz espalhada ( $I_s$ ), do coeficiente de difusão à diluição infinita ( $D_0$ ), do raio hidrodinâmico ( $R_h$ ), do índice de polidispersão (Poly), do raio de giro ( $R_g$ ), da relação entre os raios ( $\rho = R_g/R_h$ ), obtidos por Espalhamento de Luz e da distância de repetição das bicamadas fosfolipídicas ( $d$ ), da razão de área entre a curva estendida (2) e o primeiro pico de difração (1) e o número médio de bicamadas fosfolipídicas em vesículas multilamelares ( $\langle N \rangle$ ), obtidos por SAXS, para as diferentes amostras estudadas: vesículas filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  (a), vesículas filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$  (b) e vesículas não filtradas (c).

a)

quitosana (mg/mL)	$I_s$ (kcts/s)	$D_0 \cdot 10^{-8}$ (cm <sup>2</sup> /s)	$R_h$ (nm)	Poly ( $\pm\%$ )	$R_g$ (nm)	$\rho=R_g/R_h$	$d$ (nm)	razão de área (2/1)	$\langle N \rangle$
1,00	37 $\pm$ 3	1,48	145 $\pm$ 8	0,2 $\pm$ 5	102 $\pm$ 3	0,71	6,43	4,96	9
0,75	35 $\pm$ 2	1,60	134 $\pm$ 5	0,3 $\pm$ 7	107 $\pm$ 4	0,80	6,45	9,20	8
0,50	28 $\pm$ 4	1,72	125 $\pm$ 4	0,2 $\pm$ 9	99 $\pm$ 7	0,80	6,46	8,60	7
0,25	25 $\pm$ 5	1,90	113 $\pm$ 7	0,1 $\pm$ 10	92 $\pm$ 4	0,82	6,50	12,46	5
0,10	20 $\pm$ 2	2,02	106 $\pm$ 10	0,3 $\pm$ 6	88 $\pm$ 7	0,84	6,49	13,28	5
0,00	14 $\pm$ 5	2,08	103 $\pm$ 11	0,3 $\pm$ 5	81 $\pm$ 5	0,79	6,57	20,17	2

b)

quitosana (mg/mL)	$I_s$ (kcts/s)	$D_0 \cdot 10^{-8}$ (cm <sup>2</sup> /s)	$R_h$ (nm)	Poly ( $\pm\%$ )	$R_g$ (nm)	$\rho=R_g/R_h$	$d$ (nm)	razão de área (2/1)	$\langle N \rangle$
1,00	76 $\pm$ 3	0,79	272 $\pm$ 78	0,5 $\pm$ 8	106 $\pm$ 4	0,41	6,47	1,23	13
0,75	64 $\pm$ 6	0,80	268 $\pm$ 64	0,4 $\pm$ 17	106 $\pm$ 3	0,42	6,49	3,10	12
0,50	56 $\pm$ 6	0,84	256 $\pm$ 81	0,5 $\pm$ 15	92 $\pm$ 3	0,37	6,50	4,80	12
0,25	41 $\pm$ 4	0,95	226 $\pm$ 88	0,5 $\pm$ 9	98 $\pm$ 7	0,44	6,52	10,62	13
0,10	34 $\pm$ 5	1,05	204 $\pm$ 47	0,6 $\pm$ 12	98 $\pm$ 6	0,49	6,54	14,60	10
0,00	21 $\pm$ 4	1,31	163 $\pm$ 62	0,5 $\pm$ 10	91 $\pm$ 5	0,57	6,62	30,57	7

c)

quitosana (mg/mL)	$I_s$ (kcts/s)	$D_0 \cdot 10^{-8}$ (cm <sup>2</sup> /s)	$R_h$ (nm)	Poly ( $\pm\%$ )	$R_g$ (nm)	$\rho=R_g/R_h$	$d$ (nm)	razão de área (2/1)	$\langle N \rangle$
1,00	95 $\pm$ 2	0,80	269 $\pm$ 87	0,4 $\pm$ 6	106 $\pm$ 8	0,40	6,49	1,09	20
0,75	84 $\pm$ 3	0,79	270 $\pm$ 75	0,5 $\pm$ 7	101 $\pm$ 7	0,39	6,51	1,22	19
0,50	71 $\pm$ 5	0,75	287 $\pm$ 85	0,6 $\pm$ 10	104 $\pm$ 15	0,38	6,51	2,10	17
0,25	55 $\pm$ 4	0,78	275 $\pm$ 98	0,5 $\pm$ 8	98 $\pm$ 5	0,37	6,50	3,11	13
0,10	39 $\pm$ 4	0,92	232 $\pm$ 78	0,6 $\pm$ 9	103 $\pm$ 5	0,46	6,50	11,30	12
0,00	26 $\pm$ 6	1,24	173 $\pm$ 92	0,6 $\pm$ 18	79 $\pm$ 10	0,47	6,59	27,51	8



Um outro fator que pode ser considerado é a redução de moléculas de água entre as bicamadas. As extremidades polares dos fosfolipídios estão hidratadas e uma determinada quantidade de água encontra-se entre uma bicamada e outra, conforme representado na Figura 3.8. Como a  $d$  considera também a espessura da camada aquosa juntamente com a espessura da membrana, a redução do seu valor também pode estar relacionada com a diminuição da quantidade de água entre as bicamadas. Neste caso, a quitosana atuaria no sentido de desidratar as membranas das vesículas.

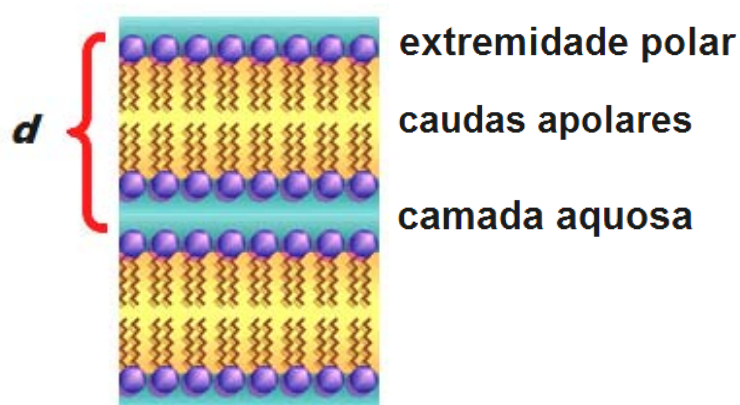


Figura 3.8. Representação idealizada de duas bicamadas de fosfolipídios separadas por uma camada de moléculas de água. A distância de repetição  $d$  considera a espessura da bicamada mais a porção aquosa.

Assim sendo, tanto a maior organização a nível molecular quanto a redução da camada aquosa são os possíveis fatores envolvidos nos resultados da  $d$ . Como discutido nesta Sessão, os perfis de espalhamento de alta definição correspondem a uma organização molecular maior. Sendo assim, este seria o parâmetro mais influente na  $d$ . Por outro lado, a porção aquosa é um fator real que não pode ser negligenciado. Portanto, os dois fatores podem estar atuando juntamente no sentido de reduzir a  $d$ .

A existência da curva estendida em todos os espectros de SAXS, bem como o sinal constante do primeiro pico, evidenciam que o sistema é constituído de uma mistura de estruturas uni e multilamelares. A avaliação da proporção entre uni e multilamelares é difícil e requer a aplicação de cálculos matemáticos sofisticados para relacionar os dados experimentais com modelos teóricos. Bouwstra e colaboradores procederam uma criteriosa análise neste sentido produzindo uma série de dados quantitativos teóricos que podem ser

relacionados com os perfis de difração dos espectros.<sup>12</sup> Além da relação entre o primeiro pico e a curva estendida, a diferença de intensidade entre o primeiro e o segundo pico de difração também fornece informações a respeito da proporção entre estruturas uni e multilamelares. De forma qualitativa, quando a intensidade do segundo pico de Bragg é muito reduzida em relação à intensidade do primeiro pico, significa que a proporção de estruturas multilamelares presentes no sistema é pequena em relação às estruturas unilamelares. Isso também é independente do  $\langle N \rangle$  das multilamelares. A questão pode ser entendida fisicamente considerando que o segundo pico é uma reflexão do primeiro. Quando esta reflexão é pouco intensa, significa pouca reprodutibilidade de espalhamento, mesmo que o espalhamento seja coerente. E este resultado está relacionado com a quantidade da população que produz o espalhamento coerente em relação à quantidade da população que produz o espalhamento incoerente.

Em sistemas exclusivamente multilamelares o segundo pico pode apresentar uma intensidade acima de 50% da intensidade do primeiro e até mesmo um terceiro pico de difração pode ser detectado. Nos perfis de espalhamento obtidos aqui, a amostra de quitossomas não filtrada contendo a maior concentração do polímero apresentou intensidade do segundo pico correspondente à aproximadamente 25% da intensidade do primeiro. Tal resultado corresponde a uma proporção máxima de 20% de estruturas multilamelares presentes na mistura.<sup>12</sup> Deve ser lembrado que aqui o parâmetro é considerado puramente qualitativo.

Esta análise torna-se mais complicada com o aumento da intensidade da curva correspondente às estruturas unilamelares. Como pode ser observado na Figura 3.7, a diferença de intensidades entre os dois picos de Bragg mostra-se menor na situação intermediária (Figura 3.7b) em comparação com a amostra de maior concentração polimérica (Figura 3.7a). O resultado sugere que nesta amostra a quantidade de estruturas multilamelares é proporcionalmente maior do que a quantidade de unilamelares, quando comparada com a amostra com a maior concentração de quitosana. Porém, como pode ser observado na Tabela 3.3, estas estruturas lamelares da amostra intermediária apresentam um menor  $\langle N \rangle$ . Assim, teríamos mais estruturas multilamelares, porém as mesmas apresentariam menos lamelas por vesícula multilamelar.

Levando em consideração que o método da evaporação em fase reversa foi desenvolvido para a produção de lipossomas unilamelares, os resultados mostram que a presença de quitosana modifica os resultados da metodologia. Uma proporção aproximada de

20% de estruturas multilamelares com a presença de quitosana pode ser considerada como um resultado razoável. Mesmo os lipossomas produzidos aqui, forneceram uma pequena porção de estruturas multilamelares no caso das amostras não filtradas ou filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$  (Tabela 3.3). As amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  forneceram uma porção de estruturas bilamelares. O resultado sugere a necessidade de um pós-tratamento das vesículas para homogeneização estrutural.

Interpretando os dados obtidos para as três séries de amostras, pode ser observado que a filtração também exerce um efeito considerável nos resultados de SAXS. A evolução comparativa das áreas de pico e curva para as três séries é apresentada na Figura 3.9 em função da concentração de quitosana.

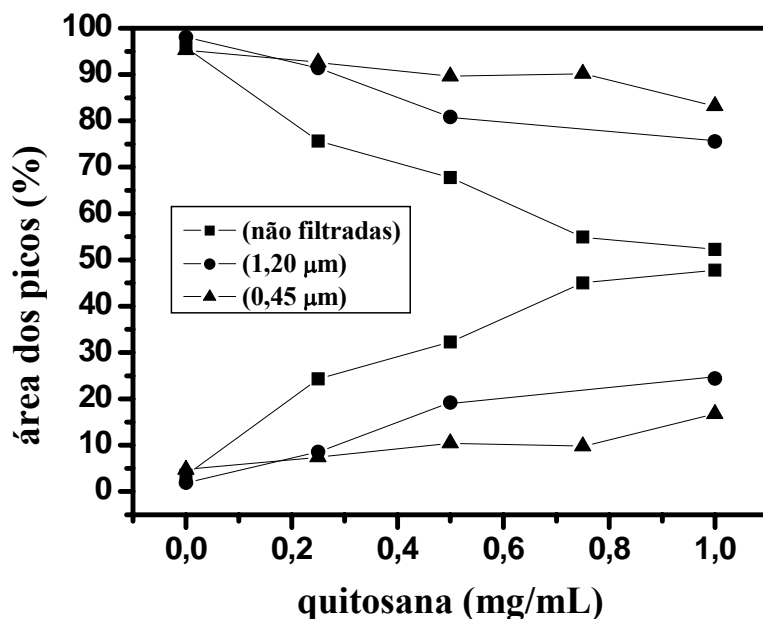


Figura 3.9. Evolução percentual relativa das áreas da curva estendida (acima) e do primeiro pico de difração (abaixo) obtidas pela aplicação de funções Lorentzianas nos espectros de SAXS das diferentes amostras de vesículas estudadas em função da concentração de quitosana e da filtração, conforme indicado.<sup>1</sup>

O sistema não filtrado sofre variações maiores com o aumento da concentração de quitosana. A área da curva estendida diminui consideravelmente enquanto que a área do pico de Bragg aumenta na mesma proporção relativa. As amostras filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$  evoluem no

mesmo sentido, mas de forma mais discreta, assim como as amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  que apresentaram as menores variações. Através destes resultados, pode ser considerado que a filtração a 1,20  $\mu\text{m}$  produz um efeito no sistema no sentido de reduzir, não a quantidade de estruturas multilamelares presentes no sistema (que depende também da diferença entre o primeiro e segundo pico, conforme discutido nesta Sessão), mas sim o número de bicamadas nas estruturas multilamelares, como pode ser observado também na Figura 3.10. Sendo assim, a filtração a 1,20  $\mu\text{m}$  apresenta um efeito detectável por SAXS que não foi detectado pelo Espalhamento de Luz, onde foi considerado que amostras não filtradas e filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$  apresentam praticamente o mesmo comportamento. Os raios hidrodinâmicos não variaram significativamente entre amostras não filtradas e filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$ . Por conseguinte, se o número de bicamadas está diminuindo, porém o tamanho das vesículas não diminuiu na mesma proporção, significa afirmar que as vesículas estão adquirindo um núcleo aquoso maior na filtração a 1,20  $\mu\text{m}$ . Este comportamento mostra a alta sensibilidade do sistema às variações das condições de preparação. Cada condição de preparação produz vesículas de características distintas. Mesmo sendo alta, a porosidade de 1,20  $\mu\text{m}$  em comparação com os tamanhos das estruturas obtidas logo após a sua formação, o processo de passagem das amostras pela membrana porosa parece exercer influência na estruturação final das vesículas, mesmo que esta influência seja discreta e pouco perceptível pelo Espalhamento de Luz.

Já as amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$ , que apresentaram variações de área do primeiro pico e da curva mais discretas ao longo do aumento da concentração de quitosana, podem assim ser consideradas mais uma vez como o sistema de maior homogeneidade estrutural.

Analisando os resultados para o número médio de bicamadas  $\langle N \rangle$  (Figura 3.10), as diferenças para as três séries de amostras seguem uma tendência semelhante ao da variação relativa de áreas (Figura 3.9). Porém, os valores do  $\langle N \rangle$  para as amostras filtradas a 1,20  $\mu\text{m}$  seguem uma tendência semelhante ao das amostras não filtradas até a concentração de 0,25 mg/mL. Após, a tendência muda para valores inferiores e segue mais próxima ao das amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$ . Por conseguinte, pode ser considerado que as filtrações exercem efeito no sistema no sentido de reduzir o  $\langle N \rangle$ .

Torna-se importante salientar os aspectos dimensionais do  $\langle N \rangle$ . Os valores encontrados neste estudo podem ser considerados altos. Principalmente os obtidos para as amostras não filtradas. Vesículas com  $\langle N \rangle$  acima de 15 são pouco prováveis em estruturas

multilamelares. O procedimento de cálculo do  $\langle N \rangle$  (Sessão 2.4) foi desenvolvido a partir de cálculos teóricos que consideram o sistema multilamelar como uma sobreposição de bicamadas fosfolipídicas ideal, ou seja, dispostas de forma linear num plano, empilhadas umas sobre as outras de forma repetitiva e sem influência de ondulações ou distorções. Evidentemente esta situação ideal não procede na prática, onde as variações termodinâmicas provocam diversas oscilações estruturais, principalmente em estruturas de menor homogeneidade estrutural, como as vesículas com as maiores concentrações de quitosana e não filtradas. Por conseguinte, deve ser reconhecido que os valores do  $\langle N \rangle$  podem estar subestimados, especialmente para as amostras não filtradas.

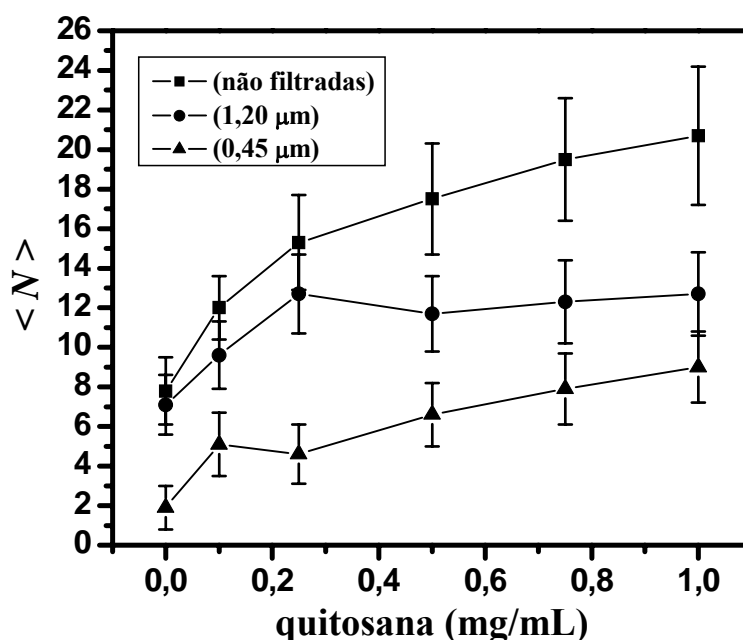


Figura 3.10. Variação do número médio de bicamadas fosfolipídicas ( $\langle N \rangle$ ) obtido pela largura à meia altura do primeiro pico de espalhamento nos espectros de SAXS em estruturas multilamelares para as diferentes amostras de vesículas estudadas em função da concentração de quitosana e da filtração, conforme indicado.<sup>1</sup>

De qualquer forma, a tendência dos resultados permanece e as discussões proferidas são fundamentadas e interrelacionadas, levando em consideração os diversos aspectos que definem a estruturação das vesículas a partir da diferenciada gama de resultados.

A relação entre os dados de Espalhamento de Luz e SAXS pode fornecer mais alguns parâmetros estruturais interessantes.<sup>1</sup> Os valores médios de  $R_g$  foram relacionados

com os valores de  $\langle N \rangle$  e de  $d$ , conforme descrito na Sessão 2.4, e assim foi possível obter o diâmetro do núcleo aquoso, ou seja, o diâmetro da região aquosa da vesícula desconsiderando a membrana fosfolipídica. Por consequência, também foi possível calcular o volume do núcleo aquoso, ou o volume de água encapsulado no núcleo das vesículas. A quantidade de água entre as bicamadas de estruturas multilamelares não é considerada neste volume, sendo que o seu valor é descontado no cálculo já que a  $d$  considera a sua contribuição. Os cálculos foram efetuados para a série de amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  que apresentaram a maior homogeneidade estrutural e os resultados são apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Resultados para diâmetro do núcleo aquoso ( $D_n$ ) e volume aquoso encapsulado ( $V$ ) no núcleo das vesículas filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  em função da concentração de quitosana. Os valores são médios e foram obtidos pela relação entre resultados de Espalhamento de Luz e SAXS.

quitosana (mg/mL)	$D_n$ (nm)	$V$ ( $10^{-16} \text{ cm}^3$ )
1,00	88	3,57
0,75	110	6,97
0,50	108	6,60
0,25	119	8,82
0,10	111	7,16
0,00	136	13,17

Os resultados de  $D_n$  e  $V$  mostram que as vesículas apresentam um considerável núcleo aquoso dentro do qual é possível encapsular uma quantidade considerável de moléculas hidrofílicas. Diâmetro e volume internos são reduzidos com a presença de quitosana e o aumento da sua concentração. Esta redução ocorre devido à formação das multicamadas que acabam preenchendo mais o espaço interno das estruturas multilamelares. O  $R_g$  das vesículas também aumentou com a quitosana, porém, a variação dos valores de  $D_n$  e  $V$  demonstra que a multilamelaridade também cresce na direção oposta, ou seja, para dentro das vesículas.

Consequentemente conclui-se pelo conjunto dos resultados de Espalhamento de Luz e de SAXS que a informação estrutural a respeito do sistema vesicular estudado pode ser acessada. O Espalhamento de Luz mostrou o aumento de tamanho das estruturas e o SAXS o aumento do número médio de bicamadas, comportamentos resultantes do aumento da

concentração de quitosana. Ambos os resultados mostram juntamente que a quitosana atua também no sentido de aumentar a massa estrutural das vesículas, com a sobreposição de bicamadas, para o interior das estruturas, reduzindo o núcleo aquoso. Lembrando que este efeito está possivelmente relacionado também com o processo de filtração, que possui a capacidade de moldar as estruturas, conforme discutido na Sessão anterior.

De qualquer maneira, deve ser considerado que uma vesícula multilamelar, onde as bicamadas se sobrepõem também para o interior, é estruturalmente mais rígida ou de organização molecular superior em relação a uma vesícula multilamelar na qual as bicamadas se sobrepõem para o exterior da estrutura. Em outras palavras, uma estrutura multilamelar contendo um número de bicamadas  $\langle N \rangle$  e um núcleo aquoso reduzido é menos passível de oscilações estruturais do que uma estrutura multilamelar com o mesmo número de bicamadas  $\langle N \rangle$  e um núcleo aquoso maior. Assim sendo, a concentração de quitosana juntamente com a filtração a 0,45  $\mu\text{m}$ , reduz o núcleo aquoso produzindo estruturas com mais bicamadas e conseqüentemente com uma capacidade potencial maior de incorporação de substâncias hidrofóbicas, considerando a região apolar das bicamadas fosfolipídicas.

Por fim, um último parâmetro estrutural a ser considerado refere-se à localização da quitosana nos quitossomas. Até aqui foram discutidos os diversos efeitos provocados no sistema pela sua presença. Porém, a localização exata da quitosana é complexa e consiste numa informação que necessita de um estudo bastante aprofundado, através de diferentes técnicas. Os dados das diferentes técnicas devem ser relacionados entre si e levando em consideração os fatores físico-químicos de interação molecular, é possível determinar a posição ou algumas posições da quitosana nos quitossomas preparados neste estudo.

A técnica de SAXS permite uma análise preliminar neste sentido. Conforme descrito na literatura,<sup>12</sup> os perfis de espalhamento de estruturas multilamelares, com bicamadas concêntricas, correspondem a picos de Bragg bem definidos. Já as estruturas unilamelares e também as multivesiculares, onde as bicamadas não são concêntricas, fornecem uma curva estendida de baixa intensidade. Considerando que a presença de quitosana leva à formação de estruturas multilamelares com bicamadas concêntricas, é pouco provável que exista quitosana entre as bicamadas.

Imaginando uma situação simplificada, como a massa molar média de quitosana de 164 000 g/mol como a massa única, sem considerar a distribuição, o número médio de monômeros presentes na amostra de quitossomas preparados com a solução de 1,00 mg/mL

de quitosana corresponde à  $7,2 \times 10^{17}$  monômeros. Neste cálculo foram levadas em consideração as contribuições de 83% de monômeros desacetilados e 17% de monômeros acetilados. Já para o número de moléculas de fosfolipídio, considerando uma massa molar média de 800 g/mol, as 60 mg de material utilizado na preparação das amostras representam  $4,5 \times 10^{19}$  moléculas. Por conseguinte, relacionando os valores médios, teríamos uma proporção de 63 moléculas de fosfolipídios por monômero de quitosana. O cálculo, embora simplificado, mostra que existe pouco polímero presente nas amostras em relação à quantidade de fosfolipídios.

Por outro lado, através dos estudos de SAXS, foi estimada uma proporção máxima de estruturas multilamelares de 20%. Se a quitosana estiver presente apenas nas estruturas multilamelares, esta proporção diminui sensivelmente. Contudo, o perfil de espalhamento mostra a alta organização molecular das estruturas multilamelares. Com a presença de quitosana entre as lamelas, esta organização seria perturbada, pois as cadeias poliméricas certamente exigem uma considerável região espacial (física e de agitação molecular) que pode ser maior em alguns pontos (onde há mais monômeros) e menor em outros (onde há menos monômeros ou mesmo nenhum). A não ser que as cadeias poliméricas estejam quase totalmente estendidas e homoganeamente distribuídas entre as lamelas. Neste caso, as bicamadas não seriam tão perturbadas quanto à sua organização estrutural.

Lembrando ainda que a quitosana utilizada é constituída de dois tipos de monômeros, com aproximadamente 17% de grupos acetila os quais ocupam uma área espacial diferente dos grupos amino e evidentemente interagem de forma diferente com as extremidades polares dos fosfolipídios, gerando mais perturbações diferenciadas que contribuiriam no sentido de reduzir a organização das bicamadas.

Todas estas razões sugerem que a presença de quitosana entre as bicamadas das estruturas multilamelares é pouco provável. Seria mais razoável imaginar que o polímero esteja revestindo as estruturas externamente e internamente ou também encontrar-se encapsulado no núcleo aquoso. Assim teríamos vesículas multilamelares com a membrana revestida externa e internamente com quitosana. Esta situação mais simples pode justificar as interpretações discutidas até aqui: a maior rigidez da membrana bem como a maior organização molecular das bicamadas.

A questão intrigante é discutida também ao longo da presente Tese, com base nos resultados obtidos pelas outras técnicas empregadas no estudo das vesículas e pela questão de interação molecular entre a quitosana e o fosfolipídio.



### 3.1.1.3. Microscopia Óptica e Eletrônica

A Microscopia Óptica foi empregada para que se pudesse ter uma idéia do aspecto micrométrico das amostras de lipossomas e quitossomas. Na Figura 3.11 foram comparadas as amostras não filtradas com as amostras filtradas a 0,45  $\mu\text{m}$  para os dois sistemas observadas no microscópio óptico sob luz direta.

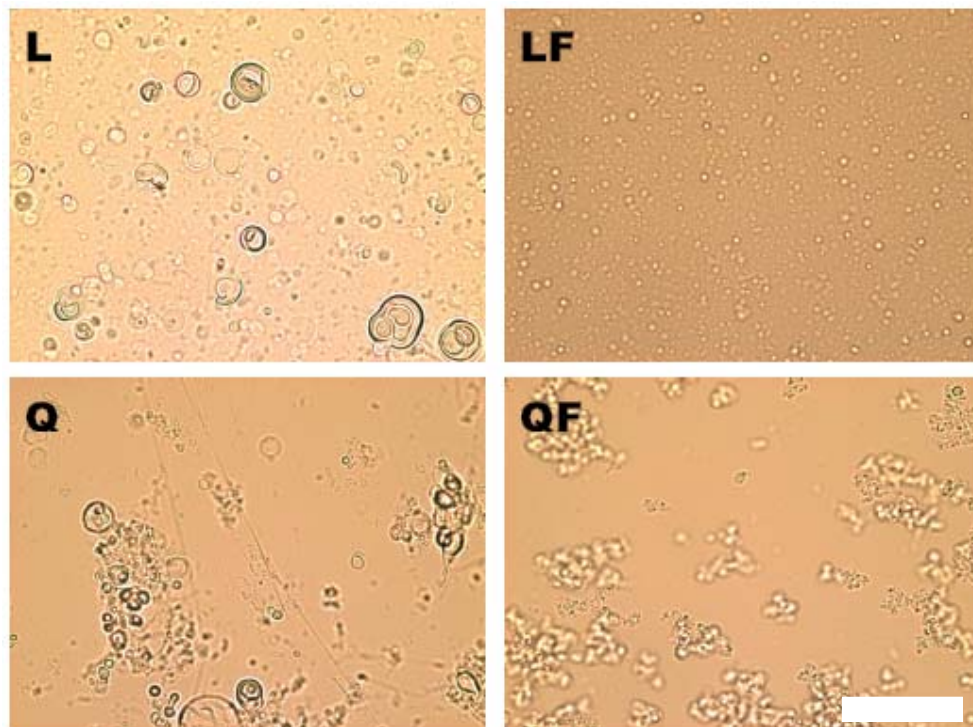


Figura 3.11. Imagens de Microscopia Óptica obtidas para amostras em suspensão aquosa de lipossomas (L) e quitossomas (Q) (1,00 mg/mL de quitosana) não filtrados e filtrados a 0,45  $\mu\text{m}$  (LF e QF). A barra representa expansão de 10  $\mu\text{m}$  para todas as imagens.

Tratando-se de um sistema sub-micrométrico, a definição de imagem das estruturas é muito baixa. Mesmo assim, foi possível perceber duas diferenças importantes entre os sistemas. A primeira refere-se ao uso da filtração. Comparando as imagens das estruturas não filtradas (Figura 3.11 L e Q) com as imagens das estruturas filtradas (Figura 3.11 LF e QF), fica evidenciado, mesmo a nível microscópico, que a filtração realmente produz um efeito determinante na homogeneização estrutural das vesículas em suspensão. Enquanto que as

amostras não filtradas apresentam uma vasta diversidade de estruturas, as amostras filtradas mostram uma infinidade de pequenos pontos sem grandes variações de forma ou tamanho.

A segunda diferença pôde ser percebida comparando as imagens de lipossomas (Figura 3.11 L e LF) com as imagens de quitossomas (Figura 3.11 Q e QF), preparados com a maior concentração de quitosana (1,00 mg/mL). Independentemente da filtração, parece que no caso das amostras de quitossomas as estruturas se apresentam relativamente mais aglomeradas, formando conjuntos de partículas que podem indicar a formação de agregados de vesículas interagindo umas com as outras. Este comportamento sugere uma alteração de carga superficial das vesículas com a presença do polímero, além do aumento de interação de superfície entre as vesículas. Sendo assim, os dois fatores podem sugerir que o polímero reveste a membrana das vesículas na parte externa, o que seria uma localização da quitosana na estrutura dos quitossomas. Através de Microcopia Óptica de Luz Polarizada foi possível indentificar a textura “mosaico” característica, com a presença de cruces de Malta<sup>14-16</sup> para as amostras de vesículas (Figura 3.12).

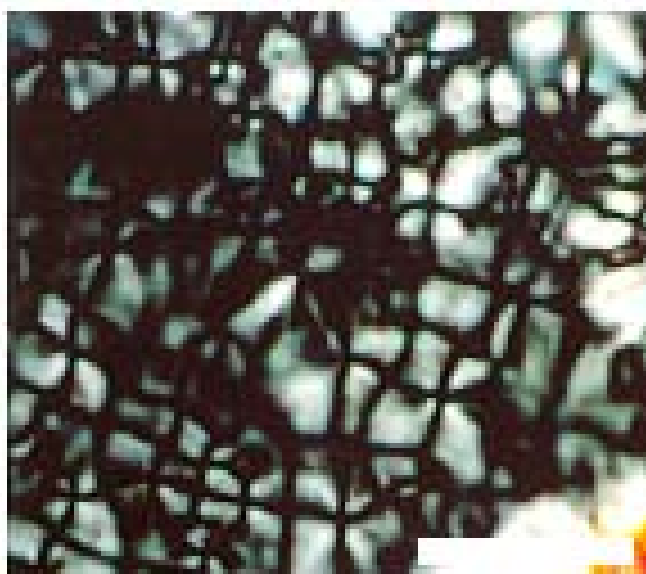


Figura 3.12. Imagem de Microcopia Óptica de Luz Polarizada obtida para uma amostra de quitossomas não filtrada (1,00 mg/mL de quitosana). A textura em mosaico com a presença de cruz de Malta caracteriza a organização do sistema como fase lamelar num líquido isotrópico. A barra representa expansão de 0,1 µm.

Neste caso não houve diferença entre lipossomas e quitossomas, tão pouco entre amostras filtradas ou não filtradas. A textura caracteriza a organização lamelar dos sistemas vesiculares (bicamadas fosfolipídicas) e é apresentada aqui como confirmação microscópica desta organização.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão permitiu uma análise visual mais detalhada dos lipossomas e dos quitossomas. Neste caso foram observadas as mesmas amostras não filtradas bem como amostras ultrasonicadas durante 5 minutos sob energia constante, sendo que os quitossomas também foram preparados com a maior concentração de quitosana (1,00 mg/mL).

A Figura 3.13 apresenta algumas imagens selecionadas de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Assim, foi visualmente constatado que todas as amostras apresentam estruturas esféricas. Da mesma forma como indicado pela Microscopia Óptica, a Microscopia Eletrônica mostrou que as amostras que não passaram por nenhum tratamento após a sua formação (Figura 3.13a, b, c, d) apresentam uma variada gama de vesículas de formatos variados, além das esféricas. Estruturas multivesiculares foram observadas, bem como estruturas alongadas e de formatos não esféricos. Portanto, este resultado pode ser usado como justificativa da alta polidispersão de vesículas obtidas para estas amostras pelo Espalhamento de Luz, bem como o reduzido valor da relação  $\rho = R_g / R_h$ , o qual foi inferior a 0,50.

Uma análise global de tamanhos pela Microscopia Eletrônica não é a forma mais adequada de estudar este parâmetro, pois a obtenção de uma grande quantidade de imagens a partir de muitas preparações de amostras para observação seria necessária para a produção de uma estatística aceitável. De qualquer forma, nas imagens observadas, foram encontradas vesículas maiores com mais frequência nas amostras de quitossomas do que nas amostras de lipossomas, ainda considerando as amostras sem pós-tratamento. Assim, a polidispersão também pareceu maior nos quitossomas do que nos lipossomas.

No que concerne à presença de estruturas multilamelares, na Figura 3.13c é apresentada uma vesícula multilamelar encontrada na amostra de quitossomas, confirmando a sua presença. Porém, poucas vesículas deste tipo foram observadas, o que corrobora com a avaliação de SAXS, onde foi estimada uma porção máxima de 20% de estruturas multilamelares para a amostra de quitossomas.

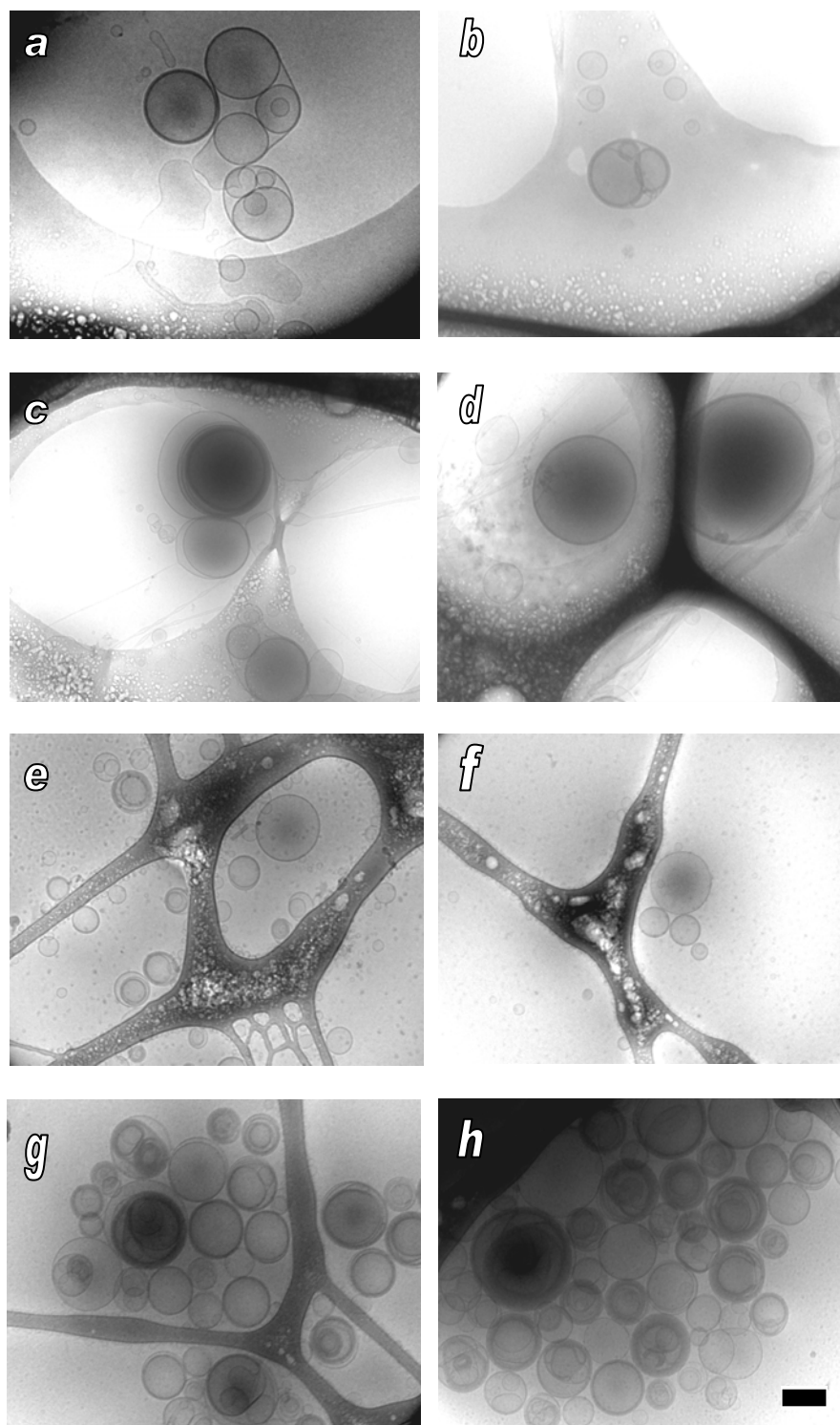


Figura 3.13. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão obtidas para amostras de lipossomas (a, b, e, f) e quitossomas (c, d, g, h) (1,00 mg/mL de quitosana) sem nenhum pós-tratamento (a, b, c, d) e com aplicação de 5 minutos de ultrasonicação sob energia constante (e, f, g, h). A barra representa expansão de 100 nm.

A localização da quitosana não pôde ser obtida pelas imagens de Microscopia. Um diferencial observado nas amostras de quitossomas foi a frequência de estruturas semelhantes às duas vesículas esféricas maiores da Figura 3.13d, as quais apresentam uma membrana “escurecida”. Essa membrana diferenciada pode, evidentemente, ser uma bi ou trilamela onde as bicamadas estão totalmente sobrepostas. Mas a possibilidade de este tipo de estrutura conter quitosana também deve ser cogitada. Pode ser observado que a vesícula multilamelar da Figura 3.13c também apresenta tal membrana.

Analisando agora as imagens e, f, g, h da Figura 3.13, que correspondem às amostras ultrasonicadas, em comparação com as imagens a, b, c, d, fica evidenciada a grande diferença de polidispersão e do tipo de estruturas entre os dois sistemas. Praticamente todas as vesículas sonicadas observadas foram esféricas ou semi-esféricas e a distribuição de tamanhos foi muito reduzida em comparação com as amostras não sonicadas, confirmando os resultados de Espalhamento de Luz. Comparando as amostras de lipossomas com quitossomas, a frequência de estruturas multilamelares foi bem maior para quitossomas. Por outro lado, quitossomas também apresentaram muitas estruturas multivesiculares. O resultado pode sugerir que as condições de sonicação utilizadas podem ser suficientes para reduzir a distribuição de tamanhos, como demonstrado pelos resultados de Espalhamento de Luz, porém não totalmente eficientes para homogeneizar o tipo de estruturas presentes no sistema. Assim, estruturas multivesiculares continuam presentes. A analogia pode parecer desvantajosa, mesmo assim, deve ser lembrado que o que está sendo prioritariamente estudado são os efeitos da quitosana sobre o sistema vesicular e, portanto, uma homogeneização excessiva do sistema poderia dificultar mais a interpretação destes efeitos.

Visualmente, as distribuições de tamanhos encontradas pela Microscopia Eletrônica podem ser comparadas com as distribuições obtidas por Espalhamento de Luz para as diferentes amostras. Por fim, a Microscopia Eletrônica provou que vesículas esféricas foram obtidas através da evaporação em fase reversa com a adição de quitosana e que o sistema continuou apresentando estruturas esféricas, porém de distribuição de tamanhos menor, após a ultrasonicação.

### **3.1.2. Transições de Fase**

Conforme discutido na Sessão 1.2.3, as transições de fase das bicamadas fosfolipídicas são uma característica que qualifica propriedades físico-químicas e estruturais dos sistemas vesiculares sob diferentes condições energéticas. Lembrando que a presença de compostos misturados aos fosfolipídios produz alterações de organização e de interações moleculares na bicamada, as transições de fase também serão afetadas por estas diferenciações geradas por outras moléculas. Neste sentido, é de se esperar mudanças consideráveis na transição de fase das vesículas com a presença de uma macromolécula como a quitosana que provoca diversas mudanças estruturais, conforme discutido nas Sessões anteriores. A transição de fase foi investigada através do aumento da temperatura para lipossomas e quitossomas para a avaliação dos efeitos da quitosana sobre o sistema submetido a um estado de transição metaestável.

#### **3.1.2.1. Espalhamento de Luz Estático**

O comportamento das bicamadas fosfolipídicas de lipossomas e quitossomas submetidos ao aquecimento foi investigado através do Espalhamento de Luz Estático. Conforme descrito na literatura, o número médio de fótons detectados por segundo é representativo de fenômenos macrocópicos emergentes de um sistema em suspensão. As variações de intensidade de luz espalhada são resultantes das modificações das propriedades ópticas do material durante o decorrer de mudanças estruturais.<sup>17</sup>

De fato, as transições de fase das bicamadas fosfolipídicas alteram as propriedades ópticas das vesículas em solução, sendo que nas temperaturas de transição podem ocorrer modificações de difusão lateral, da espessura da bicamada, da organização das cadeias apolares, da permeabilidade da membrana, etc.<sup>17,18</sup> Essas modificações também provocam variações superficiais nas vesículas, conseqüentemente a superfície da membrana externa pode oscilar com variações espaciais das extremidades polares dos fosfolipídios, como representado na Figura 3.14. Estas variações superficiais refletem na intensidade de luz espalhada.

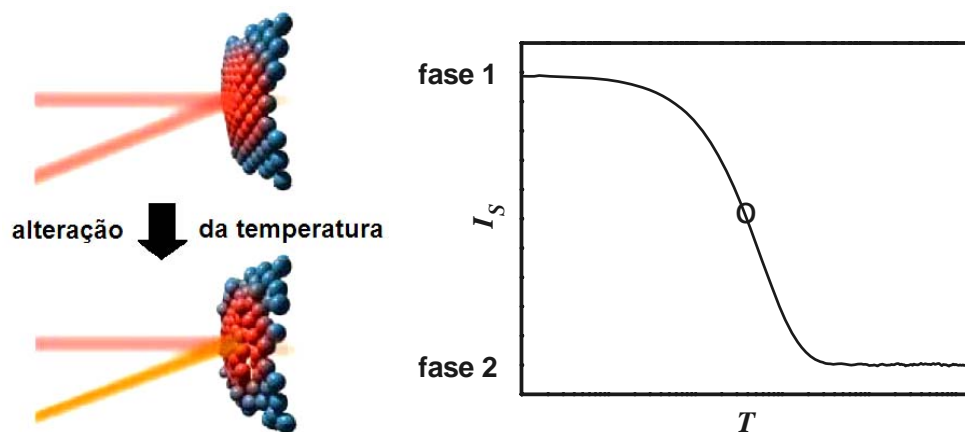


Figura 3.14. Representação de uma porção da superfície externa de vesícula fosfolipídica onde as extremidades polares conferem uma superfície homogênea em determinada fase 1 e uma superfície não homogênea com as extremidades polares desalinhadas na fase 2. As fases podem ser relacionadas com a intensidade de luz espalhada ( $I_s$ ) em função da temperatura ( $T$ ), onde o ponto à meia altura da curva corresponde à temperatura de transição de fase do sistema.<sup>17</sup>

Na transição de fase as propriedades da membrana de vesículas fosfolipídicas apresentam descontinuidades que estão relacionadas com a coexistência de duas fases lamelares na região de transição, com a formação de microdomínios.<sup>19</sup> Considerando as propriedades ópticas peculiares de cada fase, a transição da fase 1 para a fase 2 (Figura 3.14) envolve necessariamente um estágio intermediário em que os microdomínios das duas fases estão presentes. Esse estágio intermediário é representado pela inflexão da curva representada na Figura 3.14. O ponto a meia altura da queda da curva corresponde, no eixo horizontal, à temperatura de transição de fase.<sup>17</sup>

Michel e colaboradores obtiveram seqüências sigmoidais da variação de intensidade de luz espalhada em função da temperatura para alguns fosfolipídios. Desta forma foi possível determinar todas as transições de fase, ou seja, a sub-transição, a pré-transição e a transição principal, sendo que cada temperatura de transição foi atribuída ao ponto médio de cada curva.<sup>17</sup>

A metodologia foi aplicada na presente Tese no estudo das propriedades dos quitossomas sob aquecimento em comparação com lipossomas nas mesmas condições. A Figura 3.15 mostra a  $I_s$  obtida em função da temperatura para os dois sistemas.

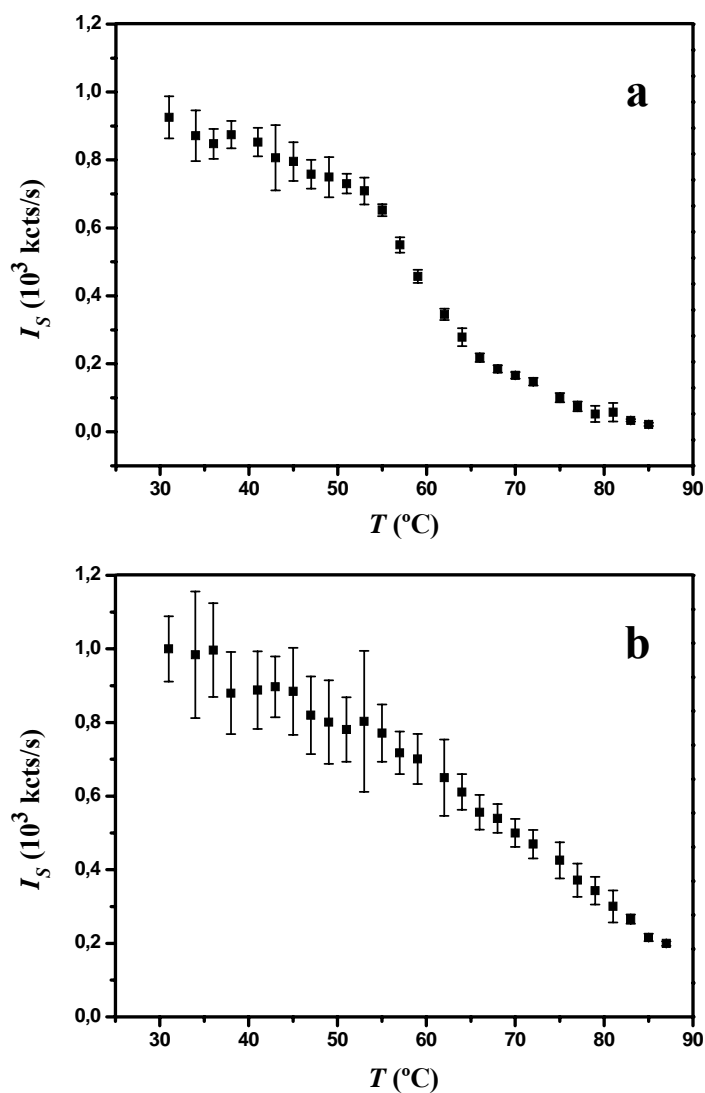


Figura 3.15. Evolução da intensidade de luz espalhada ( $I_S$ ) observada no ângulo de espalhamento de  $135^{\circ}$  em função do aumento da temperatura ( $T$ ) obtida por Espalhamento de Luz Estático para lipossomas (a) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) (b).

Para os lipossomas (Figura 3.15a) a  $I_S$  foi significativamente mais reduzida entre 53 e  $65^{\circ}\text{C}$ . A queda de  $I_S$  não é totalmente abrupta, como pode ser encontrado na literatura para alguns fosfolípidios.<sup>17</sup> Deve ser lembrado que o fosfolípido utilizado na preparação das vesículas, a fosfatidilcolina da lecitina de soja, apresenta uma pureza aproximada de 95%. Assim, as impurezas estão influenciando o estado de transição proporcionando uma curva mais estendida. Além disso, como a própria fosfatidilcolina apresenta alguma variação



quanto à constituição das suas cadeias apolares, a produção da curva estendida é totalmente esperada. Na prática, a transição de fase neste sistema é governada pelo somatório das influências das diferentes moléculas, o que resulta num retardamento da transição efetiva, a qual acaba produzindo um estado metaestável mais prolongado do que teríamos para um fosfolipídio totalmente puro.

De qualquer forma, a temperatura de transição de fase de 57 °C foi obtida pelo ponto à meia altura através da derivada primeira da curva para a amostra de lipossomas. Essa temperatura é próxima à temperatura de transição de fase principal, de  $P\beta'$  para  $L\alpha$ , para a molécula de DSPC (55,6 °C),<sup>20</sup> principal componente da fosfatidilcolina da lecitina de soja utilizada. As outras moléculas presentes contribuem, portanto, no sentido de aumentar em aproximadamente 1,4 °C a temperatura de transição de fase principal da DSPC determinada pelo Espalhamento de Luz Estático. As temperaturas de sub-transição e pré-transição são mais difíceis de serem determinadas experimentalmente e os resultados não mostram dados conclusivos para estas transições.

Uma pronunciada diferença do perfil da curva de transição foi encontrada para a amostra de quitossomas preparada com a maior concentração de quitosana utilizada, 1,00 mg/mL (Figura 3.15b). Neste caso, em vez de uma queda acentuada de  $I_S$ , uma moderada e gradativa redução ocorreu ao longo de uma ampla faixa de temperatura, entre aproximadamente 53 e 85 °C. Esta faixa corresponde a um intervalo de mais de 30 °C. A determinação da temperatura correspondente à meia altura da curva forneceu 64 °C. O resultado representa um aumento de 7 °C em relação à temperatura determinada para os lipossomas.

Sabe-se que a presença de compostos misturados aos fosfolipídios confere alterações de organização e de interações moleculares na bicamada, conforme já constatamos para os quitossomas. Determinados compostos podem proporcionar uma blindagem entre os grupos polares reduzindo a transição de fase, enquanto que outros podem formar altas energias de interação com os fosfolipídios promovendo um aumento na transição de fase.

O comportamento observado para os quitossomas sugere que o polímero atua de forma a dissipar a energia fornecida ao sistema, que assim pode estar passando por uma transição de fase extremamente moderada, com lenta transição dos microdomínios de uma fase para outra. Pelos resultados encontrados, também pode ser cogitado que a quitosana esteja mesmo prevenindo o sistema de uma transição de fase completa, até a temperatura estudada (87 °C).

Com a presença de quitosana, parece que a desordem das bicamadas fosfolipídicas, resultantes da mobilidade das moléculas de fosfolipídios sob aquecimento, que produz a redução de  $I_S$ , é minimizada de alguma forma por uma compensação energética ou organização molecular. Essa interpretação pode ser assumida se for considerada a formação de estruturas mais rígidas com a presença da quitosana.

A presença da quitosana também pode levar a uma transição de fase não homogênea. Por exemplo, partes da estrutura podem sofrer a transição enquanto que outras permanecem na fase anterior produzindo um sistema totalmente metaestável e dependente da energia fornecida. Assim, a quitosana concorre para a manutenção dos microdomínios na superfície da membrana.

Uma outra abordagem seria considerar que na suspensão existem vesículas com quitosana na sua estrutura e vesículas sem quitosana, ambas misturadas. Porém, neste caso as vesículas com quitosana poderiam estar passando pelos processos discutidos acima de qualquer forma. Por conseguinte, o sistema como um todo estaria sendo modulado pelas contribuições de vesículas sem quitosana, equivalentes aos lipossomas, e pelas alterações provocadas pelas vesículas com quitosana. Abordagem semelhante pode ser feita entre estruturas unilamelares e multilamelares, respectivamente, misturadas na suspensão.

Considerando a localização da quitosana na superfície externa das vesículas, a queda extremamente moderada da  $I_S$  provavelmente está sendo delineada por esta diferenciação estrutural. De qualquer maneira, essa redução da  $I_S$  ao longo de uma faixa de aumento da temperatura significativamente estendida, deve ser reconhecida como uma propriedade importante dos quitossomas.

A temperatura de 64 °C, determinada através da metodologia proposta por Michel e colaboradores,<sup>17</sup> deve ser considerada com cautela quanto ao seu significado como temperatura de transição de fase. Embora a mesma possa representar um estado de transição entre uma fase e outra, a presença da quitosana pode estar mascarando a quantidade de luz espalhada pelas vesículas, principalmente assumindo que o polímero esteja também na superfície externa das estruturas. Certamente as propriedades ópticas das vesículas contendo quitosana são diferentes das dos lipossomas. Isso é demonstrado pela  $I_S$  relativamente maior dos quitossomas, como pode ser observado comparando as Figuras 3.15a e b.

De qualquer forma, a temperatura de 64 °C, mesmo que aparente, bem como a atenuada queda de  $I_S$  com o aumento da temperatura, caracterizam um sistema diferenciado,

onde as interações entre fosfolipídios e cadeias poliméricas devem ser efetivas. Essa interação pode perfeitamente resultar no retardamento da transição de fase principal da bicamada fosfolipídica das vesículas.

### 3.1.2.2. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

Uma das modificações estruturais mais importantes das bicamadas fosfolipídicas conseqüente das transições de fase é a variação da espessura da bicamada, a qual pode ser estudada pela distância de repetição  $d$  fornecida pelo Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS). Da mesma forma como nos estudos procedidos na temperatura ambiente (20 °C), o SAXS forneceu os perfis de espalhamento característicos relacionados com a densidade eletrônica de cada amostra em função do aumento da temperatura (Figura 3.16).

No início da rampa de aquecimento foram obtidos perfis de espalhamento de definição maior com os picos de Bragg na relação 1/2, com as características conforme discutido na Sessão 3.1.1.2. Com o aumento da temperatura, os picos foram perdendo a intensidade relativa. Especialmente para a amostra de lipossomas, essa perda de intensidade foi drástica, sendo que acima de 59 °C apenas um pequeno sinal pôde ser detectado entre o ruído e uma curva estendida com a ampliação do espectro (Figura 3.17e). A 63 °C apenas a curva estendida pôde ser detectada e a mesma permaneceu até a última temperatura medida (71 °C). Este comportamento pode ser interpretado como uma transição de fase que ocorre entre as temperaturas de 57 e 59 °C, onde a eliminação dos picos com o concomitante aumento da curva estendida mostram uma redução da densidade eletrônica espalhada, ou seja, o espalhamento tornou-se totalmente incoerente evidenciando uma redução na organização molecular.<sup>21</sup> Sendo que através do Espalhamento de Luz Estático foi determinada uma temperatura de transição de fase aproximada de 57 °C para os lipossomas nas mesmas condições de preparação (sem nenhum pós-tratamento), essa variação acentuada do perfil de espalhamento em torno dessa mesma temperatura pode realmente ser a comprovação de que a transição de fase principal ocorre bem próxima a 57 °C.

Outra semelhança com os resultados de Espalhamento de Luz Estático, a redução mais acentuada de  $I_S$  constatada entre 53 e 65 °C também pode ser comparada com a diminuição mais pronunciada da intensidade dos picos de Bragg entre 51 e 63 °C (Figura 3.16a).

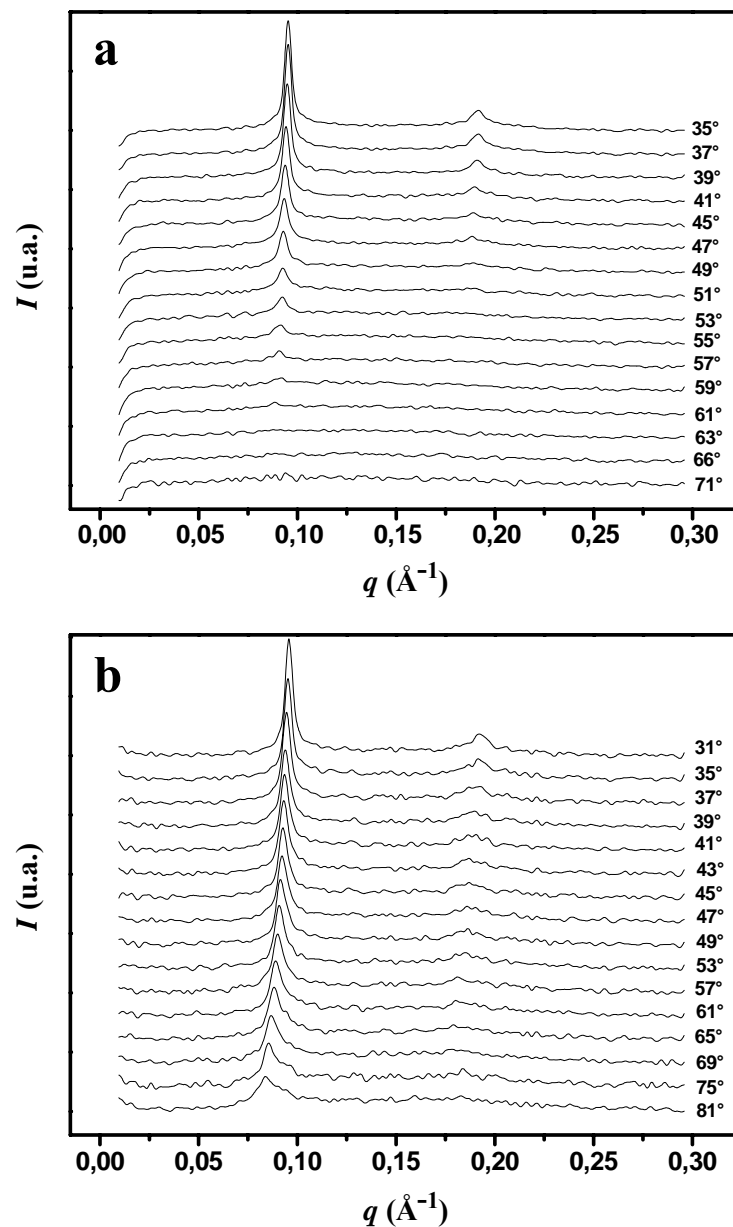


Figura 3.16. Perfis de espalhamento de intensidade ( $I$ ) em função do vetor de onda ( $q$ ) obtidos por SAXS em diferentes temperaturas ( $^{\circ}\text{C}$ ), conforme indicado, para amostras de lipossomas (a) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) (b).

Em contrapartida, a amostra de quitossomas, mais uma vez, demonstrou resultados diversos para os espectros de SAXS ao longo da rampa de aquecimento. Ambas as amostras apresentaram perfis de espalhamento semelhantes nas temperaturas menores (Figura 3.16 e Figura 3.17), com uma alta definição espectral. As diferenças entre a relação de áreas entre o pico e a curva não foram consideradas, já que as mesmas estão discutidas na Sessão 3.1.1.2.

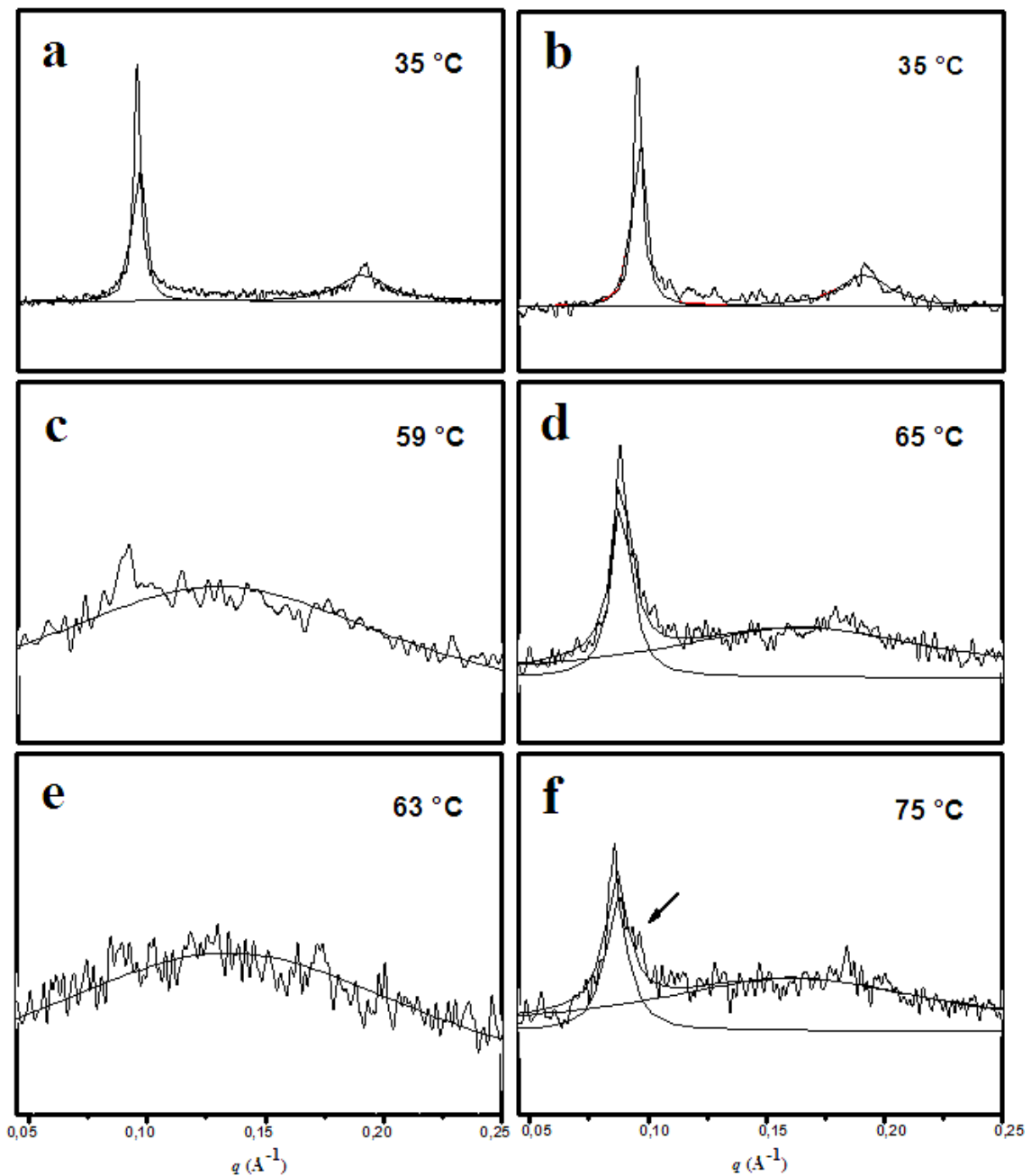


Figura 3.17. Perfis de espalhamento de intensidade em função do vetor de onda ( $q$ ) obtidos por SAXS em diferentes temperaturas, conforme indicado, para amostras de lipossomas (a, c, e) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) (b, d, f). As linhas contínuas mostram o ajuste com funções Lorentzianas que evidenciam a presença de picos e curvas. A flecha indica a presença de um ombro estendido ao lado do primeiro pico para os quitossomas na temperatura de 75 °C.

O que se torna relevante neste caso é a considerável manutenção do perfil de espalhamento, mesmo que sofrendo uma redução atenuada de intensidade, ao longo de todo processo de aquecimento da amostra de quitossomas. Os picos de Bragg puderam ser observados até a temperatura de 81 °C (Figura 3.16b). Um alargamento mais pronunciado do primeiro pico foi observado na temperatura de 65 °C (Figura 3.16b e Figura 3.17d). Essa temperatura é próxima à temperatura determinada para a transição de fase aparente através do Espalhamento de Luz Estático, a 64 °C. Além disso, na temperatura de 75 °C, um pequeno ombro estendido se formou no lado direito do pico e o mesmo persistiu até a última temperatura medida (81 °C) (Figura 3.16 e Figura 3.17f). Este resultado pode indicar a formação de uma fase hexagonal do tipo H<sub>II</sub>, onde as vesículas passam para um outro estágio de organização estrutural, mais complexo, sob influência da energia térmica.<sup>21</sup> Essa organização consiste em cilindros alongados com núcleo aquoso, formados a partir da agregação e fusão de vesículas submetidas a uma condição extrema, como redução significativa da porção aquosa ou aquecimento elevado. O resultado sugere que parte das vesículas esteja sofrendo esse processo de reorganização estrutural sob influência da alta temperatura. O fenômeno é esperado e tem sido descrito na literatura.<sup>21-23</sup> A presença de quitosana no sistema pode estar favorecendo a formação desta fase, já que a mesma não pôde ser observada para os lipossomas.

Analisando os valores resultantes para as distâncias de repetição  $d$ , na Figura 3.16 é possível perceber um contínuo deslocamento dos picos para valores menores de  $q$  conforme a temperatura vai aumentando. Assim, os valores da  $d$  aumentam com a temperatura (Figura 3.18). Porém, para lipossomas, o aumento da  $d$  ocorre de forma relativamente mais acentuada a partir de 55 °C. Esse comportamento demonstra que realmente existe uma modificação estrutural da bicamada em torno dessa temperatura. Para os quitossomas, um aumento maior da  $d$  pode ser observado após 61 °C. Em torno de 75 °C, onde foi observada a formação de um ombro ao lado direito do primeiro pico, essa continuidade de aumento foi relativamente reduzida.

Embora esses aumentos da  $d$  sejam discretos em relação à temperatura imediata, os mesmos não podem ser negligenciados ao longo de toda a rampa de aquecimento, levando em consideração a precisão da técnica de SAXS. O comportamento global da  $d$  para a amostra de quitossomas poderia ser extrapolado para uma reta se for excluído o último ponto (acima de 75 °C). Por outro lado, para a amostra de lipossomas, uma curva ascendente seria mais adequada. Os resultados também mostram que a  $d$  menor, obtida para quitossomas em

relação à lipossomas, na temperatura ambiente (20 °C), não persiste quando a amostra é submetida ao aquecimento. Com a pequena quantidade de quitosana presente no sistema em relação à quantidade de moléculas de fosfolipídios, a agitação molecular causada pelo aumento da temperatura deve prevalecer sobre o efeito de redução da  $d$  provocada pela quitosana a 20 °C.

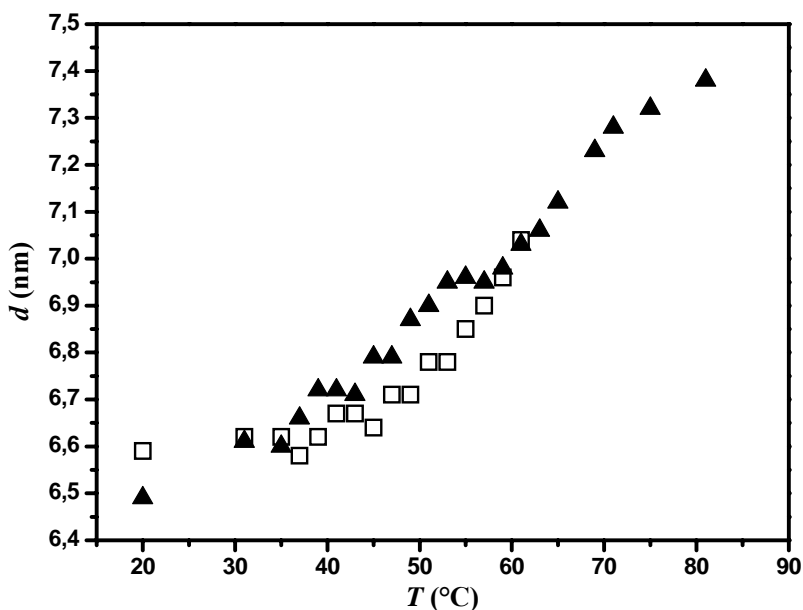


Figura 3.18. Evolução das distâncias de repetição das bicamadas fosfolipídicas ( $d$ ) obtidas por SAXS para lipossomas (□) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) (▲) submetidos ao aquecimento.

Outra observação dos pontos da  $d$  dos quitossomas pode ser feita considerando os patamares, por exemplo, em torno de 40 °C e em torno de 55 °C, onde houve uma pequena estagnação no aumento da  $d$ . A segunda temperatura pode ser aproximadamente relacionada com a temperatura de transição de fase da DSPC (55,6 °C).

Analisando os dados de SAXS juntamente com os dados de Espalhamento de Luz Estático no gráfico conjunto apresentado na Figura 3.19, com os valores da  $d$  normalizados pelo maior valor de  $d$  em cada caso por razões de ajuste comparativo, é possível demonstrar o efeito global da quitosana sobre o sistema submetido ao aquecimento, evidenciado pelas duas técnicas. Tanto a  $I_S$  obtida pelo Espalhamento de Luz quanto a  $d$  obtida pelo SAXS, mostram que os lipossomas sofrem modificações mais acentuadas em torno da mesma faixa

de temperatura, enquanto que quitossomas sofrem modificações relativamente menos pronunciadas durante a maior parte da rampa de aquecimento. Estes resultados colaboram com a interpretação de que a quitosana submete o sistema a um estado de transição moderado, dissipando a energia térmica fornecida ao sistema, conforme distutido na Sessão 3.1.2.1.

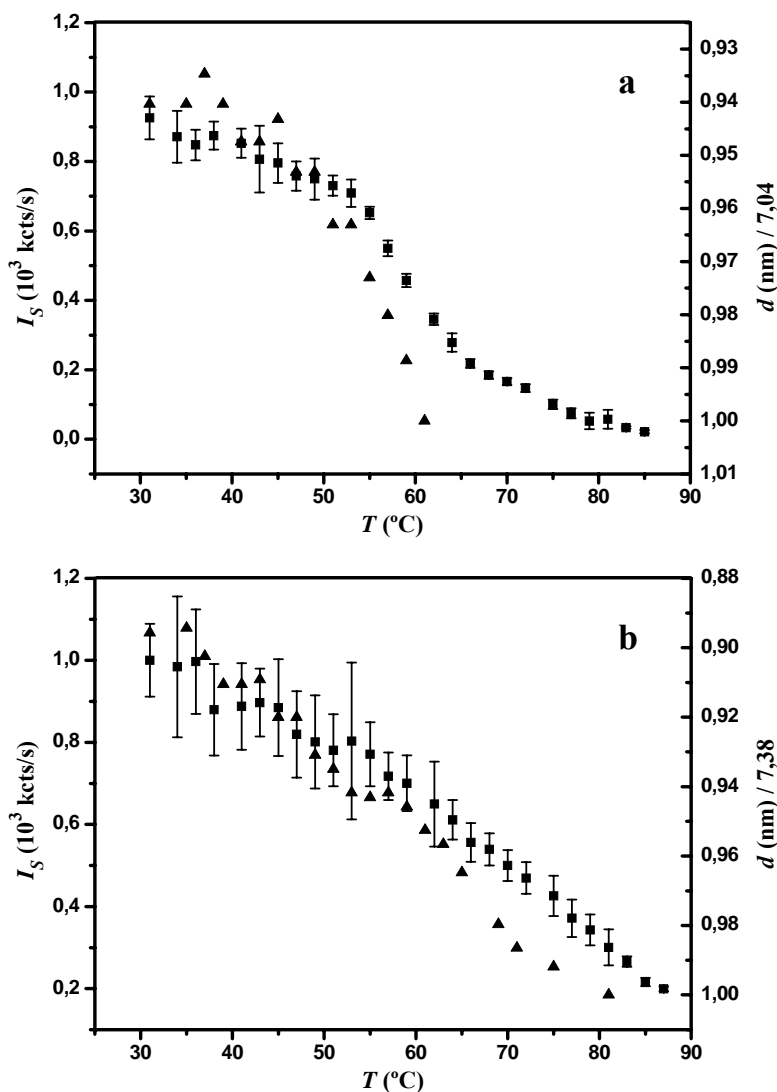


Figura 3.19. Evolução da intensidade de luz espalhada ( $I_S$ ) (■) observada no ângulo de espalhamento de  $135^\circ$  em função do aumento da temperatura ( $T$ ) obtida por Espalhamento de Luz Estático para lipossomas (a) e quitossomas contendo a maior concentração de quitosana utilizada (1,00 mg/mL) (b). Evolução comparativa das distâncias de repetição das bicamadas fosfolipídicas ( $d$ ) (▲) obtidas por SAXS e normalizadas em relação ao maior valor encontrado para lipossomas (a) e quitossomas (b) submetidos ao aquecimento.



Uma questão de complexidade maior consiste no significado físico da  $d$ . Lembrando que o parâmetro engloba a espessura de uma bicamada fosfolipídica mais a porção aquosa entre uma bicamada e outra, a sua variação está sujeita não somente à modificações da organização molecular da bicamada, mas também à variação do volume ocupado pela água entre as bicamadas das estruturas com mais de uma bicamada.

Conforme descrito na Sessão 1.2.3, a  $d$  pode variar com as diferentes fases lamelares, sendo que na transição da mesofase  $L_c$  para a  $L\beta$  a mesma deve aumentar como resultado da alongação das cadeias apolares dos fosfolipídios. Porém, na transição da  $L\beta$  para a  $L\beta'$  a espessura da bicamada deve ser reduzida como consequência da inclinação das cadeias. Entre a  $L\beta'$  e a  $P\beta'$  (pré-transição) a espessura pode diminuir ainda mais devido as interpenetrações das cadeias apolares. Finalmente, entre as mesofases  $P\beta'$  e  $L\alpha$  (transição principal) a bicamada volta a aumentar de espessura, resultado do alto desordenamento das cadeias apolares.

Essas modificações da espessura da bicamada influenciam a  $d$  diretamente, considerando um volume aquoso constante entre uma bicamada e outra. Porém, o volume aquoso pode variar, o que torna a avaliação da variação da  $d$  até certo ponto independente da variação da espessura. Evidentemente com o aumento da temperatura a agitação molecular das moléculas de água também aumenta. Consequentemente essas moléculas de água em crescente agitação molecular irão ocupar um volume maior. Além disso, a área ocupada pelas extremidades polares dos fosfolipídios também aumenta com a temperatura, principalmente em consequência da maior mobilidade das cadeias apolares,<sup>15</sup> mas também devido ao maior volume livre gerado pela agitação da água. A Figura 3.18 evidencia algumas regiões de estagnação, ou mesmo de pequena redução da  $d$  para os dois sistemas. Porém, a questão da variação da  $d$  apresenta uma alta complexidade e por si só este parâmetro não é conclusivo quanto à espessura efetiva da bicamada fosfolipídica em cada mesofase.

A presença de água entre bicamadas facilita as modificações de curvatura das bicamadas que podem ocorrer em determinadas transições de fase.<sup>16</sup> Admitindo um aumento do volume aquoso por agitação molecular, é possível justificar o concomitante aumento da flutuação das bicamadas que acaba produzindo picos de SAXS menos definidos com o aumento da temperatura. Assim, a organização lamelar das vesículas, especialmente em estruturas multilamelares, continua existindo no sistema, embora a agitação molecular causada pela temperatura provoque incoerências no perfil de espalhamento, mostrado pela redução dos picos e aumento da curva estendida.

Comparando mais uma vez os espectros de SAXS para os dois sistemas (Figura 3.16), fica evidenciado que a quitosana atua na manutenção da organização molecular das bicamadas fosfolipídicas dos quitossomas submetidos ao aquecimento, já que picos de Bragg podem ser observados até a temperatura de 81 °C. Neste caso, uma menor desordem molecular deve ser energeticamente favorecida, mesmo com o fornecimento crescente de energia térmica. A quitosana deve atuar no sentido de reduzir a agitação molecular das moléculas de fosfatidilcolina e talvez também das moléculas de água incorporadas nas vesículas.

Em outras palavras, os resultados demonstram que a quitosana fornece ao sistema vesicular certa estabilidade física sob energia térmica. É possível submeter os quitossomas a temperaturas bem mais elevadas do que os lipossomas, com a manutenção de algumas características estruturais originais. A maior rigidez da estrutura das vesículas contendo quitosana pode mais uma vez ser sugerida.

Quanto à transição de fase, considerando todo o conjunto de resultados e discussões abordados nesta Sessão bem como na Sessão 3.1.2.1, parece coerente concluir que a transição de fase principal das bicamadas fosfolipídicas foi deslocada para uma temperatura maior com a presença de quitosana. Por outro lado, não é possível precisar exatamente essa temperatura, sendo que os dados sugerem uma temperatura aparente em torno de 64 °C.

Todos os resultados de Espalhamento de Luz Estático e de SAXS mostram que em relação aos lipossomas, os quitossomas apresentam um comportamento bem mais atenuado, com variações progressivas também, porém minimizadas. Ao longo do aumento da temperatura, o processo apresentado pelos quitossomas certamente pode ser denominado como um regime de transição de uma fase metaestável.

### **3.1.3. Dinâmica e Interações Moleculares**

A membrana fosfolipídica de lipossomas apresenta propriedades dinâmicas características da sua composição molecular e organização estrutural. A presença da quitosana, seja qual for a sua localização na bicamada, produz alterações não somente estruturais, mas principalmente na estabilidade físico-química. Essas alterações levam o sistema para um estado energético diferenciado que pode apresentar menor ou maior estabilidade termodinâmica em determinadas condições ambientais. Os movimentos

moleculares dos fosfolipídios estarão limitados às conseqüências resultantes do tipo de interação estabelecida com a quitosana. Considerando a vesícula na sua totalidade, além dos parâmetros estruturais, as condições iônicas da superfície externa têm um papel importante no comportamento das partículas em suspensão frente a processos de interação entre elas, que podem estimular ou inibir fenômenos de agregação e fusão, por exemplo. A difusão das vesículas em suspensão também representa um parâmetro indicativo de características físicas peculiares, sendo que a velocidade com que uma partícula se desloca depende de fatores relacionados com a sua estrutura e composição. Por fim, o tipo de interação estabelecida entre fosfolipídios e quitosana condiciona diversos comportamentos dinâmicos a nível molecular e estrutural dos quitossomas. Propriedades dinâmicas e de interação foram estudadas para que se pudesse verificar a localização da quitosana e inferir sobre o tipo de interação predominante no sistema vesicular estabelecido entre fosfatidilcolina e quitosana.

#### **3.1.3.1. Potencial Zeta**

Os comportamentos eletrocinéticos de partículas em suspensão constituem uma propriedade dinâmica das partículas como resposta à ação de um campo elétrico aplicado. A presença de cargas na superfície externa e a sua magnitude influenciam os processos dinâmicos das estruturas na suspensão.

O potencial eletrocinético, ou Potencial Zeta, das partículas em difusão numa suspensão de concentração de eletrólito conhecida, sob ação de um campo elétrico constante, foi determinado para lipossomas e quitossomas com variada concentração polimérica. Sendo que as vesículas apresentam faixas de tamanhos em torno de 200 nm de diâmetro ou mais, conforme determinado por Espalhamento de Luz, foi considerado o modelo de Smoluchowski com a função de Henry igual a 1,5.<sup>24</sup>

Os resultados obtidos para as vesículas filtradas a 0,45 µm em suspensão aquosa de pH 5,8 e concentração de 1 mM de NaCl são apresentados na Figura 3.20. Para lipossomas, o Potencial Zeta foi de  $-42 \pm 3$  mV. O valor negativo significa que as vesículas apresentam superfície externa com predominância de cargas negativas, onde os íons  $\text{Na}^+$  da suspensão estão sendo atraídos pela carga superficial negativa dos lipossomas. Lembrando que a fosfatidilcolina constitui um fosfolipídio zwitteriônico, ou seja, de carga efetiva igual a zero,

essa carga superficial negativa deve ser resultante da presença de ácido fosfatídico na composição da fosfatidilcolina utilizada na preparação das vesículas.

O valor de  $-42 \pm 3$  mV significa que os lipossomas podem apresentar relativa estabilidade coloidal em relação a processos de agregação. A carga superficial negativa proporciona uma proteção iônica às partículas e desta forma, quando uma partícula em difusão encontra outra na suspensão, ambas se auto-repelem devido à carga superficial.

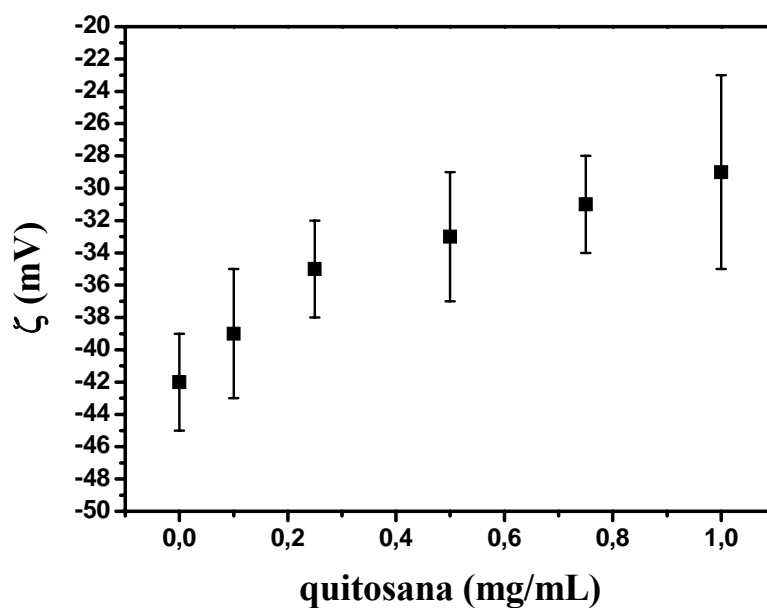


Figura 3.20. Variação do Potencial Zeta ( $\zeta$ ) para lipossomas e quitossomas com crescente concentração polimérica para amostras filtradas a  $0,45 \mu\text{m}$ .

Para os quitossomas o Potencial Zeta variou entre  $-39 \pm 4$  mV e  $-29 \pm 6$  mV, com potencial crescente com a concentração de quitosana (Figura 3.20). A constante variação do potencial para valores maiores mostra a influência da quitosana na carga superficial das vesículas. Como a quitosana representa um polieletrólito de carga positiva nos grupos amino ionizados em suspensão aquosa, é de se esperar uma interação eletrostática entre as cadeias positivamente ionizadas do polímero e a superfície externa das vesículas com potencial predominante negativo. A presença de quitosana na superfície dos quitossomas aumenta a densidade de cargas positivas em contra partida às cargas negativas. O resultado é o crescimento do Potencial Zeta efetivo, conforme observado.

O resultado de Potencial Zeta maior em relação ao valor encontrado para os lipossomas, bem como o aumento contínuo com a concentração de polímero sugere, portanto, a presença efetiva de quitosana na superfície externa dos quitossomas.

Os valores de Potencial Zeta para os quitossomas representam uma carga moderadamente negativa que, como para os lipossomas, significa um parâmetro que pode proporcionar uma relativa estabilidade coloidal, evitando as interações entre partículas de mesma carga. Porém, à medida que a concentração da quitosana aumenta o valor efetivo também cresce e com isso o poder contra processos de agregação pode diminuir. Um valor de Potencial Zeta de -29 mV, encontrado para os quitossomas de maior concentração de quitosana, já pode ser considerado como um valor crítico, pois está acima do limite inferior (-30 mV) definido como potencial de colóides de estabilidade moderada,<sup>24</sup> ou seja, o valor encontra-se dentro da faixa de -30 a +30 mV, onde os fenômenos de agregação são mais freqüentes.

Nos experimentos de Microscopia Óptica foram observados aglomerados micrométricos para a amostra de quitossomas de maior concentração polimérica (Sessão 3.1.1.3). Assim, os resultados de Potencial Zeta também podem indicar que os quitossomas estão sujeitos à agregação em suspensão com uma probabilidade maior do que os lipossomas.

### **3.1.3.2. Recuperação de Fluorescência Após Foto-Branqueamento**

A dinâmica dos sistemas vesiculares foi estudada através da difusão das partículas em suspensão com a finalidade de investigar a associação da quitosana às vesículas. A Recuperação de Fluorescência Após Foto-Branqueamento (FRAP) permite a determinação deste parâmetro a partir da mobilidade de moléculas fluorescentes presentes no sistema.

Lipossomas fluorescentes contendo 0,1% de NBDPC na sua composição e quitossomas fluorescentes, preparados com a quitosana fluorescente (1,00 mg/mL), submetidos à ultrasonicação de 5 minutos para homogeneização da distribuição de tamanhos (Sessão 3.1.1.1) foram submetidos à técnica de FRAP. A quitosana fluorescente, dissolvida na solução tampão de acetato (pH 4,5), também foi avaliada.

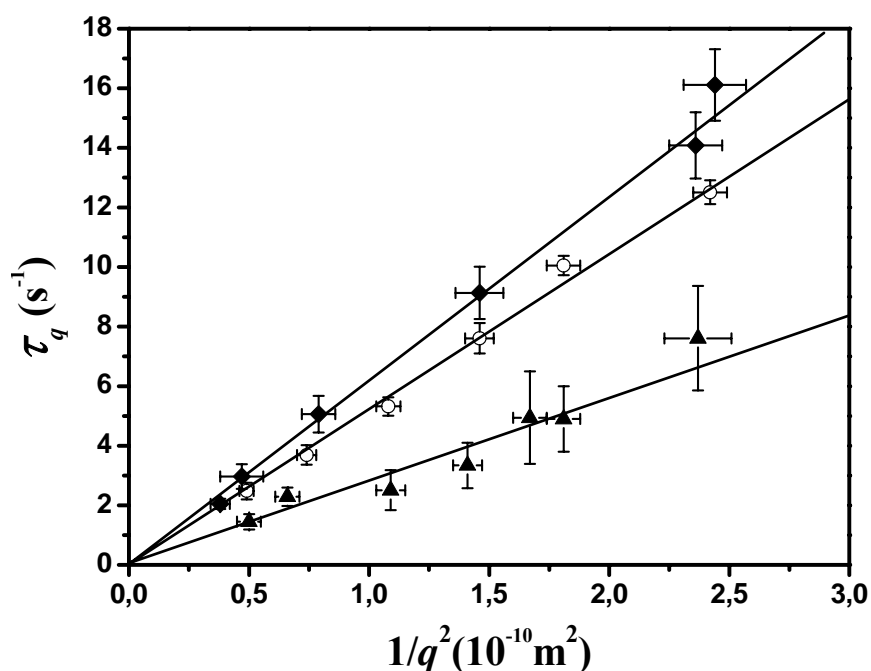


Figura 3.21. Tempos de recuperação de fluorescência característicos ( $\tau_q$ ) em função do inverso do vetor de onda ao quadrado ( $q$ ) obtidos por FRAP para lipossomas com 0,1% de NBDPC (◆) e quitossomas com quitosana fluorescente (1,00 mg/mL) (○) em suspensão aquosa e sonicados por 5 minutos sob energia constante e quitosana fluorescente em solução tampão (7).

Os tempos de recuperação de fluorescência obtidos em função do vetor de onda pela FRAP (Figura 3.21) estão relacionados com a dinâmica difusional das partículas em suspensão ou solução. Os lipossomas apresentaram os maiores tempos, seguidos pelos quitossomas e quitosana em solução, respectivamente.

O perfil de recuperação mostra uma relativa linearidade individual para as três espécies. A quitosana apresenta tempos inferiores em relação aos quitossomas para todos os vetores de onda. Esse resultado evidencia que na amostra de quitossomas não existe polímero livre na solução, já que nenhum tempo de recuperação característico do polímero foi identificado na amostra. Sendo assim, a quitosana adicionada na formação destas vesículas está totalmente associada à estrutura das mesmas. Portanto, pode-se concluir também que o processo de ultrasonicação, aplicado para homogeneização de tamanhos das estruturas, não leva à perda de quitosana das vesículas mesmo com a ação de uma energia de relativa

intensidade. O resultado sugere que o polímero está fortemente ligado à estrutura das vesículas, o que torna a interação iônica mais provável do que forças de van der Waals, considerando a existência de polímero na superfície externa das estruturas, conforme observado pelos resultados de Potencial Zeta.

A comparação dos tempos de recuperação entre quitossomas e lipossomas também sugere comportamentos diferenciados para as duas espécies. Porém, neste caso as diferenças não são muito pronunciadas, o que mostra uma proximidade das velocidades de difusão das duas vesículas em suspensão, bem como a semelhança na distribuição de tamanhos. De qualquer forma, a extrapolação dos pontos mostra duas espécies distintas com seus respectivos tempos de recuperação característicos.

A partir da extrapolação dos dados da Figura 3.21, foram obtidos os coeficientes de difusão de cada amostra. Os resultados são apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Valores obtidos para os coeficientes de difusão ( $D$ ) para as diferentes amostras fluorescentes estudadas por FRAP e raios hidrodinâmicos aparentes ( $R_h$ ) para vesículas não fluorescentes (média  $\pm$  distribuição) e quitosana não fluorescente obtidos por Espalhamento de Luz Dinâmico.

Amostra	$D$ ( $10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	$R_h$ (nm)
Lipossomas	$1,52 \pm 0,05$	$65 \pm 15$
Quitossomas	$1,76 \pm 0,04$	$55 \pm 10$
Quitosana	$3,52 \pm 0,50$	$10 \pm 1$

Os coeficientes de difusão determinados pela FRAP mostram que quitossomas apresentam velocidade média de difusão 14% maior do que lipossomas. Evidentemente esta maior velocidade também é resultante do menor tamanho médio e distribuição de tamanhos encontrados para quitossomas ultrasonicados, como pode ser comparado na Tabela 3.5. A quitosana em solução apresenta a difusão maior pelo seu reduzido  $R_h$ .

Em suma, os resultados de FRAP mostram que a quitosana está realmente presente na estrutura das vesículas, considerando que as mesmas apresentam fluorescência efetiva detectada pela técnica, bem como tempos de recuperação de fluorescência característicos que

resultam numa velocidade de difusão diferenciada. Quitosana livre não faz parte do sistema formado pelos quitossomas, o que prova que mesmo a ultrasonicação das vesículas não resulta em perda polimérica. Assim, uma grande estabilização estrutural pela alta energia de interação entre quitosana e fosfatidilcolina é sugerida.

### 3.1.3.3. Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo

A estruturação de lipossomas e quitossomas bem como as interações entre os fosfolípidios e a quitosana também foram estudadas pela RMN de  $^{31}\text{P}$ . A técnica representa um método adequado para que se possa acessar o ambiente eletrônico do átomo de fósforo.

O aspecto de maior interesse nos estudos de RMN da presente Tese consiste na avaliação das interações entre a extremidade polar dos fosfolípidios, onde encontra-se o grupo fosfato, e a quitosana. Montenez e colaboradores, por exemplo, estudaram a interação entre os grupos amina protonados da azitromicina com o grupo fosfato de fosfolípidios em lipossomas e alterações na mobilidade molecular dos fosfolípidios foram caracterizadas.<sup>25</sup>

Considerando os grupos amino positivamente ionizados das cadeias do polissacarídeo, espera-se que as interações da quitosana com a região polar dos fosfolípidios proporcionem alterações na mobilidade do grupo fosfato, negativamente ionizado. A Figura 3.22 mostra os espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  para lipossomas e quitossomas preparados com a maior concentração de quitosana (1,00 mg/mL), para quatro temperaturas diferentes.

Comparando primeiramente os espectros obtidos para a temperatura ambiente (25 °C), os resultados evidenciam uma significativa diferença na ressonância do  $^{31}\text{P}$  entre lipossomas e quitossomas. Os perfis de ressonância são característicos de sistemas lamelares, apresentando o pico isotrópico ( $\sigma_{\perp}$ ) em campo alto e a curva anisotrópica de intensidade menor ( $\sigma_{\parallel}$ ) em campo baixo. Porém, um pico isotrópico distinto está presente em torno de 0 ppm. Para os lipossomas o mesmo apresenta alta intensidade em relação ao pico característico ( $\sigma_{\perp}$ ). Por outro lado, para quitossomas a sua intensidade é consideravelmente reduzida em relação ao pico de referência.

O pico isotrópico a 0 ppm corresponde a uma ressonância distinta do  $^{31}\text{P}$ , resultado de uma mobilidade diferenciada do grupo fosfato. Neste caso existe um tempo de relaxação menor que sugere um novo ambiente eletrônico para o grupo fosfato. A sua presença pode



ser interpretada considerando pelo menos dois aspectos dos sistemas: tamanho ou forma de partículas e interações moleculares.

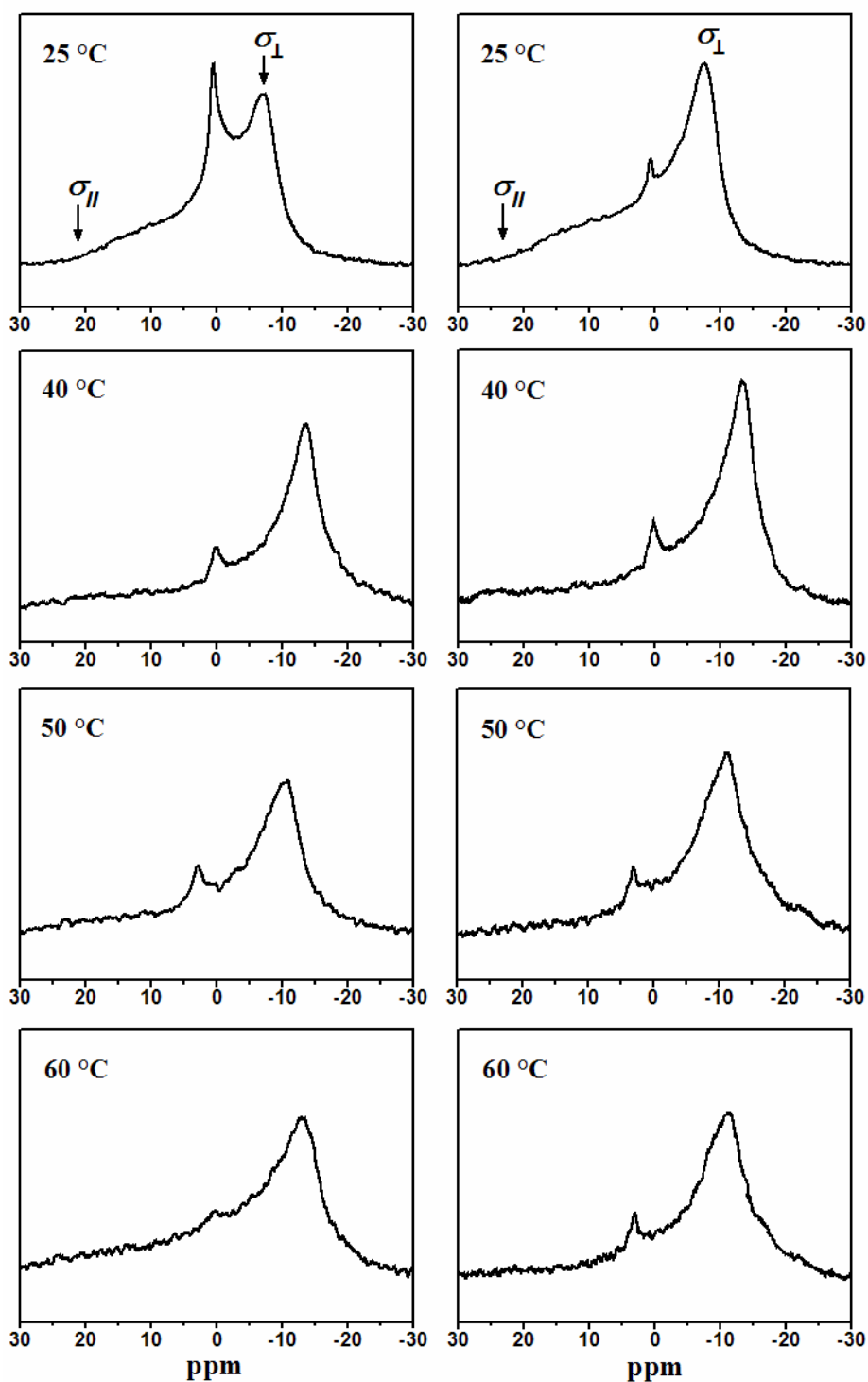


Figura 3.22. Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  obtidos para lipossomas (coluna esquerda) e quitossomas preparados com 1,00 mg/mL de quitosana (coluna direita) em diferentes temperaturas conforme indicado. Os deslocamentos químicos perpendicular ( $\sigma_{\perp}$ ) e paralelo ( $\sigma_{\parallel}$ ) são indicados nos espectros superiores.

Conforme introduzido na Sessão 2.8, o padrão de picos no espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  pode ser relacionado com os tamanhos de partículas fosfolipídicas.<sup>26</sup> Burnell e colaboradores mostraram que lipossomas com diâmetros inferiores a 100 nm apresentam um pico de ressonância centrado a 0 ppm com reduzida largura à meia altura de 1,5 ppm, resultante da rápida dinâmica das partículas.<sup>27</sup> A alta curvatura da membrana de lipossomas de tamanhos reduzidos fornece um volume espacial maior para a extremidade polar, principalmente da camada fosfolipídica externa dos lipossomas. Assim, a mobilidade rotacional do grupo fosfato é elevada, o que resulta num pico de alta definição e intensidade no espectro de RMN. A curvatura da camada fosfolipídica interna dos lipossomas não restringe o volume espacial do grupo fosfato (que neste caso estaria sendo reduzido), pois a mesma é compensada pela redução do número de fosfolipídios em relação à camada externa, para propiciar a alta curvatura. Para lipossomas unilamelares pequenos a razão entre moléculas de fosfolipídios contidas no interior e no exterior da bicamada é de aproximadamente 1/2.<sup>28</sup>

A difusão rotacional das vesículas e a difusão lateral dos fosfolipídios dentro da bicamada fosfolipídica, como discutido na Sessão 1.2.3, são os principais fatores influentes na mobilidade do grupo fosfato da extremidade polar.<sup>27</sup> Evidentemente essas difusões são mais expressivas em estruturas menores.

Com o aumento do tamanho dos lipossomas a curvatura da membrana diminui, a proporção de moléculas entre camada interna e externa da bicamada é mais equilibrada e conseqüentemente o empacotamento das moléculas torna-se mais organizado, ao mesmo tempo em que o volume espacial das mesmas é reduzido. Assim, a mobilidade do grupo fosfato também é reduzida o que resulta num espectro de estendido  $\Delta\sigma$ . Para lipossomas com diâmetro de 500 nm um valor de  $\Delta\sigma$  de 25 ppm foi determinado por Burnell e colaboradores.<sup>27</sup> Quanto maior o diâmetro das estruturas, maior será o  $\Delta\sigma$ .<sup>26</sup>

Lembrando que as amostras analisadas por RMN de  $^{31}\text{P}$  não foram submetidas a nenhum pós-tratamento, apresentando assim uma larga distribuição de tamanhos de partículas (Sessão 3.1.1.1), bem como a presença de estruturas não esféricas (Sessão 3.1.1.3), o pico isotrópico em 0 ppm pode ser relacionado com a maior liberdade rotacional do grupo fosfato. Conforme discutido acima, essa liberdade rotacional é resultante do maior volume espacial proporcionado à região polar dos fosfolipídios devido à alta curvatura da bicamada das partículas menores e das partículas não esféricas. Esse resultado pode ser comparado, por exemplo, com os estudos de Toraya e colaboradores, que observaram uma transição entre

lipossomas esféricos e alongados com o surgimento de um pico isotrópico de alta intensidade na RMN de  $^{31}\text{P}$ .<sup>29</sup>

Para os sistemas estudados aqui, o pico isotrópico não atinge uma intensidade muito elevada, já que a presença de estruturas esféricas de diâmetros acima de 100 nm predomina tanto para os lipossomas como para os quitossomas. Contudo, os resultados mostram que, para os lipossomas, a intensidade do pico é significativamente maior do que para os quitossomas. O fato sugere, portanto, uma proporção maior de estruturas de diâmetros reduzidos e estruturas não esféricas para os lipossomas.

Por outro lado, as interações moleculares entre fosfolípidios e quitosana também devem ser consideradas na avaliação dos espectros. Sendo que o pico isotrópico representa uma liberdade espacial maior para o grupo fosfato, o seu decréscimo, por conseguinte, significa uma redução nesta referida liberdade espacial. Assim, o resultado sugere que, com a presença de quitosana, a liberdade espacial do grupo fosfato é menor. Portanto, o ambiente do fósforo é influenciado pela quitosana o que pode sugerir interações moleculares efetivas entre quitosana e o grupo fosfato da região polar dos fosfolípidios. Timoszyk e colaboradores relacionaram o aumento de um pico isotrópico com uma maior fluidez da membrana de lipossomas.<sup>30</sup> Nesse sentido, a quitosana estaria reduzindo a fluidez da membrana e produzindo estruturas mais rígidas conforme observado também por SAXS.

Após aquecimento, os sistemas também apresentam um comportamento diferenciado. Para lipossomas as intensidades do pico isotrópico a 0 ppm e da curva anisotrópica foram reduzidas a 40 °C. Na temperatura de 50 °C não foi observada nenhuma alteração pronunciada. Porém, na temperatura de 60 °C o pico isotrópico a 0 ppm diminuiu significativamente.

Já para quitossomas, na temperatura de 40 °C apenas a intensidade da curva anisotrópica foi reduzida. Em seguida, o sistema mostra-se praticamente inalterado sob o aumento da temperatura, com a manutenção dos dois picos isotrópicos de menor e maior intensidade a 50 e 60 °C.

Conforme discutido anteriormente, o aumento da temperatura reduz o deslocamento químico de anisotropia  $\Delta\sigma$ . A Figura 3.23 mostra os resultados para o  $\Delta\sigma$  em função do aumento da temperatura para os dois sistemas.

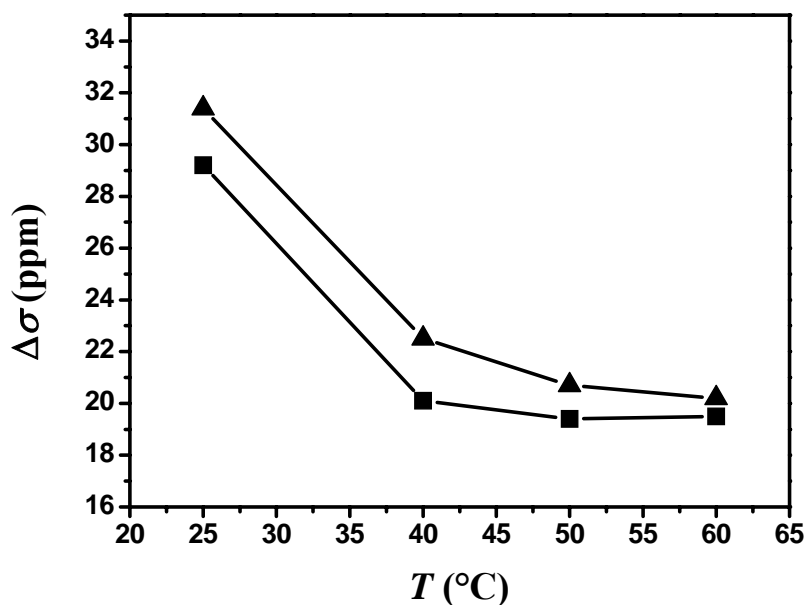


Figura 3.23. Variação do deslocamento químico de anisotropia ( $\Delta\sigma$ ) obtido por RMN de  $^{31}\text{P}$  em função da temperatura ( $T$ ) para lipossomas (■) e quitossomas (▲). O desvio máximo do  $\Delta\sigma$  é de  $\pm 2$  ppm para todos os pontos.

Uma significativa queda no valor de  $\Delta\sigma$  foi observada tanto para lipossomas como para quitossomas com o aumento da temperatura de 25 para 40 °C. Essa redução do  $\Delta\sigma$  mostra o crescimento da mobilidade rotacional do grupo fosfato com o aumento da energia térmica para os dois sistemas. Após, o subsequente aumento de temperatura não provocou mais qualquer alteração considerável de  $\Delta\sigma$  até 60 °C.

Deve ser lembrado que entre 50 e 60 °C deve ocorrer a transição de fase de gel para cristal líquido no sistema formado pelos lipossomas (Sessão 3.1.2.1). Conforme descrito na literatura, normalmente ocorre uma significativa redução do valor de  $\Delta\sigma$  na temperatura dessa transição de fase. Porém, esse comportamento não consiste numa regra estabelecida, sendo que muitos trabalhos também observam a ausência da redução do  $\Delta\sigma$  na temperatura de transição de fase de fosfolipídios formadores de lipossomas.<sup>31</sup> De fato, nos sistemas aqui estudados, nenhuma grande variação desse parâmetro foi observada entre 50 e 60 °C e o valor de  $\Delta\sigma$  permaneceu praticamente constante nestas duas temperaturas.

O que pode ser observado entre os espectros de 50 e 60 °C de lipossomas é a redução da intensidade do pico isotrópico, relacionado com a maior mobilidade espacial do grupo fosfato. Assim, essa redução, mais significativa entre 25 e 40 °C, culmina com a

eliminação quase total dessa ressonância peculiar a 60 °C. O fato pode estar relacionado tanto com a transição de fase como com a fusão de partículas de estabilidade estrutural menor com o aumento da temperatura. A curvatura acentuada da membrana de lipossomas de reduzido diâmetro ou de formas não esféricas, representa uma condição geométrica desfavorável em nível de estabilidade estrutural especialmente numa situação de elevada agitação molecular, como ocorre com o aumento da temperatura. Assim, processos de fusão dessas vesículas de baixa estabilidade têm sido observados em função da temperatura.<sup>32,33</sup> Neste caso, os lipossomas estariam fundindo e formando estruturas onde a liberdade espacial do grupo fosfato é menor. Consequentemente, o pico isotrópico em torno de 0 ppm é reduzido.

Os valores médios de  $\Delta\sigma$  foram maiores para quitossomas em todas as temperaturas, o que poderia reforçar a idéia de menor mobilidade espacial do grupo fosfato com a presença do polímero. Porém, a diferença não é muito significativa considerando que existe uma variação de até 2 ppm na determinação deste parâmetro.

O que fica bastante evidenciado nos espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  é a manutenção praticamente inalterada do pico isotrópico em torno de 0 ppm para os quitossomas entre 25 e 60 °C. Esse resultado pode sugerir ausência de processos de fusão vesicular, ou seja, as estruturas permanecem imunes aos processos de agregação térmica. Assim, a quitosana proporciona estruturas termodinamicamente mais estáveis.

Do ponto de vista das interações moleculares, a ressonância peculiar do  $^{31}\text{P}$  representada pelo referido pico isotrópico permanece, portanto, pouco influenciada pela energia térmica, o que pode ser o resultado das interações entre quitosana e região polar dos fosfolípidios. Como observado nos estudos de transição de fase (Sessão 3.1.2), os quitossomas mostram-se efetivamente menos influenciados pelo aumento da temperatura do que os lipossomas. Os resultados de RMN de  $^{31}\text{P}$  comprovam também esses resultados.

De fato, a quitosana parece modular a ressonância do  $^{31}\text{P}$ . Mesmo com o aumento da mobilidade espacial do grupo fosfato entre 25 e 40 °C, mostrada pela significativa redução do  $\Delta\sigma$ , a mobilidade do grupo fosfato representada pelo pico isotrópico em torno de 0 ppm, não está sendo afetada pela energia térmica, o que significa que a quitosana está blindando o fosfato de forma constante. A energia térmica não parece afetar essa blindagem oferecida pela quitosana, o que reforça a discussão a respeito da dissipação da energia térmica da Sessão 3.1.2, proporcionada pela presença do polissacarídeo.

Em suma, pode-se concluir que a quitosana reduz efetivamente na temperatura ambiente (25 °C) a mobilidade do grupo fosfato. O mesmo torna-se blindado de tal forma que o aumento da temperatura até 60 °C não altera significativamente as suas propriedades de ressonância detectáveis pela RMN de  $^{31}\text{P}$ . Os resultados mostram uma interação molecular entre a quitosana e o grupo fosfato da extremidade polar dos fosfolipídios nos quitossomas.

Considerando igualmente os resultados de Potencial Zeta onde foi observada uma constante alteração do potencial superficial das estruturas, concomitante com o aumento da concentração de quitosana, bem como os tempos de recuperação de fluorescência característicos obtidos por FRAP, que forneceram uma velocidade de difusão diferenciada, provando que não existe quitosana livre no sistema mesmo após a ultrasonicação, juntamente com a alteração do perfil de ressonância do  $^{31}\text{P}$ , torna-se bastante razoável sugerir a interação eletrostática entre os grupos amino positivamente ionizados da quitosana e o grupo fosfato de carga negativa da fosfatidilcolina como a interação predominante entre as duas entidades. Portanto, os estudos dinâmicos e de interação mostram que a presença da quitosana no sistema vesicular representa uma camada polimérica nas regiões polares das estruturas. A camada influencia as propriedades do sistema como carga superficial, difusão, liberdade espacial molecular, fluidez da membrana e estabilidade termodinâmica. Essas propriedades são diferenciadas no sistema composto formado pelos quitossomas.

### **3.2. Lipossomas Gigantes**

Lipossomas Gigantes, também conhecidos como vesículas gigantes, foram investigados na presente Tese com o objetivo de avaliar a presença e a localização da quitosana nas estruturas micrométricas. A bicamada fosfolipídica é semelhante em qualquer lipossoma, sendo que a mesma apresenta apenas alguns nanômetros de espessura. No entanto, lipossomas gigantes permitem a observação microscópica direta das propriedades dinâmicas da membrana através de Microscopia Óptica. As modificações causadas pela variação de condições físico-químicas do meio e a presença de diferentes moléculas na sua composição, podem ser estudadas. Através da Microscopia Óptica de Fluorescência também é possível identificar espécies específicas que contenham marcadores fluorescentes e assim, seu comportamento frente à membrana das vesículas pode ser monitorado.

A formação de lipossomas gigantes contendo quitosana foi desenvolvida pela primeira vez na presente Tese. Por meio de análises ópticas quantitativas, a localização do polímero pôde ser visualmente e quantitativamente determinada, bem como a estabilidade estrutural avaliada. A produção bem sucedida de quitossomas gigantes estáveis sugere forte interação molecular entre os fosfolipídios e a quitosana.

### 3.2.1. Avaliação da Eletroformação a partir da Fase Reversa

A modificação da Eletroformação clássica para a produção de vesículas gigantes foi procedida para a produção dos quitossomas gigantes na presente Tese. A observação por Microscopia Óptica da célula de formação das vesículas contendo quitosana em comparação com a célula em que foi feita a eletroformação tradicional, sem polímero, não mostrou diferenças microscópicas entre os dois processos.

Como pode ser observado na Figura 3.24, tanto na célula de eletroformação onde foi efetuado o procedimento descrito por Angelova e colaboradores<sup>34</sup> (Figura 3.24a) quanto na célula em que foi aplicada a emulsão contendo a quitosana (Figura 3.24b), vesículas gigantes foram produzidas sob iguais condições de tempo, tensão aplicada, temperatura e pressão osmótica da solução de sacarose.

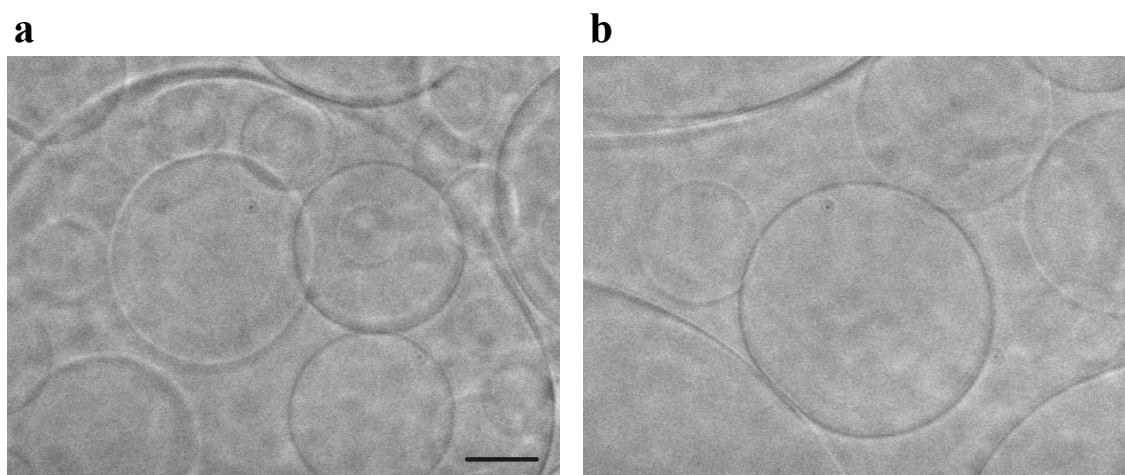


Figura 3.24. Imagens de Microscopia Óptica do interior das células de eletroformação na produção de vesículas gigantes pelo método tradicional (a) e pelo método modificado com a adição de quitosana (b) após três horas sob ação de campo elétrico constante (1,5 V e 10 Hz) em solução de sacarose (0,095 M) na temperatura ambiente (20 °C). A barra expande 10 micrômetros.

Em ambos os casos as vesículas gigantes apresentaram um crescimento equivalente em função do tempo, ou seja, nenhuma das células mostrou uma formação de estruturas significativamente mais acelerada em relação à outra. De forma semelhante, o rendimento de produção de vesículas também pareceu qualitativamente comparável nos dois processos, embora nenhuma análise quantitativa tenha sido feita nesse sentido.

Nos dois processos, vesículas gigantes com diâmetros variando entre alguns micrômetros e algumas centenas de micrômetros foram obtidas. As mesmas puderam ser igualmente transferidas para células de observação em solução de glicose de pressão osmótica conhecida para a sua avaliação de forma isolada (Figura 3.25).

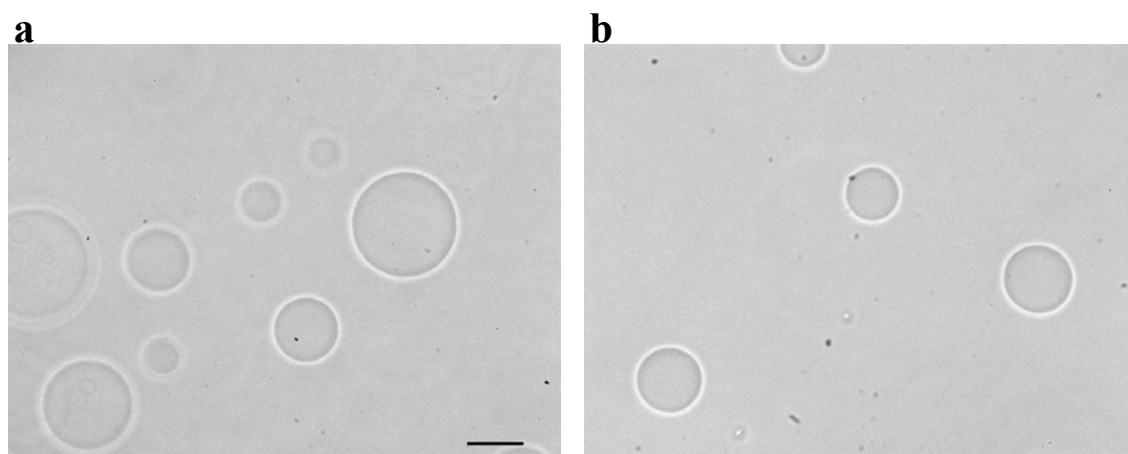


Figura 3.25. Imagens de Microscopia Óptica de Contraste de Fase de lipossomas gigantes (a) e quitossomas gigantes (b) dispersos em solução de glicose (0,099 M). A barra expande 20 micrômetros.

Variáveis pertinentes também foram avaliadas. A preparação a partir da fase reversa foi procedida sem adição de polímero, ou seja, a emulsão precursora foi preparada apenas com a adição da solução tampão de acetato (pH 4,5). Os resultados foram comparáveis aos acima descritos.

Os resultados obtidos evidenciam que a modificação da Eletroformação pela introdução da emulsão contendo micelas reversas formadas pela solução tampão contendo ou não quitosana e pelas moléculas de DOPC, produz vesículas gigantes comparáveis ao processo original. Apesar do uso de uma suspensão aquosa, que poderia alterar significativamente o processo de organização molecular das bicamadas de fosfolipídio que



formam a membrana das vesículas, reduzindo ou mesmo impedindo o crescimento das estruturas, foi demonstrado que a modificação não prejudica a produção de lipossomas gigantes. Mesmo com a presença de quitosana na emulsão precursora, a formação de vesículas não foi prejudicada.

No que concerne à porção aquosa presente na primeira etapa, pode-se considerar que após a secagem da emulsão depositada sobre a lâmina condutora em dessecador sob vácuo, poucas moléculas de água devem restar no sistema. Possivelmente um grau de hidratação mínimo da DOPC deve-se manter incorporado, já que as moléculas de fosfolipídios são higroscópicas. De qualquer forma, a deposição na lâmina de eletroformação de uma suspensão de micelas, em substituição a uma solução de fosfolipídio, poderia ser prejudicial à subsequente Eletroformação. A deposição da emulsão contendo fase aquosa deve proporcionar a formação de um filme de fosfolipídios, após a secagem, onde as moléculas estão distribuídas de forma menos homogênea do que na situação onde não existe fase aquosa. Mesmo assim, tanto a presença de moléculas de água quanto essa diferenciação organizacional do filme, não prejudicou a formação das vesículas.

Mais além, a presença de quitosana deve ser encarada como um fator ainda mais relevante do que a água. A macromolécula poderia perfeitamente impedir a auto-associação das moléculas de DOPC por razões das mais diversas, como interações entre as cadeias poliméricas com a região apolar dos fosfolipídios, que poderia prevenir a formação da bicamada das vesículas. A simples presença da quitosana significa que o sistema está à mercê das conseqüências termodinâmicas diferenciadas, resultantes quando da ação do campo elétrico aplicado na célula. A agitação molecular do polímero, a dissipação da energia ao longo das suas cadeias, impedimentos estéricos gerados pelo seu volume espacial e tipos de interação e organização são variáveis de significativa relevância.

Porém, nenhuma das alterações provocadas no sistema pela presença da quitosana parece ter prejudicado o processo de formação das vesículas gigantes. Portanto, pode-se concluir que a modificação da Eletroformação pela introdução da emulsão precursora foi bem sucedida. A mesma é capaz de produzir vesículas gigantes unilamelares, esféricas, em quantidades consideráveis e adequadas para pesquisas científicas desenvolvidas com tais estruturas.

Os resultados do processo sugerem inclusive que outras moléculas hidrofílicas, não apenas polímeros, mas também fármacos ou proteínas, possam ser adicionadas na formação

da emulsão a fim de proporcionar a produção de lipossomas gigantes diferenciados, designados para uma larga gama de pesquisas relacionadas.

### **3.2.2. Localização da Quitosana nos Lipossomas Gigantes**

A modificação da Eletroformação com a utilização de uma emulsão precursora possibilitou a produção de lipossomas gigantes da mesma forma que a Eletroformação tradicional, a partir de um filme de fosfolipídios. Por outro lado, a presença da quitosana na emulsão precursora depositada na lâmina condutora, pode não garantir a sua presença efetiva nas vesículas, após a completa estruturação das mesmas.

As moléculas de DOPC podem se auto-associar nas bicamadas que formam a membrana dos lipossomas, sob ação da energia elétrica fornecida à célula. Esse processo de auto-associação pode perfeitamente ocorrer independente da presença da quitosana se existirem condições energéticas que desfavoreçam qualquer interação que permita levar à formação das vesículas contendo o polímero na sua estrutura.

A presença da quitosana poderia, portanto, prejudicar a formação das vesículas gigantes e conseqüentemente as vesículas observadas não conteriam o polímero em sua estrutura. Assim as vesículas formadas pela Eletroformação modificada seriam idênticas quanto à sua composição às vesículas obtidas pelo processo convencional.

Uma outra possibilidade seria a formação de vesículas contendo quitosana encapsulada no núcleo aquoso das estruturas. Neste caso teríamos a ausência de interação positiva entre as moléculas de DOPC e as cadeias da quitosana e o polímero poderia estar disperso em forma de agregados, já que as condições de pH das soluções de sacarose e glicose não favorecem a sua dissolução. Agregados de quitosana também poderiam ser encontrados fora das vesículas, ou seja, nas próprias soluções de formação e dispersão das vesículas.

A grande vantagem da vesícula gigante é o seu tamanho micrométrico, o qual permite a observação direta no microscópio óptico. Nenhum procedimento especial de preparação é necessário para essa observação, sendo que as estruturas podem ser vistas diretamente na célula de eletroformação, dispersas na solução de origem (sacarose) ou em solução de características semelhantes (glicose).

A observação microscópica permite, portanto, a análise direta da estrutura das vesículas, bem como a verificação de características da membrana. No caso da avaliação da presença de moléculas estranhas na estrutura das vesículas ou mesmo no meio de dispersão, essa localização pode ser facilmente procedida se as moléculas em questão apresentarem marcadores de fluorescência. Assim, através da Microscopia Óptica de Fluorescência, essas moléculas podem ser especificamente observadas no sistema.

Com a intenção de localizar a quitosana no sistema de vesículas gigantes formadas pela modificação da Eletroformação, foi utilizada quitosana fluorescente na emulsão precursora. Após a formação das vesículas, as mesmas foram normalmente isoladas na célula de observação e analisadas no microscópio óptico, primeiramente com luz direta, em contraste de fase, e logo após com fonte luminosa para a excitação da fluorescência (Figura 3.26).

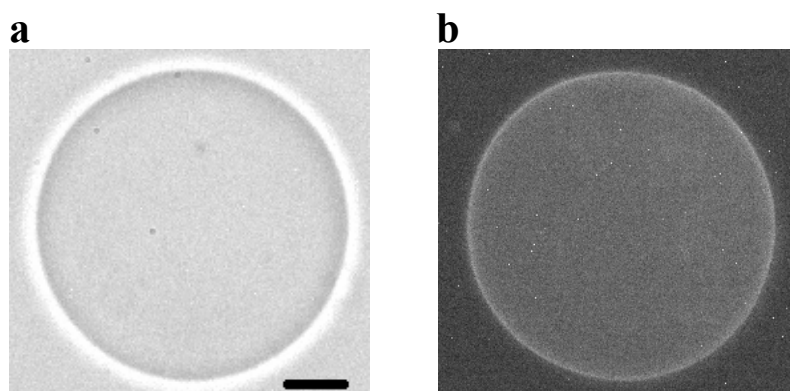


Figura 3.26. Imagens de Microscopia Óptica de Contraste de Fase (a) e de Fluorescência (b) para um quitossoma gigante contendo quitosana fluorescente. A barra expande 10 micrômetros.

Como evidenciado na Figura 3.26, a mesma vesícula preparada com adição de quitosana e observada sob luz direta apresentou-se totalmente fluorescente quando observada no modo de fluorescência. Esse resultado mostra que a quitosana encontra-se incorporada nas vesículas gigantes, já que a mesma constitui a espécie fluorescente do sistema. Sendo assim, quitossomas gigantes foram efetivamente obtidos pela modificação da Eletroformação.

Dentro dos limites de observação da Microscopia Óptica, boa parte das vesículas obtidas não apresentaram poros ou defeitos na membrana, como é o caso da vesícula apresentada na Figura 3.26. Da mesma forma como no processo de eletroformação convencional, uma porção de estruturas mal formadas foi produzida, porém, apenas as vesículas sem defeitos aparentes foram analisadas, conforme deve ser procedido nos estudos de lipossomas gigantes.

A distribuição da fluorescência nas vesículas foi homogênea na maioria das estruturas, como mostrado na Figura 3.26b. Nenhum foco de fluorescência livre foi encontrado nas soluções de glicose contendo as vesículas. Isso demonstra que a solução realmente não representa um meio favorável à dissolução do polímero, já que a mesma possui um pH de 5,8.

Em algumas preparações, uma porção das vesículas apresentou a mesma fluorescência bem distribuída e mais alguns pequenos pontos de fluorescência muito intensa na membrana. O fato sugere que nesta situação houve a formação de alguns agregados poliméricos que se apresentaram interagindo com a membrana das estruturas. Porém, como essa situação não foi reprodutível em todas as preparações, independente das concentrações poliméricas utilizadas, pode-se considerar que a formação de agregados é aleatória dentro das condições de preparação procedidas. A formação de agregados é, portanto, uma imperfeição no processo de eletroformação modificado.

Sendo assim, seguindo-se então a recomendação de análise de vesículas bem formadas, as imagens individuais de cada vesícula obtidas em contraste de fase e fluorescência, foram comparadas conforme apresentado na Figura 3.27. A Figura 3.27c mostra uma co-localização de imagens, ou seja, a vesícula em contraste de fase pode ser sobreposta com a vesícula em fluorescência. A análise, ao longo da linha equatorial (Figura 3.27c), do perfil de fluorescência na imagem fluorescente (gráfico superior) e do perfil de distribuição da intensidade de cinza na imagem de contraste de fase (gráfico inferior), fornece picos de alta intensidade exatamente na mesma região: nos pontos correspondentes à membrana da vesícula. Essa co-localização da intensidade máxima de fluorescência com a membrana mostra que a localização da quitosana é predominantemente junto à membrana nos quitossomas gigantes. Sendo assim, não foi encontrado polímero livre ou encapsulado no interior das vesículas.

O perfil de intensidade de fluorescência apresentado na Figura 3.27 (gráfico superior) é simétrico em relação ao centro da vesícula. À esquerda do gráfico observa-se a

fluorescência do fundo, que apresenta ruídos relacionados com defeitos de pixels da imagem coletada. Um pico de fluorescência aparece na superfície da vesícula. Em seguida, sobre a região interna, a intensidade decresce novamente até um valor mínimo, porém maior do que a intensidade de fundo.

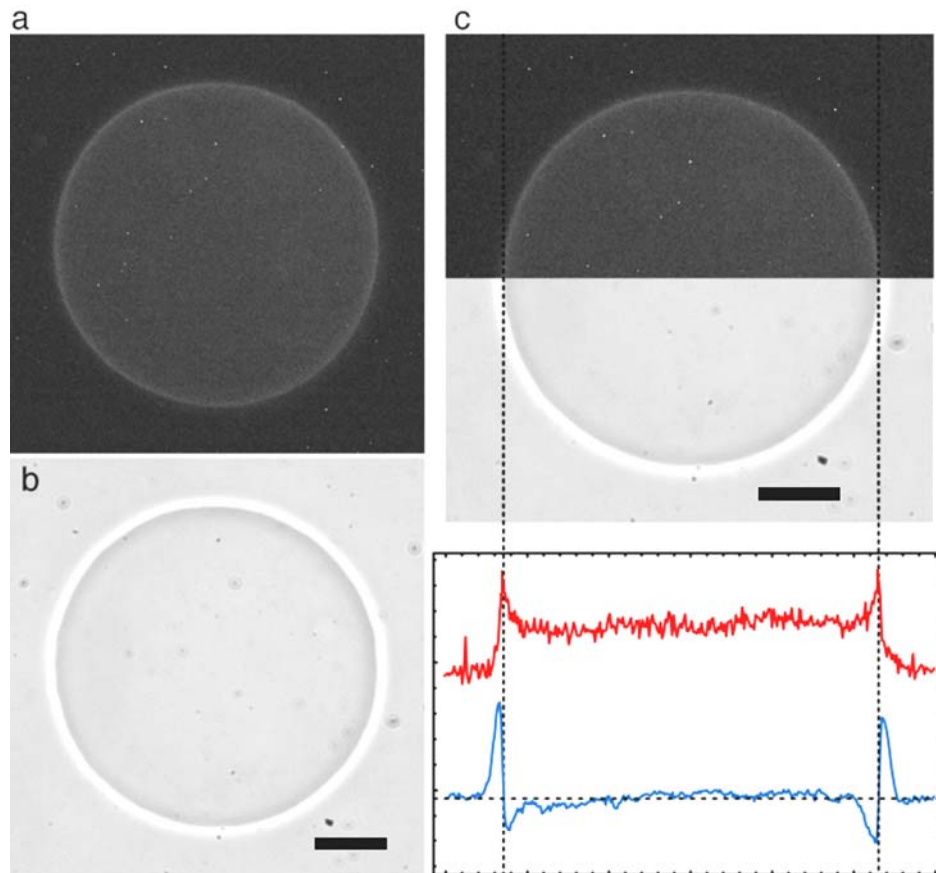


Figura 3.27. Imagem de Microscopia Óptica de Fluorescência (a) e de Microscopia Óptica de Contraste de Fase (b) de um quitossoma gigante fluorescente em solução de glicose (0,099 M). A sobreposição das imagens (c) mostra a co-localização da quitosana fluorescente com a membrana da estrutura pela comparação do perfil de intensidade de fluorescência (gráfico superior) com o perfil da variação de intensidade de cinza (gráfico inferior) de uma linha equatorial sobre ambas as imagens. Nos gráficos, em  $y$  é medida a intensidade de cinza e em  $x$  o número de pixels. A barra expande 10 micrômetros.

De forma comparativa, são apresentadas na Figura 3.28 imagens de fluorescência de vesículas gigantes sem quitosana. Na Figura 3.28a é apresentada uma vesícula formada

com a adição de NBDPC, o fosfolípido fluorescente que necessariamente está localizado somente na membrana da estrutura. Pode-se observar que o perfil de distribuição de fluorescência sobre o equador da vesícula é bastante semelhante ao apresentado pelo quitossoma gigante fluorescente (Figura 3.27).

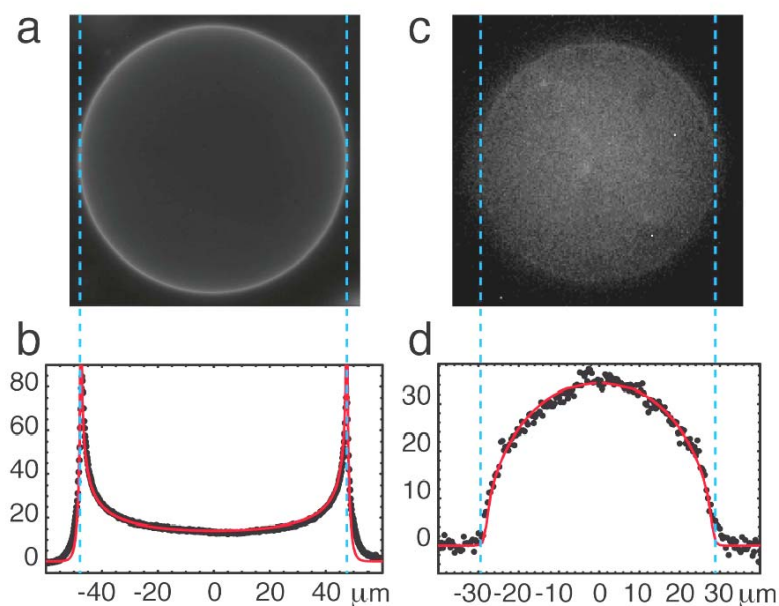


Figura 3.28. Imagens de Microscopia Óptica de Fluorescência de uma vesícula gigante contendo 1% de NBDPC na membrana (a) e de uma vesícula gigante contendo fluoresceína encapsulada no volume do núcleo aquoso (c) e o correspondente perfil de distribuição da intensidade de fluorescência sobre uma linha equatorial de cada imagem (b e d). Os pontos nos gráficos representam os resultados experimentais e as linhas cheias os cálculos teóricos obtidos pela convolução da função de propagação pontual do microscópio e a intensidade de fluorescência emitida unicamente pela membrana (b) ou unicamente pelo volume (d) de cada vesícula.

A Figura 3.28c apresenta uma vesícula gigante onde uma substância fluorescente (fluoresceína) foi exclusivamente encapsulada no núcleo aquoso da estrutura. Neste caso, o perfil de distribuição de intensidade de fluorescência mostra uma curva estendida sobre toda região interna da estrutura, com uma intensidade crescente em direção ao centro, onde o volume da substância fluorescente é maior considerando a maior área na diagonal da estrutura.

Essas distribuições de fluorescência também foram analisadas a partir do cálculo teórico da intensidade pela convolução da função de propagação pontual (*FPP*) do microscópio e a fluorescência distribuída sobre a superfície de uma esfera de raio equivalente ao da vesícula da Figura 3.28a. O resultado do cálculo mostrou um perfil de distribuição igual ao obtido na medida experimental (Figura 3.28b). Da mesma forma, foi calculado o perfil considerando uma fluorescência distribuída no volume da esfera de raio igual ao da vesícula da Figura 3.28c. Mais uma vez o resultado do perfil teórico pôde ser comparado ao resultado experimental (Figura 3.28d). Estes resultados mostram a alta acuracidade na avaliação quantitativa da intensidade de fluorescência procedida nestes estudos.

Comparando-se o perfil de fluorescência da vesícula de NBDPC (Figura 3.28b) com o perfil do quitossoma (Figura 3.27c), pode-se afirmar que há uma equivalência nos resultados e que, portanto, a quitosana, assim como o NBDPC, encontra-se somente na membrana da vesícula.

Uma análise quantitativa das intensidades de fluorescência, relacionadas com as concentrações de quitosana utilizada, também foi procedida para a investigação da localização da quitosana nas vesículas gigantes. A intensidade total de fluorescência  $F$  emitida por uma vesícula de área  $S$  foi calculada para diversas vesículas de variados diâmetros, em função de três diferentes concentrações de quitosana adicionada na emulsão precursora. A Figura 3.29 apresenta a dependência da fluorescência em relação à área dos quitossomas gigantes. As barras de erro consideram as variações na obtenção da intensidade de fundo e a precisão na integração da intensidade de fluorescência total.

A relação entre a intensidade de fluorescência  $F$  e a área superficial  $S$  para cada concentração de quitosana fluorescente, segue uma tendência aproximadamente linear, crescente e característica de cada concentração. A quantidade de polímero por unidade de superfície é proporcional à intensidade de fluorescência. A relação linear entre  $F$  e  $S$  confirma, portanto, que a quitosana está localizada na membrana das vesículas.

A extrapolação de cada reta a zero forneceu a declividade individual  $\beta$  para cada concentração. A Figura 3.30 mostra a declividade  $\beta = F/S$  resultante das extrapolações em função das diferentes concentrações relativas de quitosana. O parâmetro  $\beta$  é proporcional à concentração. Esse resultado mostra que a quantidade de polímero na membrana da vesícula pode ser controlada pelas concentrações adicionadas na emulsão precursora, depositada sobre a lâmina da célula de eletroformação. Perceba-se que cada um dos pontos apresentados na

Figura 3.30 representa um valor absoluto que foi obtido a partir da extrapolação de mais de oito pontos individuais, sendo que a linearidade resultante é reprodutível.

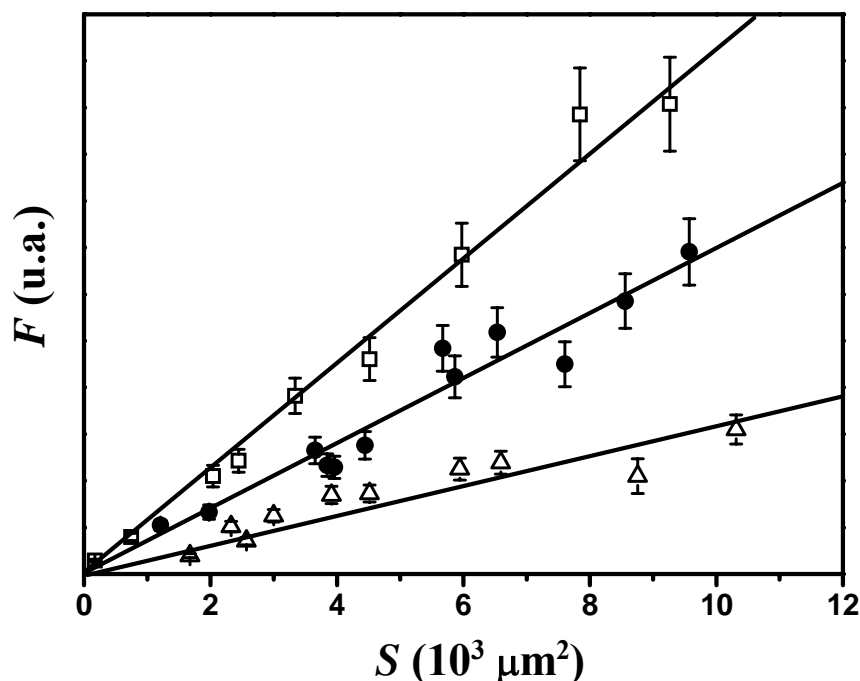


Figura 3.29. Intensidade de fluorescência em função da área de superfície de quitossomas gigantes para concentrações relativas de 3 ( $\Delta$ ), 6 ( $\bullet$ ) e 12 % ( $\square$ ) de quitosana fluorescente adicionada na produção das estruturas.

Salientado que  $S$  representa a área de superfície da vesícula e não o volume, temos fluorescência por unidade de superfície. No caso de haver contribuições de fluorescência provenientes do núcleo, a relação entre  $F$  e  $S$  não seria linear. Vesículas maiores, de volume superior, conteriam uma quantidade de quitosana maior, a qual forneceria um crescimento de  $F$  mais significativo em relação à  $S$  do que na situação observada neste caso. Conseqüentemente, no caso de polímero no núcleo aquoso das vesículas, teríamos uma curva ascendente para a relação entre  $F$  e  $S$ .

Deve-se levar em conta que a condição de pH do meio (pH 5,8), tanto na solução de dispersão como na solução do núcleo das vesículas, não favorece uma condição de dissolução para a quitosana. Assim, no caso da presença de quitosana não associada à



membrana, teríamos agregados poliméricos dispersos no núcleo. Esses agregados, por sua vez, emitiriam uma alta intensidade de fluorescência. A mesma seria detectada, no perfil de distribuição da fluorescência, como um pico destacado acima da intensidade mínima da região interna da vesícula. Ou seja, a intensidade mínima da região interna da vesícula não seria aproximadamente linear, mas sim, altamente oscilante.

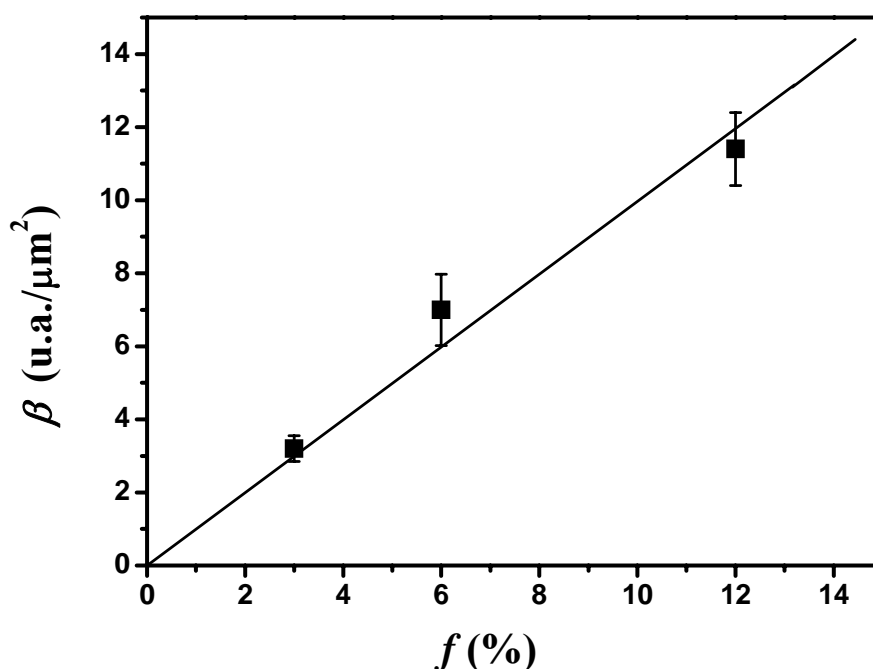


Figure 3.30. Fluorescência por unidade de superfície ( $\beta = F/S$ ) obtida a partir da extrapolação das contribuições de quitossomas gigantes de variados diâmetros em função da concentração relativa de quitosana ( $f$ ) adicionada na produção das estruturas.

Uma varredura da análise do perfil de fluorescência foi feita sobre linhas horizontais em diversas regiões de um quitossoma gigante (Figura 3.31). Pode ser percebido que a intensidade mínima da região interna não apresenta grandes variações de alto a baixo da vesícula, mostrando que não existe nenhum agregado de quitosana no seu núcleo ou sobre a membrana. Esta situação corresponde ao tipo de vesículas analisadas na obtenção dos dados quantitativos.

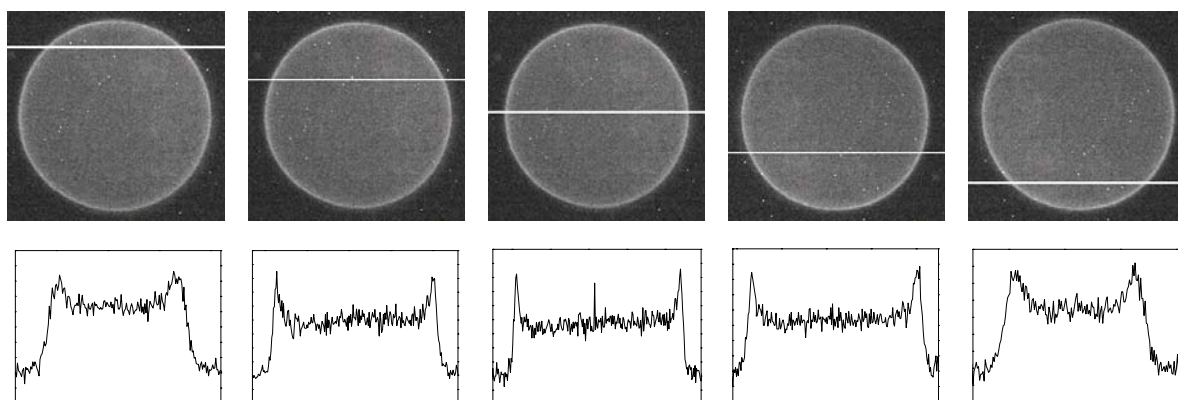


Figura 3.31. Imagem de Microscopia Óptica de Fluorescência de um quitossoma gigante com as análises do perfil de distribuição da intensidade de fluorescência sobre a linha horizontal em cinco diferentes regiões de alto a baixo da vesícula. Nos gráficos, em  $y$  é medida a intensidade de cinza e em  $x$  o número de pixels. A linha expande 50 micrômetros.

Conforme mencionado anteriormente, algumas preparações de quitossomas gigantes apresentaram aleatoriamente agregados poliméricos fluorescentes nas vesículas. Neste caso, a intensidade mínima de fluorescência sobre a região interna da vesícula realmente não é homogênea, sendo que o agregado fornece um pico de alta intensidade na região do agregado (Figura 3.32). Esta situação representa um tipo de vesículas que não foram consideradas nos estudos da presente Tese.

Assim, como conclusão principal, pode-se afirmar que foi determinada tanto pelas evidências qualitativas como pelos dados quantitativos, a localização da quitosana na membrana dos quitossomas gigantes preparados pela modificação da Eletroformação.

A localização da quitosana junto à membrana sugere mais uma vez as interações eletrostáticas entre os grupos amino ionizados do polímero e as extremidades polares dos fosfolípidios. No processo de Eletroformação modificado é primeiramente obtido um filme a partir da emulsão precursora, onde a quitosana está contida em micelas reversas. Considerando que a quitosana encontra-se no núcleo aquoso das micelas reversas, a interação eletrostática é mais favorecida, já que o núcleo aquoso é cercado pelas extremidades polares da DOPC, enquanto que as cadeias apolares da DOPC interagem com o solvente orgânico na região externa das micelas. Portanto, a interação eletrostática é mais estimulada na emulsão precursora.

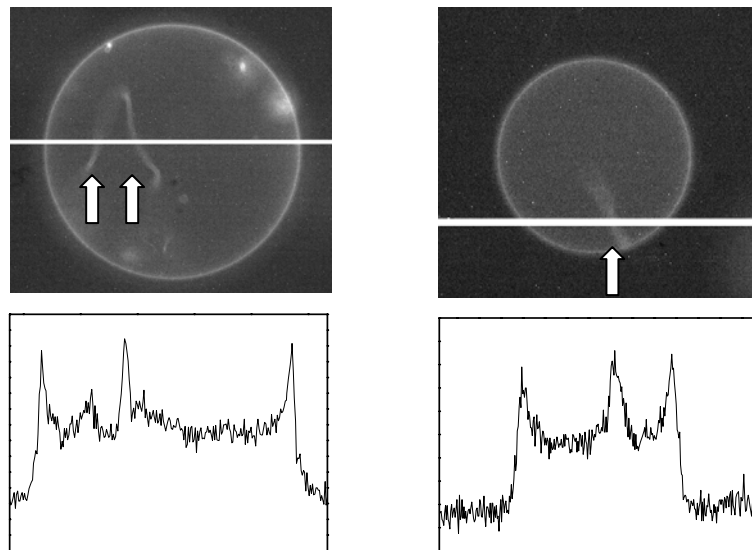


Figura 3.32. Imagens de Microscopia Óptica de Fluorescência de dois quitossomas gigantes com as respectivas análises do perfil de distribuição da intensidade de fluorescência sobre as linhas horizontais. As setas indicam agregados de quitosana fluorescente. Nos gráficos, em  $y$  é medida a intensidade de cinza e em  $x$  o número de pixels. As linhas expandem 100 micrômetros.

Por outro lado, na etapa seguinte, a emulsão é depositada sobre a lâmina condutora de eletroformação e secada. Com a eliminação da água e do solvente orgânico obtém-se um filme basicamente de DOPC e quitosana. Neste filme de elevado contato molecular, outras interações podem ser estimuladas, embora as interações eletrostáticas, previamente estabelecidas, devam predominar.

Após, a solução aquosa de sacarose é introduzida no sistema e a energia elétrica é aplicada. A própria energia dissipada na célula de eletroformação pode estimular interações de outra natureza entre DOPC e quitosana. Interações de apolaridade entre as cadeias apolares dos fosfolípidios e a região hidrofóbica das cadeias do polímero, podem ser favorecidas no processo de Eletroformação.

Portanto, a localização da quitosana na membrana das vesículas gigantes pode significar, além de interações eletrostáticas, também interações apolares. Sendo assim, as cadeias de quitosana podem estar tanto sobre a membrana, revestindo a bicamada

fosfolipídica internamente e externamente por interação eletrostática, quanto no interior na membrana, ou seja, dentro da bicamada sob a influência de interações de caráter apolar.

### **3.2.3. Avaliação da Concentração de Quitosana**

A quitosana representa um polímero de baixa solubilidade, sendo que as concentrações críticas determinadas na presente Tese foram de 0,59 e 0,78 mg/mL respectivamente para a quitosana comercial e a obtida pela hidrólise da quitina.<sup>13</sup>

Essa reduzida solubilidade significa um fator limitante na produção de vesículas onde uma maior concentração do polímero é desejada de forma controlada. Os procedimentos adotados aqui priorizaram o uso da filtração da quitosana através de membranas de 0,45 e 0,22  $\mu\text{m}$ . Essa metodologia tem como objetivo o controle maior sobre as soluções poliméricas onde a formação de agregados e a presença de impurezas é minimizada.

Por outro lado, a filtração, principalmente para as concentrações acima da concentração crítica, pode levar a uma perda de parte do polímero na solução. Considerando também uma alta distribuição de massa molecular, as macromoléculas de elevada massa podem estar sendo excluídas durante a filtração.

Além disso, durante o processo de Eletroformação, o grau de transferência de material do filme depositado sobre a lâmina para a formação das vesículas gigantes, pode não ser o mesmo para as diferentes moléculas. Ou seja, como se trata de um sistema composto de fosfolipídios e polímero, durante a formação das vesículas gigantes pode ocorrer uma alteração nas proporções de concentração do material adicionado no início do processo. Assim, nos quitossomas gigantes a proporção de concentração entre os componentes pode ser diferente da proporção aplicada na célula de eletroformação.

De forma a considerar os pontos discutidos acima, a avaliação da concentração da quitosana foi procedida primeiramente para a solução filtrada, a qual foi utilizada nas soluções aplicadas para os estudos das vesículas gigantes. Através da calibração pela fluorescência (Sessão 2.9.4), a perda de polímero resultante da filtração foi avaliada. Os comprimentos de onda característicos de absorção e emissão da quitosana fluorescente na solução tampão foram respectivamente 470 e 515 nm.

Para as preparações de quitossomas gigantes, a quitosana comercial foi dissolvida a uma concentração de 2,5 mg/mL na solução tampão. A partir dessa solução, foram preparadas as emulsões precursoras de micelas reversas para a formação do filme sobre a lâmina de eletroformação. Essa concentração significa aproximadamente cinco vezes a concentração crítica determinada para a quitosana comercial. Assim, deve-se considerar a possibilidade de formação de agregados e conseqüente perda de quitosana durante a filtração. A Figura 3.33 exemplifica uma calibração de fluorescência característica para a avaliação de diferentes concentrações de quitosana em solução.

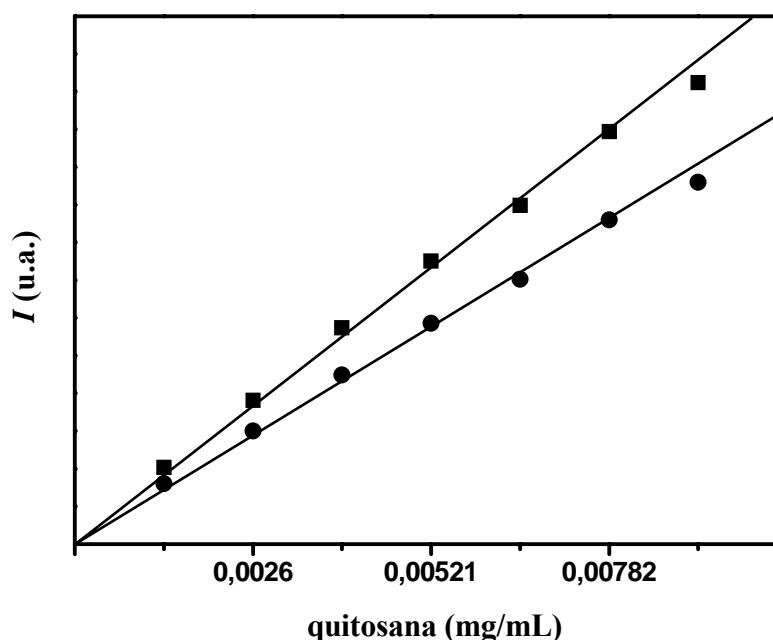


Figura 3.33. Intensidade de fluorescência ( $I$ ) em função da concentração de quitosana fluorescente em solução tampão (filtrada a 0,22  $\mu\text{m}$ ) a 515 (■) e 533 nm (●).

A calibração pela fluorescência a 515 nm da solução de 2,5 mg/mL não filtrada mostrou igualmente um comportamento linear de intensidade em função da concentração, da mesma forma como a solução filtrada. Porém, as intensidades foram significativamente maiores para as mesmas diluições medidas para a solução não filtrada. Assim, pela extrapolação das retas, foi possível determinar que o processo de filtração da solução de 2,5 mg/mL de quitosana fluorescente leva a uma perda de aproximadamente dois terços do polímero na solução. Portanto, a concentração real da solução filtrada é de 0,8 mg/mL.

Com esse resultado também foram calculadas as concentrações reais de quitosana depositadas sobre a lâmina de eletroformação. Da maior para a menor, em percentual de massa em relação ao fosfolípido, temos 3,75%, 1,88% e 0,94%.

Com o conhecimento deste dado, também foi avaliada a concentração da quitosana nos quitossomas gigantes, igualmente pelo método da calibração pela fluorescência. A Figura 3.34 mostra o resultado obtido para as medidas de fluorescência dos lipossomas nanométricos, contendo NBDPC, nos dois comprimentos de onda analisados. Lembrando que o comprimento de onda de 533 nm corresponde à emissão máxima da NBDPC.

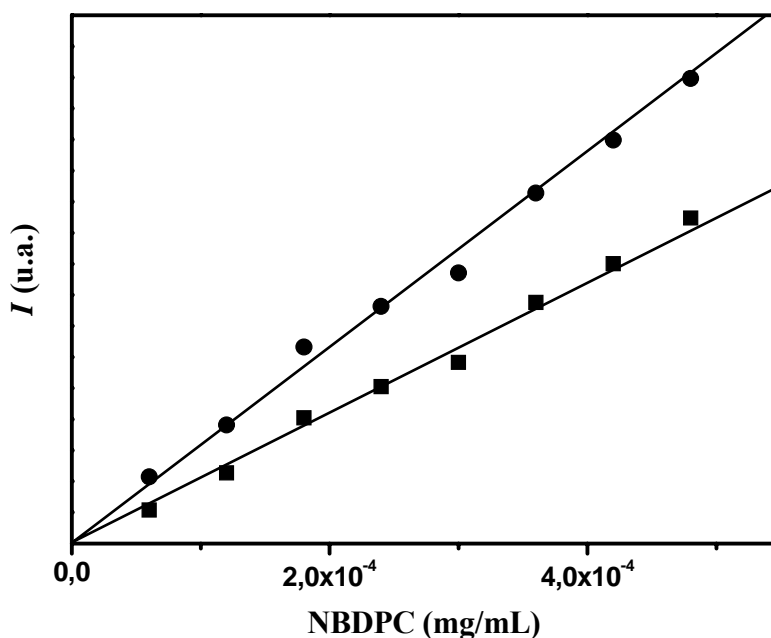


Figura 3.34. Intensidade de fluorescência ( $I$ ) em função da concentração de NBDPC contida em lipossomas nanométricos em suspensão aquosa a 515 (■) e 533 nm (●).

Neste caso a intensidade também varia linearmente com a concentração da espécie fluorescente para os dois comprimentos de onda. As intensidades de fluorescência medidas para quitossomas gigantes, em suspensão na solução de sacarose, contendo quitosana fluorescente (preparados com a maior concentração de quitosana) e 1% de NBDPC foram de  $I^{\lambda_1} = 1,103$  a 515 nm e  $I^{\lambda_2} = 1,199$  a 533 nm.

A partir destas intensidades e das extrapolações das calibrações das Figuras 3.33 e 3.34, foram calculadas as concentrações de transferência efetiva de massa de fosfolipídio e de quitosana do filme formado sobre a lâmina de eletroformação para as vesículas gigantes (Sessão 2.9.4). As concentrações  $_{NBC} = 2,65 \cdot 10^{-5}$  e  $_{QC} = 1,65 \cdot 10^{-4}$  mg foram determinadas e as mesmas representam percentuais de transferência de 31% e 48% respectivamente para fosfolipídios e quitosana, evidenciado uma transferência diferenciada para as duas espécies.

De maneira geral, o resultado mostra que menos da metade do material de origem é transferido para a produção das vesículas gigantes, pelo menos durante o tempo de três horas despendido para o processo. Um tempo mais prolongado pode ser cogitado para uma menor perda de material. Mas o fato mais importante consiste na maior transferência de quitosana em relação ao fosfolipídio. Considerando a concentração mais elevada de quitosana na emulsão precursora como 3,75%, descontada a perda pela filtração, a proporção encontrada para os quitossomas gigantes a partir do resultado acima foi de 5,70% em massa. Isso significa que o processo de Eletroformação modificado possui uma eficácia considerável para um enriquecimento de quitosana na composição das vesículas gigantes.

Com este resultado quantitativo, torna-se possível estimar um outro parâmetro importante dos quitossomas gigantes. Esse parâmetro consiste na quantidade de polímero por área de superfície das vesículas, já que foi determinado que a quitosana está localizada na membrana das estruturas. Empregando-se uma área média ocupada de  $0,725 \text{ nm}^2$  por molécula de fosfolipídio,<sup>35</sup> o cálculo fornece 0,1 mg de quitosana por metro quadrado de fosfolipídios. Este resultado consiste num valor tipicamente encontrado para polímeros absorvidos em superfícies moderadamente atrativas.<sup>36</sup>

Considerando os dois lados da bicamada tem-se, portanto, 0,2 mg de quitosana por metro quadrado de área de superfície nos quitossomas gigantes com a maior concentração de quitosana utilizada.

Lembrando a relação linear de intensidade de fluorescência por unidade de superfície em função da concentração de quitosana, juntamente com os resultados da calibração pela fluorescência, pode-se concluir que vesículas gigantes foram preparadas com a adição de 0,94, 1,88 e 3,75% de quitosana na emulsão precursora, o que resultou em quitossomas gigantes contendo respectivamente 0,03, 0,05 e 0,10 mg de polímero por metro quadrado de fosfolipídios, ou seja, 0,06, 0,10 e 0,20 mg de quitosana por metro quadrado de superfície vesicular.

### 3.2.4. Estabilidade

Vesículas gigantes apresentam graus de estabilidade variados e dependentes de uma série de fatores estruturais, composicionais e ambientais. A pressão osmótica consiste num fator ambiental de grande influência principalmente na estabilidade estrutural das vesículas gigantes. Especialmente na metodologia aplicada nesta Tese, em que na composição final as vesículas apresentam solução de sacarose no núcleo aquoso e solução de glicose no meio externo, a questão da pressão osmótica deve ser avaliada e controlada para a otimização de uma condição favorável de estudo.

No caso particular dos quitossomas gigantes, a presença de polímero na membrana das vesículas representa um fator composicional capaz de proporcionar estabilidades diferenciadas às estruturas. Apesar da modificação do método da Eletroformação proporcionar a formação de quitossomas gigantes com uma concentração maior de quitosana em relação ao fosfolipídio do que a concentração depositada na célula de eletroformação, o resultado obtido não significa que as estruturas formadas apresentem igualmente uma boa estabilidade estrutural e composicional. A quitosana pode, após algum tempo, dissociar-se da membrana das vesículas, especialmente se as interações entre os fosfolipídios e o polímero forem de natureza fraca. Uma perda de quitosana, mesmo que parcial, pode provocar alterações estruturais no sistema dependentes do fator tempo. A permanência da quitosana na membrana das estruturas constitui, portanto, um fator de avaliação de estabilidade composicional e estrutural.

Nos estudos da presente Tese foram avaliados os parâmetros de pressão osmótica para que se pudesse estabelecer uma condição ideal de observação das vesículas gigantes sem a ocorrência de variações estruturais significativas, decorrentes de uma condição osmótica desfavorável.

Normalmente, uma pressão osmótica interna igual ou maior do que a do meio externo leva à desestruturação das vesículas com freqüentes rompimentos da membrana. Por outro lado, uma pressão osmótica externa muito maior também não é adequada, pois proporciona grandes flutuações da membrana e o fenômeno de *pearling*, onde as vesículas se desestruturam formando vesículas bem menores ligadas umas as outras como um colar de pérolas.<sup>37,38</sup>



Sendo a pressão osmótica interna  $0,095 \pm 0,003$ , já que as estruturas foram formadas na solução de sacarose e portanto incorporaram a solução no seu interior, e a pressão osmótica externa  $0,099 \pm 0,003$ , proporcionada pela dispersão das vesículas na solução de glicose, um valor ligeiramente menor para o ambiente interno foi caracterizado como sendo bastante adequado para a preservação estrutural das vesículas gigantes com baixa flutuação da membrana. Estes valores de pressão osmótica mostraram-se eficientes tanto para lipossomas gigantes, independente do método de preparação tradicional ou modificado, como para os quitossomas gigantes. As vesículas permaneceram microscopicamente inalteradas e com reduzidas flutuações da membrana durante o período necessário para a sua observação. Sendo assim, foram estabelecidas as condições de pressão osmótica consideradas ideais e constantemente aplicadas nos estudos das vesículas gigantes, já que as mesmas proporcionaram um ambiente de estabilidade estrutural satisfatório.

A estabilidade composicional referente à permanência da quitosana na membrana das vesículas gigantes foi avaliada durante um período de dez dias para as mesmas amostras das três concentrações de quitosana estudadas. A intensidade de fluorescência foi medida para diversas vesículas de variados diâmetros e a relação de intensidade por área de superfície foi obtida conforme discutido na Sessão 3.2.1.

O comportamento da intensidade de fluorescência também se mostrou linearmente crescente com a área de superfície dos quitossomas e proporcionalmente dependente da concentração de quitosana para todos os dias observados. Assim, foi possível calcular a intensidade de fluorescência por unidade de superfície  $\beta$  de cada concentração para cada dia avaliado, durante o período de dez dias (Figura 3.35).

Os resultados evidenciam que a intensidade de fluorescência dos quitossomas gigantes, preparados com as três diferentes concentrações de quitosana, mantém-se praticamente constante durante dez dias. Consequentemente pode ser concluído que a quitosana permanece na membrana das vesículas durante pelo menos dez dias.

Sendo assim, a estabilidade composicional do sistema vesicular formado pelos quitossomas gigantes pode ser considerada alta. Esse resultado mostra também que as interações moleculares entre fosfolipídios e quitosana são fortes, sugerindo mais uma vez interações eletrostáticas nas regiões polares, sem descartar a possibilidade da presença de quitosana também no interior da bicamada fosfolipídica, na região apolar, sob interações apolares.

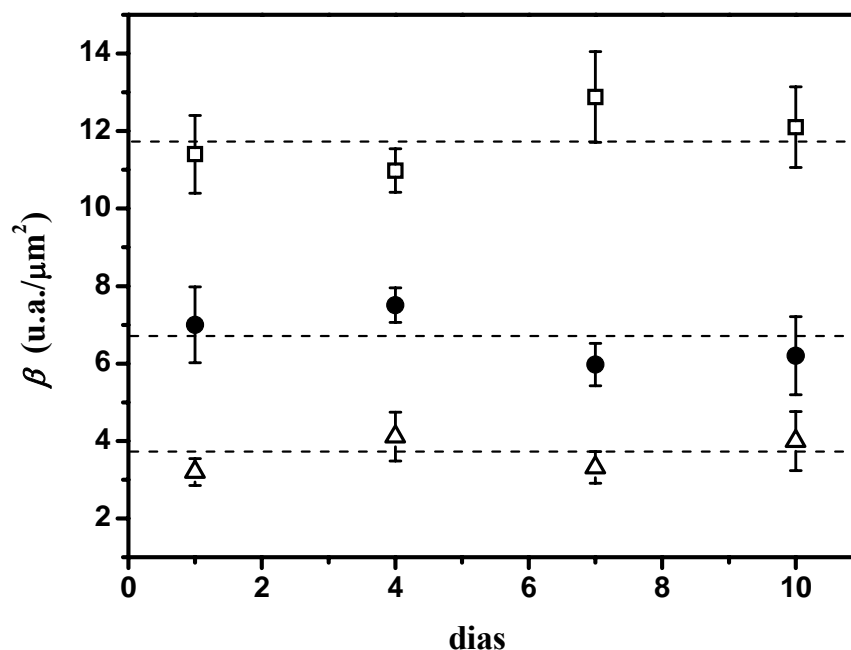


Figura 3.35. Variação temporal da intensidade de fluorescência por unidade de superfície ( $\beta$ ) para quitossomas gigantes preparados com três diferentes concentrações de quitosana fluorescente: 0,94 ( $\Delta$ ), 1,88 ( $\bullet$ ) e 3,75% ( $\square$ ) (m/m). As linhas horizontais pontilhadas mostram os valores médios para cada  $\beta$ .

### 3.3. Aspectos Aplicativos do Sistema Desenvolvido

O sistema composto vesicular formado pela associação da fosfatidilcolina e da quitosana na presente Tese apresenta potenciais aplicativos que vem sendo explorados em trabalhos de outros grupos de pesquisa.

Recentemente, um trabalho de colaboração com o Laboratório de Microesferas e Lipossomas do Instituto Butantan, coordenado pela Professora Maria Helena Bueno da Costa, mostrou pela primeira vez a viabilidade de aplicação dos quitossomas nanométricos compostos como veículos para administração de vacina.<sup>39</sup> Os estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram vantagens dos quitossomas em relação aos lipossomas como retenção prolongada da vacina encapsulada e respostas de memória imunológica e de seletividade muito superiores. Devido às propriedades de biocompatibilidade da quitosana e de versatilidade da

preparação do sistema compósito pela evaporação em fase reversa, mais os resultados positivos encontrados nos estudos *in vitro* e *in vivo*, os quitossomas representam um veículo bastante adequado para a administração intravenosa de vacina.<sup>39</sup>

Em um outro trabalho de colaboração recentemente iniciado com a Faculdade de Farmácia da UFRGS, coordenado pela Professora Sílvia Stanisçuaski Guterres, tem mostrado potenciais de aplicação dos quitossomas como um veículo de administração de fármacos pela via cutânea.<sup>40</sup> Testes de estabilidade de tamanho em períodos prolongados de armazenamento e estudos *in vivo* mostraram vantagens para os quitossomas. Os mesmos ainda encontram-se em fase de investigação, porém os resultados preliminares têm mostrado boas perspectivas.

Trabalhos da literatura também têm citado o sistema compósito desenvolvido nesta Tese, especialmente no que concerne parâmetros estruturais e de interação da quitosana com fosfolipídios.<sup>41-44</sup> Quemeneur e colaboradores, em dois trabalhos sobre lipossomas unilamelares e vesículas gigantes revestidos com quitosana, mencionam a metodologia de preparação desenvolvida na presente Tese, que proporciona a formação de quitossomas contendo polímero em ambos os lados da membrana das vesículas, ou seja, no exterior e no interior da estrutura.<sup>41,42</sup> No trabalho mais recente também é mencionada a vantagem da interação de cargas positivas dos grupos amino ionizados da quitosana com cargas negativas presentes na região polar dos fosfolipídios.<sup>41</sup> Caseli e colaboradores mencionam a importância da interação efetiva entre a quitosana e os fosfolipídios na produção das vesículas compósitas em dois trabalhos com filmes de Langmuir, na investigação das interações entre as duas entidades.<sup>43,44</sup>

Por fim, o sistema compósito formado pelos quitossomas representa um sistema de larga investigação científica e apresenta possibilidades reais de aplicação como veículo de administração de fármacos, podendo ser usado como insumo farmacêutico na produção de medicamentos.

### 3.4. Referências

1. Mertins, O.; Cardoso, M.B.; Pohlmann, A.R.; Silveira, N.P. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **2006**, 6, 2425.
2. Berne, B.J.; Pecora, R. *Dynamic Light Scattering*. New York: Dover, **2000**.
3. Burchard, W. *Cellulose*. **2003**, 10, 213.
4. Burchard, W.; Richtering, W. *Progress in Colloid and Polymer Science*. **1989**, 80, 151.
5. Patty, P.J.; Frisken, B.J. *Biophysical Journal*. **2003**, 85, 996.
6. Lasic, D.D. *Nature*. **1996**, 380, 561.
7. Szleifer, I.; Gerasimov, O.V.; Thompson, D.H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1998**, 95, 1032.
8. Campana Filho, S.P.; Desbrières, J. *Chitin, Chitosan and Derivatives*. In: *Natural Polymers and Agrofibrils Based Composites*. São Carlos: Suprema Gráfica, **2000**, p. 41-71.
9. Kruus, P.; Burk, R.C.; Entezari, M.H.; Otson, R. *Ultrasonics Sonochemistry*. **1997**, 4, 229.
10. Almong, R.; Forward, R.; Samsonoff, C. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1991**, 60, 93.
11. Pereira-Lachataignerais, J.; Pons, R.; Panizza, P.; Courbin, L.; Rouch, J.; López, O. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2006**, 140, 88.
12. Bouwstra, J.A.; Gooris, G.S.; Bras, W.; Talsma, H. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1993**, 64, 83.
13. Mertins, O.; Sebben, M.; Pohlmann A.R.; Silveira, N.P. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2005**, 138, 29.
14. Nieh, M.P.; Raghunathan, V.A.; Glinka, C.J.; Harroun, T.A.; Pabst, G.; Katsaras, J. *Langmuir*. **2004**, 20, 7893.
15. Caboi, F.; Amico, G.S.; Pitzalis, P.; Monduzzi, M.; Nylander, T.; Larsson, K. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2001**, 109, 47.
16. Radlinska, E.Z.; Gulik-Krzywicki, T.; Lafuma, F.; Langevin, D.; Urbach, W.; Williams, C.E. *Journal de Physique II France*. **1997**, 7, 1393.
17. Michel, N.; Fabiano, A.S.; Polidori, A.; Jack, R.; Pucci, B. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2006**, 139, 11.
18. Jutila, A. *Lateral Heterogeneity in Model Membranes – Inducements and Effects*. Academic Dissertation. Finland: University of Helsinki, **2001**.
19. Bagatolli, L.A.; Gratton, E. *Biophysical Journal*. **1999**, 77, 2090.
20. Ichimori, H.; Hata, T.; Matsuki, H.; Kaneshina, S. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1999**, 100, 151.
21. Semmler, K.; Meyer, H.W.; Quinn, P.J. *Chemistry and Physics of Lipids*. **1999**, 99, 155.
22. Buldt, G.; Schlesinger, R.; Pebay-Peyroula, E.; Sass, H.J. *Structure and Dynamics of Biological Membranes*. In: *Structure and Dynamics of Biomolecules: Neutron and Synchrotron Radiation for Condensed Matter Studies*. Oxford: Oxford University Press, **2000**, p. 251-259.
23. Delattre, J.; Couvreur, P.; Puisieux, F.; Philippot, J.R.; Shuber, F. *Les Liposomes*. Paris: INSERM, **1993**.
24. Zetasizer Nano Series. *User Manual*. England: Malvern Instruments, **2004**.
25. Montenez, J.P.; Bambeke, F.V.; Piret, J.; Schank, A.; Bresseur, R.; Tulkens, P.M.; Mingeot-Leclercq, M.P. *European Journal of Pharmacology*. **1996**, 314, 215.
26. Qiu, X.; Pidgeon, C. *Biochemistry*. **1994**, 33, 960.
27. Burnell, E.E.; Cullins, P.R.; Kruijff, B. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1980**, 603, 63.
28. Pidgeon, C; Hunt, C.A. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1981**, 70, 173.
29. Toraya, S.; Nagao, T.; Norisada, K.; Tuzi, S.; Saitô, H.; Izumi, S.; Naito, A. *Biophysical Journal*. **2005**, 89, 3214.
30. Timoszyk, A.; Gdaniec, Z.; Latanowicz, L. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*. **2004**, 25, 142.

31. Fa, N.; Ronkart, S.; Schanck, A.; Deleu, M.; Gaigneaux, A.; Goormaghtigh, E.; Mingeot-Leclercq, M.P. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2006**, 144, 108.
32. Nayar, R.; Hope, M.J.; Cullins, P.R. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1989**, 986, 200.
33. Schullery, S.E.; Schmidt, C.F.; Felgner, P.; Tillack, T.W.; Thompson, T.E. *Biochemistry*. **1980**, 19, 3919.
34. Angelova, M.I.; Dimitrov, D.S. *Faraday Discussions of the Chemical Society*. **1986**, 81, 303 and 345.
35. Petrache, H.I.; Tristram-Nagle, S.; Gawrisch, K.; Harries, D.; Parsegian, V.A.; Nagle, J.F. *Biophysical Journal*. **2004**, 86, 1574.
36. Fleer, G.; Stuart, M.C.; Scheutjens, J.; Cosgrove, T.; Vincent, B. *Polymers at Interfaces*. New York: Springer, **1993**.
37. Billot, V. *Deux Approches de l'Interaction Entre Membranes et Supra-Molécules: Effets de Polymères et de Cyclodextrines*. PhD Thesis. Strasbourg: Université Louis Pasteur, **2005**.
38. Fa, N. *Micro-rhéologie de vésicules géantes*. PhD Thesis. Strasbourg: Université Louis Pasteur, **2003**.
39. Maron, L.B.; Covas, C.P.; Silveira, N.P.; Pohlmann, A.; Mertins, O.; Tatsuo, L.N.; Sant'anna, O.A.B.; Moro, A.M.; Takata, C.S.; Araujo, P.S.; Costa, M.H.B. *Journal of Liposome Research*. **2007**, 17, 155.
40. Gonçalves, M.C.F. *Desenvolvimento, Caracterização Físico-Química e Avaliação Biológica de Quitossomas para a Liberação Cutânea de Melatonina*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS, **2008**.
41. Quemeneur, F.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. *Biomacromolecules*. **2008**, 9, 396.
42. Quemeneur, F.; Rammal, A.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. *Biomacromolecules*. **2007**, 8, 2512.
43. Caseli, L.; Pavinatto, F.J.; Nobre, T.M.; Zaniquelli, M.E.D.; Viitala, T.; Oliveira, O.N. *Langmuir*. **2008**, 24, 4150.
44. Pavinatto, F.J.; Caseli, L.; Pavinatto, A.; Santos, D.S.; Nobre, T.M.; Zaniquelli, M.E.D.; Silva, H.S.; Miranda, P.B.; Oliveira, O.N. *Langmuir*. **2007**, 23, 7666.

## Capítulo 4. Conclusões

### 4. Conclusões

A avaliação estrutural comparativa entre lipossomas e quitossomas nanométricos mostrou uma série de diferenciações geradas no sistema composto pela presença da quitosana. A macromolécula modificou a morfologia, a estabilidade e a organização molecular no sistema vesicular. Os quitossomas nanométricos apresentaram tamanhos médios maiores, com conseqüentes menores coeficientes de difusão, do que os lipossomas e essa característica foi igualmente dependente da concentração polimérica. A alta polidispersão de partículas pôde ser significativamente reduzida através da filtração das nanovesículas por membrana porosa de 0,45  $\mu\text{m}$ .

A morfologia das vesículas mostrou-se variada. Apesar da predominância de estruturas esféricas, vesículas de formatos não esféricos foram identificadas. A padronização morfológica em estruturas esféricas também foi efetivada pela filtração das estruturas a 0,45  $\mu\text{m}$ . Através da filtração ocorreu uma re-estruturação morfológica para um sistema com predominância de estruturas esféricas de energia livre mais favorecida. A filtração não preveniu os efeitos da quitosana sobre o sistema, ou seja, o aumento dimensional das vesículas em função da concentração polimérica permaneceu mesmo após a filtração.

A água utilizada como líquido de suspensão das partículas foi considerada adequada para a manutenção estrutural do sistema no sentido de que as interações entre partículas e água são fracas. Desta forma a água atua efetivamente como um líquido de suspensão e não como um solvente e assim a integridade estrutural das vesículas foi preservada durante os procedimentos investigativos em suspensão aquosa. Essa interação entre partículas e água também foi menor com a presença da quitosana, bem como com o aumento da sua concentração.

A ultrasonicação, empregada como um pós-tratamento alternativo à filtração, apresentou resultados globais semelhantes proporcionando uma considerável redução de tamanhos e polidispersão das vesículas. Porém, neste caso foi possível reduzir os tamanhos médios dos quitossomas a valores inferiores aos dos lipossomas.

Os aspectos estruturais em nível supramolecular também mostraram propriedades interessantes para quitossomas. A presença da quitosana proporcionou uma maior organização molecular da bicamada fosfolipídica das vesículas nanométricas, o que resultou de forma direta na redução da distância de repetição da bicamada. A formação de estruturas multilamelares foi constatada, apesar de o método de preparação levar à formação predominante de estruturas unilamelares, e a produção de estruturas compósitas apresentando uma maior rigidez na sua membrana foi sugerida. Esses efeitos puderam ser bem relacionados com o gradativo aumento da concentração de quitosana.

A filtração a 0,45  $\mu\text{m}$  também atuou em nível supramolecular, reduzindo as distâncias de repetição e o número de bicamadas nas estruturas multilamelares. O pós-tratamento mostrou-se vantajoso para favorecer a homogeneização estrutural sem, no entanto, eliminar os efeitos proporcionados pela presença do polissacarídeo.

Através da relação de dados obtidos por Espalhamento de Luz e Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo foram determinados novos parâmetros estruturais: o diâmetro e o volume do núcleo aquoso encapsulado nas vesículas. Desta forma foi demonstrado que as nanovesículas possuem uma capacidade de núcleo aquoso adequada para a incorporação de moléculas hidrofílicas.

As inter-relações procedidas a partir dos dados de Espalhamento de Luz Dinâmico, Espalhamento de Luz Estático e Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo forneceram interpretações importantes e mostraram que as técnicas atuam de forma complementar na avaliação estrutural dos lipossomas e quitossomas.

Em nível microscópico também foram evidenciadas diferenças entre lipossomas e quitossomas. A presença da quitosana favoreceu a formação de agregados micrométricos no sistema compósito. A Microscopia Óptica também mostrou diferenças entre sistemas filtrados e não filtrados, comprovando de forma micrométrica a maior homogeneização do sistema através da filtração. A Microscopia Eletrônica de Transmissão evidenciou o mesmo efeito resultante da ultrasonicação, com a confirmação da redução de tamanhos e polidispersão para as estruturas sonicadas. Igualmente, a identificação pela Microscopia Eletrônica de Transmissão de estruturas multilamelares, multivesiculares e não esféricas confirmou os resultados estruturais a partir da interpretação dos dados de Espalhamento de Luz e Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo. A necessidade de aplicação de um pós-tratamento para a obtenção de uma maior homogeneização estrutural ficou evidenciada também pelas análises de microscopia.

A avaliação da transição de fase da bicamada fosfolipídica das nanovesículas mostrou um comportamento absolutamente peculiar para quitossomas. As estruturas compósitas foram menos influenciadas pela energia térmica em nível de flutuações da bicamada, o que remete novamente a uma vesícula de maior rigidez estrutural.

A transição de fase da bicamada fosfolipídica foi retardada com a presença da quitosana e a distância de repetição das bicamadas sofreu alteração bem mais gradativa do que no sistema isento de quitosana com o aumento da temperatura. Portanto, pode-se concluir que os quitossomas também apresentam uma estabilidade térmica maior, onde a presença da quitosana atua de forma a dissipar os efeitos da energia térmica.

As medidas de Potencial Zeta mostraram um aumento progressivo concomitante com o aumento da concentração de quitosana. Assim, a carga externa do sistema compósito foi alterada para valores que podem favorecer processos de agregação em suspensão aquosa. Por outro lado, a mesma alteração de carga mostrou a presença de quitosana na superfície externa das nanovesículas.

Os tempos de recuperação de fluorescência obtidos pela Recuperação de Fluorescência Após Foto-Branqueamento para os quitossomas contendo quitosana fluorescente foram característicos e distintos aos tempos da quitosana em solução. Desta forma pôde ser concluído que todo polímero adicionado no sistema encontra-se incorporado nas vesículas. O polímero manteve-se associado mesmo após a ultrasonicação, o que sugere fortes interações entre a macromolécula e a membrana das estruturas.

A mobilidade espacial do grupo fosfato presente na extremidade polar dos fosfolipídios foi reduzida com a presença da quitosana. Através da Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo foi demonstrada uma interação molecular efetiva entre a quitosana e a região polar da bicamada fosfolipídica. Mesmo sob significativo aquecimento o sistema compósito não sofreu modificações consideráveis de ressonância, o que confirma a relativa estabilidade termodinâmica determinada por Espalhamento de Luz e Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo.

A modificação da Eletroformação clássica para a produção de vesículas gigantes foi realizada a partir do uso de uma emulsão precursora formada no método da evaporação em fase reversa. A metodologia permitiu pela primeira vez a produção de quitossomas gigantes esféricos contendo quitosana incorporada na membrana formada pela bicamada fosfolipídica.



Por meio da Microscopia Óptica de Fluorescência a quitosana fluorescente foi localizada na membrana e pela relação de intensidade de fluorescência e área superficial de vesículas a distribuição do polímero sobre a membrana da vesícula foi quantificada. A quantidade de polímero sobre a membrana das vesículas gigantes pôde ser relacionada com a concentração polimérica aplicada no método da Eletroformação modificada nesta Tese.

Pela metodologia de Calibração da Fluorescência foi possível concluir que o processo de Eletroformação proposto também enriquece as vesículas com quitosana, sendo que a partir da emulsão precursora até a formação das vesículas o percentual de transferência da quitosana foi relativamente maior do que de fosfolipídios. A quantidade de quitosana por área de superfície foi determinada como 0,2 mg de quitosana por metro quadrado de área de superfície, considerando os dois lados da membrana fosfolipídica.

Os parâmetros de pressão osmótica foram otimizados para condições ideais e assim as vesículas apresentaram estabilidade estrutural adequada para os estudos realizados. As quantidades de quitosana incorporadas na membrana das vesículas gigantes permaneceram inalteradas durante dez dias, mostrando estabilidade composicional.

A partir das conclusões obtidas pela análise dos dados produzidos pela variada gama de técnicas utilizadas nos estudos físico-químicos e estruturais dos lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana e as interpretações a partir das inter-relações dos mesmos dados, considerando ainda a forma de produção das estruturas, é possível propor que o sistema compósito formado representa uma vesícula cuja membrana fosfolipídica apresenta um revestimento de quitosana na superfície externa e na superfície interna. A interação entre o fosfolipídio e a quitosana mostrou-se como uma interação forte e conseqüentemente a mesma deve ser de natureza eletrostática entre os grupos amino positivamente ionizados da quitosana e as cargas negativas presentes na extremidade polar dos fosfolipídios.

Considerando os resultados já obtidos e os estudos em andamento, é possível concluir também que o sistema compósito quitossoma apresenta potencial de aplicação como veículo para administração de fármacos e vacina.

## **Anexos**

### **Artigos Publicados**



## Production of soybean phosphatidylcholine–chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study

Omar Mertins, Marcelo Sebben, Adriana Raffin Pohlmann,  
Nádyá Pesce da Silveira\*

*Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15003, CEP 91501-970 Porto Alegre RS, Brazil*

Received 1 March 2005; received in revised form 5 July 2005; accepted 28 July 2005

Available online 24 August 2005

### Abstract

In the present work, we describe the preparation of composite nanovesicles containing soybean phosphatidylcholine and polysaccharide chitosan by the reverse phase evaporation method. Nanovesicles free from chitosan prepared in the same way were studied as reference. The production method involves the preparation of reverse micelles followed by the formation of an organogel, which is dispersed in water to yield the final liposomal structures. Structural changes in each step of the nanovesicles preparation were studied by means of static and dynamic light scattering as well as small angle X-ray scattering. Chitosan was also fully characterized in solution. The hydrodynamic radius of the composite nanovesicles is in the range of 174–286 nm, depending on the chitosan contents. A comparison with nanovesicles free from chitosan indicates the existence of higher contents of multilamellae structures in the composites, as well as improved stability in water.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Soybean phosphatidylcholine; Liposomes; Nanovesicles; Reverse micelles; Chitosan

### 1. Introduction

Phospholipidic vesicles, often called liposomes, are colloidal structures having an internal aqueous pool formed by self-assembly of amphiphilic lipid molecules in solution. According to their size, morphology and physicochemical characteristics, they are able to encapsulate water-soluble compounds in the

inner aqueous phase and to entrap lipophilic materials in the membrane (Polozova et al., 1999 and references therein).

Over the last decades different stable, biodegradable and/or biocompatible nanometric structures have been studied to encapsulate drugs in order to modify and/or modulate their delivery (Allémann et al., 1998; Ceve, 2004; Seki et al., 2004). Although some works have reported well-developed nanometric structures made with polymers presenting better action and efficiency than liposomes (Soppimath et al., 2001), the main purpose in developing a delivery system has always to be

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 33167321;

fax: +55 51 33167304.

E-mail address: [nadya@iq.ufrgs.br](mailto:nadya@iq.ufrgs.br) (N.P. da Silveira).



# Structural Evaluation of Phospholipidic Nanovesicles Containing Small Amounts of Chitosan

Omar Mertins, Mateus Borba Cardoso, Adriana Raffin Pohlmann,  
and Nádyá Pesce da Silveira\*

Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Caixa Postal 15003, CEP 91501-970 Porto Alegre RS, Brazil

In this study we present a full characterization of nanovesicles containing soybean phosphatidylcholine and polysaccharide chitosan. The nanovesicles were prepared by the reverse phase evaporation method, including the preparation of reverse micelles followed by the formation of an organogel, which is dispersed in water to yield the final liposomal particles. Structural changes as a function of the chitosan amount and the filter porosity used in the nanovesicles preparation were studied employing Static and Dynamic Light Scattering as well as Small Angle X-ray Scattering. The hydrodynamic radius of the nanovesicles ranged between 106 and 287 nm, depending on the chitosan contents and the filter porosity. A comparison with nanovesicles free of chitosan indicates the existence of higher contents of multilamellar structures that depends on the chitosan concentration in the vesicles containing chitosan. Typical spherical vesicles having nanometric diameters with polydispersity mostly desired in the biomedical area could only be achieved by filtration through a 0.45  $\mu\text{m}$  porous filter.

**Keywords:** Liposomes, Nanovesicles, Soybean Phosphatidylcholine, Chitosan, Light Scattering, Small-Angle X-Ray Scattering.

## 1. INTRODUCTION

Nowadays nanovesicles represent promising systems for drug delivery in order to target the drug to the site of action or improve the circulation time of the drug *in vivo*, aiming side effects reduction as well as the optimisation of treatments.<sup>1–4</sup> Liposomes have been known for their huge potential as drug carriers for a variety of compounds like low molecular weight drugs, therapeutic proteins, vaccines and diagnostic agents.<sup>5–14</sup> In the last years, there has been introduced in the market stealth liposomes as efficient spherical nanovesicles.<sup>7, 15, 16</sup> They are formed by a self-closed phospholipidic bilayer carrying a hydrophilic drug in its aqueous core. Externally, they are covered with polyethylene glycol making them stable in the intravenous environment.<sup>7</sup> Chitosan, a natural polymer that receives increasing attention as a new material,<sup>17</sup> may represent an alternative to polyethylene glycol for liposomes covering. Chitosan not only possesses advantageous biocompatibility and biodegradability<sup>17–20</sup> but also contains free charges in low pH water solution allowing interactions with the polar heads of the phospholipidic bilayers in the liposomes.<sup>21</sup>

Regarding the applicability of liposomes containing chitosan, several studies have highlighted the use of chitosan as an absorption-enhancing agent.<sup>22–24</sup> Moreover, because of its bioadhesive properties chitosan has also been worth in novel bioadhesive drug delivery systems for the treatment of wounds and burns as well as for local administration of drugs in treatments of diseases in the eyes, nasal, mucosa, or tumours.<sup>25–28</sup>

In a recent work<sup>29</sup> we have dealt with the physicochemical characterisation of each preparation step of liposomal vesicles production applying the reverse phase evaporation method.<sup>30</sup> A distinct behaviour was found in both intermediate and final vesicular structure when small amounts of chitosan were added.

In this paper, a deeper evaluation of the chitosan influence on the structure of phosphatidylcholine (PC) liposomes is presented analysing the data obtained from Dynamic (DLS) and Static (SLS) Light Scattering and Small-Angle X-Ray Scattering (SAXS) techniques. Three series of samples have been prepared as a function of the filter porosity used for filtration of the nanovesicles from the aqueous suspensions. In each series, the chitosan concentrations applied in the nanostructures preparation varied between 0 mg/ml and 1.00 mg/ml, covering the critical

\* Author to whom correspondence should be addressed.

## LUVs Recovered with Chitosan: A New Preparation for Vaccine Delivery

LILIAM BECHERÁN MARÓN,<sup>1</sup> CARLOS PENICHE COVAS,<sup>2</sup>  
NADYA PESCE DA SILVEIRA,<sup>3</sup> ADRIANA POHLMANN,<sup>3</sup>  
OMAR MERTINS,<sup>3</sup> LEONARDO NAKAMARU TATSUO,<sup>4</sup>  
OSVALDO A. B. SANT'ANNA,<sup>5</sup> ANA MARIA MORO,<sup>6</sup>  
CÉLIA S. TAKATA,<sup>7</sup> PEDRO SOARES DE ARAUJO,<sup>8</sup> AND  
MARIA HELENA BUENO DA COSTA<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Materiales y Reactivos, Universidad de La Habana, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana, Cuba

<sup>3</sup>Instituto de Química-UFRG, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Microesferas e lipossomas, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

<sup>6</sup>Biofármacos em células animais, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

<sup>7</sup>Seção de Vacinas múltiplas-Formulação, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

<sup>8</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

*Chitosan,  $\alpha$ -(1-4)-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan, is a deacetylated form of chitin, an abundant natural polysaccharide present in crustacean shells. Its unique characteristics such as positive charge, biodegradability, biocompatibility, nontoxicity, and rigid linear molecular structure make this macromolecule ideal as drug carrier. The association between chitosan and liposomes was carefully described, where REVs (reverse phase evaporation vesicles) were sandwiched by chitosan. The usage of these particles in vaccine formulation is here proposed for the first time in the literature. The Chitosan-REVs now stabilized by polyvinilic alcohol were the vehicle for Diphtheria toxoid (Dtxd). Round chitosan-sandwiched REVs (REVs-Chi) particles of  $373 \pm 17$  nm containing 65% Dtxd were obtained. After 200 min of incubation in a simulated gastric fluid, 70% of the Dtxd was liberated from REVs-Chi in comparison to 100% of Dtxd liberated from pure REVs. In PBS, the Dtxd liberation from REVs-Chi was about 60%.*

Received 31 May 2007; accepted 6 June 2007.

Thanks are due to FAPESP (2005/04514-2), CAPES, CNPq and Fundação Butantan for financial support. L. Becherán Marón received a fellowship from Santander.

Address correspondence to Maria Helena Bueno da Costa, Laboratório de Microesferas e Lipossomas-Instituto Butantan, Av. Vital Brazil, 1500 (05503-900) Butantan, São Paulo, SP, Brazil; Tel: (5511) 3726 7222, ext. 2265; Fax: (5511) 3726 1505; E-mail: bdacosta@edu.usp.br

