



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Monique Lemos

Ação de aditivos moleculares em dispersões de vesículas e filmes
de Langmuir de moléculas anfifílicas

São José do Rio Preto
2019

Monique Lemos

Ação de aditivos moleculares em dispersões de vesículas e filmes
de Langmuir de moléculas anfifílicas

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biofísica
Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação
Biofísica Molecular do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa

São José do Rio Preto
2019

L557a Lemos, Monique
Ação de aditivos moleculares em dispersões de vesículas e filmes de Langmuir de moléculas anfífilas / Monique Lemos. -- São José do Rio Preto, 2019
135 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Eloi Feitosa

1. Biofísica Molecular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Monique Lemos

Ação de aditivos moleculares em dispersões de vesículas e filmes de Langmuir de moléculas anfifílicas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Eloi da Silva Feitosa
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof.^a Dra. Rosângela Itri
USP- Universidade de São Paulo

Prof.^a Dra. Eneida de Paula
Unicamp – Campinas

Prof.^a Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Jorge Chahine
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
29 de Outubro de 2019

Dedico este Trabalho aos meus irmãos, Matheus, Lucas e Diomar, e ao meu namorado Thiago, pelo amor, carinho e incentivos dedicados, e também aos meus professores, à UNESP e, acima de tudo, à minha paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Eloi Feitosa, meu orientador, agradeço por toda disposição em ensinar, críticas construtivas e por toda a ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

À Prof.^a Dra. Renata Danielle Adati por toda sua paciência e pelo exemplo de dedicação em ensinar, pois mesmo distante se fez tão presente na realização desse trabalho.

A minha família por todo apoio, carinho e atenção. Dedicção sem limites para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao IBILCE/UNESP e ao Programa de Pós Graduação em Biofísica Molecular.

Aos meus amigos por iluminar meus dias e incentivar a continuar no desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001*, à qual agradeço pelo financiamento.

*“ Presentemente eu posso me considerar um sujeito de sorte
Porque apesar de muito moço me sinto são, salvo e forte
E tenho comigo pensado, Deus é brasileiro e anda do meu lado
E assim já não posso sofrer no ano passado ”*
(Belchior,1976)

Resumo

A utilização de carreadores não virais de fármacos, de baixo custo comercial, requer estudo das propriedades físico-químicas e caracterização desses carreadores. Uma opção para carreador não viral são vesículas de lipídios sintéticos ou naturais, como os catiônicos brometo e cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAB e DODAC) e o *zwitterionico* dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) respectivamente. O presente estudo apresenta os efeitos dos sais NaCl e NaBr, e da glicose nas propriedades térmicas e estruturais desses lipídios organizados em monocamadas (filmes de Langmuir) ou em bicamadas (vesículas). Foi também investigada ação do copolímero Plurônico F127, como *helper*, na solubilização da molécula anticancerígena doxorubicina nas vesículas investigadas, em soro fisiológico, glicosado e caseiro como solvente. A ação desses aditivos nas vesículas e monocamadas é investigada por calorimetria diferencial de varredura, espalhamento dinâmico da luz, espalhamento eletroforético da luz, espectrofotômetro-UV e medidas em cuba de Langmuir. Dentre os resultados obtidos destacam-se a formação e caracterização de vesículas em soro e na presença do copolímero F127 e DOX.

Palavras-chave: Vesículas anfifílicas, DODAB, DODAC, DPPC, Plurônico F127, contra íon, glicose.

ABSTRACT

The use of low cost non-viral carriers of pharmaceutical drugs in medicine requires studies on the physico-chemical properties and characterization of such carriers. An option for non-viral carriers are vesicles formed with synthetic or natural amphiphiles, such as the cationic dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride (DODAB and DODAC) and the zwitterionic 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), respectively. The present study introduces the effect of NaCl, NaBr and glucose on the thermal and structural properties of these lipids organized as monolayers (Langmuir films) or bilayers (vesicles). The action of the micelle-forming triblock copolymer Pluronic F127, as a helper was also investigated, on the solubilization of the anticancer molecule doxorubicin on the vesicles in saline, glucoside and saline/glucoside mixtures. The action of these additives for vesicles and monolayers were investigated by differential scanning calorimetry (DSC), dynamic light scattering (DLS), dynamic electrophoretic light scattering (DELS), UV-Vis spectrophotometry, and Langmuir Films techniques. Among the results obtained, it is highlighted the formation and characterization of vesicles and monolayers under physiological conditions of the solvent, and in presence of F127 and DOX.

Keywords: amphiphilic vesicles, DODAB, DODAC DPCC, Pluronic F127, counterion, glucose.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Modelos de carreadores não virais.....	19
Figura 2 - Esquema de possíveis ações dos carreadores na membrana celular.....	19
Figura 3 - (a) Estrutura molecular de F127, onde a representa o número de óxido de etileno e b representa o número de óxido de propileno, sendo $a = 99$ e $b = 65$. (b) Representação esquemática de uma micela de copolímero tribloco.....	21
Figura 4 - Estrutura Molecular Doxorubicina.....	22
Figura 5 - Representação esquemática de um lipídio (a) e de três estruturas formadas por lipídios em solução aquosa: vesícula unilamelar (b), micela (c) e bicamada (d).....	24
Figura 6 - Transições de estados características de bicamadas lipídicas.....	26
Figura 7 - Transições de Fase do DPPC.....	29
Figura 8 - a) Esquema do método de preparo de dispersões mistas de DODAB, DODAC ou DPPC na solução aquosa, salina, glicosada ou F127, b) Esquema do método de preparo de dispersões mistas de DODAB, DODAC ou DPPC com F127 e DOX.....	33
Figura 9 - Componentes essenciais de um equipamento de espalhamento de luz. O detector está posicionado no ângulo de espalhamento de 90°	36
Figura 10 - Imagens de amostras de dispersões aquosas de (a) DODAB/NaBr, (b) DODAC/NaCl, (c) DPPC/NaCl e (d) DPPC/NaBr, nas concentrações de 0,1-400 mM sal, após um dia do preparo. Amostras foram mantidas a 25°C	42
Figura 11 – Efeito da concentração de sal na (a) A_{500} e na (b) T_{500} de dispersões de DODAB, DODAC ou DPPC 1 mM (25°C).....	43
Figura 12 – Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DODAC (1 mM) em água e concentração crescente de NaCl.....	45
Figura 13 - Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DODAB (1 mM) em água e concentração crescente de NaBr.....	48
Figura 14 - Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DPPC (1 mM) em água e concentração crescente de NaCl.....	50

Figura 15 - Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DPPC (1 mM) em água e concentração crescente de NaBr.....	52
Figura 16 - Medidas no D_H das vesículas de DODAC/NaCl (a), DODAB/NaBr (b), DPPC/NaCl (c) e DPPC/NaBr (d). Resultados obtidos a 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°.....	56
Figura 17 - Isotermas π -A de DODAC/NaCl (a), DODAB/NaBr (b), DPPC/NaCl (c) e DPPC/NaBr (d) na ausência e presença do sal na subfase, 25°C.....	58
Figura 18 - Imagens de amostras de dispersões aquosas de (a) DODAC/NaBr e (b) DODAB/NaCl nas concentrações de 0.1- 400 mM de sal (em mM), após um dia do preparo. Amostras foram mantidas a 25 °C.....	62
Figura 19 - Transmitância em 500 nm (T_{500}) de DODAB/NaCl e DODAC/NaBr (1 mM), em função da concentração de sal, a 25 °C.....	63
Figura 20 - Termogramas de DSC, no aquecimento e resfriamento, de DODAC (1 mM) em água e solução de NaBr até 100 mM, e de DODAB como referencia.....	65
Figura 21 - Termogramas de DSC, no aquecimento e resfriamento, de DODAB (1 mM) em solução de NaBr até 100 mM, e de DODAC, usado como referencia.....	67
Figura 22 - Medidas de D_H das vesículas de DODAC/NaBr (a) e DODAB/NaCl (b). Resultados obtidos a 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°.....	70
Figura 23 - Isotermas π -A de DODAC/NaBr (a) e DODAB/NaCl (b), na ausência e presença do sal na subfase aquosa, 25 °C.....	71
Figura 24 - Análise visual de (a) DODAC/GLI, (b) DODAB/GLI e DPPC/GLI (c) em concentrações de 0,1- 400 mM de glicose, após um dia do preparo. As amostras foram mantidas a 25 °C.....	74
Figura 25 - Transmitância (T_{500}) de dispersão de DODAC, DODAB e DPPC, em função da concentração de GLI, 25°C.....	76
Figura 26 - Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DODAC (1 mM), em água e solução de glicose.....	77
Figura 27 - Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DODAB (1 mM), em água e solução de glicose.....	79
Figura 28 - Termogramas de DSC de aquecimento de DPPC (1 mM) em água e em solução de glicose até 400 mM. Aquecimento (a) e resfriamento (b).....	81

Figura 29- Efeitos de GLI no D_H da DODAC e DODAB (a) e DPPC (b) todos a 1 mM, 25 °C.....	83
Figura 30- Efeito de GLI no potencial zeta nas vesículas DODAC e DODAB (a) e DPPC (b), a 25 °C.....	85
Figura 31- Isotérmica π -A de DODAC (a), DODAB (b) e DPPC (c), na ausência e presença de GLI na subfase, 25°C.	86
Figura 32- Análise visual de (a) DODAC/F127 e (b) DODAB/F127 em água, SG, SF e SC, após um dia do preparo. Amostras foram mantidas a 25 °C. Onde D são as amostras na ausência de F127, e D/F na presença de F127.....	90
Figura 33 - Transmitância (500 nm) de DODAC e DODAB (a) e ação de F127 (b) em água, SG, SF e SC, respectivamente, 25°C.....	92
Figura 34- Termogramas de DSC de DODAC (1 mM) em SF, SG e SC, obtidos nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b).....	94
Figura 35- Termogramas da dispersão de DODAC/ F127 em água, SF, SG e SC, por aquecimento (a) e resfriamento (b).....	96
Figure 36- Termogramas de DODAB (1 mM) em água, SF, SG e SC obtidos nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b).	98
Figura 37- Termogramas da dispersão de DODAB/F127 em água, SF, SG e SC por aquecimento (a) e resfriamento (b).	100
Figura 38 - Termogramas da dispersão de DPPC (1 mM) em água, SF,SG e SC, aquecimento (a) e resfriamento (b).	102
Figura 39- Medidas no D_H das vesículas em soluções fisiológicas de DODAB, DODAC e DPPC (a) e na presença de F127 (b). Resultados obtidos a 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°.	104
Figura 40- Monocamadas de DODAB (a), DODAC (b) e DPPC (c) 1 mgmL ⁻¹ em clorofórmio espalhado na subfase água, SF, SG e SC, a 25°C.	106
Figura 41 – Modelo da interação dos anfifílicos com o <i>helper</i> F127.....	107
Figura 42- Imagens de amostras de (a) DODAC/DOX e (b) DODAB/DOX na ausência e na presença de F127, em água, SF, SG e SC, após um dia do preparo. Amostras foram mantidas a 25 °C.	109
Figura 43 - T ₅₀₀ de DODAC (a) e DODAB (b) e ação de F127/DOX em água, SG, SF e SC, respectivamente, a 25°C.	111

Figura 44- Termogramas da dispersão de DODAC/F127/DOX. Por aquecimento (a) e resfriamento (b).113

Figura 45- Termogramas da dispersão de DODAB (1 mM)/ F127 (0,2 mM) em água, SF, SG e SC com DOX (0,5 mM), medidas durante aquecimento (a) e resfriamento (b).115

Figura 46- Medidas no D_H das vesículas de DODAC (a), DODAB (b), F127/DOX. Resultados obtidos a 25 °C, e ângulo de espalhamento de 90°.117

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1- Estruturas e formas de lipídios e agregados, e os respectivos parâmetros de empacotamento.	25
Tabela 2 – Estruturas moleculares dos compostos químicos utilizados neste trabalho.....	32
Tabela 3- Parâmetros térmicos de dispersões de DODAC (1 mM), na ausência e na presença de NaCl, obtidos por análise dos termogramas de DSC no aquecimento e no resfriamento.....	46
Tabela 4 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAB (1 mM), na ausência e na presença de NaBr, obtidos por análise dos termogramas de DSC, no modo aquecimento.	48
Tabela 5 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAB (1 mM), na ausência e na presença de NaBr, obtidos por análise dos termogramas de DSC, no modo resfriamento.	49
Tabela 6 - Parâmetros térmicos de dispersões de DPPC (1 mM) em NaCl obtidos, no aquecimento e resfriamento.....	51
Tabela 7 - Parâmetros térmicos de dispersões de DPPC (1 mM) em NaBr, obtidos no aquecimento e no resfriamento.	53
Tabela 8 - Parâmetros térmicos de DODAC (1 mM) em NaBr, no aquecimento.....	66
Tabela 9 - Parâmetros térmicos de DODAC (1 mM) em NaBr ,no resfriamento.....	66
Tabela 10- Parâmetros térmicos de DODAB (1 mM) em concentração crescente de NaCl, obtidos no aquecimento.....	68
Tabela 11– Parâmetros térmicos de DODAB (1 mM) em concentração crescente de NaCl, obtidos durante resfriamento.....	68
Tabela 12 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAC (1 mM), na ausência e na presença de GLI, obtidos por DSC, nos modos de aquecimento e resfriamento.....	78
Tabela 13 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAB (1 mM) na presença e na ausência de GLI, obtidos no aquecimento.....	79
Tabela 14 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAB (1 mM) na presença e ausência de GLI, obtidos no resfriamento.....	80

Tabela 15- Parâmetros térmicos de dispersões de DPPC 1 mM, na presença e na ausência de GLI, obtidos durante aquecimento e resfriamento.....	81
Tabela 16- Parâmetros Térmicos de DODAC em água, SF, SG e SC, aquecimento e resfriamento.....	94
Tabela 17- Parâmetros térmicos de DODAC/F127 em água, SF, SG e SC, no modo aquecimento.....	96
Tabela 18- Parâmetros térmicos de DODAC/F127 em água, SF, SG e SC, no modo resfriamento.....	97
Tabela 19- Parâmetros térmicos de DODAB em água, SF, SG e SC, aquecimento....	98
Tabela 20- Parâmetros térmicos de DODAB em água, SF, SG e SC, no modo resfriamento.....	99
Tabela 21- Parâmetros térmicos DODAB/F127 em água, SF, SG e SC, aquecimento.....	101
Tabela 22- Parâmetros térmicos DODAB/F127 em água, SF, SG e SC, no modo resfriamento.....	101
Tabela 23- Parâmetros térmicos de DPPC (1 mM) em água, SF,SG e SC, aquecimento e resfriamento.....	103
Tabela 24- Parâmetros térmicos de DODAC/F127/DOX em água, SF, SG e SC, durante o aquecimento.....	113
Tabela 25- Parâmetros térmicos de DODAC/F127/DOX em água, SF, SG e SC, durante o resfriamento.....	114
Tabela 26- Parâmetros térmicos de DODAB/F127/DOX em água, SF, SG e SC, obtidos no modo aquecimento.....	115
Tabela 27- Parâmetros térmicos de DODAB/F127/DOX em água, SF, SG e SC, obtidos no modo resfriamento.....	116

ABREVIATURAS

A₅₀₀ Absorbância em 500 nm

CMC concentração micelar crítica

CMT temperatura micelar crítica

CVC concentração vesicular crítica

DNA ácido desoxirribonucleico

DODAB brometo de dioctadecildimetilamônio

DODAC cloreto de dioctadecildimetilamônio

DOX doxorubicina

DPPC dipalmitoilfosfatidilcolina

EO óxido de etileno

F127 Plurônico F127

k_B constante de Boltzmann

Lam estruturas de lamelas

LF Filme de Langmuir

MDR resistência a múltiplas drogas

NaCl cloreto de sódio

NaBr brometo de sódio

PEO poli(óxido de etileno)

P-gp glicoproteína -P

PO óxido de propileno

PPO poli(óxido de propileno)

SC soro caseiro

SF soro fisiológico

SG soro glicosado

T_m temperatura de transição principal

T'_m temperatura de transição principal reversa

T_p temperatura de pós-transição

T'_p temperatura de pós-transição reversa

T_s temperatura de pré- transição

T'_s temperatura de pré-transição reversa

T₅₀₀ Transmitância em 500 nm

Ves estruturas de vesículas

Vis visível

UV ultravioleta

ΔH variação da entalpia

ΔH_m variação da entalpia da transição principal

ΔH'_m variação da entalpia da transição reversa principal

ΔH_s variação da entalpia da pré- transição

ΔT_{1/2m} largura à meia altura da transição principal

ΔT_{1/2p} largura à meia altura da pós-transição

ΔT_{1/2s} largura à meia altura da pré-transição

ε constante dielétrica

ζ potencial zeta

λ comprimento de onda

μ_e mobilidade eletroforética

η viscosidade

κ comprimento de Debye

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Motivação	18
1.2 Plurônico F127 (F127).....	20
1.3 Doxorrubicina (DOX)	22
1.4 Vesículas anfífilas	23
1.5 Monocamadas anfífilas.....	28
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral... ..	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 SEÇÃO EXPERIMENTAL	32
3.1 Materiais e Métodos	32
3.1.1 Reagentes	32
3.1.2 Preparo de vesículas	33
3.1.3 Preparo dos Filmes de Langmuir	34
3.2 Técnicas de caracterização	34
3.2.1 Espectrofotometria UV-Vis.....	34
3.2.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	35
3.2.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	36
3.2.4 Espalhamento dinâmico eletroforético de luz (DELS)	37
3.2.5 Filmes de Langmuir (LF)	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Efeitos de sal nas vesículas e monocamadas	40
4.1.1 DODAB/NaBr e DODAC/NaCl	40
4.1.1.1 Análise visual das amostras	41
4.1.1.2 Resultados de Espectrofotometria UV-Vis	42
4.1.1.3 Resultados de DSC	44
4.1.1.4 Resultados de DLS	54
4.1.1.5 Resultados de filmes de Langmuir (LF).....	57
4.1.1.6 Conclusão	60
4.1.2 DODAB/NaCl e DODAC/NaBr	61
4.1.2.1 Análise visual das amostras.....	61
4.1.2.2 Resultados de espectrofotometria UV-Vis	62
4.1.2.3 Resultados de DSC	64
4.1.2.4 Resultados de DLS	69
4.1.2.5 Resultados de filmes de Langmuir (LF).....	73
4.1.2.6 Conclusão	72
4.2 Vesículas e monocamadas anfífilas em solução de glicose (GLI)	73
4.2.1 Análise visual das amostras	73
4.2.2 Resultados de espectrofotometria UV-Vis	75

4.2.3 Resultados de DSC	76
4.2.4 Resultados de DLS	82
4.2.5 Resultados de potencial zeta.....	84
4.2.6 Resultados de LF	86
4.2.7 Conclusão.....	88
4.3 Vesículas em soro fisiológico na presença e ausência de F127.....	88
4.3.1 Ação do surfactante F127	89
4.3.1.1Análise visual das amostras	89
4.3.1.2 Resultados de espectrofotometria UV-Vis	91
4.3.1.3 Resultados de DSC	93
4.3.1.4 Resultados de DLS	103
4.3.2 Resultados de LF.....	105
4.3.3 Conclusão	107
4.4 Vesículas com DOX	108
4.4.1 Análise visual das amostras	108
4.4.1 Resultados de espectrofotometria UV-Vis	109
4.4.2 Resultados de DSC	112
4.4.3 Resultados de DLS	116
4.4.5 Conclusão	118
5 CONCLUSÃO GERAL.....	119
REFERÊNCIAS	121
Anexo A – Publicações	135

1 Introdução

1.1 Motivação

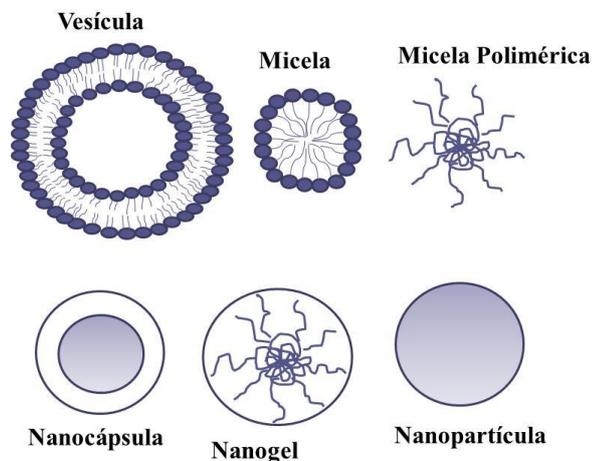
O desenvolvimento de doença como o câncer é um processo de múltiplos passos envolvendo mutações e seleção da célula com a capacidade de proliferação, sobrevivência, invasão e metástase [ANDERSON *et al.*, 2010]. A quimioterapia é um do principal tratamento clínico, apesar dos efeitos adversos e da baixa eficiência, que está associada, por exemplo, à resistência a múltiplas drogas (MDR), mecanismo de defesa das células tumorais. Este mecanismo consiste da ausência de resposta e resistência a uma vasta gama de quimioterápicos [KLOPMAN, SHI, RAMU, 1997, HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010]. Uma das características mais intrigantes da MDR é que os fármacos envolvidos não têm entre si analogia estrutural nem farmacológica como, por exemplo, no caso da vimblastina e de doxorubicina (DOX) [HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010].

O fenômeno MDR está relacionado à superexpressão da glicoproteína-P (gp-P), uma proteína de membrana plasmática que funciona como uma bomba de efluxo levando a uma diminuição da concentração intracelular dos quimioterapêuticos [BRAY *et al.*, 2012; HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010]. Uma alternativa ao tratamento convencional é a utilização de carreadores não virais, por serem menos tóxicos, imunogênicos e facilmente produzidos em larga escala, se comparados aos carreadores virais, produzido com vírus modificados para transportar o composto farmacêutico ou material genético [OSTRO, CULLIS, 1989].

É previsto que a resistência aos medicamentos pode ser minimizada ou suprimida quando anticancerígenos convencionais, como a DOX e materiais genéticos (si-RNA), são transportados simultaneamente até as células tumorais usando vesículas de fosfolípidios com o polímero neutro poli(etileno glicol), utilizado como *helper*, para aumentar a estabilidade e o tempo de circulação do carreador [CHENG *et al.*, 2002; SAAD; GARBUZENKO; MINKO, 2008].

Alguns exemplos de carreadores não virais são as nanocápsulas poliméricas, lipossomos (vesículas), nanogéis e micelas poliméricas (Figura 1), que podem ser utilizados na administração de agentes anticancerígenos ou de material genético [LIU *et al.*, 2017].

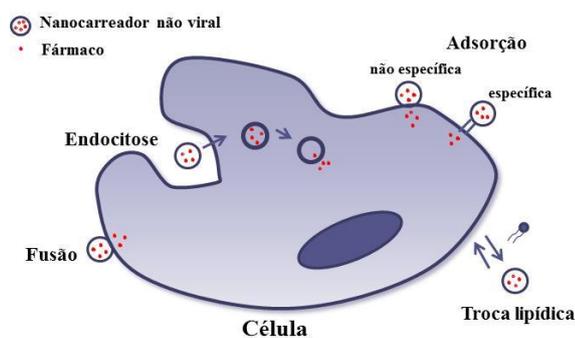
Figura 1 - Modelos de carreadores não virais.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os carreadores não virais (e.g., vesículas) na presença dos aditivos tensoativos ou poliméricos (*helpers*), exercem a função de transportar fármacos até células tumorais [LASIC; TEMPLETON, 1996; ZHADANOV; PODOBED; VLASSOV, 2002]. O transporte de fármacos através da membrana celular pode ocorrer por endocitose, fusão celular, adsorção ou troca lipídica (Figura 2), dos quais, a endocitose é o mais observado em vesículas, devido às características físico-químicas do carreador, possibilitando o acoplamento de moléculas em sua superfície e permitindo um direcionamento específico e controlado da liberação do agente terapêutico. Dentre os fatores que afetam a adesão celular e a entrega do fármaco destaca a densidade de carga superficial e o tamanho do carreador [SOENE; BRISSON; CUYPER, 2009].

Figura 2- Esquema de possíveis ações dos carreadores na membrana celular.



Fonte: adaptado de LEHNINGER, 1985.

Wu e colaboradores (1993) relataram que estruturas formadas por anfifílicas catiônicas com DOX, produz citotoxicidade *in vitro* e atividade antitumoral *in vivo* superior de estruturas neutras [WU *et al.*, 1993]. Estudos realizados por outros grupos indicam que agregados anfifílicos catiônicos aplicados na liberação controlada de quimioterapêuticos, são facilmente eliminados pelo sistema biológico [McLEAN *et al.*, 1997, MAHATO *et al.*, 1995, LITZINGER *et al.*, 1996], enquanto que estruturas neutras se localizam preferencialmente em tumores sólidos [PAPAHADJOPOULOS *et al.*, 1991, HUANG *et al.*, 1992, YUAN *et al.*, 1994].

A utilização de carreadores não virais formados por anfifílicos catiônicos apresenta melhor resposta biológica comparada com a neutra. A fim de reduzir a citotoxicidade e otimizar a eficiência na transfecção celular, utiliza-se na preparação dos carreadores não virais, um *helper*. Os *helpers* são aditivos, como polímeros, copolímeros, tensoativos e solutos em geral [LIANG; CHOU, 2009; LV *et al.*, 2006; STEFANUTTI *et al.*, 2014]. As interações dos *helpers* com lipídios e polímeros catiônicos resulta em alterações no grau de fluidez e na estrutura dos carreadores (lipoplexos e poliplexos, respectivamente), tornando-os mais eficientes e menos citotóxicos [OLIVEIRA *et al.*, 2012, OLIVEIRA, *et al.*, 2014]. A eficiência e a especificidade na transferência de genes, ou fármacos, aumentam consideravelmente quando empregamos sistemas mistos de lipídios na presença de aditivos (*helpers*) [ZHADANOV; PODOBED; VLASSOV, 2002].

1.2 Plurônico F127 (F127)

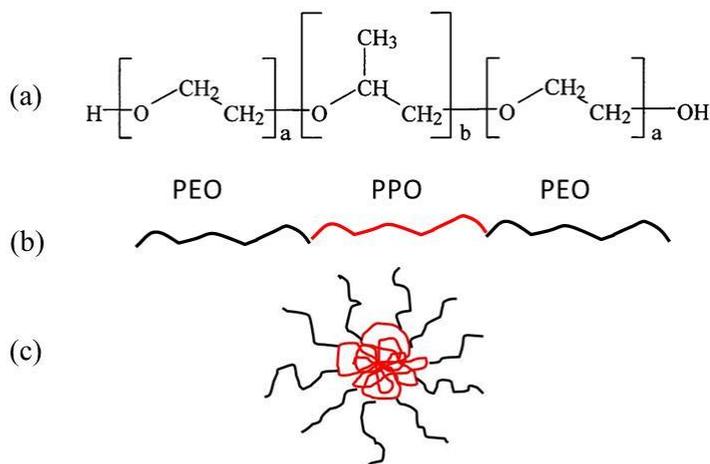
Copolímeros triblocos do tipo [poli(óxido etileno)]_a-[poli(óxido propileno)]_b-[poli(óxido etileno)]_a, sendo *a* e *b* números de cadeias de OE (óxido de etileno) e OP (óxido de propileno), respectivamente, são conhecidos como Plurônicos (nome comercial atribuído pela BASF, empresa que o fabrica) ou Poloxamer (nome dado por Irving Schmolka, patente de 1973).

O copolímero consiste de blocos de segmentos do polímero EO e PO, respectivamente hidrofílico e hidrofóbico, dispostos na sequência P(EO)_a-P(PO)_b-P(EO)_a com tamanhos variados, dados pelos valores de *a* e *b*, que proporcionam grande variedades dos copolímeros [KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002a].

A característica anfifílica e a possibilidade de variar a extensão dos blocos PEO e PPO conferem aos copolímeros vasta gama de aplicação, como em sistemas de distribuição controlada de fármacos e terapia gênica, pois, dependendo da fração desses segmentos hidrofílico/hidrofóbico, um número de estruturas supramoleculares e fases diferentes podem ser formados com potencial de aplicações diversas [HAMLEY, 2005; WANKA; HOFFMANN; ULBRICHT, 1994, KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002b].

O copolímero F127 (PEO₉₉-PPO₆₅-PEO₉₉), MM 12.600 g/mol, Figura 3, apresenta valor de temperatura micelar crítica (cmt) e concentração micelar crítica (cmc) dependente da concentração e temperatura, respectivamente [KABANOV; BATRAKOVA; ALAKHOV, 2002a; MORTENSEN, 2001]. As micelas são formadas pela associação dos segmentos de PPO no núcleo hidrofóbico e o segmento de PEO, hidrofílico, conforme mostrado na Figura 3a [ALEXANDRIDIS *et al.*, 1994, 1995].

Figura 3- (a) Estrutura molecular de F127, onde *a* representa o número de óxido de etileno e *b* representa o número de óxido de propileno, sendo *a* = 99 e *b* = 65. (b) monômero F127, (c) representação esquemática de uma micela de copolímero tribloco em meio aquoso.



Fonte: Lemos 2015.

Em solução aquosa e abaixo da cmc e/ou cmt, o copolímero F127 encontra-se na forma monomérica. Acima do valor da cmc e/ou cmt, ocorre micelização, com o núcleo hidrofóbico de PPO e uma coroa hidrofílica de PEO, Figura 3b [ALEXANDRIDIS, HATTON, 1995]. Outra característica dos copolímeros triblocos, é o grande potencial

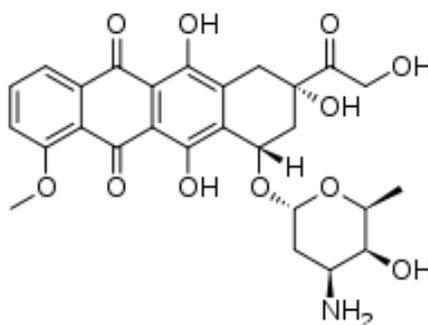
dessas moléculas de gelificação, sob condições específicas de concentração e temperatura [BOHORQUEZ *et al.*, 1999; CHAIBUNDIT *et al.*, 2007; GAUCHER, *et al.*, 2005]. Portanto, variações na concentração e na temperatura ocasionam alterações estruturais com potencial de aplicação industrial [WENZEL *et al.*, 2002, RASSING; ATTWOOD, 1982, ZHANG; LAM; TAN, 2005; SU; WEI; LIU, 2003].

Os sistemas contendo F127 podem ser usados no *design* de novos modelos de carreadores não virais de fármaco ou material genético. Estudos anteriores indicam que F127 auxiliam na ação inibidora de ATP e quimissensibilizador da P-gp, sendo possível controlar a bomba de efluxo [KABANOV, BATRAKOVA, ALAKHOV, 2002b, LIU, *et al.*, 2014, CHENG, *et al.*, 2014].

1.3 Doxorrubicina (DOX)

O antitumoral doxorrubicina (DOX) é um antibiótico antineoplásico do grupo das antraciclina, Figura 4, isolado a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius*, de uso corrente em oncologia, sendo aplicada por injeção intravenosa como um fármaco livre ou em formulação lipossomal [GABIZON, SHMEED, BARENHOLZ, 2003]. É um fármaco com ampla gama de aplicações clínicas contra vários tipos de tumores, incluindo sarcoma de Kaposi, carcinoma, leucemia, câncer de mama, útero, ovário, pulmão [RANA, *et al.* 2011, SUZUKI, *et al.*, 2005], próstata [SCHER, *et al.* 1984] e bexiga [PAVONE-MACALUSO, *et al.* 1984].

Figura 4 - Estrutura Molecular da Doxorrubicina (DOX).



Fonte: Elaborado pela autora.

O fármaco DOX é uma molécula anfifílica que em sua estrutura química apresenta um anel tetraciclina hidrofóbica ligado, através de uma ponte glicosídica, a um aminossacarídeo hidrofílico, Figura 4. Em pH fisiológico, a DOX contém um grupo amina carregado positivamente sendo atraído eletrostaticamente para os grupos fosfato dos ácidos nucleicos, carregados negativamente, podendo ser intercalada entre os pares de nucleotídeos da dupla fita de DNA [LOWN, 1993, GEWIRTZ, 1999].

Como a maioria dos fármacos quimioterápicos, tem toxicidade e efeitos adversos ligados à sua utilização, sendo a mais perigosa a cardiotoxicidade, que relacionada com a elevada afinidade com os fosfolipídios carregados negativamente, das membranas das mitocôndrias. O fato dos músculos cardíaco (miocárdio) conter excesso de mitocôndria explica, em parte, a alta cardiotoxicidade da DOX, o que limita a dose a ser administrada [MINOTTI *et al.*, 2004].

1.4 Vesículas anfifílicas

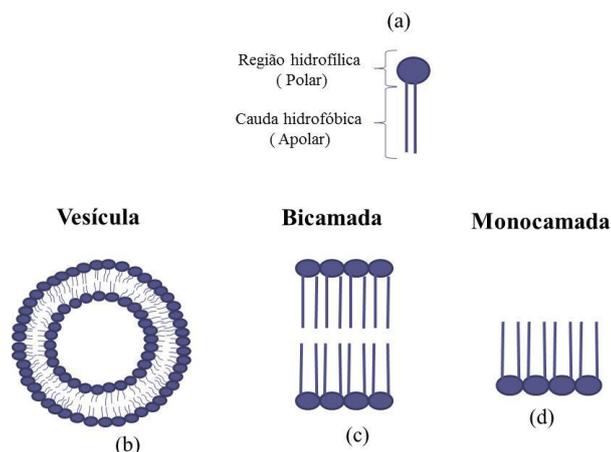
Os lipídios em geral são moléculas anfifílicas classificadas, de acordo com suas composições químicas, como aniônicos, catiônicos, não iônicos ou dipolo elétrico (*zwitterionicos*). Os fosfolipídios apresentam um grupo fosfato em sua estrutura química, por exemplo, o DPPC é um fosfolipídio *zwitteriônico* com dupla cadeia alquílica saturada, e a fosfatidilcolina, presente na porção polar da molécula, com grande estabilidade à variação de pH e força iônica do meio, o que lhe confere considerável potencial carreador de compostos terapêuticos [BATISTA; CARVALHO, MAGALHÃES, 2007].

Os lipídios catiônicos são sintéticos aqueles derivados dos sais de amônio quaternário, da série de brometo de dialquildimetilamônio, todos contêm dupla cadeia alquílica sem insaturação, sendo os mais estudados o brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e o cloreto de dioctadecildimetilamônio (DODAC) devido sua alta estabilidade na formação de estruturas coloidais. Estes sistemas coloidais são promissores para aplicações em áreas farmacêuticas e industriais, com a vantagem de apresentar baixo custo comercial comparado com os sistemas coloidais formados por lipídios naturais [MARQUES *et al.*, 2002, FEITOSA *et al.*, 2006a].

Os lipídios catiônicos também são promissores na aplicação em *gene delivery* devido ao seu potencial para compactar e descompactar ácido nucleicos, por interação eletrostática, a fim de transportá-lo até a célula-alvo.

Devido ao efeito hidrofóbico, resultado do contato energeticamente desfavorável entre a parte apolar dos lipídios e moléculas de água, e repulsão eletrostática entre os grupos polares [GRADZIELSKI *et al.*, 1999, SEGOTA;TEZAK, 2006], os lipídios podem ser associação em diferentes agregados como micelas, vesículas, monocamadas (ou filmes de Langmuir) e bicamadas unilamelares ou multilamelares, entre outras estruturas mais complexas (Figura 5).

Figura 5- Representação esquemática de um lipídio (a) e de três estruturas formadas por lipídios em solução aquosa: vesícula unilamelar (b), bicamada (c) e monocamada (d).



Fonte: Lemos 2015.

As vesículas são exemplo de carreadores não virais, que consistem de bicamadas fechadas de lipídios, de modo a reter uma porção do solvente no interior, onde podem ser solubilizadas moléculas hidrofílicas de pequeno e médio porte. Elas também apresentam a capacidade de encapsular compostos lipofílicos, inseridos ou adsorvidos na bicamada [KUNITAKE, OKAHATA, 1977]. O tamanho e a geometria das vesículas dependem da arquitetura do lipídio, do parâmetro de empacotamento (P), da concentração e do método de preparação [ISRAELACHVILLI, 2011].

O parâmetro de empacotamento do lipídio, $P = v/al$, onde v e l representam o volume e comprimento das cadeias hidrofóbicas respectivamente e a representa a área

ocupada pelo grupo polar do lipídio no agregado formado [ISRAELACHVILLI, 2011]. Assim, para micelas, $P < 0.5$, vesículas, $0.5 < P < 1$, e bicamadas, $P \approx 1$ [ISRAELACHVILLI, 2011, p.549], outras geometrias são apresentadas no Tabela 1. Os lipídios que formam vesículas têm geometria aproximadamente cilíndrica regular ou cone truncado, e as vesículas podem ser uni ou multilamelares [ISRAELACHVILLI, 2011, p. 559].

A estrutura do agregado pode ser alterada com variação de concentração. Em pequenas concentrações, vesículas unilamelares são predominantes; porém, em concentrações maiores estruturas mais complexas (multilamelares ou multivesiculares) passam a predominar. Esse comportamento, no entanto, depende da arquitetura do lipídio [FEITOSA; BARRELEIRO, OLOFSSON, 2000].

A estrutura e o tamanho das vesículas estão relacionados ao método de preparo das mesmas. Os métodos mais utilizados são o espontâneo, injeção orgânica (etanólica, clorofórmica etc.), sonicação, extrusão e hidratação de filmes lipídicos [FEITOSA; BROWN, 1997, FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000, OLSON *et al.*, 1979, BATZRI; KORN 1973]. Dentre esses métodos, destacamos o método espontâneo, que consiste na formação das vesículas em solvente aquoso, por diluição simples do composto sobre agitação mecânica, acima de sua temperatura de transição [FEITOSA, KARLSSON, EDWARDS, 2006]. Neste trabalho optamos pela formação das vesículas de DPPC, DODAB e DODAC pelo método espontâneo, por não envolver nenhum tipo de contaminante (solvente orgânico, fragmento do probe de sonicação).

Tabela 1- Estruturas e formas de lipídios e agregados, e os respectivos parâmetros de empacotamento.

Estruturas geométricas	 Cone	 Cone truncado	 Cone truncado	 Cilíndrico	 Cilíndrico invertido
$P = v/al$	$P > 1/3$	$1/3 < P < 1/2$	$1/2 < P < 1$	$P \approx 1$	$P > 1$
Estruturas dos agregados	Micelas esféricas	Micelas globulares ou cilíndricas	Vesículas	Bicamadas	Estruturas reversas

Fonte: Adaptado de ISRAELACHVILLI, 2011, p.549.

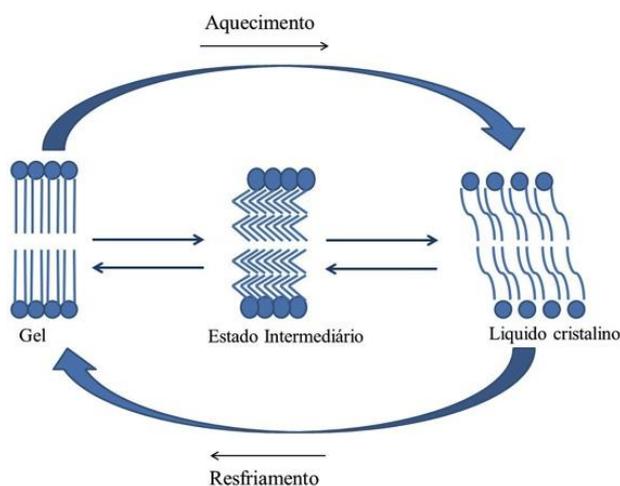
O comportamento térmico (Figura 6) é uma característica de bicamadas que pode ser usada para monitorar interação de fármaco com vesículas. A transição de estado gel para líquido-cristalino (LC) ocorre em muitas bicamadas lipídicas em torno de uma temperatura característica, T_m . Essa transição ocorre numa faixa de temperatura que depende do tipo de lipídio, da concentração lipídica, do método de preparação das vesículas, do tipo de estrutura supramolecular formado, e da presença de aditivos em geral (capaz de afetar o tipo de estrutura). Desse modo, a T_m é uma característica do sistema vesicular e não do lipídio [FEITOSA; JANSSON; LINDMAN, 2006].

Outra característica térmica importante das vesículas consiste no fato da transição gel para LC ocorrer, diretamente ou não, no aquecimento da amostra.

As vesículas de DODAC possuem uma única transição térmica, atribuída à transição gel para LC, em torno de T_m . DODAB possui três transições térmicas bem definidas, em torno de T_s , T_m e T_p , onde T_s é a temperatura de transição do estado gel para o estado intermediário (entre gel e LC), T_m representa a temperatura de transição do estado intermediário para o LC [FEITOSA *et al.*, 2012, ARIAS *et al.*, 2018].

As vesículas *zwitterionicas* de DPPC, possuem duas transições térmicas, T_s (estado intermediário) e T_m [NAUMANN, BRUMM, BAYERL, 1992, ARIAS *et al.*, 2018, SARIISIK, *et al.*, 2019] o comportamento térmico das vesículas de DPPC se assemelham ao de DODAB.

Figura 6 - Transições de estados características de bicamadas lipídicas.



Fonte: Lemos 2015.

Na fase gel da bicamada as caudas dos lipídios estão completamente distendidas, no seu interior, numa direção perpendicular ao plano da bicamada, deixando esta mais rígida e mais espessa; no estado líquido-cristalino (LC), as caudas dos lipídios encontram-se recolhidas (*all-trans*), deixando a mais fluida, Figura 6. No estado intermediário encontram-se inclinadas em relação ao plano da bicamada, conferindo uma ondulação para a bicamada das vesículas. As alterações das vesículas apresentam uma e transições um pico endotérmico no termograma DSC em torno da temperatura T_s . Em água, os valores da T_m diferem para DODAB e DODAC, $T_m \approx 45$ e 49 °C, respectivamente, sendo para DODAB, $T_s \approx 36$ °C [FEITOSA, 2010, FEITOSA *et al.*, 2012, FEITOSA *et al.*, 2009].

A terceira transição do DODAB apresenta uma temperatura em torno de $T_p \approx 53$ °C. Esta transição se deve à formação de estruturas de bicamadas multilamelares, mais compactamente organizadas do que as bicamadas das vesículas unilamelares [FEITOSA *et al.*, 2012].

No resfriamento, as vesículas de DODAB, DPPC ou DODAC apresentam uma transição reversa do estado LC para o estado intermediário ou gel em $T'_m < T_m$, apresentando, portanto, histerese térmica, $\Delta T_m = T_m - T'_m$, caracterizando reação distinta da bicamada no aquecimento e resfriamento [FEITOSA *et al.*, 2012, ARIAS *et al.*, 2018]. A largura do pico de transição ($\Delta T_{1/2}$) representa o inverso da cooperatividade da transição térmica, que indica a facilidade em ocorrer a transição e sua inversa. Essas propriedades térmicas serão exploradas comparativamente aos respectivos valores na ausência e na presença de aditivos.

As formulações a base de lipídios catiônicos possuem características para interagir com as membranas bacterianas, negativamente carregadas, devido à atração eletrostática, possibilitando o transporte de fármacos através do acúmulo nos locais afetados. Estima-se que este sistema de entrega dos fármacos utiliza uma quantidade menor de princípio ativo e apresenta eficiência aumentada, pois possibilita o direcionamento do fármaco [JAIN, 2008, CHEN, *et al.*, 2015].

O interesse pelo estudo das vesículas é crescente, especialmente relacionado a propriedades como a concentração vesicular crítica (CVC), efeitos da composição e concentração anfifílica, método de preparação, e aditivos em solução. A especificidade de íons ou moléculas adicionadas à solução, promove interações que alteram o empacotamento das cadeias alquílicas na bicamada [BLANDAMER *et al.*, 1997, VAN

DER LINDEN, BUYTENHEK, 1997] e, conseqüentemente, a ação carreadora das vesículas.

Estudo recente da interação de F127 com vesículas catiônicas demonstra que em baixas concentrações (até 0,8 mM) de F127, as vesículas são preservadas, formando estruturas mistas. Em concentrações maiores de F127, as vesículas se desestabilizam, com formação de estruturas mistas menores, compatíveis com micelas [LEMOS; ADATI, FEITOSA, 2019].

Liu e colaboradores, desenvolveram nanocápsulas poliméricas de F127, na presença de *helpers* como p-nitrofenila, ácido hialurônico (HA) ou poli (s-lisina) (PL), utilizadas no controle da liberação de cloridrato de doxorubicina (DOX·HCl) em solução aquosa. O fármaco foi encapsulado fisicamente nas nanocápsulas e a curva de liberação, mostrou que parte do composto foi liberado gradualmente [LIU *et al.*, 2017].

Devido a aplicação industrial e farmacêutica das vesículas, e sua capacidade de mimetizar biomembranas para o transporte de pequenas moléculas, os estudos sobre a formação e estabilidade das vesículas carregadas em solução de sais simples, como NaCl e NaBr, moléculas de glicose e em solução fisiológica, se justificam como aspectos importantes para monitorar as propriedades, visando possível aplicação.

Aa solução de NaCl 0,9% (p/p) em água, de glicose 5% (p/p) em água e a mistura destas soluções, podem ser usada para nutrir e/ou hidratar. A solução de NaCl 0,9% (p/p) é uma solução estéril, normalmente usada para infusão intravenosa, mas também para lavagem de lentes de contato, irrigação nasal, entre outras aplicações [PUBCHEM, 2018, OLARTE *et al.*, 2014].

1.5 Monocamadas anfífilicas

As monocamadas anfífilicas podem ser formadas através da técnica dos filmes de Langmuir na superfície ar-água, sendo um bom modelo para mimetizar o comportamento na membrana celular. As monocamadas são amplamente utilizadas em estudos das propriedades das moléculas anfífilicas na interface, como lipídios naturais ou sintéticos, polímeros, proteínas, e sua interação com outras moléculas [OLIVEIRA, 1992].

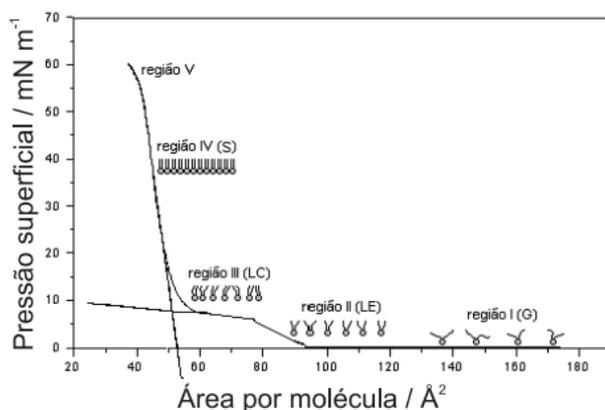
A utilização de monocamadas, que permite o controle da composição da membrana, do estado de compactação, da estrutura da monocamada e da planaridade

que lembra o formato de uma superfície celular (ao contrário de vesículas que possuem grande curvatura). A maior desvantagem das monocamadas é, talvez, a inviabilidade de estudos de transportes através de membrana e de carregamento de moléculas. Portanto, é necessário complementar o estudo com sistemas vesiculares. Porém, a similaridade entre esses dois sistemas anfífilos é comprovada por alguns autores [HASEGAWA *et al.*, 1997, OLIVEIRA, 1992].

Esta similaridade está associada à organização molecular, similar à assumida por fosfolipídios nas membranas celulares. Assim como os fosfolipídios, os anfífilos catiônicos DODAB e DODAC, devido ao equilíbrio hidrofóbico-hidrofílico, também tendem se estruturar em monocamadas estáveis na superfície da água [CAVALLI *et al.* 2001]. Para que o filme anfílico tenha uma espessura fina (molecular), a área superficial deve ser suficientemente extensa e a quantidade de material espalhado na interface ar-água suficientemente pequena [FERREIRA, *et al.* 2005, OLIVEIRA, 1992].

Normalmente, durante a formação da monocamada, podem ser observadas quatro regiões ou fases: região I: fase gasosa, na qual as moléculas estão afastadas entre si, não havendo interação entre elas e a pressão interfacial é zero; região II: fase líquido-expandido (LE), na qual as moléculas estão próximas, com menor interação, região III: fase líquido-condensada (LC), onde as moléculas estão próximas, de modo a interagir com sua vizinha mais próxima; e região IV: fase sólida (S), na qual as moléculas estão densamente empacotadas de modo a colapsar com o aumento da pressão. Podemos denominar ainda, a região de colapso como região V, na qual as monocamadas se sobrepõem irreversivelmente, Figura 7 [FERREIRA, *et al.* 2005].

Figura 7 - Transições de fase em monocamadas do DPPC.



Fonte: Adaptado de FERREIRA, *et al.* 2005.

Assim, diferentes grupos de pesquisa utilizam filmes de Langmuir como modelo para estudar a interação de biomembranas com biomoléculas, como peptídeos [MAGET-DANA, 1999], enzimas [GIRARD-EGROT; GODOY; BLUM, 2005], polímeros sintéticos [BREZESINSKI; MOHWALD, 2003], sensores biológicos [SIONTOROU *et al.*, 2017], íons [CAVALLI *et al.*, 2001, TAYLOR; DONG; JONES, 1996], dentre outros.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar propriedades térmicas e estruturais de vesículas catiônicas e *zwitterionicas* em diferentes ambientes aquosos e na presença de *helper*, visando a incorporação de fármacos.

2.2 Objetivos específicos

(1) investigar o efeito da concentração (0,1- 400 mM) dos sais NaCl e NaBr em vesículas e monocamadas de DODAB, DODAC e DPPC.

(2) investigar o efeito da concentração (0,1- 400 mM) de glicose em vesículas e monocamadas de DODAB, DODAC e DPPC.

(3) investigar a formação das vesículas catiônicas em soro (SF), glicosado (SG) e caseiro (SC) na ausência e na presença de Plurônico F127.

(4) realizar testes de incorporação de DOX nas vesículas catiônicas contendo F127, em SF, SG e SC.

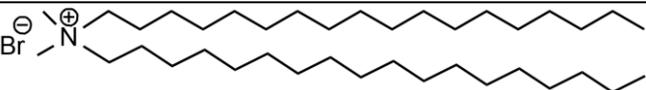
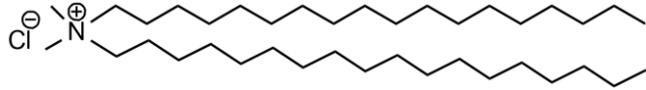
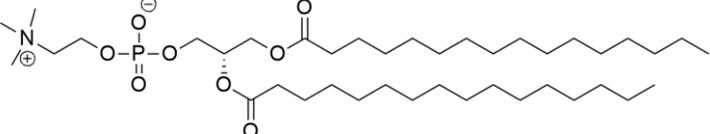
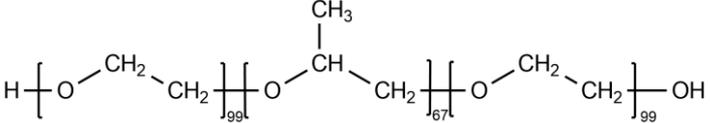
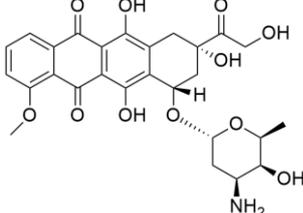
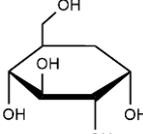
3. SEÇÃO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Reagentes

Na Tabela 2 são apresentadas as estruturas moleculares dos compostos químicos utilizados neste estudo, massa molar e procedência comercial. DODAC foi obtido a partir de DODAB em coluna de troca iônica e recristalizado conforme relatado [CUCCOVIA *et al.*, 1997]. Todos os compostos anfifílicos utilizados com grau de pureza > 98 % e foram utilizados sem purificação adicional. Água ultrapura, qualidade Milli-Q (modelo Direct-Q UV-3), resistividade 18,2 MΩ.cm em 25 °C, foi utilizada na preparação das amostras.

Tabela 2 – Estruturas moleculares dos compostos químicos utilizados neste trabalho.

Nome do composto	Estrutura Química	Massa molecular (g/mol)	Fabricantes
DODAB		620,95	Sigma-Aldrich
DODAC		586,50	-
DPPC		734,04	Sigma-Aldrich
F127		12.600	Sigma-Aldrich
DOX		543,52	Sigma-Aldrich
Glicose		180,16	Merck
NaCl		58,44	Merck
NaBr		102,89	Dinâmica

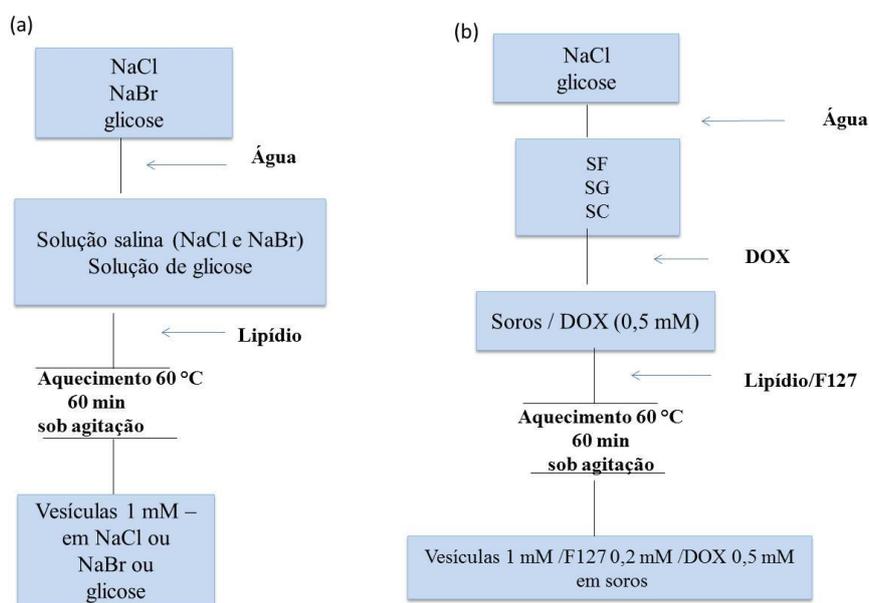
Fonte: Elaborado pela autora.

3.1.2 Preparo de vesículas

As dispersões de vesículas anfifílicas foram preparadas por diluição simples das moléculas anfifílicas em solução aquosa na temperatura adequada, e na concentração fixa de 1 mM. As dispersões de DODAC, DODAB e DPPC, foram solubilizadas em água, solução de NaCl ou NaBr (0,1 a 400 mM), solução de glicose (0,1 a 400 mM) e soro SF, SG e SC, sob agitação magnética lenta durante 1 h, a 60°C, isto é, acima da sua temperatura de transição (T_m), dos três anfifílicos, Figura 8a. Em seguida, foram resfriadas à temperatura ambiente (25 °C) para estocagem.

Dispersões das vesículas de DODAC, DODAB e DPPC 1 mM com F127 0,2 mM, em água ou em soro (NaCl 0,9% (p/p)), glicosado (5% (p/p)) ou caseiro (0,9% + 5% (p/p)) foram preparadas utilizando o processo descrito na Figura 8. DOX 0,5 mM foi adicionado ao soro fisiológico, glicosado ou caseiro, e a mistura foi usada no preparo de dispersões de vesículas catiônicas mistas (1 mM), com F127 0,2 mM, de acordo com o esquema da Figura 8b.

Figura 8- (a) Esquema do método de preparo de dispersões mistas de DODAB, DODAC ou DPPC em solução aquosa, salina, glicosada ou F127, (b) Esquema do método de preparo de dispersões mistas de DODAB, DODAC ou DPPC com F127 e DOX.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.1.3 Preparo dos filmes de Langmuir

As monocamadas foram formadas por espalhamento de 17 μL de uma solução clorofórmica de DODAB, DODAC ou DPPC ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) na superfície ar/água ou ar/solução aquosa, solução contendo NaCl ou NaBr (0,1 a 200 mM), solução de glicose (0,1 a 400 mM) ou soro SF, SG ou SC. A solução lipídica permaneceu em repouso por 15 minutos antes de varrer a superfície com as barreiras móveis, para evaporação do solvente orgânico. As isotermas foram registradas usando uma velocidade de barreira de $10 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$. Todas as experiências foram realizadas a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), em triplicata.

3.2 Técnicas de caracterização

3.2.1 Espectrofotometria UV-vis

As medidas de turbidez foram realizadas em um espectrofotômetro Cary Bio 300 UV-Vis (Varian, Mulgrave, Austrália), equipado com cubetas de quartzo retangulares de comprimento óptico 1 cm. A espectroscopia em UV-Vis tem ampla aplicação em pesquisas físicas, químicas, bioquímicas, farmacológicas, dentre outras. A técnica consiste da incidência de uma radiação eletromagnética, na região ultravioleta (UV) ou visível (Vis), sobre a amostra, onde se observa absorção, espalhamento ou transmissão da radiação, de modo que a intensidade total da radiação seja conservada. No estudo utilizamos radiação (luz) visível, que não é absorvida pelos anfifílicos. Neste caso, $I_o = I_s + I_t$, onde I_o , I_s , e I_t , representam a intensidade da luz incidente, espalhada e transmitida, respectivamente. Matematicamente, $T = I_t/I_o$ e $A = \log(I_o/I_t) = -\log T$ [SHOEMAKER, GARLAND, NIBLER, 1989, p. 754].

Segundo a lei de Beer-Lambert, $A = abc$, onde a é o coeficiente de absorvidade molar, b é o comprimento óptico e c a concentração [DAVIES-COLLEY; SMITH, 2001]. Na região da luz visível, para uma dada concentração de soluto e temperatura, o valor da turbidez é, em primeira aproximação, proporcional ao tamanho da partícula espalhadora de luz.

As amostras foram monitoradas nos comprimentos de onda $\lambda = 250, 400$ e 500 nm e temperatura ambiente (~ 25 °C), e os resultados apresentados em gráficos de turbidez em função da concentração da componente variável da mistura (p. ex., concentração de sal).

3.2.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

O DSC é um equipamento importante para investigar transições térmicas de vesículas de lipídios e polímeros, assim como na análise de ligantes em proteínas e mudanças estruturais e conformacionais em sistemas coloidais e de proteínas [COOPER; NUTLEY; WADOOD, 2000, SILVA; LOTH; OLOFSSON, 2004]. Os experimentos consistem em aquecer ou resfriar, à mesma taxa e volumes iguais da amostra e da referência, à pressão constante, de uma temperatura inicial (T_i) até uma temperatura final (T_f), mantendo-se a amostra e a referência à mesma temperatura.

O calorímetro compensa o ganho ou a perda de calor da amostra, fornecendo ou removendo calor, de modo a manter a temperatura igual à temperatura da referência [COOPER; NUTLEY; WADOOD, 2000]. Esse calor retirado ou fornecido é registrado graficamente em função da temperatura, denominado termograma, que descreve a variação da capacidade térmica (ΔC_p) vs temperatura, ajustado com referência à linha base, obtida com ambas as celas preenchidas com o solvente.

As transições endo- e exotérmicas, são representadas no termograma por picos em torno da temperatura de transição (*e.g.*, T_m), cuja largura ($\Delta T_{m,1/2}$) reflete a velocidade da transição e, portanto, a cooperatividade. A área do pico fornece a energia a pressão constante, ou entalpia (ΔH_m), dessa transição [BARRELEIRO *et al.*, 2002; FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000; MARQUES; KHAN, LINDMAN, 2002].

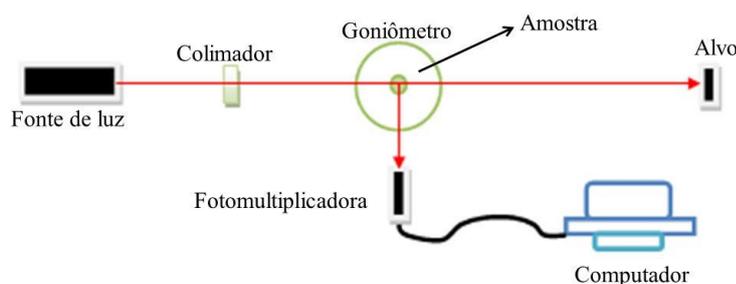
As dispersões dos lipídios e do copolímero investigados resultaram em termogramas com perfil característico para cada composto, o que nos permitiu compará-los aos termogramas de lipídio/copolímero, obtendo assim, a partir de variação no perfil dos termogramas, informações sobre o comportamento térmico e estrutural dos complexos formados. Os termogramas de DODAC, DODAB e DPPC foram obtidos em dois ciclos de aquecimento e resfriamento, com tempo de equilíbrio de 15 min, à taxa de

60 °C/h, de 1 a 80 °C, no equipamento do modelo VP-DSC (Microcal. Inc. Northampton. MA - EUA), com celas gêmeas, para a amostra e a referência, de 0,54 mL, para análise dos dados foi utilizado o software Origin[®] 7.0 fornecido pelo fabricante.

3.2.3 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A técnica de DLS permite determinar o diâmetro hidrodinâmico (D_H) e a polidispersidade de partículas coloidais (*e.g.*, vesículas e micelas). Essencialmente, o equipamento consiste de um laser como fonte de luz monocromática, um colimador, um goniômetro, no centro do qual fica posicionado a amostra, um sistema detector de luz espalhada, uma fotomultiplicadora, e um computador com software para análise de dados, Figura 9. O diâmetro hidrodinâmico corresponde ao diâmetro da partícula mais a espessura da camada de solvatação (hidratação), e obtido através da medida do coeficiente de difusão da partícula, que arrasta consigo algumas moléculas de água ligadas [CHU, 1997].

Figura 9- Componentes essenciais de um equipamento de espalhamento de luz. O detector está posicionado no ângulo de espalhamento de 90°.



Fonte: LEMOS 2015.

A técnica de espalhamento de luz explora os movimentos térmicos das partículas em suspensão sobre as quais incide o laser. O coeficiente de difusão (D) para uma partícula está relacionado ao seu D_H de acordo com a relação de Stokes-Einstein:

$$D = k_B T / 6\pi\eta D_H \quad (1)$$

onde o k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura Absoluta e η é a viscosidade do meio. O sistema detecta a função de auto correlação da intensidade de luz espalhada,

que decai exponencialmente com o tempo. A partir de ajustes da função exponencial o programa calcula a função distribuição do diâmetro hidrodinâmico, cuja posição caracteriza o valor médio de D_H , e a largura indica a polidispersividade do tamanho das partículas [CHU, 1997].

Agregados como vesículas e micelas são apropriados para o transporte de fármacos via corrente sanguínea e também são apropriadas para a compactação/descompactação de DNA para a transfecção celular [LASIC, TEMPLETON, 1996; KABANOV, BATRAKOVA, ALAKHOV, 2002a].

As medidas de DLS foram realizadas no instrumento fabricado pela Brookhaven Instruments Corp, Holtsville, EUA, equipado com um laser de comprimento de onda 635 nm operando a uma potência ajustável de até 15 mW, com ângulo de espalhamento ajustável e temperatura da amostra controlada por um banho termostático (Poly Science Temperature Control, modelo 91A0A11B).

3.2.4 Espalhamento dinâmico eletroforético de luz (DELS)

O Potencial zeta (ζ) é o potencial eletrostático na superfície de cisalhamento de partículas coloidais hidratadas, que determina a mobilidade dessas partículas na presença de um campo elétrico. A mobilidade eletroforética (μ_e) está relacionada ao potencial zeta (ζ) através da equação

$$\mu_e = \zeta \varepsilon / \eta f(\kappa a) \quad (2)$$

onde ε é constante dielétrica, η é a viscosidade do meio, κ é o comprimento de Debye, a é o raio cinético da partícula e $f(\kappa a)$ é uma função que depende do modelo teórico adotado.

Há dois modelos clássicos que resultam em dois limites: as equações de Smoluchowski e de Debye-Hückel, que se aplicam em limites opostos [WEINER, 1987]:

1. *Limite de Hückel*: $\mu_e = (2\varepsilon\zeta)/(3\eta)$ para $\kappa a \ll 1$, válida para pequena força iônica e partículas muito pequenas.
2. *Limite de Smoluchowski*: $\mu_e = \varepsilon\zeta/\eta$ para $\kappa a \gg 1$, válida para força iônica significativa e partículas grandes.

O potencial zeta (ζ) das amostras foram obtidos utilizando o equipamento de DELS (Zeta Pals, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, EUA) equipado com um

laser de diodo de alta potência de 35 mW. Sobre a amostra irradiada pelo laser incide um campo elétrico, atribuindo às partículas coloidais movimento de translação associado ao movimento browniano, sobre os quais se aplicam os modelos de Hückel ou de Smoluchoviski.

3.1.2.5 Filmes de Langmuir (LF)

As Cubas de Langmuir possuem barreiras móveis, fabricadas de Teflon[®], com o controle eletrônico do posicionamento e da velocidade de compressão, além de medidores de pressão e potencial de superfície. A pressão de superfície (π) é definida como a diferença de tensão superficial entre uma subfase com água pura (γ_0) e uma subfase com o filme (γ), ou seja, $\pi = \gamma - \gamma_0$. Esta pressão pode ser obtida através da força por unidade de comprimento sobre uma barreira fixa, através de uma eletrobalança, ou medindo-se a tensão superficial pelo método de Wilhelmy, como usual nas cubas comerciais. A pressão mínima medida é zero, e a máxima é próxima da tensão superficial, aproximadamente 73 mN/m (água pura a 25 °C) [OLIVEIRA, 1992].

As monocamadas ou filmes de Langmuir são geralmente obtidos através da dissolução do lipídio em solvente apolar (clorofórmio, metanol), volátil, seguida da sua distribuição sobre a superfície da subfase, que pode ser água ou outra solução.

Filmes de Langmuir são produzidos numa cuba, usualmente de forma retangular e feita de um material hidrofóbico, como o Teflon (poli(tetrafluoroetileno)), que contém a subfase aquosa.

Assim usando pequenas moléculas anfifílicas, é possível formar um filme fino, se aproximando da espessura de uma molécula, isto é, o tamanho da cuba deve ser suficientemente extenso e/ou a quantidade de material espalhado suficientemente pequeno [FERREIRA, *et al.*, 2005]. Portanto, a solução lipídica é espalhada sobre toda a superfície e o solvente evapora em poucos minutos. Se a área disponível por molécula for elevada, o filme se encontra no estado denominado gasoso, onde as interações entre as moléculas do anfifílico são fracas e podem ser desprezadas. Se a área superficial para o filme for diminuída, através da compressão do filme com uma barreira móvel, as moléculas interagirão progressivamente à medida que a área média ocupada por molécula diminuir [OLIVEIRA, 1992, FERREIRA, *et al.*, 2005].

A compressão do filme através de barreiras móveis força a orientação das moléculas de modo que seus eixos tendem a estar perpendiculares à superfície na

subfase. Durante a compressão do filme, normalmente podem ser observadas as fases gasoso, líquido expandido, líquido condensado e sólido, alguns autores consideram a região de colapso como uma transição. Estas transições são observadas nas isotermas de pressão. As isotermas podem ser modificadas com a alteração da subfase, como diferentes pH ou força iônica, consequentemente modificando o empacotamento das moléculas.

É fundamental o equilíbrio entre a parte polar e apolar das moléculas que constituirão o filme. Nos casos em que a cauda hidrofóbica seja muito pequena em relação à cabeça polar, ou em que o grupo polar seja muito forte, em termos de interações, o material pode se dissolver na água de tal forma que ocorra um comprometimento da estabilidade dos filmes.

A isoterma de pressão superficial-área molecular (π -A) dos filmes de Langmuir foram obtidas usando-se uma Cuba de Langmuir KSV-NIMA, com os seguintes acessórios: sensor de pressão, barreiras moveis e cuba de Teflon[®], com dimensões 40 x 12 cm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados e discutidos os resultados, obtidos por diferentes técnicas experimentais, da ação dos sais NaBr e NaCl, e do açúcar glicose (GLU), nas propriedades de vesículas e monocamadas catiônicas de DODAB e DODAC, e *zwitterionicas* (bipolares) de DPPC. Foram também realizados estudos dessas vesículas preparadas em soros (SF), glicosado (SG) e caseiro (SC), na ausência e na presença do copolímero F127 usado como *helper*, além da realização de testes preliminares de incorporação do fármaco DOX.

Inicialmente, foi investigada a ação de NaBr e NaCl nas vesículas (Seções 4.1); em seguida, o efeito da glicose nessas vesículas (Seção 4.2). Na Seção 4.3 foi estudado o papel de F127 nas propriedades das vesículas e a transição vesícula-micela induzida por Plurônico. Finalmente, na Seção 4.4, auxiliam a solubilização do fármaco anticancerígeno DOX nas vesículas, que funcionaria como possível carreador não viral. Nas Conclusões (Seção 5) são elencadas considerações de destaque de cada sistema investigado e suas inter-relações.

4.1 Efeito de sal nas vesículas e monocamadas

O estudo do efeito de sal nas propriedades estruturais, térmicas e de estabilidade de vesículas e monocamadas pode ser útil em soro, assim como no preparo de sistemas carreadores de fármacos. De modo geral, os resultados apresentados indicam que os íons Br^- e Cl^- adicionados às vesículas e monocamadas anfifílicas determinam as propriedades dessas estruturas de maneira específica para cada anfifílico investigado.

4.1.1 DODAB/NaBr e DODAC/NaCl

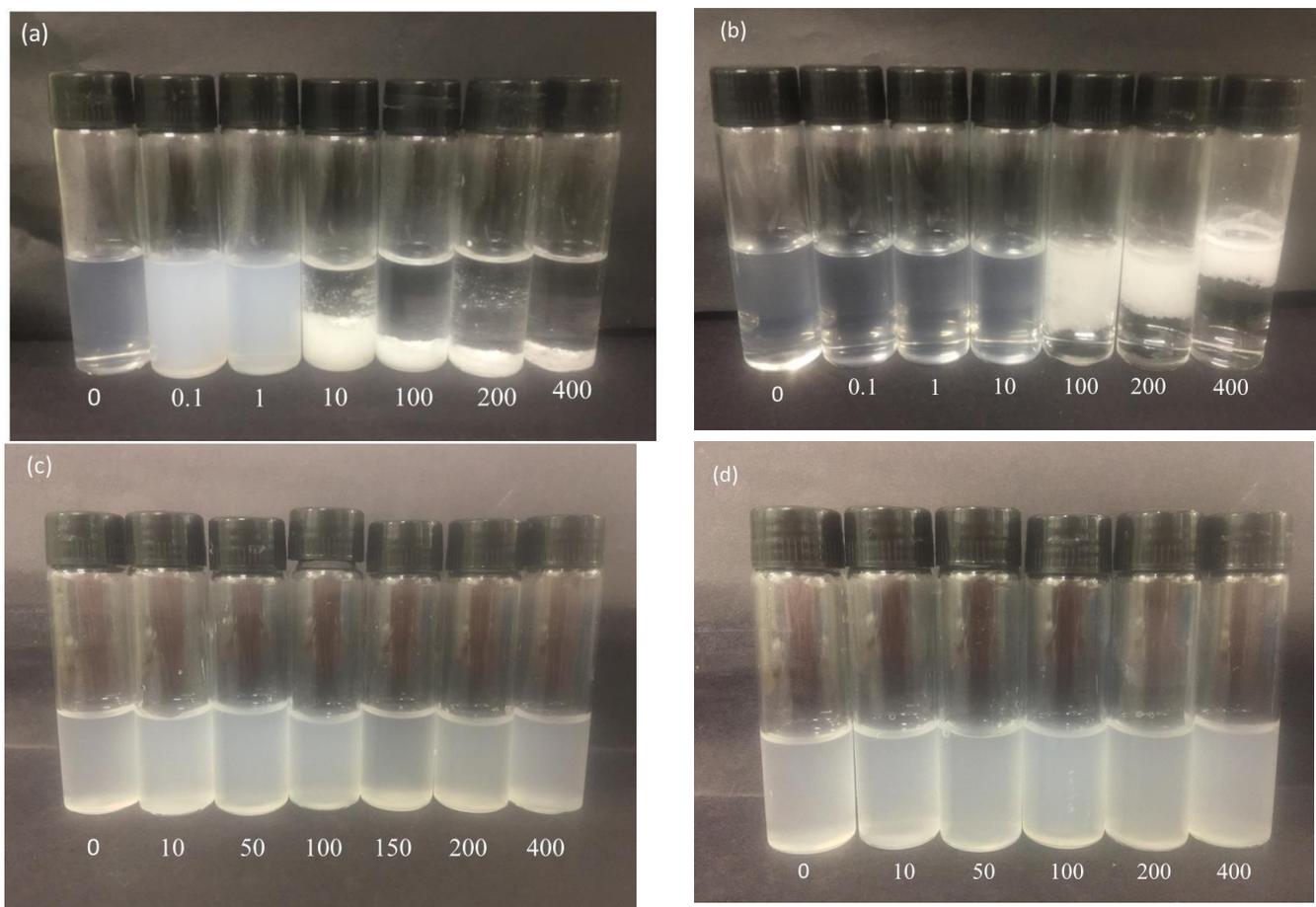
O efeito de NaBr e de NaCl, sobre as vesículas catiônicas de DODAB e de DODAC foi investigado, de modo a manter o mesmo contra íon na dispersão (DODAB/NaBr e DODAC/NaCl). Para fins de comparação, foi também investigado o efeito desses sais nas vesículas *zwitterionicas* de DPPC/NaBr e DPPC/NaCl.

4.1.1.1 Análise visual das amostras

Análise visual, após um dia de preparo das amostras, indicou que as dispersões de DODAB (Figura 10a) e de DODAC (Figura 10b) 1 mM são desestabilizadas, respectivamente, a partir de 10 mM de NaBr e de 100 mM de NaCl. Nestas concentrações ocorreu floculação e separação de fases. Para DODAB/NaBr nas concentrações de 0,1-1 mM de sal (Figura 10a), as amostras são bastantes turvas, pois há formação de estruturas maiores e multivesiculares ou multilamelas. Acima de 10 mM, estas estruturas maiores gerando a desestabilização das amostras. Para DODAC/NaCl o comportamento é diferente, no intervalo de concentração de 0.1-10 mM, as amostras estão pouco turvas e permanecem estáveis. Acima de 10 mM, nota-se a separação de fase e a formação de estruturas de bicamadas menos densa.

A polarização dos íons Br^- é maior e interagem mais fortemente com as vesículas de DODAB quando comparado com os íons Cl^- com as vesículas de DODAC. As dispersões de DPPC permanecem turvas, relativamente estáveis até 400 mM de NaCl ou de NaBr, demonstrando que esses íons interagem menos com DPPC, (Figura 10c e 10d), devido o dipolo elétrico presente no DPPC.

Figura 10 - Imagens de amostras de dispersões aquosas de (a) DODAB/NaBr, (b) DODAC/NaCl, (c) DPPC/NaCl e (d) DPPC/NaBr, nas concentrações de 0,1- 400 mM de sal, após um dia do preparo. Amostras foram mantidas a 25 °C.



Fonte: Elaborado pela autora.

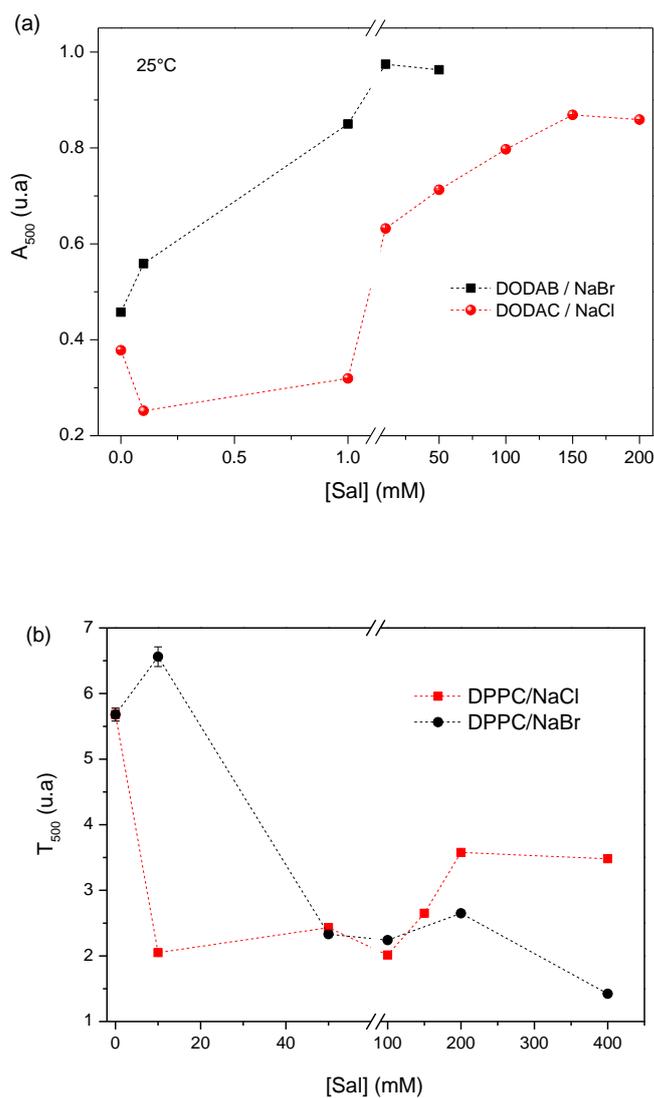
4.1.1.2 Resultados de espectrofotometria UV-Vis

As medidas de turbidez (A_λ) e transmitância (T_λ), realizadas em triplicata (25 °C), nos comprimentos de onda $\lambda = 250$ (região do UV), 400 e 500 nm (região do visível), apresentaram comportamentos semelhantes entre si. Por isso são apresentados e discutidos aqui apenas os valores obtidos para 500 nm, A_{500} e T_{500} .

De acordo com a Figura 11a, a turbidez da dispersão de DODAB tende a aumentar em função da concentração de NaBr, sugerindo a formação de estruturas maiores, saturando (turbidez > 1) a partir de 20 mM do sal. Nas dispersões de DODAC, a adição de até 1 mM de NaCl diminui ligeiramente o valor da turbidez; acima de 10 mM, a turbidez aumenta rapidamente (para 0,8), indicando possível transição estrutural (vesículas uni- para multilamelares) e, conseqüentemente, aumento de tamanho,

tornando as vesículas comparáveis (embora menores) às vesículas de DODAB em solução de NaBr, conforme reportado [FEITOSA; BARRELEIRO, 2004]. De modo geral, as vesículas de DODAB em água tendem a formar estruturas maiores com maior turbidez do que DODAC.

Figura 11– Efeito da concentração de sal na (a) A_{500} e na (b) T_{500} de dispersões de DODAB, DODAC ou DPPC 1 mM (25°C).



Fonte: Elaborado pela autora.

A turbidez da dispersão aquosa de DPPC (1 mM) excede a unidade (sinal saturado). Por esse motivo, monitorou o efeito de NaBr e de NaCl na transmitância dessas vesículas (Figura 11b). Estas medidas foram realizadas em triplicata, nas mesmas condições de temperatura e de comprimento de onda da radiação incidente das medidas de turbidez.

De acordo com a Figura 11b, a adição de NaCl e NaBr às dispersões de DPPC afeta de maneira distinta a transmitância da amostra, indicando ação diferenciada dos íons Br^- e Cl^- na estrutura dessas vesículas. Na ausência de sal, $T_{500} \approx 5,5$ u.a, a adição de 10 mM de NaCl, reduz o valor de T_{500} para 2 u.a; com a adição de até 200 mM do sal, T_{500} aumenta suavemente para 3,5, permanecendo constante acima desta concentração. Os resultados sugerem que, na presença de quantidade crescente de NaCl, o tamanho das vesículas de DPPC inicialmente aumenta consideravelmente para, em seguida, diminuir ligeiramente até saturação. Na presença de NaBr, T_{500} aumenta para 6,5 (na presença de 10 mM do sal), diminuindo em seguida, para 2,5 u.a, na presença de 50 mM, mantendo-se nesse valor até 200 mM do sal, e diminuindo para 1,5 de 300-400 mM.

De acordo com estes dados, NaBr inicialmente diminui ligeiramente o tamanho das vesículas de DODAB, aumentando em seguida até a saturação. A redução final da transmitância pode estar relacionada à formação de estruturas maiores e multilamelares.

Considerando a estrutura molecular de DPPC, o grupo positivo (N^+) fica mais protegido na bicamada, dificultando sua interação com os ânions Br^- e Cl^- . No entanto, o raio iônico do Br^- por ser maior, tem menor acesso a N^+ , causando maior efeito de blindagem eletrostática e, portanto, menor efeito geral sobre o tamanho das vesículas.

4.1.1.3 Resultados de DSC

A Calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica que permite estudar os efeitos térmicos da concentração anfifílica e de aditivos em bicamadas anfifílicas em geral e de vesículas de DODAC, DODAB e DPPC em particular.

Em água, os termogramas de aquecimento e resfriamento de DODAC 1 mM apresentam uma única transição térmica de estado gel-líquido cristal (LC), em torno de $T_m = 49,0$ °C ($\Delta T_{1/2 m} = 0,3$ °C) e $T'_m = 44,0$ °C ($\Delta T'_{1/2 m} = 0,9$ °C), respectivamente (Figura 12a e 12b). Há, portanto uma histerese térmica, $\Delta T_m = T_m - T'_m = 5$ °C para

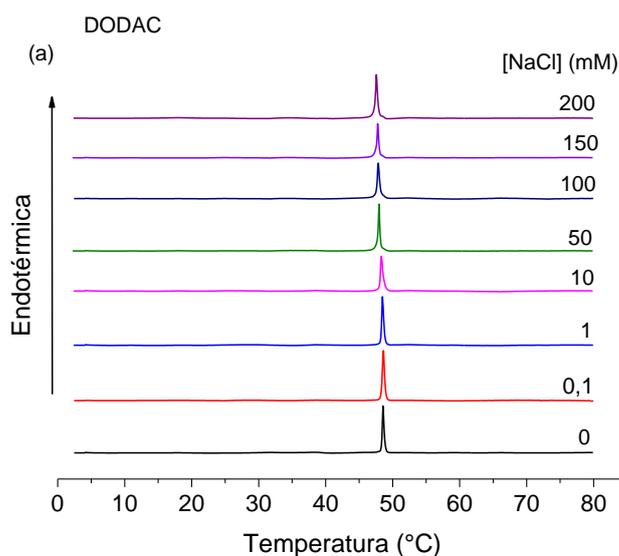
DODAC (Tabela 3) em água, conforme reportado anteriormente [FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000].

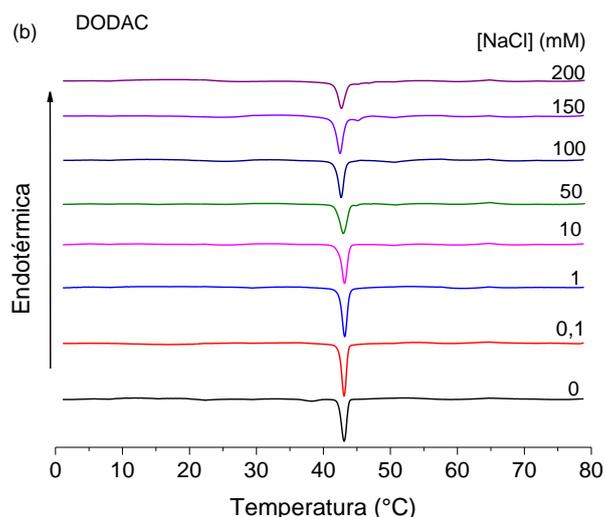
Na presença de NaCl, os termogramas de aquecimento e resfriamento de DODAC também são unimodais e os valores dessas temperaturas de transição diminuem de até 1,5 °C com o aumento da concentração do sal, tornando a bicamada mais fluida, devido ao aumento da hidratação, ocasionada pela proximidade do contra íon Cl⁻ da bicamada.

Portanto, a organização das moléculas de DODAC em água e em solução de NaCl não difere muito entre si e a transição reversa, LC para gel, é ligeiramente mais lenta. A entalpia da transição de aquecimento (ΔH_m) e de resfriamento ($\Delta H'_m$) diminui, respectivamente, de 50 para 36 kJ/mol, e de 51 para 35 kJ/mol com a adição de 0,2 M de NaCl, devido à alteração na camada de solvatação da vesícula. Diminuindo a força de repulsão eletrostática entre os lipídios adjacentes e facilitando a transição (Tabela 3).

No geral, esses dados indicam que com 200 mM de NaCl, as estruturas das vesículas de DODAC são preservadas, pois o pico de transição se mantém. Resultado importante, pois nesta faixa de concentração encontra-se a condição do soro fisiológico (ca 150 mM de NaCl).

Figura 12 – Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DODAC (1 mM) em água e concentração crescente de NaCl.





Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 3- Parâmetros térmicos de dispersões de DODAC (1 mM), na ausência e na presença de NaCl, obtidos por análise dos termogramas de DSC no aquecimento e no resfriamento.

[NaCl] (mM)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T'_m (°C)	$\Delta H'_m$ (kJ/mol)	$\Delta T'_{1/2m}$ (°C)	$\Delta T'_m$ (°C)
0	49,0	49,5	0,3	44,0	51,4	0,9	5,0
0,1	48,4	31,7	0,3	43,0	34,0	0,8	5,4
1	48,5	32,0	0,3	43,2	35,0	0,9	5,3
10	48,3	30,0	0,4	43,2	29,4	0,9	5,1
50	48,0	31,9	0,3	43,0	27,0	1,3	5,0
100	47,9	32,7	0,4	42,6	28,5	1,0	5,3
150	47,7	34,8	0,3	42,5	27,2	1,2	5,2
200	47,5	36,2	0,3	42,4	34,8	1,1	5,1

Fonte: Elaborado pela autora.

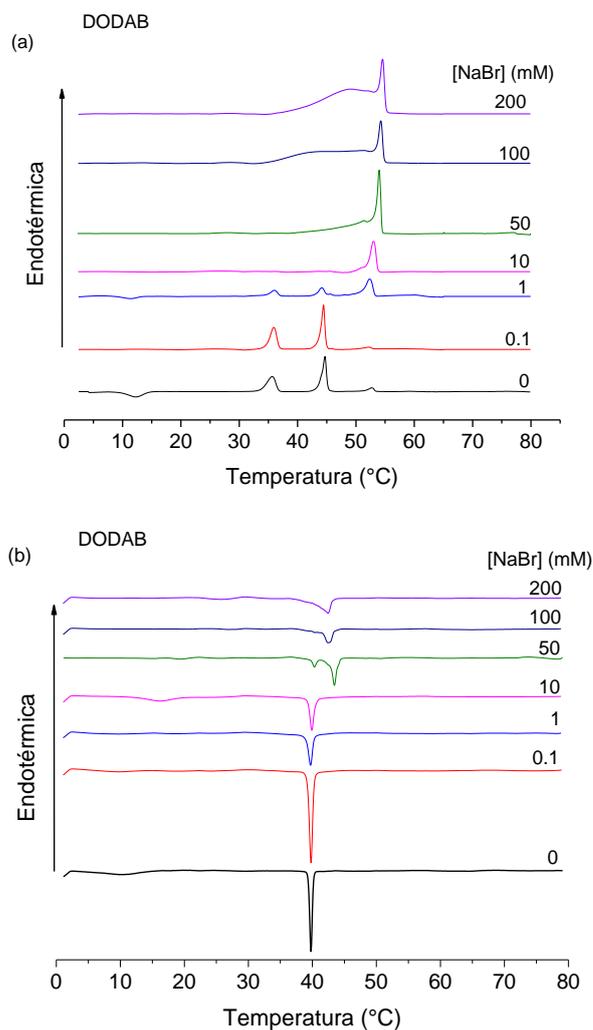
Os termogramas de aquecimento de DODAB (1 mM) em água, apresentam tipicamente três transições, Figura 13a, nas temperaturas $T_s = 36,0$ °C, $T_m = 45,0$ °C, e $T_p = 52,0$ °C, atribuídas às transições do estado gel-estado intermediário (em T_s), do estado intermediário-LC (em T_m) de vesículas unilamelares, e do estado gel-LC (T_p) de estruturas multilamelares (mais complexas), que coexistem com as vesículas unilamelares, conforme reportado anteriormente [FEITOSA *et al.*, 2012]. O termograma multipicos indica que a 1 mM DODAB se associa em estruturas maiores do que DODAC [FEITOSA, LEMOS, KARLSSON, 2019].

O comportamento térmico das vesículas de DODAB é alterado consideravelmente na presença de NaBr (Figura 13a e 13b; Tabela 4 e 5). Até 1 mM de NaBr, as estruturas uni- e multilamelares das vesículas de DODAB são preservadas com algumas variações nos valores na intensidade, posição e largura de pico. Até 1 mM do sal, o pico da pós-transição é pequeno, tornando-se significativo a partir de 1 mM, sugerindo que 0,1 mM de NaBr favorece as vesículas unilamelares e, acima de 1 mM do sal, as estruturas multilamelares são favorecidas com o aumento da concentração.

A partir de 10 mM de NaBr surge uma banda larga à esquerda do pico da pós-transição, cuja intensidade aumenta com o aumento da concentração do sal (Figura 13a). A razão dessa banda está possivelmente relacionada à formação de flocos (estruturas macroscópicas) devido à desestabilização das vesículas, conforme observado na Figura 10a. O valor de ΔH_p , reportado na Tabela 4, leva em conta essa banda e, portanto, não tem significado físico, exceto que a entalpia total aumenta e, aparentemente, a intensidade do pico em T_p diminui, indicando que a entalpia associada à banda (de flocação) aumenta a instabilidade das vesículas com o aumento da concentração de NaBr.

No resfriamento, Figura 13b e Tabela 5, os termogramas apresentam uma única exoterma, em $T'_m \approx 40^\circ\text{C}$ (exceção para 50 mM do sal, que apresenta duas transições, características de região de transição), confirmando, portanto, a existência de estruturas de bicamada de DODAB até a região de desestabilização das vesículas, em torno de 50 mM do sal. Em 50 mM de NaBr, o valor de T'_p é maior e igual a $43,4^\circ\text{C}$ e diminui com o aumento da concentração do sal (possui outro comportamento). A entalpia $\Delta H'_m$ da transição reversa tende a diminuir, de 54 para 8 kJ/mol quando a concentração de NaBr aumenta até 50 mM. Acima de 50 mM do sal, a entalpia varia entre 29 e 37 kJ/mol, que corresponde à superposição de picos, provavelmente devido à formação de estruturas complexas de agregados.

Figura 13 – Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DODAB (1 mM) em água e concentração crescente de NaBr.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 4 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAB (1 mM), na ausência e na presença de NaBr, obtidos por análise dos termogramas de DSC, no modo aquecimento.

[NaBr] (mM)	T_s (°C)	ΔH_s (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2s}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T_p (°C)	ΔH_p (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2p}$ (°C)
0	35,6	42,9	1,6	45,0	54,4	0,7	52,0	9,1	0,9
0,1	36,0	49,7	1,3	44,4	60,7	0,7	52,2	7,0	1,9
1	36,0	15,5	1,4	44,2	20,6	1,2	52,3	44,9	1,4
10	-	-	-	-	-	-	53,0	61,2	1,0
50	-	-	-	-	-	-	54,0	198,2	1,0
100	-	-	-	-	-	-	54,2	322,0	1,0
200	-	-	-	-	-	-	54,5	455,0	1,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAB (1 mM), na ausência e na presença de NaBr, obtidos por análise dos termogramas de DSC, no modo resfriamento.

[NaBr] (mM)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T_p (°C)	ΔH_p (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2p}$ (°C)	ΔT_m
0	40,0	53,9	0,5	-	-	-	5,0
0,1	40,0	62,4	0,6	-	-	-	4,4
1	39,8	29,7	0,7	-	-	-	4,4
10	40,0	29,0	0,6	-	-	-	-
50	40,3	8,4	0,7	43,4	28,7	0,7	-
100	-	-	-	42,5	25,0	1,2	-
200	-	-	-	42,4	36,7	2,0	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Importante notar que não existe um pico bem definido correspondente à transição inversa da banda larga do aquecimento, sugerindo que, no resfriamento, os flocos de bicamadas têm cinética lenta. Os diferentes valores da largura dos picos das transições reversas, $\Delta T'_{1/2m} \approx 0,6$ °C e $\Delta T'_{1/2p} \approx 0,7-2,0$ °C indicam cooperatividades distintas dessas transições.

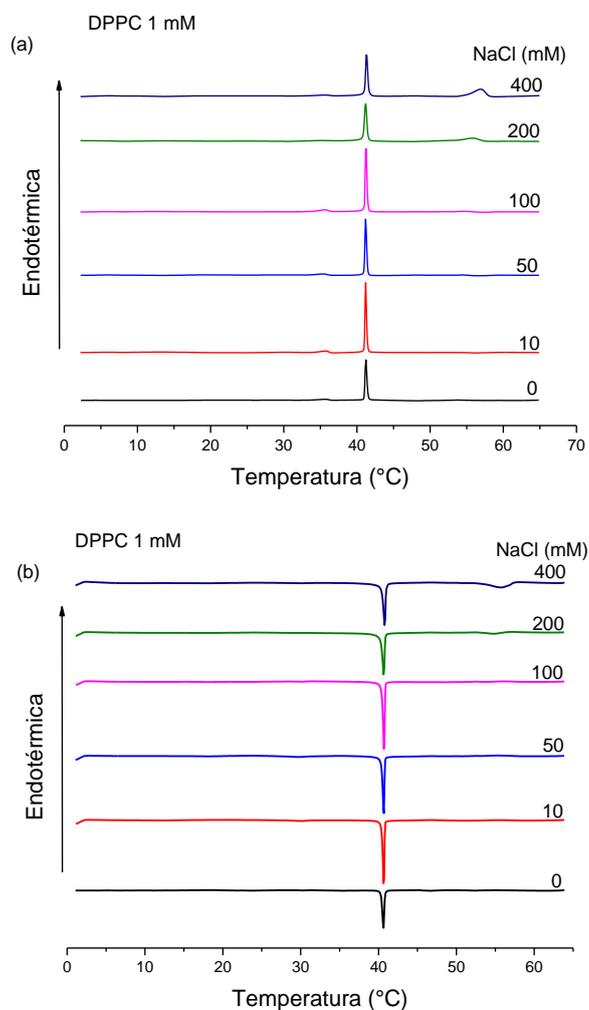
Os dados acima indicam histereses térmicas, $\Delta T_m \approx 4-5$ °C e $\Delta T_p \approx 10-12$ °C, indicando diferentes organizações dos lipídios nos agregados, com diferentes taxas de reorganização da bicamada no aquecimento e resfriamento.

O termograma de DPPC em água, no aquecimento e resfriamento (Figura 14a e 14b e Tabela 6) é dominado pelo pico da transição do estado gel-LC, respectivamente em $T_m = 41,2$ °C, e em $T'_m = 40,6$ °C, ocorrendo, portanto, uma pequena histerese, $\Delta T_m = 0,6$ °C. No aquecimento, $\Delta H_m \approx 23$ kJ/mol e, no resfriamento, $\Delta H'_m \approx 18,8$ kJ/mol. $\Delta T_{1/2m} \approx 0,3$ °C aquecimento e resfriamento indica que a transição é altamente cooperativa. É possível notar uma pequena pré-transição de DPPC e água em $T_p \approx 36$ °C que por ser muito pequena não foi analisada neste estudo. Essa pré-transição tem sido reportada na literatura [NAUMANN, BRUMM, BAYERL, 1992], e se torna mais evidente em concentrações maiores deste anfifílico. A Tabela 6 resume os valores dos parâmetros térmicos das dispersões aquosas de DPPC, na ausência e presença de NaCl.

No aquecimento, em concentrações de NaCl abaixo de 100 mM, os termogramas apresentam apenas uma transição de estado gel-LC, em $T_m = 41,2$ °C e $\Delta H_m \approx 23-28$ kJ/mol, a largura do pico praticamente não varia, indicando a predominância de vesículas unilamelares. No resfriamento, o comportamento das exotérmicas e dos parâmetros térmicos semelhantes (mas reverso) ao modo aquecimento (Figura 14b).

De modo geral, até de NaCl, as vesículas de DPPC são pouco alterado, pois os parâmetros térmicos da transição são pouco alterados, demonstrando baixa interação com Cl⁻, este efeito pode se relacionar com a estrutura de lamelas formada por DPPC. Acima de 100 mM de NaCl, os termogramas apresentaram um pequeno pico de pós-transição em $T_p \approx 57-58\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_p \approx 13-21\text{ kJ/mol}$, e $\Delta T_{1/2p} \approx 2,5\text{ }^\circ\text{C}$ (Tabela 6), que, analogamente a DODAB, pode estar relacionada à formação de estruturas multilamelares, com $T_p > T_m$. Na transição inversa, $T'_p \approx 56\text{ }^\circ\text{C}$, histerese de $\Delta T_p \approx 2\text{ }^\circ\text{C}$. Vemos, assim, que o comportamento térmico das dispersões de DPPC se assemelham mais às de DODAB do que de DODAC.

Figura 14 – Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DPPC (1 mM) em água e concentração crescente de NaCl.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 6 - Parâmetros térmicos de dispersões de DPPC (1 mM) em NaCl obtidos, no aquecimento e resfriamento.

[NaCl] (mM)	T _m (°C)	ΔH _m (kJ/mol)	ΔT _{1/2m} (°C)	T _p (°C)	ΔH _p (kJ/mol)	ΔT _{1/2p} (°C)	T _m (°C)	ΔH _m (kJ/mol)	ΔT _{1/2m} (°C)	ΔT _m (°C)
0	41,2	23,0	0,3	-	-	-	40,6	18,8	0,3	0,6
10	41,2	31,7	0,2	-	-	-	40,6	29,0	0,2	0,6
50	41,2	28,4	0,2	-	-	-	40,6	27,6	0,3	0,6
100	41,3	35,5	0,2	-	-	-	40,7	32,5	0,2	0,6
200	41,2	29,4	0,3	55,8	13,0	2,5	40,6	29,6	0,3	0,6
400	41,2	29,4	0,3	57,0	21,0	1,8	40,7	28,6	0,3	0,5

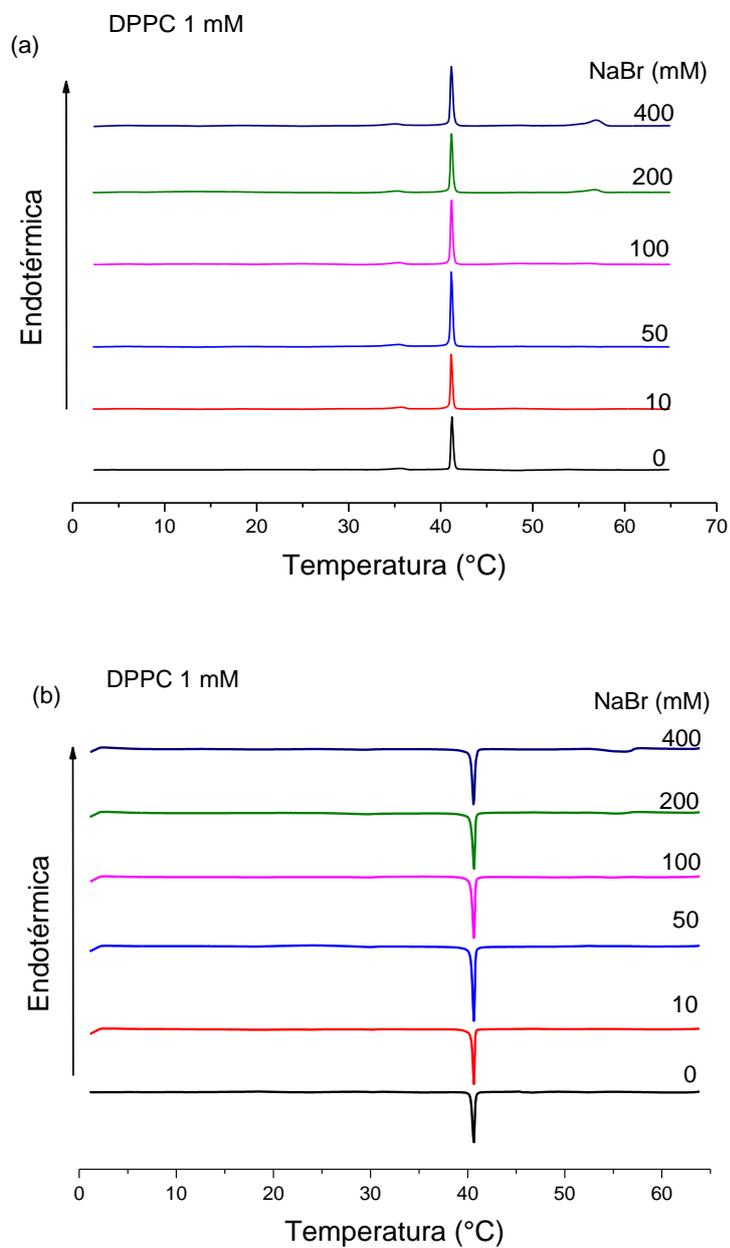
Fonte: Elaborado pela autora.

Os termogramas de DSC e os valores dos parâmetros térmicos das dispersões de DPPC (1 mM), na ausência e na presença de NaBr, são apresentados na Figura 15a e 15b e Tabela 7. Com o aumento da concentração de NaBr, T_m de DPPC não varia, a entalpia ΔH_m tende a aumentar, indicando maior gasto energético para alterar a fluidez da bicamada, mantendo a velocidade da transição praticamente constante (ΔT_{1/2m} ≈ 0,3 °C). No modo resfriamento, observa-se a mesma tendência do aquecimento, e a histerese não se altera, ΔT_m = 0,6 °C.

Comparando os termogramas das Figuras 14 e 15, os efeitos semelhantes de NaCl e de NaBr. A partir de 200 mM desses sais, o pico de pós-transição aparece. O valor de T_p após adição de NaBr 200 e 400 mM é T_p ≈ 57 °C.

Os dados de DSC para DODAB, DODAC e DPPC indicam maior interação do íon Br⁻ (do que Cl⁻), causando maior instabilidade nas vesículas de DODAB. O limite de estabilidade é cerca de quatro vezes maior para DODAC do que para DODAB, respectivamente 200 e 50 mM de sal adicionado. A razão para isso pode estar relacionado às características desses contra íons, como a eletronegatividade, polarizabilidade e raio de hidratação [FEITOSA; LEMOS ADATI 2019, FEITOSA; BARRELEIRO, 2004]. Vesículas de DPPC são mais resistentes (estáveis) a esses sais (NaBr e NaCl), conforme os dados mostrados acima, ou seja, em função do aumento da concentração de sal as vesículas de DODAB e DODAC são mais alteradas comparadas as vesículas de DPPC.

Figura 15 – Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DPPC (1 mM) em água e concentração crescente de NaBr.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7 - Parâmetros térmicos de dispersões de DPPC (1 mM) em NaBr, obtidos no aquecimento e no resfriamento.

NaBr (mM)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	ΔT_m (°C)
0	41,2	23,0	0,3]	18,8	0,3	0,6
10	41,2	21,6	0,3	40,6	18,7	0,3	0,6
50	41,2	31,7	0,3	40,6	29,9	0,3	0,6
100	41,2	27,0	0,2	40,6	24,3	0,3	0,6
200	41,2	26,1	0,2	40,6	24,3	0,3	0,6
400	41,2	29,6	0,2	40,6	27,0	0,2	0,6

Fonte: Elaborada pela autora.

Efeito semelhante foi observado por Nascimento e cols. [NASCIMENTO *et al.*, 1998] para vesículas de haleto de dioctadecildimetilamônio. Segundo esses autores, íons menos hidratados produzem bicamadas menos rígidas com valores de T_m menores. Assim, Cl^- (mais hidratado), forma bicamada mais hidratada e diminui a repulsão eletrostática entre os grupos polares de DODAC, tornando a bicamada das vesículas mais rígidas e estáveis com relação a DODAB. Esses autores verificaram também repulsões eletrostáticas mais fortes entre os monômeros adjacentes na bicamada de DODAB, contendo Br^- , que formam vesículas maiores e menos estáveis do que DODAC e DPPC.

Comparado a DODAB e DODAC, as vesículas de DPPC são mais resistentes a sal, devido à menor interação. Importante aqui destacar a estabilidade das vesículas de DODAC na presença de NaCl 0,15 M (condição fisiológica), possibilitando seu uso com função bactericida ou carreadora quando essas vesículas catiônicas são dispersas em soro fisiológico (SF), a ser discutido mais adiante nesta Tese.

4.1.1.4 Resultados de DLS

O DLS é uma técnica que permite obter o diâmetro hidrodinâmico (D_H) e a polidispersidade das vesículas, em função da concentração anfifílica ou de aditivos. Portanto, esta técnica é útil para análise de alterações estruturais nas vesículas. As dispersões de DODAC, DODAB e DPPC (1 mM) são dominadas por duas populações de estruturas vesiculares com tamanhos distintos [FEITOSA; KARLSSON, EDWARDS, 2006a, SOOK, *et al.*, 2007]. As estruturas menores apresentam tamanhos compatíveis com as vesículas unilamelares, enquanto as estruturas maiores referem-se a vesículas grandes, no caso de DODAC, ou estruturas de bicamada mais complexas, no caso do DODAB, como foi relatado por Feitosa e cols. [FEITOSA, *et al.* 2012].

Na tentativa de relacionar o comportamento térmico e o D_H das estruturas constituídas por DODAC, DODAB e DPPC, em função da concentração de NaBr ou de NaCl (Figura 16), onde DODAB e DODAC em solução salina contêm duas populações com D_H distintos, as medidas de D_H para as dispersões de DODAC/NaCl e DODAB/NaBr foram realizadas até 10 mM de sal no mesmo dia do preparo das amostras; acima dessa concentração, as amostras foram completamente desestabilizadas (Figura 10).

Para primeira população de vesículas (Ves), DODAC/NaCl (Figura 16a), D_H aumenta de 250 para 850 nm em função da concentração de NaCl; um aumento mais pronunciado ocorre inicialmente após a adição de 0,5 mM de NaCl. Para DODAB/NaBr (Figura 16b), por outro lado, D_H diminui suavemente de 800 para 640 nm até 10 mM de NaBr. A tendência geral, com a adição desses sais em DODAB e DODAC é a formação de vesículas com maior camada de solvatação e a blindagem eletrostática.

Para DPPC/NaCl, Figura 16c, o D_H diminui de 800 para 600 nm, exceto no intervalo de 10 a 50 mM de NaBr em que há um aumento pronunciado próximo de 980 nm, após este intervalo diminui suavemente. Já DPPC/NaBr apresentou o D_H com diminuição de 770 para 530 nm, comportamento distinto do observado para DODAC/NaCl e DODAB/NaBr.

As estruturas maiores (segunda população) formadas pelas dispersões de DODAB e DODAC apresentam um comportamento distinto em função do acréscimo de sal. Por exemplo, em 0,5 mM de NaCl as estruturas de DODAC diminuem, enquanto que, em NaBr, na mesma concentração, as estruturas permanecem constantes. Em geral, DODAC/NaCl (Figura 16a), com D_H de 1700 em água diminuiu para 1200 nm em 0,5

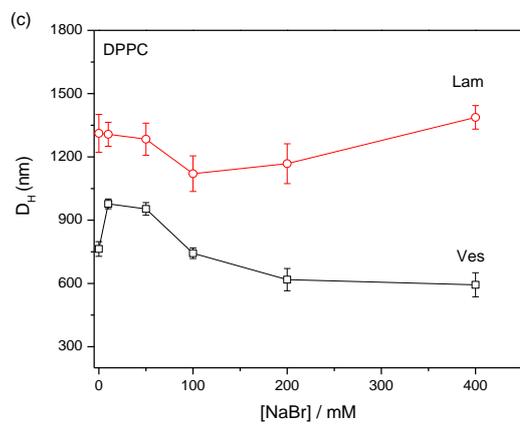
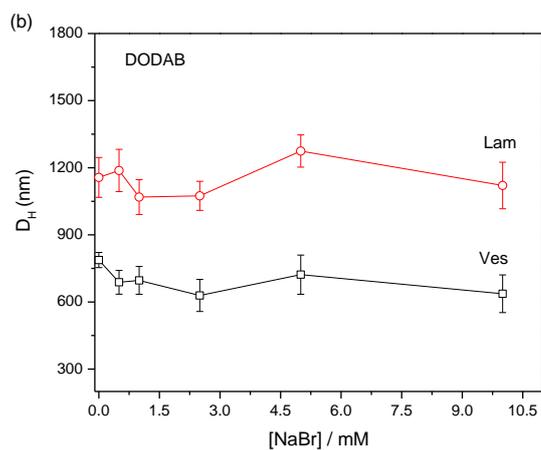
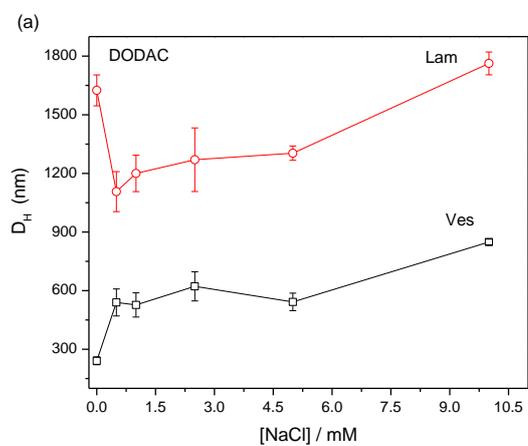
mM de sal, após esta concentração aumenta para 1750 nm, enquanto que DODAB/NaBr (Figura 16b) as estruturas maiores são praticamente constantes com o aumento da concentração de sal, $D_H = 1200$ nm.

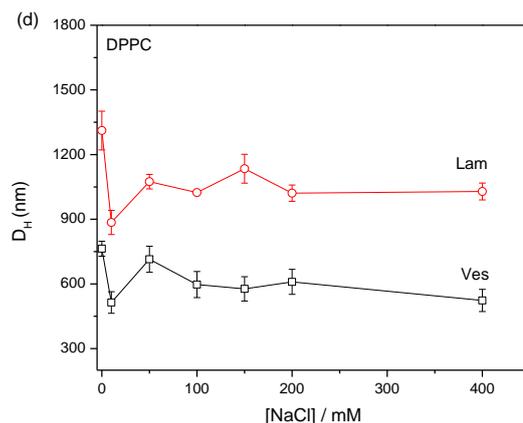
Já para DPPC/NaBr, o D_H aumenta para próximo de 1500 nm (Figura 16c), diferentemente de DPPC/NaCl (Figura 16d) em baixa concentração de sal ($D_H = 900$ nm), e após esta concentração permanece constante em 1100 nm. As populações de estruturas maiores para DPPC apresentam o mesmo perfil das estruturas menores.

De modo geral, com o pequeno acréscimo de sal e o método de preparo podem alterar as estruturas formadas pelos três anfifílicos estudados. Esta alteração no D_H é devida alteração da camada de solvatação e o aumento da blindagem eletrostática, por DODAC e DODAB, gerando maior polidispersividade das amostras. No caso do Cl^- por apresentar maior eletronegatividade comparado ao Br^- , formam-se estruturas maiores, por acomodar maior número de moléculas de água ao seu redor, efeito não observado em excesso de Br^- , com o qual, após a saturação da camada de solvatação as estruturas permanecem com D_H constantes, como foi observado nas dispersões de DODAC e DODAB [FEITOSA; LEMOS, ADATI, 2019].

Ao analisar as estruturas formadas por DPPC, o Br^- consegue penetrar mais a bicamada lipídica *zwitterionicos* que o Cl^- , ou seja, o Cl^- se acomoda melhor gerando maior estabilidade e, logo, estruturas com tamanhos constantes, diferentemente do Br^- , que ao se acomodar pode gerar maior perturbação da bicamada, gerando tamanhos mais irregulares, como foi discutido por Aroti e colaboradores [AROTI *et al.*, 2007].

Figura 16- Medidas no D_H das vesículas de DODAC/NaCl (a), DODAB/NaBr (b), DPPC/NaCl (c) e DPPC/NaBr (d). Resultados obtidos a 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°.





Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.1.5 Resultados de filmes de Langmuir (LF)

Na isoterma π -A de DODAB, mais do que na de DODAC, com água na subfase, a transição de estados não é bem definidas (Figura 17a e 17b), conforme já reportado anteriormente [TAYLOR, DONG, JONES; 1996; HASEGAWA *et al.*, 1997; OLIVEIRA,1992]. Isso se deve, provavelmente, à forte repulsão eletrostática entre os grupos polares catiônicos (maior para DODAB do que para DODAC), comparadas à (menor) repulsão entre os grupos polares *zwitterionicos* de DPPC, cuja isoterma (com água na subfase) apresenta transição de estado bem definida (Figura 17c e 17d).

Inicialmente um grande deslocamento da curva após adição de apenas 0,5 mM do NaBr, além do aparecimento de uma região de transição do estado líquido expandido (LE) para o estado condensado quando $\pi = 10$ -15 mNm^{-1} (Figura 17a).

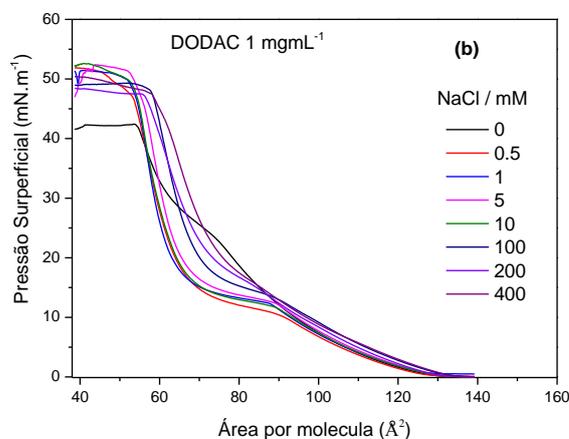
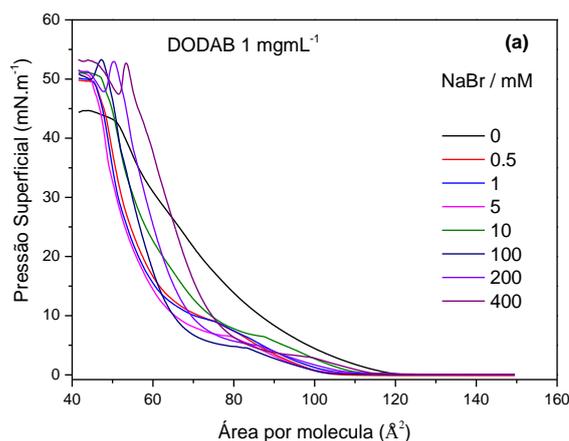
A adição de até 5 mM do sal causa menor efeito de compactação, indicando diminuição de força de repulsão dos lipídios adjacentes na monocamada. Com 10 mM do sal, a curva se desloca para áreas maiores, provavelmente devido à desestabilização do filme, reduzindo a quantidade de lipídios na superfície, que migram para a solução; acima de 10 mM, o sentido do deslocamento da curva depende da pressão; em baixa pressão, a curva se desloca para áreas menores e, em pressões maiores, se desloca para áreas maiores, provavelmente devido à remoção de lipídios da monocamada.

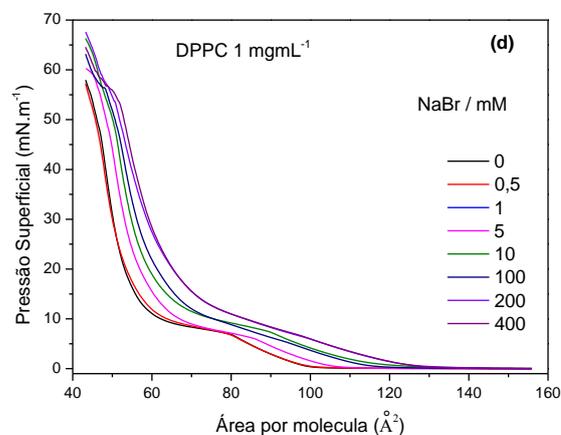
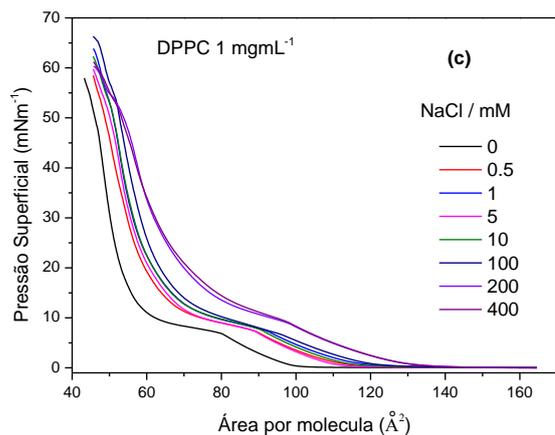
Em geral, o efeito é minimizado em valores de pressão menores (até *ca* 10 mNm^{-1}). Na presença de NaBr, a pressão de colapso aumenta de aproximadamente 45

para 50 mNm^{-1} , indicando menor estabilidade da monocamada, devido a perda de lipídio para subfase.

Em baixas pressões (até *ca* 15 mNm^{-1}), o efeito de NaCl na isoterma de DODAC é pequeno, mas perceptível; na pressão 10 mNm^{-1} , até *ca* 10 mM de NaCl, a curva é deslocada para áreas menores, e para áreas maiores acima desta concentração (Figura 17b), comportamento similar ao de DODAB/NaBr. Na presença de NaCl a transição de estados se torna bem definida (similar a DPPC), porém, em pressão menor (*ca* 15 mNm^{-1}). A pressão de colapso também aumenta de 45 para 50 mNm^{-1} .

Figura 17 - Isotermas π -A de DODAC/NaCl (a), DODAB/NaBr (b), DPPC/NaCl (c) e DPPC/NaBr (d) na ausência e presença do sal na subfase, 25°C .





Fonte: Elaborado pela autora.

As isotermas de DPPC, Figuras 17c e 17d, na ausência e presença de NaCl e NaBr na subfase. Em NaCl, o perfil da isoterma de DPPC/água (Figura 17c) altera-se muito pouco. Após a adição de NaCl, a curva é essencialmente deslocada para áreas moleculares maiores com a transição LE-fase condensada ocorrendo em pressão ligeiramente superior (12 mNm^{-1}) à da pressão na ausência do sal (10 mNm^{-1}).

Entre 0,5 e 100 mM de NaCl, as curvas são deslocadas para áreas moleculares maiores, indicando saturação; acima de 100 mM do sal, a curva sofre novo deslocamento para a direita, praticamente igual para 200 e 400 mM de NaCl, indicando nova saturação. Notamos também que na presença de NaCl a transição do estado gasoso para o estado LE (*lift off*) ocorre em valores de área molecular maiores ($>120 \text{ \AA}^2$) comparado ao valor em água (100 \AA^2). Na presença de NaCl, os nossos dados indicam que o colapso da monocamada ocorre em pressões maiores (o colapso ocorre de fato em

valores de área um pouco menores do que a área mínima mostrada na Figura 17 [AOKI *et al.*, 2008].

Na Figura 17d, após adição de NaBr, a isoterma de DPPC é deslocada para áreas moleculares maiores; o valor do deslocamento depende da quantidade do sal adicionado, e difere do deslocamento observado para DPPC/NaCl (Figura 17c). A adição de 0,5 mM de NaBr praticamente não altera o perfil da curva. Acima desta concentração, nota-se um deslocamento gradativo da curva e do valor do *lift off*. Apesar da tendência de NaBr e de NaCl deslocarem a curva para a direita, a sequência do deslocamento difere de DODAC para DODAB, pela tendência de Br⁻ desestabilizar a monocamada, pois ele consegue penetrar e interagir fortemente, em baixas concentrações, diferentemente do excesso de Cl⁻.

4.1.1.6 Conclusão

O efeito de NaBr e de NaCl, respectivamente em propriedades térmicas e estruturais de vesículas catiônicas de DODAB e de DODAC, de modo a manter o mesmo contra íon na dispersão. Os resultados de turbidez, transmitância, DSC e DLS indicam que as características do sal adicionado influenciam na formação, estrutura e estabilidade das vesículas: Br⁻ interage mais com as vesículas de DODAB e DPPC, gerando maior instabilidade comparado com DODAC/NaCl, que formam vesículas mais estáveis. A estabilidade das vesículas está relacionada às propriedades desses ânions. Comportamento semelhante foi observado na ação desses sais em monocamadas desses anfifílicos (Figura 17).

O efeito observado é favorável a possíveis aplicações farmacológicas dessas vesículas, cujas propriedades podem ser ajustadas pela adição do sal apropriado, conforme discutido nas subseções 4.3 e 4.4 desta Tese, onde se investiga a incorporação de DOX às vesículas.

4.1.2 DODAB/NaCl e DODAC/NaBr

Nesta seção, foi investigado o efeito de NaCl e NaBr, respectivamente nas vesículas e monocamadas de DODAB e DODAC, de modo que o ânion adicionado fosse diferente daqueles do contra íon desses anfífilos. O efeito do sal adicionado influencia na organização das estruturas de bicamadas e monocamadas catiônicas de DODAB ou DODAC. Esse efeito foi investigado pelas técnicas de espectrofotometria UV-Vis, calorimetria diferencial de varredura (DSC), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e filmes de Langmuir (LF).

4.1.2.1 Análise visual das amostras

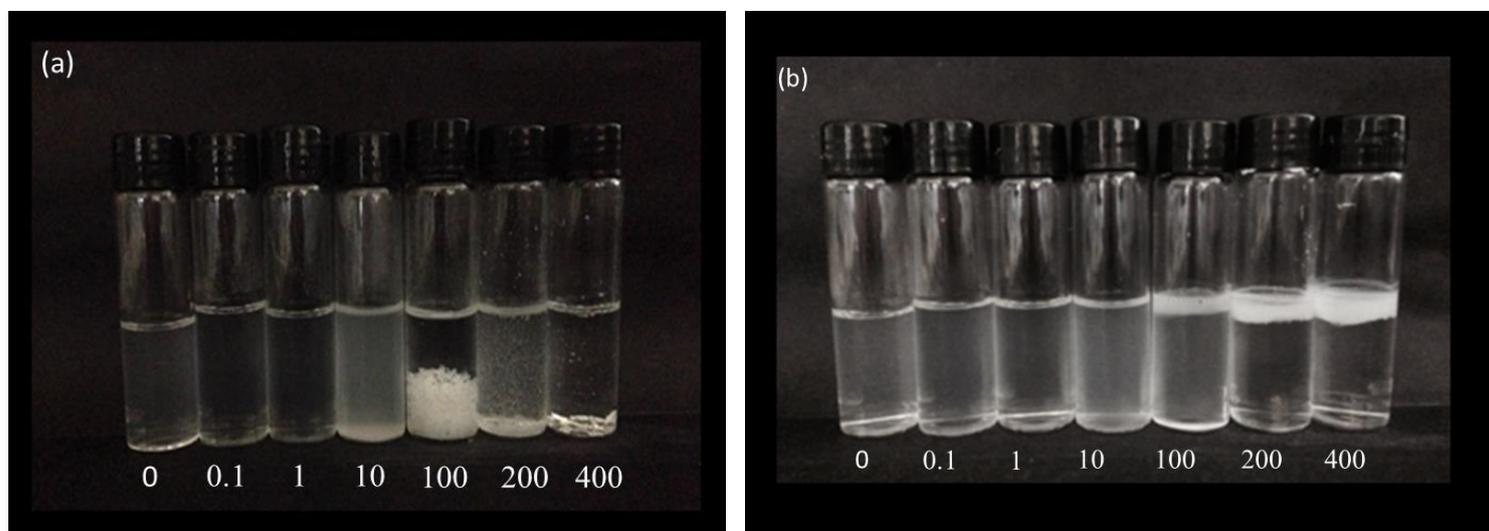
Análise visual das amostras de DODAC/NaBr e DODAB/NaCl (Figura 18), após um dia do preparo, indica que as dispersões de DODAB/NaCl são mais estáveis do que as dispersões de DODAC/NaBr.

De acordo com a Figura 18a dispersões de DODAC/NaBr permanecem estáveis até 10 mM do sal. Após esta concentração, há formação de precipitados. As dispersões de DODAB/NaCl permanecem visualmente estáveis até 400 mM sal, sem precipitados. Porém, em 100 mM de NaCl, uma pequena fase superior pode ser distinguida (Figura 18b), provavelmente devido à formação de uma quantidade crescente de novas estruturas de bicamada. As vesículas de DODAC são majoritariamente desestabilizadas em 100 mM NaBr. Nesta concentração é possível observar agregados macroscópicos e, acima de 100 mM de sal, são formados cristais hidratados (Figura 18a). Deve-se notar também que em 10 mM de NaBr, a dispersão de DODAC/NaBr é altamente turva, indicando formação de estruturas complexas na faixa de 10 a 100 mM de sal.

Feitosa e colaboradores (2019), relataram que o acréscimo de Br^- ou Cl^- , respectivamente, em dispersões aquosas de DODAC e DODAB, substitui parcialmente os contra íons ligados (Cl^- e Br^- , respectivamente) das vesículas, produzindo formação de vesículas mistas de DODAB/DODAC [FEITOSA, LEMOS, ADATI, 2019], semelhante a estudo anterior, realizado pelo grupo, sobre a formação de vesículas da mistura de DODAB e DODAC [FEITOSA, ALVES, 2008]. Portanto, a adição de NaBr e de NaCl nas dispersões dessas vesículas permitem compartilhar os íons Br^- ou Cl^- ,

formando estruturas mistas, e a estabilização é mais evidente em DODAB/NaCl (que se compara como DODAC) comparado a DODAC/NaBr (que se compara como DODAB), em excesso de sal, sendo que dispersões de DODAC são mais estáveis do que de DODAB [FEITOSA, ADATI, LEMOS,2019]. Os resultados obtidos mostram que em excesso do sal adicionado, as dispersões se comportam como em mistura de DODAB e DODAC em água, conforme estudo prévio [FEITOSA, ALVES, 2008].

Figura 18 - Imagens de amostras de dispersões aquosas de (a) DODAC/NaBr e (b) DODAB/NaCl nas concentrações de 0.1- 400 mM de sal (em mM), após um dia do preparo. Amostras foram mantidas a 25 °C.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2.2 Resultados de espectrofotometria UV-Vis

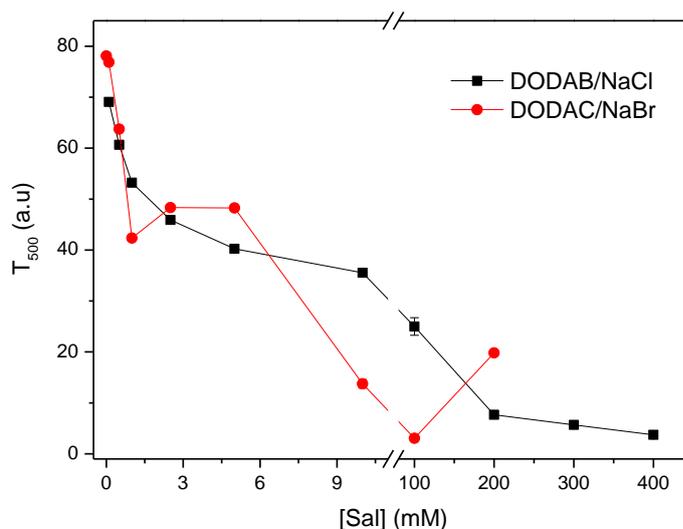
Na presença de sal, a turbidez das dispersões de DODAC e DODAB é superior à unidade (sinal saturado). Portanto, foram realizadas medidas de transmitância (T_λ), em triplicata, em 25°C, no mesmo dia de preparo das amostras, nos comprimentos de onda $\lambda = 250$ (região do ultravioleta), 400 e 500 nm (região do visível), nos quais as medidas apresentaram comportamentos semelhantes entre si. Serão apresentados, a seguir, resultados de transmitância apenas para $\lambda = 500$ nm (T_{500}).

Em geral, a variação no valor da transmitância de dispersões de DODAC/NaBr e DODAB/NaCl indica formação de estruturas maiores e complexas, com a diminuição da transmitância, aumento da turbidez (Figura 19).

Na presença de NaCl, a transmitância de dispersões de DODAB diminui quase continuamente de 70 para 2% (Figura 19), indicando consideráveis alterações estruturais nas vesículas inicialmente predominantemente unilamelares, para, possivelmente, estruturas maiores, compatíveis com a estrutura das vesículas de DODAC, porém, desestabilizadas pelo excesso de sal adicionado, que tendem a ser mais complexa do que a de DODAC (1 mM) na ausência de sal adicionado.

A transmitância de DODAC diminui de forma diferente com a adição de NaBr (Figura 19). Inicialmente diminui rapidamente de 80 para 40% até um patamar em torno de 50% entre 1 e 5 mM do sal, diminuindo novamente para 2%. O aumento final na transmitância se deve provavelmente à desestabilização da amostra, com formação de precipitados. Vale destacar que as vesículas unilamelares de DODAB em solução de NaCl são mais estáveis do que as vesículas de DODAC em solução de NaBr, assim como as vesículas de DODAC são mais estáveis do que as de DODAB em água (sem sal adicionado).

Figura 19 - Transmitância em 500 nm (T_{500}) de DODAB/NaCl e DODAC/NaBr (1 mM), em função da concentração de sal, a 25 °C.



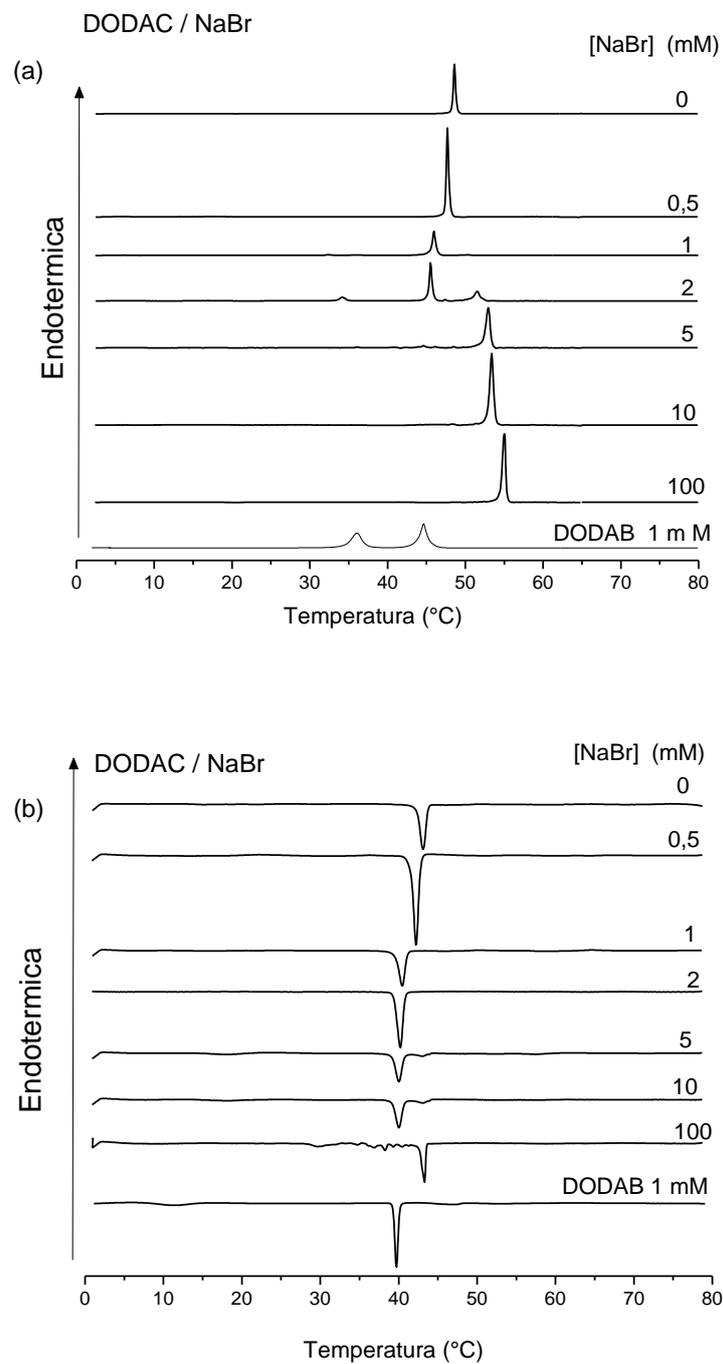
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2.3 Resultados de DSC

O efeito de NaBr no comportamento térmico de vesículas de DODAC (1 mM) é mostrado na Figura 20, onde foram incluídos dados de DODAB em água como padrão de referência. Os parâmetros térmicos são apresentados nas Tabelas 7 e 8 para seus aquecimentos e resfriamentos, respectivamente. Espera-se que, em excesso de NaBr, as vesículas de DODAC se comportem como vesículas de DODAB, e a diferença de comportamento observada pode ser atribuída à formação de vesículas mistas de DODAX, onde X representa a fração de contra íons Br^-/Cl^- ligada às vesículas. Em pequenas concentrações de NaBr (até 2 mM), T_m de DODAC diminui de 48,6 para 45,5 °C, valor comparável ao de DODAB em água (44,6 °C). Tal efeito indica afinidade de Br^- com as vesículas de DODA^+ , pois, nessa faixa de concentração de NaBr, uma fração dos contra íon Cl^- foi substituída por Br^- , prevalecendo vesículas mistas de DODAX, com características de DODAC, prevalecendo a quantidade de Cl^- ligado em $X = \text{Br}^-/\text{Cl}^-$. A entalpia da transição, ΔH_m , diminui de 67,5 para 35,7 kJ/mol (Tabela 8). Na presença de 2 mM de NaBr, o termograma apresenta três picos, indicando coexistência de dois tipos de estruturas, unilamelares (com $T_s = 32,3$ °C e $T_m = 46,0$ °C) e multilamelares, (com $T_p = 50,3$ °C), característico, porém não similar, a dispersões de DODAB em concentrações iguais ou superiores a 1 mM. Em 5 mM do sal, há predominância de estruturas multilamelares (com $T_p = 53,0$ °C). Acima de 5 mM, ocorrem apenas estruturas multilamelares de DODAX, com valores crescentes de $T_p = 53-55$ °C, $\Delta T_{1/2p}$ diminui de 1-0,5 °C, demonstrando aumento da cooperatividade da transição (Figura 20a e Tabela 8).

No resfriamento, Figura 20b e Tabela 9, com o aumento da concentração de NaBr, os termogramas exibem apenas uma exoterma, em T'_m , cujo valor diminui de 43,3 a 39,9 °C. Os valores da T'_m observados estão próximo ao de DODAC ($T'_m = 44$ °C) e DODAB ($T'_m = 40$ °C), respectivamente em pequenas e maiores concentrações; a entalpia, ΔH_m , foi reduzida de 35,2 para 23,7 kJ/mol, característica de estruturas mistas de DODAX. Em 10 mM de NaBr, nota-se uma pequena transição, em $T' \approx 44$ °C, que pode ser indicativo de formação de flocos (desestabilização), evidente em 100 mM do sal (Figura 18).

Figura 20- Termogramas de DSC, no aquecimento e resfriamento, de DODAC (1 mM) em água e solução de NaBr até 100 mM, e de DODAB como referencia.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 8 - Parâmetros térmicos de DODAC (1 mM) em NaBr, no aquecimento.

[NaBr] (mM)	T _s (°C)	ΔH _s (kJ/mol)	ΔT _{1/2s} (°C)	T _m (°C)	ΔH _m (kJ/mol)	ΔT _{1/2m} (°C)	T _p (°C)	ΔH _p (kJ/mol)	ΔT _{1/2p} (°C)
0	-	-	-	48.6	37.0	0.3	-	-	-
0.5	-	-	-	47.7	47.8	0.3	-	-	-
1.0	32.3	0.9	0.8	46.0	28.9	0.4	50.3	1.0	1.0
2.0	34.2	6,7	0.84	45.5	35.7	0.4	51.6	19.7	0.8
5.0	-	-	-	-	-	-	53.0	57.8	0.7
10	-	-	-	-	-	-	53.4	88.3	0.5
100	-	-	-	-	-	-	55.0	73.7	0.5

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 9 - Parâmetros térmicos de DODAC (1 mM) em NaBr ,no resfriamento.

[NaBr] (mM)	T' _m (°C)	ΔH' _m (kJ/mol)	ΔT _{1/2m} (°C)	T' _p (°C)	ΔH' _p (kJ/mol)	ΔT' _{1/2} (°C)	ΔT (°C)
0	43.3	35.2	0.8	-	-	-	5.3
0.5	42.4	34.6	0.7	-	-	-	5.3
1.0	40.6	32.7	0.8	-	-	-	5.4
2.0	40.4	44.5	0.8	-	-	-	5.1
5.0	40.1	28.4	0.9	-	-	-	-
10	39.9	23.7	0.7	43.9	8.8	1.0	-
100	-	-	-	43.5	30.9	0.5	-

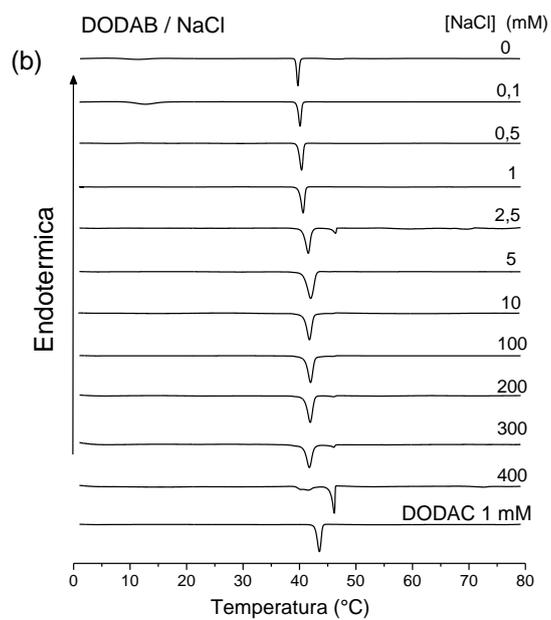
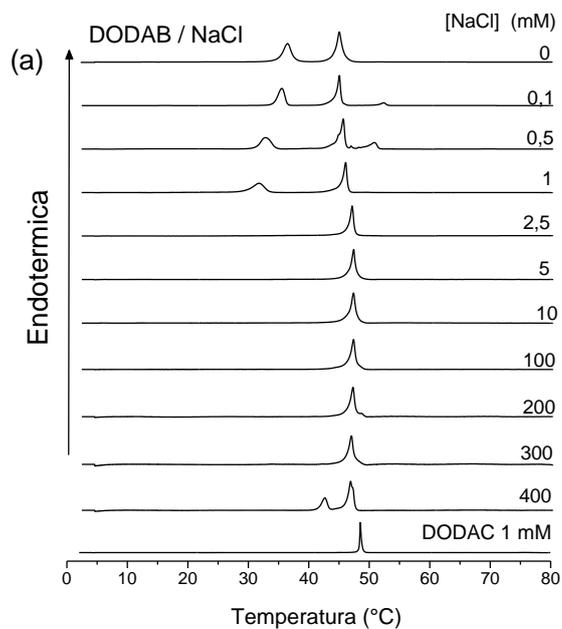
Fonte: Elaborado pela autora.

As dispersões de DODAB 1 mM, Figura 21, permaneceram estáveis até 300 mM de NaCl, dados esses que corroboram os resultados apresentados para DODAC/NaCl. No aquecimento, na presença de até 1 mM de NaCl, os termogramas apresentam duas ou três transições, características das vesículas unilamelares (em T_s ≈ 36 °C e T_m ≈ 45 °C), e de estruturas multilamelares (T_p ≈ 52 °C), característica das dispersões de DODAB em água, Tabela 10. Acima de 1 mM de NaCl, os termogramas exibem uma única transição, em torno de T_m = 46-47 °C; esses valores de T_m estão entre os valores da T_m de DODAB (ca 45 °C) e DODAC (ca 49 °C) em água, indicando também a substituição parcial dos contra íons Br⁻ por Cl⁻, comportamento análogo ao observado para DODAC/NaBr. Próximo de 400 mM de NaCl, observa-se uma transição em torno de 42 °C, indicando mudanças estruturais, talvez devido a desestabilização das vesículas.

No resfriamento até 1 mM de NaCl, os termogramas exibem uma exoterma mais estreita em T'_m ≈ 40-41 °C (Figura 21b e Tabela 11), e a dispersão é dominada por vesículas unilamelares, característica das dispersões de DODAB (com T'_m ≈ 40 °C). Acima de 100 mM, no entanto, esta transição é deslocada para valores maiores, T_p ≈ 46

$^{\circ}\text{C}$, que pode indicar a formação de estruturas de bicamadas mais complexas ($T'_p > T'_m \approx 43^{\circ}\text{C}$), conforme observado para DODAC/NaBr.

Figura 21 - Termogramas de DSC, no aquecimento e resfriamento, de DODAB (1 mM) em solução de NaBr até 100 mM, e de DODAC, usado como referencia.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 10- Parâmetros térmicos de DODAB (1 mM) em concentração crescente de NaCl, obtidos no aquecimento.

[NaCl] (mM)	T _s (°C)	ΔH _s (kJ/mol)	ΔT _{1/2s} (°C)	T _m (°C)	ΔH _m (kJ/mol)	ΔT _{1/2m} (°C)	T _p (°C)	ΔH _p (kJ/mol)	ΔT _{1/2p} (°C)
0	36.0	43.0	1,6	45.0	47,4	0.7	52.0	1.6	0.9
0.1	35.1	37.6	1.3	45.0	49.0	0.6	52.0	15.7	1.1
0.5	23.4	29.5	2.0	45.3	49.0	0.7	50.4	11.0	1.2
1	30.5	28.0	2.2	45.6	47.5	0.7	49.2	11.0	1.1
2.5	-	-	-	46.7	48.0	0.7	-	-	-
5	-	-	-	47.0	47.2	0.7	-	-	-
10	-	-	-	47.0	46.0	0.8	-	-	-
100	-	-	-	47.0	46.0	0.8	-	-	-
200	-	-	-	47.3	40.7	0.8	-	-	-
300	-	-	-	47.0	36.0	0.9	-	-	-
400	-	-	-	46.5	38.0	1.0	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 11- Parâmetros térmicos de DODAB (1 mM) em concentração crescente de NaCl, obtidos durante resfriamento.

[NaCl] (mM)	T' _m (°C)	ΔH' _m (kJ/mol)	ΔT' _{1/2m} (°C)	ΔT (°C)
0	40.0	53.9	0.5	5.0
0.1	40.1	48.0	0.5	5.1
0.5	40.4	50.0	0.7	4.9
1	40.6	47.0	0.7	5.0
2.5	41.5	46.0	0.9	5.2
5	42.0	43.0	0.9	5.0
10	42.0	41.2	0.9	5.0
100	42.0	40.0	1.2	5.0
200	42.0	35.1	1.3	5.3
300	42.0	20.1	1.3	5.0
400	41.5	34.5	1.7	5.0

Fonte: Elaborado pela autora.

Em geral, o valor de T'_m aumenta continuamente com a concentração de NaCl, até um patamar (saturação) em T'_m ≈ 42 °C < T'_m = 43,3 °C de DODAB (vide Tabela 10 e 11). Os resultados obtidos por DSC das dispersões aquosas de DODAB/NaCl e DODAC/NaBr mostram que, em excesso de NaCl, DODAB se comporta como DODAC, enquanto que em excesso de NaBr, o DODAC se comporta como DODAB. A esses sistemas, denominamos de vesículas mistas de DODAX, com múltiplas

características comparáveis a DODAB, DODAC ou mistura DODAB/DODAC. Essas vesículas mistas apresentam valores de T'_m ou T''_m intermediários entre os valores de T'_m de DODAB e DODAC na ausência de sal, assim como maior afinidade por Br^- em comparação com Cl^- .

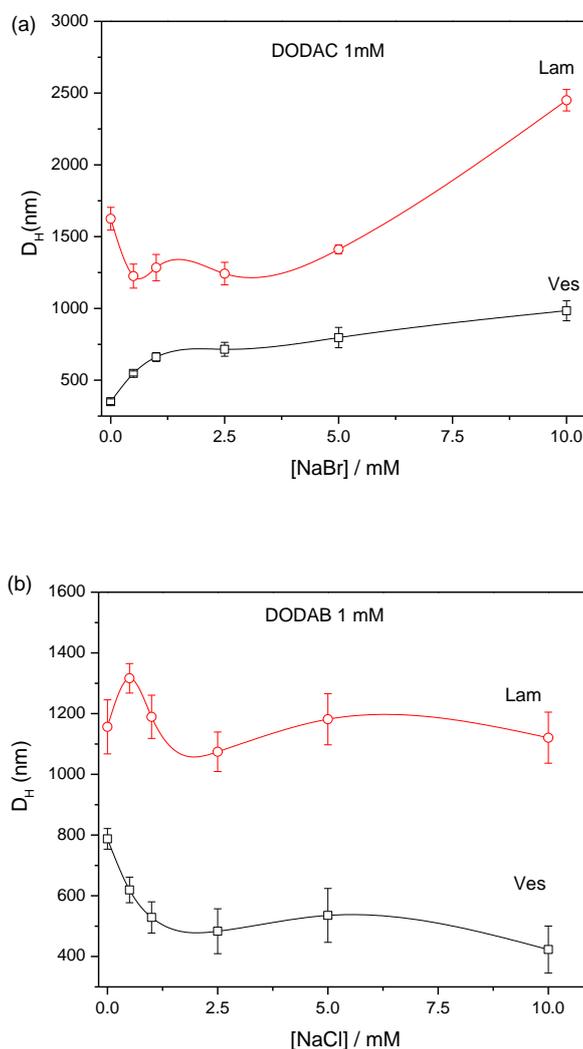
4.1.2.4 Resultados de DLS

As dispersões de DODAC e DODAB apresentam duas populações, com tamanho (D_H) compatíveis de vesículas e vesículas grandes, como foi relatado por Cuccovia (1990) e Feitosa, Lemos e Adati (2019) [CUCCOVIA, *et al.*, 1990; FEITOSA, LEMOS, ADATI, 2019]. Na Figura 22a e 22b, são apresentados as alterações do D_H em função da concentração de sal, para DODAC/NaBr e DODAB/NaCl. Os dados de DLS são apresentados até 10 mM, pois acima desta concentração a função de correlação do espalhamento dinâmico da luz não foi determinada e os tamanhos não foram possíveis de ser calculados.

Para DODAC/NaBr a população com D_H das vesículas aumenta de 400 para 800 nm, com adição de 2 mM de sal, e após 2 mM permanecem entre 800 a 1000 nm, comportamento inverso observado para DODAB/NaCl, que neste mesmo intervalo de concentração diminui de 800 para 400 nm, a tendência é com a adição destes sais ao DODAB e DODAC é a formação de estruturas mistas de DODAB /DODAC com tamanhos menores ou maiores, respectivamente, corroborando assim com os dados de transmitância e DSC.

Para a população de estruturas de bicamadas maiores, DODAC/NaBr o D_H aumenta, predominando estruturas com 1700-3000 nm, efeito contrário observado por DODAB/NaCl, onde as estruturas lamelares permanecem próximo de 1200 nm, considerando o erro experimental. Deve-se notar que o valor mínimo de D_H para DODAC/NaBr é semelhante ao do DODAB/NaCl (Figura 22), o aumento de estruturas complexas em função de NaBr, podem ser atribuídos à não estabilidade do DODAC/NaBr, que se comporta como vesículas mistas. Com a alteração dos contra íons presente na solução, os dados de DLS estão em acordo com os dados de transmitância e DSC, pois, o tamanho das vesículas mistas é comparável às vesículas DODAB e DODAC em água, que exibem duas populações de vesículas e lamelas.

Figura 22 - Medidas de D_H das vesículas de DODAC/NaBr (a) e DODAB/NaCl (b). Resultados obtidos a 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2.5 Resultados de filmes de Langmuir (LF)

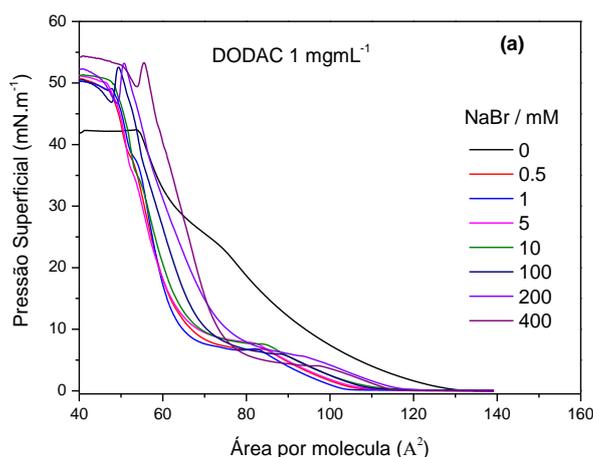
Os filmes de Langmuir de DODAC/NaBr (Figura 23a) e DODAB/NaCl (Figura 23b) foram obtidos em triplicatas, a 25 °C. No intervalo de 0,5-1 mM de sal as curvas de DODAC foram deslocadas para áreas menores e houve o aparecimento de um a região do estado líquido expandido para condensado, semelhante ao observado nas curvas de DODAB/NaBr. De 5-10 mM, observa-se o deslocamento para áreas maiores, devido ao começo da saturação da monocamada, porém, a transição do estado líquida expandida para condensado se conserva. Acima de 100 mM, é menor o efeito de

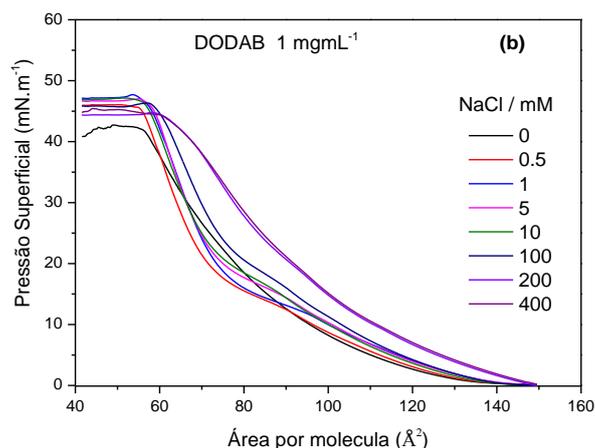
compactação, indicando saturação da monocamada e as curvas apresentam deslocamentos para áreas maiores e menores, devido à remoção de lipídios da superfície. Não foi evidente a troca iônica, pois as curvas de DODAC/NaBr não se aproximaram de DODAB em água, nesta faixa de concentração estudada, Figura 23a.

Figura 23b, em baixas concentrações de NaCl as curvas de DODAB apresentam o mesmo comportamento das curvas de DODAC/NaBr. Porém, no intervalo de 5-10 mM as curvas de DODAB/NaCl se aproximaram da curva de DODAC em água, efeito não observado para DODAC/NaBr, padrão característico das curvas de DODAX. Acima de 100 mM de NaCl o mesmo comportamento observado para de DODAC/NaBr indicando saturação da monocamada. Em concentrações maiores de sal, esses resultados são comparáveis aos de DPPC/sal (Figura 6c e 6d), pois, nessas condições, as cargas eletrostáticas de DODAB e DODAB nas bicamadas são parcialmente blindadas, e o comportamento se assemelha ao de vesículas neutras (ou *zwitteriônicas*).

De modo geral, o Cl^- , por apresentar maior eletronegatividade comparado ao Br^- , consegue se acomodar na monocamada gerando maior área por molécula e por acomodar maior número de moléculas de água ao seu redor, efeito não observado em excesso de Br^- [FEITOSA; LEMOS, ADATI, 2019, KOELSCH, *et al.*, 2007].

Figura 23- Isotermas π -A de DODAC/NaBr (a) e DODAB/NaCl (b), na ausência e presença do sal na subfase aquosa, 25 °C.





Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2.6 Conclusão

O estudo do efeito de NaCl e NaBr nas vesículas e monocamadas de DODAB e DODAC, respectivamente, quando o ânion adicionado foi diferente do contra íon desses anfífilos, pode ser útil na aplicação de vesículas catiônicas e na compreensão das monocamadas, considerando as características anfífilas e a força iônica do meio com diferentes contra íons.

A formação de estruturas de bicamadas mistas de DODAB/DODAC, foi evidenciada por transmitância, DSC e DLS e explicada pela troca parcial entre Br⁻ e Cl⁻ na cabeça polar desse lipídios. Para as monocamadas não ficou evidenciada a possível troca iônica. No geral, o comportamento da dispersão e das monocamadas de DODAC e DODAB vai depender das características do sal e da quantidade do ânion adicionada.

As estruturas de bicamada mistas formadas exibiram transições semelhantes às dos anfífilos puros. Além disso, as vesículas de DODAB/NaCl foram mais estáveis que as vesículas DODAC/NaBr, confirmando resultados da literatura que as vesículas de DODAC puro são mais estáveis que as vesículas de DODAB, assim como as monocamadas [LOPES *et al.*, 2008, CAVALLI, *et al.*, 2001].

4.2 Vesículas e monocamadas anfifílicas em solução de glicose (GLI)

Nesta seção foi investigado o efeito da concentração de glicose (GLI) nas propriedades de vesículas e monocamadas catiônicas de DODAC e DODAB, e *zwiteriônicas* de DPPC. A interação de GLI com vesículas e monocamadas foi investigada por medidas de transmitância, DSC, DLS, potencial zeta e Filmes de Langmuir. A combinação dessas técnicas forneceu informações sobre a estabilidade das vesículas e a formação de monocamadas na presença de GLI na subfase.

Em geral, as estruturas de bicamadas catiônicas e *zwiteriônicas* são preservadas na presença de até 400 mM de GLI. Medidas de potencial zeta indicam que as vesículas de DODAC e DODAB permanecem carregadas positivamente, enquanto as estruturas de DPPC apresenta uma carga líquida negativa, valores esses pouco afetados pela adição da glicose.

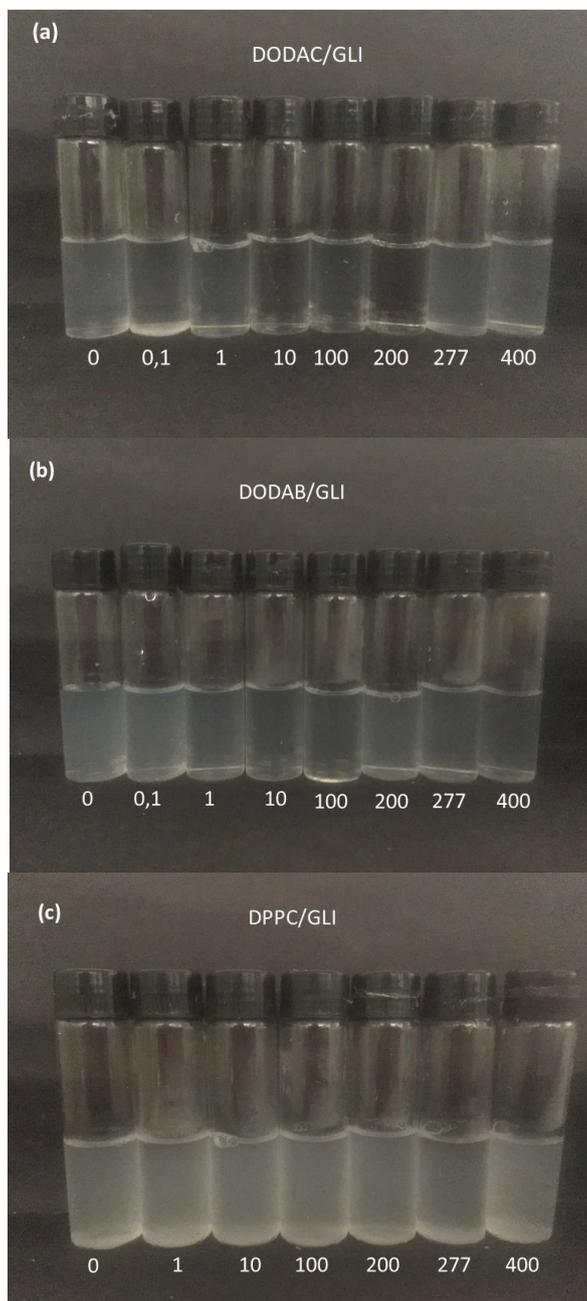
4.2.1 Análise visual das amostras

Análise visual das amostras (Figura 24), em função da concentração de GLI indica soluções estáveis para os três anfifílicos testados, isto é, não se observa a formação de precipitados ou separação de fase, para nenhum deles nas concentrações estudadas.

Para DODAC/GLI (Figura 24a), no intervalo de 0,1-1 mM de GLI, o aspecto visual das amostras permanece inalterado comparado à dispersão em água. No intervalo de 10-200 mM de GLU, as amostras são mais claras, indicando a formação de estruturas menores. Já no intervalo de 277-400 mM de GLI, as amostras são mais turvas, indicando a formação de estruturas maiores.

Para DODAB/GLI (Figura 24b), as amostras estão levemente mais claras no intervalo de 0,1-100 mM, pela possível formação de estruturas menores. Acima de 200 mM, as amostras são mais turvas, efeito semelhante ao observada para DODAC. As análises das imagens indicam que moléculas de GLI interagem com vesículas catiônicas. Para DPPC/GLI (Figura 24c) não foi observado alteração em função da concentração de glicose.

Figura 24 – Análise visual de (a) DODAC/GLI, (b) DODAB/GLI e DPPC/GLI (c) em concentrações de 0,1- 400 mM de glicose, após um dia do preparo. As amostras foram mantidas a 25 °C.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 Resultados de espectrofotometria UV-Vis

As dispersões aquosas de DODAC, DODAB e DPPC, ausência e presença de GLI, foram analisadas em triplicatas, em 25°C, no mesmo dia de preparo das amostras. Como o perfil das curvas de T_λ era semelhante entre si, consideramos apenas os resultados obtidos para $\lambda = 500$ nm (Figura 25).

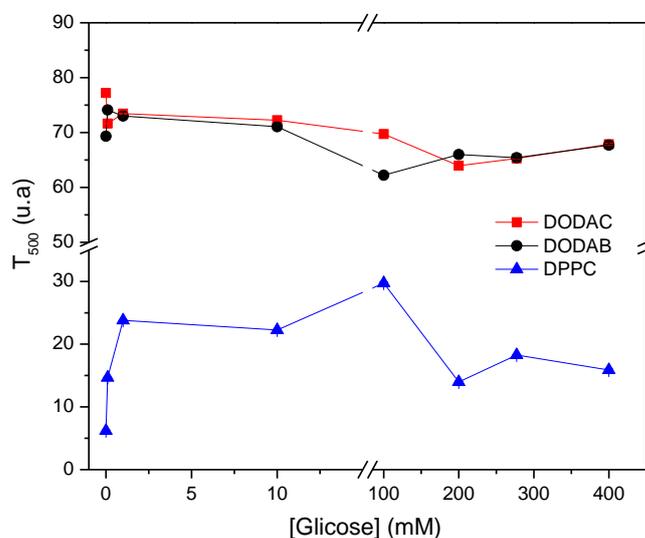
Na ausência de GLU, a transmitância da dispersão de DODAC é ligeiramente maior do que a de DODAB, pois conforme relatado na literatura as vesículas de DODAC são menores que as vesículas de DODAB [FEITOSA, KARLSSON, EDWARDS, 2006]. Porém, na presença de GLI, em geral, a transmitância dessas duas dispersões se equivalem, com exceção para GLI em torno de 100 mM. A pequena variação nos valores da transmitância dessas dispersões indica que GLI interage muito pouco com as vesículas catiônicas.

As vesículas de DPPC apresentam menor valor de transmitância comparado a DODAC e DODAB (Figura 25). Diferentemente, a transmitância da dispersão de DPPC sofre maior variação com a adição de GLI, indicando maior interação entre as moléculas do açúcar e da vesícula *zwitterionicas* de DPPC.

No intervalo de 1-10 mM para DODAC, DODAB e DPPC permanecem estáveis, entre 10-100 mM, nota-se a diminuição regular na transmitância para DODAC e DODAB, Figura 25, a diminuição é devido o excesso de moléculas de GLI, ocorre a alteração da viscosidade da solução e maior interação com as vesículas, assim há formação de estruturas menores e, portanto mais estáveis em função do tempo para DODAC e DODAB. Efeito distinto para DPPC há alteração da interação entre os lipídios adjacentes de DPPC, na concentração de 100 mM de GLI as vesículas catiônicas são maiores e as *zwitterionicas* menores.

Acima de 100 mM, DODAC e DODAB apresentam valores de transmitância maiores comparado a DPPC, indicando a formação de estruturas menores e regulares catiônicas e maiores para *zwitterionicas*. De modo geral, a GLI afeta mais as estruturas *zwitterionicas* comparado às catiônicas. Os perfis de DODAC e DODAB pouco se alteram em função da GLI, diferente para DPPC, que apresenta maior valor de transmitância em 100 mM.

Figura 25 - Transmitância (T_{500}) de dispersão de DODAC, DODAB e DPPC, em função da concentração de GLI, 25°C.



Fonte: Elaborado pela autora.

As alterações estruturais em função da GLI foram também analisadas por DSC, DLS e potencial zeta, para possível aplicação como carreadores de pequenas moléculas de fármacos na condição fisiológica.

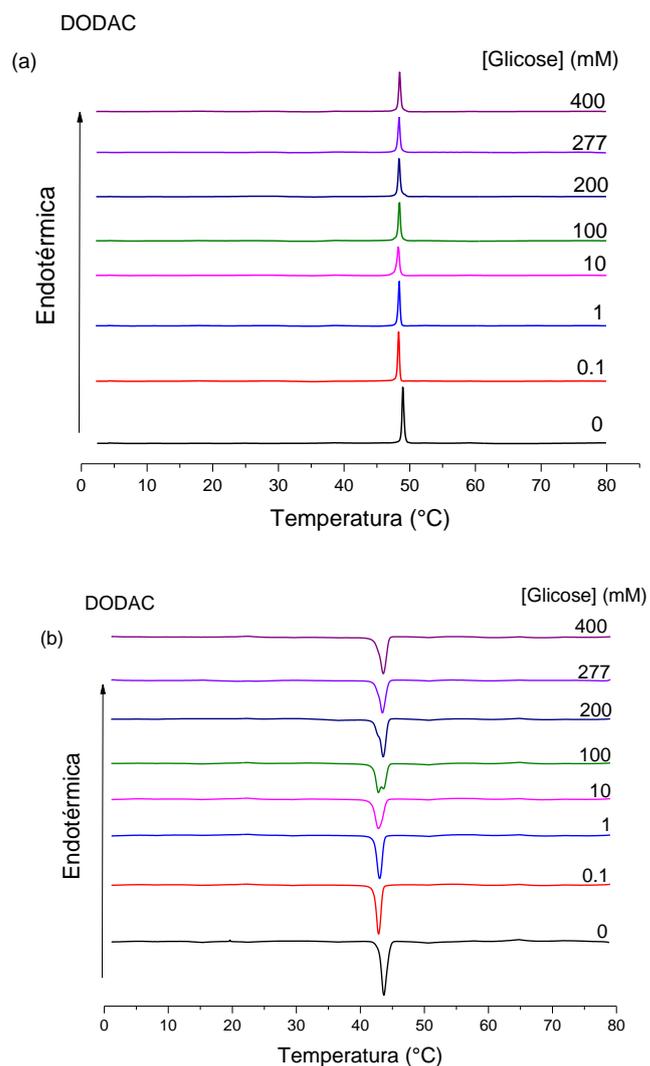
4.2.3 Resultados de DSC

Em geral, com o aumento da concentração de GLI, as vesículas de DODAC (1 mM) são preservadas, apresentando apenas uma transição do estado gel-LC, Figura 26. No aquecimento, com o aumento da concentração de GLI, o valor da T_m diminui em torno de 1 °C, ΔH_m também diminui, mas não de maneira sistemática, e $\Delta T_{m1/2} \approx 0,2-0,4$ °C, demonstrando alta cooperatividade (Figura 26a, Tabela 12). No resfriamento, o comportamento de T'_m e $\Delta H'_m$ é semelhante ao do aquecimento, e $\Delta T'_{1/2m}$ apresenta valores maiores, se comparados a $\Delta T_{1/2m}$, ou seja, no aquecimento a transição é mais cooperativa do que no resfriamento. Nota-se na presença de 100 mM de GLI, um pequeno desdobramento do pico, sugerindo a formação de estruturas diferentes; acima

desta concentração, o valor de T'_m é ligeiramente maior, sugerindo a existência de bicamadas mais compactadas (Figura 26b, Tabela 12).

Em geral, os parâmetros térmicos de DODAC são significativamente afetados por GLU, sugerindo a formação de estruturas vesiculares com diferentes graus de empacotamento, acima e abaixo de 100 mM.

Figura 26 - Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DODAC (1 mM), em água e solução de glicose.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 12 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAC (1 mM), na ausência e na presença de GLI, obtidos por DSC, nos modos de aquecimento e resfriamento.

[GLU] (mM)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T'_m (°C)	$\Delta H'_m$ (kJ/mol)	$\Delta T'_{1/2m}$ (°C)	ΔT_m (°C)
0	49,0	48,5	0,3	44,0	48,0	0,9	5,0
0,1	48,3	38,2	0,2	43,0	38,7	0,8	5,3
1	48,4	35,0	0,3	43,0	36,3	0,9	5,4
10	48,3	33,8	0,4	43,0	35,4	1,4	5,3
100	48,4	39,3	0,3	43,0	41,0	1,7	5,4
200	48,4	39,3	0,3	43,5	38,5	1,6	4,9
277	48,4	38,0	0,3	43,5	37,0	1,2	4,9
400	48,5	37,0	0,3	43,6	38,6	1,2	4,9

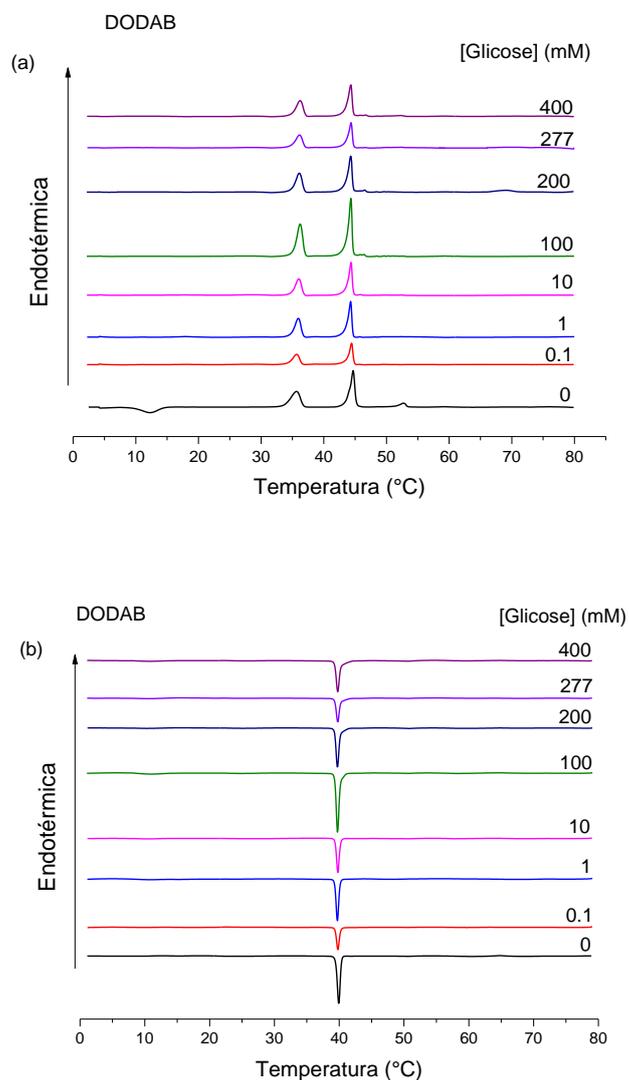
Fonte: Elaborado pela autora.

Para as dispersões de DODAB, com a adição de GLI, a transição gel-LC das estruturas multilamelares, em $T_p = 52,0$ °C desaparece, predominando as vesículas unilamelares, caracterizadas pelas transições em $T_s \approx 36$ °C e $T_m \approx 44$ °C (Figura 27a e Tabela 13). Assim como DODAC, as vesículas de DODAB permanecem estáveis na presença de até 400 mM de GLI.

Nota-se que em 100 mM, há um aumento de ΔH_s e ΔH_m (56,1 e 73,5 kJ/mol, respectivamente), abaixo de 100 mM, valores próximos de 31 kJ/mol (Tabela 13). Esses dados indicam interação fraca GLI-DODAB, preservando a estrutura de vesículas unilamelares e inibindo a estrutura multilamelar, pois os valores de T_s e de T_m variam e a transição em T_p desaparece. No resfriamento o efeito se mantém (Figura 27b e Tabela 14). O $\Delta T_{1/2m} \approx 0,6-0,7$ °C e $\Delta T_{1/2s}$ foram reduzidos de 1,6 para 1,0 no aquecimento; e no resfriamento o $\Delta T'_{1/2m}$ permaneceram constante em 0,5 °C. A velocidade da transição é diferente para aquecimento e resfriamento, característico da alteração da configuração da bicamada. O $\Delta T_m = 5$ °C em água, com aumento da concentração diminuiu, permanecendo entre 4,4-4,8 °C.

De acordo com os dados de DSC, os termogramas indicam que as vesículas de DODAB e DODAC são preservadas com o aumento da concentração de glicose, até 400 mM, predominando vesículas unilamelares de DODAB. Porém o grau de empacotamento da bicamada é alterado com a concentração de GLI, demonstrando interação entre as vesículas catiônicas com glicose.

Figura 27 – Termogramas de DSC, nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b), de DODAB (1 mM), em água e solução de glicose.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 13 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAB (1 mM) na presença e na ausência de GLI, obtidos no aquecimento.

[Glicose] (mM)	T_s (°C)	ΔH_s (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2s}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T_p (°C)	ΔH_p (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2p}$ (°C)
0	36,0	42,9	1,6	45,0	54,4	0,7	52,0	1,6	0,9
0,1	35,6	20,9	1,3	44,4	27,1	0,6	-	-	-
1	35,7	33,5	1,2	44,2	43,3	0,7	-	-	-
10	36,0	28,7	1,0	44,3	38,3	0,6	-	-	-
100	36,2	56,1	1,0	44,3	73,5	0,6	-	-	-
200	36,0	35,1	1,2	44,3	51,8	0,7	-	-	-
277	36,1	32,4	1,2	44,3	43,9	0,7	-	-	-
400	36,2	31,0	1,2	44,3	42,4	0,7	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 14 - Parâmetros térmicos de dispersões de DODAB (1 mM) na presença e ausência de GLI, obtidos no resfriamento.

[Glicose] (mM)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T'_{1/2m}$ (°C)	ΔT_m (°C)
0	40,0	53,9	0,5	5,0
0,1	40,0	26,3	0,5	4,4
1	39,7	44,2	0,5	4,5
10	39,8	36,9	0,5	4,5
100	39,7	70,6	0,5	4,6
200	39,6	50,5	0,5	4,7
277	39,7	44,0	0,5	4,7
400	39,5	45,8	0,5	4,8

Fonte: Elaborado pela autora.

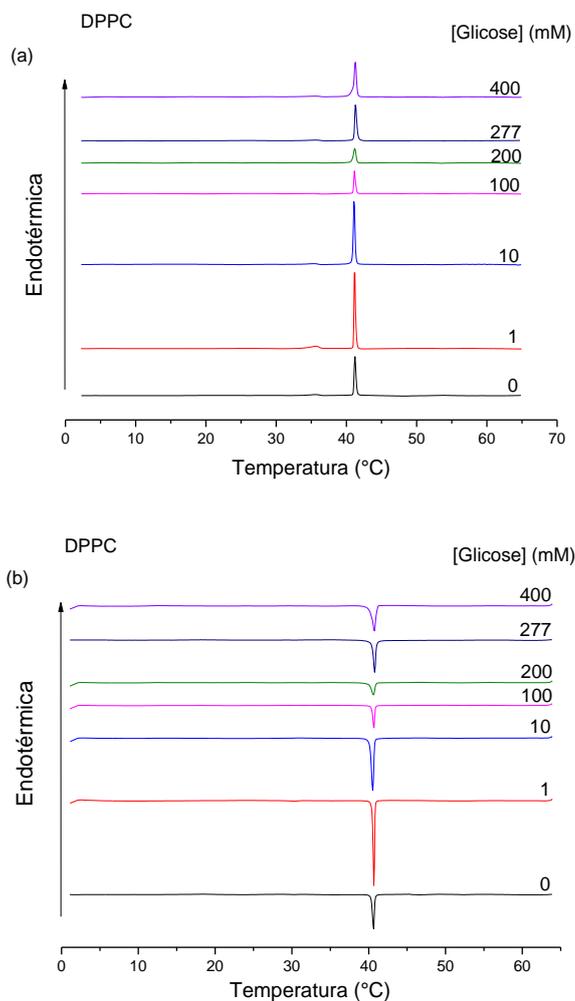
Investigamos também o efeito de GLI nas vesículas de DPPC, (Figura 28). As vesículas de DPPC apresentam um comportamento comparável a DODAB e DODAC, sendo preservadas até 400 mM de GLI. No aquecimento com o acréscimo de GLI, observa-se que a intensidade da transição do estado gel-LC é reduzida gradualmente até 200 mM, porém a T_m permanece constante e há diminuição no ΔH_m , Figura 28a e Tabela 15.

Acima de 200 mM, há um pequeno aumento de T_m , $T_m \approx 41,3^\circ\text{C}$, característico da alteração no empacotamento da bicamada. A entalpia permanece entre 24-31 kJ/mol, assim é provável que em baixas concentrações de GLI, as bicamadas sejam menos compactas, se comparadas àquelas em elevadas concentrações (acima de 200 mM de GLI). Nota-se uma pré-transição de baixa intensidade em água, em torno de 30°C , que permanece até 10 mM de GLI. Esta pequena transição pode estar relacionada com a alteração estrutural observada na transmitância em baixa concentração de GLI, Figura 28a. Comportamento semelhante foi observado no processo de resfriamento, Figura 28b e Tabela 15.

De modo geral, as vesículas de DPPC também foram preservadas até 400 mM, porém a entalpia apresentou um comportamento distinto comparado à DODAC e DODAB, pois no intervalo de 100-200 mM, seu valor foi reduzido e permaneceu próximo de 12 kJ/mol. Após este intervalo ΔH fica próximo de 24-31 kJ/mol, demonstrando interação das vesículas com GLI. A largura do pico permanece entre $\Delta T_{1/2m} = 0,3-0,5^\circ\text{C}$ e $\Delta T'_{1/2m} = 0,2-0,5^\circ\text{C}$. A velocidade da transição no modo aquecimento foi praticamente semelhante à do resfriamento, caracterizando uma

transição bastante cooperativa. O efeito da histerese, ΔT_m , pouco se alterou, permanecendo entre 0,4-0,6 °C.

Figura 28- Termogramas de DSC de aquecimento de DPPC (1 mM) em água e em solução de glicose até 400 mM. Aquecimento (a) e resfriamento (b).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 15- Parâmetros térmicos de dispersões de DPPC 1 mM, na presença e na ausência de GLI, obtidos durante aquecimento e resfriamento.

[Glicose] (mM)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	ΔT_m (°C)
0	41,2	23,0	0,3	40,6	18,8	0,3	0,6
1	41,2	37,8	0,4	40,7	35,3	0,2	0,5
10	41,2	35,1	0,3	40,7	34,0	0,3	0,5
100	41,2	12,0	0,3	40,7	12,0	0,3	0,4
200	41,2	12,3	0,4	40,7	12,3	0,5	0,5

277	41,3	24,0	0,3	40,8	23,4	0,3	0,6
400	41,3	31,0	0,5	40,8	25,0	0,5	0,6

Fonte: Elaborado pela autora.

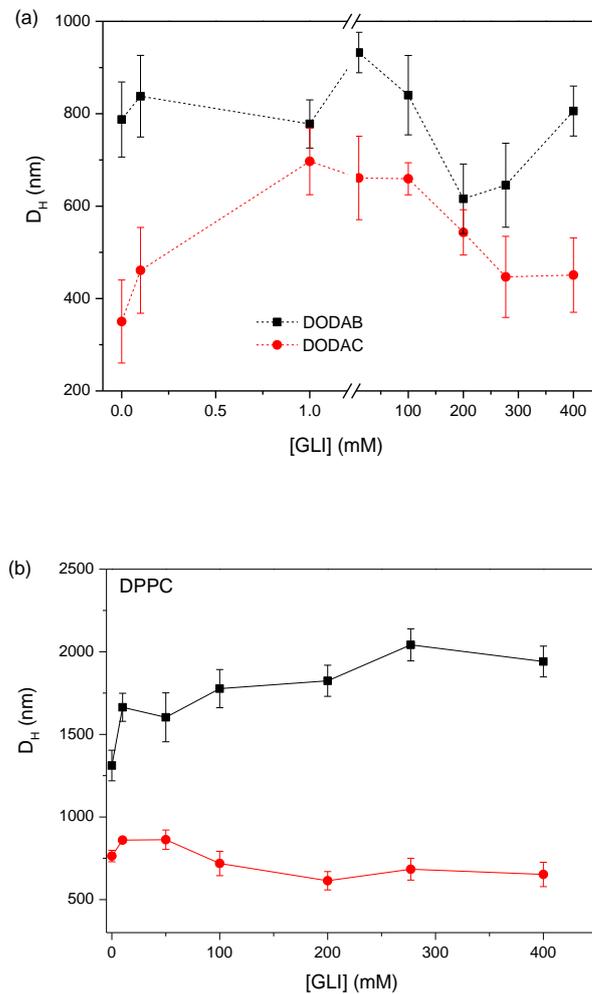
4.2.3 Resultados de DLS

De acordo com a Figura 29a, DODAC e DODAB (1 mM) na presença de GLI apresentaram apenas uma população de vesículas (de menor tamanho). Para DODAC/GLI, os valores do D_H das vesículas aumentam, dobrando de 350 para 700 nm. Para DODAB, nota-se uma pequena diminuição de 790 nm para 700 nm, indicando maior efeito no tamanho de DODAC, comparado ao DODAB.

No intervalo de 1-100 mM, os valores do D_H de DODAC permanecem próximos de 650 nm, enquanto DODAB os valores estão próximos de 800 nm, neste intervalo as estruturas de DODAB alcançam um D_H máximo de 950 nm em 10 mM, característico do início da saturação das vesículas de DODAB por moléculas de GLI. Após 10 mM, o D_H diminui rapidamente para 600 nm, indicando a perda das moléculas de GLI em excesso nas vesículas de DODAB, e atingem valores de D_H próximo de 790 nm em 400 mM, Figura 29a, como foi observado por transmitância na Seção 4.2.1. Para DODAC, acima de 100 mM, nota-se uma diminuição gradual dos valores de D_H , com tamanhos variados de 650 para 450 nm, permanecendo constante até 400 mM de GLI.

O comportamento da distribuição do tamanho depende da concentração de GLI, pois, os valores de D_H das vesículas de DODAB são mais regulares em concentrações menores, abaixo de 1 mM, enquanto que, para DODAC em concentrações maiores, acima de 100 mM. O contra íon e a concentração de GLI influenciam no comportamento térmico, na estrutura e na estabilidade das vesículas catiônicas. Os dados de DLS corroboram os observados de DSC e transmitância, pois foi possível notar as alterações estruturais em função da concentração de glicose.

Figura 29- Efeitos de GLI no D_H da DODAC e DODAB (a) e DPPC (b) todos a 1 mM, 25 °C.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para DPPC (1 mM) em água, (Figura 29b), duas populações de vesículas com $D_H \approx 750$ nm e $D_H \approx 1250$ nm foram observados. Em solução de GLI, no intervalo de 1-100 mM, o tamanho das vesículas aumentam em 50 nm; de 100-400 mM de glicose, as vesículas apresentam o $D_H \approx 650$ nm, para população de lamelas com o aumento da concentração de glicose aumenta o valor do D_H de 1650 para 2000 nm. A distribuição dos tamanhos para DPPC em função da concentração de GLI ocasiona em estruturas regulares sem muitas oscilações nos tamanhos analisados, comportamento distinto para DODAC e DODAB, considerando o erro experimental. Os dados indicam a formação de estruturas mais estáveis de DPPC comparadas às de DODAC e DODAB, até 400 mM

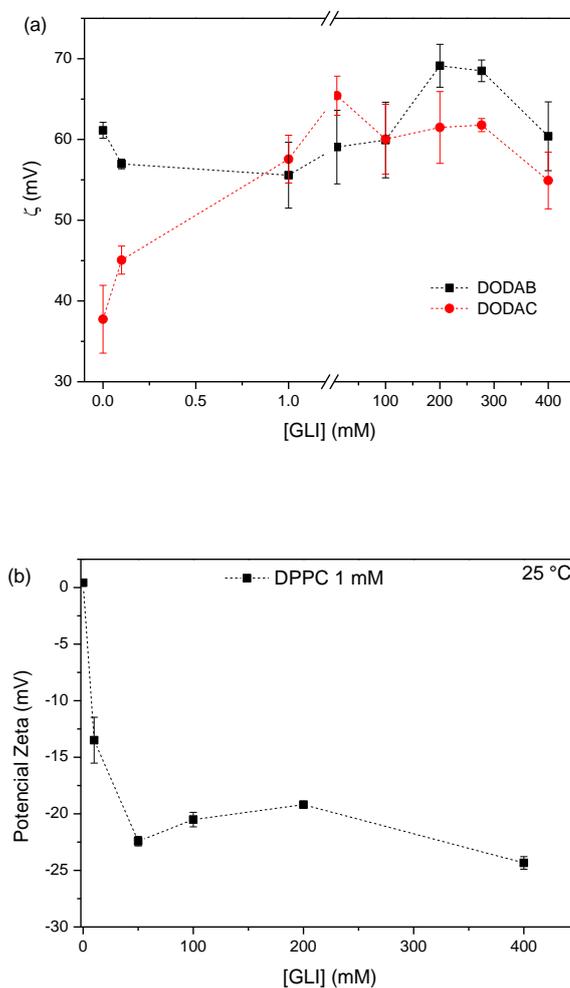
de glicose. Mais uma vez, os dados de DLS corroboraram as análises de transmitância e DSC.

4.2.4 Resultados de potencial zeta

O efeito do contra íons, DODAC e DODAB, com aumento da concentração de GLI são apresentados na Figura 30. Na ausência de GLI, $\zeta \approx 40$ e 67 mV, respectivamente para DODAC e DODAB, como foi discutido anteriormente, DODAC é mais estável comparado a DODAB. Com acréscimo de GLI, as vesículas permanecem carregadas positivamente, com comportamento distinto, dependendo da concentração, Figura 30a.

Abaixo de 100 mM, as vesículas de DODAC apresentam valores de potencial, $\zeta \approx 45-65$ mV enquanto DODAB permanece entre $\zeta = 62-59$ mV, maior efeito da GLI em DODAC. Em 100 mM ambas apresentam o mesmo valor, $\zeta = 60$ mV, após esta concentração ocorre uma inversão nos valores dos potenciais, ou seja, DODAB com valor de potencial maior comparado a DODAC, Figura 30a. Em geral, as vesículas de DODAC são mais estáveis acima de 100 mM (menor potencial) e DODAB abaixo de 100 mM, ambas as vesículas interagem com as moléculas de GLI. A concentração de 100 mM é uma concentração crítica, pois a partir dessa concentração, temos comportamento distinto para DODAC e DODAB, demonstrando que o contra íons influencia na interação com GLI. Esses dados corroboram os dados apresentados por transmitância, DSC e DLS.

Figura 30 - Efeito de GLI no potencial zeta das vesículas de DODAC e DODAB (a) e DPPC (b), a 25 °C.



Fonte: Elaborado pela autora.

Também foi analisado o potencial zeta das vesículas *zwitterionicas* de DPPC em função da concentração de GLI, a fim de comparar com as medidas de DODAC e DODAB.

As vesículas de DPPC apresentaram potencial zeta próximo de $\zeta = 0$ mV em água, Figura 30b, porém, com o aumento da concentração, as vesículas de DPPC apresentam uma carga líquida negativa, ζ diminui de 0 para -25 mV, demonstram que o DPPC em excesso de glicose, predominam vesículas aniônicas, a parte carregada positivamente interage fortemente com OH^- da glicose, e não foi observado o efeito da concentração crítica, como observado em DODAC e DODAB.

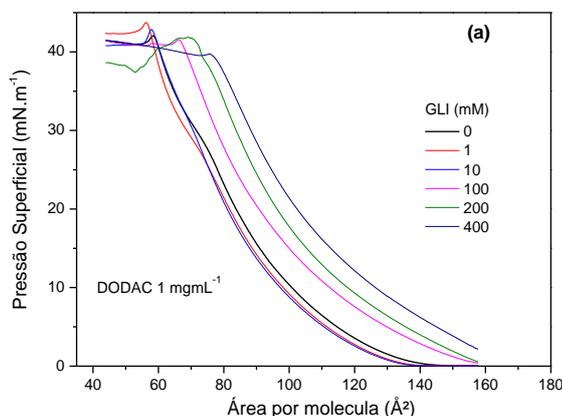
4.2.5 Resultados de LF

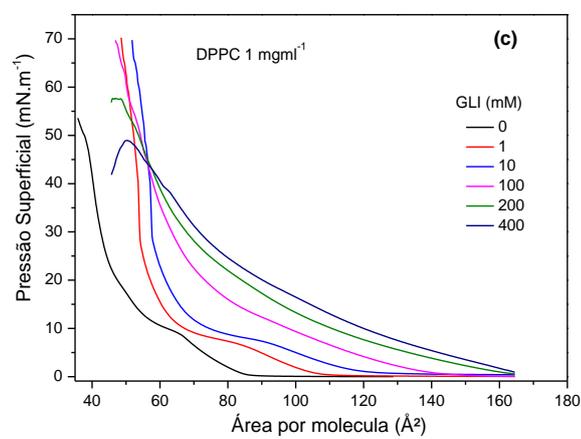
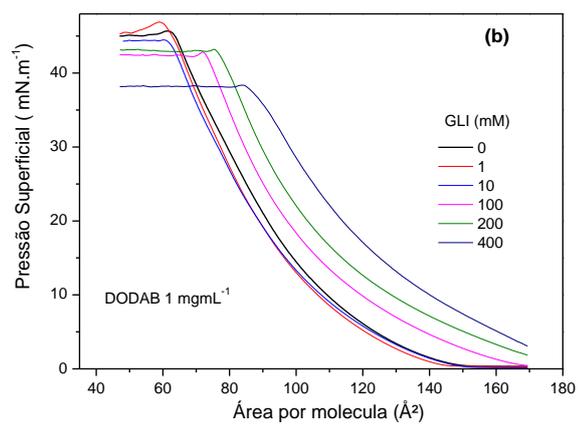
Em glicose no intervalo de 1-10 mM, as isotermas π -A DODAB e DODAC apresentaram um pequeno deslocamento para áreas menores com DODAC notou-se uma pequena transição do estado líquido expandido para condensado, pela diminuição da repulsão eletrostática entre a parte polar do lipídio, Figura 31a e 31b. Para o filme de DPPC, Figura 31c, o efeito foi contrário, deslocamento das curvas para áreas maiores, indicando afastamento de lipídios adjacentes (60 \AA^2), e as transições de DPPC ainda permaneceram pronunciadas (citadas no item 4.1.1.5) observou-se aumento da pressão de colapso para 70 mN.m^{-1} .

Até 400 mM, para DODAC e DODAB, as curvas foram deslocadas para áreas maiores, devido à saturação da monocamada, causando um afastamento da parte polar dos lipídios. Para DODAC a área limite foi de 110 \AA^2 em água, e aumentando para 130 \AA^2 . Já para DODAB a área limite, em água 120 \AA^2 alterando-se para 140 \AA^2 , que indica a incorporação da GLI na monocamada e afetando as interações entre as moléculas do lipídio, e neste caso a condensação do filme, o que explica a área por molécula de lipídio aumentar em função da concentração de GLI.

As curvas de DPPC mudaram consideravelmente, com deslocamentos também para áreas maiores, efeito semelhante ao observado com DODAC e DODAB. As transições características de DPPC desapareceram, demonstrando um comportamento semelhante aos lipídios carregados.

Figura 31- Isotermas π -A para monocamada de DODAC (a), DODAB (b) e DPPC (c), na ausência e presença de GLI na subfase, a 25°C .





Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.6 Conclusão

A estabilidade de vesículas depende do balanço de forças de repulsão eletrostática da parte polar e hidrofóbicas das cadeias alquílicas dos lipídios. As moléculas de GLI adicionadas à solução de DODAC, DODAB e DPPC, promoveram interações que alteraram o empacotamento dessas cadeias na vesícula e o afastamento dos lipídios adjacentes nas monocamadas. Esses dados indicam que a GLI é bom controlador osmótico de membranas lipídicas. De modo geral, devido a alteração da carga líquida do DPPC é provável a formação de estruturas maiores, pois os lipídios adjacentes da bicamada estão mais afastados, com maior repulsão eletrostática, e há diminuição na estabilidade em excesso de GLI. Esta hipótese foi comprovada com os dados de transmitância e DLS, onde se observou a formação de duas populações com tamanhos distintos, ou seja, coexistem estruturas de tamanhos variados e maiores comparados a DODAC e DODAB. Portanto, as estruturas de vesículas de DPPC com o aumento da concentração de GLI, apresentam maior alteração que as vesículas catiônicas, formadas por DODAC e DODAB.

Medidas de D_H mostram que para DODAC e DODAB, ambos apresentam uma única população com tamanho compatível a estruturas de vesículas, já para DPPC, nota-se duas populações, vesículas, a distribuição dos tamanhos para ambas as populações de DPPC reflete estruturas regulares sem muitas oscilações nos tamanhos analisados, comportamento distinto de DODAC e DODAB.

4.3 Vesículas em soro fisiológico na presença e ausência de F127

As propriedades físico-químicas das vesículas anfifílicas, na ausência e na presença do *helper* F127, em soro fisiológico (SF, 0,9% de NaCl), soro glicosado (SG, 5% de GLU) e o caseiro (SC, 0,9% de NaCl e 5% de GLU) foram investigadas por espectrofotometria UV-Vis, DSC e DLS e LF (monocamadas na ausência de F127).

O resultado da interação do anfifílico catiônico (1mM) com F127 0,2 mM em solução aquosa, induziu à formação de estruturas de vesículas mistas. Em geral, as vesículas catiônicas mistas foram preservadas e permaneceram estáveis, comparadas com as vesículas puras nos três soros estudados.

A formação de monocamada foi investigada na ausência de F127, pois, surfactante por ser muito hidrofílico, não se estrutura em monocamadas na interface ar/água. Os resultados indicam que, em SF e SC predomina interação eletrostática e, em SG, as moléculas de GLI se intercalam nas monocamadas, analogamente ao observado na seção 4.1 e 4.2.

4.3.1 Ação do surfactante F127

4.3.1.1 Análise visual das amostras

Na Figura 32, as dispersões catiônicas e *zwitterionicas*, na ausência de F127, são indicadas pela letra D, e aquelas com F127, pelas letras D/F em água e nos três soros. Pela análise visual, após um dia de preparo das amostras, as dispersões de DODAB (Figura 32b) em água e SG, são mais turvas, indicando que as vesículas de DODAB são maiores do que as de DODAC (Figura 32a).

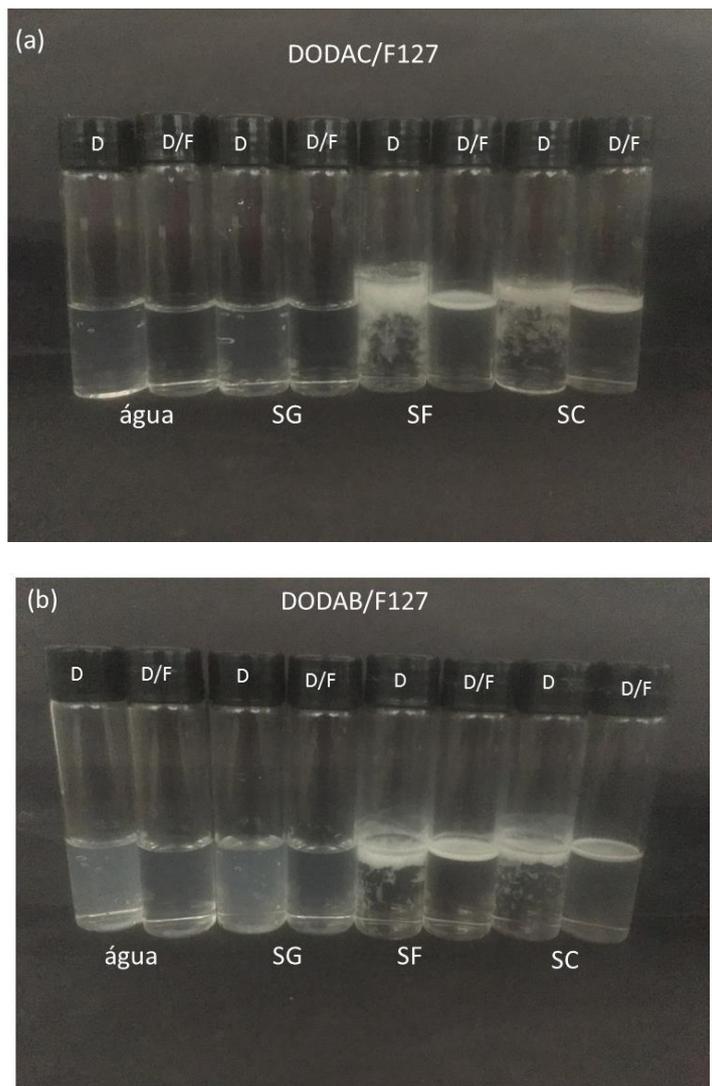
Em SF e SC, na ausência de F127, há formação de flocos mais densos, isto é, há alteração da estrutura de bicamada em NaCl, pois a concentração salina está em 150 mM, conforme discutimos na seção 4.1. Ao analisar o efeito de F127 nas vesículas, em SF e SC, uma pequena fase superior pode ser distinguida (Figura 32a e 32b), provavelmente devido a formação de uma quantidade crescente de estruturas de bicamada menos densa. Em geral, na ausência de F127, o efeito eletrostático nos SF e SC é favorecido, ocasionando menor estabilidade em função do tempo nas dispersões catiônicas.

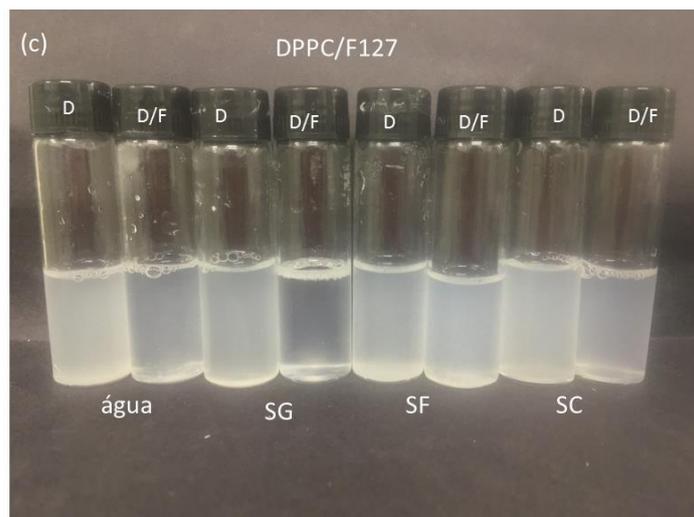
Para DPPC, Figura 32c, tanto na ausência como na presença de F127, não se observa separação de fases e nem formação de precipitados. Porém, as dispersões são bastante turvas comparadas aos anfifílicos catiônicos, com predominância de estruturas maiores e multilamelares.

Estudos realizados por Feitosa e colaboradores, indicam que a formação de estruturas catiônicas mistas é mais estável para DODAC na presença de F127 em pequenas concentrações; com o aumento da concentração de F127, observa-se a transição vesícula-micela, que ocorre em três estágios: no primeiro estágio, predominam as vesículas mistas; no segundo estágio, coexistem vesículas e micelas mistas; e, no terceiro estágio, predominam as micelas mistas. Outro fato importante é que a carga líquida das vesículas catiônicas é preservada em elevadas concentração de F127

[FEITOSA, LEMOS, ADATI, 2019]. De acordo com a literatura, os copolímeros são dissolvidos nas bicamadas lipídicas e auxiliem na estabilização das estruturas em solução [FEITOSA, WINNIK, 2010].

Figura 32 – Análise visual de (a) DODAC/F127 e (b) DODAB/F127 em água, SG, SF e SC, após um dia do preparo. Amostras foram mantidas a 25 °C. Onde D são as amostras na ausência de F127, e D/F na presença de F127.





Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.1.2 Resultados de espectrofotometria UV-Vis

A fim de complementar a análise das imagens foram realizadas as medidas de transmitância nas dispersões de DODAC, DODAB e DPPC, na ausência e presença de F127.

Na Figura 33a, as dispersões de DODAB diminuem regularmente o valor da transmitância, apresentando o menor valor em SC comparado com água, indicando que o tipo de soro pode alterar a estrutura das vesículas e, conseqüentemente, o grau de compactação da bicamada catiônica. As estruturas formadas por DODAB são maiores que as de DODAC. Para as dispersões de DODAC, Figura 33a, nota-se um aumento, em SG, de *ca* 10 u.a no valor da transmitância, indicando a formação de estruturas menores, para SF e SC observa-se valores menores de transmitância, com predomínio de estruturas maiores em SF e SC.

Tanto para DODAC quanto DODAB, é provável que o Cl^- presente na solução interage com as vesículas, formando estruturas maiores, conforme discutido na seção 4.1. Em geral, em SG ocorre alteração estrutural para ambos os anfífilicos, sem alterar a estabilidade da estrutura formada, efeito diferente do observado na presença de sal, SF e SC.

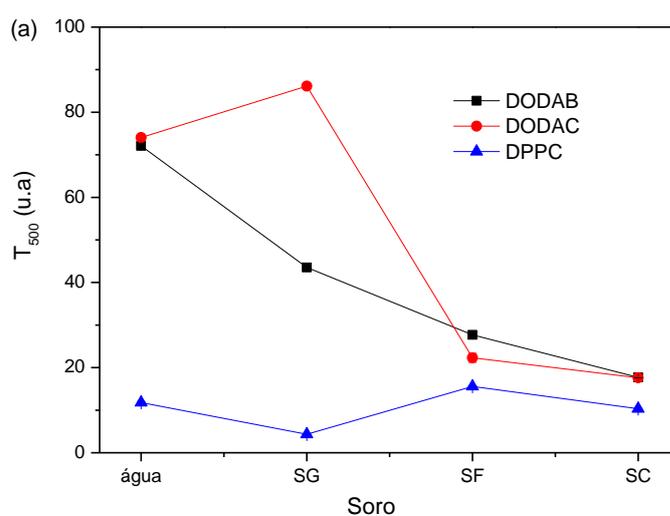
Para DPPC (Figura 33a), o valor da transmitância permanece abaixo de 20 u.a, apresentando valores menores comparados às estruturas catiônicas. Portanto, há

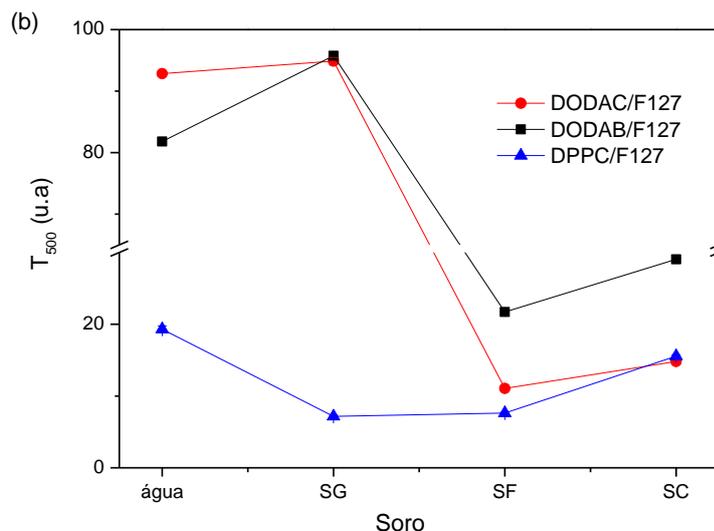
formação de estruturas maiores nos três soros testados, com a maior alteração estrutural observada em SG, isto é, a glicose altera a estrutura das vesículas de DPPC. Em SF, a estrutura das vesículas de DPPC (*zwitteriônica*), permanece igual à estrutura em água; em SC, o valor da transmitância diminui levemente, indicando pequeno efeito do sal e do açúcar na estrutura das vesículas.

A estrutura das vesículas mistas de DODAC/F127, Figura 33b, permanece inalterada em água e em SG, já em SF e SC ocorre diminuição no valor da transmitância, indicando formação de estruturas maiores, devido ao acréscimo de NaCl, e predominância de interação eletrostática e alteração da camada de solvatação das estruturas mistas de DODAC/F127. Para DODAB/F127, o valor da transmitância de SG aumenta, indicando a formação de estruturas menores; para SF e SC, o comportamento é semelhante ao de DODAC/F127, porém, com valor de transmitância maior, isto é, com formação de estruturas menores de DODAB/F127, comparavelmente a DODAC/F127.

Para DPPC/F127 em água, o comportamento é semelhante ao de F127 em água; para SG e SF, a estrutura permanece inalterada; em SC o valor da transmitância aumenta predominando estruturas menores.

Figura 33 - Transmitância (500 nm) de DODAC e DODAB (a) e ação de F127 (b) em água, SG, SF e SC, respectivamente, 25°C.





Fonte: Elaborado pela autora.

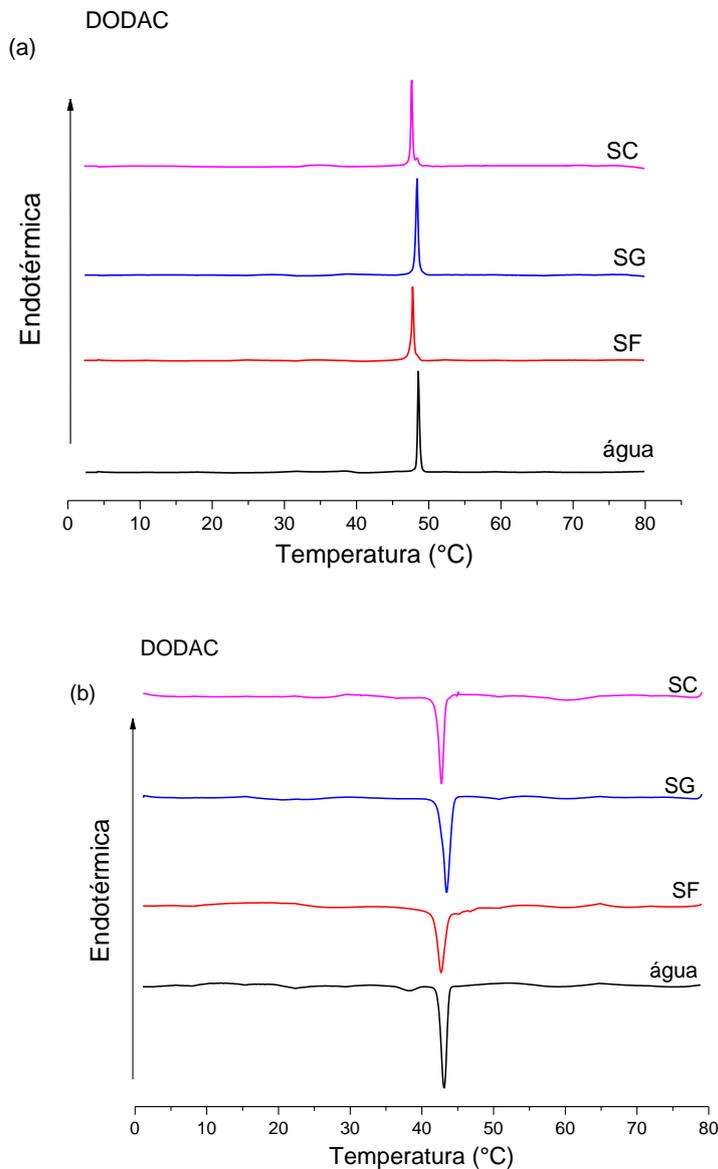
4.3.1.3 Resultados de DSC

De acordo com o termograma de DODAC (1 mM) em água, Figura 34a, no aquecimento, o termograma apresenta uma única transição de estado gel-LC, com os seguintes parâmetros térmicos: $T_m \approx 49\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_m \approx 48,5\text{ kJ/mol}$, e $\Delta T_{1/2m} \approx 0,3\text{ }^\circ\text{C}$. E, no resfriamento, $T'_m \approx 44\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_m \approx 48\text{ kJ/mol}$, e $\Delta T_{m1/2} \approx 0,9\text{ }^\circ\text{C}$, portanto, indicando histerese térmica de $5\text{ }^\circ\text{C}$.

De acordo com a Tabela 16, no aquecimento, tanto o sal quanto o GLU diminuem o valor da T_m em até $1,4\text{ }^\circ\text{C}$, e de ΔH_m de $48,5\text{ kJ/mol}$, em água, para $25,7$, $34,0$ e $26,7\text{ kJ/mol}$, respectivamente; $\Delta T_{1/2m}$ permanece praticamente constante, com $0,2\text{-}03\text{ }^\circ\text{C}$, indicando transição altamente cooperativa.

No resfriamento, Figura 34b, a mesma tendência do aquecimento, com os picos de transições mais largas. Esses dados permitem-nos concluir que as vesículas de DODAC são preservadas nos SF, SG e SC, podendo ser usadas na solubilização de fármacos (*e.g.*, DOX) como agente carreador.

Figura 34- Termogramas de DSC de DODAC (1 mM) em SF, SG e SC, obtidos nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 16- Parâmetros Térmicos de DODAC em água, SF, SG e SC, aquecimento e resfriamento.

Soro	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	ΔT_m (°C)
Água	49,0	48,5	0,3	44,0	48,0	0,9	5,0
SF	48,0	25,7	0,2	43,0	27,2	1,2	5,0
SG	48,4	38,0	0,3	43,5	37,0	1,2	4,9
SC	47,6	26,7	0,2	43,0	22,4	0,7	4,6

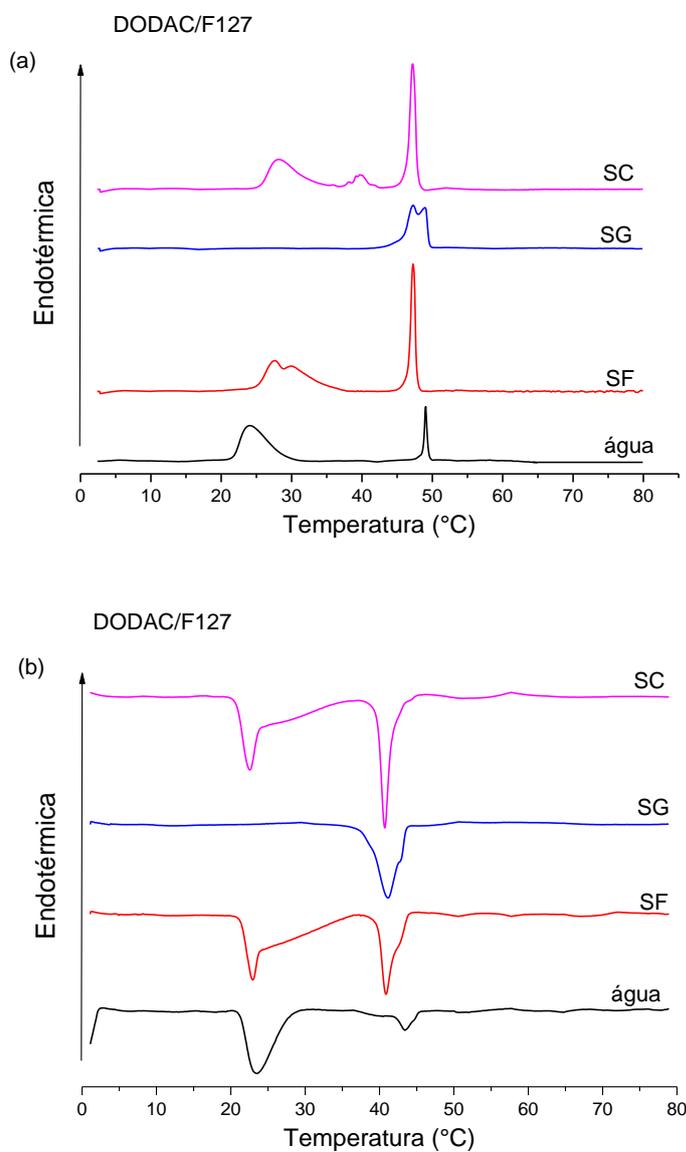
Fonte: Elaborado pela autora.

Os termogramas de DODAC (1 mM)/F127 (0,2 mM) apresentam duas transições térmicas, de estado gel-LC característico das vesículas e a outra da formação das micelas de F127. A transição de estado gel-LC é bastante intensa e estreita em SF e SC comparavelmente a água, no modo aquecimento e resfriamento, (Figura 35a e 35b). Para SG o termograma apresenta um pico de baixa intensidade, largo e um desdobramento no modo aquecimento, (Figura 35^a).

Nos três soros, T_m diminuiu não mais de 2 °C, $\Delta H_m \approx 37, 43$ e 45 kJ/mol, respectivamente para SF, SG e SC, $\Delta T_{1/2m} = 0,8$ °C em SF, 3°C em SG e 1 °C em SC. Esta transição é lenta e de baixa cooperatividade na presença de glicose, SG, comparado ao sal (SF e SC), devido a diminuição da repulsão eletrostática e aumento da camada de solvatação. Em SC, nota-se uma terceira transição, $T = 39,7$ °C, $\Delta H = 12,7$ kJ/mol e $\Delta T_{1/2} = 2,7$ °C, não esclarecido, mas que pode ser um desdobramento da transição das micelas, (Tabela 17).

A CMT teve um acréscimo máximo de 4 °C, $\Delta H_m \approx 52, 62$ e 50 kJ/mol respectivamente para água, SF e SC. Em SG a transição da micela de F127 foi inibida. O $\Delta CMT_{1/2}$ de maior valor em SF (6,3 °C), se comparado à água (4,3°C) e SC (4,7 °C) indica que a transição das micelas é lenta e de baixa cooperatividade na presença de sal. De acordo com a Tabela 18, o comportamento no modo resfriamento é semelhante ao do aquecimento. No sistema de DODAC (1 mM) /F127 (0,2 mM), as vesículas foram preservadas nos três soros e houve maior intensidade em comparação a água; a transição das micelas de F127 foi inibida apenas em SG.

Figura 35- Termogramas da dispersão de DODAC/ F127 em água, SF, SG e SC, por aquecimento (a) e resfriamento (b).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 17- Parâmetros térmicos de DODAC/F127 em água, SF, SG e SC, no modo aquecimento.

Soro	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	CMT (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta CMT_{1/2}$ (°C)	T (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
Água	49,0	10,4	0,4	24,0	52,0	4,3			
SF	47,3	36,7	0,8	27,6	62,0	6,3			
SG	47,3	43,5	3,0	-	-	-			
SC	47,2	45,4	1,0	28,1	50,0	4,7	39,7	12,7	2,7

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 18- Parâmetros térmicos de DODAC/F127 em água, SF, SG e SC, no modo resfriamento.

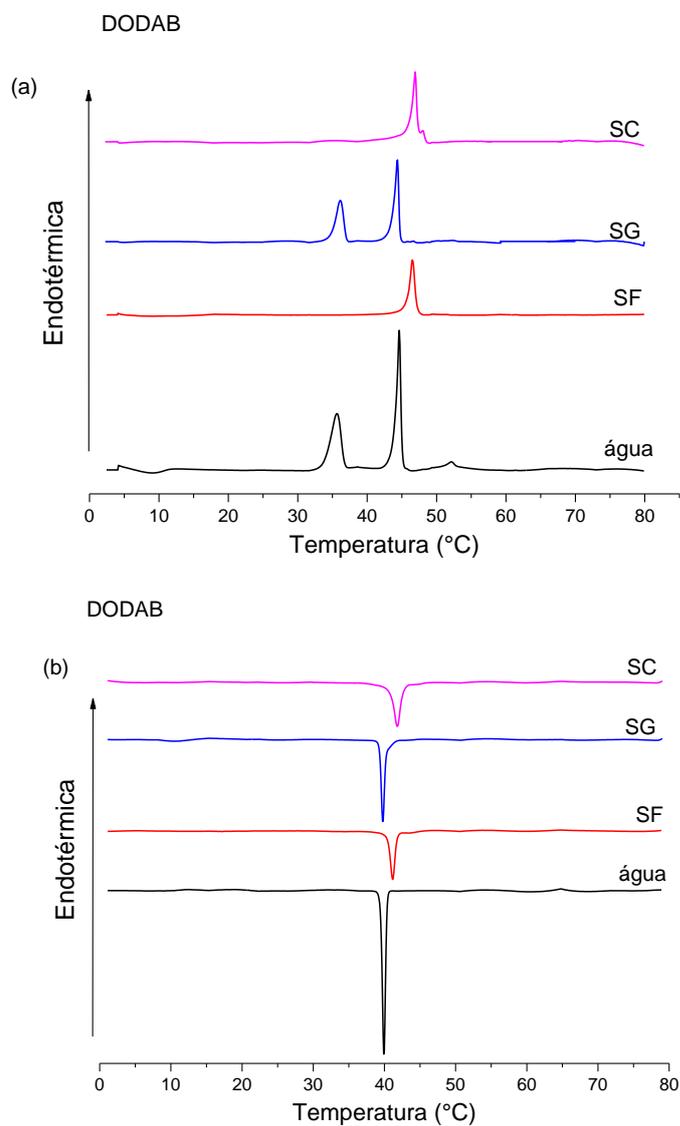
Soro	T'_m (°C)	$\Delta H'_m$ (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	CMT' (°C)	$\Delta H'$ (kJ/mol)	$\Delta CMT'_{1/2}$ (°C)	ΔT_m (°C)	ΔCMT (°C)
Água	43,3	10,1	2,1	23,4	40,9	4,0	5,7	0,6
SF	41,0	28,0	2,0	23,0	58,0	3,3	6,3	4,6
SG	41,1	40,0	3,2	-	-	-	6,2	-
SC	40,7	35,0	1,2	22,5	60,0	2,1	6,5	5,6

Fonte: Elaborado pela autora.

O termograma de DODAB (1 mM) em água (Figura 36), apresenta tipicamente três transições endotérmicas, em $T_s \approx 36$ °C, $T_m \approx 45$ °C e $T_p \approx 52$ °C. No resfriamento, apresenta uma única transição exotérmica, em $T'_m \approx 40$ °C, conforme Figura 36b, dados da literatura [FEITOSA *et al.*, 2012].

De acordo com a Figura 36a no aquecimento, a pré-transição foi totalmente inibida nos SF e SC, e mantida no SG ($T_s = 36,1$ °C, $\Delta H_s = 32,4$ kJ/mol e $\Delta T_{1/2s} = 1,2$ °C), como a concentração de do SG é 277 mM, está acima da concentração crítica de saturação observada no item 4.2, portanto as estruturas de DODAB são preservadas. A pós-transição foi inibida na presença em todos os soros. A entalpia da pré- e transição principal diminui na presença dos soros. No resfriamento os termogramas apresentaram apenas uma transição, com intensidade menor em SF e SC, em comparação a SG, Figura 36b. Os valores de T_m e T'_m aumentaram em 2 °C para SF e SC, enquanto para SG diminuíram menos que 1 °C. Já a entalpia diminuiu em todos os soros e a cooperatividade foi alterada em ambos os processos, $\Delta T_{1/2m}$ no aquecimento permaneceu entre 0,7-0,8 °C e no resfriamento entre 0,5-1,1 °C, indicando que a transição no aquecimento é mais cooperativa que no modo resfriamento; a histerese permaneceu entre 5,1-4,7°C, (Tabelas 19 e 20).

Figure 36- Termogramas de DODAB (1 mM) em água, SF, SG e SC obtidos nos modos aquecimento (a) e resfriamento (b).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 19- Parâmetros térmicos de DODAB em água, SF, SG e SC, aquecimento.

Soro	T_s (°C)	ΔH_s (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2s}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T_p (°C)	ΔH_p (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2p}$ (°C)
Água	36,0	42,9	1,6	45,0	54,4	0,7	52,0	1,6	0,9
SF	-	-	-	46,5	27,4	0,8	-	-	-
SG	36,1	32,4	1,2	44,3	43,9	0,7	-	-	-
SC	-	-	-	47,0	38,4	0,7	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 20- Parâmetros térmicos de DODAB em água, SF, SG e SC, no modo resfriamento.

Soro	T'_m (°C)	$\Delta H'_m$ (kJ/mol)	$\Delta T'_{1/2m}$ (°C)	$\Delta T'_m$ (°C)
Água	40,0	53,9	0,5	5,0
SF	41,1	26,4	0,7	5,1
SG	39,7	44,0	0,5	4,7
SC	42,0	36,4	1,1	5,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Nos termogramas de DODAB (1 mM)/F127 (0,2 mM) em SF, SG e SC (Figuras 37a e 37b), notam-se um comportamento mais regular se comparado a água. A intensidade da transição de estado gel-LC foi bastante intensa e estreita em SF e SC comparados a SG. A transição da formação das micelas não foi inibida em SF, SG e SC, apresentou um perfil largo e regular, comportamento diferente do observado em DODAC/F127.

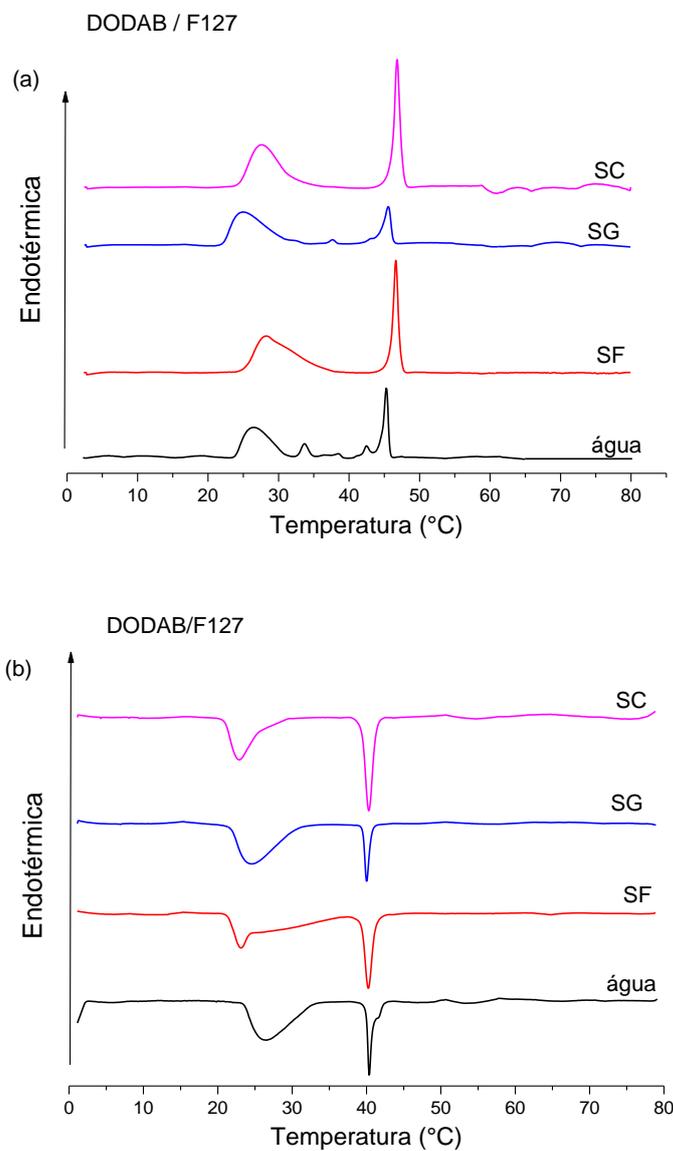
A T_m aumentou em torno de 3 °C, $\Delta H_m \approx 29, 16, 37$ kJ/mol respectivamente em SF, SG e SC, demonstrando que em sal a entalpia é maior comparavelmente a glicose, devido a diminuição da repulsão eletrostática, tornando a transição de alta cooperatividade, $\Delta T_{1/2m}$ foi de 0,8 °C em SF e SC, e de 1,3 °C em SG. A CMT apresentou menor valor em SG (25 °C) se comparada a SF (28,3 °C) e SC (27,6 °C), $\Delta CMT_{1/2}$ foi de 6,2 °C, 5,5 4,7 °C respectivamente, para SF, SG e SC, indicando a baixa cooperatividade em SF, (Tabela 21).

No resfriamento, Tabela 22, T'_m foi alterada apenas na presença de sal, (SF e SC), $\Delta'H_m$ com comportamento semelhante no aquecimento demonstra que gasto energético é equivalente em ambos os modos $\Delta T'_{1/2m} = 1,2, 0,6$ e 1,1 em SF, SG e SC, sugere que a transição LC-gel ocorre lentamente na presença de sal, comportamento inverso ao aquecimento. Portanto no resfriamento é necessário menor velocidade para voltar no estado inicial da bicamada.

A CMT diminuiu em média 2 °C, $\Delta'H$ apresentou um comportamento inverso do observado no aquecimento, $\Delta CMT'_{1/2}$ permaneceu próximo de 5,5 °C em SF e SG enquanto em SC $\Delta CMT'_{1/2} = 3,1$ °C. De modo geral, no resfriamento a configuração

dos monômeros de F127 foi bastante alterada em SC, pois apresentou menor entalpia e maior velocidade, perdendo a reversibilidade observada em água.

Figura 37- Termogramas da dispersão de DODAB/F127 em água, SF, SG e SC por aquecimento (a) e resfriamento (b).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 21- Parâmetros térmicos DODAB/F127 em água, SF, SG e SC, aquecimento.

Soro	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	CMT (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta CMT_{1/2}$ (°C)
Água	44,3	18,0	1,2	25,0	67,0	5,0
SF	46,6	29,0	0,8	28,3	60,0	6,2
SG	45,5	16,3	1,3	25,0	46,4	5,5
SC	46,8	37,0	0,8	27,6	56,0	4,7

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 22- Parâmetros térmicos DODAB/F127 em água, SF, SG e SC, no modo resfriamento.

Soro	T'_m (°C)	$\Delta H'_m$ (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	CMT' (°C)	$\Delta H'$ (kJ/mol)	$\Delta CMT'_{1/2}$ (°C)	ΔT_m (°C)	ΔCMT (°C)
Água	40,0	19,7	0,5	25,0	71,8	5,0	4,3	0,0
SF	40,2	27,2	1,2	23,1	61,0	5,4	6,4	5,2
SG	40,0	12,5	0,6	24,6	69,0	5,5	5,5	0,4
SC	40,3	32,0	1,1	23,0	42,3	3,1	6,5	4,6

Fonte: Elaborado pela autora.

Em SF e SC, os parâmetros térmicos obtidos no aquecimento e no resfriamento, apresentam valores maiores, pois a camada de solvatação das vesículas aumenta na presença de sal. Isso ocorre devido, à forte interação das vesículas com NaCl comparado as moléculas de água, tornando a bicamada mais rígida, tal que maior energia para alterar a curvatura e o grau de fluidez da bicamada é observado, como foi relatados na literatura [FEITOSA; BARRELEIRO, 2004].

Este efeito não é observado em SG, pois a entalpia diminui porque as ligações de hidrogênio formadas são facilmente quebradas com o aumento da temperatura.

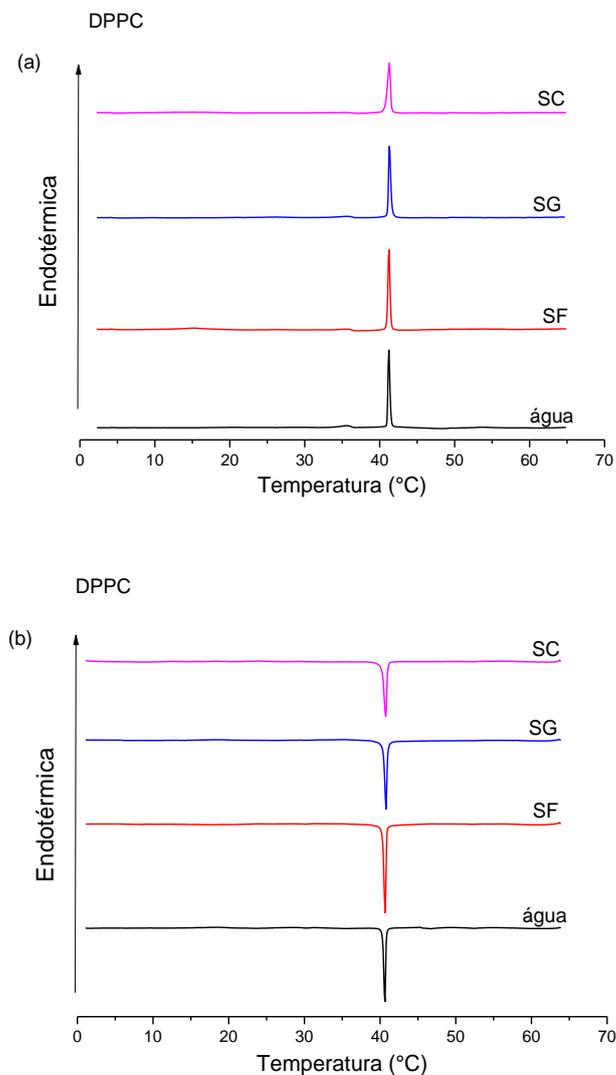
Para DPPC, nos soros testados, T_m e T'_m são pouco alteradas, no aquecimento e resfriamento, (Figura 38a e 38b e Tabela 23). O $\Delta T_{1/2}$ é alterado apenas em SC, em 0,2 °C. No aquecimento a ΔH_m permanece entre 23-24,2 kJ/mol e no modo resfriamento $\Delta H'_m$ aumenta não mais de 8 kJ/mol, demonstrando que o modo resfriamento requer mais energia para retornar ao estado gel da bicamada, a histerese não se alterou (Tabela 20).

De modo geral, as propriedades térmicas das vesículas *zwitterionicas* de DPPC pouco se alteram em SF e SC comparavelmente a SG. O comportamento térmico da

vesícula de DODAB é afetado em SF e SC, ou seja, em solução salina. Em SF, o comportamento das vesículas se assemelha ao efeito de sal, descrito no item 4.1. Em SG, para DODAB e DODAC as vesículas são preservadas, e demonstram pequena alteração no empacotamento da bicamada, como descrito no item 4.2. Para SC, a interação que predomina é a interação eletrostática com as vesículas.

Quando comparamos a ação de F127 em soros (item 4.3), as vesículas mistas de DODAB/F127 apresentam um comportamento mais regular do que as vesículas de DODAB em água, comportamento diferente do observado para DODAC.

Figura 38 - Termogramas da dispersão de DPPC (1 mM) em água, SF,SG e SC, aquecimento (a) e resfriamento (b).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 23- Parâmetros térmicos de DPPC (1 mM) em água, SF,SG e SC, aquecimento e resfriamento.

Soro	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	ΔT_m (°C)
Água	41,2	23,0	0,3	40,6	18,8	0,3	0,6
SF	41,2	24,2	0,3	40,6	26,4	0,3	0,6
SG	41,3	24,0	0,3	40,7	23,4	0,3	0,6
SC	41,3	23,0	0,5	40,7	21,6	0,4	0,6

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.1.4 Resultados de DLS

Através da distribuição de tamanho dos agregados, verificamos alterações estruturais, indicando a coexistência de tamanhos variados, (Figura 39), na ausência e presença do F127.

Na Figura 39a, nas dispersões de DODAC (1 mM) em SF, SG e SC, apresentaram D_H entre 500-800 nm. Para DODAB 1 mM em soros, apresentaram D_H de 200-550 nm. Para DPPC (1 mM), as estruturais de vesículas estão próximas de 600 a 800 nm. O DPPC apresentou uma segunda população de baixa intensidade de estruturas lamelares, de 1300-1500 nm, dados não apresentados.

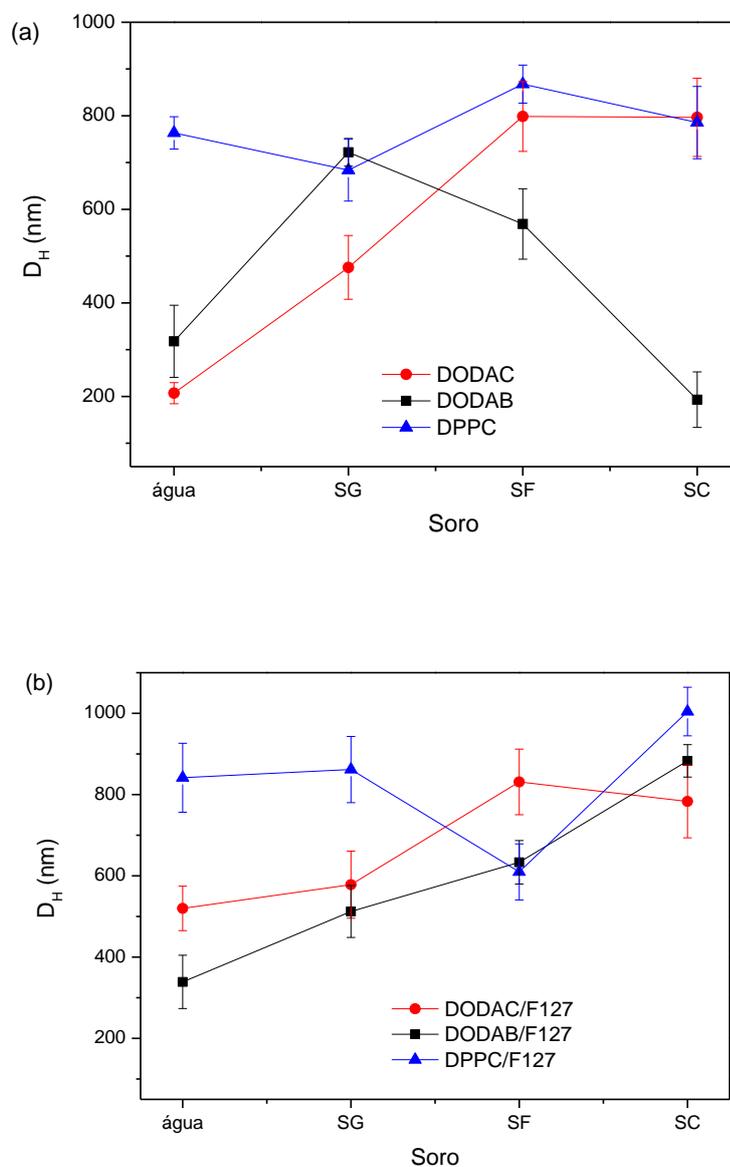
Na presença de F127, as estruturas mistas catiônicas apresentam D_H mais regulares, sem oscilações nos valores, comparadas com a Figura 39a. Para DODAC/F127, o D_H é maior comparado a DODAB/F127, em água, SF e SG, as vesículas DODAC/F127 são preservadas, apresentaram D_H entre 500-800 nm.

Para DODAB/F127, em água permanece inalterado o D_H comparativamente na ausência de F127 em SG, o D_H foi maior (próximo de 500 nm) e D_H igual 700 a 900 nm em SF e SC, isto é, na presença de F127 as estruturas de DODAB são preservadas e permanecem estáveis em solução de NaCl (SF e SC), de acordo com as análises de espectrofotometria de UV-vis e DSC. Para DPPC/F127 em SG o D_H foi semelhante em água, em SF diminuiu ficando próximo de 600 nm, e na mistura predominou estruturas maiores e multilamelares.

Em geral, sem F127, o sal aumenta o tamanho das estruturas de DODAC e DPPC, devido à diminuição da repulsão entre os lipídios e fosfolipídios adjacentes, enquanto para DODAB, ocorre a competição entre os contra íons de Br^- e ânion Cl^- ,

causando um D_H menor. Em SG, DODAC diminui seu tamanho comparado à DODAB e DPPC. Em SC em DODAC predominam as interações eletrostáticas, pois o D_H em SF e próximo do SC, diferente para DODAB e DPPC. Com F127, as estruturas mistas de DODAC/F127 foram mais alteradas e maiores, comparadas à DODAB/F127. Para DPPC/F127 houve maiores D_H em água e SG, enquanto que em SF e SC, se assemelhou a DODAB/F127.

Figura 39- Medidas no D_H das vesículas em soluções fisiológicas de DODAB, DODAC e DPPC (a) e na presença de F127 (b). Resultados obtidos a 25 °C e ângulo de espalhamento de 90°.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2 Resultados de LF

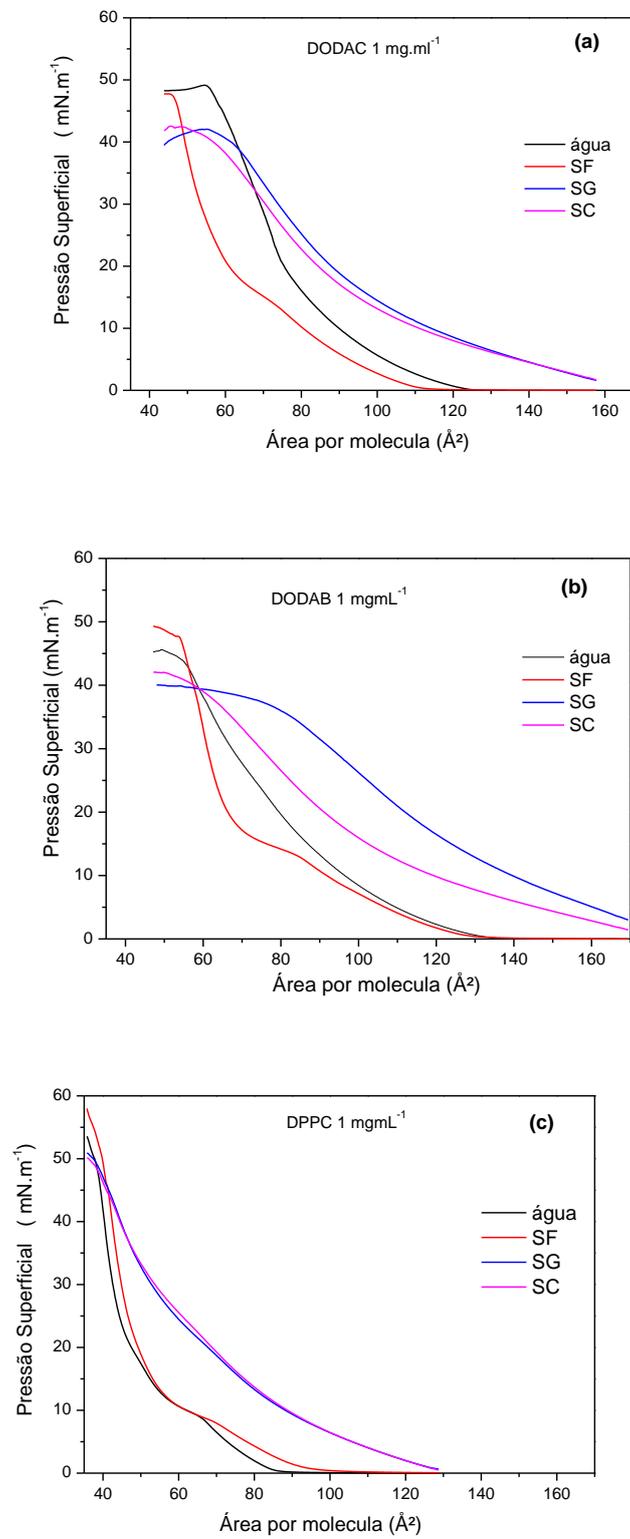
Os filmes de Langmuir de DODAB, DODAC e DPPC foram investigados a 25°C, com subfase de água ou SF, SG e SC.

Na figura 40, em SF, as curvas de DODAB e DODAC foram deslocadas para áreas menores, pois o sal diminui a repulsão eletrostática entre os lipídios. Nota-se a transição do líquido expandido para condensado mais pronunciada em DODAB comparavelmente a DODAC, (Figuras 40a e 40b), e a pressão de colapso alterada de 45 para 50 mN.m^{-1} para DODAB, permanece constante para DODAC. Para DPPC as curvas em SF foram deslocadas para áreas maiores e a pressão de colapso aumentou para 57 mN.m^{-1} se comparada a água, efeito é semelhante ao observado para DODAB, (Figura 40c).

Em SG, as curvas também foram deslocadas para a área maiores e não se observou nenhuma transição para os três lipídios. A pressão de colapso diminuiu, permanecendo próxima de 40 mN.m^{-1} para DODAC e DODAB, e 50 mN.m^{-1} para DPPC.

Em SC as curvas de DODAC e DPPC apresentaram comportamento semelhante ao SG, devido à solução apresentar moléculas de glicose na subfase que impediam a interação entre os íons de Cl^- com a parte polar, diferentemente de DODAB, pois em SC, a curva foi deslocada para áreas ainda maiores, talvez, devido à saturação da monocamada por moléculas de glicose. Comparando o comportamento de bicamadas (dados de DSC) e monocamadas (Filmes de Langmuir) em SC, nas bicamadas predomina a interação com sal diferentemente das monocamadas que predomina a interação com GLI.

Figura 40- Monocamadas de DODAB (a), DODAC (b) e DPPC (c) 1 mgmL⁻¹ em clorofórmio espalhado na subfase água, SF, SG e SC, a 25°C.



Fonte: Elaborado pela autora.

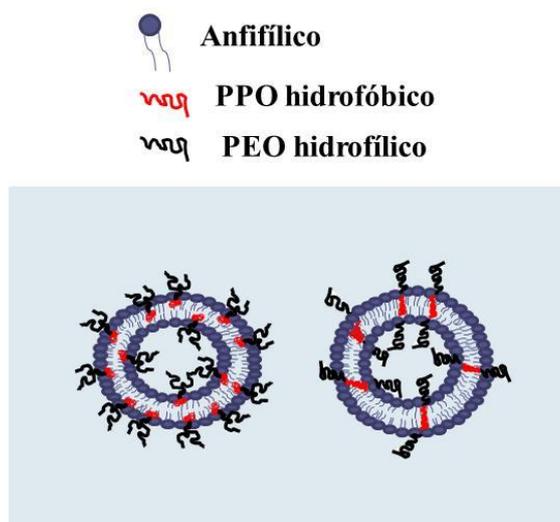
4.3.3 Conclusão

F127 apresenta três blocos, onde o bloco central é hidrofóbico e os blocos terminais são hidrofílicos, como descrito na seção 1.2, isto é, a formação das vesículas mistas dos anfifílicos com F127, como *helper*, em água, é apresentada na Figura 41, onde a região hidrofóbica, composta de PPO, interage fortemente com a região das cadeias hidrocarbônicas dos anfifílicos, e a parte hidrofílica (de PEO) interage com a região hidrofílica do anfifílico. Lemos e colaboradores relataram que, dependendo da concentração de F127, predominam estruturas de vesículas mistas ou micelas mistas [LEMONS, ADATI, FEITOSA, 2019].

Em SF e SC, onde predomina interação eletrostática, as vesículas mistas são mais estáveis comparadas às vesículas puras, pois a região composta de PEO protege a bicamada da ação do ânion presente na solução; já para SG, ocorrem interações de hidrogênio entre as moléculas de GLU e o copolímero.

Em geral, as estruturas mistas de DODAC/F127 formam bicamadas estáveis e de tamanhos menores, com o observado por espectrofotometria de UV-Vis, DSC e DLS, comparavelmente a DODAB/F127. Como as estruturas de DODAB se assemelham a DPPC, o comportamento de ambo com F127 e também semelhante.

Figura 41 – Modelo da interação dos anfifílicos com o *helper* F127.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Vesículas com DOX

Misturas de lipídio catiônico, como DODAB ou DODAC, na presença de F127, formam estruturas coloidais, como vesículas ou micelas, com grande potencial de aplicação industrial e médica, entre outras [BARDHAN, *et al.*, 2001].

Nesta Seção, foi investigada a solubilização do fármaco anticancerígeno DOX nas vesículas mistas de DODAB ou DODAC na presença de F127 (*helper*), como possível carreador não viral de fármacos. F127 é um composto biocompatível e aceito pela FDA (*Food and Drug Administration*) para testes farmacêuticos [BARENHOLZ, 2012].

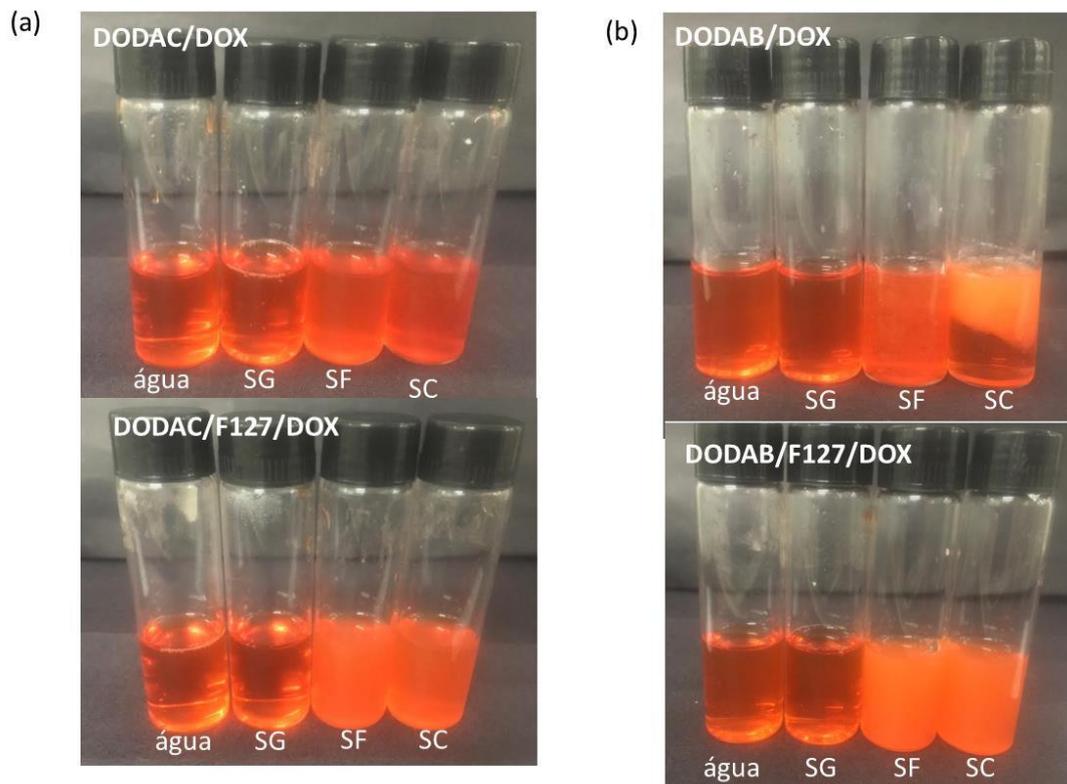
As propriedades físico-químicas de DODAB/F127 e DODAC/F127 (na ausência de DOX), em SF, SG ou SC, foram investigadas na Seção 4.3. O efeito de DOX nestas vesículas foi igualmente investigado e os resultados comparados.

4.4.1 Análise visual das amostras

Análise visual das amostras de DODAC/DOX e DODAB/DOX, na ausência e presença de F127 (Figura 42), após um dia do preparo indicam que as dispersões mistas contendo DODAC são mais estáveis do que as dispersões DODAB. Na Figura 42a, as dispersões de DODAC/DOX, em água e em SG, são estáveis, na ausência e na presença de F127. Em SF e SC, sem F127, as amostras não são turvas comparadas às amostras contendo F127, provavelmente devido à formação de estruturas maiores com F127, devido à predominância de interações eletrostáticas nessas amostras.

Para DODAB/DOX, Figura 42b, o comportamento é semelhante ao de DODAC em água e SG; porém, na presença de sal, SF e SC, sem F127, as amostras são desestabilizadas, havendo formação de flocos em SF, e separação de fase em SC. Esse efeito não foi observado na presença de F127, onde as amostras permanecem turvas sem separação de fase e sem formação de flocos em SF e SC. É provável que, na presença de F127, DODAB/DOX formem estruturas maiores, que permaneceram estáveis. Para possível aplicação, os sistemas de DODAC/DOX, contendo ou não F127, são mais apropriados comparados aos sistemas análogos contendo DODAB.

Figura 42- Imagens de amostras de (a) DODAC/DOX e (b) DODAB/DOX na ausência e na presença de F127, em água, SF, SG e SC, após um dia do preparo. Amostras foram mantidas a 25 °C.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.2 Resultados de espectrofotometria UV-Vis

As medidas de transmitância (T_{500}) seguem o mesmo padrão apresentado neste trabalho. Em termos de comparação, foram realizadas medidas de transmitância de DOX, em solução fisiológica e em vesículas catiônicas de DODAC/DOX e DODAB/DOX, na ausência e na presença de F127, visando entender o comportamento analisado na Seção 4.4.1.

Análise da transmitância da solução de DOX, (Figura 43a), indica maior valor de transmitância comparativamente a DODAC/DOX e DODAB/DOX. Como DOX é uma molécula anfifílica, há formação de estruturas menores quando adicionada em solução aquosa. A parte hidrofílica se volta para solução e protege a parte hidrofóbica da molécula, efeito este é observado em solução salina, SF e SC, onde as estruturas são

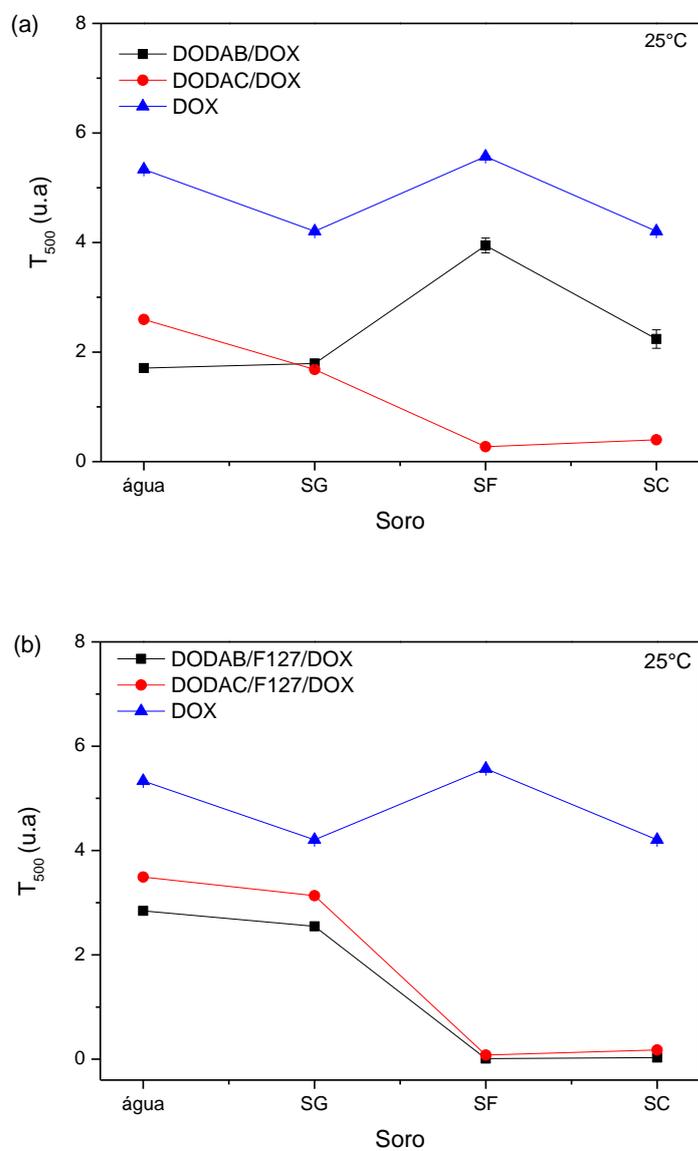
menores, neutras e compactadas se comparadas às formadas em água e SG, onde as estruturas são maiores a adquirem uma carga negativa do grupo amina.

Ao analisar o feito da DOX nas vesículas de DODAC e DODAB, é provável que DOX esteja solubilizada nas vesículas catiônicas de DODAC, pois o perfil de T_{500} muda em comparação com DOX pura em solução aquosa, com os valores de transmitância diminuindo.

Para DODAB/DOX, T_{500} permanece constante em água e SG. Na presença de NaCl, SF e SC, o perfil de T_{500} se assemelha a DOX pura em solução, indicando que as estruturas de DODAB desestabilizam, predominando DOX livre em solução, Figura 43a.

Para as estruturas contendo F127, Figura 43b, o comportamento de DODAC/F127/DOX e DODAB/F127/DOX é distinto de DOX livre em solução, o valor de T_{500} diminui, pois parte do fármaco é solubilizada nas vesículas mistas, apresentando tamanhos menores, em água e SG, e maiores em SF e SC. É provável que F127 auxilie na interação de DOX com as vesículas catiônicas, pois caudas de PEO do copolímero interagem com a região hidrofóbica de DOX livre na solução.

Figura 43 - T_{500} de DODAC (a) e DODAB (b) e ação de F127/DOX em água, SG, SF e SC, respectivamente, a 25°C.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.3 Resultado de DSC

Os termogramas de DODAC (1 mM)/F127 (0,2 mM)/DOX (0,5 mM) são mostrados na Figura 44. Todos os termogramas, nos modos aquecimento e resfriamento, apresentam duas transições térmicas do estado gel-LC das vesículas e da formação das micelas de F127.

No aquecimento, (Figura 44a e Tabela 24), em SF e SC, a transição do estado de gel-LC é de bastante intensidade e estreita ($\Delta T_{1/2m} = 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$) comparada à água ($\Delta T_{1/2m} = 0,9 \text{ }^\circ\text{C}$) e SG ($\Delta T_{1/2m} = 1,4 \text{ }^\circ\text{C}$). Na presença de sal a transição é bastante cooperativa. A transição característica da formação da micela de F127 (CMT) apresenta maiores valor para SF e SC do que a água e SG, em SC há um desdobramento, provavelmente devido à formação de estruturas micelares diferentes com DOX. Comportamento distinto foi observado na ausência de DOX.

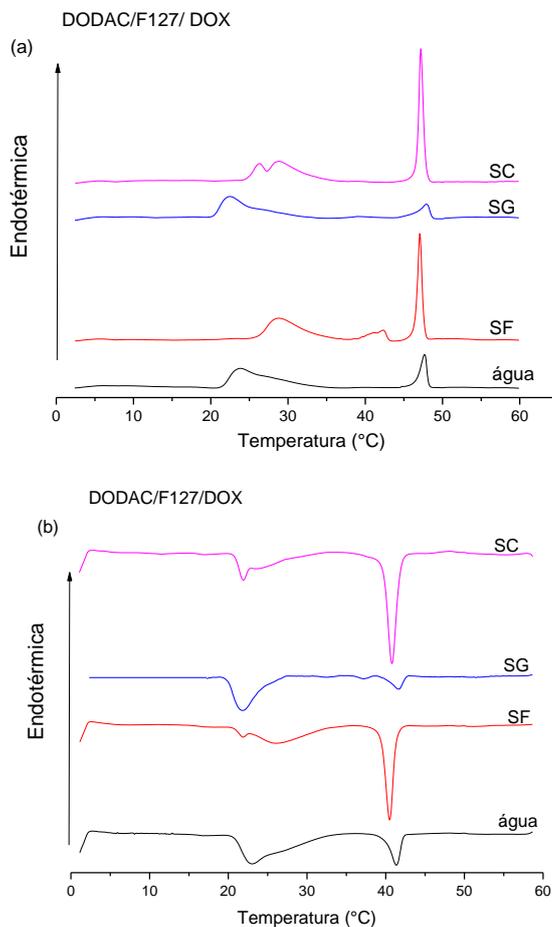
Em SF e SC, $T_m \approx 47 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H_m \approx 34,5$ e 42 kJ/mol respectivamente, demonstrou uma pequena alteração ao observado em água. Em SG, $T_m = 48 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\Delta H_m = 9 \text{ kJ/mol}$, houve diminuição em 30 kJ/mol do valor observado em água na ausência de DOX, indicando desestabilização das vesículas em SG com DOX, pois a transição principal das vesículas mistas é de menor intensidade, se comparada com água.

Ao analisar a entalpia, ΔH do F127 = 56 - $50,5 \text{ kJ/mol}$, respectivamente em SF e SC, aumentou comparado à água. Em SG $\Delta H = 41 \text{ kJ/mol}$, o que foi maior comparado à água. De acordo com o item 4.3, a transição da micela de F127 foi inibida em SG, indicando que as micelas são favorecidas pela DOX em solução de GLU.

No resfriamento, Figura 44b e Tabela 25, as vesículas apresentam comportamento semelhante ao aquecimento. Os valores de $CMT' = 23, 26$ e $22 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente em água, SF e SG, apresentando mesmo valor em SG e SC, $\Delta H'$ diminuiu, apresentando menor valor em SC, demonstrando que a interação entre micelas e fármacos não é reversível, Tabela 25.

As vesículas permaneceram estáveis em SF e SC com DOX, e as micelas de F127 tiveram um comportamento distinto do observado na ausência de DOX.

Figura 44- Termogramas da dispersão de DODAC/F127/DOX. Por aquecimento (a) e resfriamento (b).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 24- Parâmetros térmicos de DODAC/F127/DOX em água, SF, SG e SC, durante o aquecimento.

Soro	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	CMT (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta CMT_{1/2}$ (°C)
Água	47,6	15,0	0,9	24,0	47,0	5,8
SF	47,0	34,5	0,7	28,7	56,0	4,8
SG	48,0	9,0	1,4	22,5	41,0	3,8
SC	47,2	42,0	0,7	28,7	50,5	6,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 25- Parâmetros térmicos de DODAC/F127/DOX em água, SF, SG e SC, durante o resfriamento.

Soro	T'_m (°C)	$\Delta H'_m$ (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	CMT' (°C)	$\Delta H'$ (kJ/mol)	$\Delta CMT'_{1/2}$ (°C)
Água	41,3	13,0	1,3	23,0	48,0	6,2
SF	40,5	33,0	1,0	26,0	38,0	7,0
SG	41,6	6,0	1,6	22,0	33,0	3,0
SC	40,8	42,0	1,2	22,0	27,0	3,4

Fonte: Elaborado pela autora.

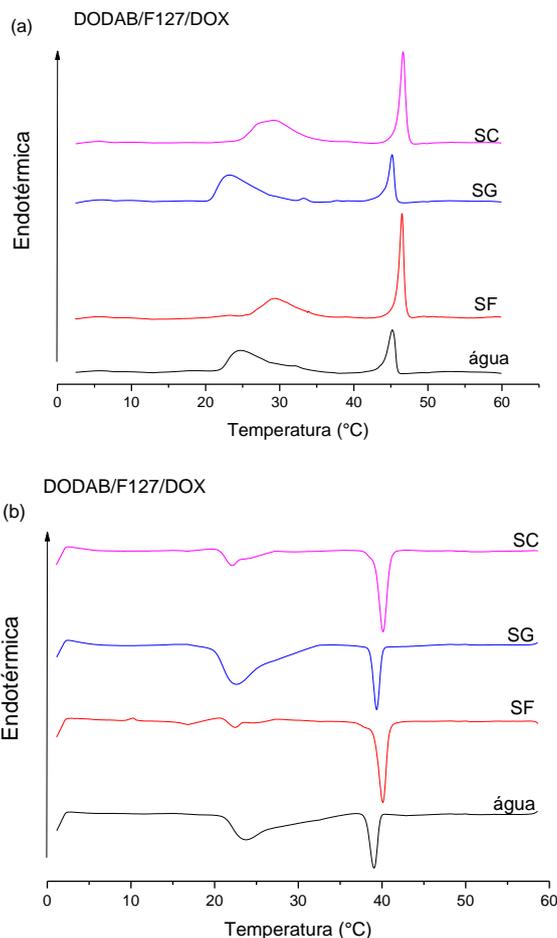
Os termogramas de DODAB (1 mM)/F127 (0,2 mM)/DOX (0,5 mM) são mostrados na Figura 45. Todos os termogramas, nos modos aquecimento e resfriamento, apresentam duas transições térmicas (em T_m e CMT), indicando que as vesículas unilamelares e micelas são preservadas.

No aquecimento em água com DOX, o valor da T_m permanece inalterado, $T_m \approx 45^\circ\text{C}$, a ΔH_m aumenta em 13 kJ/mol, caracterizando possível interação do fármaco na membrana da vesícula. Em SF e SC, T_m e ΔH_m aumentaram respectivamente em 2°C e 23 kJ/mol. Efeito contrário foi observado quando analisamos a ΔH do F127, em SF, SG e SC, que se reduziu comparado a água com DOX. Em SG, os parâmetros térmicos foram bem próximos dos valores em obtidos em água, Figura 45a.

Aparentemente SF e SC, tende a preservar o complexo formado, alterando a camada de solvatação da bicamada, sendo necessária maior energia para alterar a fluidez desse complexo, (Tabela 26). Em SG, T_m e CMT são praticamente inalteradas e a entalpia diminui para ambas as transições, (Tabela 26).

No resfriamento, (Figura 45b), CMT' permaneceu inalterada, a $\Delta H'$ apresentando um valor distinto em SG no aquecimento está próximo de 16 kJ/mol e no resfriamento está 73 kJ/mol, demonstrando que a interação entre micelas e fármacos não é reversível, (Tabela 27), efeito semelhante ao observado para DODAC. É possível a formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do fármaco e as moléculas livres de glicose, alterando a estabilidade da estrutura coloidal presente.

Figura 45- Termogramas da dispersão de DODAB (1 mM)/ F127 (0,2 mM) em água, SF, SG e SC com DOX (0,5 mM), medidas durante aquecimento (a) e resfriamento (b).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 26- Parâmetros térmicos de DODAB/F127/DOX em água, SF, SG e SC, obtidos no modo aquecimento.

Soro	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta T_{1/2m}$ (°C)	CMT (°C)	ΔH (kJ/mol)	$\Delta CMT_{1/2}$ (°C)
Água	45,2	18,0	1,1	25,2	51,0	7,4
SF	46,5	31,4	0,7	29,0	35,0	5,2
SG	45,2	16,0	0,8	23,2	46,0	5,2
SC	47,0	31,0	0,8	29,1	46,0	6,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 27- Parâmetros térmicos de DODAB/F127/DOX em água, SF, SG e SC, obtidos no modo resfriamento.

Soro	T _m (°C)	ΔH _m (kJ/mol)	ΔT _{1/2m} (°C)	CMT ['] (°C)	ΔH ['] (kJ/mol)	ΔCMT ['] _{1/2} (°C)
Água	39,1	19,0	1,1	24,0	48,0	5,4
SF	40,1	33,0	1,1	-	-	-
SG	39,0	19,0	0,8	23,0	73,0	5,0
SC	40,0	31,0	1,0	22,0	14,0	3,0

Fonte: Elaborado pela autora.

Em geral, as vesículas mistas de DODAC tiveram seus parâmetros térmicos bastante alterados com DOX, se comparadas com as vesículas mistas de DODAB. Os termogramas de DODAC/F127/DOX apresentaram transições secundárias e desdobramentos que não foram observados em DODAB/F127/DOX, ainda são necessários testes de estabilidade, controle de tamanho e da carga superficial dos complexos formados. Porém é provável que ocorra interação com as vesículas catiônicas mistas com DOX, mesmo que o fármaco em pH próximo de 7 apresente um caráter mais catiônico.

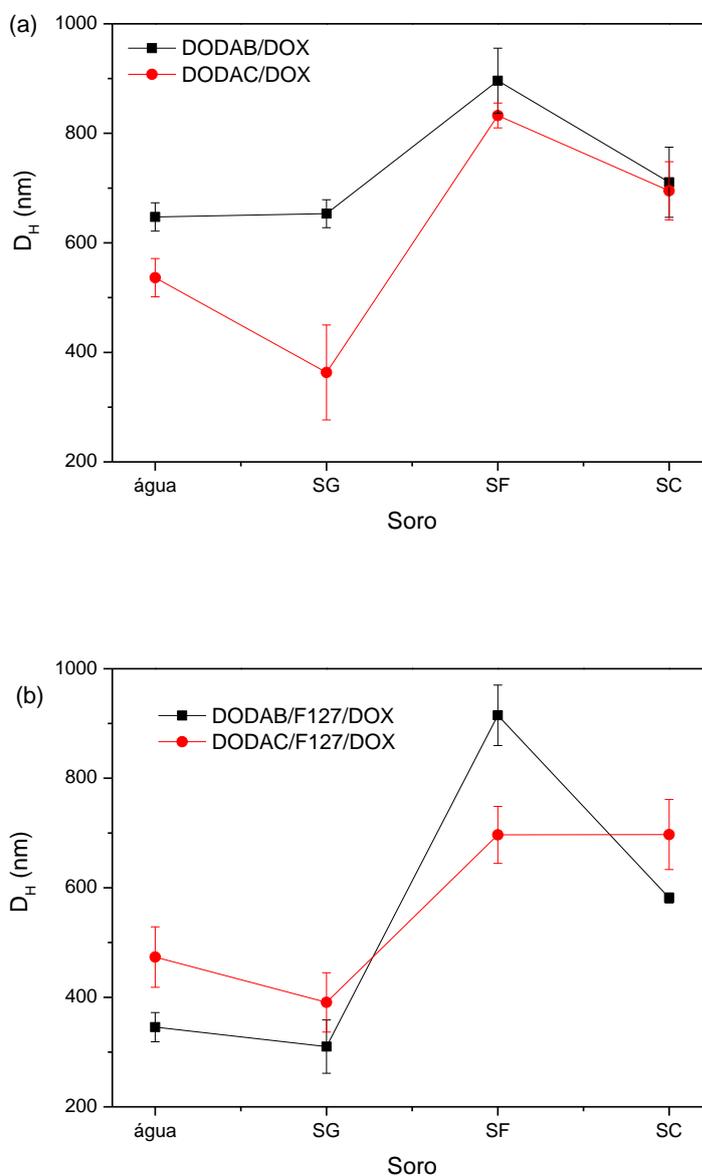
4.4.4 Resultado de DLS

De acordo com a Figura 46, DODAC/DOX e DODAB/DOX, na ausência e presença de F127, é analisado em SF, SG e SC com as medidas realizadas a 25 °C e em triplicata.

Para DODAC/DOX, os valores do D_H das vesículas em água é 680 nm, já para SG, diminui ficando próximo de 400 nm, considerando o erro experimental. Em NaCl, SF, o D_H = 800 nm, em SC esta próximo de 700 nm.

Para DODAB/DOX, o D_H é maior nos três soros testados comparado a DODAC/DOX, em água e SG o D_H = 700 nm, aumentando para 900 nm em SF, e SC próximo de 800 nm, Figura 46a. O efeito da DOX no tamanho de DODAC comparado a DODAB indica que DODAC/DOX apresenta D_H menor comparado a DODAB/DOX nos três soros testados.

Figura 46 - Medidas no D_H das vesículas de DODAC (a), DODAB (b), F127/DOX. Resultados obtidos a 25 °C, e ângulo de espalhamento de 90°.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 46b, DODAC/F127/DOX em água o D_H é maior (500 nm) comparado a DODAB/F127/DOX (300nm), em SG, considerando o erro experimental D_H próximos de 400 nm para ambos os lipídios. Em SF e SC, DODAB/F127/DOX o D_H teve valores semelhantes ao observado sem F127, pois em solução salina de NaCl prevalece interação eletrostática para DODAB. Já para DODAC/F127/DOX, o efeito é diferenciado, pois o D_H aumenta para 700 nm e permanece semelhante para SF e SC, é

provável que o F127 preserve a interação das vesículas com DOX e diminua os efeitos eletrostáticos gerados pela presença de NaCl. Para DODAC/F127/DOX, o D_H não apresenta grandes oscilações nos valores, se comparado a DODAB/F127/DOX, isto é, com formação de estruturas mais estáveis e regulares.

4.4.5 Conclusão

Nesta Seção foram apresentados resultados preliminares da solubilização do fármaco antitumoral doxorubicina (DOX) nas vesículas catiônicas mistas de DODAC/F127 e DODAB/F127 em solução fisiológica (SF, SG e SC), para possível aplicação em soro fisiológico enriquecido, ou no tratamento do câncer. Este fármaco é um medicamento com efeitos adversos, como a cardiotoxicidade [AGRAWAL, BARTH WAL, BARTH WAL, 2009, SAWYER, *et al.*, 2010]. Portanto, o estudo da interação da DOX com lipídios e copolímeros pode definir seu papel no sistema biológico e ser determinante para sua atividade farmacológica.

As dispersões de DODAC/F127/DOX, nas três condições testadas (SG, SF e SC), comparadas com água, permanecem estáveis, conforme observado nas imagens fotográficas; ao contrário do observado para DODAB/F127/DOX. De acordo com os dados de DSC, os termogramas de DODAC/F127/DOX comparados aos das vesículas mistas de DODAC/F127 (sem DOX), mostram comportamentos não observados para DODAB/F127. Já a distribuição do tamanho DODAC/F127/DOX apresenta D_H maior em água e SG, permanecendo inalterado em SF e SC, comparavelmente a DODAB/F127.

É evidente que a presença de NaCl afeta a estrutura das vesículas de DODAB, na ausência e na presença de F127. Portanto, sistemas mistos com DODAC, contendo ou não F127, são mais indicados como carreadores de DOX.

5 CONCLUSÃO GERAL

O efeito da concentração de NaBr, NaCl, e glicose (GLU) nas propriedades térmicas e estruturais de vesículas e monocamadas dos lipídios catiônicos de DODAB e DODAC, e *zwitteriônico* de DPPC, é investigado para possíveis aplicações em soros fisiológico (SF), glicosado (SG) e caseiro (SC) contendo vesículas com função carreadora ou bactericida (lipídios catiônicos).

Plurônico F127 foi usado como *helper*, a fim de ajustar as propriedades das vesículas para a função carreadora de fármacos. Testes de incorporação de pequena molécula com ação farmacológica às vesículas e bicamadas foram realizados usando anticancerígeno doxorrubicina (DOX).

A ação de NaCl e NaBr nas vesículas e monocamadas é dependente da concentração e da composição do sal e do lipídio usado. Em água, as vesículas de DODAC são mais estáveis do que as de DODAB; Entretanto, em excesso de NaCl, as vesículas de DODAC e DODAB são mais estáveis do que presença de NaBr, o que nos leva a concluir que Br^- interage mais fortemente com as vesículas de DODAC ou DODAB do que Cl^- , devido seu menor raio hidrodinâmico.

Esses sais interagem fracamente com as vesículas *zwitteriônicas* de DPPC, se comparar a DODAB e DODAC. Na presença de pouco sal (até 1 mM), em geral, as vesículas tem bom comportamento de estabilidade.

Na presença de NaCl ou NaBr, as vesículas, respectivamente de DODAB e de DODAC, apresentam comportamento de vesículas mistas de DODAX ($X = \text{Br}^-/\text{Cl}^-$), com características de DODAC ou de DODAB, em excesso de Cl^- ou de Br^- , respectivamente. Tal comportamento pode ser atribuído à maior afinidade de Br^- às vesículas. O equilíbrio entre as propriedades das vesículas e o tipo de íons pode ser de interesse em aplicações práticas, como por exemplo, na diluição das vesículas em SF, SG e SC.

A ação desses sais na monocamada de DODAB e DODAC tende a blindar a repulsão eletrostática entre as cabeças polares desses lipídios, realçando a transição do estado líquido expandido para o estado condensado, comparável aos filmes de DPPC, nos quais o sal tem efeito de aumentar a área por molécula.

Devido à fraca interação GLU-lipídio, as vesículas resistem a grandes quantidades do açúcar (até 400 mM), preservando a sua estrutura de mono (LF) e de bicamada (DSC e DLS). Pequena mudança estrutural ou térmica foi observada nessas

estruturas com a adição de GLU. As vesículas de DODAC e de DPPC foram preservadas nos soros fisiológico (SF), glicosado (SG) e caseiro (SC). As vesículas de DODAB são instáveis em SF e estáveis nos demais soros. A ação da GLU nas vesículas obedece à seguinte sequência de estabilidade: DPPC > DODAC > DODAB. As vesículas mistas de DODAB/F127 e DODAC/F127 também foram preservadas nesses soros. Portanto, os estudos preliminares sobre a solubilização de DOX nas vesículas mistas são mais favoráveis às vesículas de DODAC/F127 que DODAB/F127, nas condições testadas, conforme dados apresentados por imagens fotográficas, transmitância, DSC e DLS.

REFERÊNCIAS

ADATI, R. D.; FEITOSA, E. The assembly of dialkyldimethylammonium bromide cationic lipids as vesicles or monolayers in presence of poly(ethylene glycol). **Thermochimica Acta**, v.613, n., p.71-76, 2015.

AGRAWAL, P.; BARTHWAL, S.K.; BARTHWAL, R. Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n.4, p. 1437-1451, 2009.

ALEXANDRIDIS, P.; HATTON, T. A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.96, n.2, p.1-46, 1995.

ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J.F.; HATTON, T.A. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. **Macromolecules**, v.27, n.9, p.2414-2425, 1994.

ANDERSON, L.J.; *et al.* Optically guided controlled release from liposomes with tunable plasmonic nanobubbles. **Journal Controlled Release**, v.144, n.2, p. 151-158, 2010.

AOKI, P. H. B.; *et al.* Sensor Array Made with Nanostructured Films to Detect a Phenothiazine Compound. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, vol. 8, n., p.4341-4348, 2008.

ARIAS, J. M.; *et al.* Reorganization of Hydration Water of DPPC Multilamellar Vesicles Induced by l-Cysteine Interaction. **Journal of Physical Chemistry B**, v.122, n., p. 5193-5204, 2018.

AROTI, A.; *et al.* Effects of monovalent anions of the Hofmeister series on DPPC lipid bilayers part I: Swelling and In-Plane equations of state. **Biophysical Journal**, v.93, n., p.1580-1590, 2007.

BANGHAM, A. D.; HORNE, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. **Journal of Molecular Biology**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 660-668, 1964.

BARENHOLZ, Y. Doxil(R)-the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of Controlled Release**, v.160, n.2, p.117-134, 2012.

BARDHAN, R. ; *et al.* Theranostic nanoshells: From probe design to imaging and treatment of cancer, **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n.10, p. 936-946, 2011).

BARRELEIRO, P. C. A.; *et al.* Interaction of Octaethylene Glycol n-Dodecyl Monoether with Dioctadecyldimethylammonium Bromide and Chloride Vesicles. **Langmuir**, v.18, n.4, p.1024-1029, 2002.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B., MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 43, n. 2, p., 2007.

BATZRI, S.; KORN, E. D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v.298, n.4, p.1015-1019, 1973.

BLANDAMER, M. J.; *et al.* Reorganisation of alkyl chains in vesicles formed in aqueous solution by dialkyldimethylammonium bromide, $R_2N^+Me_2Br^-$ where $R=C_{12}H_{25}$, $C_{14}H_{29}$, $C_{16}H_{33}$ or $C_{18}H_{37}$. **Journal Chemical Society, Faraday Transactions**, v.93, p.453-455, 1997.

BRAY, F.; *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population – based study. **The Lancet Oncology**, v.13, n.8, p. 790-801, 2012.

BELCHIOR, **Sujeito de sorte**, Rio de Janeiro: PolyGram:1976. Suporte (65 min)

BREZESINSKI, G.; MOHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100-102, n.28, p. 563-584, 2003.

BOHORQUEZ, M.; KOCH, C.; TRYGSTAD, T.; PANDIT, N. A Study of the temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.216, n.1, p.34-401, 1999.

CAVALLI, A.; *et al.* Using an effective surface charge to explain surface potential of langmuir monolayers from dialkydimethylammonium halides with the Goy-Chapman theory. **Chemical Physics Letters**, v.338, n. 2-3, p.88-94, 2001.

CERN A.; *et al.* Quantitative structure-property relationship modeling of remote liposome loading of drugs. **Journal of Controlled Release**, v.160, n.2, p. 147-157, 2012.

CHAIBUNDIT, C.; *et al.* Micellization and Gelation of Mixed Copolymers P123 and F127 in Aqueous Solution. **Langmuir**, v.23, n.18, p.9229-9236, 2007.

CHATTERJEE, K.; *et al.* Doxorubicin cardiomyopathy. **Cardiology Journal**, v.115, n.2, p. 155-162, 1999.

CHENG, D.; *et al.* Multifunctional nanocarrier mediated co – delivery of doxorubian and siRNA for synergistic enhancement of glioma apoptosis in rat. **Biomaterials**, v.33, n.4, p.1170-1179, 2002.

CHU, B. “Laser light scattering”, **Editora Academic Press**, New York, 1974.

CHEN, Q.; *et al.* Nanoscale theranostics for physical stimulus-responsive cancer therapies. **Biomaterials Journal**, v.73, n_, p. 214-230, 2015.

CUCCOVIA, I.M.; *et al.* Characterization of dioctadecyldimethylammonium chloride vesicle prepared by membrane extrusion and dichloromethane injection. **Journal of Molecular Liquid**,v.72, n.1-2.,p.323-336, 1997.

CUCCOVIA, I.M. ; *et al.* Reed, Size, Electrophoretic mobility and ion dissociation of vesicles prepared with synthetic amphiphiles, **Journal Physical Chemical**, v. 94, n_, p.3722-3726, 1990.

COOPER, A.; NUTLEY, M. A.; WADOOD, A. Differential scanning microcalorimetry in solution. E. Harding and B. Z. Chowdhry (Eds.), Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry. **Oxford University Press, Oxford New York**, p.287-318, 2000.

DAVIES-COLLEY, R.J.; SMITH, D.G. Turbidity, Suspended Sediment and Water Clarity: A Review. **Journal of the American Water Resources Association**, v.37, n. -, p1085-1101, 2001.

FEITOSA, E.; ALVES, F.R. The role of counterion on the thermotropic phase behavior of DODAB and DODAC vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.156, n.1-2, p. 13-16, 2008.

FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P. C. A.; OLOFSSON, G. Phase transition in dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride vesicles prepared by different methods. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.105, n.2, p.201-213, 2000.

FEITOSA, E.; LEMOS, M.; ADATI, R.D. Mixed cationic surfactants vesicles in (dioctadecyldimethylammonium bromide)/NaCl and (dioctadecyldimethylammonium chloride)/NaBr aqueous dispersions. *Journal of Surfactant and Detergents*, 2019.

FEITOSA, E.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. Unilamellar vesicles obtained by simply mixing dioctadecyldimethylammonium chloride and bromide with water. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.140, n.1-2, p.66-74, 2006.

FEITOSA, E.; KARLSSON, G. Dioctadecyldimethylammonium bromide vesicles prepared by the surfactant removal method. **Journal of Colloid Interface Science**, v.298, n.2, p.1000-1001, 2006a.

FEITOSA, E.; *et al.* Thermal and structural behavior of dioctadecyldimethylammonium bromide dispersions studied by differential scanning calorimetry and X-ray scattering. **PLoS ONE**, v.7, n.9, p.e44702, 2012.

FEITOSA, E.; JANSSON, J.; LINDMAN, B. The effect of chain length on the melting temperature and size of dialkyldimethylammonium bromide vesicles. **Chemistry Physics of Lipids**, v.142, n.1-2, p.128-132, 2006b.

FEITOSA, E. Kinetic asymmetry in the gel-liquid crystalline state transitions of DDAB vesicles studied by differential scanning calorimetry. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.344, n.1, p.70-74, 2010.

FEITOSA, E.; BARRELEIRO, P. C. A. The effect of ionic strength on the structural organization of dioctadecyldimethylammonium bromide in aqueous solution. **Progress in Colloid Polymer Science**, v.128, n., p. 163-168, 2004.

FEITOSA, E.; BROWN, W. Fragment and vesicle structures in sonicated dispersions of dioctadecyldimethylammonium bromide. **Langmuir**, v.13, n., p. 4810-4816, 1997.

FEITOSA, E.; WINNIK, F. Interaction between Pluronic F127 and dioctadecylmethylammonium bromide (DODAB) vesicles studied by differential scanning calorimetry. **Langmuir**, v.26, n.23, p.17852-17857, 2010.

FEITOSA, E. *et al.* DODAB and DODAC bilayer-like aggregates in the micromolar surfactant concentration domain. **Colloid Polymer Science**, v.287, p.591-599, 2009.

FEITOSA, E.; LEMOS, M.; KARLSSON, G. The role of concentration and counterion on the thermal behavior and structural assembly of dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride in water, *manuscrito em preparação*, 2019.

FERREIRA, M. *et al.*; Técnicas de caracterização para investigar interações no nível molecular em filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). **Química Nova**, v.28, n.3, p. 502-510, 2005.

GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; BAREHOLZ, Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. **Clinical Pharmacokinetics**, v.42, n.5, p. 419-436, 2003.

GANTA, S.; *et al.* A review of stimuli responsive nanocarriers for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v.126, n.3, p. 187-204, 2008.

GAUCHER, G.; et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. **Journal Controlled Release**, v.109, p.169-188, 2005.

GEWIRTZ, D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v.57, n.7, p.727-741, 1999.

GIRARD-ERGROT, A.P.; GODOY, S.; BLUM, L.J. Enzyme association with lipidic Langmuir-Blodgett films: interests and applications in nanobioscience. **Advances in Colloid Interface Science**, v. 116, n.1-3, p. 205-225, 2005.

GRADZIELSKI, M.; *et al.* Structural and macroscopic characterization of a gel phase of densely packed monodisperse, unilamellar vesicles. **Journal of Physical Chemistry B**, v.103, n. 9, p.1416-1424, 1999.

GONZALEZ-ANGULO, A.M.; MORALES-VASQUEZ, F.; HORTOBAGYI, G.N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. (eds) **Breast Cancer Chemosensitivity. Advances in Experimental Medicine and Biology**, book series, v. 608, cp.1, p.1-22, 2007.

HAMLEY, I.W. "Block Copolymers in Solution: Fundamentals and Application", Editora **Wiley**, 2005.

HANAI, K.; *et al.* Evaluation of cardiac function by echocardiography in dogs treated with doxorubicin. **Journal of Toxicological Science**, v.21, n.1, p.1-10, 1996.

HASEGAWA, T.; *et al.* Thermally Hydrated DPPC Langmuir Film: A trial application to the analysis of interaction of sucrose with DPPC liposome. **The Journal of Physical Chemical B**, v. 101, n.34, p. 6701-6706,1997.

Home page: National Center for Biotechnology Information. **PubChem**. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sodium_chloride#section=Top>. Acesso em : 22 maio 2018.

HUBER, P.C.; MARUIAMA, C.H.; ALMEIDA, W.P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v.33,n.10, p.2148-2154, 2010.

HUANG, S.K.; *et al.* Pharmacokinetics and therapeutics of sterically stabilized liposomes in mice bearing C-26 colon carcinoma. **Cancer Research**, v.52,n.24,p. 6774–6781, 1992.

ISRAELACHVILI, J.N. Intermolecular and Surface Forces, Editora **Academic Press**, 3rd Edition.

JAIN, K..K.. Handbook of Nanomedicine - Nanomolar Diagnostic and Nano-Oncology. Ed. Humana Press, EUA, 2008.

KABANOV, A.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **Journal Controlled Release**, v.82, n.2-3, p.189-212, 2002a.

KABANOV, A.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, n.5, p.759-779, 2002b.

KLOPMAN, G., SHI, L.M., RAMU, A. Quantitative structure-activity relationship of multidrug resistance reversal agents. **Molecular Pharmacology**, v.52, n.2, p. 323-334,1997.

KOELSCH, P.; *et al.* Specific ion effects in physicochemical and biological systems: Simulation, theory and experiments. **Colloids and Surfaces A:Physicochemical Engineering Aspects**, v.303, n., p.110-136, 2007.

KUNITAKE, T.; OKAHATA, Y. A totally synthetic bilayer membrane. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 99, n. 11, p. 3860-3861, 1977.

LASIC. D. D.; TEMPLETON, N.S. Liposomes in gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.20, p.221-266, 1996.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1985.

LEMOS, M. Transição vesícula-micela em mistura aquosa de sais dialquilados de amônio quaternário com Pluronic® F127. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2015.

LEMOS, M., ADATI, R.D., FEITOSA, E. Vesicle-micelle transition in cationic amphiphile/Pluronic® F127. Models for drugs carriers. Manuscrito em preparação, 2019.

LEMOS, M.; FEITOSA, E. The assembly of dialkyldimethylammonium bromide cationic and dipalmitoylglycerophosphocholine (DPPC) lipids as vesicle or monolayers in presence of glucose. Manuscrito em preparação, 2019.

LIANG, C.H.; CHOU, T.H. Effect of chain length on physicochemical properties and cytotoxicity of cationic vesicles composed of phosphatidylcholines and dialkyldimethylammonium bromides. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.158, n.2, p. 81-90, 2009.

LIU, T. C.; *et al.* Drug delivery with PEGylated MoS² nano-sheets for combined photothermal and chemotherapy of cancer. **Advanced Materials**, v.26, n.21, p.3433-3440, 2014.

LIU, H.; *et al.* Multifunctional polymeric micelles loaded with doxorubicin and poly(dithienyl-diketopyrrolopyrrole) for near-infrared light-controlled chemophototherapy of cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.157, n.1, p. 398-406, 2017.

LITZINGER, D.C.; *et al.* Fate of cationic liposomes and their complex with oligonucleotide in vivo. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1281,n.2, p.139–149, 1996.

LV, H.; *et al.* Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v.114, n.1, p.100-109, 2006.

LOPES, A.; EDWARDS. K.; FEITOSA, E. Extruded vesicles of dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride investigated by light scattering

and cryogenic transmission electron microscopy, **Journal of Colloid Interface Science**, v. 322, n.1, p.582-588, 2008.

LOWN, J.W. Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. **Pharmacology & Therapeutics**, v.60, n.2, p. 185-214, 1993.

MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 1462, n.1-2, p. 109-140, 1999.

MAHATO, R.I.; *et al.* Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of plasmid DNA/cationic liposome complexes. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v.84,n.11, p.1267–1271, 1995.

MARQUES, E. F.; KHAN, A.; LINDMAN, B. A calorimetric study of the gel-to-liquid crystal transition in catanionic surfactant vesicles. **Thermochimica Acta**, v.394, n.1-2, p.31-37, 2002.

MINOTTI, G.; *et al.* Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacology Review**, v.56,n.2, p.185-229, 2004.

MITRA S.; *et al.* Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **Journal of Controlled Release**, v.74, n.1-3, p.317-323, 2001.

McLEAN, J.W.; *et al.* Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome–DNA complexes in mice. **American Journal of Physiology**, v.273, n.1, p.H387–H404, 1997.

NAUMANN, C.; BRUMM, T.; BAYERL, T.M. Phase transition behavior of single phosphatidylcholine bilayers on a solid spherical support studied by DSC, NMR and FIT-IR. **Journal Biophysical**, v. 53, n.1, p.1314-1319, 1992.

NASCIMENTO, D.B.; *et al.* Counterion effects on properties of cationic vesicles. **Langmuir**, v.14,n.1, p.7387-7391, 1998.

OLIVEIRA, O. N.J. Langmuir-Blodgett Films - Properties and Possible Applications. **Brazilian Journal of Physks**, vol. 22, n. 2,p.,1992.

OLARTE, O. *et al.* Fractional frequency domain identification of NaCl-glucose solutions at physiological levels. **Measurement**, v. 50,n_, p.213-221, 2014.

OLIVEIRA, I. M. S. C.; *et al.* Aggregation behavior of aqueous dioctadecyldimethylammonium bromide/monoolein mixtures: A multitechnique investigation on the influence of composition and temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.374, n.1, p.206-217, 2012.

OLIVEIRA, A.; *et al.* Dioctadecyldimethylammonium:Monoolein Nanocarriers for Efficient in Vitro Gene Silencing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.6, n.9, p.6977-6989, 2014.

OLSON, F.; *et al.* Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v.557, n.1, p.9-23, 1979.

OSTRO, M.J.; CULLIS, P.R. Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. **American Journal of Hospital Pharmacy**, v.46, n.8, p. 1576-1587, 1989.

PAPAHADJOPOILOS, D.; *et al.* Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. **Proceedings of the National Academy Sciences USA**, v.88,n.24,p.11460–11464, 1991.

PAVONE-MACALUSO, M.; *et al.* Intravesical instillation of adriamycin in treatment of bladder cancer - A review. **Urology**, v.23,n.3, p. 40-47, 1984.

RANA, D.K.; *et al.* Dual intramolecular hydrogen bond as a switch for inducing ground and excited state intramolecular double proton transfer in doxorubicin: an excitation wavelength dependence study. **Journal of Physical Chemistry A**, v.115, n.33, p. 9169-9179, 2011.

RASSING, J.; ATTWOOD, D. Ultrasonic velocity and light-scattering studies on the polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer Pluronic F127 in aqueous solution. **International Journal of Pharmaceutics**, v.13, n.1, p.47-55, 1982.

SAAD, M., GARBUZENKO.; O. B., MINKO, T. Co-delivery of siRNA and an anticancer drug for treatment of multidrug-resistant cancer. **Nanomedicine**, v.3, n.6, p.761-776, 2008.

SARIISIK, E. *et al.*, Interaction of the cholesterol reducing agent simvastatin with zwitterionic DPPC and charged DPPG phospholipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes**, v. 1861, n_4, p.810-818, 2019.

SAWYER, D.B.; *et al.* Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection?. **Progress in Cardiovascular Disease**, v.53, n.2, p. 105-113, 2010.

SCHER, H.; *et al.* Phase II trial of doxorubicin in bidimensionally measurable prostatic adenocarcinoma. **Journal of Urology**, v.131, n.6, p. 1099-1102, 1984.

SEGOTA, S.; TEZAK, D. Spontaneous formation of vesicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.121, n.1-3, p.51-75, 2006.

SHARIFI, S.; *et al.* Toxicity of nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v.41, n. 6, p. 2323-2343, 2012.

SHOEMAKER, D. P.; GARLAND, C. W.; NIBLER, J. W. Experiments in Physical Chemistry, Editora **McGraw-Hill**.

SIMPKINS, H.; PEARLMAN, L.F.; THOMPSON, L.M. Effects of adriamycin on supercoiled DNA and calf thymus nucleosomes studied with fluorescent probes. **Cancer Research**, v.44, n.2, p. 613-618, 1984.

SILVA, R. C.; LOTH, W.; OLOFSSON, G. Calorimetric investigation of temperature effect on the interaction between poly(ethylene oxide) and sodium dodecylsulfate in water. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 417, n. 2, p. 295-300, 2004.

SIONTOROU, C.G.; *et al.* Artificial Lipid Membranes: Past, Present, and Future. **Membranes**, v. 7, n.3, p. 38, 2017.

SOENE, S.J.; BRISSON, A.R.;CUYPER, M. Addressing the problem of cationic lipidmediated toxicity: the magnetoliposome model. **Biomaterials**, v.30, n.22, p. 3691-3701, 2009.

SONG,X.; CHEN, Q.; LIU, Z.; Recent advances in the development of organic photothermal nanoagents, **Nano Research**, v.8, n.2, p.340-354,2015.

SOOK, H.K.; *et al.* Stability and state of aggregation of aqueous Fibrinogen and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid vesicles. **Langmuir**, v.23, n., p.5657-5664, 2007.

SU, Y. L.; WEI, X. F.; LIU, H. Z. Effect of sodium chloride on association behavior of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer in aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.264, n.2, p.526-531, 2003.

SUZUKI, F.; *et al.* Induction of tumor-specific cytotoxicity and apoptosis by doxorubicin. **Anticancer Research**, v.25, n.2A, p. 887-893, 2005.

STEFANUTTI, E.; *et al.* Cationic liposomes formulated with DMPC and a gemini surfactant traverse the cell membrane without causing a significant bio-damage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes**, v.1838, n.10, p.2646-2655, 2014.

SZTANDERA, K.; *et al.* Sugar modification enhances cytotoxic activity of PAMAM-Doxorubicin conjugate in glucose-deprived MC-7 Cells possible role of GLUT1 transporter. **Pharmaceutical Research**, v.36, n.10, p.1-11, 2019.

TAYLOR, D.M.; DONG, Y.; JONES, C.C. Characterization of monolayers and LB multilayers of dioctadecyldimethylammonium chloride. **Thin Solid Films**, v. 284, n., p. 130-133,1996.

TURA, A.; *et al.* Impedance spectroscopy of solution at physiological glucose concentrations. **Biophysical Chemistry**, v.129, n., p. 235-241, 2007.

VAN DER LINDEN, E.; BUYTENHEK C. J. Spontaneous formation of onion phases in a single surfactant system and their salt-induced transformation towards ordinary lamellar phases. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, v.245, n.1-2, p.1-10, 1997.

YUAN, F.; *et al.* Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. **Cancer Research**, v.54, n.13, p.3352–3356, 1994.

WANKA, G.; HOFFMANN, H.; ULBRICHT, W. Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. **Macromolecules**, v.27, n.15, p.4145-4159, 1994.

WENZEL, J. G. W.; *et al.* Pluronic[®] F127 gel formulations of Deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. **Journal Controlled Release**, v.85, n.1-3, p.51-59, 2002.

WEINER, B. B.; TSCHARNUTER, W. W. Uses and abuses of PCS in particle sizing. In: PROVIDER, Theodore (Ed.). **Particle size distribution, assessment and characterization**. Washington: American Chemical Society, 1987. (ACS Symposium, Series, 332)

WU, N.Z.; *et al.* Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of stealth liposomes in tumor tissue. **Cancer Research**, v.53, n_ p.3765–3770, 1993.

YOON, G. Dielectric properties of glucose in bulk aqueous solutions: Influence of electrode polarization and modeling. **Biosensors and Bioelectronics**, v.26, n_, p. 2347-2353, 2011.

ZENG, Z.P.; *et al.* Facile fabrication of thermally responsive Pluronic F127 based nanocapsules for controlled released of doxorubicin hydrochloride. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n.7, p. 1521-1530, 2014.

ZHANG, Y.; LAM, Y. M.; TAN, W. S. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)-g-poly(vinylpyrrolidone): Association behavior in aqueous solution and interaction with anionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.285, n.1, p.74-79, 2005.

ZHADANOV, R. I.; PODOBED, O. V.; VLASSOV, V. V. Cationic lipid–DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy. **Bioelectrochemistry**, v.58, n.1, p.53-64, 2002.

Anexo A – Publicações

Rosemaire S Santana de Oliveira, Nélide S Marín Huachaca, Monique Lemos, Natália F Santos, Grace Gosmann., Eloi Feitosa. Molecular interactions between Pluronic F127 and saponin in aqueous solution. *Colloid and Polymer Science A*, no prelo, 2019.

Eloi Feitosa, Monique Lemos, Renata D, Adati. Mixed cationic surfactante vesicles in (Dioctadecyldimethylammonium Bromide)/NaCl and (Dioctadecyldimethylammonium)/NaBr aqueous dispersions. *Journal of Surfactants and Detergents*, (2019).

Leonardo Negri Furini, Luis Fernando do Carmo Morato, Olivier, Danilo S., Monique Lemos, Eloi Feitosa, Carlos José Leopoldo Constantino. Interactions of lipid polar headgroups with carbendazim fungicide. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v.12, n.7, p.3734-3743,2019.

Salay, L. C.; Prazeres, E. A.; Huachaca, N. S. M.; Lemos, M.; Piccoli, J. P.; Sanches, P. R.; Cilli, E. M.; Santos, R. S.; Feitosa, E. Molecular interactions between Pluronic F127 and the peptide tritriptin in aqueous solution. *Colloid Polymer Science*, v.296, n.4, p.809-817, 2018.

Monique Lemos, Eloi Feitosa. The role of concentration and counterion on the bilayer assembly of dioctadecyldimethylammonium bromide and chloride. Em preparação

Renata D. Adati, Monique Lemos, Eloi Feitosa. Vesicle to micelle transition in aqueous dispersion of Pluronic F127 / quaternary ammonium cationic surfactant. Em preparação