

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIEL ALBUQUERQUE TORRES KAMINSKI



**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS POR
BIOPOLÍMEROS A FIM DE CONTROLAR A CINÉTICA DE
LIBERAÇÃO PROTEICA**

CURITIBA

2013

GABRIEL ALBUQUERQUE TORRES KAMINSKI

**DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS POR
BIOPOLÍMEROS A FIM DE CONTROLAR A CINÉTICA DE
LIBERAÇÃO PROTEICA**

**Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial à conclusão
do Curso de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de
Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto
Pontarolo**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves
de Freitas**

CURITIBA

2013

Kaminski, Gabriel Albuquerque Torres

Desenvolvimento de lipossomas revestidos por biopolímeros a fim de controlar a cinética de liberação proteica / Gabriel Albuquerque Torres Kaminski – Curitiba, 2013.

71 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Professor Dr. Rilton Alves de Freitas

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2013.

Inclui bibliografia

1. DDAB. 2. Xantana. 3. Galactomanana. 4. EGF. 5. Lipossomas catiônicos. 6. *Layer by layer*. I. Pontarolo, Roberto. II. Freitas, Rilton Alves de. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

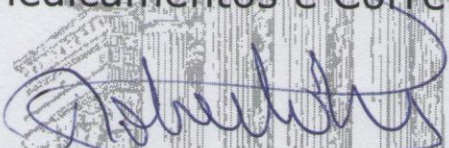
CDD 547.7

TERMO DE APROVAÇÃO

GABRIEL ALBUQUERQUE TORRES KAMINSKI

Título: DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS POR BIOPOLÍMEROS A FIM DE CONTROLAR A CINÉTICA DE LIBERAÇÃO PROTÉICA

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



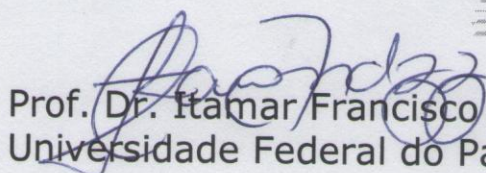
Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador



Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas
Universidade Federal do Paraná



Prof^a. Dr^a. Tania Mari Bellé Bresolin
Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI



Prof. Dr. Itamar Francisco Andrezza
Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 7 de março de 2013.

À todos aqueles que me possibilitaram chegar até aqui,
principalmente ao Senhor, pais, familiares e amigos.

*“O temor do Senhor
é o princípio da sabedoria,
e o conhecimento do Santo
é prudência.”*

Provérbios 9:10

Bíblia Sagrada

AGRADECIMENTOS

À Deus, Criador dos Céus e da Terra, pelo maior de todos os dons que é a vida. Pela família que me deu, a qual me incentiva e se alegra com minhas conquistas. Pelo desejo de conhecer cada vez mais sobre as maravilhas de Sua criação que colocou dentro de meu coração, catalisador de minha pesquisa. Pelos sábados em Sua presença que me renovam e fornecem condições para começar uma nova semana com alegria e entusiasmo.

Ao meu pai, por desde cedo me instigar a buscar o saber. Por prover tudo que preciso para poder desenvolver minhas faculdades mentais, sociais e espirituais.

À minha mãe, por seu amor e carinho que sempre me confortam. Pela constante preocupação no meu bem estar que me mantém numa redoma de segurança.

À minha irmã Jéssika, por ser a minha companheira desde e para sempre. Pela sua admiração que me motiva a ir mais além.

À Gabriella Pereira, pelo seu interesse no meu trabalho, seu carinho e incentivo.

Aos meus familiares, pelo incentivo incondicional e por seu carinho.

Aos meus amigos, por suportarem minha empolgação em contar aquilo que aprendo e os avanços de minha pesquisa, mesmo sem ter interesse algum na área. Pela atenção, carinho e paciência que voluntariamente exercem a fim de permanecerem em minha presença sem ter alguma obrigatoriedade nisso.

À Joane Bertoja, pela agradável companhia e motivação para que esse caminho fosse percorrido.

Ao Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas, grande mentor e idealizador de tudo que foi realizado. Por acreditar num projeto a princípio sem começo, meio ou fim, por enxergar a minha vontade de trabalhar e esculpir o rabisco de idéias sem muito fundamento num projeto conciso, detalhado e de sucesso. Por aceitar a co-orientação inclusive no período sem orientação que passei.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, que mesmo sem vagas aceitou minha orientação dando credibilidade a um projeto fora de sua linha de pesquisa e crendo na minha capacidade em realizá-lo.

À Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski, por abrir as portas de seu laboratório de primeiro mundo para o desenvolvimento da maior parte deste trabalho, colocando à disposição seu grande conhecimento, equipamentos e recursos.

À Profa. Dra. Sandra Zanin, por me incentivar a fazer o mestrado neste programa, colocando-se inicialmente à disposição para minha orientação.

À Profa. Dra. Francine Valenga, por me motivar e incentivar, pela amizade e auxílio em análises de AFM e textuais, prestados sempre com simpatia e disposição.

Ao Prof. Dr. Diogo Ducatti, pelo auxílio nas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Itamar Andreazza, por além de aceitar ser minha banca interna e contribuir para a afinação desta dissertação, sugerir-me a co-orientação do Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas que foi essencial para a realização deste trabalho.

À Profa. Tania Mari Bellé Bresolin, por aceitar ser minha banca externa e contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Msc. Marco Aurelio Woehl, por me apadrinhar em minha chegada ao BioPol, ensinando a operar os equipamentos, a extrair e a interpretar dados.

Ao Msc. Clayton Fernandes de Souza, por seu no μ -DSC e pelo seu bom humor.

À Thais Cheminski, por seu auxílio no preparo de amostras, mesmo que por um curto espaço de tempo.

Ao Guilherme Fadel Picheth, pela companhia durante a mudança de projeto e orientação e pelas contribuições ao meu trabalho.

Aos colegas do BioPol que diariamente tiveram a capacidade de conviver comigo, rindo das minhas piadas, sendo engraçadas ou não, pela companhia produtiva durante todo esse tempo. Que Deus tenha misericórdia de vós.

À Coordenação e ao Colegiado do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao programa REUNI, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Fatores de crescimento são proteínas, que entre outras funções biológicas são responsáveis pela cicatrização de tecidos através do estímulo à síntese de DNA e divisão celular. São rapidamente degradados *in vivo*, principalmente por proteases. Seu revestimento em nanopartículas pode ser uma alternativa para protegê-los da degradação, mantendo um estímulo constante de cicatrização através da liberação sustentada dos fatores de crescimento a partir destas. Neste trabalho os fatores de crescimento foram incorporados em lipossomas catiônicos revestidos com os biopolímeros xantana e galactomanana através da técnica de *layer-by-layer* (LbL). O revestimento foi proposto pois lipossomas tendem a coalescer e podem ser reconhecidos por macrófagos devido à sua carga superficial positiva. A interação natural entre os polímeros xantana e galactomanana comprovou ser forte o suficiente para estruturar até 8 camadas de LbL, por análises de microbalança de cristal de quartzo (QCM) e potencial zeta. A interação entre o tensoativo brometo de dimetil-dioctadecil amônio (DDAB) e a xantana, foi comprovada através da diminuição da concentração micelar crítica (CMC) do surfactante na presença de xantana, determinada por tensiometria, turbidimetria e fluorimetria com sonda de pireno. Também foi comprovada através de análises de microcalorimetria exploratória diferencial (μ -DSC) e pelos parâmetros termodinâmicos: entalpia padrão de micelização, entropia padrão de micelização, energia livre padrão de micelização, energia livre padrão de adsorção, área mínima ocupada por uma molécula de tensoativo na interface e excesso superficial máximo na interface ar/solução devido à interação tensoativo-polímero. Esta interação possibilitou o revestimento polimérico com xantana dos lipossomas catiônicos e posteriormente com a galactomanana. Os lipossomas revestidos pelos biopolímeros formaram nanopartículas com diâmetro de 165 (\pm 15) nm, medido por espalhamento de luz dinâmico (DLS), e com potencial zeta (ζ) de $-4 (\pm 13)$ mV, e foram capazes de aumentar em 10 vezes a liberação sustentada de fator de crescimento epidermal (EGF), comparado a lipossomas não revestidos, a uma taxa de $4,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Assim, a utilização de biopolímeros xantana e galactomanana, possibilitou a formação lipossomas revestidos, capazes de sustentar a liberação de fatores de crescimento permitindo maior tempo de ação no sítio.

Palavras chave: DDAB. Xantana. Galactomanana. EGF. Lipossomas Catiônicos. Layer-by-layer.

ABSTRACT

Growth factors are proteins secreted from activated platelets, responsible for tissue healing through DNA synthesis and cellular division stimulation. They are fast degraded *in vivo*, specially by proteases. Their entrapment in nanoparticles can be an alternative to protect them from degradation, keeping a constant tissue healing stimuli by their sustained release from the nanoparticles. In this work the growth factors were entrapped in cationic liposomes coated by the biopolymers xanthan and galactomannan through the layer-by-layer (LbL) technique. Liposomes tend to aggregate and can be recognized by macrophages by their superficial charge, thus, coating was purposed. The natural interaction between xanthan and galactomannan proved to be strong enough to enable LbL structure up to 8 layers, evidenced by quartz crystal microbalance (QCM) and zeta potential. The interaction between dimethyldioctadecyl ammonium bromide (DDAB) and xanthan, was evidenced by the surfactants critical micelle concentration (CMC) reduction in the presence of xanthan, determined by tensiometry, turbidimetry and pyrene probe fluorimetry. It was also evidenced by micro differential scanning calorimetry (μ -DSC) and by the following thermodynamic parameters: standard enthalpy of micellization, standard entropy of micellization, standard free energy of micellization, minimum area occupied by a surfactant molecule at the interface and the surface excess concentration. This interaction enabled xanthan coating of the cationic liposomes. The biopolymer coating of liposomes generated nanoparticles with 165 (\pm 15) nm, determined by dynamic light scattering (DLS), and with -4 (\pm 13) mV zeta potential, capable of 10 fold increase in the sustained release of epidermal growth factor (EGF), compared to non coated liposomes, at a $4,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ rate.

Palavras chave: DDAB. Xantana. Galactomanana. EGF. Lipossomas Catiônicos. Layer-by-layer.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – ESQUEMA DOS TIPOS DE LIPOSSOMAS, ONDE SUV SÃO VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUENAS; LUV SÃO VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES; GUV SÃO VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES E MLV SÃO VESÍCULAS MULTILAMELARES4
- FIGURA 2** – ESQUEMA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO BROMETO DE DIMETIL-DIOCTADECIL AMÔNIO (DDAB)5
- FIGURA 3** – ESQUEMA DOS PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE LbL. a) DEPOSIÇÃO POR IMERSÃO EM SOLUÇÕES DE POLIÂNION E POLICÁTION, 1 E 3, RESPECTIVAMENTE, E LAVAGEM (2 E 4). ESSES 4 PASSOS SÃO A ESTRUTURA BÁSICA DE FORMAÇÃO DE LbL. b) ILUSTRAÇÃO DA FORMAÇÃO DAS PRIMEIRAS CAMADAS SOBRE UM SUBSTRATO CATIONICO7
- FIGURA 4** – ESQUEMA DA ESTRUTURA QUÍMICA DA XANTANA (XAN) REPRESENTANDO O ESQUELETO (1→4)- β -D-GLUCANA COM SUBSTITUIÇÃO NO CARBONO 3 POR UMA CADEIA LATERAL TRISSACARÍDICA COMPOSTA POR UMA UNIDADE ÁCIDO D-GLUCURÔNICO (β -1→2) E DUAS UNIDADES DE MANOSE LIGADAS.....9
- FIGURA 5** – ESQUEMA DA ESTRUTURA QUÍMICA DA GALACTOMANANA (GMC) REPRESENTANDO O ESQUELETO (1→4)- β -D-MANANA SUBSTITUÍDO NO OXIGÊNIO 6 POR UMA UNIDADE DE GALACTOSE.....11
- FIGURA 6** – ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS MODELOS PROPOSTOS DE INTERAÇÃO ENTRE XAN E GMC. O MODELO 1 SUGERE A INTERAÇÃO ENTRE A ESTRUTURA ORDENADA DA XAN E O ESQUELETO POUCO SUBSTITUÍDO DA GMC. O MODELO 2 SUGERE INTERAÇÃO ENTRE AS CADEIAS LATERAIS DE XAN NA FORMA HELICOIDAL COM O ESQUELETO POUCO SUBSTITUÍDO DA GMC. O MODELO 3 SUGERE A INTERAÇÃO ENTRE A XAN NA FORMA DESORDENADA E O ESQUELETO POUCO SUBSTITUÍDO DA GMC.13
- FIGURA 7** – REPRESENTAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO14
- FIGURA 8** – ESQUEMA ILUSTRATIVO DE UMA PARTÍCULA CARREGADA EM SOLUÇÃO.....15

- FIGURA 9** – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO PIRENO E SUAS BANDAS DE VIBRAÇÃO17
- FIGURA 10** – ESQUEMA DO SISTEMA DE ANÁLISE TOPOGRÁFICA DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA (AFM)19
- FIGURA 11** – REPRESENTAÇÃO DOS MODOS OPERACIONAIS CONTATO (C), CONTATO INTERMITENTE (CI) E NÃO CONTATO (NC) EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CANTILEVER E A AMOSTRA 19
- FIGURA 12** – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS POLÍMEROS A 0,5 mg.mL⁻¹, ELUÍDOS A 0,4 mL.min⁻¹ COM NaNO₃ 0,1 mol.L⁻¹, 200 ppm DE AZIDA DE SÓDIO, A 40°C, ATRAVÉS DE COLUNA Shodex OHpak SB-806M HQ, DETECTADOS POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO A 90° (RALS). POLÍMEROS COMERCIAIS EM VERMELHO E PURIFICADOS EM PRETO.38
- FIGURA 13** – ¹H-RMN DA GMC PURIFICADA, INSERTO COM A REGIÃO DOS CARBONOS ANOMÉRICOS DE MANOSE E GALACTOSE DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA PURIFICADA, USANDO D₂O COMO SOLVENTE A 70°C40
- FIGURA 14** – FTIR DOS POLÍMEROS PURIFICADOS. a) VIBRAÇÃO DAS LIGAÇÕES C – C E C – O TÍPICAS DE POLISSACARÍDEOS. b) VIBRAÇÃO ENTRE ESQUELETO E RAMIFICAÇÕES DA CADEIA POLISSACARÍDICA. c) VIBRAÇÃO DA LIGAÇÃO ÁCIDA C = O. d) VIBRAÇÃO DAS LIGAÇÕES C – H DE ALCANOS. XANTANA EM VERMELHO E GALACTOMANANA EM PRETO40
- FIGURA 15** – DETERMINAÇÃO DA CAM PARA XAN (▲) E GMC (▼). EM ÁGUA ULTRA PURA. EXPERIMENTOS REALIZADOS A 25 °C. EM CONCENTRAÇÕES DOS POLÍMEROS DE 1 x 10⁻⁴ A 10 mg.mL⁻¹. 42
- FIGURA 16** – DETERMINAÇÃO DA CMC PARA DDAB (■) E DDAB + XAN (◆). NOS EXPERIMENTOS DDAB + XAN A CONCENTRAÇÃO DE XANTANA FOI FIXADA EM 0,5 mg.mL⁻¹ EM ÁGUA. EXPERIMENTOS REALIZADOS A 25°C. CONCENTRAÇÕES DE DDAB DE 1 x 10⁻⁶ a 10 mmol.L⁻¹.44
- FIGURA 17** – DETERMINAÇÃO DA CMC DO DDAB POR TITULAÇÃO CONDUTIMÉTRICA EM ÁGUA ULTRA PURA À 25°C, EM CONCENTRAÇÕES DE 1 x 10⁻⁴ A 6 mmol.L⁻¹.45
- FIGURA 18** – IMAGEM TOPOGRÁFICA POR AFM SOBRE SILÍCIO DE (a) 10⁻⁶ mmol.L⁻¹ DDAB COM 0,5 mg.mL⁻¹ XAN E (b) 10⁻² mmol.L⁻¹ DDAB COM 0,5 mg.mL⁻¹ de XAN45
- FIGURA 19** – ANÁLISE DE μ-DSC SOB ATMOSFERA DE N₂ A 0,2°C.min⁻¹. DDAB 5 mmol.L⁻¹ EM VERMELHO, XAN 0,5 mg.mL⁻¹ EM AZUL E A

	MISTURA DE AMBOS, NAS MESMAS CONCENTRAÇÕES, EM PRETO. AMOSTRAS PREPARADAS EM 10 mmol.L ⁻¹ NaCl.....	47
FIGURA 20	– ESQUEMA DA ESTRUTURA DE LBL SOBRE O CRISTAL DE QCM. AS CAMADAS SÃO OURO, HEXANOTIOL, DDAB, XAN E GMC, DE BAIXO PARA CIMA	50
FIGURA 21	– IMAGEM TOPOGRÁFICA POR AFM DE LBL SOBRE CRISTAL DE QCM. a) SUPERFÍCIE DE OURO; b) HEXANOTIOL; c) DDAB; d) XAN; e) GMC.....	51
FIGURA 22	– a) DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DE FREQUÊNCIA (N = 3) POR QCM DE LBL. b) MÉDIA DO POTENCIAL ZETA DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS POR LBL A CADA CAMADA. BARRAS INDICAM DESVIO PADRÃO	53
FIGURA 23	– DISTRIBUIÇÃO GAUSSIANA DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (D _h) DOS LIPOSSOMAS (●) E DAS NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS COM XAN (■) E NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS COM XAN + GMC (◆), EM ÁGUA ULTRA PURA, A 25°C.	55
FIGURA 24	– MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DOS LIPOSSOMAS SEM REVESTIMENTO (a); REVESTIDOS COM XANTANA (b); REVESTIDOS COM XANTANA E GALACTOMANANA (c), DEPOSITADOS SOBRE SILÍCIO.	55
FIGURA 25	– (a) CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE EGF POR CLAE. (b) DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE EGF POR CLAE. EM PRETO AS MOLÉCULAS ENCAPSULADAS E EM ROSA AS NÃO ENCAPSULADAS.....	56
FIGURA 26	– TENDÊNCIA DO PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EGF A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS (N = 3) TRATADAS COMO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM. LIPOSSOMAS SEM REVESTIMENTO (●), REVESTIDOS COM XAN (■) E REVESTIDOS COM XAN + GMC (◆).	57

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - MASSA MOLAR MÉDIA-PONDERAL (M_w), RAIOS DE GIRO ($\langle S \rangle^{1/2}$) E POTENCIAL ZETA (ζ) PARA AS AMOSTRAS DE POLÍMEROS E DDAB.....39
- TABELA 2** - PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DETERMINADOS POR VARREDURA EM μ -DSC E CALCULADOS.....47
- TABELA 3** - ADSORÇÃO SOBRE CRISTAL DE QCM DE OURO. Δf MEDIDO POR QCM, RMS POR AFM E ÂNGULO DE CONTATO DETERMINADO POR GOTA SÉSSIL DE ÁGUA ULTRA PURA52

LISTA DE ABREVIACOES, SÍMBOLOS E SIGLAS

Δf	–	Variação da frequência
ΔG_{ads}^0	–	Energia livre padrão de adsorção
ΔG_{mic}^0	–	Energia livre padrão de micelização
ΔH_{mic}^0	–	Entalpia padrão de micelização
Δm	–	Variação de massa
ΔS_{mic}^0	–	Entropia padrão de micelização
ΔS_t^0	–	Entropia padrão translacional
μ -DSC	–	<i>Differential scanning calorimetry</i> (Micro calorimetria exploratória diferencial)
λ	–	Comprimento de onda
Γ_{max}	–	Excesso superficial máximo na interface solução/ar
^1H -RMN	–	Ressonância magnética nuclear de próton
a_{min}	–	rea mínima ocupada por uma molécula de surfactante na interface
ADP	–	Adenosina di-fosfato
AFM	–	<i>Atomic force microscopy</i> (Microscopia de força atômica)
AREG	–	Anfiregulina
BTC	–	Betacelulina
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMA	–	<i>Concentration of molecular aggregation</i> (Concentração de agregação molecular)
CMC	–	Concentração micelar crítica

DDAB	–	<i>Dimethyl dioctadecyl ammonium bromide</i> (Brometo de dimetil-dioctadecil amônio)
D_h	–	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	–	<i>Dynamic light scattering</i> (Espalhamento de luz dinâmico)
DNA	–	Ácido desoxirribonucléico
EGF	–	<i>Epidermal growth factor</i> (Fator de crescimento epidermal)
EPGN	–	Epigen
EPR	–	Epiregulina
FC	–	Fatores de crescimento
FTIR/IV	–	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> (espectroscopia de infravermelho)
GMC	–	Galactomanana
GUV	–	<i>Giant unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares gigantes)
HB-EGF	–	EGF heparina ligante
IV	–	Infravermelho
LbL	–	<i>Layer-by-layer</i>
L_p	–	<i>Persistence length</i> (Comprimento de persistência)
LUV	–	<i>Large unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares grandes)
MLV	–	<i>Multi lamellar vesicles</i> (Vesículas multilamelares)
M_w	–	<i>Average molar mass</i> (Massa molar média ponderal)
NRG	–	Neuregulina
PDGF	–	<i>Platelet derived growth factor</i> (Fator de crescimento derivado de plaqueta)
PRP	–	<i>Platelet rich plasma</i> (Plasma rico em plaquetas)
RMN	–	Ressonância magnética nuclear
R_h	–	Raio hidrodinâmico

RMS	–	<i>Roughness mean square</i> (rugosidade media superficial)
SEC	–	<i>Size exclusion chromatography</i> (cromatografia de exclusão por tamanho)
SUV	–	<i>Small unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares pequenas)
TGF- α	–	<i>Transformer growth factor alpha</i> (Fator de crescimento transformador alfa)
TGF- β	–	<i>Transformer growth factor beta</i> (Fator de crescimento transformador beta)
Ua	–	Unidades arbitrárias
ULV	–	<i>Unilamellar vesicles</i> (Vesículas unilamelares)
UV	–	Ultra violeta
XAN	–	Xantana
$\langle S^2 \rangle^{1/2} / R_g$	–	Raio de giro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	OBJETIVO GERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.	REVISÃO	4
3.1	LIPOSSOMAS.....	4
3.2	AUTOMONTAGEM OU LAYER-BY-LAYER.....	6
3.3	REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS.....	7
3.3.1	Xantana	9
3.3.2	Galactomananas.....	10
3.3.3	Interação Xantana-Galactomanana.....	11
3.4	MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	13
3.4.1	Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)	13
3.4.2	Potencial zeta (ζ).....	14
3.4.3	Métodos para determinação da concentração micelar crítica (CMC) e de agregação molecular (CMA)	16
3.4.4	Microscopia de força atômica (AFM)	18
3.4.5	Microcalorimetria exploratória diferencial (μ -DSC)	20
3.4.6	Microbalança de cristal de quartzo (QCM)	20
3.4.7	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	21
3.5	CICATRIZAÇÃO.....	22
3.6	FATORES DE CRESCIMENTO	24
4.	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	PREPARO DOS POLÍMEROS	28
4.1.1	Purificação dos polímeros.	28

4.1.2	Caracterização dos polímeros.....	28
4.1.2.1	Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).....	28
4.1.2.2	Potencial zeta	29
4.1.2.3	Quantificação de proteínas	29
4.1.2.4	Métodos espectrométricos	30
4.2	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AGREGAÇÃO MOLECULAR E MICELAR CRÍTICA	30
4.2.1	Tensiometria	31
4.2.2	Turbidimetria	31
4.2.3	Fluorimetria	31
4.2.4	Microcalorimetria exploratória diferencial (μ -DSC)	32
4.2.4.1	Parâmetros termodinâmicos de micelização	32
4.2.5	Microbalança de cristal de quartzo (QCM)	34
4.2.6	Microscopia de força atômica (AFM)	34
4.2.7	Ângulo de contato	34
4.3	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS.....	35
4.3.1	Revestimento dos lipossomas.....	35
4.4	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE EGF	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	38
5.1.2	Determinação da CAM dos polímeros.....	41
5.2	DETERMINAÇÃO DA CMC DO DDAB E INTERAÇÃO DDAB E XAN ..	43
5.3	NANOPARTÍCULAS	54
5.4	EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO .	55
6.	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

Os fatores de crescimento (FC) são proteínas capazes de atuar em receptores de superfície celular e direcionar as atividades celulares para o reparo tecidual, através da sinalização de processos de vascularização, coagulação, divisão e diferenciação celular (CHEN *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2008; TAYALIA e MOONEY, 2009).

Uma fonte concentrada de FC são as plaquetas, atuando como reservatórios autólogos, sem custo e de fácil obtenção (TSAY *et al.*, 2005; WROTNIAK, BIELECKI e GAŹDZIK, 2007). Estas têm sido utilizadas em tratamentos diversos como regeneração óssea (ALVES *et al.*, 2009; GANDHI *et al.*, 2006), cartilagens (WU *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2009), reparo e prevenção de complicações periodontais (SAMMARTINO *et al.*, 2005), cicatrização tecidual (BROWN, NANNEY e GRIFFEN, 1989) e queimaduras (PALLUA, WOLTER e MARKOWICZ, 2010).

Entretanto, as plaquetas liberam seu conteúdo de FC muito rapidamente, aproximadamente 95% são secretados na primeira hora após sua ativação obrigando àqueles que as utilizam a prepará-las no momento da aplicação, na forma de plasma rico em plaquetas ou plasma concentrado, limitando assim o seu uso (WROBLEWSKI, MEJIA e WRIGHT, 2010).

Adicionalmente, os FC possuem pouca estabilidade, e para que a terapia de cicatrização seja efetiva devem atingir o sítio de ação sem sofrer degradação e ali permanecer tempo suficiente para exercerem suas funções. Desta forma, vias tópicas e locais de aplicação de FC não parecem ser as mais efetivas (UEBERSAX, MERKLE e MEINEL, 2009).

Contudo, o encapsulamento dos FC em lipossomas poderia ser uma alternativa para aumentar a estabilidade (DEĞİM *et al.*, 2011) e evitar degradação enzimática (LU *et al.*, 2008), de forma a potencializar o reparo de tecidual (TSAY *et al.*, 2005).

Lipossomas já foram estudados como sistemas de liberação de FC (ALVES *et al.*, 2009; DALENÇON *et al.*, 1996; DEĞİM *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2003; PLUM *et al.*, 2001; XIANG *et al.*, 2011), entretanto, a liberação dos FC

poderia ser melhor modulada através de um revestimento polimérico dos lipossomas, obtendo-se assim o perfil de liberação desejado.

Diversos revestimentos poliméricos já foram propostos para alterar o perfil de liberação de fármacos em lipossomas, a fim de aumentar sua eficácia e melhorar a cinética de liberação, entre eles estão colágeno (FONSECA, ALSINA e REIG, 1996), álcool polivinílico (TAKEUCHI *et al.*, 2000), carbopol (TAKEUCHI *et al.*, 2003), polilisina (VOLODKIN *et al.*, 2007), quitosana (LI *et al.*, 2009; MADY e DARWISH, 2010), quitosana com albumina (CHANDY e SHARMA, 1996), quitosana com dextrana (FUKUI e FUJIMOTO, 2009; MADRIGAL-CARBALLO *et al.*, 2010) e quitosana com alginato (HAIDAR, HAMDY e TABRIZIAN, 2008).

Neste trabalho, propõe-se o uso inédito dos biopolímeros xantana e galactomanana, baseado em sua interação natural, para estruturação de revestimento polimérico via *layer-by-layer* (LbL) de lipossomas catiônicos de brometo de dimetil-dioctadecil amônio (DDAB), formando um novo sistema nanométrico tridimensional para liberação sustentada de fatores de crescimento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a formação de lipossomas catiônicos revestidos com xantana e galactomanana pela técnica de *layer-by-layer* a fim de controlar a cinética de liberação do fator de crescimento epidermal (EGF).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar e caracterizar os polímeros xantana e galactomanana por análises colorimétricas, espectrofotométricas e cromatográficas;
- Verificar as interações entre o tensoativo brometo de dimetil-dioctadecil amônio (DDAB) e os polímeros por análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e análises de microcalorimetria exploratória diferencial (μ -DSC);
- Desenvolver lipossomas catiônicos e revesti-los com xantana e galactomanana pela técnica de *layer-by-layer*;
- Gerar e caracterizar o revestimento por *layer-by-layer* (LbL) por microbalança de cristal de quartzo (QCM), microscopia de força atômica (AFM), DLS e potencial zeta (ζ);
- Incorporar o EGF nos lipossomas revestidos, determinar a eficiência de encapsulamento e determinar a cinética de liberação proteica do sistema por cromatografia;

3. REVISÃO

3.1 LIPOSSOMAS

Os lipossomas são vesículas lipídicas, micro ou nanométricas, nas quais uma fase aquosa é totalmente cercada por uma ou mais lamelas (bicamadas de lipídios), constituindo um dos sistemas mais importantes para encapsulamento e liberação sustentada de fármacos (TORCHILIN, 2005). Eles podem encapsular ingredientes hidrofílicos, hidrofóbicos ou anfifílicos, principalmente compostos com extremos de log P, ou seja, muito hidrossolúveis ou lipossolúveis. Fármacos hidrofílicos têm tendência a permanecer no compartimento central aquoso, enquanto que os hidrofóbicos e anfifílicos podem se encontrar inseridos na bicamada lipídica (DRULIS-KAWA e DOROTKIEWICZ-JACH, 2010).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o número de lamelas que apresentam: vesículas multilamelares (MLV) ou vesículas unilamelares (ULV), pelo tamanho: vesículas unilamelares gigantes (GUV) vesículas unilamelares grandes (LUV) ou vesículas unilamelares pequenas (SUV) (LESOIN *et al.*, 2011). Os tipos de lipossomas são apresentados na FIGURA 1.

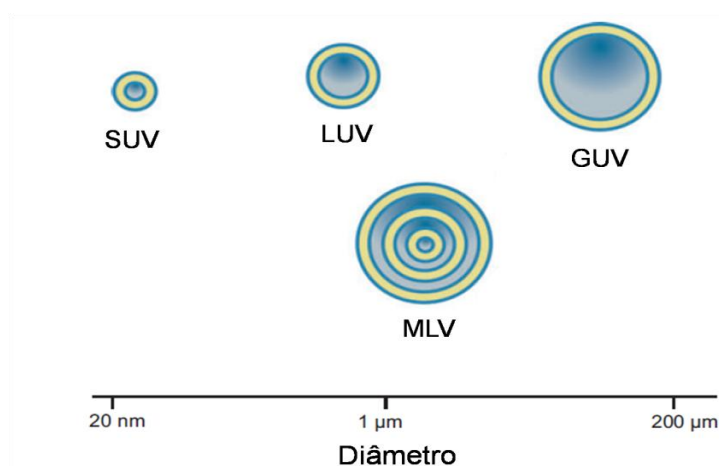


FIGURA 1 - ESQUEMA DOS TIPOS DE LIPOSSOMAS, ONDE SUV SÃO VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUENAS; LUV SÃO VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES; GUV SÃO VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES E MLV SÃO VESÍCULAS MULTILAMELARES

FONTE: Adaptado de Jesorka e Orwar (2008)

Sistemas lipossomais são estudados como transportadores de diversos fármacos como antibióticos e corticóides (GAUR *et al.*, 2010; GREGORIADIS, 2008; KLUZA *et al.*, 2011), material genético (BISWAS *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2011), peptídeos (CHEN *et al.*, 2010; MARQUETTE, LORBER e BECHINGER, 2010; NEGUSSIE *et al.*, 2010), enzimas (CHAIZE e FOURNIER, 2004; SCARPA *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2008), fatores de crescimento plaquetários (DALENÇON *et al.*, 1996; XIANG *et al.*, 2011) e fator de crescimento epidermal (EGF) (ALVES *et al.*, 2009; DEĞİM *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2003).

Os lipossomas são biocompatíveis, pouco imunogênicos, biodegradáveis e capazes de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação no sangue. Assim, podem liberar doses concentradas do encapsulado no tecido que necessita de tratamento, aumentando sua ação terapêutica. Contudo, quando na corrente sanguínea, podem ser rapidamente reconhecidos e atacados pelos macrófagos. Quanto maiores e mais carregados, mais facilmente serão reconhecidos, por isso um revestimento que neutralize sua carga superficial e seja fino pode ser útil (LEE, SILVA e MOONEY, 2011).

As maiores limitações dos lipossomas são extravasar seu conteúdo com o tempo e coalescer (TAYLOR *et al.*, 2005; GREGORIADIS, SAFFIE e DE SOUZA, 1997). Uma alternativa para superar tais limitações é o revestimento polimérico dos lipossomas (IWANAGA *et al.*, 1999).

Entre os possíveis lipídeos catiônicos disponíveis, o brometo de dimetil-dioctadecil amônio (DDAB) foi escolhido para a construção do lipossoma, a fim de otimizar a estruturação do revestimento polimérico por LbL. O DDAB (FIGURA 2), é um sal quaternário de amônio como cabeça polar e duas cadeias saturadas de 18 carbonos por cauda apolar (DOMENICI *et al.*, 2012).

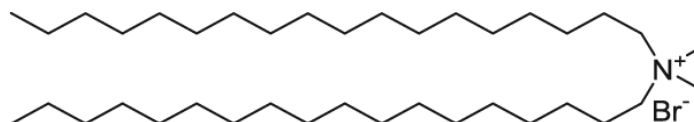


FIGURA 2 - ESQUEMA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO BROMETO DE DIMETIL-DIOCTADECIL AMÔNIO (DDAB)
FONTE: O autor (2013)

Por ser um lipídio catiônico de baixa toxicidade, o DDAB têm sido utilizado no preparo de lipossomas para transfecção de DNA (LI *et al.*, 2010), encapsulamento de vetores adenovirais (STEEL *et al.*, 2007), construção de biofilmes para liberação de antibióticos (ROBINSON *et al.*, 2001) e liberação de antibióticos (DRULIS-KAWA e DOROTKIEWICZ-JACH, 2010; WU, J. *et al.*, 2007).

Uma das estratégias para o revestimento polimérico de sistemas bidimensionais, como membranas, e tridimensionais, como partículas, é um processo conhecido como automontagem ou *layer-by-layer* (LbL).

3.2 AUTOMONTAGEM OU LAYER-BY-LAYER

A técnica de LbL consiste na deposição alternada de poliânions e polications (DECHER, 1997), gerando um revestimento com múltiplas camadas, que se mantém unido majoritariamente por interações eletrostáticas (FUKUI e FUJIMOTO, 2009). Contudo, ligações de hidrogênio (STOCKTON e RUBNER, 1997; WANG *et al.*, 1997), ligações covalentes (BRYNDA e HOUSKA, 1996; SUN *et al.*, 1998), interações hidrofóbicas (KOTOV, 1999; LOJOU e BIANCO, 2004) e forças de van der Waals (SATO e SANO, 2005) já foram estudadas como possíveis forças de estabilização da automontagem.

As maiores vantagens do processo de LbL são a combinação de diferentes materiais em filmes individuais e a determinação da arquitetura do revestimento pela sequência de deposição dos materiais. Estes podem ser escolhidos dentre várias moléculas orgânicas, colóides por associação, polímeros, proteínas e grupos inorgânicos: partículas de argila, por exemplo (DECHER, 1997).

Outras vantagens do método incluem o controle da espessura do revestimento no âmbito nano a micrometro, possibilidade de adição de moléculas alvo à superfície, estabilização de moléculas sub-micrométricas (Al *et al.*, 2003), evitando o uso de partículas mecanicamente micronizadas e termodinamicamente instáveis (RASENACK e MÜLLER, 2002), possibilidade de funcionalização da superfície (MADRIGAL-CARBALLO *et al.*, 2010), e a

necessidade reduzida de materiais para produzir revestimentos funcionais, comparado a outras técnicas (De VILLIERS *et al.*, 2011).

Esquemáticamente, a formação de filmes por automontagem pode ser visualizada na FIGURA 3.

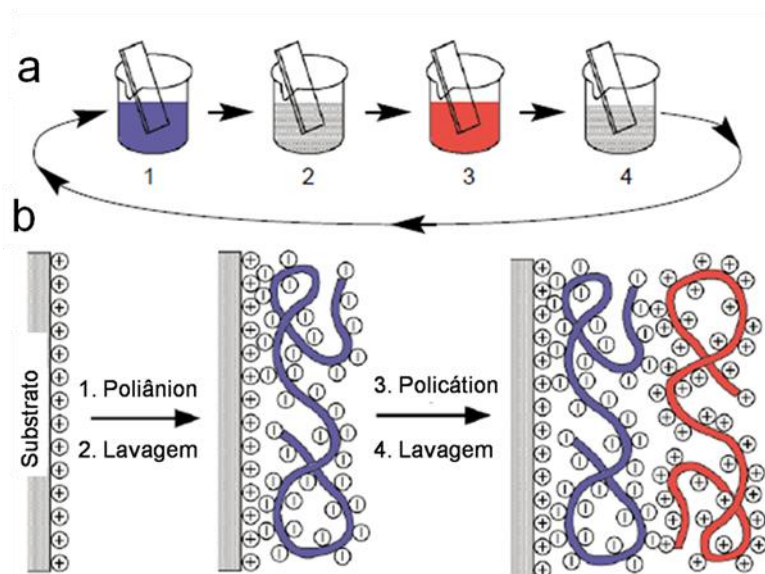


FIGURA 3 – ESQUEMA DOS PROCESSOS DE FORMAÇÃO DE LbL. a) DEPOSIÇÃO POR IMERSÃO EM SOLUÇÕES DE POLIÂNION E POLICÁTION, 1 E 3, RESPECTIVAMENTE, E LAVAGEM (2 E 4). ESSES 4 PASSOS SÃO A ESTRUTURA BÁSICA DE FORMAÇÃO DE LbL. b) ILUSTRAÇÃO DA FORMAÇÃO DAS PRIMEIRAS CÂMADAS SOBRE UM SUBSTRATO CATIÔNICO

FONTE: Adaptado de Decher (1997)

3.3 REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS BIODEGRADÁVEIS

Os revestimentos poliméricos biodegradáveis, também conhecidos por biopolímeros, aqui usados como sinônimo para polímeros obtidos de fontes naturais (IUPAC, 1992), têm recebido grande atenção no campo alimentício e farmacêutico, em sistemas nanocarreadores, como revestimentos polieletrólitos para partículas e superfícies (LIU *et al.*, 2008; SHAHIDI, ARACHCHI e YEON, 1999).

Na natureza estes podem ser encontrados em várias fontes como algas (ex: alginato), plantas (ex: galactomananas, celulose), micro-organismos (ex: dextrana, xantana) e animais (ex: quitosana, condroitina). Podendo formar

complexos por interação eletrostática e revestir moléculas com carga superficial oposta à sua (PRABAHARAN, 2011).

As utilizações de biopolímeros para revestimento de lipossomas são diversas e variadas na literatura. Fonseca, Alsina e Reig (1996), por exemplo, utilizaram colágeno para revestir lipossomas que após 144 h extravasaram, *in vitro*, apenas 40 % do conteúdo de carboxifluoresceína encapsulada, contra 100 % lipossomas sem revestimento. Takeuchi *et al.* (2003) utilizaram carbopol e quitosana para aumentar as propriedades mucoadesivas de lipossomas contendo calcitocina e seu efeito farmacológico foi potencializado em 4 vezes. Volodkin *et al.* (2007) criaram uma impermeabilização térmica para lipossomas revestindo-os com polilisina, e mesmo após sete dias não houve liberação de carboxifluoresceína encapsulada a temperatura ambiente, sendo apenas liberado acima de 50°C. Li *et al.* (2009) utilizaram quitosana de baixa massa molar e obtiveram lipossomas com aproximadamente 80 nm de diâmetro hidrodinâmico para liberação ocular sustentada de diclofenaco de sódio por mais de 24 h.

A utilização de mais de um polímero para o revestimento de lipossomas permite a funcionalização destes com as características desejadas, pela escolha dos polímeros, sendo assim possível arquitetar nanopartículas. Madrigal-Carballo *et al.* (2010) comprovam, por espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopia de força atômica (AFM) e potencial zeta (ζ), a formação de lipossomas, contendo ácido elágico, revestidos com até quatro camadas intercaladas de quitosana e sulfato de dextrana, que demonstraram uma liberação cada vez mais sustentada à medida que novas camadas de revestimento foram adicionadas. As maiores nanopartículas atingiram aproximadamente 400 nm de diâmetro hidrodinâmico que mesmo após 72 h liberaram apenas 20 % de seu conteúdo, *in vitro*, à 25°C.

Haidar, Hamdy e Tabrizian (2008) formaram lipossomas catiônicos de DDAB revestidos com até dez camadas intercaladas de alginato e quitosana, caracterizados por DLS, AFM e potencial ζ . Estas nanopartículas, de aproximadamente 400 nm, liberaram apenas 40 % do conteúdo de albumina encapsulada, *in vitro*, à 37°C, mesmo após 5 dias.

Entre os polímeros ainda não explorados e com potencial para revestimento de lipossomas por LbL temos a xantana (XAN) e galactomanana (GAL), cujas propriedades serão descritas a seguir.

3.3.1 Xantana

A xantana (XAN) ou goma xantana é um heteropolissacarídeo aniônico produzido pelo microorganismo *Xanthomonas campestris*. Seu esqueleto consiste em unidades (1→4)-β-D-glucana com todos os resíduos de glucose substituídos no carbono 3 por uma cadeia lateral ácida trissacarídica. A cadeia trissacarídica consiste de uma unidade de ácido D-gulurônico entre duas unidades de D-manose (FIGURA 4) (JANSSON, KENNARK e LINDBERG, 1975).

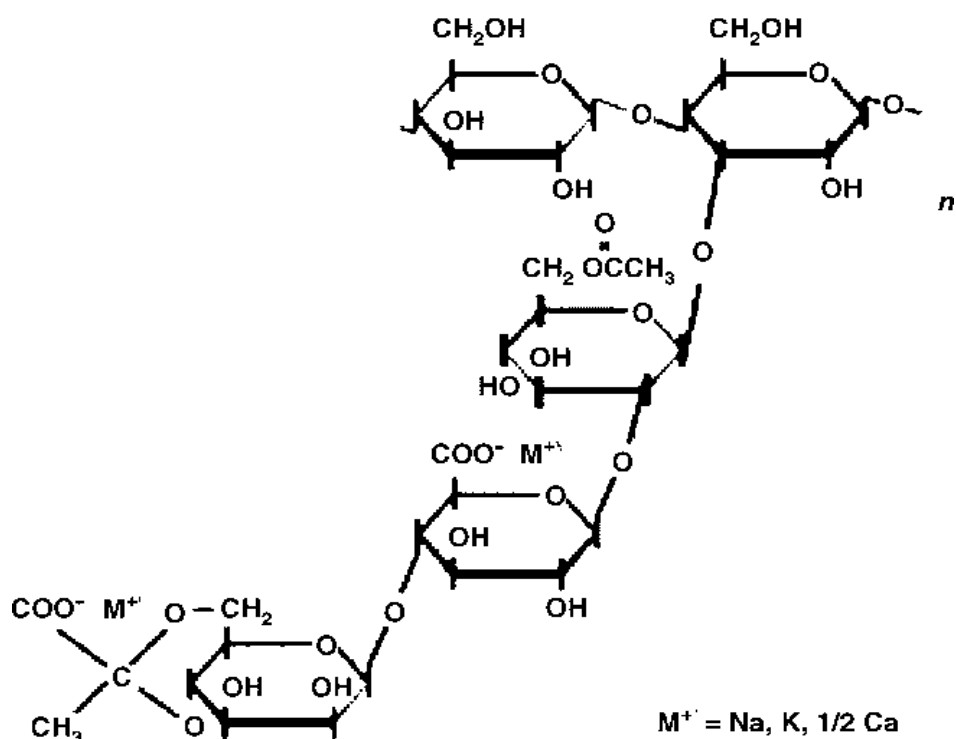


FIGURA 4 - ESQUEMA DA ESTRUTURA QUÍMICA DA XANTANA (XAN) REPRESENTANDO O ESQUELETO (1→4)-β-D-GLUCANA COM SUBSTITUIÇÃO NO CARBONO 3 POR UMA CADEIA LATERAL TRISSACARÍDICA COMPOSTA POR UMA UNIDADE ÁCIDO D-GLUCURÔNICO (β-1→2) E DUAS UNIDADES DE MANOSE LIGADAS.

FONTE: Sutherland (1977)

Em soluções aquosas, a estrutura da xantana sofre uma transição conformacional, induzida pelo calor, de um estado ordenado (helicoidal) para um estado desordenado. Esta transição conformacional depende da força iônica, natureza do eletrólito, pH, e quantidade de acetil e piruvato da molécula (HOLZWARTH, 1976; PAOLETTI, CESÀRO e DELBEN, 1983).

Em altas temperaturas e baixa força iônica a xantana apresenta estrutura desordenada em solução, contudo a redução da temperatura e/ou adição de íons induz a organização da estrutura (NORTON *et al.*, 1984). Em água purificada, a 25 °C, o esqueleto da xantana é desordenado, ou parcialmente ordenado, e altamente estendido, devido à repulsão eletrostática das cadeias laterais, possibilitando o alinhamento das moléculas e sua interação por ligações de hidrogênio (ROCHEFORT e MIDDLEMAN, 1987).

O aumento da temperatura gera um enovelamento da estrutura que causa a dissociação das ligações de hidrogênio e altera suas propriedades reológicas (ROCHEFORT e MIDDLEMAN, 1987). Após o resfriamento, as moléculas de xantana se unem, duas a duas, formando duplas hélices (MILAS, REED e PRINTZ, 1996). Quando íons são adicionados à solução, a 25 °C ocorre a organização da estrutura com o esqueleto em hélice simples e as cadeias laterais colabam no esqueleto, estabilizando a estrutura (MULLER *et al.*, 1986).

3.3.2 Galactomananas

Galactomananas (GMC) podem ser encontradas em diversas plantas, sendo extraídas de goma Guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), goma de alfarroba (*Ceratonia siliqua*), tara (*Caesalpineia spinosa*) (MAIER *et al.*, 1993) e de bracatinga (*Mimosa scabrella*) (GANTER *et al.*, 1997). Há variações na relação molar manose:galactose de 2:1; 3,5:1; 3:1 e 1,1:1, respectivamente (CERQUEIRA *et al.*, 2009). Sua estrutura consiste basicamente de um esqueleto (1→4)-β-D-manana substituído, irregularmente, no oxigênio 6 por (1→6)-α-D-galactose formando a cadeia lateral que confere solubilidade ao polissacarídeo (FIGURA 5) (DEA e MORRISON, 1975).

As galactomananas são agentes viscosantes eficientes, propriedade controlada essencialmente pela massa molar, que produzem géis em

(DEA e MORRISON, 1975), bem como da distribuição de galactose no esqueleto de galactomanana (MCCLEARY, 1979) resultando em géis mais fracos (MANNION *et al.*, 1992).

Um outro modelo propõe que a interação ocorra entre as cadeias laterais da xantana na forma helicoidal e o esqueleto da galactomanana, as cadeias laterais da xantana seriam inseridas em regiões adjacentes não substituídas do esqueleto de galactomanana, o qual adota uma conformação estendida (TAKO, 1991; TAKO, ASATO e NAKAMURA, 1984) (FIGURA 6).

O terceiro modelo requer aquecimento e sugere que a interação intermolecular ocorre necessariamente com a xantana na forma desorganizada, estendida, ao invés de sua conformação helicoidal (CAIRNS, MILES e MORRIS, 1986; CAIRNS *et al.*, 1987) (FIGURA 6) resultando em géis mais fortes (MANNION *et al.*, 1992). Neste raciocínio também foi sugerido que a interação ocorra apenas entre os segmentos das cadeias laterais da xantana na forma desordenada (CHEETHAM e MASHIMBA, 1988; 1991). O grau de desordem na estrutura da xantana é então o principal fator na interação entre xantana e galactomanana (BRESOLIN *et al.*, 1999; RINAUDO *et al.*, 1999).

Para o uso de tais sistemas poliméricos, devem ser utilizados métodos analíticos a fim de caracterizar as propriedades poliméricas. Entre os principais métodos analíticos estão cromatografia de exclusão por tamanho, espalhamento de luz dinâmico e estático e potencial zeta.

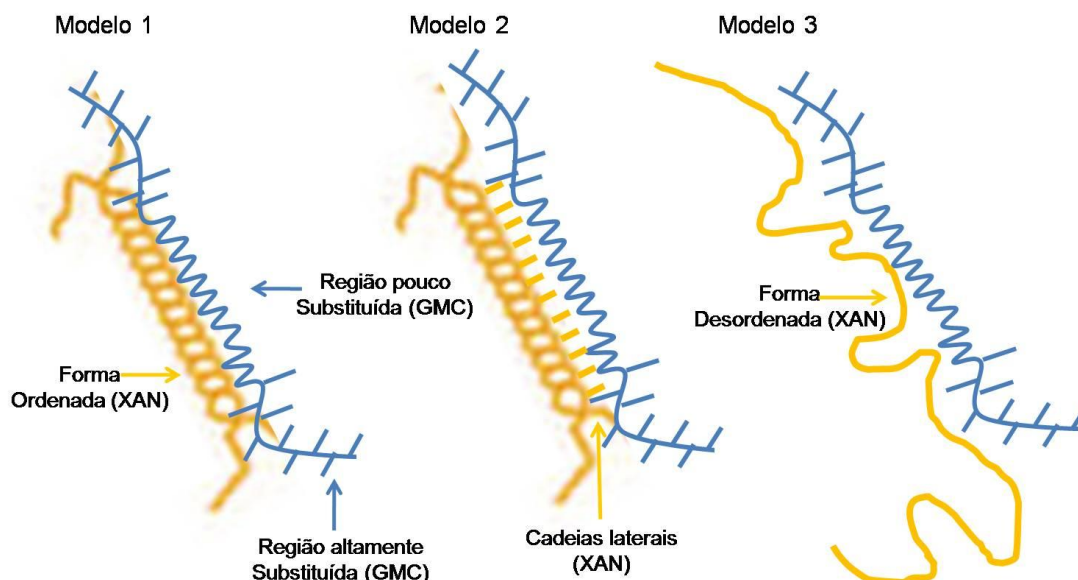


FIGURA 6 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS MODELOS PROPOSTOS DE INTERAÇÃO ENTRE XAN E GMC. O MODELO 1 SUGERE A INTERAÇÃO ENTRE A ESTRUTURA ORDENADA DA XAN E O ESQUELETO POUCO SUBSTITUÍDO DA GMC. O MODELO 2 SUGERE INTERAÇÃO ENTRE AS CADEIAS LATERAIS DE XAN NA FORMA HELICOIDAL COM O ESQUELETO POUCO SUBSTITUÍDO DA GMC. O MODELO 3 SUGERE A INTERAÇÃO ENTRE A XAN NA FORMA DESORDENADA E O ESQUELETO POUCO SUBSTITUÍDO DA GMC.

FONTE: Adaptado de Tako, Asato e Nakamura (1984) e Tako (1991)

3.4 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

3.4.1 Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

Uma variedade de designações como, filtração em gel, cromatografia em gel, cromatografia de peneira molecular, cromatografia por exclusão estérica ou cromatografia por exclusão molecular, são utilizadas para definir a separação baseada no tamanho molecular, cromatografia de exclusão por tamanho, como denominada pela IUPAC (1993).

O princípio desta técnica esta na permeação, dependente de tamanho, de moléculas que permeiam um gel com diversos tamanhos de poros (FIGURA 7). A resolução da cromatografia é dependente da difusão molecular e do empacotamento da coluna. Uma exclusão estérica verdadeira se dá sem a

contribuição de interações entálpicas, como partição ou adsorção (GRABIELLE-MADELMONT, LESIEUR e OLLIVON, 2003).

O uso de sistema triplo de detecção nesta cromatografia permite a caracterização das macromoléculas separadas. É composto por detectores de índice de refração, viscosidade e espalhamento de luz, os quais determinam concentração, densidade molecular e massa molecular, respectivamente. Através destes parâmetros é possível determinar matematicamente outros como viscosidade intrínseca, raio hidrodinâmico e de giração, conformação molecular, presença de ramificações e agregados (STRIEGEL, 2005).

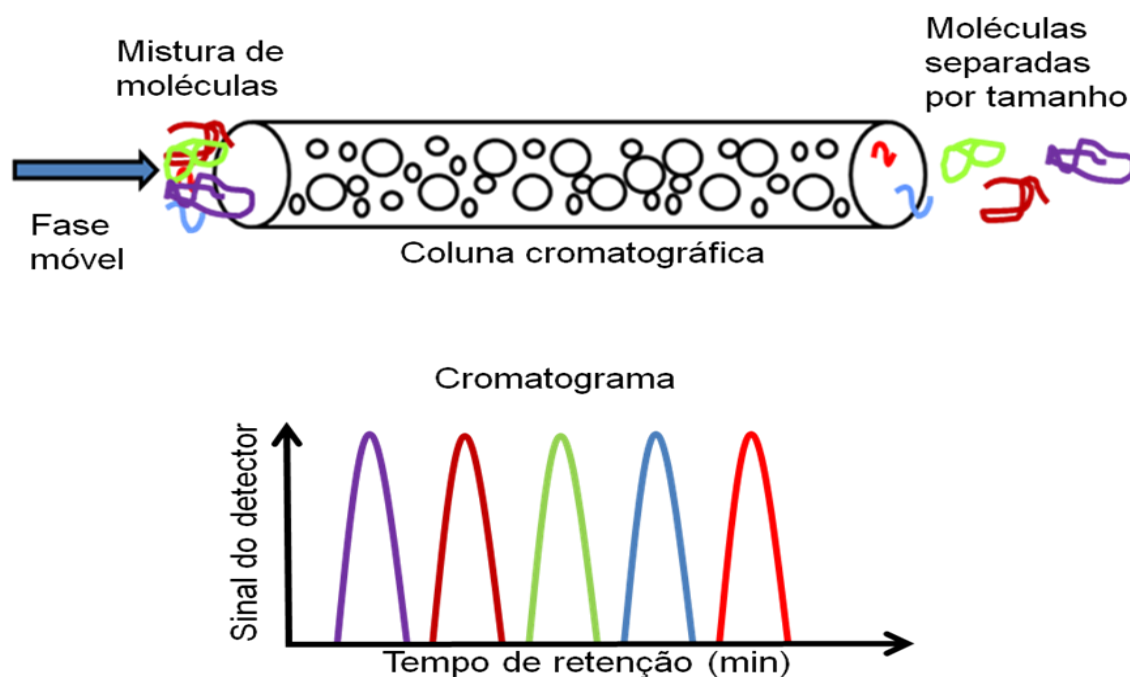


FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO

FONTE: O autor (2013)

3.4.2 Potencial zeta (ζ)

Ao redor de uma partícula carregada, contra íons ligam-se fortemente formando a camada de Stern, ao redor desta camada forma-se outra camada

de íons chamada difusa (FIGURA 8). Estas camadas movem-se como se fossem parte da partícula sob movimento Browniano. O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, e pode ser medido pela mobilidade eletroforética das partículas, ao aplicar-se uma diferença de potencial elétrico no meio, as partículas movem-se em direção à carga oposta em velocidade proporcional à sua carga (DISALVO e BOUCHET, 2012).

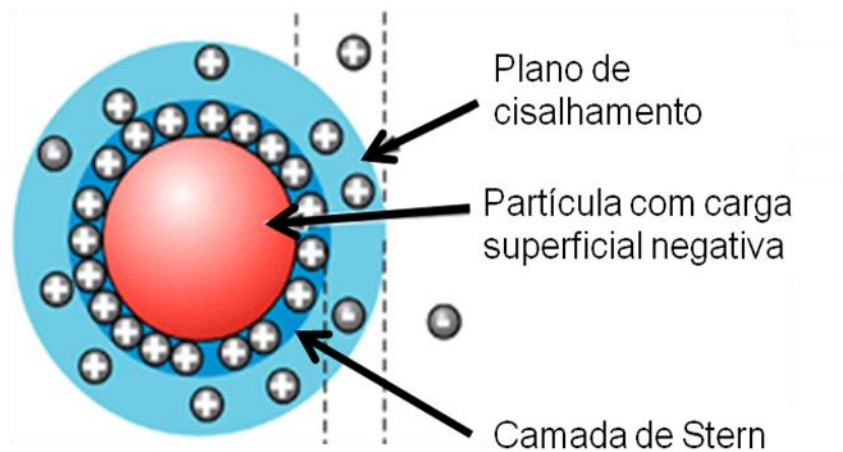


FIGURA 8 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DE UMA PARTÍCULA CARREGADA EM SOLUÇÃO
FONTE: Adaptado de Malvern (2010)

O potencial zeta é de extrema importância para a estabilidade de dispersões coloidais. A elaboração da primeira teoria para relacionar as forças repulsivas entre cargas semelhantes e as forças atrativas de van der Waals surgiu na década de 1940, sendo esta a DLVO, proposta por Derjaguin e Landau e por Verwey e Overbeek. Quando as forças atrativas superam as repulsivas, potencial perto de 0 mV, o sistema perde a estabilidade e as partículas se agregam, precipitando (DERJAGUIN e LANDAU, 1941; VERWEY e OVERBEEK, 1948).

O potencial zeta também pode ser utilizado para monitorar o revestimento polimérico de partículas. Quando o potencial zeta de uma partícula se torna semelhante ao potencial zeta do próprio polímero utilizado para o revestimento, tem-se um revestimento completo. Contudo, quando este potencial mantém-se entre o potencial zeta anterior ao revestimento e o potencial do polímero

utilizado, tem-se um revestimento parcial, como observado por Zhou *et al.* (2010) para partículas revestidas com os polímeros alginato e quitosana.

3.4.3 Métodos para determinação da concentração micelar crítica (CMC) e de agregação molecular (CMA)

Entre as metodologias para avaliação de formação de micelas ou agregados, tem-se a sonda de pireno, que é um hidrocarboneto aromático policíclico que responde à excitação de fluorescência emitindo 5 regiões vibrônicas (FIGURA 9), sendo a primeira relacionada a ambientes polares e a terceira a ambientes apolares. Dessa forma, a relação entre essas bandas fornece uma medida da polaridade do sistema (HALASOVÁ *et al.*, 2011).

Esta técnica é muito útil e sensível para detectar a presença de agregados, uma vez que estes criam domínios hidrofóbicos e então ocorre a migração do pireno para o interior daqueles. Através de isotermas é possível determinar a concentração micelar crítica (CMC) de uma ou mais moléculas em associação, ou a concentração de associação molecular (CAM), para sistemas poliméricos.

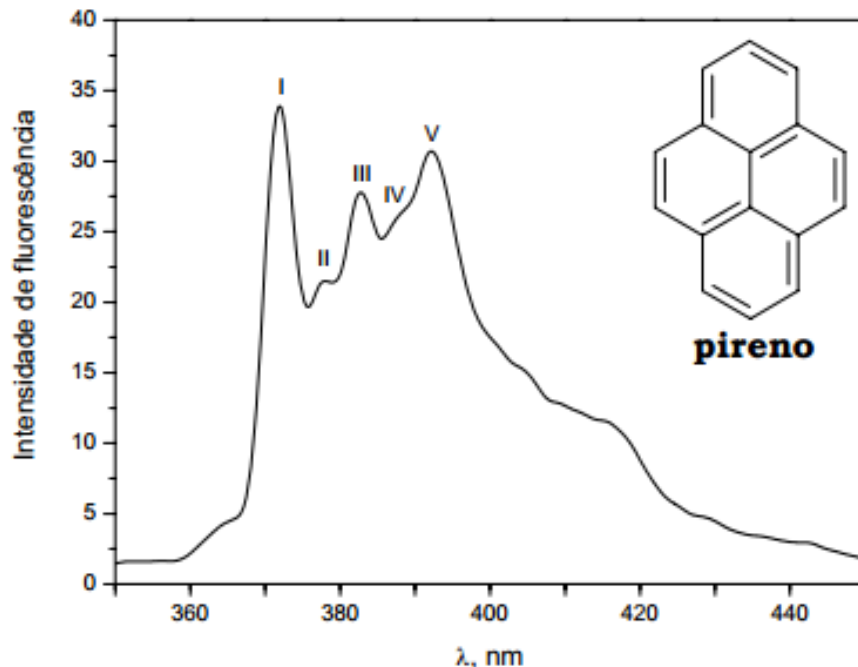


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO PIRENO E SUAS BANDAS DE VIBRAÇÃO
 FONTE: Silva (2002)

A fluorimetria com sonda de pireno expressa a CMC e a CMA pela alteração da intensidade de vibração das bandas I e III, e sua razão, sendo estas relacionadas com as micro-polaridades do sistema, indicando o surgimento de ambientes hidrofóbicos, agregados e a migração das moléculas de pireno para seu interior, quando ocorre o aumento da intensidade da banda III em relação à banda I (MEHTA *et al.*, 2008).

Halasová *et al.* (2011) utilizaram fluorimetria com sonda de pireno para estudar a interação entre ácido hialurônico e tensoativos. Contudo, o estudo foi feito em tampão fisiológico e aparentemente a concentração salina interferiu na interação entre o polímero e o tensoativo, encontrado uma CMA pouco menor do que a CMC com tensoativo aniônico e não encontrando CMA, apenas CMC de micelas livres, para tensoativos zwitteriônicos e catiônicos.

Outra forma de determinar a CMC e a CMA é através de medidas de tensiometria. Neste caso, ao se formar uma gota de solução diluída de um tensoativo na ponta de uma agulha, o balanço das interações entre cadeias carbônicas – água, cadeias carbônicas – cadeias carbônicas, cabeça polar –

cabeça polar e cabeça polar – água, direcionará as moléculas de surfactante para a interface da gota com o ar, a fim de que suas caudas apolares interajam com o ar, por ser menos polar. A migração dessas moléculas causam a diminuição da tensão superficial, ou interfacial, da gota (COSGROVE, 2010).

Quando a superfície da gota está completamente tomada por moléculas de tensoativo, a tensão interfacial é mínima e há um excesso superficial (Γ). O aumento da concentração de surfactante resultará na criação micro-domínios apolares no seio da gota, orientado pelas ligações de hidrogênio das moléculas de água e pelas interações entre as cadeias carbônicas (CHAKRABORTY e GHOSH, 2006; COSGROVE, 2010).

Há também medidas turbidimétricas, onde a CMC e a CMA são determinadas com o aumento da absorvância, devido ao efeito Faraday-Tyndall inerente à formação de agregados moleculares e colóides por associação (LIAW *et al.*, 2012).

3.4.4 Microscopia de força atômica (AFM)

Avaliações topográficas de um material podem ser realizadas por microscopia de força atômica (AFM). O AFM possui uma sonda sensor ligada a um *cantilever* que oscila sobre a amostra e determina assim a sua topografia. A sonda escaneia a amostra por varredura através de linhas paralelas. Dependendo da distância entre a amostra e o *cantilever* forças de atração e de repulsão atuam produzindo uma deformação elástica no último (BERNARDES, 2003) (FIGURA 10).

Existem três diferentes tipos de modos operacionais, modo contato, modo contato intermitente e modo não contato, diferenciados pelas forças envolvidas na varredura (FIGURA 11). No modo de contato intermitente, a força sobre o *cantilever* oscila próxima à frequência de ressonância e o contato com a amostra é descontínuo. O *cantilever* é aproximado da amostra até tocá-la levemente e logo é afastado. A amplitude de vibração do *cantilever* varia entre 20 e 100 nm.

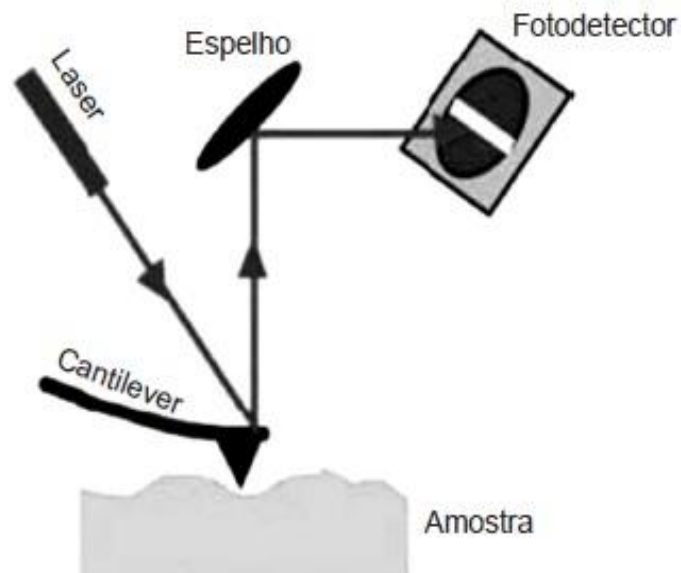


FIGURA 10 – ESQUEMA DO SISTEMA DE ANÁLISE TOPOGRÁFICA DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA (AFM)
 FONTE: Fernandes, Paulin Filho e Morelli (2011)

Devido à alta resolução de imagens topográficas na escala nano, a microscopia de força atômica têm sido utilizada para polímeros (LIU *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2012), proteínas (OLANYA *et al.*, 2010; SOMAN, RICE e SIEDLECKI, 2008) e polissacarídeos (BALNOIS e WILKINSON, 2002; MATSKO e MUELLER, 2004).

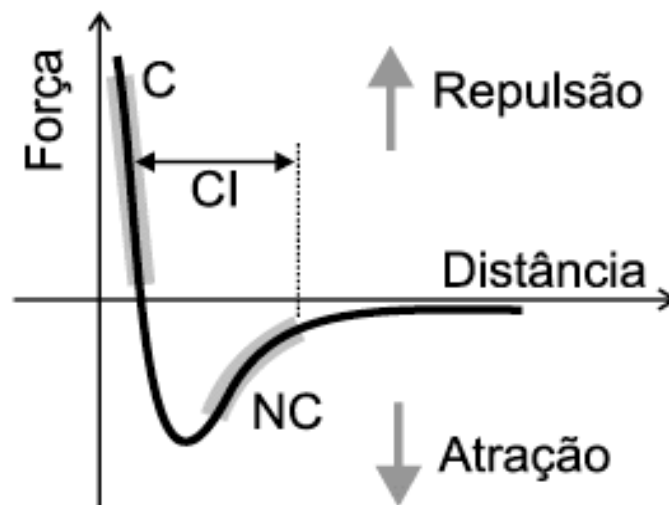


FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO DOS MODOS OPERACIONAIS CONTATO (C), CONTATO INTERMITENTE (CI) E NÃO CONTATO (NC) EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE O CANTILEVER E A AMOSTRA
 FONTE: Fernandes, Paulin Filho e Morelli (2011)

3.4.5 Microcalorimetria exploratória diferencial (μ -DSC)

A microcalorimetria exploratória diferencial é um dos métodos mais sofisticados para explorar a termodinâmica de processos de agregação em soluções. Através deste é possível determinar a entalpia padrão de micelização (ΔH_{mic}^0) (CHAKRABORTY, CHAKRABORTY e GHOSH, 2006).

O equipamento de μ -DSC mede a transferência de calor entre um cadinho contendo a solução da amostra e outro cadinho contendo apenas o solvente, dentro de um forno com temperatura controlada. À medida que o forno aquece ou resfria o fluxo de calor entre os cadinhos é monitorado e quando ocorre um evento térmico no cadinho contendo a amostra, este recebe ou doa calor para o cadinho referência e essa transferência de calor é equivalente à entalpia do evento (SPINK, 2008).

Dentre os eventos detectáveis e quantificáveis estão alterações conformacionais, fusão, hidratação/desidratação, agregação/desagregação ou inclusive uma combinação de eventos para lipídeos, ácidos nucleicos, polímeros e proteínas (CELEJ *et al.*, 2006).

Feitosa *et al.* (2012) investigaram a formação de vesículas de DDAB por μ -DSC. Encontraram que até 1 mM de DDAB em água ultra pura o DDAB forma apenas vesículas unilamelares e apresentam os eventos T_m a 45°C e T'_m a 40°C durante o aquecimento e o resfriamento, respectivamente. À medida que a concentração de DDAB aumenta, a partir de 1 mM, surge um novo evento térmico denominado T_p a 53°C no aquecimento, o qual aumenta com o aumento da concentração de DDAB. Este evento é característico da formação de micelas multi lamelares e torna-se o único evento observado em concentrações de DDAB acima de 65 mM.

3.4.6 Microbalança de cristal de quartzo (QCM)

Através do monitoramento de variações na frequência de vibração de um cristal de quartzo, esta técnica permite medir alterações de massa por área da superfície do cristal. A adsorção, ou a dessorção de moléculas da superfície do

cristal perturba sua ressonância, sendo utilizado então para caracterizar a formação de filmes de polímeros, proteínas, lipídeos e até mesmo células (DIXON, 2008).

Uma massa depositada na superfície do cristal altera sua espessura e, por conseguinte, sua frequência de vibração. Através da equação de Sauerbrey (EQUAÇÃO 1) a variação de frequência pode ser correlacionada com a massa adsorvida,

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu_c\rho_c}} = -k \Delta m \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

onde Δf é a variação da frequência de ressonância em Hz, k é a constante do cristal, que leva em consideração a área geométrica do cristal (A), sua frequência fundamental (f_0), modo de cisalhamento do quartzo (μ_c) e a densidade deste (ρ_c), e Δm é equivalente à variação de massa (DIXON, 2008).

Esta técnica já foi utilizada para estudar a interação entre surfactantes e polímeros. Merta, Tammelin e Stenius (2004) utilizaram cristais de ouro revestidos com sílica para estudar os efeitos do comprimento de cadeia, densidade de carga e força iônica na interação entre surfactantes aniônicos e amido catiônico.

3.4.7 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Uma das estratégias para determinação do coeficiente de difusão (D) e raio hidrodinâmico (R_h) de uma partícula é o espalhamento de luz dinâmico (DLS).

No DLS, uma radiação eletromagnética conhecida é emitida sobre uma solução de amostra com diluição infinita. Ao atingir as partículas ocorre uma mudança do vetor elétrico da luz emitida que provoca o espalhamento da luz, sendo este proporcional à concentração de partículas e ao tamanho destas, uma vez que partículas menores espalham mais a luz em menores ângulos, e partículas maiores em maiores ângulos, a observação da luz espalhada normalmente é feita a 90° (BERNE e PECORA, 2000; CHU, 2007).

A intensidade de luz espalhada varia com o movimento Browniano das partículas, sendo inversamente proporcional ao tamanho destas, assim partículas menores apresentarão uma maior frequência de variação da luz espalhada do que partículas maiores. Essa movimentação das partículas na solução é determinada como coeficiente de difusão e é inversamente proporcional ao R_h das partículas, como mostra a equação de Stokes-Einstein (EQUAÇÃO 2),

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

onde, D é o coeficiente de difusão, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da análise, η é a viscosidade do solvente e R_h é o raio hidrodinâmico da partícula (BERNE e PECORA, 2000; CHU, 2007).

O espalhamento de luz dinâmico pode ser uma ferramenta no estudo da interação entre polímeros e surfactantes. Li, Wettig e Verral (2005) utilizaram o DLS para avaliar a formação de agregados em sistemas semi-diluídos de polímeros e surfactantes. Eles demonstram a agregação dos polímeros com os surfactantes e a formação de micelas livres, dependendo da concentração de surfactante.

Após a caracterização, os sistemas particulados podem ser utilizados para incorporar fator de crescimento epidermal, envolvido no processo cicatricial. Assim, uma descrição do processo de cicatrização é apresentada a seguir.

3.5 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é um mecanismo que promove a re-epitelização da epiderme e a substituição da derme por nova matriz extracelular num processo complexo e ordenado.

Primeiramente inicia-se o processo de inflamação a partir da agressão do tecido ocorre o rompimento de vasos e conseqüente extravasamento dos constituintes sanguíneos, dentre eles as plaquetas que se degranulam e

agregam formando o coágulo. A coagulação ativa a resposta inflamatória pela ativação do fator XII (fator Hageman) e promoção da cascata do complemento tanto pela via clássica como pela via alternada (SOTER e BADEN, 1991).

Concomitantemente, há um aumento na permeabilidade vascular e, por quimiotaxia, atração de células polimorfonucleares, monócitos, macrófagos e linfócitos que eliminam micro-organismos e secretam fatores de crescimento e citocinas, contribuindo para a formação da matriz temporária de tecido de granulação composta por proteoglicanos, glicosaminoglicanos e fibronectina (SOTER e BADEN, 1991).

As plaquetas secretam várias citocinas – fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e fator de crescimento epidermal (EGF) – as quais estimulam a formação do novo tecido, bem como secretam substâncias com atividade vasoconstritora – serotonina, adenosina di-fosfato (ADP), cálcio e tromboxanos – para prevenção da hemorragia (ROOK, WILKINSON e EBLING, 1998).

Em uma segunda fase, determinada de fibroplasia, a secreção plaquetária de citocinas e FC estimulam a produção e a deposição de fibronectina, colágenos do tipo I, III e VI e ácido hialurônico, além da migração de fibroblastos os quais formam um tecido macio na ferida com neomatriz e neovascularização, originando a neoderme, que dá suporte à neoepiderme (WANG *et al.*, 2000).

Os fibroblastos se organizam em arranjos radiais ligando-se à matriz extracelular e uns aos outros gerando tensão para a contração da ferida. Simultaneamente as células endoteliais da microvasculatura próximas à ferida dissolvem a membrana basal e migram para o novo tecido de granulação formando novos capilares. Rapidamente uma nova membrana basal é formada entre os capilares endoteliais e o tecido de granulação neoformado a fim de substituir a matriz provisória (WANG *et al.*, 2000).

O EGF estimula a proliferação das células epidérmicas da margem da ferida, as quais migram sobre a matriz provisória estabelecendo a re-epitelização. Após o término da re-epitelização forma-se nova membrana basal

que fecha a nova epiderme sobre a matriz (BARRADON e GREEN, 1987; KEDE e SABATOVITCH, 2004).

Em uma última fase, denominada maturação ocorre a remodelação da matriz extracelular a partir dos bordos da lesão em direção ao centro, de forma que o tecido das bordas em dados momentos diferem do tecido de granulação mais central. Essa diferença depende do tempo de regeneração, da distância da margem da ferida e é principalmente afetada pelas citocinas liberadas e pelo microambiente da matriz (CLARK e HENSON, 1996).

Nesta fase, a fibronectina atua majoritariamente na migração celular, na contração da ferida pelos miofibroblastos e na produção de colágeno, enquanto o ácido hialurônico favorece a penetração de células parenquimatosas na matriz. Com a evolução da matriz ambos desaparecem, resultando no aumento dos feixes de colágeno e na tensão da ferida, principalmente pela formação de fibrilas pelos colágenos do tipo I, III e V, aumentando a resistência da ferida à estímulos mecânicos e consequentes deformações (CLARK e HENSON, 1996).

3.6 FATORES DE CRESCIMENTO

As plaquetas atuam diretamente no processo de cicatrização (ANITUA *et al.*, 2004), sendo ativadas por trombina e cálcio em resposta a dano tecidual. Sua ativação provoca a degranulação dos grânulos α -plaquetários, resultando numa grande liberação de FC diretamente no local da injúria (GANDHI *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2008) que promove o reparo e reconstituição tecidual (PIETRZAK e EPPLEY, 2005).

Os principais FC secretados pelas plaquetas são PDGF, TGF- α , TGF- β e EGF. Estes são proteínas capazes de atuar em receptores de superfície celular e direcionar as atividades celulares para o reparo tecidual (CHEN *et al.*, 2010) através da sinalização de processos de vascularização, coagulação, divisão e diferenciação celular (LU *et al.*, 2008; TAYALIA e MOONEY, 2009) e sua concentração aumenta diretamente com a concentração de plaquetas (EPPLEY, WOODSELL e HIGGINS, 2004).

Os FC são moléculas sinalizadoras que instruem células durante o desenvolvimento, ligando-se à receptores de superfície celular para direcionar suas atividades (CHEN *et al.*, 2010). São secretados por diversos tipos de células e promovem a cicatrização de forma ordenada (MURAKAMI *et al.*, 1999).

Os efeitos destas proteínas são multifacetados, manifestados como quimiotático, mitogênico, morfogênico, apoptótico, metabólico e até a combinação destes efeitos (MARX, 2004). Apresentam diferentes mecanismos de ação, dependendo da concentração, tempo de exposição e do tipo celular ao qual é direcionado, sendo, portanto, utilizadas em tratamentos diversos como regeneração óssea (ALVES *et al.*, 2009; GANDHI *et al.*, 2006), cartilagens (WU *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2009), reparação e prevenção de complicações peridontais (SAMMARTINO *et al.*, 2005), cicatrização tecidual (BROWN, NANNEY e GRIFFEN, 1989) e queimaduras (PALLUA, WOLTER e MARKOWICZ, 2010).

Os FC normalmente difundem lentamente pela matriz extracelular e agem localmente devido à sua curta meia-vida. A capacidade de gerar uma resposta não está associada apenas ao seu tipo, mas também ao número de células-alvo, tipo de receptor e de resposta intracelular após sua ligação ao receptor podendo um único FC gerar diferentes respostas em diferentes tipos de células (LEE, SILVA e MOONEY, 2011).

FC têm sido empregados para manipular o processo de cicatrização não apenas facilitando o reparo tecidual no sítio de injúria, mas também *in vitro* na engenharia de tecidos atribuindo biofuncionalidade à materiais sintéticos (MALAFAYA, SILVA e REIS, 2007), uma vez que diversos FC estão envolvidos no processo de cicatrização normal, sugere-se a sua indicação como agente terapêutico para promover a cicatrização de feridas (GREENHALGH, 1996).

Entre os FC, o primeiro isolado foi o EGF, um polipeptídeo de 53 aminoácidos com 6 kDa (COHEN, 1962).

Existem dez proteínas que compõe o grupo EGF, elas possuem estrutura e atividade biológica semelhante e atuam sobre o mesmo receptor de superfície celular, são elas EGF, TGF- α , EGF heparina ligante (HB-EGF), betacelulina (BTC), anfiregulina (AREG), epigen (EPGN), epiregulina (EPR) e

neuregulina de 1 a 4 (NRG1 – 4) (HARRIS, CHUNG e COFFEY, 2003; PRIGENT e LEMOINE, 1992).

O EGF promove a regeneração celular da epiderme e é essencial no processo de cicatrização de feridas por estimular a proliferação e a migração de queratinócitos. Promove também a formação do tecido de granulação, etapa primordial do processo de re-epitelização, e estimula a mobilidade dos fibroblastos. Atua também como mitógeno através de ligação receptor específica ativando a tirosina quinase e iniciando a transdução de sinal que resulta na síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e proliferação celular (CARPENTER e COHEN, 1990; CARPENTER, KING e COHEN, 1978).

Existem diversos produtos tópicos comerciais a base de EGF para feridas crônicas e queimaduras (FREW, REZAIIE e SAMMUT, 2007; MOLA, ACEVEDO e SILVA, 2003). E os estudos dos efeitos de EGF exógeno no processo de cicatrização vêm desde 1973, avaliando-se *in vivo* a sua aplicação tópica em hiperplasia epitelial de córnea após injúria (SAVAGE e COHEN, 1973).

O uso de EGF também apresentou resultados positivos com aplicações tópicas e subcutâneas em feridas dérmicas, na regeneração epitelial acelerada e com menores cicatrizes em coelhos (FRANKLIN e LYNCH, 1979), e também na redução no tempo de cicatrização de queimaduras (BROWN, NANNEY e GRIFFEN, 1989).

Com o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos houve um novo fôlego nas pesquisas com EGF para cicatrização. Este novo interesse pode resultar em terapias nanomédicas, com fatores de crescimento, desenhadas para manipular o ambiente da ferida a nível molecular e otimizar a cicatrização de feridas (HARDWICKE *et al.*, 2008).

Alves *et al.* (2009) formaram lipossomas contendo EGF que capazes de dobrar o recrutamento de osteoclastos *in vivo*, comparado à EGF não encapsulado, para regeneração de dentes. Contudo os lipossomas não foram caracterizados e a cinética de liberação de EGF não foi determinada.

Değim *et al.* (2011) desenvolveram um gel contendo lipossomas multilamelares de 4 µm de diâmetro. Este sistema acelerou a cicatrização de queimaduras *in vivo*, contudo a cinética de liberação de EGF não foi determinada.

Li *et al.* (2003) desenvolveram lipossomas de aproximadamente 300 nm capazes de acelerar a cura de úlceras gástricas *in vivo* por administração oral. A cinética de liberação de EGF a partir dos lipossomas não foi determinada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO DOS POLÍMEROS

4.1.1 Purificação dos polímeros.

A xantana comercial (Sigma-Aldrich) utilizada possui 8 % de umidade, 0,9 % de cinzas e viscosidade de 1020 cPs em solução a 1%. Esta foi dispersa, a 1 mg.mL⁻¹, em água ultra pura (MilliQ system), e purificada por diálise através de membrana de celulose com diâmetro de poros médio de 12 kDa (Sigma-Aldrich) contra ácido acético 0,1 mol.L⁻¹ por 3 dias, seguido por água ultra pura por 2 dias para remover o ácido em excesso. O polímero foi então liofilizado (Micromodulyo, Thermo) e armazenado até o uso em ambiente seco e ao abrigo da luz.

A galactomanana comercial de alfarroba *Ceratonia siliqua* (Sigma-Aldrich) utilizada possui 9 % de umidade, 0,8 % de cinzas e viscosidade de 2420 cPs em solução a 1 %. Esta foi purificada por solubilização, a 2,5 mg.mL⁻¹, em água ultra pura (MilliQ system) e centrifugação (Sigma 4K15C) a 10.000 g, por 20 minutos, a 40°C. Ao sobrenadante foi adicionado álcool etílico absoluto qsp 70%, esta suspensão foi centrifugada a 10.000 g, por 20 minutos, a 5°C para precipitar toda fração polimérica. O polímero foi então lavado com etanol absoluto, centrifugado como descrito por último e seco em estufa a 40°C.

4.1.2 Caracterização dos polímeros

4.1.2.1 Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

Os polímeros foram solubilizados a 0,5 mg.mL⁻¹ em NaNO₃ 0,1 mol.L⁻¹ contendo 200 ppm de azida de sódio, a 60°C durante uma hora, e foram mantidos sob agitação magnética a temperatura ambiente por 24 h. Após a solubilização, foram filtrados por membrana de acetato de celulose com diâmetro de poros médio de 0,45 µm. As soluções resultantes foram então

injetadas, 100 μL , em cromatógrafo de exclusão por tamanho (Viscotek) composto por detectores de UV/Vis, índice de refração, espalhamento de luz laser, λ de 633 nm, a 7° e 90° e viscosidade, com coluna OHPak SB-806M HQ (Shodex). A fase móvel foi igual à da solubilização dos polímeros, sob fluxo de $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a 40°C . A calibração foi feita com padrões (Viscotek) de óxido de polietileno ($22 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) e dextrana ($70 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$). Os experimentos foram realizados no Departamento de Química da UFPR.

4.1.2.2 Potencial zeta

O potencial ζ foi determinado para soluções, a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, dos polímeros, e $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de DDAB, em água ultra pura, por mobilidade eletroforética, utilizando cubetas descartáveis de poliestireno em equipamento Zetasizer nano-zs (Malvern), a 25°C , após 120 segundos de estabilização. Esses experimentos foram realizados no Hospital Albert Einstein em São Paulo.

4.1.2.3 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Hartree (1972). Soluções dos polímeros a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram submetidas à reação com o reativo de *Folin-Ciocalteu*. Este método baseia-se na complexação da proteína com o cobre alcalino e a redução do fosfomolibdato-fosfotungstato a ácido fosfomolibdotúngtico, provocada pelos aminoácidos tirosina e triptofano, resultando na coloração azul da solução. As amostras foram submetidas à comparação com curva padrão de albumina com linearidade de 20 a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $R = 0,999$ e a seguinte equação da reta: $y = A \times 0,00352 + 0,0077$. As análises foram feitas em espectrofotômetro, λ de 650 nm (HARTREE, 1972).

4.1.2.4 Métodos espectrométricos

Os polímeros também foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho e por ressonância magnética nuclear de próton ($^1\text{H-RMN}$).

Os espectros de infravermelho (FTIR) foram obtidos por reflectância atenuada com sonda pontual, utilizando um Espectrofotômetro de Infravermelho VERTEX 70 (BRUKER) com 4 cm^{-1} de resolução e transformada de Fourier. Os espectros foram obtidos na região de $4000 - 600\text{ cm}^{-1}$ em absorbância (%), sendo efetuadas 16 varreduras nas amostras em pó. Experimento realizado no Departamento de Química da UFPR.

O RMN de próton foi realizado em equipamento DRX-400 (BRUKER), em tubo de 5 mm de diâmetro, em água deuterada (D_2O 99 %, Cambridge Isotope Laboratories) a 70°C . Os deslocamentos químicos de próton (δ 2,224 ppm) foram baseados no da acetona, utilizada como padrão interno.

Os polímeros foram solubilizados, a 10 mg.mL^{-1} , em D_2O e então liofilizados. Promoveu-se a troca de hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção de água presente através da repetição desse processo por três vezes.

Os espectros foram obtidos na frequência base de 400 MHz, janela espectral de 8250 Hz, com intervalo de aquisição de 4 s, intervalo entre os pulsos de 1 s, com no mínimo 16 aquisições, e com espectro de resolução de 16 K. Esses experimentos foram realizados no Departamento de Bioquímica da UFPR.

4.2 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AGREGAÇÃO MOLECULAR E MICELAR CRÍTICA

Os polímeros e o lipídio foram submetidos à análises de tensiometria, turbidimetria e fluorimetria para a determinação das concentrações de agregação molecular (CAM) dos polímeros, e concentração micelar crítica (CMC) do tensoativo. Foram preparadas soluções de diversas concentrações em água ultra pura, com aquecimento dos polímeros a 60°C por 1 h, e agitação magnética por 24 h. A fim de verificar a interação entre XAN e DDAB diferentes

quantidades de lipídio foram adicionadas a soluções de XAN, 0,5 mg.mL⁻¹, em água ultra pura. Estas amostras foram então submetidas às seguintes análises.

4.2.1 Tensiometria

As análises foram realizadas, a 25°C, de acordo com o método do formato da gota pendente em equipamento OCA15 (Dataphysics). Uma gota da solução do polímero, ou tensoativo, é formada na ponta de uma agulha e permanece pendente. O formato da gota é captado por uma câmera e através do software SCA20, a tensão interfacial é determinada pela curvatura da gota através da equação de Laplace-Young abaixo,

$$P_i - P_e = (D - 1) \frac{\gamma}{R} \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

onde, P_i é a pressão interna, P_e é a pressão externa, D a dimensão espacial, R é o raio de curvatura da gota e γ é a tensão superficial. As análises foram realizadas até valores constantes no Departamento de Química da UFPR.

4.2.2 Turbidimetria

As soluções foram analisadas em cubeta de quartzo, em espectrofotômetro UV2600 (Shimadzu) sob comprimento de onda de 600 nm como descrito por Harmon *et al.* (2011). Análises realizadas no Departamento de Química da UFPR.

4.2.3 Fluorimetria

Solução metanólica de Pireno (Fluka) foi adicionado às amostras, qsp concentração final de 1 µg.mL⁻¹. Após 60 minutos de estabilização as amostras foram analisadas em cubeta de quartzo para fluorescência, em espectrofotômetro de fluorescência F4500 (Hitachi), com excitação em 336 nm

e varredura de 360 a 460 nm. Análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

4.2.4 Microcalorimetria exploratória diferencial (μ -DSC)

As amostras foram solubilizadas, sem aquecimento, e apenas para este experimento foram solubilizadas em NaCl 10 mmol.L⁻¹, XAN a 0,5 mg.mL⁻¹ e DDAB a 5 mmol.L⁻¹. As varreduras foram realizadas, de 25°C a 100°C, em equipamento Micro DSC III (Setaram), em atmosfera inerte de nitrogênio, sob fluxo de 15 bar, em cadinhos de 1 cm³ com taxa de aquecimento e de resfriamento de 0,2°C.min⁻¹. A fim de verificar a interação entre XAN e DDAB, o lipídio foi adicionado, a 5 mmol.L⁻¹, à uma solução 0,5 mg.mL⁻¹ de XAN e submetido à varredura como anteriormente citado. Os dados foram coletados e analisados pelo software Setsoft 2000. As análises foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

4.2.4.1 Parâmetros termodinâmicos de micelização

O grau de ionização das micelas foi determinado por titulação condutimétrica e a energia livre de Gibbs padrão de micelização (ΔG_{mic}^0) foi calculada por (BERG, 2010),

$$\Delta G_{mic}^0 = (1 - \beta)RT \ln cmc \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

onde, β é o grau aparente de contra íon ligados à micela, calculado por $1 - \alpha$, sendo α o grau de ionização das micelas, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura de micelização.

O excesso superficial máximo na interface solução/ar (Γ_{max}) foi calculado através da isoterma de adsorção de Gibbs (TADROS, 1984),

$$\Gamma_{max} = \frac{-1}{2.303RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \log c} \right)_T \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

onde, R a constante universal dos gases, T a temperatura, γ a tensão interfacial/superficial e c a concentração de surfactante.

Conhecendo-se Γ_{max} foi possível calcular a área mínima ocupada por uma molécula de surfactante na interface (a_{min}), a qual foi calculada segundo Tadros (1984),

$$a_{min} = \frac{10^{18}}{N_A \Gamma_{max}} \quad \text{EQUAÇÃO 6}$$

onde, N_A é o número de Avogadro.

A energia livre padrão de adsorção (ΔG_{ads}^0) na interface solução/ar foi calculada por (SIKIRIC, PRIMOZIC e FILIPOVIC-VINCEKOVIC, 2002),

$$\Delta G_{ads}^0 = \Delta G_{mic}^0 - \pi_{cmc} / \Gamma_{max} \quad \text{EQUAÇÃO 7}$$

onde, π_{cmc} é a pressão superficial na CMC, calculada pela diferença entre a tensão superficial da água pura e a tensão superficial da solução de surfactante na CMC.

A entropia padrão de micelização (ΔS_{mic}^0), para processos que ocorram a temperatura e pressão constantes foi calculada pela EQUAÇÃO 8 (BERG, 2010), a partir da entalpia padrão de micelização (ΔH_{mic}^0) fornecida pelo software de μ -DSC e a energia livre padrão de micelização (ΔG_{mic}^0) calculada:

$$\Delta S_{mic}^0 = \left(\frac{\Delta H_{mic}^0 - \Delta G_{mic}^0}{T} \right) \quad \text{EQUAÇÃO 8}$$

O ganho de entropia do sistema contendo micelas formadas com xantana pode ser relacionado à recuperação da entropia translacional dos contra íons que não necessitam adsorver à superfície das micelas para estabilizá-las. Esta entropia translacional pode ser determinada por (WANG *et al.*, 2003):

$$\Delta S_t^0 = \Delta S_{mic\ livre}^0 - \Delta S_{mic\ ligada}^0 \quad \text{EQUAÇÃO 9}$$

4.2.5 Microbalança de cristal de quartzo (QCM)

Triplicatas foram realizadas em equipamento SRS QCM200 com célula de fluxo. Cristais de ouro/cromo com vibração de 5 MHz (SRS) foram lavados por imersão em solução piranha (H_2O_2 1:3 H_2SO_4) por 5 minutos e enxaguados com água ultra pura (MilliQ system).

A fim de mimetizar modificar a superfície do cristal de ouro, para formar uma camada hidrofóbica, este foi imerso em solução clorofórmica de hexanotiol (Sigma-Aldrich) a 5 mmol.L^{-1} por 5 minutos e seco em temperatura ambiente com N_2 , como já descrito em literatura (LIEBAU *et al.*, 1998; MORITA, NUKUI e KUBOI, 2006; TOMINAGA *et al.*, 2004).. Então este cristal foi revestido com DDAB por imersão em solução clorofórmica a 5 mmol.L^{-1} .

O cristal revestido com DDAB foi posicionado em uma célula de fluxo na qual as soluções poliméricas, a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em água ultra pura, foram alternadamente injetadas a $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$, com auxílio de uma bomba de seringa (KdScientific). Entre a injeção dos polímeros a célula de fluxo foi lavada com a injeção de 1 mL de água ultra pura, sob mesmo fluxo.

4.2.6 Microscopia de força atômica (AFM)

Imagens de cada camada sobre o cristal de QCM foram obtidas com microscópio Agilent PicoPlus Molecular Imaging, em ar a 25°C , com *cantilever* de silicone com amplitude entre 50 a 100 nm e frequência de ressonância de aproximadamente 300 kHz. Foi utilizado modo de contato intermitente via *cantilever* μ -Masch com constante de mola $4,7 \text{ N.m}^{-1}$ e ponta com curvatura de raio menor a 10 nm. O processamento das imagens e cálculo da rugosidade média superficial (RMS) foram realizados através do software Gwyddion.

4.2.7 Ângulo de contato

Os ângulos de contato do cristal de QCM revestido foram determinados, a 25°C , para gotas de $15 \mu\text{L}$ de água ultra pura, com equipamento OCA15

(Dataphysics). A gota é depositada sobre a superfície a ser analisada e uma câmera capta essa imagem, através do software SCA20 o ângulo formado entre a borda da gota e a superfície é determinado. Quanto maior o ângulo de contato, menor é a força de coesão entre a água e a superfície, e portanto, mais apolar é a superfície.

4.3 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Uma vez que o EGF adquirido para ser utilizado neste trabalho não foi de padrão analítico, este foi submetido a uma etapa de purificação com centrifugação, 10.000 g por 20 minutos, a 25°C, com 5 etapas de lavagem por água ultra pura (MilliQ system), em tubo Amicon com cutoff de 3 kDa (Millipore), inferior ao tamanho do EGF descrito em literatura de 6 kDa (COHEN, 1962).

Os lipossomas foram preparados de acordo com Domenici *et al.* (2012) com modificações. O DDAB foi solubilizado em clorofórmio, a 5 mmol.L⁻¹, o solvente foi rotaevaporado a 40°C formando um filme de lipídio na parede do balão, este foi ressuspense em solução de EGF (Caragen), 5 µg.mL⁻¹, em água ultra pura (MilliQ system), concentração similar ao publicado por Alves *et al.*, (2009) e Değim *et al.* (2011), sob agitação a 40°C por 2 horas. Então, o material foi submetido a ultrassom (Sonics vibra cell) com sonda por 5 minutos, sem aquecimento e em banho de água a temperatura ambiente. Após 24h de repouso os lipossomas foram filtrados por membrana de acetato de celulose com diâmetro de poros médio de 0,45 µm.

4.3.1 Revestimento dos lipossomas

A suspensão de lipossomas foi diluída 1:10 com água ultra pura e centrifugada a 10.000 g por 20 minutos, a 25°C. O sobrenadante foi descartado e os lipossomas foram ressuspensos em solução de XAN, 0,5 mg.mL⁻¹, com auxílio de agitação vortex, e foram novamente centrifugados. Após centrifugação, foram lavados com água ultra pura e novamente centrifugados.

Finalmente, foram ressuspensos com GMC, $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, centrifugados e lavados como descrito anteriormente.

Os lipossomas foram caracterizados por espalhamento de luz dinâmico (DLS), através da determinação do diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas sem revestimento, revestidos com XAN e revestidos com XAN e GMC, em equipamento NanoDLS (Brookhaven Instruments) semelhante a Scarioti *et al.* (2011). O potencial ζ dos lipossomas foi determinado sem revestimento, e com até 8 camadas de revestimento, como descrito no item 4.1.2.2, a fim de relacionar a carga superficial das partículas, no seu plano de cisalhamento, com a carga superficial dos polímeros a cada camada de revestimento. Imagens dos lipossomas sem revestimento, revestidos com XAN e revestidos com XAN e GMC, foram feitas como descrito no item 4.3.3 sobre silício, lavado com solução piranha, como descrito no item 4.3.2.

4.4 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE EGF

Lipossomas sem revestimento, revestidos com XAN e revestidos com XAN e GMC foram colocados, em triplicatas, em membranas de celulose para diálise, com diâmetro de poros médio de 12 kDa (Sigma-Aldrich), e imersas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 5,5 para mimetizar condições dérmicas (WAGNER *et al.*, 2003), sob agitação magnética a 35°C , por 48 horas. Alíquotas de 1 mL foram coletadas do meio e o volume foi repostado com tampão.

As alíquotas coletadas foram diluídas 1:10 na fase móvel, filtradas por membrana Millipore, com diâmetro de poros de $0,45 \mu\text{m}$, e 20 μL de cada amostra foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência Prominence (Shimadzu), com coluna Symmetry C18 ($4,6 \times 250 \text{ mm}$, partículas de $5 \mu\text{m}$). O método foi adaptado de acordo com os métodos de Clayton *et al.* (2005), Furuya, Akashi e Hirayama (1989) e Yang *et al.* (2005), para isocrático com fase móvel 40% acetonitrila em água e ácido trifluoro acético a 0,1%, sob fluxo de 1 mL.min^{-1} , a 40°C , e detecção em 210 nm, resultando em tempo de retenção para EGF de 4,8 minutos.

A quantificação de EGF foi feita por CLAE pelo método descrito anteriormente utilizando uma curva padrão de albumina. O EGF foi então submetido à teste de limites de detecção e quantificação e linearidade. A eficiência de incorporação de EGF pelos lipossomas revestidos foi feita de forma direta e indireta em triplicata. Os lipossomas revestidos contendo EGF foram centrifugados a 10.000 g por 20 minutos, a 25°C, o sobrenadante foi analisado por CLAE para quantificar o quanto não foi incorporado, e indiretamente o quanto foi incorporado, de acordo com a EQUAÇÃO 10.

$$Eficiência\ de\ incorporação = \left\{ \left(\frac{[EGF\ no\ sobrenadante]}{EGF\ Total} \right) - 1 \right\} \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 10}$$

Então, o precipitado foi ressuspenso e as nanopartículas foram lisadas pela adição de Triton X-100 qsp 3 %, como descrito por Chen, Cole e Srivatsa (2000) e Lu *et al.* (2008), e então foi feita a quantificação de forma direta por CLAE.

$$Eficiência\ de\ incorporação = \left(\frac{[EGF\ no\ lisado]}{EGF\ Total} \right) \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 11}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS

Os polímeros obtidos comercialmente e os purificados para utilização no presente trabalho, xantana (XAN) e galactomanana (GMC), foram caracterizados por SEC.

Os polímeros purificados exibiram uma distribuição unimodal (FIGURA 12), e os valores de massa molar média-ponderal (M_w) e raio de giro ($\langle S^2 \rangle^{1/2}$) para a XAN, de $1,0 \times 10^6$ g.mol⁻¹ e 69,2 nm, foram semelhantes aos descritos em literatura por Gulrez *et al.* (2012). A GMC apresentou M_w e $\langle S^2 \rangle^{1/2}$, de $2,57 \times 10^5$ e 52,1 nm, e similares ao descrito por Dakia *et al.* (2008) de $5,25 \times 10^5$ g.mol⁻¹ e 57,4 nm (TABELA 1).

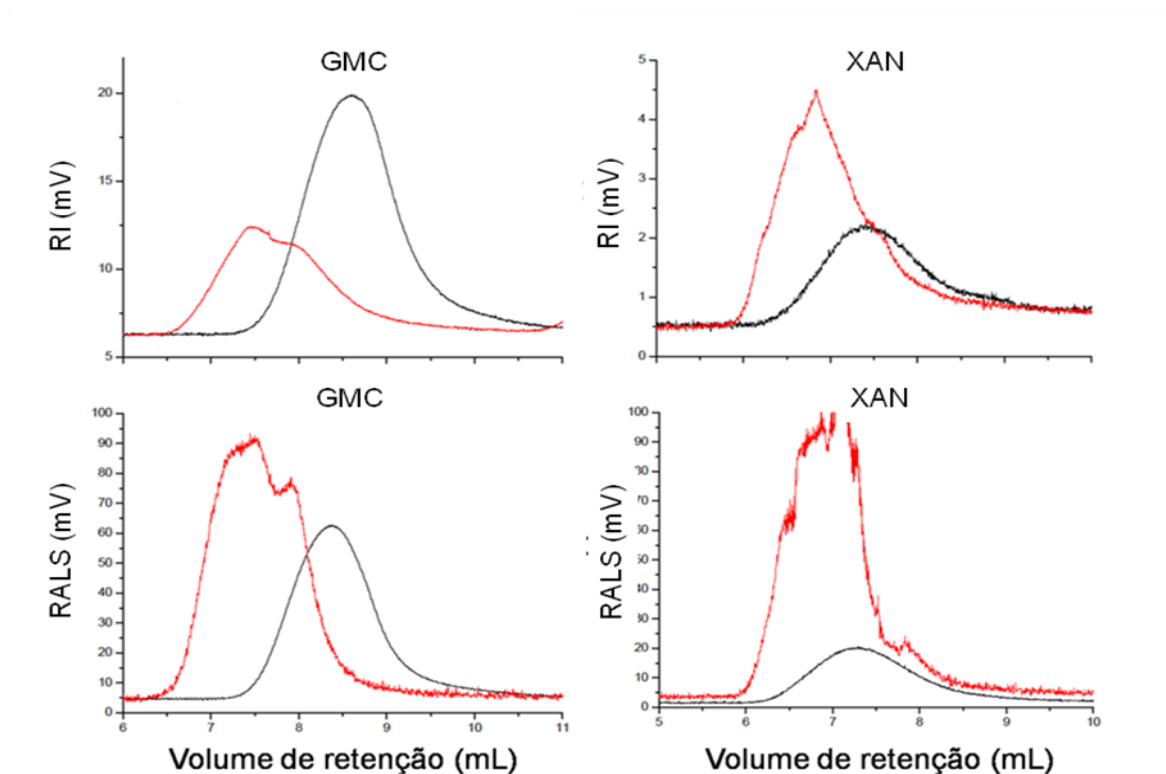


FIGURA 12 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS POLÍMEROS A 0,5 mg.mL⁻¹, ELUÍDOS A 0,4 mL.min⁻¹ COM NaNO₃ 0,1 mol.L⁻¹, 200 ppm DE AZIDA DE SÓDIO, A 40°C, ATRAVÉS DE COLUNA Shodex OHpak SB-806M HQ, DETECTADOS POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) E ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO A 90° (RALS). POLÍMEROS COMERCIAIS EM VERMELHO E PURIFICADOS EM PRETO.

FONTE: O autor (2013)

Os potenciais zeta, referente ao potencial no plano de cisalhamento dos colóides, de + 52,2 mV para o DDAB e de – 50,3 mV para a XAN, evidenciaram uma grande diferença de carga, sugerindo que ambos possam interagir por uma forte interação eletrostática. A carga negativa de – 14,2 mV da GMC, um polímero em princípio neutro, pode ser devido a proteínas ligadas, e que permaneceram contaminando o material mesmo após o processo de purificação e precipitação com álcool etílico, ou a adsorção de íons presentes em solução aquosa, bem como ao caráter ácido fraco dos grupos hidroxila do polissacarídeo (TABELA 1).

TABELA 1 – MASSA MOLAR MÉDIA-PONDERAL (M_w), RAIOS DE GIRO ($\langle S^2 \rangle^{1/2}$) E POTENCIAL ZETA (ζ) PARA AS AMOSTRAS DE POLÍMEROS E DDAB

Moléculas*	M_w (g.mol ⁻¹)	$\langle S^2 \rangle^{1/2}$ (nm)	Potencial ζ (mV)	Proteínas (%)
XAN	$1,03 \times 10^6$	69,2	- 50,3 (± 6)	0,83
GMC	$2,57 \times 10^5$	52,1	- 14,2 (± 13)	1,46
DDAB	630	-	+ 53,5 (± 10)	-

* Xan e GMC a 0,5 mg/mL em água ultra pura e DDAB a 5 mmol/L em água ultra pura.

FONTE: O autor (2013)

A relação molar manose:galactose observada para a galactomanana foi de 2:1 (FIGURA 13), sugerindo que durante o processo de purificação, frações pouco substituídas da cadeia de manose por galactose foram eliminadas, restando assim apenas as frações mais hidrossolúveis. O grau de substituição da cadeia de manose por galactose foi determinado por ¹H-RMN e em comparação com Ono (2004) houve uma pequena variação dos deslocamentos químicos de 5,02 ppm para 4,98 ppm e de 4,75 ppm para 4,71 ppm, para galactose e manose, respectivamente.

A espectrometria de infravermelho (FTIR) confirmou estruturas comuns a polissacarídeos. As largas bandas entre 800 e 1200 cm⁻¹ (FIGURA 14a) são típicas de carboidratos e se referem às ligações C – C e a ligações C – O de alcoóis. Outra banda larga está entre 2840 e 3000 cm⁻¹ (FIGURA 14d), referente à ligação C – H de alcanos. Bandas referentes à vibração entre o esqueleto de polissacarídeos e suas ramificações geralmente ficam entre 1300 e 1500 cm⁻¹ (FIGURA 14b). A maior diferença entre os polissacarídeos está em 1750 cm⁻¹ (FIGURA 14c) e refere-se à ligação C = O do grupamento ácido da XAN,

confirmando assim o seu caráter poliânionico (SILVERSTEIN, BASSLER e MORRIL, 1991).

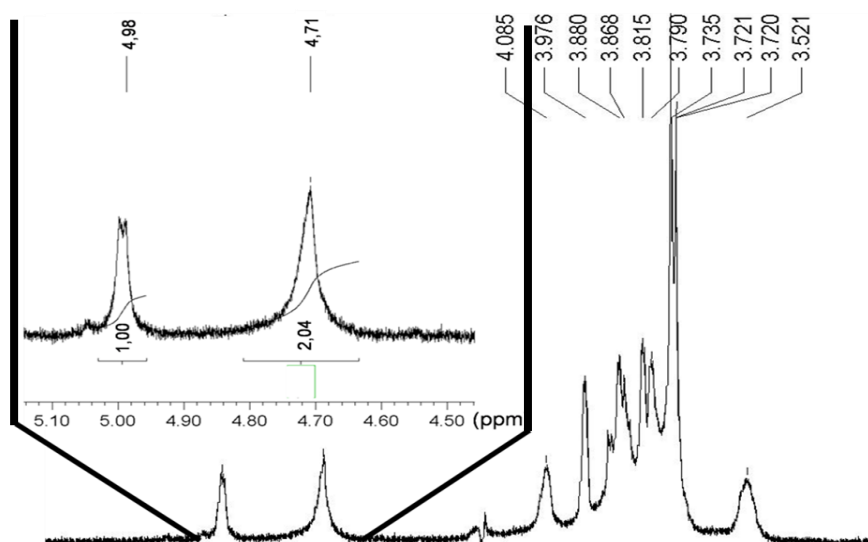


FIGURA 13 – ^1H -RMN DA GMC PURIFICADA, INSERTO COM A REGIÃO DOS CARBONOS ANOMÉRICOS DE MANOSE E GALACTOSE DA GALACTOMANANA DE ALFARROBA PURIFICADA, USANDO D_2O COMO SOLVENTE A 70°C

FONTE: O autor (2013)

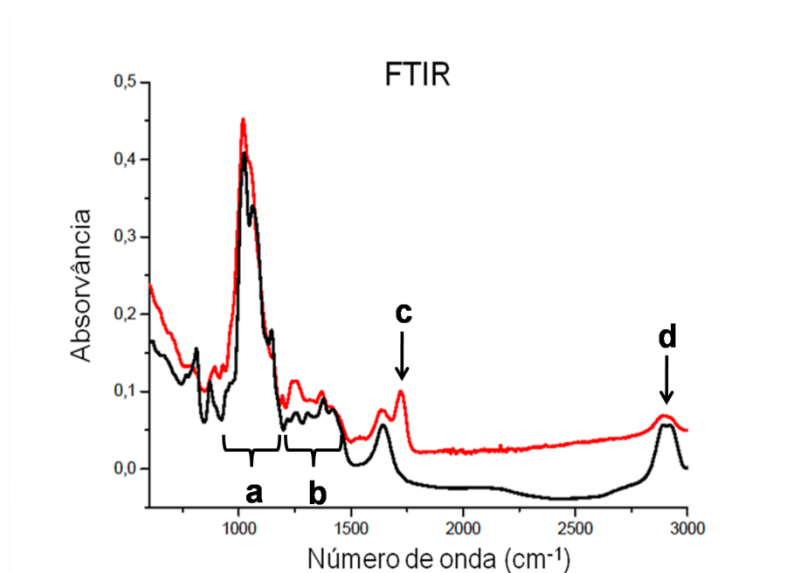


FIGURA 14 – FTIR DOS POLÍMEROS PURIFICADOS. a) VIBRAÇÃO DAS LIGAÇÕES C – C E C – O TÍPICAS DE POLISSACARÍDEOS. b) VIBRAÇÃO ENTRE ESQUELETO E RAMIFICAÇÕES DA CADEIA POLISSACARÍDICA. c) VIBRAÇÃO DA LIGAÇÃO ÁCIDA C = O. d) VIBRAÇÃO DAS LIGAÇÕES C – H DE ALCANOS. XANTANA EM VERMELHO E GALACTOMANANA EM PRETO

FONTE: O autor (2013)

5.1.2 Determinação da CAM dos polímeros

A determinação da concentração de agregação molecular (CAM) é importante para estabelecer a concentração apropriada de polímeros para o revestimento de lipossomas, assegurando que as cadeias dos polímeros estejam livres, ao invés de agregadas, formando revestimento fino e homogêneo, tornando o revestimento o mais reprodutível possível.

A CAM e a CMC podem ser consideradas como concentrações limiares para saturar a interface da gota com o ar (CHAKRABORTY, CHAKRABORTY e GHOSH, 2006), evidenciadas ao se atingir a tensão interfacial mínima. As moléculas de água expõem as cadeias poliméricas, ou de tensoativo, a fim de interagirem entre si formando o maior número possível de ligações de hidrogênio (COSGROVE, 2010). Desta forma as porções hidrofóbicas das moléculas de surfactante, ou de polímero, ocupam a superfície da gota a fim de interagirem com o ar, por ser menos polar. Quando toda a superfície da gota está repleta, e a tensão interfacial for a mínima, o aumento da concentração de polímero, ou de surfactante, gera a formação de agregados, criando domínios hidrofóbicos no seio da gota (BERG, 2010).

A CAM dos polímeros variou entre 1 e 10 mg.mL⁻¹, como observado na FIGURA 15 pelo valor mínimo de tensão interfacial e pelo aumento da razão banda III/I e da turbidimetria do sistema. Sugeriu-se a utilização de concentrações inferiores às de agregação molecular dos polímeros, e neste trabalho foram utilizadas concentrações de 0,5 mg.mL⁻¹ para o revestimento de lipossomas, a fim de evitar a presença de agregados intermoleculares entre as cadeias poliméricas.

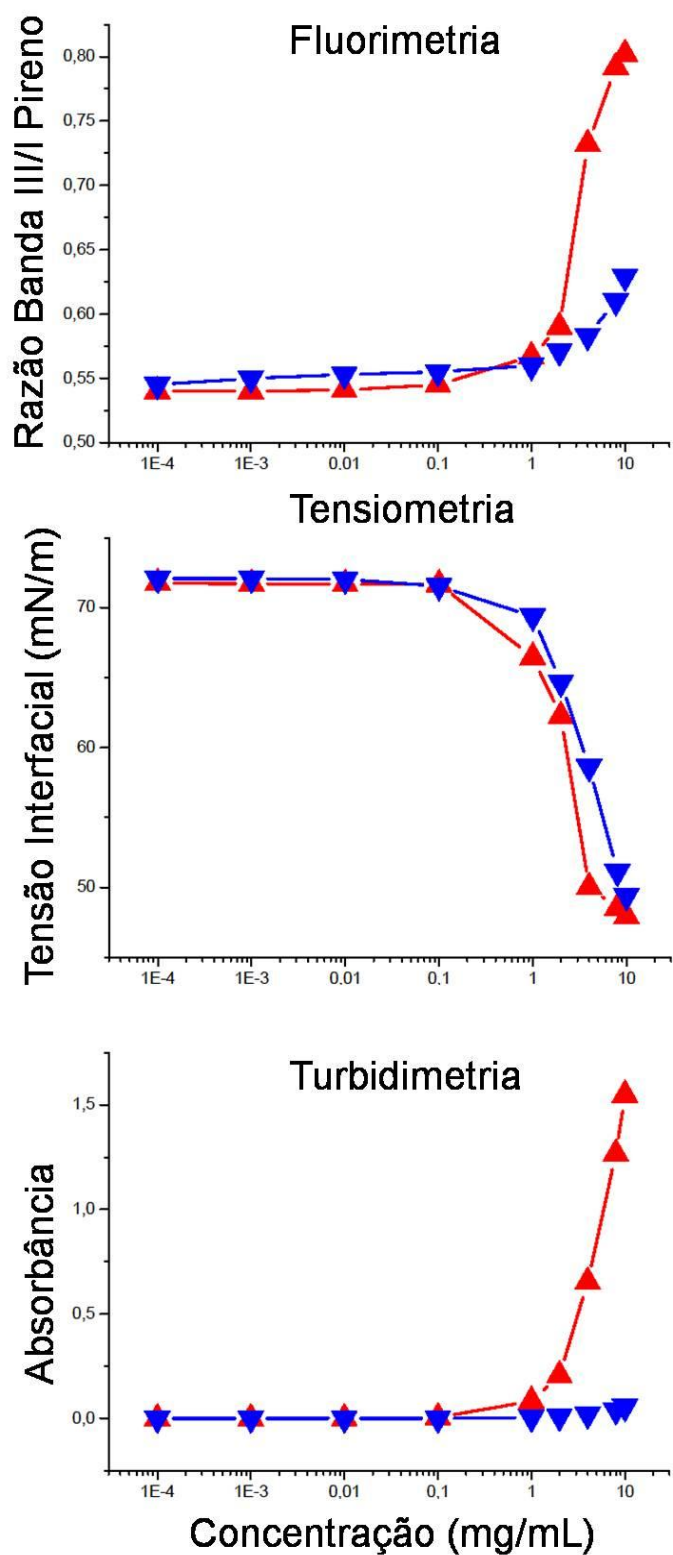


FIGURA 15 – DETERMINAÇÃO DA CAM PARA XAN (▲) E GMC (▼). EM ÁGUA ULTRA PURA. EXPERIMENTOS REALIZADOS A 25 °C. EM CONCENTRAÇÕES DOS POLÍMEROS DE 1×10^{-4} A 10 mg.mL^{-1} .
 FONTE: O autor (2013)

5.2 DETERMINAÇÃO DA CMC DO DDAB E INTERAÇÃO DDAB E XAN

As técnicas utilizadas para a determinação da CMC dos polímeros também foram utilizadas para determinar a CMC do tensoativo DDAB e para verificar a interação entre DDAB e XAN, uma vez que a XAN possui carga negativa mais pronunciada e, portanto, foi escolhida como a primeira camada para revestir os lipossomas catiônicos.

Correlacionando os dados das três técnicas para determinação da CMC (FIGURA 16), observou-se para o DDAB valores entre 0,1 e 3 mmol.L⁻¹. O valor da CMC do DDAB foi confirmada por titulação condutimétrica para encontrar em precisamente 1,43 mmol.L⁻¹ (FIGURA 17).

As três técnicas de determinação da CMC (FIGURA 16) mostraram uma redução significativa da CMC do DDAB na presença de XAN, indicando uma interação cooperativa positiva, como também encontrada por Mehta, Bhawna, Bhasin *et al.* (2008) e Mehta, Bhawna, Kaur *et al.* (2008).

O DDAB é capaz de formar agregados pela ligação de moléculas de surfactante com o esqueleto celulósico da XAN, ainda que a superfície da gota não esteja completamente saturada. Desta forma a interação hidrofóbica entre a cauda do tensoativo e a XAN, bem como as interações iônicas entre o tensoativo e a XAN, sobrepujam a repulsão Coulombiana das cabeças catiônicas do DDAB (CHAKRABORTY, CHAKRABORTY e GHOSH, 2006).

Para visualizar a formação de agregados, e testar a hipótese de uma interação entre DDAB e XAN, abaixo da CMC do DDAB, amostras com concentrações 10⁻⁶ mmol.L⁻¹ e 10⁻² mmol.L⁻¹ de DDAB, na presença de XAN a 0,5 mg.mL⁻¹, foram analisadas por AFM sobre silício. Como pode ser visto na FIGURA 18, várias micelas de DDAB se agregam sobre as cadeias de XAN, criando uma rede de agregação com 10⁻² mmol.L⁻¹ de DDAB, uma concentração em que não ocorreria agregação sem a presença de XAN.

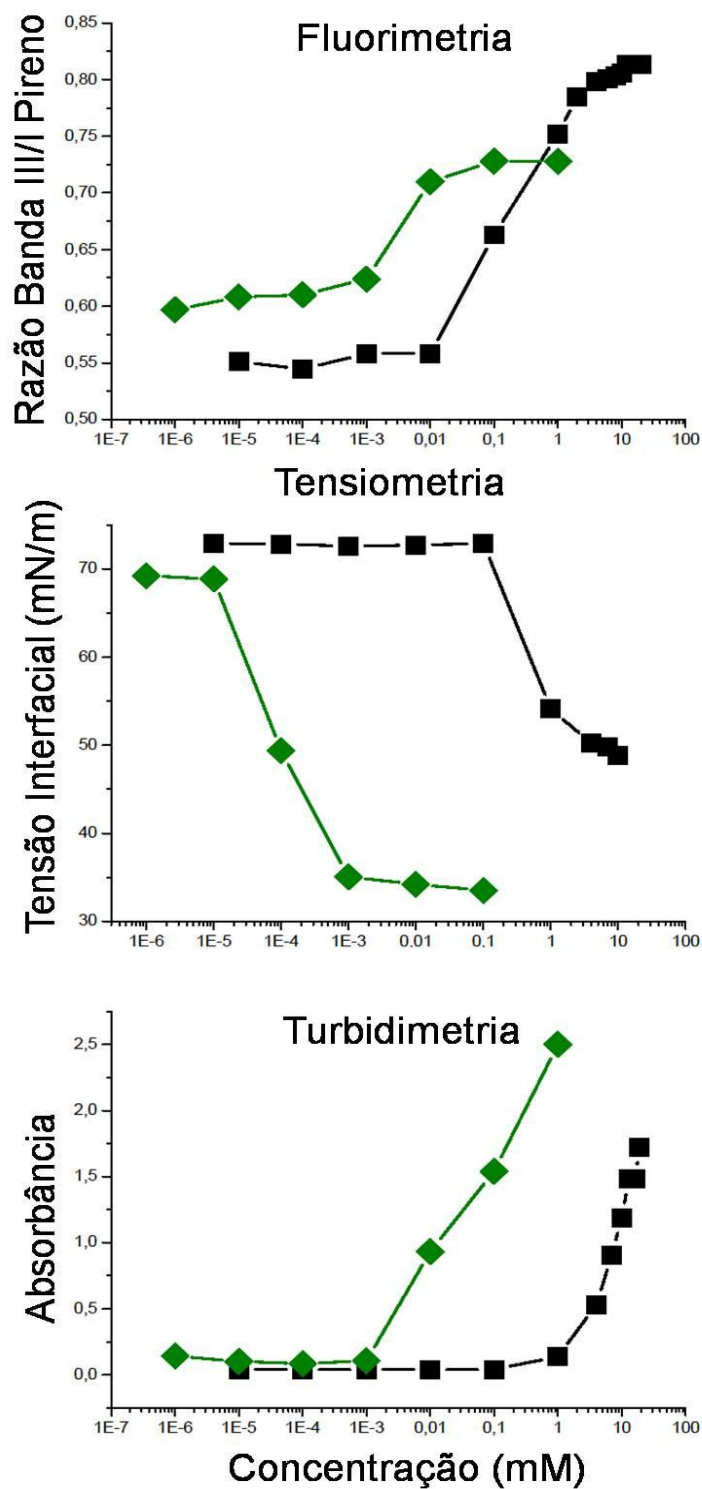


FIGURA 16 - DETERMINAÇÃO DA CMC PARA DDAB (■) E DDAB + XAN (◆). NOS EXPERIMENTOS DDAB + XAN A CONCENTRAÇÃO DE XANTANA FOI FIXADA EM 0,5 mg.mL⁻¹ EM ÁGUA. EXPERIMENTOS REALIZADOS A 25°C. CONCENTRAÇÕES DE DDAB DE 1 x 10⁻⁶ a 10 mmol.L⁻¹.

FONTE: O autor (2013)

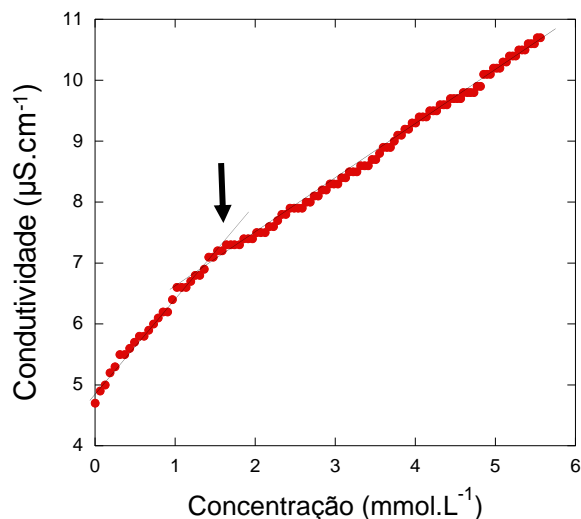


FIGURA 17 – DETERMINAÇÃO DA CMC DO DDAB POR TITULAÇÃO CONDUTIMÉTRICA EM ÁGUA ULTRA PURA À 25°C, EM CONCENTRAÇÕES DE 1×10^{-4} A 6 mmol.L^{-1} .
 FONTE: O autor (2013)

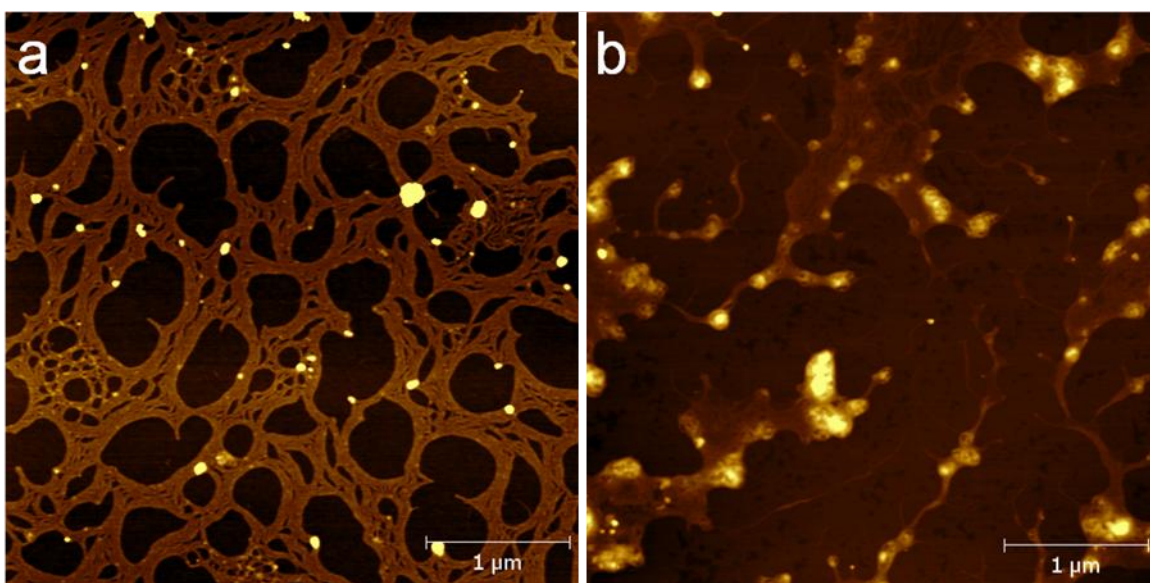


FIGURA 18 – IMAGEM TOPOGRÁFICA POR AFM SOBRE SILÍCIO DE (a) $10^{-6} \text{ mmol.L}^{-1}$ DDAB COM $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ XAN E (b) $10^{-2} \text{ mmol.L}^{-1}$ DDAB COM $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de XAN
 FONTE: O autor (2013)

A interação entre DDAB e XAN também foi evidenciada por microcalorimetria (μ -DSC), como pode ser visto na FIGURA 19, onde na presença de XAN a entalpia padrão de micelização (ΔH_{mic}^0) do DDAB, descrito por Brito e Marques (2005), em temperaturas de 40,67 e 40,35°C,

respectivamente para DDAB e DDAB em presença de xantana, no resfriamento, foi aumentado em 5 vezes (TABELA 2).

As curvas obtidas de aquecimento e resfriamento para DDAB, na presença ou não de XAN, apresentaram apenas as temperaturas referentes à vesículas unilamelares, descritas por Feitosa *et al.* (2012). Este autor cita que na concentração de 5 mM o perfil de DDAB é semelhante a 1 mM, e que há predominância de vesículas unilamelares.

O mesmo autor mostra que na concentração de 10 mM de DDAB, há a formação de vesículas multilamelares e que estas tendem a formar vesículas unilamelares com o passar do tempo, atingindo um platô após 16h. as 24h de repouso utilizadas neste trabalho antes da filtração podem então favorecer a predominância de vesículas unilamelares. Segundo Ono *et al.* (2005) soluções de DDAB até 3 mM apresentam a coexistência de micelas e vesículas unilamelares. Acima desta concentração encontra-se no sistema apenas vesículas unilamelares e multilamelares, estas dependentes da concentração.

Utilizando as informações dos experimentos de tensiometria e as análises por microcalorimetria, foi possível determinar a energia livre padrão de adsorção (ΔG_{ads}^0), a energia livre padrão de micelização (ΔG_{mic}^0), o excesso máximo superficial (Γ_{max}), a área mínima ocupada por uma molécula de tensoativo na interface (a_{min}), a entropia padrão de micelização (ΔS_{mic}^0) e a entropia translacional dos contra íons (ΔS_i^0), conforme TABELA 2.

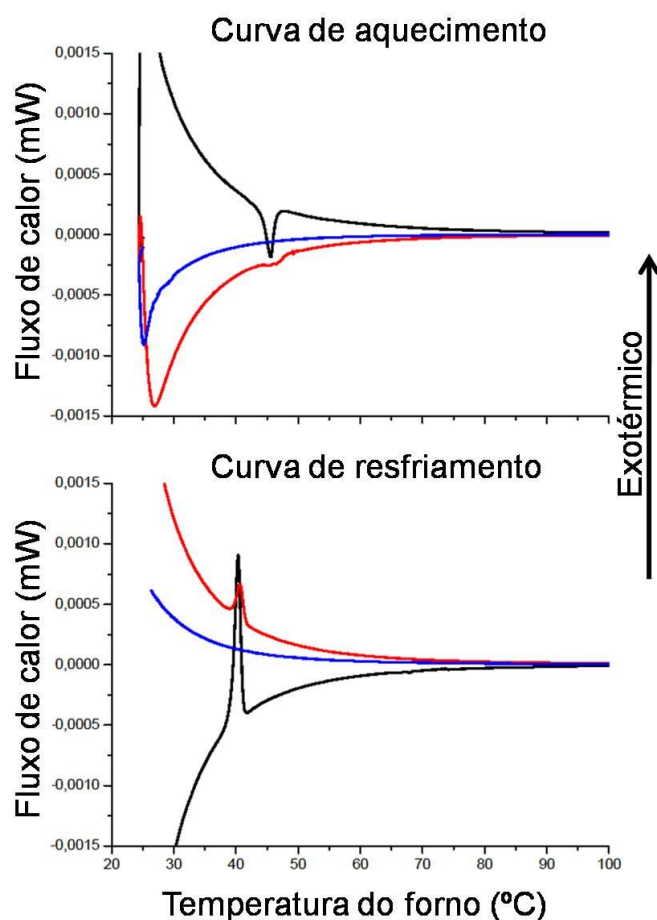


FIGURA 19 – ANÁLISE DE μ -DSC SOB ATMOSFERA DE N_2 A $0,2^\circ C \cdot min^{-1}$. DDAB $5 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ EM VERMELHO, XAN $0,5 \text{ mg} \cdot mL^{-1}$ EM AZUL E A MISTURA DE AMBOS, NAS MESMAS CONCENTRAÇÕES, EM PRETO. AMOSTRAS PREPARADAS EM $10 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ NaCl

FONTE: O autor (2013)

TABELA 2 – PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DETERMINADOS POR VARREDURA EM μ -DSC E CALCULADOS

Parâmetros Termodinâmicos	DDAB	DDAB + XAN
CMC ($\text{mol} \cdot L^{-1}$)	$1,43 \times 10^{-3}$	1×10^{-6}
ΔG_{mic}^0 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	- 16,1	- 32,0
ΔG_{ads}^0 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	- 38,8	- 32,2
Γ_{max} ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$)	$8,2 \times 10^{-7}$	$4,7 \times 10^{-3}$
a_{min} (nm^2)	2,0	$3,5 \times 10^{-4}$
ΔH_{mic}^0 ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	16,1	80,0
ΔS_{mic}^0 ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)	107	375
ΔS_{ξ}^0 ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)	-	268

FONTE: O autor (2013)

Interações entre surfactantes e polímeros de cargas opostas são consideradas como processos de troca iônica, onde contra íons condensados nas cadeias poliméricas são substituídos por moléculas de tensoativo (EHTEAZI, GOVENDER e STOLINK, 2000; KONOP e COLLY, 1999; WANG e TAM, 2002). Essa interação pode ser reforçada por agregação cooperativa entre as cadeias alquílicas dos surfactantes e as regiões hidrofóbicas dos polímeros (FUNDIN *et al.*, 1997; MATULIS, ROUZINA e BLOOMFIELD, 2000).

A interação eletrostática é então dirigida pela entropia e contrária à entalpia, controlada pelo espaçamento linear das cargas na cadeia polimérica (EHTEAZI, GOVENDER e STOLINK, 2000; MATULIS, ROUZINA e BLOOMFIELD, 2000; WANG e TAM, 2002). O aumento da entropia é relacionado à ruptura das ligações do solvente para a formação das micelas, como descrito por Wang *et al.* (2003). O aumento da entalpia de micelização (ΔH_{mic}^0) na presença de XAN, de 16 kJ.mol⁻¹ para 80 kJ.mol⁻¹, pode ser facilmente compensado então pelo aumento da entropia de micelização (ΔS_{mic}^0) na presença da mesma, de 107 para 375 J.mol⁻¹K⁻¹ (TABELA 2).

A energia livre padrão de adsorção (ΔG_{ads}^0) mais negativa que a energia livre padrão de micelização (ΔG_{mic}^0), para o DDAB (TABELA 2), revelam que a adsorção na interface é mais espontânea do que a micelização. Contudo, na presença de XAN, a micelização (- 32,0 kJ.mol⁻¹) torna-se praticamente tão espontânea quanto a adsorção interfacial (- 32,2 kJ.mol⁻¹), comprovando que a interação entre DDAB e XAN favorece a formação de agregados abaixo da CMC do DDAB.

A área mínima ocupada por uma molécula de surfactante na interface (a_{min}) encontrada para DDAB foi igual ao encontrado por Kondo *et al.* (1993). Sua redução na presença de XAN, em conjunto com o aumento do excesso superficial máximo na interface solução/ar (Γ_{max}), podem confirmar a formação de agregados, uma vez que moléculas de surfactante deixarão a interface para formá-los, exigindo uma maior quantidade de moléculas para ocorrer a saturação da interface.

Tensoativos catiônicos, como o DDAB, possuem uma repulsão Coulumbiana entre suas cabeças polares de mesma carga. Para que ocorra a

formação de micelas, contra-íons da solução adsorvem-se à superfície da micela. À medida que os contra íons ligam-se às micelas, sua entropia translacional é perdida, o que é termodinamicamente desfavorável (TABELA 2). No caso da formação de micelas na presença de polímeros, as moléculas de surfactante adsorvem-se às cadeias poliméricas com espaçamento linear entre si, reduzindo a repulsão Coulumbiana e necessitando de uma menor quantidade de contra-íons para a estabilização, de forma que contra-íons preservam sua entropia translacional. Portanto, a entropia da micelização é aumentada (WANG *et al.*, 2003), e o processo é favorável, como demonstrado pelo ΔS_{mic}^0 mais negativo (TABELA 2).

A microbalança de cristal de quartzo (QCM) foi utilizada para comprovar a interação entre DDAB e XAN, e posteriormente com GMC, para que o LbL pudesse ser estruturado e mantido.

Uma vez que os lipossomas seriam o molde para revestimento, o cristal de ouro deveria ser revestido com DDAB. Para garantir o revestimento apropriado, o cristal foi revestido com hexanotiol primeiro, a fim de interagir o grupamento tiol com o ouro, através de uma ligação semi-covalente, e deixar a cadeia alquílica exposta na interface com o meio líquido para interagir com as cadeias apolares do DDAB, deixando a cabeça polar do tensoativo mais na interface para interagir com as cadeias do poliânion, XAN. Um esquema desse processo está representado na FIGURA 20 a seguir.

A topografia do cristal foi analisada por AFM (FIGURA 21) e o ângulo de contato (TABELA 3) formado pela água ultra pura com as superfícies foram determinados em cada camada depositada.

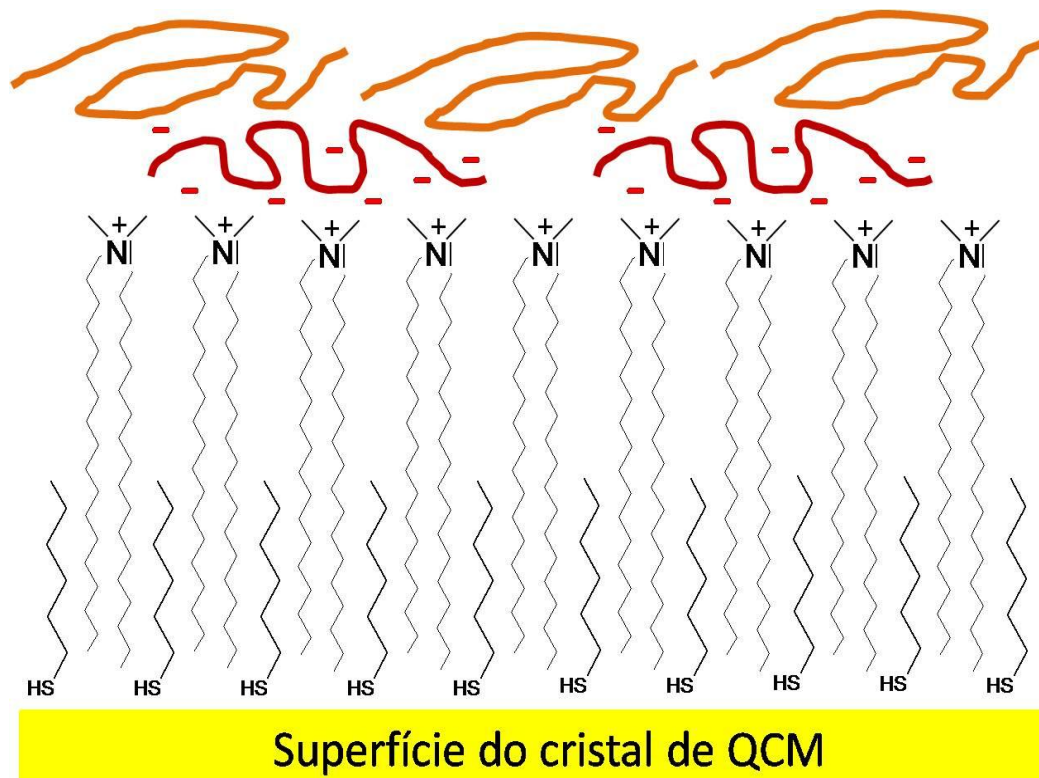


FIGURA 20 – ESQUEMA DA ESTRUTURA DE LBL SOBRE O CRISTAL DE QCM. AS CAMADAS SÃO OURO, HEXANOTIOL, DDAB, XAN E GMC, DE BAIXO PARA CIMA
 FONTE: O autor (2013)

Os dados de QCM mostram adsorção de ambos os polímeros (TABELA 3), sendo maior a de GMC pela maior variação de frequência. Isso pode ser compreendido, visto que o revestimento com XAN é mais irregular, como evidenciado pela maior RMS por AFM (TABELA 3). Uma vez que foi utilizado aquecimento da xantana para sua solubilização, possivelmente esta formou a estrutura de dupla hélice com o comprimento de persistência (L_p) de até 125 nm segundo Chazeau (1995), dificultando um revestimento conciso e deixando poros que são então preenchidos por GMC, uma vez que esta possui um L_p de 9 nm, de acordo com Morris *et al.* (2008). A GMC além de interagir com XAN pode também interagir eletrostaticamente com DDAB, devido à sua carga negativa (TABELA 1).

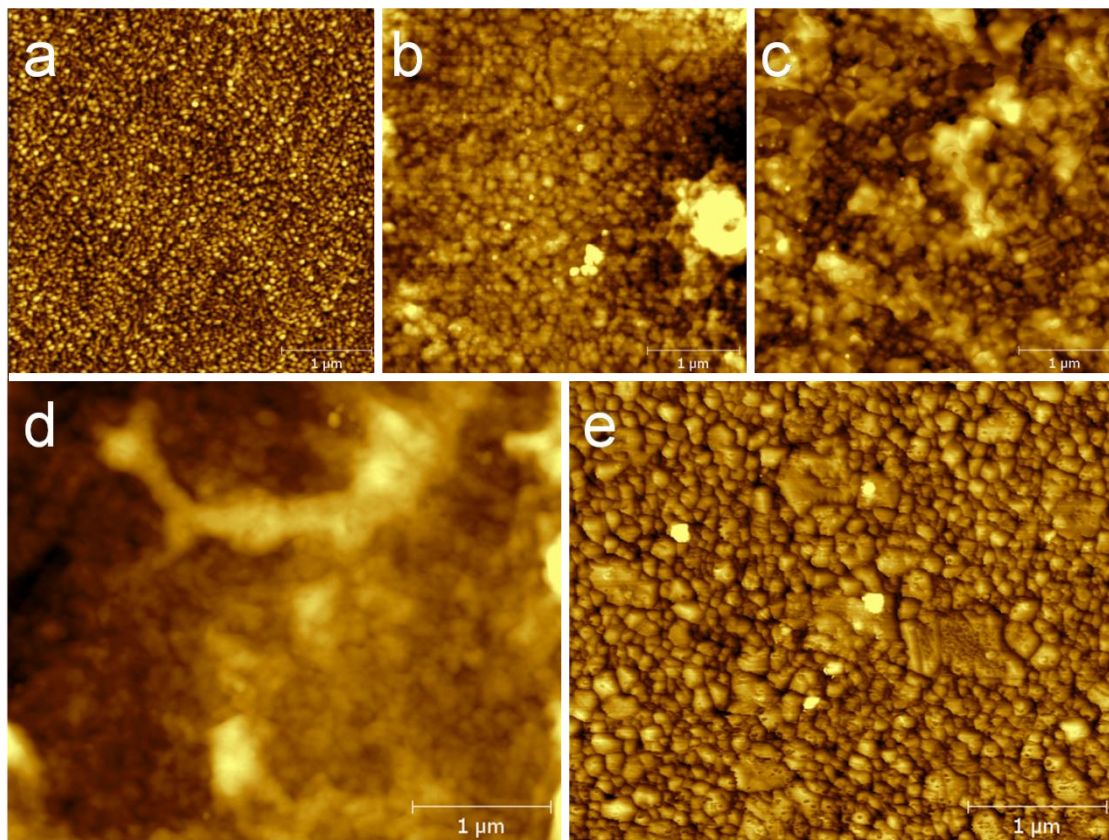


FIGURA 21 – IMAGEM TOPOGRÁFICA POR AFM DE LBL SOBRE CRISTAL DE QCM. a) SUPERFÍCIE DE OURO; b) HEXANOTIOL; c) DDAB; d) XAN; e) GMC
FONTE: O autor (2013)

Na FIGURA 21a pode-se observar que o cristal de QCM apresenta uma superfície extremamente homogênea, e pouco rugosa (TABELA 3). Após o revestimento com hexanotiol (FIGURA 21b), a rugosidade do cristal foi praticamente dobrada. O DDAB aumentou pouco a rugosidade, em relação ao hexanotiol, contudo pode-se visualizar um relevo mais acidentado (FIGURA 21c), sobre o qual a XAN (FIGURA 21d) foi depositada formando uma superfície mais irregular e rugosa. Devido ao seu comprimento de persistência, à interação natural com a XAN e à sua carga negativa, a GMC (FIGURA 21e) foi capaz de formar um revestimento mais homogêneo.

TABELA 3 – ADSORÇÃO SOBRE CRISTAL DE QCM DE OURO. Δf MEDIDO POR QCM, RMS POR AFM E ÂNGULO DE CONTATO DETERMINADO POR GOTTA SÉSSIL DE ÁGUA ULTRA PURA

Superfície	QCM	AFM	Ângulo de contato
	- Δf	RMS (nm)	°
Ouro	-	2,6	73 (\pm 1)
Ouro + Hexanotiol	-	5,0	98 (\pm 1)
Ouro + Hexanotiol + DDAB	0	6,1	62 (\pm 2)
Ouro + Hexanotiol + DDAB + XAN	95,7 (\pm 17,5)	20,0	66 (\pm 1)
Ouro + Hexanotiol + DDAB + XAN + GMC	165,0 (\pm 49,5)	11,6	77 (\pm 1)

- Δf = variação de frequência; RMS= Rugosidade media da superfície.

FONTE: O autor (2013)

As análises de ângulo de contato confirmam o revestimento de todas as camadas (TABELA 3). O hexanotiol tornou a superfície mais apolar e o DDAB a mais polar, concordando com seu potencial zeta. A camada de XAN aumentou um pouco o ângulo de contato, em relação ao DDAB, indicando uma superfície um pouco menos polar, como esperado, e a camada de GMC aumentou o ângulo de contato.

Através da EQUAÇÃO 1 foi possível correlacionar a variação de frequência do cristal de QCM com a massa adsorvida de polímero, contudo esta equação é aplicável apenas a polímeros rígidos, e sua utilização neste caso acarretaria um erro. Entretanto, a partir de $-\Delta f$ pode-se observar que houve uma adsorção polimérica mais pronunciada nas primeiras camadas, e uma queda na adsorção de polímeros à medida que o LbL foi estruturado (FIGURA 22a). Compreensivelmente, visto que a interação eletrostática é maior do que as outras interações, e que a carga positiva superficial dos lipossomas foi responsável pela grande adsorção polimérica inicial (camadas 1 e 2), à medida que esta foi sendo diminuída, cada vez menos polímeros foram adsorvidos. Embora a massa adsorvida tenha diminuído, a adsorção foi o suficiente para alterar o potencial zeta das nanopartículas (FIGURA 22b).

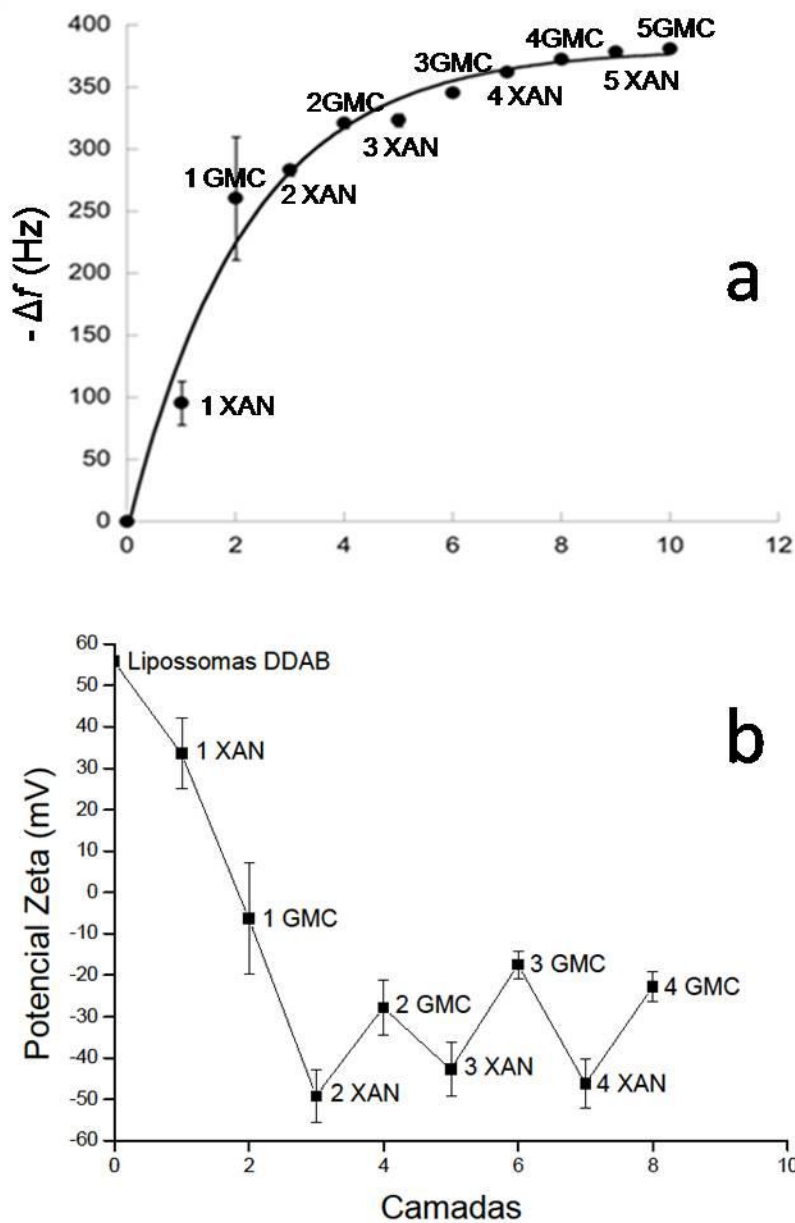


FIGURA 22 – a) DETERMINAÇÃO DA VARIAÇÃO DE FREQUÊNCIA ($N = 3$) POR QCM DE LBL. b) MÉDIA DO POTENCIAL ZETA DE LIPOSSOMAS REVESTIDOS POR LBL A CADA CAMADA. BARRAS INDICAM DESVIO PADRÃO
 FONTE: O autor (2013)

Por análise de potencial zeta das nanopartículas revestidas, foi confirmada a estruturação eficiente de LbL até 8 camadas (FIGURA 22b). A primeira camada de XAN foi capaz de reduzir o potencial ζ de + 55 mV dos lipossomas de DDAB para + 35 mV, reflexo de um revestimento incompleto, uma vez que esta técnica mede a carga superficial da partícula no seu plano de

cisalhamento; a carga positiva remanescente se deve à exposição de cargas de moléculas de DDAB não revestidas. Todavia, a primeira camada de GMC foi eficiente em blindar toda carga superficial do lipossoma, conferindo às nanopartículas um potencial ligeiramente negativo (-4 mV).

A segunda camada de XAN foi então eficiente em reduzir o potencial ζ das nanopartículas para -50 mV, relativos aos valores obtidos para a xantana. O potencial ζ das nanopartículas variou então entre -10 mV e -50 mV com os revestimentos subsequentes.

5.3 NANOPARTÍCULAS

Tendo em vista que apenas a primeira camada de cada polímero teve adsorção expressiva, as nanopartículas foram limitadas a apenas uma camada de cada. O revestimento com XAN dos lipossomas resultou no aumento do diâmetro hidrodinâmico (D_h) de $62 (\pm 9)$ nm para $132 (\pm 22)$ nm (FIGURA 23), enquanto o revestimento destes com XAN e GMC gerou nanopartículas com $165 (\pm 15)$ nm. Embora o revestimento com XAN tenha apresentado uma menor variação de frequência no QCM e uma menor variação do potencial ζ das nanopartículas, este apresentou maior contribuição ao diâmetro hidrodinâmico que a GMC. Novamente, isso pode ser explicado pelo menor L_p da GMC, uma vez que grande parte desta foi adsorvida nos poros deixados por XAN. As nanopartículas podem ser vistas na FIGURA 24.

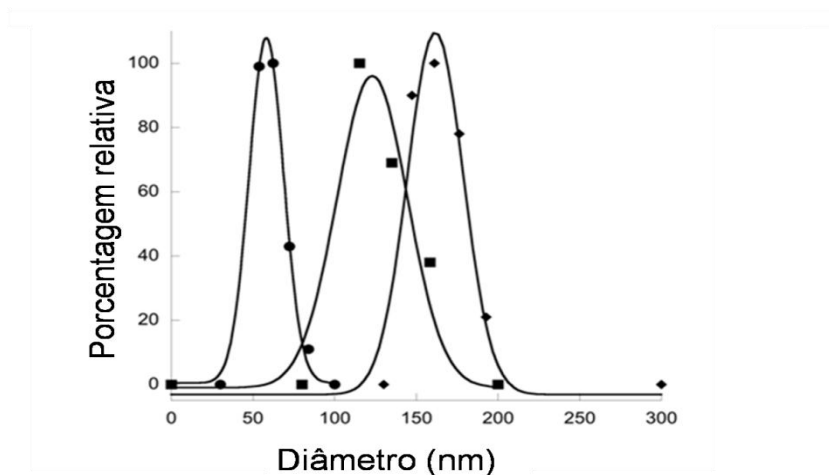


FIGURA 23 – DISTRIBUIÇÃO GAUSSIANA DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO (D_h) DOS LIPOSSOMAS (●) E DAS NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS COM XAN (■) E NANOPARTÍCULAS REVESTIDAS COM XAN + GMC (◆), EM ÁGUA ULTRA PURA, A 25°C.

FONTE: O autor (2013)

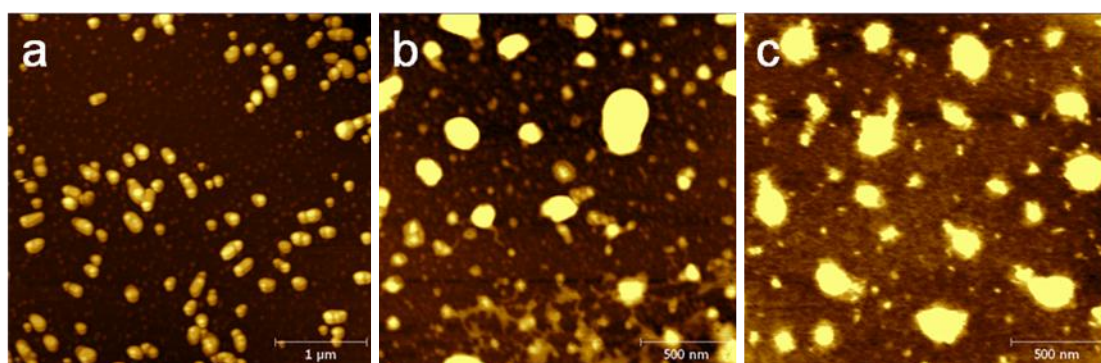


FIGURA 24 – MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DOS LIPOSSOMAS SEM REVESTIMENTO (a); REVESTIDOS COM XANTANA (b); REVESTIDOS COM XANTANA E GALACTOMANANA (c), DEPOSITADOS SOBRE SILÍCIO.

FONTE: O autor (2013)

5.4 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO E CINÉTICA DE LIBERAÇÃO

O EGF purificado para este trabalho apresentou concentração de 55 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, equivalente à albumina, e a partir desta concentração foi diluído para teste de limites de quantificação e detecção, 0,55 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 5,5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, com R^2 igual a 0,992.

A eficiência de incorporação do EGF foi determinada em 72 (± 3) % pelo método direto e 67 (± 5) % pelo método indireto, superior a 58 % encontrada

por Deđim *et al.* (2011) e a 18 % encontrada por Li *et al.* (2003). Determinada por CLAE de forma direta e indireta (FIGURA 25), resultando na concentração final de $3,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ nas nanopartículas revestidas.

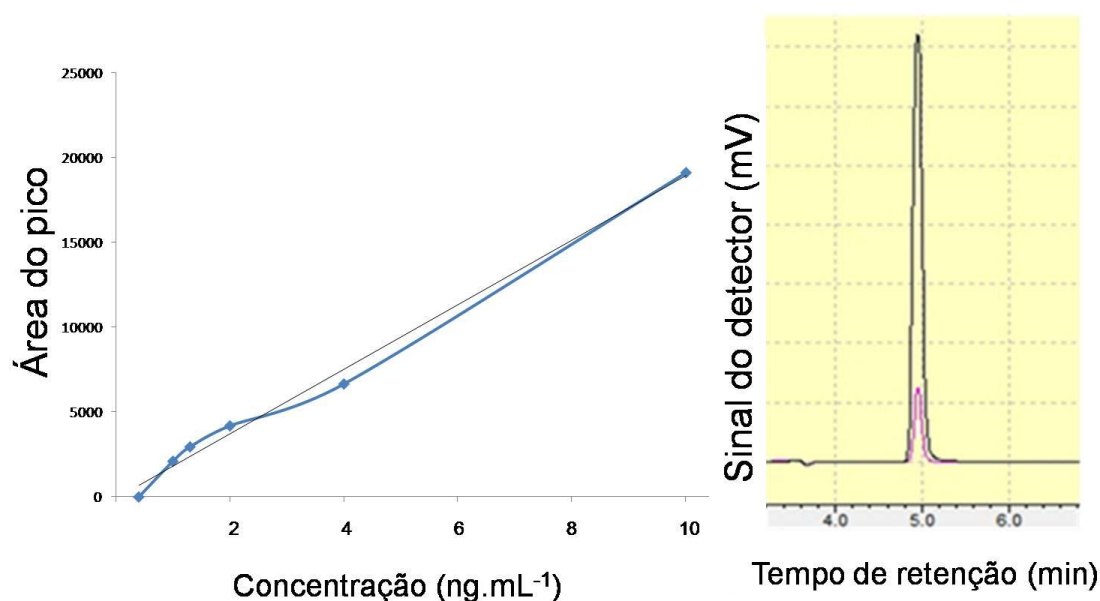


FIGURA 25 - (a) CURVA PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE EGF POR CLAE. (b) DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE EGF POR CLAE. EM PRETO AS MOLÉCULAS ENCAPSULADAS E EM ROSA AS NÃO ENCAPSULADAS

FONTE: O autor (2013)

Tanto XAN quanto GMC tiveram participação na alteração do perfil de liberação das nanopartículas, como visto na FIGURA 26. Os dados foram tratados para apresentar uma linha de tendência (BERG, 2010) com a equação de cinética de primeira ordem (EQUAÇÃO 10). O modelo serviu todas as retas com R acima de 0,99.

$$\text{Liberação EGF (\%)} = \text{Liberação EGF \%} [1 - \exp(-kt)] \quad \text{EQUAÇÃO 12}$$

Lipossomas sem revestimento apresentaram uma taxa de liberação de $5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, lipossomas revestidos apenas com XAN apresentaram uma taxa de liberação 3 vezes maior, $1,6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, e os lipossomas revestidos com XAN e GMC apresentaram uma taxa de liberação 10 vezes mais sustentada do que lipossomas sem revestimento, com taxa de $4,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Possivelmente o mecanismo de liberação de EGF seja a difusão deste através do lipossoma e

do revestimento polimérico, uma vez que a liberação foi gradativa e não apresentou liberações abruptas, atribuíveis à erosão da nanopartícula e extravasamento do seu conteúdo.

A liberação sustentada de EGF permite que este atue constantemente no sítio da injúria estimulando a síntese de DNA pelas células e, conseqüentemente, acelerando o processo de cicatrização.

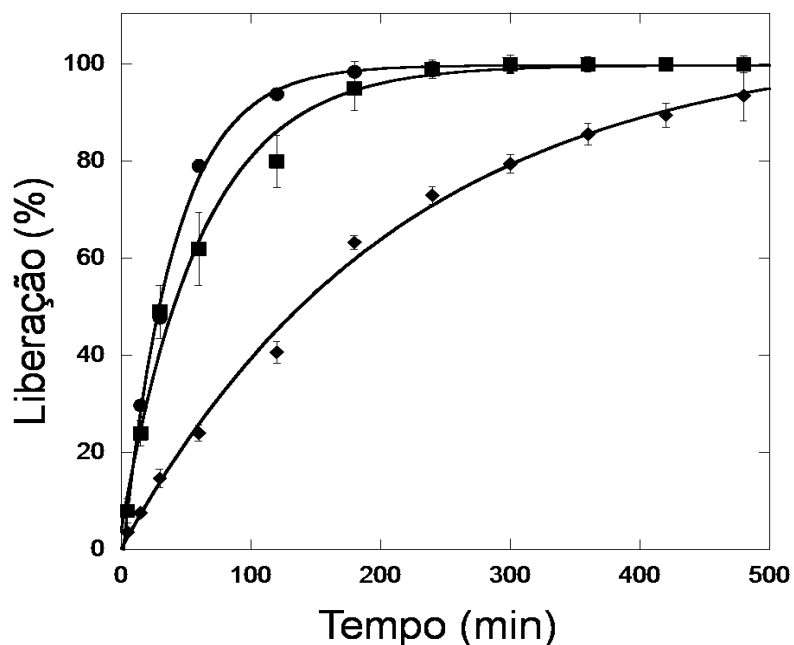


FIGURA 26 – TENDÊNCIA DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE EGF A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS ($N = 3$) TRATADAS COMO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM. LIPOSSOMAS SEM REVESTIMENTO (●), REVESTIDOS COM XAN (■) E REVESTIDOS COM XAN + GMC (◆).
FONTE: O autor (2013)

6. CONCLUSÕES

Os polímeros xantana e galactomanana purificados foram caracterizados por cromatografia de exclusão por tamanho, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear, revelando um maior grau de substituição para a galactomanana purificada que o usual para goma de alfarroba.

A interação entre o DDAB e a XAN foi caracterizada pela redução da CMC do DDAB em presença de XAN através de tensiometria, turbidimetria e fluorimetria com sonda de pireno. Também foi evidenciada pelo aumento da entalpia de micelização por avaliada por μ -DSC, e pelos parâmetros termodinâmicos calculados. A aproximação entre a energia livre padrão de micelização e a energia livre padrão de adsorção indica, o aumento do excesso superficial do tensoativo, a redução da área mínima ocupada por uma molécula de tensoativo na interface, o aumento da entropia de micelização e o ganho de entropia translacional comprovam a maior espontaneidade da micelização na presença de XAN.

Foram desenvolvidos lipossomas catiônicos revestidos com XAN e GMC pela técnica de *layer-by-layer* (LbL), caracterizados por DLS, AFM e Potencial ζ . O revestimento LbL foi caracterizado por AFM, até 10 camadas por QCM, e até 8 camadas por Potencial ζ . O EGF foi encapsulado com eficiência de 72% e sua cinética de liberação *in vitro* a partir das nanopartículas foi determinada por CLAE.

As nanopartículas formadas foram capazes de sustentar a liberação 10 vezes mais do que os lipossomas sem revestimento, com apenas uma camada de cada polímero. O uso de polissacarídeos naturais em sistemas nanométricos tridimensionais de liberação sustentada oferece biocompatibilidade, obtenção fácil e abundante com baixos custos.

REFERÊNCIAS

- Ai, H., Jones, S. A., De Villiers, M. M. e Lvov, Y. M. Nano-encapsulation of furosemide microcrystal for controlled release. Journal of Controlled Release, v.86, p.59–68. 2003.
- Alves, J. B., Ferreira, C. L., Martins, A. F., Silva, G. A. B., Alves, G. D., Paulino, T. P., Ciancaglini, P., Thedei, G. J. e Napimoga, M. H. Local delivery of EGF–liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression. Life Sciences, v.85, p.693-699. 2009.
- Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P. e Nurden, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v.91, p.4–15. 2004.
- Balnois, E. e Wilkinson, K. J. Sample preparation techniques for the observation of environmental biopolymers by atomic force microscopy. Colloids and Surfaces A, v.207, p.229–242. 2002.
- Barradon, Y. e Green, H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor- α and β epidermal growth factor. Cell, v.50, n.7, p.1131-7. 1987.
- Berg, J. C. An introduction to interfaces and colloids the bridge to nanoscience: World Scientific. 2010.
- Bernardes Filho, R. e Mattoso, L. H. C. Estudo de polímeros por microscopia de força atômica. Embrapa Instrumentação Agropecuária. São Carlos, 2003.
- Berne, B. J. e Pecora, R. Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics. New York. 2000
- Biswas, J., Mishra, S. K., Kondaiah, P. e Bhattacharya, S. Syntheses, transfection efficacy and cell toxicity properties of novel cholesterol-based gemini lipids having hydroxyethyl head group. Organic & Biomolecular Chemistry, v.9, n.12, p.4600-4613. 2011.
- Bresolin, T. M. B., Milas, M., Rinaudo, M., Reicher, F. e Ganter, J. L. M. S. Role of galactomannan composition on the binary gel formation with xanthan. International Journal of Biological Macromolecules, v. 26, p. 225-231. 1999.
- Brown, G., Nanney, L. e Griffen, J. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. N Eng J Med, v.321, p.76-80. 1989.
- Brynda, E. e Houska, M. Multiple alternating molecular layers of albumin and heparin on solid surfaces. Journal Of Colloid And Interface Science, v.183, p.18-25. 1996.

Cairns, P., Miles, M. J. e Morris, V. J. Intermolecular binding of xanthan and carob gum. Nature, v.322, p.89–90. 1986.

Cairns, P., Miles, M. J., Morris, V. J. e Brownsey, G. J. X-ray fiber diffraction studies of synergistic, binary polysaccharide gels. Carbohydrate Research, v.160, p.411–423. 1987.

Carpenter, G. e Cohen, S. Epidermal growth factor J Biol Chem v.265, p. 7709-12. 1990.

Carpenter, G., King, L. e Cohen, S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. Nature v.276 p.409-10. 1978.

Celej, M. S., Dassie, S. A., González, M., Bianconi, M. L. e Fidelio, G. D. Differential scanning calorimetry as a tool to estimate binding parameters in multiligand binding proteins. Analytical Biochemistry, v.350, p.277–284. 2006.

Cerqueira, M. A., Pinheiro, A. C., Souza, B. W. S., Lima, Á. M. P., Ribeiro, C., Miranda, C., Teixeira, J. A., Moreira, R. A., Coimbra, M. A., Gonçalves, M. P. e Vicente, A. A. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. Carbohydrate Polymers, v.75, p.408-414. 2009.

Chaize, B. e Fournier, D. Sorting out molecules reacting with acetylcholinesterase by enzyme encapsulation in liposome. Biosensors & Bioelectronics, v.20, n.3, Oct 15, p.628-632. 2004.

Chakraborty, T., Chakraborty, I. e Ghosh, S. Sodium carboxymethylcellulose-tab interaction: a detailed thermodynamic study of polymer-surfactant interaction with opposite charges. Langmuir, p.9905-9913. 2006.

Chandy, T. e Sharma, C. P. Effect of liposome-albumin coatings on ferric ion retention and release from chitosan beads. Biomaterials, v.17, p.61-66. 1996.

Chazeau, L., Milas, M. e Rinaudo, M. Conformations of xanthan in solution: analysis by steric exclusion chromatography. International Journal of Polymer Analysis and Characterization, v. 2, p. 21-29. 1995.

Cheetham, N. W. N. e Mashimba, E. N. M. Conformational aspects of xanthan–galactomannan gelatin. Carbohydrate Polymers, v.9, p.195–212. 1988.

Cheetham, N. W. N. e Mashimba, E. N. M. Conformational aspects of xanthan–galactomannan gelatin: Further evidence from optical-rotation studies. Carbohydrate Polymers, v.14, p.17–27. 1991.

Chen, D., Cole, D. L. e Srivatsa, G. S. Determination of free and encapsulated oligonucleotides in liposome formulated drug product. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.22, p.791-801. 2000.

Chen, X. A., Wang, X. H., Wang, Y. S., Yang, L., Hu, J., Xiao, W. J., Fu, A., Cai, L. L., Li, X., Ye, X., Liu, Y. L., Wu, W. S., Shao, X. M., Mao, Y. Q., Wei, Y. Q. e Chen, L. J. Improved tumor-targeting drug delivery and therapeutic efficacy by cationic liposome modified with truncated bFGF peptide. Journal of Controlled Release, v.145, n.1, Jul 1, p.17-25. 2010.

Chu, Benjamin. Laser light scattering: basic principles and practice. Dover Publications. New York. 2007.

Clark, R. A. F. e Henson, P. M. Molecular and cellular biology of wound repair: Plenum. 1996. 51-93 p.

Clayton, A. H. A., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E. C. e Burgess, A. W. Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-a multidimensional microscopy analysis. The Journal Of Biological Chemistry, v.280, n.34, p.30392–30399. 2005.

Cohen, S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eye-lid opening in the new-born animal. J Biol Chem n.237, p.1555-1562. 1962.

Cosgrove, T. Colloid science: principles, methods and applications. Bristol. 2010.

Dalençon, F., Rosilio, V., Puisieux, F., Baszkin, A. e Wautier, J.-L. Liposomes bearing platelet proteins: a model for surface functions studies. Biochimica et Biophysica Acta, v.1302, p.241-248. 1996.

De Villiers, M. M., Otto, D. P., Strydom, S. J. e Lvov, Y. M. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. Advanced Drug Delivery Reviews. 2011.

Dea, I. C. M., Morris, E. R., Rees, D. A., Welsh, E. J., Barnes, H. A. e Price, J. Associations of like and unlike polysaccharides: mechanism and specificity in galactomannans, interacting bacterial polysaccharides, and related systems. Carbohydrate Research, v.57, p.249–272. 1977.

Dea, I. C. M. e Morrison, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, v.32, p.241–312. 1975.

Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. SCIENCE, v.277, p.1232-1237. 1997.

Değim, Z., Çelebi, N., Alemdaroğlu, C., Deveci, M., Öztürk, S. e Özoğul, C. Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing. International Wound Journal, p.1-12. 2011.

Derjaguin, B., e Landau, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. Acta Physico Chemica URSS, v. 14, p. 633. 1941.

Disalvo, E. A. e Bouchet, A. M. Electrophoretic mobility and zeta potential of liposomes due to arginine and polyarginine adsorption. Colloids and Surfaces A. 2012.

Dixon, M. C. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring: enabling real-time characterization of biological materials and their interactions. Journal of biomolecular techniques, v. 19, p.151-158.

Domenici, F., Castellano, C., Dell'unto, F. e Congiu, A. Temperature-dependent structural changes on DDAB surfactant assemblies evidenced by energy dispersive X-ray diffraction and dynamic light scattering. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2012.

Drulis-Kawa, Z. e Dorotkiewicz-Jach, A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. International Journal of Pharmaceutics, v.387, p.187–198. 2010.

Ehtezazi, T., Govender, T. e Stolink, S. Hydrogen bonding and electrostatic interaction contributions to the interaction of a cationic drug with polyaspartic acid. Pharmaceutical Research, v.17, p.871. 2000.

Eppley, B. L., Woodell, J. E. e Higgins, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: Implications for wound healing. Plastic and Reconstructive Surgery, v.114, n.6, Nov, p.1502-1508. 2004.

Feitosa, E., Adati, R. D., Hansson, P. e Malmsten, M. 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.

Fernandes, M. C. S., Paulin Filho, P. I. e Morelli, M. R. Análise da superfície de grês porcelanato por microscopia de força atômica. Cerâmica, v.57, p.173-179. 2011.

Fonseca, M. J., Alsina, M. A. e Reig, F. Coating liposomes with collagen(Mr 50 000) increases uptake into liver. Biochimica et Biophysica Acta, v.1279, p.259-265. 1996.

Franklin, J. e Lynch, J. Effects of topical applications of epidermal growth factor on wound healing. Plast Reconstr Surg, v.64, p.766-70. 1979.

Frew, S., Rezaie, R. e Sammut, S. India's health biotech sector at a crossroads Nat Biotechno, v.25, p.403-17. 2007.

Fukui, Y. e Fujimoto, K. The preparation of sugar polymer-coated nanocapsules by the layer-by-layer deposition on the liposome. Langmuir, v.25, p.10020–10025. 2009.

Fundin, J., Hansson, P., Brown, W. e Lidegran, I. Poly(acrylic acid)–cetyltrimethylammonium bromide interactions studied using dynamic and static light scattering and time-resolved fluorescence quenching. Macromolecules, v.30, p.1118. 1997.

Furuya, M., Akashi, S. e Hirayama, K. The primary structure of human EGF produced by genetic engineering, studied by high-performance tandem mass spectrometry. Biochemical And Biophysical Research Communications, v.163, p.1100-1106. 1989.

Gandhi, A., Doumas, C., O'connor, J. P., Parsons, J. R. e Lin, S. S. The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. Bone, v.38, p.540-546. 2006.

Ganter, J. L. M. S., Cardoso, A. T. M., Kaminski, M. e Reicher, F. Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process. International Journal of Biological Macromolecules, v.21, p.137-140. 1997.

Gaur, P. K., Mishra, S., Gupta, V. B., Rathod, M. S., Purohit, S. e Savla, B. A. Targeted drug delivery of Rifampicin to the lungs: formulation, characterization, and stability studies of preformed aerosolized liposome and in situ formed aerosolized liposome. Drug Development and Industrial Pharmacy, v.36, n.6, Jun, p.638-646. 2010.

Grabielle-Madelmont, C., Lesieur, S. e Ollivon, M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v.56, p.189–217. 2003.

Greenhalgh, D. The role of growth factors in wound healing. J Trauma, n.41, p.159-167. 1996.

Gregoriadis, G. Liposome research in drug delivery: The early days. Journal of Drug Targeting, v.16, n.7-8, p.520-524. 2008.

Gregoriadis, G., Saffie, R. e De Souza, J. B. Liposomemediated DNA vaccination. FEBS Letters, v.402, p.107–110. 1997.

Haidar, Z. S., Hamdy, R. C. e Tabrizian, M. Protein release kinetics for core-shell hybrid nanoparticles based on the layer-by-layer assembly of alginate and chitosan on liposomes. Biomaterials, v.29, p.1207-1215. 2008.

Halasová, T., Krouská, J., Mravec, F. e Pekař, M. Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v.391, n.1-3, p.25-31. 2011.

Hardwicke, J., Schmaljohann, D., Boyce, D. e Thomas, D. Epidermal Growth Factor Therapy And Wound Healing – Past, Present And Future Perspectives. Surgeon, p.172-177. 2008.

Harmon, A. M., Lash, M. H., Tishbi, N., Lent, D., Mintzer, E. A. e Uhrich, K. E. Thermodynamic and Physical Interactions between Novel Polymeric Surfactants and Lipids: Toward Designing Stable PolymerLipid Complexes. Langmuir, p.9131–9138. 2011.

Harris, R. C., Chung, E. e Coffey, R. J. EGF receptor ligands. Experimental Cell Research, v.284, p.2–13. 2003.

Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of the lowry method that gives linear photometric response. Analytical Biochemistry, v.48, p.422-427. 1972.

Holzwarth, G. Conformation of the extracellular polysaccharide of *Xanthomonas campestris*. Biochemistry, v.15, p.4333–4339. 1976.

Huang, Y. Z., Rao, Y. F., Chen, J. L., Yang, V. C. e Liang, W. Q. Polysorbate cationic synthetic vesicle for gene delivery. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v.96A, n.3, Mar 1, p.513-519. 2011.

Iupac. Glossary for chemists of terms used in biotechnology, 1992. 148 p.

Iupac. Nomenclature for chromatography. p.81. 1993.

Iwanaga, K., Ono, S., Narioka, K., Kakemi, M., Morimoto, K., Yamashita, S., Namba, Y. e Oku, N. Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin. Journal Pharmaceutical Science, v.88, p.248-255. 1999.

Jansson, P. E., Kennark, L. e Lindberg, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydrate Research, v.45, p.275–282. 1975.

Jesorka, A. e Orwar, O. Liposomes: technologies and analytical applications. Annual review of analytical chemistry, v.1, p.801-832. 2008.

Kede, M. P. V. e Sabatovitch, O. Dermatologia estética. São Paulo: Atheneu. 2004. 11-16 p.

Khouryieh, H. A., Herald, T. J., Aramouni, F. e Alavi, S. Influence of mixing temperature on xanthan conformation and interaction of xanthan–guar gum in dilute aqueous solutions. Food Research International, v.39(9), p.964–973. 2006.

Khouryieh, H. A., Herald, T. J., Aramouni, F. e Alavi, S. Intrinsic viscosity and viscoelastic properties of xanthan/guar mixtures in dilute solutions: Effect of salt concentration on the polymer interactions. Food Research International, v.40, p.883–893. 2007.

Kluza, E., Yeo, S. Y., Schmid, S., Van Der Schaft, D. W. J., Boekhoven, R. W., Schiffelers, R. M., Storm, G., Strijkers, G. J. e Nicolay, K. Anti-tumor activity of liposomal glucocorticoids: The relevance of liposome-mediated drug delivery, intratumoral localization and systemic activity. Journal of Controlled Release, v.151, n.1, Apr 10, p.10-17. 2011.

Konop, A. J. e Colly, R. H. Role of Condensed Counterions in the Thermodynamics of Surfactant Micelle Formation with and without Oppositely Charged Polyelectrolytes. Langmuir, v.15, p.58. 1999.

Kotov, N. A. Layer-by-layer Self-assembly: Teie Contribution of Hydrophobic Interactions. NanoStructured Materials, v.12, p.789-796. 1999.

Lee, K., Silva, E. A. e Mooney, D. J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. J. R. Soc. Interface, v.8, p.153-170. 2011.

Lesoin, L., Boutin, O., Crampon, C. e Badens, E. CO₂/water/surfactant ternary systems and liposome formation using supercritical CO₂: A review. Colloids and Surfaces A, v.377, p.1-14. 2011.

Li, D., Li, G., Li, P., Zhang, L., Liu, Z., Wang, J. e Wang, E. The enhancement of transfection efficiency of cationic liposomes by didodecyldimethylammonium bromide coated gold nanoparticles. Biomaterials, v.31, p.1850–1857. 2010.

Li, H., Song, J. H., Park, J. S. e Han, K. Polyethylene glycol-coated liposomes for oral delivery of recombinant human epidermal growth factor. Int J Pharm, v.258, p.11-19. 2003.

Li, N., Zhuang, C., Wang, M., Sun, X., Nie, S. e Pan, W. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, v.379, p.131–138. 2009.

Li, X., Wetting, S. D. e Verrall, R. E. Isothermal titration calorimetry and dynamic light scattering studies of interactions between gemini surfactants of different structure and pluronic block copolymers. Journal of Colloid and Interface Science, v.282, p.466-477. 2005.

Liaw, J.-W., Shiao-Wentsai, Hung-Hsunlin, Tzu-Chenyen e Chen, B.-R. Wavelength-dependent Faraday–Tyndall effect on laser-induced microbubble in gold colloid. Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer, v.113, p.2234-2242. 2012.

Liebau, M., Bendas, G., Rothe, U. e Neubert, R. H. H. Adhesive interactions of liposomes with supported planar bilayers on QCM as a new adhesion model. Sensors and Actuators B, v.47, p.239–245. 1998.

Liu, W., Yan, Y., Hu, Z., Zhao, X., Yan, J. e Dong, S. Study on the nano machining process with a vibrating AFM tip on the polymer surface. Applied Surface Science, v.258, p.2620–2626. 2012.

Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C. e Zhang, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. Advances in Drug Delivery Reviews, v.60, p.1650–1662. 2008.

Lojou, É. e Bianco, P. Buildup of Polyelectrolyte-Protein Multilayer Assemblies on Gold Electrodes. Role of the Hydrophobic Effect. Langmuir, v.20, p.748-755. 2004.

Lu, H. H., Vo, J. M., Chin, H. S., Lin, J., Cozin, M., Tsay, R., Eisig, S. e Landesberg, R. Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation Journal of Biomedical Materials Research Part A, p.1128-1136. 2008.

Madrigal-Carballo, S., Lim, S., Rodriguez, G., Vila, A. O., Krueger, C. G., Gunasekaran, S. e Reed, J. D. Biopolymer coating of soybean lecithin liposomes via layer-by-layer self-assembly as novel delivery system for ellagic acid. Journal of Functional Foods, v.2, p.99-106. 2010.

Mady, M. M. e Darwish, M. M. Effect of chitosan coating on the characteristics of DPPC liposomes. Journal of Advanced Research, p.187-191. 2010.

Maier, H., Anderson, M., Karl, C., Maqunson, K., Whistler, R. L., In: Whistler, R. L. e Bemiller, J. N. Industrial Gums: Polysaccharides and their Derivatives. New York: Academic Press. 1993. 215 p.

Malafaya, P. B., Silva, G. A. e Reis, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. Advanced Drug Delivery Reviews, v.59, p.207-233. 2007.

Malvern. Zetasizer nanoZS Instrument Manual. 2010.

Mannion, R. O., Melia, C. D., Launay, B., Cuvelier, G., Hill, D. E. e Harding, S. E. Xanthan/locust bean gum interactions at room temperature. Carbohydrate Polymers, v.19, p.91–97. 1992.

Marquette, A., Lorber, B. e Bechinger, B. Reversible Liposome Association Induced by LAH4: A Peptide with Potent Antimicrobial and Nucleic Acid Transfection Activities. Biophysical Journal, v.98, n.11, Jun 2, p.2544-2553. 2010.

Marx, R. E. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v.62, p.489-496. 2004.

Matsko, N. e Mueller, M. AFM of biological material embedded in epoxy resin. Journal of Structural Biology, v.146, p.334–343. 2004.

Matulis, D., Rouzina, L. e Bloomfield, V. A. Thermodynamics of DNA binding and condensation: isothermal titration calorimetry and electrostatic mechanism. Journal of Molecular Biology v.296, p.1053. 2000.

Mccleary, B. V. Enzymatic hydrolysis, fine structure, and gelling interaction of legume-seed D-galacto-D-mannans. Carbohydrate Research, v.71, p.205–230. 1979.

Mehta, S. K., Bhawna, Bhasin, K. K. e Kumar, A. An insight into the micellization of dodecyldimethylethylammonium bromide (DDAB) in the presence of bovine serum albumin (BSA). Journal of Colloid and Interface Science, v.323, p.426-434. 2008.

Mehta, S. K., Bhawna, Kaur, K. e Bhasin, K. K. Micellization behavior of cationic surfactant dodecyldimethylethylammonium bromide (DDAB) in the presence of papain. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, v.317, p.32–38. 2008.

Merta, J., Tammelin, T. e Stenius, P. Adsorption of complexes formed by cationic starch and anionic surfactants on quartz studied by QCM-D. Colloids and Surfaces A, v.250, p.103-114. 2004.

Milas, M., Reed, W. F. e Printz, S. Conformations and flexibility of native and re-natured xanthan in aqueous solutions. International Journal of Biological Macromolecules, v.18, p.211-221. 1996.

Mola, E., Acevedo, B. e Silva, R. Development of Cuban Biotechnology. J Comm Biotechno, v.9, p.147-52. 2003.

Morita, S., Nukui, M. e Kuboi, R. Immobilization of liposomes onto quartz crystal microbalance to detect interaction between liposomes and proteins. Journal of Colloid and Interface Science v.298, p.672–678. 2006.

Morris, E. R., Rees, D. A., Young, G., Walkinshaw, M. D. e Darke, A. Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between Xanthomonas pathogen and its plant host. Journal of Molecular Biology, v.110, p.1–16. 1977.

Morris, G. A., Patel, T. R., Picout, D. R., Ross-Murphy, S. B., Ortega, A., Torre, J. G. D. L. e Harding, S. E. Global hydrodynamic analysis of the molecular flexibility of galactomannans. Carbohydrate Polymers, v.72, n.2, 5, p.356-360. 2008.

Muller, G., Anhourrache, M., Lecourtier, J. e Chauveteau, G. Salt dependence of the conformation of a single stranded xanthan. International Journal of Biological Macromolecules, v.8, p.167–172. 1986.

Murakami, S., Takayama, S., Ikezawa, K., Shimabukuro, Y., Kitamura, M., Nozaki, T., Terashima, A., Asano, T. e Okada, H. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. J Periodontol Res, v.34, p.425–30. 1999.

Negussie, A. H., Miller, J. L., Reddy, G., Drake, S. K., Wood, B. J. e Dreher, M. R. Synthesis and in vitro evaluation of cyclic NGR peptide targeted thermally sensitive liposome. Journal of Controlled Release, v.143, n.2, Apr 19, p.265–273. 2010.

Norton, I. T., Goodall, D. M., Frangou, S. A., Morris, E. R. e Rees, D. A. Mechanism and dynamics of conformational ordering in xanthan polysaccharide. Journal of Molecular Biology, v.175, p.371–394. 1984.

Olanya, G., Thormann, E., Varga, I., Makuška, R. e Claesson, P. M. Protein interactions with bottle-brush polymer layers: Effect of side chain and charge density ratio probed by QCM-D and AFM. Journal of Colloid and Interface Science, v.349, p.265–274. 2010.

Ono, L. Galactomananas modificadas: relação estrutura / atividade biológica. Bioquímica, UFPR, Curitiba, 2004.

Ono, Y., Kawasaki, H., Annaka, M. e Maeda, H. Effects of micelle-to-vesicle transitions on the degree of counterion binding. Journal of colloid and interface science, v. 287, p. 685-693. 2005.

Pallua, N., Wolter, T. e Markowicz, M. Platelet-rich plasma in burns. Burns, v.36, n.1, Feb, p.4-8. 2010.

Paoletti, S., Cesàro, A. e Delben, F. Thermally induced conformational transition of xanthan polyelectrolyte. Carbohydrate Research, v.123, p.173–178. 1983.

Pietrzak, W. S. e Eppley, B. L. Platelet rich plasma: biology and new technology. The Journal Of Craniofacial Surgery, v.16, p.1043-1054. 2005.

Plum, S. M., Holaday, J. W., Ruiz, A., Madsen, J. W., Fogler, W. E. e Fortier, A. H. Administration of a liposomal FGF-2 peptide vaccine leads to abrogation of FGF-2-mediated angiogenesis and tumor development. Vaccine, v.19, p.1294–1303. 2001.

Prabaharan, M. Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems. International Journal of Biological Macromolecules, v.49, p.117-124. 2011.

Prigent, S. e Lemoine, N. The type I (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. Prog Growth Factor Res v.4, p.1-24. 1992.

Rasenack, N. e Müller, B. W. Dissolution rate enhancement by in situ micronization of poorly water-soluble drugs. Pharmaceutical Research, v.19, p.1894–1900. 2002.

Rinaudo, M. Milas, M., Bresolin, T. e Gabter, J. Physical properties of xanthan, galactomanna and their mixtures in aqueous solutions. Macromolecular Symposia, v. 140, p. 115-124. 1999.

Robinson, A. M., Bannister, M., Creeth, J. E. e Jones, M. N. The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide. Colloids and Surfaces A, v.186, p.43–53. 2001.

Rocheffort, W. E. e Middleman, S. Rheology of xanthan gum: salt, temperature, and strain effects in oscillatory and steady shear experiments. Journal of Rheology, v.31(4), p.337–369. 1987.

Rocks, J. K. Xanthan gum. Food Technology, v.25(5), p.22–31. 1971.

Rook, A., Wilkinson, D. S. e Ebling, F. J. G. Textbook of dermatology London: Blackwell Science. 1998. 337-96 p.

Sammartino, G., Tia, M., Marenzi, G., Lauro, A. E. D., D'agostino, E. e Claudio, P. P. Use of autologous platelet-rich plasma (prp) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. Journal of Oral Maxillofacial Surgery, v.63, p.766-770. 2005.

Sato, M. e Sano, M. Van der Waals layer-by-layer construction of a carbon nanotube 2D network. Langmuir, v.21, p.11490–11494. 2005.

Savage, C. e Cohen, S. Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor. Eye Res, v.15, p.361. 1973.

Scarioti, G. D., Lubambo, A., Feitosa, J. P. A., Sierakowski, M. R., Bresolin, T. M. B. e Freitas, R. A. D. Nanocapsule of cationic liposomes obtained using “in situ” acrylic acid polymerization: Stability, surface charge and biocompatibility. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.87, p.267-272. 2011.

Scarpa, M., Zaccariotto, E., D'avanzo, F., Van Weperen, W., Rip, J., Gaillard, P. e Tomanin, R. First evidence of efficacy in brain following intravenous injections of Brain-Targeted Liposome-Enzyme in the MPS II mouse model. Molecular Genetics and Metabolism, v.102, n.2, Feb, p.S40-S40. 2011.

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. e Yeon, Y. J. Food applications of chitin and chitosan. Trends in Food Science and Technology, v.10, p.37–51. 1999.

Sikiric, M., Primožic, I. e Filipovic-Vincekovic, N. Adsorption and association in aqueous solutions of dissymmetric gemini surfactant. Journal of Colloid and Interface Science, v.250, p.221–229. 2002.

Silva, M. A. R. Utilização do pireno como uma sonda fluorescente na investigação de ligações intermoleculares em misturas binárias de solventes. Química, UFSC, Florianópolis, 2002.

Silverstein, R. M., Bassler, G. C. e Morrill, T. C. Spectrometric identification of organic compounds: John Wiley & Sons. 1991

Singh, M., Borain, J., Noor-Mahomed, N. e Ariatti, M. The effect of pegylation on the transfection activity of two homologous cationic cholesteryl cytofectins. African Journal of Biotechnology, v.10, n.8, Feb 21, p.1400-1407. 2011.

Soman, P., Rice, Z. e Siedlecki, C. A. Immunological identification of fibrinogen in dual-component protein films by AFM imaging. Micron, v.39, p.832–842. 2008.

Soter, N. A. e Baden, H. P. Pathophysiology of dermatologic diseases. New York: McGraw-Hill. 1991. 369-76 p.

Spink, C. H. Differential Scanning Calorimetry. Methods in Cell Biology, v.84, p.115-141. 2008.

Steel, J. C., Cavanagh, H. M. A., Burton, M. A., Abu-Asab, M. S., Tsokos, M., Morris, J. C. e Kalle, W. H. J. Increased tumor localization and reduced immune response to adenoviral vector formulated with the liposome DDAB/DOPE. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v.30, p.398–405. 2007.

Stockton, W. B. e Rubner, M. F. Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. Macromolecules, v.30, p.2717-2725. 1997.

Striegel, Andre M. Multiple detection in size-exclusion chromatography. Washington. 2005

Sun, J., Wu, T., Sun, Y., Wang, Z., Zhang, X., Shen, J. e Cao, W. Fabrication of a covalently attached multilayer via photolysis of layer-by-layer self-assembled films containing diazo-resins. Chemical Communications, p.1853-1854. 1998.

Sutherland, I. W. Microbial exopolysaccharide synthesis. Dlm. In: Sand-ford, P. A., Laskin, A. Extracellular microbial polyssacharides. EUA: American Chemical Society. p. 40-57 1997.

Tadros, T. F. Applied surfactants: principles and applications. Weinheim: John Wiley & Sons. 2005.

Takeuchi, H., Kojima, H., Yamamoto, H. e Kawashima, Y. Polymer coating of liposomes with a modified polyvinyl alcohol and their systemic circulation and RES uptake in rats. Journal of Controlled Release, v.68, n.195-205. 2000.

Takeuchi, H., Matsui, Y., Yamamoto, H. e Kawashima, Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. Journal of Controlled Release, v.86, p.235–242. 2003.

Tako, M. Synergistic interaction between xanthan and tara-bean gum. Carbohydrate Polymers, v.10, p.619–633. 1991.

Tako, M., Asato, A. e Nakamura, S. Rheological aspects of the intermolecular interaction between xanthan and locust bean gum in aqueous media. Agricultural and Biological Chemistry, v.48(12), p.2987–2993. 1984.

Tayalia, P. e Mooney, D. J. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. Advanced Materials, v.21, p.3269–3285. 2009.

Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, D. B. e Weiss, J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.45, p.587–605. 2005.

Tominaga, M., Ohira, A., Yamaguchi, Y. e Kunitake, M. Electrochemical, AFM and QCM studies on ferritin immobilized onto a self-assembled monolayer-modified gold electrode. Journal of Electroanalytical Chemistry, v.566 p.323–329. 2004.

Torchilin, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nature Reviews Drug Discovery, v.4, p.145-160. 2005.

Tsay, R. C., Vo, J., Burke, A., Eisig, S., Lu, H. H. e Landesberg, R. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v.63, p.521-528. 2005.

Uebersax, L., Merkle, H. P. e Meinel, L. Biopolymer-based growth factor delivery for tissue repair: from natural concepts to engineered systems. Tissue Engineering: Part B, v.15, p.263-289. 2009.

Verwy, E. J. W. e Overbeek, J. T. G. Theory of the stability of lyophobic colloids. Amsterdam, Elsevier. 1948.

Volodkin, D., Mohwald, H., Voegel, J.-C. e Ball, V. Coating of negatively charged liposomes by polylysine: Drug release study. Journal of Controlled Release, v.117, p.111–120. 2007.

Wagner, H., Kostka, K.-H., Lehr, C.-M. e Schaefer, U. F. pH profiles in human skin: influence of two in vitro test systems for drug delivery testing. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.55, p.57–65. 2003.

Wang, C. e Tam, K. C. New insights on the interaction mechanism within oppositely charged polymer/surfactant systems. Langmuir, v.18, p.6484. 2002.

Wang, C., Tam, K. C., Jenkins, R. D. e Tan, C. B. Interactions between Methacrylic Acid/Ethyl Acrylate Copolymers and Dodecyltrimethylammonium Bromide. J. Phys. Chem. B, v.107, p.4667-4675. 2003.

Wang, L. Y., Wang, Z. Q., Zhang, X., Shen, J. C., Chi, L. F. e Fuchs, H. A new approach for the fabrication of an alternating multilayer film of poly(4-vinylpyridine) and poly(acrylic acid) based on hydrogen bonding. Macromolecular Rapid Communications, v.18, p.509–514. 1997.

Wang, R., Ghahary, A., Shen, Q., Scott, P. G., Roy, K. e Tredget, E. E. Hypertrophic scar tissues and fibroblasts produce more transforming growth factor-beta1 mRNA and protein than normal skin and cells. Wound Repair Regen, v.8, n.2, p.128-37. 2000.

Wroblewski, A. P., Mejia, H. A. e Wright, V. J. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. Operative Techniques in Orthopaedics, v.20, p.98-105. 2010.

Wrotniak, M., Bielecki, T. e Gaździk, T. S. Current opinion about using the plateletrich gel in orthopaedics and trauma surgery. Ortop Traumatol Rehabil, v.9, p.227-238. 2007.

Wu, J., Lee, A., Lu, Y. e Lee, R. J. Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes. International Journal of Pharmaceutics, v.337, p.329–335. 2007.

Wu, W., Chen, F., Liu, Y., Ma, Q. e Mao, T. Autologous injectable tissue-engineered cartilage by using platelet-rich plasma: experimental study in a rabbit model. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v.65, p.1951-1957. 2007.

Wu, W., Zhang, J., Dong, Q., Liu, Y., Mao, T. e Chen, F. Platelet-rich plasma – A promising cell carrier for micro-invasive articular cartilage repair. Medical Hypotheses, v.72, p.455-457. 2009.

Xiang, Q., Xiao, J., Zhang, H., Zhang, X., Lu, M., Zhang, H., Su, Z., Zhao, W., Lin, C., Huang, Y. e Li, X. Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat. Burns. 2011.

Yan, Y., Sun, Y., Yang, Y., Hu, Z. e Zhao, X. Effects of the AFM tip trace on nanobundles formation on the polymer surface. Applied Surface Science, v.258, p.9656–9663. 2012.

Yang, C.-H., Huang, Y.-B., Wu, P.-C. e Tsai, Y.-H. The evaluation of stability of recombinant human epidermal growth factor in burn-injured pigs. Process Biochemistry, v.40, p.1661–1665. 2005.

Zheng, Y., Chen, H., Liu, X. P., Jiang, J. H., Luo, Y., Shen, G. L. e Yu, R. Q. An ultrasensitive chemiluminescence immunosensor for PSA based on the enzyme encapsulated liposome. Talanta, v.77, n.2, Dec 15, p.809-814. 2008.

Zhou, J., Romero, G., Rojas, E., Ma, L., Moya, S. e Gao, C. Layer by layer chitosan/alginate coatings on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for antifouling protection and folic acid binding to achieve selective cell targeting. Journal of Colloid and Interface Science, v.345, p.241-247. 2010.