

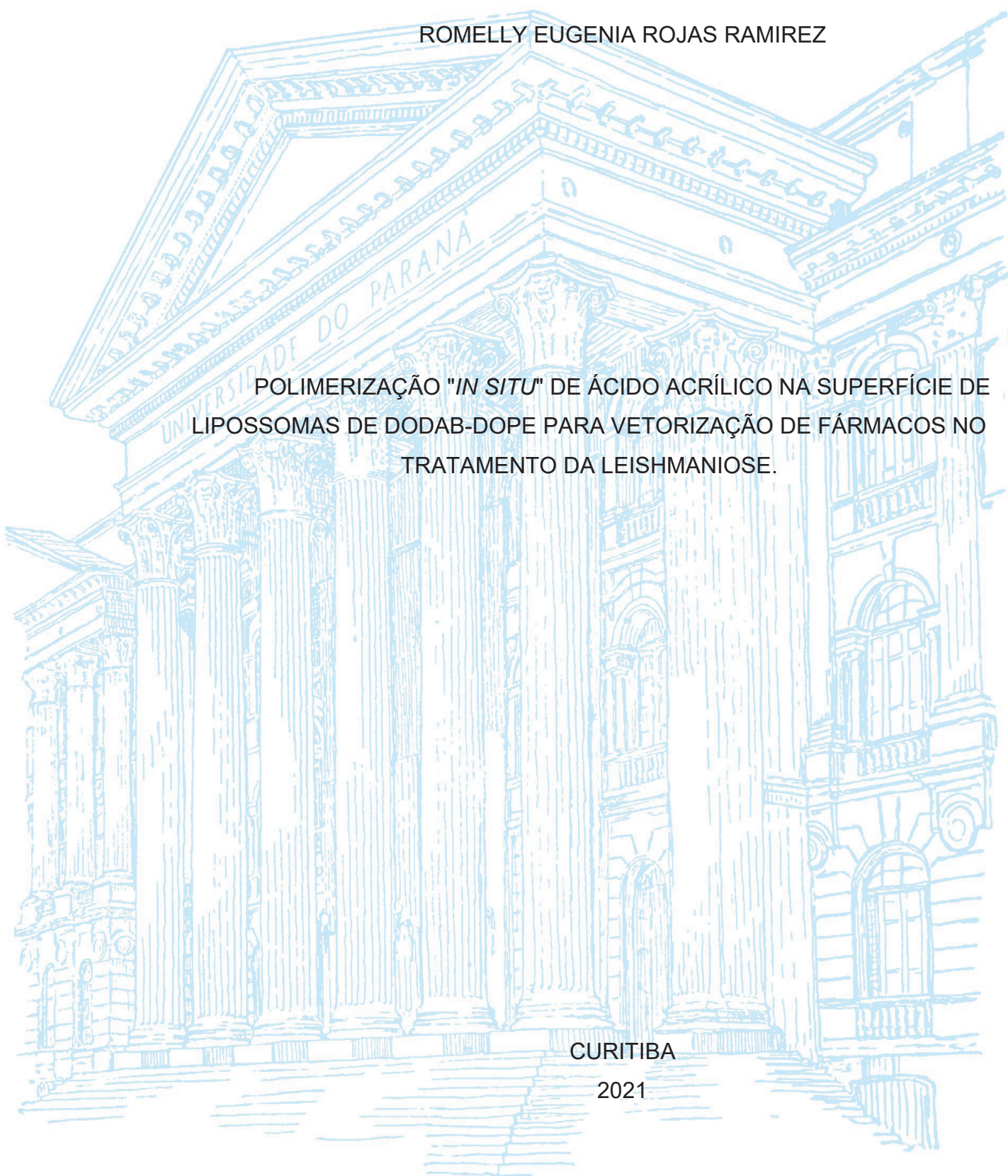
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROMELLY EUGENIA ROJAS RAMIREZ

POLIMERIZAÇÃO "IN SITU" DE ÁCIDO ACRÍLICO NA SUPERFÍCIE DE  
LIPOSSOMAS DE DODAB-DOPE PARA VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS NO  
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.

CURITIBA

2021



ROMELLY EUGENIA ROJAS RAMIREZ

POLIMERIZAÇÃO "*IN SITU*" DE ÁCIDO ACRÍLICO NA SUPERFÍCIE DE  
LIPOSSOMAS DE DODAB-DOPE PARA VETORIZAÇÃO DE FÁRMACOS NO  
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em  
Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade  
Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção  
do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

CURITIBA

2021

R741p

Rojas Ramirez, Romelly Eugenia

Polimerização “*in situ*” de ácido acrílico na superfície de lipossoma DOBAB:DOPE para vetorização de fármacos no tratamento da leishmaniose [recurso eletrônico] / Romelly Eugenia Rojas Ramirez - Curitiba, 2021.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

1. Química. 2. Reações químicas. 3. Leishmaniose. I. Universidade Federal do Paraná. II. Freitas, Rilton Alves. III. Freitas, Rilton Alves de. IV. Título.

CDD 541.39

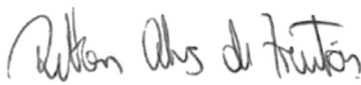
---

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ROMELLY EUGENIA ROJAS RAMIREZ** intitulada: **Polimerização "in situ" de ácido acrílico na superfície de lipossomas de DODAB-DOPE para vetorização de fármacos no tratamento da leishmaniose.**, sob orientação do Prof. Dr. RILTON ALVES DE FREITAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

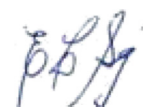
CURITIBA, 20 de Dezembro de 2021.



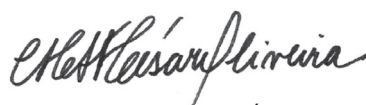
RILTON ALVES DE FREITAS  
Presidente da Banca Examinadora



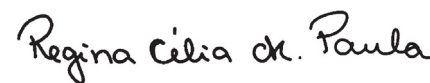
ELISA SOUZA ORTH  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



EDUARDO LEMOS DE SÁ  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MARIA APARECIDA FERREIRA CÉSAR-OLIVEIRA  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



REGINA CELIA MONTEIRO DE PAULA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ)

Dedico esta tese a meu Deus, minha  
amada família, professores e todos os que  
me ajudaram até hoje chegar aqui, em  
especial, para minha amada inspiração Sara.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a meu Deus que tem estado para mim durante minha vida, dando forças, vontade e amor suficiente para estar hoje onde estou. Obrigada por cada dons que me presenteia a cada dia, obrigada por dar o presente eterno da esperança.

À minha família que tem sido de apoio, meu pai que sempre acredito em mim, me ensinando amor pelas ciências, livros e a curiosidade, por falar de Deus do amor e do poder de dar, de servir e de ajudar ao próximo. A minha mãe por me dar sempre caráter, acreditar em mim, me ajudar em uma quantidade cosas inomináveis, e por seu cuidado. Meus irmãos que são muitas vezes meu apoio Ruth e Robinson. Minha irmã Ruth, amiga, sempre me acompanhando e vendo em mim coisas que eu não consigo enxergar.

À meu marido José Gabriel por me acompanhar neste caminho junto com minha filha, cuidando de todo quando eu não posso, pelo amor. Obrigada a minha filha por me inspirar a ser uma melhor versão de mim, e me dar esse impulso para te demonstrar que podemos ser o que queiramos com trabalho e empenho.

À meu prezado orientador professor Rilton Alves de Freitas, com quem tanto aprendi. Obrigada por confiar em mim, por me aceitar e orientar sem me conhecer, eu chegando de outro país. Obrigada por todas as coisas que me ensinou, corrigiu, ajudou e aperfeiçoou como pessoa e profissional. Foram 4 anos cheios de aprendizados que vão estar comigo por todo o que resta da minha vida, esta oportunidade para mim foi um recontro com as coisas que mais amo, que são ensinar, aprender, solucionar problemas, e não me render e você foi parte importante de todo isto, me ajudou a ser uma melhor pessoa profissionalmente e humanamente, você em um exemplo para todos nos estudantes de constância, dedicação e excelência.

À meu prezado amigo Dr. Hugo Lahousse, que confio em mim como profissional e pessoa, me ajudou a sair de um país numa situação realmente difícil. Por seus conselhos de química e da vida. Obrigada Doc.

Aos colegas do laboratório Biopol, em especial meus colegas e amigos, Cassiano, Mariana, Priscila e Carol e todos os colegas do lab. que dia a dia são parte de minha vida e aprecio em grande forma.

À meus amigos Meira, Rasec Erick, Luis, Luisa foram de grande apoio quanto profissionalmente como por sua amizade.

Às bancas examinadoras que avaliaram o nosso trabalho na qualificação e na conclusão do doutorado, professoras Elisa Souza Orth (UFPR), Maria Aparecida Ferreira César-Oliveira (UFPR), Regina Celia Monteiro De Paula (UFC) Eduardo Lemos de Sá (*UFPR*) obrigada pelas contribuições que nos ajudaram.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR, aos secretários e professores coordenadores.

A Capes pela bolsa concedida e apoio financeiro, apoio incluso do CNPq.

Agradeço aos professores que passaram pela minha vida, venezuelanos e brasileiros. Aos professores que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar onde estou, meu respeito e agradecimento.

Obrigada a todas as pessoas de Brasil que diretamente ou indiretamente me acolheram e abriram as portas de este esplêndido país.

*Temos de fazer o melhor que podemos. Esta é a nossa sagrada responsabilidade humana.*

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a polimerização *“in situ”* de ácido acrílico (AA) na superfície de lipossomas catiônicos usando como iniciador H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ ácido ascórbico, obtendo nanocápsulas de DODAB ou DODAB:DOPE recobertos com poli(ácido acrílico), e em uma segunda parte deste trabalho foi realizado o encapsulamento do fármaco comercial Anfotericina B (AmB), usado para o tratamento da Leishmaniose, uma doença infectocontagiosa, com a finalidade de obter proteção, dispersão e vetorização do fármaco. Inicialmente foi realizado um estudo sobre a adsorção de AA na superfície do lipossoma e filmes, em função da concentração de AA e do pH do meio, a adsorção foi quantificada em pH 4.4 e em concentrações > 2.0 mmol L<sup>-1</sup>. Na polimerização *“in situ”*, o efeito do tamanho do lipossoma foi avaliado tanto pela conversão de AA a poli(ácido acrílico) e a cinética reacional e como resultado, para lipossomas maiores (200 nm) a conversão de AA foi reduzida, para os menores (100 ou 20 nm), a cinética de polimerização foi similar aos de condições homogêneas. As imagens obtidas pela técnica de microscopia de força atômica apresentaram modificação na forma, com estruturas menos esféricas depois da polimerização e com mudanças no tamanho. As massas molares dos polímeros formados foram afetadas, diminuindo em presença do lipossoma. Na segunda parte do trabalho, foi realizado o encapsulamento do fármaco Anfotericina B nos lipossomas DODAB e DODAB:DOPE, determinando que a encapsulação máxima atingida foi de 50%. Quando realizada a polimerização *“in situ”* o fármaco diminuiu sua concentração apresentando oxidação, conseqüentemente, parâmetros como temperatura, tempo foram ajustados, obtendo uma melhor condição de proteção ao fármaco com a fórmula de lipossoma DODAB junto com condições de reacionais para a polimerização de T= 40 °C e 1 hora de aquecimento. A nanocápsula obtida foi testada conseguindo estabilidade coloidal de 1 mês, e mudanças no potencial zeta e tamanho em pH 2 a 4, o qual não foi observado para o lipossoma de DODAB, nem para o sistema onde foi adsorvido um polímero pre-sintetizado. Concluindo que a nanocápsula obtida pela polimerização *“in situ”* apresenta uma grande vantagem de modular a liberação em pH baixos, bem como manter a estabilidade lipossomal.

**Palavras-chave:** polimerização de ácido acrílico; lipossoma; cápsulas nano; anfotericina; vetorização de fármacos; leishmaniose; doença negligenciada.

## ABSTRACT

In this work, the "*in situ*" polymerization of acrylic acid (AA) on the surface of cationic liposomes using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ascorbic acid as initiator was evaluated, obtaining nanocapsules of DODAB or DODAB:DOPE coated with poly(acrylic acid), and in a second part of this work, the encapsulation of the commercial drug Amphotericin B (AmB) was carried out, used for the treatment of Leishmaniasis, an infectious disease, in order to obtain protection, dispersion and vectorization of the drug. Initially, a study was carried out on the adsorption of AA on the surface of the liposome and films, as a function of the concentration of AA and the pH of the medium, the adsorption was quantified at pH 4.4 and at concentrations > 2.0 mmol L<sup>-1</sup>. In "*in situ*" polymerization, the effect of liposome size was evaluated both by the conversion of AA to poly(acrylic acid) and reaction kinetics and as a result, for larger liposomes (200 nm) the AA conversion was reduced, for the (100 or 20 nm), the polymerization kinetics were similar to those under homogeneous conditions. The images obtained by the atomic force microscopy technique showed changes in shape, with less spherical structures after polymerization and with changes in size. The molar masses of the polymers formed were affected, decreasing in the presence of the liposome. In the second part of the work, the drug Amphotericin B was encapsulated in DODAB and DODAB:DOPE liposomes, determining that the maximum encapsulation achieved was 50%. When performed the polymerization "*in situ*" the drug concentration decreased, showing oxidation, consequently, parameters such as temperature, time were adjusted, obtaining a better protection condition for the drug with the DODAB liposome formula together with reaction conditions for the polymerization of T = 40 °C and 1 hour of heating. The obtained system was tested achieving colloidal stability of 1 month, and changes in zeta potential and size at pH 2 to 4, which was not observed for the DODAB liposome, neither for the system where a pre-synthesized polymer was adsorbed. In conclusion, the nanocapsule obtained from "*in situ*" polymerization has a great advantage in modulating the release at low pH, as well as maintaining liposomal stability.

**Keywords:** acrylic acid polymerization; liposome; nano capsules; amphotericin; drug vectorization; leishmaniasis; neglected disease.

## LISTA DE FIGURAS

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 | CLASSIFICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM BASE NA LAMELARIDADE: AS VESÍCULAS MULTILAMELARES (MLV); VESÍCULA UNILAMELAR GRANDE (LUV) E PEQUENAS VESÍCULAS UNILAMELARES (SUV) (PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016).....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 27 |
| FIGURA 2 | ESTRUTURAS MOLECULARES DE SURFACTANTES FORMADORES DE VESÍCULAS E MICELAS: DODAB, BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO; DODAC, CLORETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO; DDAB, BROMETO DE DODECILDIMETILAMÔNIO E CNTAB, BROMETO DE ALQUILTRIMETILAMÔNIO. FONTE: (ALVES, 2008).....                                                                                                                                                                                                      | 31 |
| FIGURA 3 | TERMOGRAMAS PARA VESÍCULAS DE DODAB 10 mmol L <sup>-1</sup> PREPARADA COM DIFERENTES TEMPOS DE SONICAÇÃO (0, 5, 30, 60 min). AS AMOSTRAS FORAM ESCANADAS DEPOIS DE 30 MIN DE PREPARADA. NS= NÃO SONICADA- TS= SONICAÇÃO DE TIP – BS=SONICAÇÃO DE BANHO. O TEMPO EM MINUTOS SE REFERE AO TEMPO DE SONIÇÃO. T <sub>s</sub> = TEMPERATURA DE PRÉ-TRANSIÇÃO T <sub>m</sub> = TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO T <sub>p</sub> = TEMPERATURA DE PÓS-TRANSIÇÃO (BRITO; MARQUES, 2005).<br>..... | 33 |
| FIGURA 4 | ESTADOS DAS TRANSIÇÕES DE FASE EM VESÍCULAS: (A) ESTADO GEL, (B) ESTADO GEL ONDULADO E (C) ESTADO LÍQUIDO- CRISTALINO (ALVES, 2008).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 33 |
| FIGURA 5 | ESTRUTURAS DE POLIMEROS PH-RESPONSIVOS (a) POLI(ÁCIDO ACRÍLICO) (b) POLI(ÁCIDO 2-ETILACRÍLICO), (c) POLI(ÁCIDO 2-PROPILACRÍLICO) (d) SucPG POLI(SUCCINILADO GLICIDOL), (e) MGluPG POLI(3-METILGLUTARILADO GLICIDOL) .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 36 |
| FIGURA 6 | ETAPAS DA POLIMERIZAÇÃO RADICALAR DO PAA COM O INICIADOR PERSULFATO DE POTASIO 1) INICIAÇÃO 2) PROPAGAÇÃO 3)TERMINAÇÃO. FONTE: (MOAD; SOLOMON, 2005).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 37 |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 8   | CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA ACOMP PARA SISTEMAS TRIDIMENSIONAIS A SEREM APLICADOS NA MONITORAÇÃO EM TEMPO REAL DO PROCESSO DE SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS REVESTIDAS COM PAA. FONTE: SCARIOTI ET AL., 2011 .....                                                                                                                                                                             | 47 |
| FIGURA 9   | RESULTADOS DE $D_{happ}$ PARA O LIPOSSOMA DODAB $1 \text{ mmol L}^{-1}$ EM ÁGUA SONICADO A 20% AMPLITUDE EM TEMPOS DE 1, 2, 3 min .....                                                                                                                                                                                                                                              | 55 |
| FIGURA 11  | RESULTADOS DO DSCIII-MICRO OBTIDOS PARA LIPOSSOMA DODAB $1 \text{ mmol. L}^{-1}$ PELO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO EM ÁGUA, 60 MIN DE AQUECIMENTO DE 25 A 70 °C.....                                                                                                                                                                                                                         | 58 |
| FIGURA 12. | RESULTADOS DOS ANÁLISES CALORIMÉTRICO OBTIDOS COM DSCIII: LIPOSSOMAS DE DODAB (ÁGUA SON 3 min) COM O MONÔMERO ÁCIDO ACRÍLICO (AA) A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM pH 5. A) RESFRIAMENTO. B) AQUECIMENTO. ....                                                                                                                                                                          | 60 |
| FIGURA 13  | RESULTADOS DAS ANÁLISES DO DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULA OBTIDOS PARA LIPOSSOMA DODAB:DOPE $1 \text{ mmol L}^{-1}$ PELO MÉTODO DE INJEÇÃO DE ETANOL 5 min DE SONICAÇÃO, COMPARADO COM O LIPOSSOMA DE DODAB PREPARADO POR INJEÇÃO DE ETANOL .....                                                                                                                                       | 62 |
| FIGURA 14  | TESTES DE ESTABILIDADE DE TEMPERATURA PARA DODAB, DODAB: DOPE 10: 1 (mol: mol) OU 10: 2 (mol: mol) TODOS ELES COM CONCENTRAÇÃO DE DODAB DE $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , A) $D_{HAPP}$ DOS TRES LIPOSSOMAS MEDIDO POR DLS E B) TESTE CALORIMÉTRICO MEDIDOS POR DSC (2° CICLO DE AQUECIMENTO EM ATMOSFERA INERTE DE NITROGÊNIO, COM TAXA DE AQUECIMENTO $0,2 \text{ °C.min}^{-1}$ ). .... | 64 |
| FIGURA 15  | EXPERIMENTOS DE ADSORÇÃO DE ÁCIDO ACRÍLICO EM FILMES DODAB E LIPOSSOMAS. A) ÂNGULO DE CONTATO DE UMA GOTA DE ÁGUA EM CRISTAIS DE OURO: 1) OURO PURO; 2) OURO MODIFICADO COM $8 \text{ mmol L}^{-1}$ DE 1-HEXANOTIOL; 3) OURO MODIFICADO COM 1-HEXANOTIOL E $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . B) ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE ÁCIDO ACRÍLICO EM UMA ÚNICA CAMADA                                  |    |

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|           | DE DODAB EM PH 5 NO GRÁFICO INSERTO, É DADA A LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE LANGMUIR. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 66 |
| FIGURA 16 | REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ADSORÇÃO DO ÁCIDO ACRÍLICO NA MONOCAMADA DODAB. OS DOIS OXIGÊNIOS (CÍRCULOS VERMELHOS) NO ÁCIDO ACRÍLICO ÍON INTERAGEM COM A CABEÇA DO SURFACTANTE POLAR DODAB .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 67 |
| FIGURA 17 | ANÁLISES DE POTENCIAL ZETA COM LIPOSSOMAS EM DIFERENTES pH E COM E SEM INICIADORES.(A) POTENCIAL ZETA DE LIPOSSOMAS DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol) E CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACRÍLICO DE 7 mmol L <sup>-1</sup> COM VARIAÇÃO DE pH. (B) POTENCIAL ZETA DE DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol) EM PH 5 E 7 mmol L <sup>-1</sup> DE ÁCIDO ACRÍLICO COM O INICIADOR DE PAR REDOX VERMELHO (3 mmol L <sup>-1</sup> DE ÁCIDO ASCÓRBICO E 18 mmol L <sup>-1</sup> COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO) E PRETO KPS (0,15 mmol L <sup>-1</sup> ) ANTES E DEPOIS DA POLIMERIZAÇÃO INDUZIDA POR AQUECIMENTO | 68 |
| FIGURA 18 | SISTEMA DE LIPOSSOMA DODAB:DOPE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE KPS E AA, COM AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE KPS APARECE TURBIDEZ E SEPARAÇÃO, TODOS A T=25 °C.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 70 |
| FIGURA 19 | ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO LIPOSSOMA DODAB A 1 mmol L <sup>-1</sup> , LIPOSSOMA DODAB 1 mmol L <sup>-1</sup> +KPS 0,15 mmol L <sup>-1</sup> E AA 2 mmol L <sup>-1</sup> . AS AMOSTRAS FORAM DILUÍDAS 1:20, MEDIÇÃO REALIZADA NA FAIXA DE 190 A 500 nm.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 71 |
| FIGURA 20 | SISTEMA ACOMP PARA SISTEMAS TRIDIMENSIONAIS A SEREM APLICADOS NA MONITORAÇÃO EM TEMPO REAL DO PROCESSO DE SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS DE DODAB:DOPE (10:2 mol:mol) E REVESTIDAS COM PAA POR POLIMERIZAÇÃO “ <i>IN SITU</i> ” .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 73 |
| FIGURA 21 | POLIMERIZAÇÃO “ <i>IN SITU</i> ” DE AA (1 A 7 mmol L <sup>-1</sup> ) A PAA PARA O REVESTIMENTO DO LIPOSSOMA DODAB:DOPE (10:2 mol:mol) A 1 mmol L <sup>-1</sup> DE DODAB CONCENTRAÇÃO INICIADORES PAR REDOX DE ACIDO ASCÓRBICO 3mmol L <sup>-1</sup> E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 18 mmol L <sup>-1</sup> .....                                                                                                                                                                                                                                                                     | 76 |

- FIGURA 22 MONITORAMENTO PELO SISTEMA ACOMP DA POLIMERIZAÇÃO “*IN SITU*” DE AA (3, 7, E 10 E 12 mmol L<sup>-1</sup>) A PAA PARA O REVESTIMENTO DO LIPOSSOMA DODAB:DOPE (10:2 mol:mol) A 1 mmol L<sup>-1</sup> DE DODAB, COM INICIADORES ACIDO ASCÓRBICO (3mmol L<sup>-1</sup>) E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO(18 mmol L<sup>-1</sup>)  $\lambda$ = 240 nm. ....78
- FIGURA 23 CONVERSÃO DE AA EM PAA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO “*IN SITU*” DE TRÊS LIPOSSOMAS DIFERENTES DE DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol) USANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DODAB (1,0 mmol L<sup>-1</sup> E 2,5 mmol L<sup>-1</sup>) E ÁCIDO ACRÍLICO (3-12 mmol L<sup>-1</sup>). AS MEDIÇÕES FORAM FEITAS EM TRIPLICATA E OS TRÊS LIPOSSOMAS APRESENTAVAM TAMANHO INICIAL DE 83 ± 20 nm .....80
- FIGURA 24 CONVERSÃO DE ÁCIDO ACRÍLICO EM POLI (ÁCIDO ACRÍLICO) USANDO UMA QUANTIDADE EXTRA DOS INICIADORES PAR REDOX. NO TEMPO 0 (SETA INDICADA COMO 1°) FOI ADICIONADO O PAR REDOX (3 mmol L<sup>-1</sup> DE ÁCIDO ASCÓRBICO E 18 mmol L<sup>-1</sup> DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO) EM 21 min (SETA INDICADA 2°) FOI ADICIONADO UMA QUANTIDADE EXTRA DE PAR REDOX INICIADOR DOBRANDO A CONCENTRAÇÃO .....81
- FIGURA 25 (a) CINÉTICA DE AA CONSUMIDO NA POLIMERIZAÇÃO A PAA, COM TRÊS TAMANHOS DIFERENTES DE LIPOSSOMAS:16±8 nm; 117±21 nm; 190±60 nm. TODAS AS CURVAS FORAM AJUSTADAS USANDO A PSEUDO PRIMEIRA ORDEM, EQUAÇÃO 7. (b) DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE ( $D_{happ}$ ) DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol) E 1 mmol L<sup>-1</sup> DE LIPOSSOMAS DODAB A 20 nm, 100 nm E 200 nm, ANTES E DEPOIS DA POLIMERIZAÇÃO DE AA A 7 mmol L<sup>-1</sup> .....83
- FIGURA 26 ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO LIPOSSOMA DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol). CONCENTRAÇÃO DE DODAB DE 2,5 mmol L<sup>-1</sup> E CONCENTRAÇÃO DO MONÔMERO ÁCIDO ACRÍLICO DE (A) 3 mmol L<sup>-1</sup>; (B) 5 mmol L<sup>-1</sup>; (C) 7 mmol L<sup>-1</sup> e (D) 12 mmol L<sup>-1</sup> . COMO CONTROLE, (E) 7 mmol L<sup>-1</sup> DE ÁCIDO ACRÍLICO SEM O PAR REDOX E O LIPOSSOMA DODAB: DOPE E (F) 7 mmol L<sup>-1</sup> DE

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|           | ÁCIDO ACRÍLICO COM DODAB: LIPOSSOMA DOPE SEM O PAR REDOX .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 85  |
| FIGURA 27 | MICROGRAFIAS TOPOGRÁFICAS E DE FASE OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA DODAB: LIPOSSOMAS DOPE (10: 2 mol: mol) COM CONCENTRAÇÕES DE DODAB DE 1 mmol L <sup>-1</sup> , NÃO REVESTIDAS E REVESTIDAS, REALIZADAS SOB MICA. PARA ESTE PROCEDIMENTO FOI UTILIZADA A CONCENTRAÇÃO DE AA 7 mmol L <sup>-1</sup> . ESCALA (4x4 µm, MODO DINÂMICO) E ESCALA DE AMPLIAÇÃO (1x1 µm, MODO DINÂMICO)..... | 87  |
| FIGURA 28 | CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE AmB POR ESPECTROMETRIA UV-Vis EM METANOL TEMPERATURA 24 °C. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 90  |
| FIGURA 29 | EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE AmB NOS LIPOSSOMAS DODAB:DOPE 10:2 1 mmol L <sup>-1</sup> DE DODAB.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 91  |
| FIGURA 30 | DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE (D <sub>happ</sub> ) (AZUL) E POTENCIAL ZETA (ROSA) DOS LIPOSSOMAS DODAB:DOPE CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AmB.....                                                                                                                                                                                                                                             | 92  |
| FIGURA 31 | AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS ARMAZENADAS SEM FILTRAR E FILTRADAS APÓS DE UMA SEMANA EM GELADEIRA À 5 °C .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 93  |
| FIGURA 32 | GRÁFICOS DA AGREGAÇÃO DA AmB EM DIFERENTES FORMULAÇÕES. (a) ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA AmB EM ÁGUA E METANOL NA FAIXA DE 300 A 450 nm. (b) FACTOR R <sub>348/409</sub> DE AGREGAÇÃO DE TRÊS FORMULAÇÕES DE LIPOSSOMA CONTENDO AmB (60, 150 e 200 µg.mL <sup>-1</sup> ) AVALIADO DURANTE 16 DIAS .....                                                                                                      | 95  |
| FIGURA 33 | ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS DODAB E DODAB POLIMERIZADOS (40 °C) CONTENDO INICIALMENTE 200 µg.L <sup>-1</sup> de AmB .....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 100 |
| FIGURA 34 | MEDIDAS A DIFERENTES pH DO D <sub>happ</sub> * 2 E DE POTENCIAL ZETA EM LIPOSSOMAS DE DODAB CONTENDO OU NÃO AMB, E DEPOIS DA POLIMERIZAÇÃO "IN SITU". OS SISTEMAS QUE CONTÉM AmB ESTÃO EM 90 µg.mL <sup>-1</sup> . (Pref.=PRE-FORMADO) .                                                                                                                                                                | 101 |

## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1  | GRADIENTE DE FLUXO USADO PARA A DETERMINAÇÃO DO MONÔMERO RESIDUAL AA.....                                                                                                                                                                                                                                               | 49 |
| TABELA 2  | TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO OBTIDA PARA OS DISTINTOS LIPOSSOMAS POR ANALISE CALORIMÉTRICA, ADICIONANDO ÁCIDO ACRÍLICO A DISTINTAS CONCENTRAÇÕES, pH 5.....                                                                                                                                                                 | 59 |
| TABELA 4  | CONVERSÃO DO ÁCIDO ACRÍLICO EM POLI(ÁCIDO ACRÍLICO) PELA POLIMERIZAÇÃO “ <i>IN SITU</i> ” COM O LIPOSSOMA DE DODAB 1 mmol L <sup>-1</sup> (DODAB:DOPE 10:2 mol:mol) E O INICIADOR KPS (2 h A 70 °C). AS AMOSTRAS FORAM LIDAS APÓS 24 h DE REPOUSO A 25 °C, MEDIDO ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-Vis NA FAIXA DE 210 nm ..... | 72 |
| TABELA 5  | CONCENTRAÇÃO DO AA CONSUMIDO PELA POLIMERIZAÇÃO “ <i>IN SITU</i> ” COM O LIPOSSOMA DODAB:DOPE (10:2 mol:mol) A 1mmol L <sup>-1</sup> DE DODAB E O INICIADOR KPS APÓS DE 1 h E 24 h...                                                                                                                                   | 74 |
| TABELA 6  | CONSTANTE DE PSEUDO PRIMEIRA ORDEM PARA A POLIMERIZAÇÃO “ <i>IN SITU</i> ” DE AA <sup>a</sup> .....                                                                                                                                                                                                                     | 84 |
| TABELA 7  | FORMULAÇÕES DE LIPOSSOMA DD (DODAB:DOPE 10:2 mol:mol 1mmol L <sup>-1</sup> EM DODAB) PARA ENCAPSULAMENTO DE AmB .....                                                                                                                                                                                                   | 90 |
| TABELA 8. | FORMULAÇÕES DE LIPOSSOMA DD (DODAB:DOPE 10:2 mol:mol 1mmol L <sup>-1</sup> EM DODAB) PARA ENCAPSULAMENTO DE AmB, PRIMEIROS TESTES .....                                                                                                                                                                                 | 97 |
| TABELA 9  | FÓRMULAS DE LIPOSSOMAS COM AmB APÓS POLIMERIZAÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS.....                                                                                                                                                                                                                                        | 98 |
| TABELA 10 | RESULTADOS COMPARATIVOS DOS D <sub>happ</sub> E POTENCIAL ZETA DE LIPOSSOMAS DODAB E DD CONTENDO AmB (200µg.L <sup>-1</sup> ) .....                                                                                                                                                                                     | 99 |

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

|        |                                                                        |
|--------|------------------------------------------------------------------------|
| AA     | - ÁCIDO ACRÍLICO                                                       |
| ACOMP  | - AUTOMATIC CONTINUOUS ONLINE MONITORING OF<br>POLYMERIZATION REACTION |
| AFM    | - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA                                         |
| AmB    | - ANFOTERICINA B                                                       |
| BIOPOL | - LABORATÓRIO DE BIOPOLÍMEROS UFPR                                     |
| CLAE   | - CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA                             |
| CNTAB  | - BROMETO DE ALQUILTRIMETILAMÔNIO                                      |
| DDAB   | - BROMETO DE DODECILDIMETILAMÔNIO                                      |
| DLS    | - ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO                                         |
| DM     | - DINÂMICA MOLECULAR                                                   |
| DODAB  | - BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO                                  |
| DODAC  | - CLORETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO                                  |
| DOPE   | - 1,2-DIOLEOIL-SN-GLICERO-3-FOSFOETANOLAMINA                           |
| DPPC   | - DIPALMITOILFOSFATIDILCOLINA                                          |
| DSC    | - CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL                                |
| ESR    | - ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA<br>ELETRÔNICA            |
| KPS    | - PERSULFATO DE POTÁSSIO                                               |
| LUV    | - VESÍCULA UNILAMELAR GRANDE                                           |
| MLV    | - VESÍCULAS MULTILAMELARES                                             |
| MMA    | - METACRILATO DE METILA                                                |
| PAA    | - POLI(ÁCIDO ACRÍLICO)                                                 |
| PAR    | - INICIADORES ÁCIDO ASCÓRBICO E PERÓXIDO DE                            |
| REDOX  | HIDROGÊNIO                                                             |
| PMMA   | - POLI(METACRILATO DE METILA)                                          |
| PVAI   | - POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)                                                |
| QCM-D  | - MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO COM<br>DISSIPACÃO                 |
| UV-Vis | - ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL                               |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|            |                                                                       |
|------------|-----------------------------------------------------------------------|
| $b$        | - CAMINHO ÓTICO                                                       |
| $C$        | - CONCENTRAÇÃO                                                        |
| $D_1$      | - COEFICIENTE DE DIFUSÃO                                              |
| $D_{happ}$ | - DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE                                     |
| $\epsilon$ | - ABSORTIVIDADE                                                       |
| $f$        | - EFICIÊNCIA DO INICIADOR                                             |
| $k$        | - CONSTANTE DE VELOCIDADE PARA O INICIADOR                            |
| $k'$       | - CONSTANTE DE PSEUDO-PRIMEIRA ORDEM                                  |
| $k_d$      | - CONSTANTE CINÉTICA DE DECOMPOSIÇÃO/ CONSUMO DOS RADICAIS            |
| $k_{io}$   | - CONSTANTE CINÉTICA PARA A REAÇÃO DE INICIAÇÃO                       |
| $K_L$      | - CONSTANTE DE LANGMUIR                                               |
| $\lambda$  | - COMPRIMENTO DE ONDA                                                 |
| $LD$       | - LIMITE DE DETECÇÃO                                                  |
| $LQ$       | - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO                                             |
| $M_n$      | - MASSA MOLAR MÉDIA NUMÉRICA                                          |
| $p$        | - PROBABILIDADE DE SIGNIFICÂNCIA                                      |
| $q_m$      | - QUANTIDADE MÁXIMA ADSORVIDA                                         |
| $q_{sp}$   | - QUANTIDADE DE ÁGUA SUFICIENTE                                       |
| $r$        | - RAIO                                                                |
| $R^2$      | - COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO                                         |
| $r_p$      | - TAXA DE GERAÇÃO DOS RADICAIS                                        |
| $t_m$      | - TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO                                            |
| $T_P$      | - TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO EM LIPOSSOMAS DE FASE LAMELAR A ISOTRÓPICA |
| $T_S$      | - TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO EM LIPOSSOMAS DE GEL A GEL ONDULADO        |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                      | 22        |
| 1.1 JUSTIFICATIVA .....                                                                                                                                                                 | 24        |
| 1.2 OBJETIVOS .....                                                                                                                                                                     | 25        |
| Objetivo geral .....                                                                                                                                                                    | 25        |
| Objetivos específicos .....                                                                                                                                                             | 25        |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                                                                                                                    | <b>26</b> |
| 2.1 ESTRUTURAS AUTO-ASSOCIADAS DE MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS EM BICAMADAS .....                                                                                                              | 26        |
| 2.2 LIPOSSOMAS E AS SUAS PROPRIEDADES FÍSICAS .....                                                                                                                                     | 26        |
| 2.2.1 Métodos de carga e preparação de lipossomas .....                                                                                                                                 | 28        |
| 2.2.2 Surfactantes catiônicos de cadeia dupla: DODAB .....                                                                                                                              | 30        |
| 2.2.3 Temperaturas de transição de DODAB .....                                                                                                                                          | 32        |
| 2.2.4 Revestimentos poliméricos usados em lipossomas .....                                                                                                                              | 34        |
| 2.3 POLIMERIZAÇÃO VIA RADICALAR .....                                                                                                                                                   | 36        |
| 2.4 ANFOTERICINA B, ESTADOS DE AGREGAÇÃO E TOXICIDADE .....                                                                                                                             | 41        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                                       | <b>43</b> |
| 3.1 MATERIAL .....                                                                                                                                                                      | 43        |
| 3.2 MÉTODOS USADOS NA FORMAÇÃO DE FILMES E NANOCÁPSULAS DE LIPÍDEO CATIÔNICO DIMETILDIOCTADECILAMÔNIO (DODAB), REVESTIDOS POR POLIMERIZAÇÃO “ <i>IN SITU</i> ” COM ÁCIDO ACRÍLICO ..... | 43        |
| 3.2.1 Adsorção de ácido acrílico na superfície DODAB .....                                                                                                                              | 43        |
| 3.2.2 Preparação dos lipossomas de DODAB e DODAB:DOPE por meio de injeção de etanol .....                                                                                               | 44        |
| 3.2.3 Preparação dos lipossomas de DODAB e DODAB:DOPE em água .....                                                                                                                     | 44        |
| 3.2.4 Tamanho e estabilidade do lipossoma .....                                                                                                                                         | 45        |
| 3.2.5 Preparação dos lipossomas revestidos com poli(ácido acrílico) através do método de polimerização “ <i>in situ</i> ” com iniciador KPS .....                                       | 45        |
| 3.2.6 Preparação dos lipossomas revestidos com poli(ácido acrílico) através do método de polimerização “ <i>in situ</i> ” com iniciador peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico .....  | 46        |
| 3.2.7 Determinação da quantidade de ácido acrílico consumida na reação .....                                                                                                            | 46        |
| Método espectrofotométrico .....                                                                                                                                                        | 46        |

|                                                                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Sistema de monitoramento em tempo real ACOMP .....                                                                                                                                               | 47        |
| Determinação do ácido acrílico consumido na reação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....                                                                                             | 48        |
| 3.2.8 Estudos cinéticos de polimerização de ácido acrílico .....                                                                                                                                 | 49        |
| 3.2.9 Determinação da massa molar dos polímeros formados por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada a detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz laser (LLS)..... | 50        |
| 3.2.10 Microscopia de força atômica .....                                                                                                                                                        | 51        |
| 3.2.11 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....                                                                                                                  | 51        |
| 3.2.12 Tratamento estatístico .....                                                                                                                                                              | 51        |
| 3.3 MÉTODOS USADOS PARA O ENCAPSULAMENTO DE AMB NOS LIPOSSOMAS DODAB E DODAB-DOPE, REVESTIDOS PELA POLIMERIZAÇÃO “IN SITU” DE AA, ESTABILIDADE E OPTIMIZAÇÃO PARA A POLIMERIZAÇÃO. 51            |           |
| 3.3.1 Encapsulamento de Anfotericina B em Lipossoma DODAB e DODAB:DOPE.52                                                                                                                        |           |
| 3.3.2 Quantificação de Anfotericina B encapsulada .....                                                                                                                                          | 52        |
| 3.3.3 Estudos de agregação da Anfotericina B por métodoespectrofotométrico .....                                                                                                                 | 52        |
| 3.3.4 Estabilidade das formulações.....                                                                                                                                                          | 53        |
| 3.3.5 Estudo da estabilidade na polimerização “in situ” das formulações de lipossomas contendo AmB .....                                                                                         | 53        |
| 3.3.6 Determinação da quantidade de AmB presente após polimerização .....                                                                                                                        | 54        |
| 3.3.7 Preparação de polímero pré-formado e estabilidade com lipossoma DODAB contendo AmB.....                                                                                                    | 54        |
| 3.3.8 Tratamento estatístico .....                                                                                                                                                               | 54        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                            | <b>55</b> |
| 4.1 FORMAÇÃO DE FILMES E NANOCÁPSULAS DE LIPÍDEO CATIÔNICO DIMETILDIOCTADECILAMÔNIO (DODAB), REVESTIDOS POR POLIMERIZAÇÃO “IN SITU” COM ÁCIDO ACRÍLICO.....                                      | 55        |
| 4.1.1 Preparação dos lipossomas .....                                                                                                                                                            | 55        |
| 4.1.1.1 Estudos da temperatura de transição do lipossoma DODAB 1mmol L <sup>-1</sup> em água.....                                                                                                | 57        |
| 4.1.1.2 <i>Estudos calorimétricos das interações do lipossoma DODAB com o monômero ácido acrílico .....</i>                                                                                      | <i>59</i> |
| 4.1.1.3 <i>Lipossomas DODAB:DOPE por injeção de etanol.....</i>                                                                                                                                  | <i>61</i> |
| 4.1.1.4 <i>Ajuste da quantidade de etanol no preparo de lipossomas DODAB:DOPE .63</i>                                                                                                            | <i>63</i> |

|                                                                                                                                                                              |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.2 Tamanho e estabilidade térmica dos lipossomas .....                                                                                                                    | 63         |
| 4.1.3 Experimentos de adsorção de ácido acrílico em filmes DODAB e lipossomas                                                                                                | 65         |
| 4.1.4 Estudos do iniciador persulfato de potássio e a sua interação com lipossoma DODAB:DOPE na polimerização “in situ” com AA .....                                         | 69         |
| 4.1.4.1 Conversão de AA a PAA utilizando quantificação por UV-Vis .....                                                                                                      | 71         |
| 4.1.4.2 Polimerização de AA em PAA utilizando sistema ACOMP .....                                                                                                            | 73         |
| 4.1.4.3 Outros estudos da polimerização do lipossoma com KPS.....                                                                                                            | 74         |
| 4.1.5 ESTUDOS DO INICIADOR PAR REDOX: PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E ÁCIDO ASCÓRBICO, E A SUA ESTABILIDADE COM O LIPOSSOMA DODAB:DOPE NA POLIMERIZAÇÃO “IN SITU” COM AA .....      | 75         |
| 4.1.6 Estudo da conversão de AA em PAA utilizando sistema ACOMP usando como iniciadores peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico .....                                       | 76         |
| 4.1.7 Resultados da determinação da quantidade consumida de AA com iniciador ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio .....                                                  | 79         |
| 4.1.8 Caracterização de lipossoma revestido com poli(ácido acrílico) .....                                                                                                   | 85         |
| 4.2 Encapsulamento de AmB nos lipossomas DODAB E DODAB-DOPE, revestidos pela polimerização “in situ” de AA, estabilidade, toxicidade e otimização para a polimerização ..... | 89         |
| 4.2.1 Encapsulamento de Anfotericina B (AmB).....                                                                                                                            | 89         |
| 4.2.2 Estudo do tamanho e potencial zeta das formulações com AmB .....                                                                                                       | 92         |
| 4.2.3 Armazenamento e estabilidade dos lipossomas.....                                                                                                                       | 92         |
| 4.2.4 Estudos da agregação da AmB nas formulações .....                                                                                                                      | 93         |
| 4.2.5 Testes de estabilidade coloidal para os lipossomas revestidos com polímero pré-formado.....                                                                            | 94         |
| 4.2.6 Potencial zeta e $D_{happ}$ das formulações de lipossoma DODAB polimerizado contendo AmB.....                                                                          | 99         |
| 4.2.7 Estabilidade no tempo dos lipossomas DODAB contendo AmB.....                                                                                                           | 99         |
| 4.2.8 Potencial zeta e $D_{happ}$ em diferentes pH .....                                                                                                                     | 100        |
| <b>5 CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                                                    | <b>103</b> |
| <b>6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>                                                                                                                          | <b>104</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                    | <b>105</b> |
| <b>8 ANEXOS .....</b>                                                                                                                                                        | <b>115</b> |

## INTRODUÇÃO

Os sistemas auto-organizados de biomoléculas, como lipídeos, têm sido amplamente utilizados para o desenvolvimento de formulações para o transporte e vetorização de fármacos ou genes (PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016). Tais estruturas podem gerar uma infinidade de arquiteturas em termos de tamanho, forma e composição, apresentando uma grande vantagem inerente a tais sistemas: a biocompatibilidade.

Tais sistemas, grosseiramente, podem ser divididos em termos de interação celular em dois grandes grupos: (i) os que são estabilizados de forma estérea com poli(etileno glicol), com surfactantes não-iônicos e com surfactantes aniônicos e anfotéricos e (ii) os altamente interativos, os catiônicos (LEE, 2008; YINGCHONCHAROEN; KALINOWSKI; RICHARDSON, 2016).

Os sistemas catiônicos podem ser utilizados para incorporar e estabilizar fármacos ou genes e protegê-los de degradação *in vivo* (LEMARCHAND; GREF; COUVREUR, 2004). Entretanto, os materiais catiônicos interagem de forma inespecífica com o sistema biológico, através da interação com a superfície negativa celular, gerando uma alta interatividade celular. Assim, para torná-los vetorizáveis, deve-se utilizar marcadores superficiais como os polímeros inteligentes, que direcionam biologicamente o fármaco, e adicionalmente, controlam a cinética de liberação dos ativos (SCARIOTI et al., 2011). Como outros exemplos de modificação da superfície de sistemas catiônicos tem-se as realizadas em nanopartículas de quitosana com polimerização *“in situ”* de ácido acrílico como um novo agente mucoadesivo (D’AGOSTINI-JUNIOR et al., 2011), modificação de xiloglucana para avaliar a cinética, as alterações de massa molar, conformação e geleificação durante processos de degalactosilação enzimática em tempo real (FREITAS et al., 2011) e a polimerização *“in situ”* do ácido acrílico (AA) na superfície de lipossomas catiônicos (SCARIOTI et al., 2011).

Utilizar sistemas catiônicos como um tipo de molde para a modificação de superfície é uma estratégia importante pois permite estudar as interações que ocorrem nas interfaces partícula-solvente, como por exemplo o fenômeno adsortivo de monômeros e polímeros. O conhecimento detalhado de tais fenômenos permitiria alcançar um maior controle do sistema, estabilidade e tempo de liberação (CSEMPESZ, 2011). Além disso as modificações da reatividade superficial de

lipídeos catiônicos podem contribuir para uma maior efetividade da resposta antiparasitária, como em leishmanioses, direcionando a vetorização de ativos em seus sítios específicos. As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que podem apresentar diferentes formas clínicas e causar endemias que levam a um problema médico-social grave nos países em desenvolvimento (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999; BRAVO; SANCHEZ, 2003; TORRES GUERRERO et al., 2017).

A terapia atual para o tratamento das leishmanioses é limitada, usualmente associada a efeitos colaterais, sendo considerada crítica no processo de tratamento. Por conseguinte, a pesquisa e desenvolvimento de novos sistemas de liberação para o tratamento de doenças negligenciadas, causadas por agentes infecciosos ou parasitas, tornam-se necessárias para reduzir a toxicidade e a adesão do paciente, além de que estas doenças são consideradas endêmicas em populações de baixa renda. Uma outra barreira é que novas substâncias químicas com potencial terapêutico esbarram na instabilidade ou baixa biodisponibilidade do fármaco (SOARES BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004; TORRES GUERRERO et al., 2017).

A principal hipótese deste trabalho é que nanocápsulas de lipídeos catiônicos, obtidas por polimerização *"in situ"* de monômeros de ácido acrílico (AA), podem modular a reatividade dos lipossomas e vetorizar as nanocápsulas, contendo fármacos leishmanicidas, para alvos específicos tais como células fagocíticas. Assim, no presente trabalho serão apresentados os resultados obtidos do desenvolvimento de filmes e nanocápsulas gerados pela polimerização *"in situ"* do monômero AA na superfície de lipossomas de DODAB (dimetildioctadecilamônio) e DODAB:DOPE (dimetildioctadecilamônio: 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) e em sistemas bidimensionais (filmes) de DODAB. Posteriormente estas estruturas geradas foram caracterizadas por análises tais como gravimetria em microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D), tensiometria, microscopia de força atômica (AFM), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta.

Foram estabelecidos, na presente proposta, os parâmetros necessários para manter a estabilidade no meio coloidal de lipossomas de DODAB e DODAB:DOPE durante a polimerização de ácido acrílico a poli(ácido acrílico). Entre estes parâmetros estudados foram o tipo de iniciador, como

persulfato de potássio (KPS) ou o par redox de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio, conjuntamente com parâmetros como a temperatura de reação, otimizando as condições reacionais para suportar as variações de temperatura durante a reação.

Também se utilizou o sistema ACOMP “Automatic continuous online monitoring of polymerization reaction” (FLORENZANO; STRELITZKI; REED, 1998), para monitorar os processos de polimerização, ou seja, a conversão dos monômeros (D’AGOSTINI-JUNIOR et al., 2011; SCARIOTI et al., 2011). Outro método que foi necessário usar para a quantificação da polimerização do AA foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia proposta é amplamente utilizada para determinação de monômero AA residual neste tipo de sistemas complexos (BRADEN; DAVY, 1991; KOSSEN; RESINS; ZOOM, 2001; OSWALD et al., 2015; SAROJA; THARANATHAN, 2000), pois permite a separação necessária e adequada para a determinação quantitativa do consumo do monômero AA, durante a polimerização “*in situ*” usando como molde o lipossoma. Por meio do mesmo método foi realizado o estudo cinético desta polimerização “*in situ*” com o lipossoma.

Nas últimas etapas deste trabalho foram desenvolvidas formulações para o encapsulamento do fármaco Anfotericina B (AmB) dentro das nanocápsulas DODAB:DOPE e DODAB. A AmB é amplamente usada para o tratamento de leishmanioses visceral e cutânea, e em sua forma lipossomada comercializada, apresenta uma nefrotoxicidade reduzida (DENNING; HOPE, 2010; FALCI; PASQUALOTTO, 2015; OLIVEIRA; BENATTI; LAMY, 2011a). Parâmetros como a eficiência de encapsulamento e toxicidade, associada à agregação do AmB também foram avaliadas nesta proposta (BARWICZ; CHRISTIAN; GRUDA, 1992; OLIVEIRA; BENATTI; LAMY, 2011b).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Uma vez conhecido que o protozoário (*Leishmania*) causador da Leishmaniose é um parasita intracelular obrigatório de fagócitos mononucleares - o que significa que precisam de uma célula hospedeira viva para realizar o seu ciclo replicativo-, pode-se desenvolver sistemas vetorizados para células fagocíticas, a partir de superfícies imuno-adjuvantes, contribuindo ativamente na eficácia e potência farmacológica (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999; SOARES BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

Entre os agentes para vetorização de partículas em células fagocíticas sugere-se o PAA, que apresenta ação imunoadjuvante, melhorando a resposta antiparasitária por via intravenosa ou cutânea. Assim, a hipótese é que o revestimento das matrizes de lipídeos catiônicos, usados como núcleos de incorporação de ativos, gerará uma partícula que será ativamente reconhecida por macrófagos, que removerão a partícula e, conseqüentemente, o ativo da circulação, aumentando assim a eficácia e potência farmacológica (LEE; NGUYEN, 2013; SIMÕES et al., 2017; YUBA, 2016).

Com base no apresentado, entre os aspectos de inovação deste projeto tem-se: 1) Aprofundar o entendimento de interfaces bidimensionais e tridimensionais catiônicas na adsorção e polimerização do PAA; 2) Estudar a adsorção e cinética de polimerização, utilizando CLAE, DLS e potencial zeta; 3) Desenvolver cápsulas de lipossoma contendo AmB, determinando a eficiência de incorporação e a melhor metodologia para polimerização, na presença do fármaco.

## 1.2 OBJETIVOS

### *Objetivo geral*

Avaliar a polimerização “*in situ*” de ácido acrílico na superfície de lipossoma DODAB:DOPE para vetorização de fármacos no tratamento da leishmaniose.

### *Objetivos específicos*

Monitorar a formação de filmes e nanocápsulas de lipídeo catiônico dimetildioctadecilamônio (DODAB), revestidos por polimerização “*in situ*” com AA, utilizando técnicas de microbalança de cristal de quartzo (QCM) e espectroscópicas;

Confirmar e caracterizar a formação das superfícies dos filmes e nanocápsulas por tensiometria, microscopia de força atômica e para os sistemas tridimensionais, potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico;

Determinar a massa molar do polímero formado na superfície;

Realizar estudos de incorporação do fármaco Anfotericina B em tratamento da leishmaniose, bem como determinar a eficiência de encapsulação;

Analisar o efeito do pH sobre as nanocápsulas geradas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Estruturas auto-associadas de moléculas anfifílicas em bicamadas**

As bicamadas são formadas geralmente por surfactantes, que apresentam uma propriedade anfifílica ou anfipática caracterizados por ter uma cabeça hidrofílica e uma calda hidrofóbica que permite a formação de bicamadas em determinadas condições, favorecendo o aumento das interações hidrofóbicas entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e a diminuição das interações entre os grupos ionizáveis de suas cabeças. Em surfactantes com uma única calda, as bicamadas podem ser formadas em altas concentrações e em situações excepcionais. Porém, para formar bicamadas em baixas concentrações de surfactantes ou com concentrações de contra-íons muito baixas, são usados comumente os surfactantes com calda dupla. Estes surfactantes são classificados como catiônicos, aniônicos ou zwitteriônicos, com base na carga intrínseca de seus grupos principais, os quais por terem grupos de cauda volumosos permitem terem fatores de empacotamento iguais, aproximadamente, a 1 (LEE, 2008; ROUSSEAU; RAFANAN; YADA, 2011).

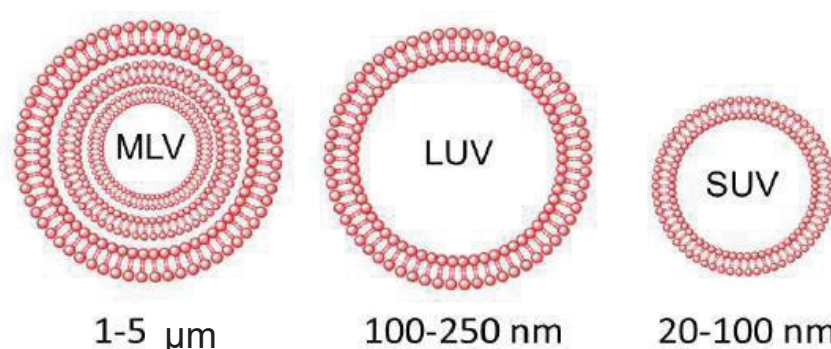
### **2.2 Lipossomas e as suas propriedades físicas**

O lipossoma, descoberto por Bangham em 1965, é uma palavra grega que significa “corpo gordo”, referindo-se às vesículas que são compostas apenas de lipídios (naturais e sintéticos). Ele consiste em um compartimento aquoso rodeado por uma ou mais bicamadas lipídicas. Já os niossomas são vesículas formadas apenas por surfactantes não iônicos. O tamanho dos lipossomas pode variar de 20 nm a 5  $\mu\text{m}$ , mas a espessura de cada bicamada é limitada à 3-5 nm (GREGORIADIS; FLORENCE, 1993; LEE, 2008; PATTNI; CHUPIN; TORCHILIN, 2015).

Na FIGURA 1 observa-se a classificação dos lipossomas, com base em sua lamelaridade e tamanho. As vesículas multilamelares (MLV) são compostas por uma série de membranas concêntricas de bicamada fosfolipídica separadas por uma fase aquosa. São grandes em tamanho e podem chegar até 5  $\mu\text{m}$ . Existem também as

vesículas unilamelares pequenas (SUV) as quais são compostas de um compartimento aquoso fechado por uma única bicamada lipídica. O tamanho destes lipossomas está entre 20-100 nm. E por último a vesícula unilamelar grande (LUV) a qual possui uma única bicamada lipídica envolvendo o compartimento aquoso, com tamanho entre 100-250 nm (LEE, 2008; YUBA, 2016).

FIGURA 1 CLASSIFICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS COM BASE NA LAMELARIDADE: AS VESÍCULAS MULTILAMELARES (MLV); VESÍCULA UNILAMELAR GRANDE (LUV) E PEQUENAS VESÍCULAS UNILAMELARES (SUV) (PANDEY; RANI; AGARWAL, 2016)



Os lipossomas, na maioria dos casos, são estruturas auto-associadas e termodinamicamente instáveis, mas metaestáveis devido a fatores cinéticos, conseguindo ser estáveis por meses ou anos. Estes fatores cinéticos são devido à interação hidrofóbica forte na bicamada lipídica, que associado ao empacotamento e formação de uma estrutura com forma fechada, eliminando o contato com a água, favorece maior estabilidade coloidal com o ambiente circundante. Por exemplo, a taxa de troca do monômero com a bicamada é da ordem de  $10^{-3}$ - $10^{-2}$  monômeros/s, ou seja, a dinâmica da bicamada é 2 - 5 ordens de magnitude mais lenta quando comparada com a dinâmica da micela, onde a taxa é  $10^{-3}$ - $10^{-1}$  monômeros/s (LEE, 2008; LI et al., 2019; YUBA, 2016).

Os lipossomas têm propriedades vantajosas como carregadores de fármacos, uma vez que são compostos de fosfolipídios não imunogênicos, não tóxicos e biodegradáveis, de origem de produtos naturais. Entretanto, o uso de outras moléculas anfifílicas, não apenas fosfolipídeos, é amplamente citada em literatura. Os lipossomas podem ser otimizados em vários tamanhos e composições, que são modulados pelos métodos de preparo. Assim, pode-se encapsular no núcleo hidrofílico, ou na bicamada hidrofóbica, adsorvido ou ancorado eletrostaticamente na

superfície. Além disso, os lipossomas apresentam vantagens como a prevenção da degradação enzimática e o aumento da absorção nas membranas celulares biológicas para aumentar a biodisponibilidade (EVELYN ROOPNGAM, 2019; LI et al., 2019).

### *2.2.1 Métodos de carga e preparação de lipossomas*

Os lipossomas podem ser preparados por vários métodos, os quais influenciarão suas propriedades como tamanho, forma, encapsulamento e até sobre as propriedades térmicas (BENATTI et al., 2001; MAJA; ŽELJKO; MATEJA, 2020). Assim, pode-se modelar algumas características do lipossoma por meio dos diferentes métodos de preparação. A escolha correta do método de preparação de lipossomas depende das características físico-químicas do material a ser encapsulado e do surfactante, a natureza do meio em que as vesículas lipídicas estão dispersas, a concentração efetiva da substância aprisionada e sua toxicidade potencial; bem como processos adicionais envolvidos durante a aplicação/entrega das vesículas; tamanho ideal, polidispersão e vida útil das vesículas para a aplicação pretendida, bem como da reprodutibilidade (DUA; RANA; BHANDARI, 2012).

Os métodos de preparação podem ser divididos em convencionais e novos, embora na literatura encontre-se também outras classificações como as técnicas passivas e ativas de carregamento. Entre as passivas estão os métodos de: dispersão mecânica, dispersão em solventes, e de remoção com detergentes, e entre os métodos de dispersão mecânica estão a sonicação, célula de extrusão francesa, hidratação de filme, microemulsificação, congelamento e descongelamento de lipossomas e extrusão por membrana (AKBARZADEH et al., 2013; DUA; RANA; BHANDARI, 2012).

A sonicação de lipossomas é descrita em literatura tanto pelo uso de sonda ou banho de ultrassom. A excessiva aplicação de energia por sonda pode gerar a desesterificação de fosfolipídeos, bem como o tempo é uma variável importante pois também induz a formação de MLV. No método de extrusão francesa os MLV, através da aplicação de pressão, atravessam um pequeno orifício a 4 °C a 20.000 psi. Os lipossomas resultantes são muito maiores do que os lipossomas SUV obtidos por sonicação. Entre as desvantagens do método estão os volumes de trabal

comparativamente pequenos (cerca de 50 mL no máximo) (AKBARZADEH et al., 2013; DUA; RANA; BHANDARI, 2012; PATIL; JADHAV, 2014). Os lipossomas SUV, durante o processo de congelamento rápido e descongelamento, formam lipossomas LUV, resultantes da fusão dos SUV (DUA; RANA; BHANDARI, 2012; PATIL; JADHAV, 2014).

Outro método é a injeção de solvente o qual baseia-se em que um solvente orgânico (etanol ou éter), contendo fosfolipídios dissolvidos, é injetado em fase aquosa, ocorrendo a formação espontânea de lipossomas SUV. Quando o etanol é injetado, ele dissolve-se em água e a diluição do etanol abaixo de uma concentração crítica força os fosfolipídios dissolvidos a se auto organizar na fase aquosa e formar lipossomas SUV. Em contraste, ao injetar uma solução de fosfolipídios em éter na água em uma dada temperatura, a formação de SUV resulta da evaporação do éter (BANGHAM; STANDISH; WEISSMANN, 1965; PATIL; JADHAV, 2014; SHASHI; SATINDER; BHARAT, 2012).

A hidratação de filmes é um método convencional onde os fosfolipídios são dispersos em solventes como clorofórmio ou metanol, ou uma mistura deles. O solvente orgânico depois deve ser removido por evaporação rotativa produzindo uma fina película lipídica nas laterais de um frasco de fundo redondo. O filme lipídico é completamente seco para remover o solvente orgânico residual. Após este filme é reidratado com água numa temperatura acima da  $T_m$  (temperatura de transição de estado gel a estado líquido cristalino) do lipídeo, com uma agitação vigorosa. Geralmente se forma uma suspensão de MLV hidratada, as partículas podem ser reduzidas a um menor tamanho por uma variedade de técnicas, incluindo sonicação ou extrusão (BANGHAM; DE GIER; GREVILLE, 1967; SHASHI; SATINDER; BHARAT, 2012).

A evaporação de fase reversa envolve a formação de emulsão de água em óleo entre a fase aquosa (contendo materiais hidrofílicos) e a fase orgânica (contendo lipídios e quaisquer materiais hidrofóbicos). A remoção da fase orgânica sob pressão reduzida produz um gel leitoso que posteriormente se transforma em suspensão lipossomal. Uma das desvantagens é que frações da fase orgânica podem ficar presentes no sistema (AKBARZADEH et al., 2013; NKANGA; BAPOLISI, 2019). Na remoção de detergentes, os fosfolipídios são solubilizados por micelas de detergente em uma fase aquosa. A remoção subsequente do detergente por diálise resulta na coalescência das micelas ricas em fosfolipídios e na formação de

lipossomas LUV. Técnicas cromatográficas também têm sido empregadas para a remoção de detergentes. Os lipossomas formados por esta técnica, mantém grande homogeneidade (DUA; RANA; BHANDARI, 2012; PATIL; JADHAV, 2014; SHASHI; SATINDER; BHARAT, 2012).

Entre os novos métodos de preparo estão a microfluidização onde os lipídeos dissolvidos em fase orgânica são impulsionados perpendicularmente ao meio aquoso, através de microcanais. Outro método usado é através do uso de fluidos supercríticos que elimina o uso de solventes pelo que é promissor como novométodo de preparo (LI et al., 2019; MAJA; ŽELJKO; MATEJA, 2020). Um outro ponto importante no preparo de lipossomas é a esterilidade para futuros testes em células, animais ou no mesmo humano, o qual se atinge muitas das vezes com: a utilização de filtração esterilizante através de poros de 400 a 200 nm, esterilizando as matérias primas, mantendo precaução na esterilidade no processo de preparo, com o uso de uma capela de fluxo laminar, e com uso de contenedores esterilizados (DUA; RANA; BHANDARI, 2012; MAJA; ŽELJKO; MATEJA, 2020; SHASHI; SATINDER; BHARAT, 2012).

Para proteger da agregação, hidrólises ou oxidação é possível o uso de pro-lipossomas, onde o lipídeo e o fármaco são revestidos sobre um transportador solúvel para formar um material granular de fluxo livre que, por hidratação, forma uma suspensão lipossomal isotônica. Outro modo é o uso de liofilização, e o recobrimento com polímeros para um maior tempo de circulação (DUA; RANA; BHANDARI, 2012; MAJA; ŽELJKO; MATEJA, 2020).

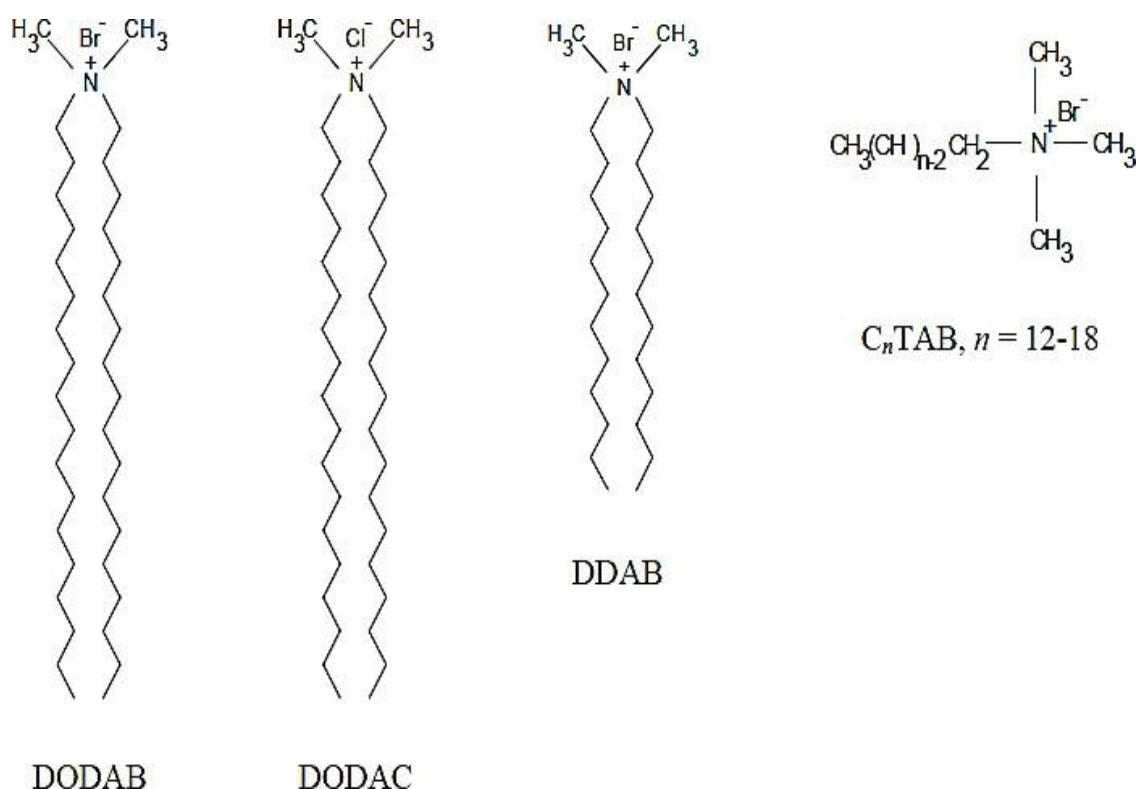
### *2.2.2 Surfactantes catiônicos de cadeia dupla: DODAB*

O DODAB (FIGURA 2) é um surfactante quaternário de amônio com uma dupla cadeia alquílica, que se auto-associa espontaneamente em bicamadas lipídicas em ambientes aquosos, formando os lipossomas catiônicos. No entanto, a morfologia dessas estruturas depende fortemente do método de preparo. Após uma longa sonicação, fragmentos de bicamada são formados, enquanto que o processo de extrusão resulta na formação de estruturas vesiculares não-esféricas e facetadas (BENATTI et al., 2001; JAMRÓZ; KEPCZYNSKI; NOWAKOWSKA, 2010).

Estudos sobre os métodos de preparo dos lipossomas de DODAB foram realizados por diferentes autores (BENATTI et al., 2001; BRITO; MARQUES, 2005;

FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000) e foi observado que tanto o tempo, o tipo de sonicação (banho ou sonda), a concentração, os diferentes solventes geravam variações nos lipossomas de DODAB, como mudanças na temperatura de transição de fase ( $T_m$ ), no tamanho e na estabilidade dos mesmos.

FIGURA 2 ESTRUTURAS MOLECULARES DE SURFACTANTES FORMADORES DE VESÍCULAS E MICELAS: DODAB, BROMETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO; DODAC, CLORETO DE DIOCTADECILDIMETILAMÔNIO; DDAB, BROMETO DE DODECILDIMETILAMÔNIO E CNTAB, BROMETO DE ALQUILTRIMETILAMÔNIO. FONTE: (ALVES, 2008)



Entre os métodos de preparo de lipossomas catiônicos têm-se a injeção lenta de solvente contendo surfactante, ou a hidratação de filme, os quais são os métodos mais amplamente utilizados para preparar lipossomas SUV e LUV, respectivamente, de DODAX ( $X = Cl$  ou  $Br$ ) e outras substâncias anfífilas sintéticas (CUCCOVIA et al., 1979).

As vesículas de DODAB têm encontrado amplo uso tanto em estudos físico-químicos sobre fenômenos interfaciais como em aplicações práticas como sistemas carreadores de DNA para transfecção de genes, adjuvantes e veículos para administração de fármacos (AYANE et al., 2018; OLIVEIRA; BENATTI; LAMY,

2011a; SILVA; OLIVEIRA; GOMES, 2012). Foram realizadas simulações por Jamróz, Kepczynski e Nowakowska (2010) por meio de software de dinâmica molecular (DM) para obter informações sobre a organização da bicamada DODAB que mostraram que a membrana do surfactante se organiza espontaneamente à 25°C, onde dois domínios diferentes estão presentes: o domínio “zipado” em que os grupos alcanos de cadeias longas das monocamadas superiores e inferiores são interdigitadas com uma espessura de 2,4 nm, e o domínio “descompactado”, onde as monocamadas estão separadas por uma distância de 4,0 nm. A densidade média calculada da bicamada hidratada DODAB e a área calculada por a molécula de DODAB foram de 0,99 g/cm<sup>3</sup> e 0,58 nm<sup>2</sup>, respectivamente. Os resultados concordaram com o valor determinado experimentalmente de 0,98 g/cm<sup>3</sup> e 0,56 nm<sup>2</sup>, respectivamente para a densidade média e área calculada por molécula de DODAB, obtidos através do modelo de adsorção de Langmuir (JAMRÓZ; KEP CZYNSKI; NOWAKOWSKA, 2010; RUANO, 2013).

Os estudos realizados através de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espalhamento de luz laser dinâmico (DLS) das vesículas catiônicas de brometo de dialquildimetilamônio (D<sub>n</sub>DAB), com n = 12, 14, 16 e 18 carbonos (FEITOSA; EDWARDS, 2006) mostraram que a T<sub>m</sub> e raio hidrodinâmico (R<sub>h</sub>) aumentam de forma não linear.

Além disso, foram obtidos resultados onde a T<sub>m</sub> das vesículas de DODAX (X= Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>) pela técnica ESR, DSC e turbidez apresentaram um aumento quando conseguidas por aquecimento do que por resfriamento da amostra, fenômeno este conhecido como histerese do comportamento termotrópico (FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000; NASCIMENTO; RAPUANO; LESSA, 1998; OLIVEIRA; BENATTI; LAMY, 2011a). Aliás, mostrou-se que a histerese diminui com o aumento do tamanho e a hidratação do contra-íon (ALVES, 2008; OLIVEIRA, 2008).

### *2.2.3 Temperaturas de transição de DODAB*

As vesículas realizadas a partir de DODAB, uma vez formadas, apresentam temperaturas de transição, onde é possível observar diferentes estados de organização da bicamada. Comumente uma vesícula natural ou sintética tem uma

temperatura de transição de estado gel para líquido-cristalino ( $T_m$ ), abaixo da  $T_m$  (estado gel) as cadeias de hidrocarbonetos na bicamada estão mais ordenadas e rígidas, enquanto que acima da  $T_m$  (estado líquido-cristalino) as caudas são flexíveis e desordenadas (ALVES, 2008; SHASHI; SATINDER; BHARAT, 2012). A transição de um para o outro estado, em geral, ocorre numa estreita faixa de temperatura.

Nas vesículas de DODAB realizadas em altas concentrações (FIGURA 3) e dependendo do método de preparo, além da transição de estado gel para líquido-cristalino, elas também apresentam uma temperatura de pré e uma pós-transição de fase, com temperaturas bem definidas,  $T_s \approx 33.3^\circ\text{C}$  e  $T_p \approx 51^\circ\text{C}$ , respectivamente (FEITOSA, 2004). A  $T_s$  está relacionada à transição de um estado gel para um estado gel ondulado, enquanto que  $T_p$  está associada à transição de fases lamelares locais para uma fase totalmente isotrópica de vesículas uni ou multilamelares (FIGURA 4). A técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma ferramenta importante para investigar essas transições de estados. As três transições são endotérmicas quando a amostra é aquecida e exotérmica no resfriamento (ALVES, 2008; ALVES et al., 2007).

FIGURA 3 TERMOGRAMAS PARA VESÍCULAS DE DODAB  $10\text{mmol L}^{-1}$  PREPARADA COM DIFERENTES TEMPOS DE SONICAÇÃO (0, 5, 30, 60 MIN). AS AMOSTRAS FORAM ESCANADAS DEPOIS DE 30 MIN DE PREPARADA. NS= NÃO SONICADA- TS= SONICAÇÃO DE TIP – BS=SONICAÇÃO DE BANHO. O TEMPO EM MINUTOS SE REFERE AO TEMPO DE SONICAÇÃO.  $T_s$ = TEMPERATURA DE PRÉ-TRANSIÇÃO  $T_m$ = TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO  $T_p$ = TEMPERATURA DE PÓS-TRANSIÇÃO (BRITO; MARQUES, 2005).

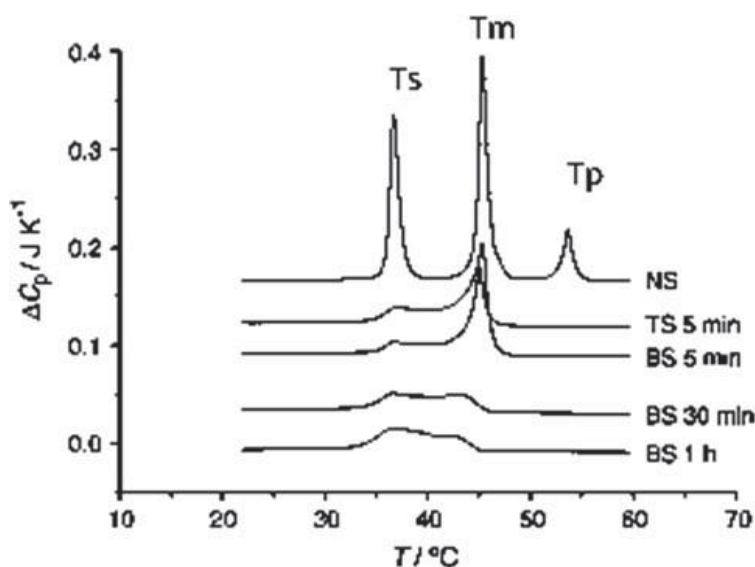
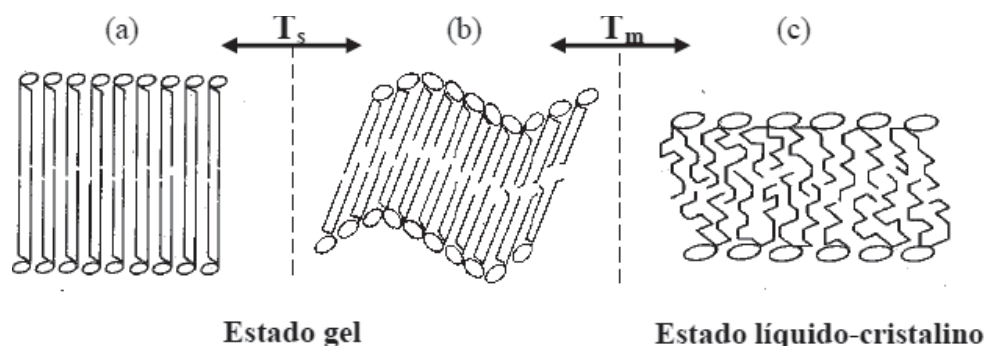


FIGURA 4 ESTADO DAS TRANSIÇÕES DE FASE EM VESÍCULAS: (A) ESTADO GEL, (B) ESTADO GEL ONDULADO E (C) ESTADO LÍQUIDO-CRISTALINO (ALVES, 2008).



Pela variedade e mudança das propriedades próprias destes sistemas, é esperado que quando esses lipídios são misturados com outras moléculas, pequenas diferenças influenciarão nas propriedades gerais dos nanocarregadores e terão um impacto dramático no desempenho final das vesículas lipídicas. Por isso, usualmente, são utilizados lipídeos não iônicos para gerar maior estabilidade da vesícula catiônica, por exemplo, a monoleína (MO), usada junto com DODAB para encapsulação RNA (NORBETO et al., 2014), o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (SOBRAL; SOTO; CARMONA-RIBEIRO, 2008), também já foi usado para esta finalidade. Outro exemplo é o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) que é um lipídeo não iônico, não tóxico e amplamente usado na criação de lipossomas. A adição de lipídeos adjuvantes pode auxiliar na estabilização da estrutura das membranas lipídicas, resistindo aos danos das proteínas do soro às membranas e ajustando a temperatura de transição da membrana, especialmente para lipossomastermossensíveis (LI et al., 2019; SCARIOTI et al., 2011). Outros autores também realizaram estudos com DOPE para aumentar a estabilidade térmica dos lipossomas de DODAB (HUNGERFORD et al., 2006; SCARIOTI et al., 2011).

#### 2.2.4 Revestimentos poliméricos usados em lipossomas

A utilização de polímeros no revestimento de lipossomas pode ocorrer por adsorção física ou ligação química, como exemplo de adsorção física são utilizados polímeros para o revestimento de lipossomas, como realizados por Takeuchi *et al.* (2000) com poli(álcool vinílico), ou Scarioti *et al.* (2011) com poli(ácido acrílico)

(PAA) ou como ligação química entre o surfactante e o polímero, conforme descrito por LI *et al.* (2013), em que há uma reação química do surfactante com PAA.

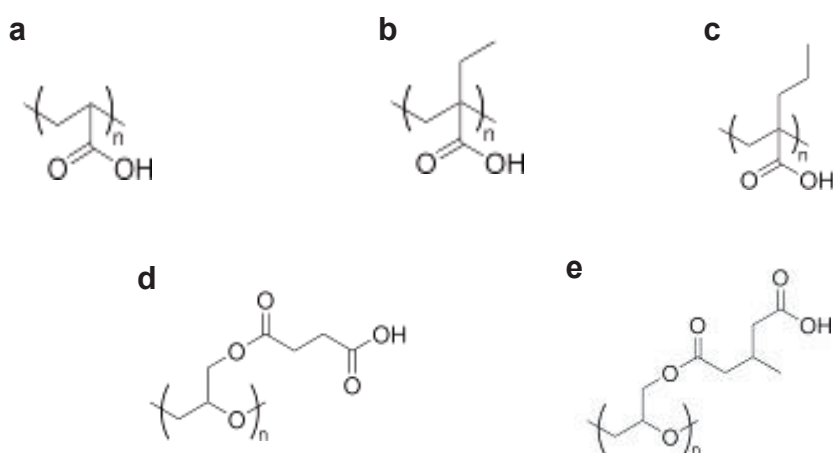
Entre os polímeros solúveis em água e amplamente utilizados na liberação de fármacos, destacam-se: poliacrilamidas, polimetacrilamidas e poli(etileno glicol) (ALVES *et al.*, 2009; D'AGOSTINI-JUNIOR *et al.*, 2011; EVELYN ROOPNGAM, 2019; LI *et al.*, 2013; SCARIOTI *et al.*, 2011) utilizados principalmente em aplicações mais sofisticadas, como lipossomas invisíveis ao sistema retículoendotelial ou sistema mononuclear fagocitário, formando superfícies com baixa aderência à proteínas, minimizando o processo de opsonização. Os polímeros apresentam um grande volume de exclusão em solução aquosa, maior que outros polímeros hidrossolúveis com massa molar similar, produzindo um impedimento estérico significativo a fenômenos adsortivos e aumentando a estabilidade coloidal (NIE *et al.*, 2012).

A incorporação de poli(ácido-2-etilacrílico) (FIGURA 5) na superfície do lipossoma aumentou a liberação de fármacos em meios mais ácidos, gerando uma liberação controlada pelo pH. Tanto o PAA, como os seus derivados, quando presentes na superfície do lipossoma, também aumentam a liberação de fármacos em meios ácidos, abaixo do pKa 4,25 do AA, rompendo a membrana do lipossoma. Além disso, PAA é um polímero biocompatível, abundantemente utilizado em formulações farmacêuticas e cosméticas, que responde de diferentes maneiras dependendo do pH do meio, controlando o lipossoma ao ponto de ser capaz de liberar o fármaco em meios mais ácidos (LI *et al.*, 2013; SIMÕES *et al.*, 2017).

Os lipossomas revestidos com PAA têm todas as características fundamentais para serem utilizados como sistemas de administração e liberação inteligente de fármacos, especialmente, por possibilitar a reticulação, aumentando o grau de retenção das moléculas encapsuladas, permitindo que as cápsulas de lipossomas catiônicos obtidos através de polimerização "*in situ*" sejam usados como vetores e, por sua vez, tornando-o mecanicamente resistentes. Ademais, como já citado anteriormente, quando tais cápsulas reticuladas alcançam um meio ácido, contraem e há colapso, liberando assim todo o conteúdo carregado. Para obter complexos reticulados com o PAA em lipossomas tem sido adicionados N-ciclo-hexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodimidameto-p-toluenossulfonato e etilenodiamina de acordo com a razão molar de grupos carboxílicos presentes em cada formulação (SIMÕES *et al.*,

2017). Assim, dependendo da aplicação, é possível selecionar uma liberação lenta (sem reticulação) ou uma liberação instantânea, com reticulação do PAA (LI et al., 2013; SIMÕES et al., 2017).

FIGURA 5 ESTRUTURAS DE POLIMEROS PH-RESPONSIVOS (a) POLI(ÁCIDO ACRÍLICO) (b) POLI(ÁCIDO 2-ETILACRÍLICO), (c) POLI(ÁCIDO 2-PROPILACRÍLICO) (d) SucPG POLI(SUCCINILADO GLICIDOL), (e) MGIuPG POLI(3-METILGLUTARILADO GLICIDOL)



Notavelmente, o poli(ácido propilacrílico) tem uma maior capacidade de induzir a ruptura da membrana lipossomal, respondendo a um pH levemente ácido, se comparado ao poli(ácido etilacrílico). O poli(ácido propilacrílico) tem sido aplicado na liberação de antígeno por conjugação direta a proteínas antigênicas. Esses conjugados antígeno-polímero induzem uma apresentação cruzada *in vitro* e resposta imuno-celular *in vivo* (YUBA, 2016), reforçando a capacidade dos polímeros acrílicos em induzir uma vetorização em células do sistema imune.

### 2.3 Polimerização via radicalar

Entre os tipos de reações de polimerização pode-se nomear as reações de adição, ou poliadições e reações de condensação, ou policondensações. Os polímeros de adição em geral têm a cadeia regularmente constituída por apenas átomos de carbono, ligados covalentemente; por exemplo, polietileno, poliestireno, poli(metacrilato de metila). Dentre este tipo de reações se encontra por exemplo,

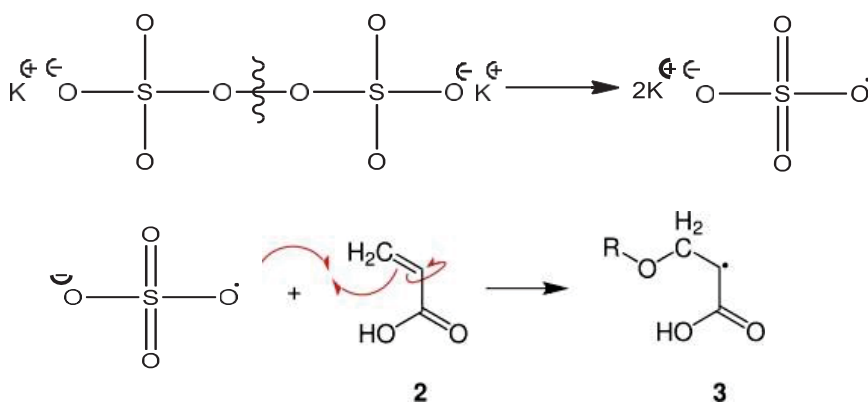
polimerizações via radicais livres, iônica. Por outro lado os polímeros de condensação apresentam em sua cadeia principal não apenas átomos de carbono, mas também átomos de outros elementos, como oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo, etc; por exemplo, poli(tereftalato de etileno). (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007; MANO; MENDES, 2004).

A polimerização que ocorre pelo mecanismo de radicais livres ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A iniciação se dá por iniciadores radiculares, formados por ruptura homolítica (térmica ou fotoquímica) ou por processos redox, como exemplo tem-se os azocompostos e peróxidos (DAVIS; MATYJASZEWSKI, 2003). Estas espécies radiculares possuem a habilidade de quebrar ligações covalentes, gerando novos radicais livres altamente reativos. Entretanto, várias reações paralelas podem ocorrer até que o iniciador chegue ao monômero. Portanto, associa-se à reação de iniciação um fator de efetividade do iniciador, e esta eficiência encontra-se usualmente na faixa de 0,3 a 0,8, e depende fortemente do meio reacional (CHICOMA; CARRANZA; GIUDICI, 2013; DAVIS; MATYJASZEWSKI, 2003; MACHADO, 2004; MOAD; SOLOMON, 2005).

FIGURA 6 ETAPAS DA POLIMERIZAÇÃO RADICALAR DO PAA COM O INICIADOR PERSULFATO DE POTÁSIO 1) INICIAÇÃO 2) PROPAGAÇÃO 3) TERMINAÇÃO. FONTE: (MOAD; SOLOMON, 2005)

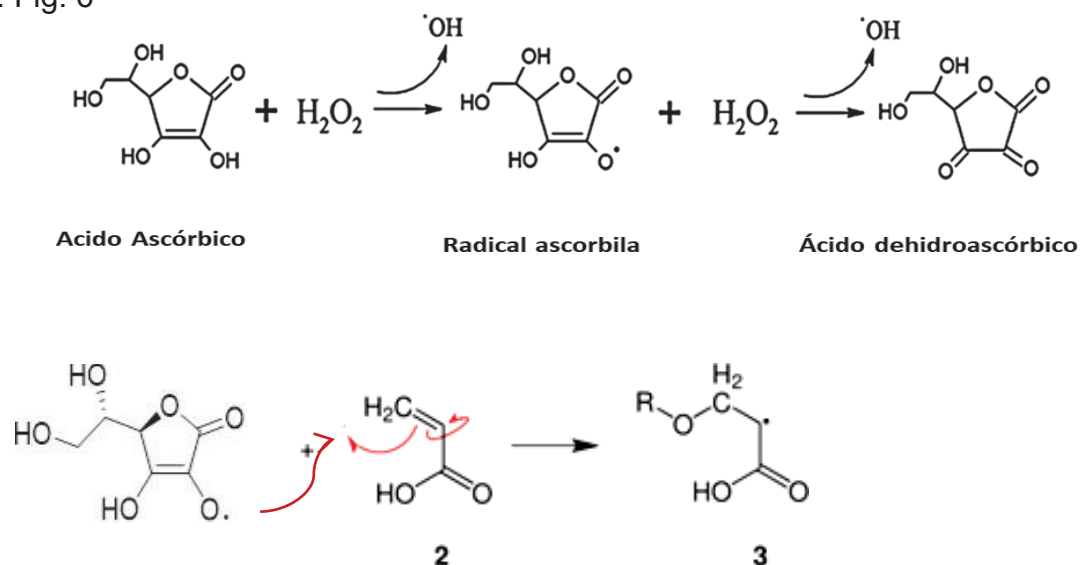
### 1) Iniciação

-Por ruptura homolítica: KPS

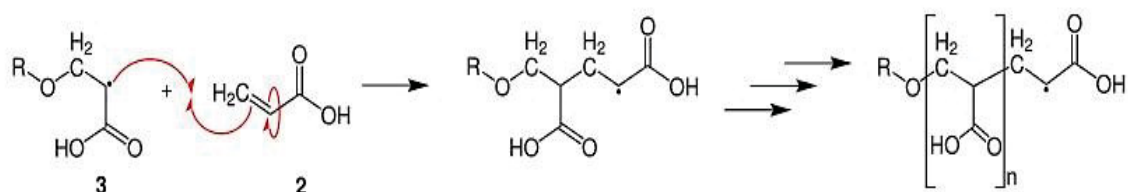


- Por reação redox Ácido ascórbico: peróxido de hidrogênio

Cont. Fig. 6

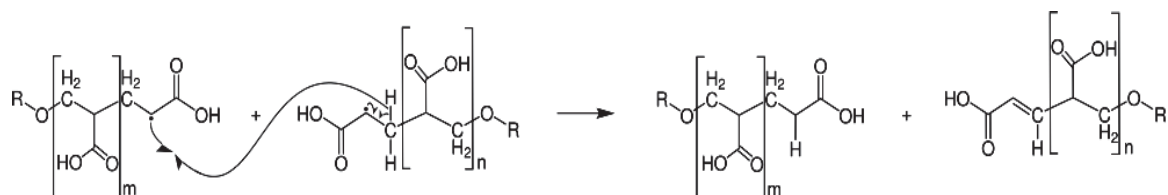


## 2) Propagação

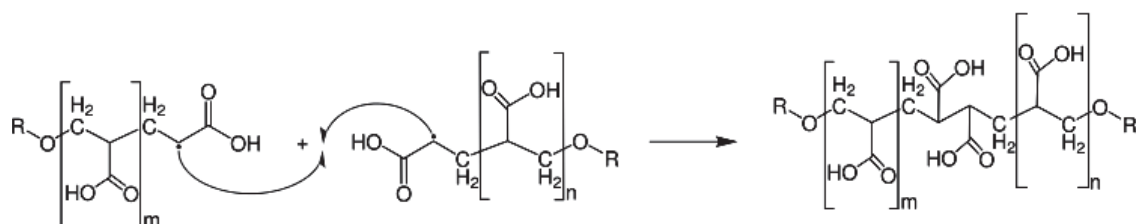


## 3) Terminação

### - Desproporcionamento



### - Combinação



Quanto maior a quantidade de radicais livres presentes no meio reacional, maior a taxa de iniciação e, conseqüentemente, uma maior taxa de polimerização, que diminui o tamanho da cadeia. Os fatores que influenciam na taxa de iniciação são os tipo de iniciação, a concentração de iniciador ou a intensidade de radiação e temperatura (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007; MOAD; SOLOMON, 2005).

A polimerização radicalar envolve um monômero que contém uma ligação dupla, pela qual ocorre o crescimento da cadeia polimérica. Os monômeros são sequencialmente adicionados, gerando polimerizações em cadeia a qual corresponde a etapa de propagação (MACHADO, 2004; MOAD; SOLOMON, 2005).

A velocidade de decomposição do iniciador geralmente segue uma cinética de primeira ordem, porém deve-se adicionar um parâmetro que quantifica a eficiência do iniciador ( $f$ ), que traz informações sobre a fração dos radicais primários de iniciador gerados que realmente serão utilizados para formação dos radicais poliméricos. A taxa de geração dos radicais ( $r_p$ ) poliméricos pode ser escrita conforme **equação 1** (MOAD; SOLOMON, 2005; WOLFF; RENÉ BOS, 1997).

$$r_p = 2fk_d I \text{ (eq. 1)}$$

Onde  $k_d$  é a constante cinética de decomposição/consumo dos radicais, e  $I$  concentração de iniciador radicalar.

O fator de eficiência do iniciador ( $f$ ) é gerado, em parte, devido ao efeito gaiola (*cage effect*), que resulta do confinamento dos radicais pelas moléculas do solvente, do monômero ou do polímero. Assim, quanto maior a resistência que o meio oferece à difusão dos radicais formados, maior a probabilidade de que estes venham a se recombinar ou participar de reações paralelas que não resultem na polimerização. A eficiência e o tempo de meia vida do iniciador dependem da natureza física do meio em que o iniciador se decompõe, da concentração de polímero no meio reacional, da temperatura, da mobilidade do radical primário, da massa molar das espécies e da composição do meio (MACHADO, 2004; WOLFF; RENE BOS, 1997)

O efeito gaiola foi descrito por Wolff e Rene (1997), e foi assim explicado: as espécies que estão presentes no meio reacional podem inibir a difusão formando uma célula onde o radical não pode se difundir livremente e depende somente do

coeficiente de difusão ( $D_1$ ). Então este efeito pode ser descrito por meio de um modelo geométrico formado por duas esferas concêntricas de raios  $r_1$  e  $r_2$  a parte do radical confinado. Assim, os radicais primários são gerados unicamente na esfera de reação de iniciador de raio  $r_1$ , localizada dentro de uma grande esfera de difusão de raio  $r_2$ . Apenas os radicais que escapam da esfera de raio  $r_2$  podem reagir com o monômero para formar novas cadeias poliméricas (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007; WOLFF; RENÉ BOS, 1997). Este mecanismo pode ser descrito pela seguinte **equação 2**.

$$f = \frac{1}{\frac{1}{f_0} + \frac{r_2^2 k_{io} [M]}{8 f_0 r_1 D_1}} \quad (\text{eq. 2})$$

onde  $k_{io}$  é a constante cinética para a reação de iniciação;  $f$  é a eficiência do iniciador;  $f_0$  é a eficiência do iniciador na ausência de impedimentos difusionais; e  $[M]$  é a concentração de monômero (WOLFF; RENE BOS, 1997).

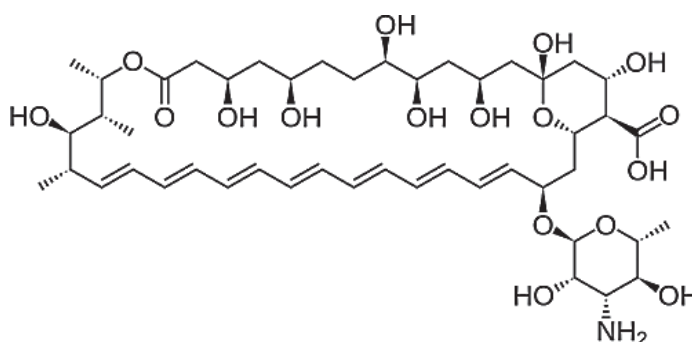
Um dos iniciadores usados em trabalhos de polimerização via emulsão tem sido o par redox de peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico (FIGURA 5). Já foram obtidas nanopartículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) a partir deste par que, comparada com o método de obtenção em fase orgânica com Azo compostos, conseguiu atingir 90% de conversão em 30min de reação (AL-HAYDARI et al., 2009).

Para a polimerização em emulsão de MMA os iniciadores KPS e o par redox ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio foram usados por (DA SILVA, 2016) e ambos foram efetivos para a obtenção de partículas sólidas poliméricas. Em outro trabalho foram obtidas nanopartículas de PVAI e PMMA usando os mesmos iniciadores e em ambos os casos, e em outro trabalho realizado com estes iniciadores a quantidade de estes não afetou o diâmetro das nanopartículas formadas (BERNARDY, 2009).

## 2.4 Anfotericina B, estados de agregação e toxicidade

A anfotericina B (AmB) é um antimicrobiano da classe dos polienos, isolado pela primeira vez em 1955 a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* obtidas no delta do rio Orinoco, na Venezuela (FALCI; PASQUALOTTO, 2015). As formulações de anfotericina B são amplamente utilizadas para o tratamento de candidíase disseminada, aspergilose invasiva, meningite criptocócica, infecções causadas por Mucorales, e a leishmanioses visceral e cutânea (DENNING; HOPE, 2010; PELISSARI et al., 2011). Elas podem ser apresentadas em varias formas de formulações mas os efeitos nefrotóxicos são igualmente encontrados como a ação pro-inflamatória. É amplamente usada a forma lipossomal por ter um efeito de nefrotoxicidade reduzida e o efeito anti-inflamatório deve-se, pelo menos parcialmente, ao carregador lipossomal utilizado (DENNING; HOPE, 2010; FALCI; PASQUALOTTO, 2015; OLIVEIRA; BENATTI; LAMY, 2011b)(FIGURA 7).

FIGURA 7 REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA ANFOTERICINA B. FONTE: ANGIOLELLA ET AL., 2017



Recentes estudos no Brasil demonstraram que a forma lipossomal do fármaco comercial diminuiu a proporção de casos com falhas no tratamento devido a efeitos adversos do fármaco quando comparado com o tratamento tradicional de meglumina antimoniato (SILVA et al., 2020).

A estrutura da molécula de AmB consiste em um esqueleto macrolídeo heptaeno, com um grupo carboxila funcional na posição C16 e um apêndice de açúcar micosamina na posição C19, o mecanismo ação da molécula ainda não está esclarecido, mas conjectura-se que a estrutura poliênica da molécula forma complexos com o ergosterol, causando a formação de poros na membrana celular

do parasito e que resultam em perda de sua integridade e o rápido extravasamento de potássio e outros íons, ocasionando a morte celular. Também acontece, concomitantemente, um estresse oxidativo associado a tais eventos (DENNING; HOPE, 2010; WANG; ZHU, 2021). Como a AmB pode regular a atividade de macrófagos e apresenta uma ação formadora de poros poderia ser usado como uma nova droga nas terapias anticâncer (WANG; ZHU, 2021).

Estudos foram realizados sob a relação da forma agregada e monomérica e a sua influencia na toxicidade em diferentes lipídeos como em micelas e vesículas de DODAB (BARWICZ; CHRISTIAN; GRUDA, 1992; OLIVEIRA; BENATTI; LAMY, 2011b). O estado monomérico da Anfotericina B está associado a uma baixa toxicidade (BARWICZ; CHRISTIAN; GRUDA, 1992; LEGRAND et al., 1992). Por isso, a busca de formulações onde a AmB esteja em estado monomérico, mesmo após diluição no plasma sanguíneo, são estratégias úteis para diminuir a nefrotoxicidade do fármaco (PAULA et al., 2021)

Na literatura há várias estratégias que buscam diminuir a agregação da AmBe assim, seus efeitos tóxicos no humano, as quais podem ser diferenciadas pelos métodos de preparo, já que muitas das propriedades finais das nanopartículas carregadas de AmB vão depender do tipo de preparo como por exemplo; nanoprecipitação, evaporação de solvente, nanoemulsões entre outros. Um sistema interessante foi desenvolvido preparando nanopartículas da mistura de PLGA carregadas com AmB e de AmB PLGA-PEG e estas inibiram a atividade hemolítica da AmB em cerca de 100% e não causaram alterações no tecido renal ou hepático (MORAES et al., 2017). Os métodos de encapsulamento com lipídeos, niossomas e lipossomas continuam sendo estudados alguns deles dando resultados favoráveis na eliminação da leishmanioses e estabilidade prolongada (IMAN et al., 2011; LAURENT et al., 2020; MOSTAFAVI et al., 2019; PAULA et al., 2021).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material

Os seguintes reagentes foram usados para a preparação de lipossomas: brometode dimetiloctadecilamônio (DODAB) (98% em peso, SIGMA), etanol 99%, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) (98% por peso, SIGMA) e água ultrapura (MilliQ, sistema Millipore). Para a polimerização de AA foram utilizados os seguintes materiais: ácido acrílico AA (99% área por GC, ALDRICH), ácido ascórbico (P.A C. KORMAN) e peróxido de hidrogênio (35% m/v, NEON), persulfato de potássio KPS ( $K_2S_2O_8$ ) SIGMA-ALDRICH 99%. Outros reagentes também foram usados: azida de sódio (99,5% em peso de SIGMA), nitrato de sódio (99% em peso de MERCK), hexanotiol (99% de área de acordo com GC SIGMA), tetraidrofurano para cromatografia líquida (MERCK), acetonitrila para gradiente de HPLC  $\geq 99,9\%$  da área por GC (SIGMA-ALDRICH), ácido fosfórico  $\geq 85\%$  (SIGMA-ALDRICH) e clorofórmio (SUPELCO) Anfotericina B USP (INLAB Confiança). Os materiais foram usados conforme recebidos, sem purificação.

#### 3.2 Métodos usados na formação de filmes e nanocápsulas de lipídeo catiônico dimetildioctadecilamônio (DODAB), revestidos por polimerização “*in situ*” com ácido acrílico

##### 3.2.1 Adsorção de ácido acrílico na superfície DODAB

Para verificar a adsorção de AA na superfície DODAB, experimentos utilizando a microbalança de cristal de quartzo (QCM) foram realizados, usando sistemas bidimensionais como brevemente descrito. Inicialmente, os cristais piezoelétricos foram revestidos por dip-coating com hexanotiol 8 mmol L<sup>-1</sup>, preparados em solução etanólica, por 24 h, e depois imersos em DODAB 10 mmol L<sup>-1</sup> por 24 h. Posteriormente, a solução do monômero foi passada através da célula de fluxo QCM-D a 100  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> usando uma bomba peristáltica (KdScientific) a 25 °C. A adsorção de AA na superfície do filme DODAB foi monitorada continuamente. Diferentes concentrações de monômero (1-7 mmol L<sup>-1</sup>) pH (3-6) foram testados, e todos os experimentos foram realizados em triplicata (KWON et al., 2006).

As superfícies dos cristais piezoelétricos utilizadas nos experimentos de QCM também foram analisadas por tensiometria através das medidas de ângulo de contato com equipamento OCA15 (Dataphysics) a 25 °C. Resumidamente, usando uma seringa controlada por software SCA20 foram dispensados 0,5 µL de água ultrapura sobre a superfície dos cristais, com ou sem modificação, e o ângulo de contato foi medido usando triplicata para cada sistema (KAMINSKI et al., 2016; KWON et al., 2006).

### *3.2.2 Preparação dos lipossomas de DODAB e DODAB:DOPE por meio de injeção de etanol*

Para a preparação do lipossoma, utilizando o método de injeção de etanol, o DODAB ou a mistura entre DODAB: DOPE (10:1 e 10:2 mol:mol) foram dissolvidos em 200µL de etanol, e posteriormente, injetado em 50 mL de água ultrapura (sob agitação magnética aproximadamente 1500 rpm, à 60 °C durante 30 min) até que a concentração final de DODAB fosse de 1, 2,5 ou 5 mmol L<sup>-1</sup>. Após o resfriamento, o lipossoma foi sonificado por 5 min com 20% de amplitude (SONICS VIBRACELL) e então, este permaneceu em repouso durante 24 h antes das análises de caracterização (KAMINSKI et al., 2016).

### *3.2.3 Preparação dos lipossomas de DODAB e DODAB:DOPE em água*

Para a preparação dos lipossomas utilizando o método de dispersão em água foi utilizado DODAB ou a mistura entre DODAB: DOPE (10:1 e 10:2 mol:mol) dissolvidos em 50 mL de água ultrapura (sob agitação magnética aproximadamente 1500 rpm, à 60 °C durante 30 min, 1 h, 2 h, 3 h) até que a concentração final de DODAB fosse de 1 mmol L<sup>-1</sup>. Após o resfriamento, os lipossomas foram sonificados por 1, 2 e 3 min com 20% de amplitude (SONICS VIBRACELL) e então, este permaneceu em repouso durante 24 h antes das análises de caracterização (FEITOSA; EDWARDS, 2006).

### 3.2.4 Tamanho e estabilidade do lipossoma

Os diâmetros hidrodinâmicos aparentes ( $D_{\text{happ}}$ ) dos lipossomas revestidos e não revestidos foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) no equipamento NanoDLS Brookhaven, detector de espalhamento a  $90^\circ$  e usando um comprimento de onda de laser vermelho de 638 nm e temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . As amostras foram diluídas 1: 100 em água ultrapura, antes da análise, para reduzir a turbidez e, conseqüentemente, o espalhamento múltiplo. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A estabilidade térmica foi realizada em uma faixa de temperatura de  $25$  a  $60^\circ\text{C}$  e controlada diretamente pelo sistema NanoDLS. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três amostras.

A calorimetria exploratória diferencial ( $\mu$ -DSC) foi usada em todas as amostras, e as varreduras foram realizadas de  $25^\circ\text{C}$  a  $95^\circ\text{C}$ . As entalpias em solução foram medidas em DSC III Setaram, em atmosfera de nitrogênio, pressão de 60kPa, em cadinhos de  $1\text{ cm}^3$  com taxa de aquecimento e resfriamento de  $0,5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para a primeira análise e de  $0,2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  para a segunda análise. Os dados foram coletados e analisados pelo software Setsoft 2000.

As medições do Potencial zeta foram realizadas para o sistema de lipossomas DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol) na concentração de DODAB de  $1\text{ mmol L}^{-1}$ , adicionando  $300\text{ }\mu\text{L}$  de solução AA  $30\text{ mmol L}^{-1}$  em intervalos de  $1.000\text{ s}$  sobre o lipossoma até  $14.500\text{ s}$ . Posteriormente, a leitura do potencial zeta foi interrompida e os iniciadores foram adicionados. O sistema foi aquecido a  $70^\circ\text{C}$ , permaneceu nesta temperatura por  $30\text{ min}$  e então foi resfriado à  $25^\circ\text{C}$  para determinação do potencial zeta. Este experimento foi realizado para os dois iniciadores testados: KPS e o par ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio. O KPS foi acrescentado na concentração de  $0,15\text{ mmol L}^{-1}$  e o par redox na concentração de  $3\text{ mmol L}^{-1}$  de ácido ascórbico e  $18\text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio (KAMINSKI et al., 2016; SCARIOTI et al., 2011).

### 3.2.5 Preparação dos lipossomas revestidos com poli(ácido acrílico) através do método de polimerização “in situ” com iniciador KPS

O revestimento dos lipossomas com PAA foi realizado utilizando diferentes concentrações de AA em pH 5,0 e concentrações fixas de lipossoma e iniciador. O

volume foi ajustado para 10 mL com água ultrapura. Para tanto, foi preparada inicialmente, uma solução contendo 6 mL de lipossoma (DODAB:DOPE 10:2 1 mmol L<sup>-1</sup>), AA (concentração final de 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 13 e 15 mmol L<sup>-1</sup>) e água. Essa solução permaneceu sob agitação magnética e corrente de nitrogênio por 60 min. Após esse período, foi acrescentado o iniciador KPS (concentração final 0,15 mmol L<sup>-1</sup>) e a solução foi transferida para um banho de água a 70 °C por 2 h. Em seguida, a solução foi resfriada (25 °C) para a sua caracterização após 24 h.

### *3.2.6 Preparação dos lipossomas revestidos com poli(ácido acrílico) através do método de polimerização “in situ” com iniciador peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico*

Os lipossomas (DODAB: DOPE 10: 2 mol: mol), em diferentes concentrações, foram revestidos usando diferentes concentrações de AA, o volume final de solução foi 10 mL, contendo 6 mL de dispersão de lipossoma a 1, 2,5 ou 5 mmol L<sup>-1</sup> de DODAB, com proporção de DODAB: DOPE de 10: 2 (mol: mol). Foram usados diferentes volumes de AA (de uma solução estoque a 30 mmol L<sup>-1</sup>) para obter a concentração final de 3, 5, 7, 9, 11, 12 mmol L<sup>-1</sup> em pH 5. Quantidade de água suficiente (qsp) foi adicionada para completar do volume final, e essas soluções foram agitadas e mantidas sob atmosfera de nitrogênio durante 60 min. Após desse tempo, essa solução foi colocada em banho-maria à 70 °C, e quando a solução atingiu 70 °C os iniciadores foram adicionados com uma concentração final de 3 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 18 mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio. As amostras foram mantidas a 70 °C durante 30 min. Em seguida, a solução foi resfriada a 25 °C e caracterizada após 24 h.

A adsorção de AA também foi avaliada por meio de um sistema tridimensional, os lipossomas, aplicando o mesmo processo descrito acima, mas sem iniciadores, a 3, 5, 7, 9, 11, 12 mmol L<sup>-1</sup> de AA e 2,5 mmol L<sup>-1</sup> lipossomas DODAB:DOPE.

### 3.2.7 Determinação da quantidade de ácido acrílico consumida na reação

#### Método espectrofotométrico

Os espectros de absorção UV-Vis foram obtidos em uma faixa de comprimento de onda de 200–500 nm no espectrômetro UV-2401PC (SHIMADZU, Japan), usando  $\lambda = 210\text{nm}$  para a determinação. As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório multiusuários) da UFPR.

A curva de calibração foi realizada usando triplicatas de concentrações de AA de 0,5, 1, 2, 3, 4,5, 6, 7, 8, 9, 10  $\text{mmol L}^{-1}$  apresentando uma faixa de linearidade de 1- 5  $\text{mmol L}^{-1}$ , as quais cumpriam a lei de Beer-Lambert. A curva de calibração obtida apresentou um  $R^2 = 0,999$  e limite de quantificação (LQ) = 0,018  $\text{mmol L}^{-1}$  e limite de detecção (LD) = 0,060  $\text{mmol L}^{-1}$ .

As amostras já polimerizadas com KPS ou par redox, após 24 h, foram levadas para leitura da absorção do AA em espectrofotômetro, as amostras  $\geq 6 \text{ mmol L}^{-1}$  de AA foram diluídas 1:2 em água purificada antes das leituras. Posteriormente, novas amostras centrifugadas por 2 h 12.000 g. O sobrenadante foi levado para a leitura em espectrofotômetro, e as mais concentradas  $\geq 6 \text{ mmol L}^{-1}$  foram também diluídas como reportado anteriormente.

#### Sistema de monitoramento em tempo real ACOMP

O esquema do sistema ACOMP, de monitoramento em tempo real está representado na FIGURA 8. Este experimento foi usado para tentar observar a ocorrência da reação de polimerização com o iniciador KPS ou com a dupla redox no sistema de lipossoma DODAB: DOPE (10:2 mol:mol), conforme descrito por Scarioti *et al.* (2011).

FIGURA 8 CONFIGURAÇÃO DO SISTEMA ACOMP PARA SISTEMAS TRIDIMENSIONAIS A SEREM APLICADOS NA MONITORAÇÃO EM TEMPO REAL DO PROCESSO DE SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS REVESTIDAS COM PAA. FONTE: SCARIOTI ET AL., 2011



O revestimento dos lipossomas com PAA foi realizado com as proporções descritas no item (3.2.4) levando as quantidades a usar para uma solução total de 100 mL. Utilizando concentrações de AA de 3,7,10 e 12 mmol L<sup>-1</sup>, em pH 5,0 e concentrações fixas de lipossoma e iniciadores (KPS ou par redox). Essa solução permaneceu sob agitação magnética e fluxo de nitrogênio por 60 min. Após esse período, a solução foi posicionada em um banho de água a 70 °C e, posteriormente, foram acrescentados os iniciadores e monitorados por 8, 10 e 12 h com no espectrômetro UV-2401PC (SHIMADZU, Japan)  $\lambda = 210$  e 240 nm para a determinação e NanoDLS Brookhaven, detector de espalhamento a 90° e usando um comprimento de onda de laser vermelho de 638 nm e temperatura de 25 °C.

#### **Determinação do ácido acrílico consumido na reação por Cromatografia líquida de Alta Eficiência**

O consumo de AA durante a reação foi determinado por Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o cromatógrafo LC-20AT acoplado a detector UV-Vis (modelo DGU-20A5), ambos da marca Shimadzu. Foi utilizada uma coluna C18 com fluxo 0,5 mL min<sup>-1</sup> a 25 °C, loop de 20  $\mu$ L e comprimento de onda de 210 nm. O gradiente de fluxo usado para a determinação está representando na TABELA 1. Todos os solventes usados eram grau CLAE, e uma mistura de água ultrapura contendo 0,1% de ácido fosfórico e filtrada por membrana de éster celulose 0,22  $\mu$ m de poro (BRADEN; DAVY, 1991; KOSSEN; RESINS; ZOOM, 2001; OSWALD et al., 2015; SAROJA; THARANATHAN, 2000).

Foi obtida uma curva de calibração usando triplicatas verdadeiras de concentrações de AA a 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mmol L<sup>-1</sup>. O tempo de eluição determinado foi de 14,3 min e tempo total de corrida 53 min. A curva de calibração obtida apresentou um  $R^2 = 0,994$  e limite de quantificação (LQ) = 1,07 mmol L<sup>-1</sup> e limite de detecção (LD) = 0,31 mmol L<sup>-1</sup>, com linearidade numa faixa de 1,1 -5 mmol L<sup>-1</sup> (Anexo A).

TABELA 1 GRADIENTE DE FLUXO USADO PARA A DETERMINAÇÃO DO MONÔMERO RESIDUAL AA

| <b>Tempo<br/>(min)</b> | <b>Acetonitrila</b> | <b>Tetraidrofurano</b> | <b>H<sub>2</sub>O<br/>(0,1% Ác.<br/>Fosfórico)</b> |
|------------------------|---------------------|------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>0</b>               | 0                   | 0                      | 100                                                |
| <b>5</b>               | 0                   | 0                      | 100                                                |
| <b>15</b>              | 100                 | 0                      | 0                                                  |
| <b>25</b>              | 100                 | 0                      | 0                                                  |
| <b>28</b>              | 0                   | 100                    | 0                                                  |
| <b>38</b>              | 0                   | 100                    | 0                                                  |
| <b>41</b>              | 100                 | 0                      | 0                                                  |
| <b>51</b>              | 100                 | 0                      | 0                                                  |
| <b>53</b>              | 0                   | 0                      | 100                                                |

As amostras, após a polimerização com o par redox, foram levadas a centrifugação por 12 min em 12.000g, e 20 µL do sobrenadante foi injetado diretamente no CLAE.

### 3.2.8 Estudos cinéticos de polimerização de ácido acrílico

Para a cinética de polimerização do AA foi preparada uma solução de 50 mL, contendo: 11,66 mL de AA (solução estoque 30 mmol L<sup>-1</sup>) obtendo-se uma concentração final de AA de 7 mmol L<sup>-1</sup>. Juntos, 30 mL de lipossoma (DODAB: DOPE 10: 2 mol: mol) a 1mmol L<sup>-1</sup> DODAB, com diferentes valores de  $D_{happ}$  foram adicionados. Primeiramente, AA e água foram adicionados ao lipossoma e mantidos sob agitação magnética em fluxo de nitrogênio durante 60 min e colocados em banho-maria a 70 °C. Em seguida, foi adicionado o par redox de iniciadores (ácido ascórbico 3 mmol L<sup>-1</sup> e peróxido de hidrogênio 18 mmol L<sup>-1</sup>). Durante o experimento, 0,5 mL do volume da reação foi retirado e diluído 1: 2 com água ultrapura a 5 °C para medir a concentração de AA por CLAE com detector UV-Vis. O consumo de AA

foi monitorado a 210 nm e os perfis cinéticos (concentração vs tempo) foram ajustados usando os mínimos quadrados iterativos.

Os lipossomas com diferentes tamanhos foram preparados conforme descrito: lipossomas de DODAB: DOPE 10 mol: 2 mol a 1 mmol L<sup>-1</sup> de DODAB e foram preparados de forma semelhante ao método de preparação de lipossomas, variando apenas a quantidade de etanol utilizado: 0,3 mL de etanol foi usado para dissolver os surfactantes antes da injeção em água para D<sub>happ</sub> 20 nm. Para o lipossoma D<sub>happ</sub> 100 nm, os surfactantes foram dissolvidos em 0,2 mL de etanol. A preparação do lipossoma D<sub>happ</sub> 200 nm foi análogo ao procedimento de lipossoma 100 nm, embora não sujeito à sonicação.

### *3.2.9 Determinação da massa molar dos polímeros formados por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) acoplada a detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz laser (LLS)*

O PAA sintetizado “*in situ*” durante o revestimento do lipossoma foi caracterizado por SEC-RI-LLS utilizando um sistema multidetector Viscotek-HPSEC, coluna Shodex-OH Pack SB-806M-HQ L007054 (Japão), com limite de exclusão de 2 x10<sup>7</sup> g/mL e temperatura de 40 °C. A coluna foi conectada em série a um refratômetro diferencial (detector Viscotek VE3580 RI), um detector viscosimétrico e um detector de espalhamento de luz laser (detector modelo 270) de baixo ângulo (7°, LALLS) e ângulo reto (90 °, RALLS) com comprimento de onda de 632,8 nm. A amostra foi eluída utilizando-se como fase móvel NaNO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> e NaN<sub>3</sub> 200 ppm com um fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>.

A dispersão aquosa do lipossoma revestido com PAA foi submetida a um processo de extração líquido-líquido utilizando uma parte de clorofórmio e uma da dispersão do lipossoma visando remoção do surfactante para a fase clorofórmica e mantendo o polímero na fase aquosa. Foram realizadas no mínimo 8 lavagens com agitação em vortex por 1 min, até que amostra não apresentasse turbidez, que foi monitorada visualmente. Posteriormente, a fase aquosa foi congelada e liofilizada e a amostra liofilizada foi ressuspensa em 0,5 mL da fase móvel do SEC e filtrada por membrana de éster celulose 0,45 µm antes da injeção no sistema cromatográfico.

### 3.2.10 Microscopia de força atômica

As análises de microscopia de força atômica (AFM) foram obtidas de lipossomas revestidos ou não revestidos com PAA em microscópio Agilent Scanning Probe Microscope (modelo 5500) usando o modo dinâmico. As imagens foram obtidas nos tamanhos 4x4  $\mu\text{m}$  e 1x1  $\mu\text{m}$  usando um *cantilever* NSC15 (MikroMash) com frequência de ressonância de 320 kHz e constante de força de 40 N.m<sup>-1</sup>. Lipossomas não revestidos foram diluídos 1:20 com água ultrapura e 300  $\mu\text{L}$  foram depositados em mica. Após 5 min, o excesso de material foi removido através da técnica de *spin coating* a 1000 rpm durante 10s. Para os lipossomas revestidos com PAA, as amostras foram diluídas 1:30 e 300  $\mu\text{L}$  foram depositados em mica após 5 min foi utilizado *spin coating* como no procedimento anterior

### 3.2.11 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram medidas em um espectrofotômetro Vertex 70 (BRUKER, Germany) com reflectância total atenuada (ATR). Para cada amostra foram utilizados 16 scans, resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e faixa do número de onda de 400–4000 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram liofilizadas antes da análise (MicroModulyo, Thermo Electron Corporation, EUA). As análises foram realizadas no Departamento de Farmácia da UFPR.

### 3.2.12 Tratamento estatístico

Os resultados foram analisados estatisticamente usando teste t para duas amostras usando variâncias equivalentes com hipóteses nulas da diferencia media bicaudal com 95% de confiança.

## 3.3 Métodos usados para o encapsulamento de AmB nos lipossomas DODAB e DODAB-DOPE, revestidos pela polimerização “*in situ*” de AA, estabilidade e otimização para a polimerização.

### 3.3.1 Encapsulamento de Anfotericina B em Lipossoma DODAB e DODAB:DOPE

Para a preparação do lipossoma por hidratação de filme foram preparados lipossomas de DODAB  $1\text{mmol L}^{-1}$  e DODAB: DOPE (10:2 mol:mol),  $1\text{mmol L}^{-1}$  em DODAB, cada formulação foi dissolvida junto a quantidades de AmB para distintas concentrações finais (60, 100, 150, 200 e  $250\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em uma mistura de 12,5 mL de clorofórmio e 12,5 mL de metanol com 1,5 mL de ácido clorídrico  $0,01\text{mol L}^{-1}$ , e posteriormente, a amostra foi colocada em um evaporador rotativo à pressão reduzida. Uma vez formado o filme na parede do balão, o mesmo foi colocado sob alto vácuo para eliminar traços dos solventes e posteriormente foi reidratado com 25 mL de água ultrapura (sob agitação magnética, a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min) (DAR et al., 2019; PEREZ et al., 2015). Em seguida, o lipossoma foi sonificado por 2 min com 30% de amplitude (SONICS VIBRACELL) e posteriormente foi filtrado com membrana de éster celulosa diâmetro de poro  $0,22\mu\text{m}$ .

### 3.3.2 Quantificação de Anfotericina B encapsulada

Para a determinações da quantidade de AmB encapsulada foi utilizado o método espectrofotométrico. Os espectros de absorção UV-vis foram obtidos em uma faixa de comprimento de onda de 300–450 nm no espectrômetro UV-2401PC (SHIMADZU, Japan), usando  $\lambda=410\text{nm}$  para a determinação, para isto foram adicionados 1,0 mL de lipossoma contendo AmB (preparado no item 3.3.1) em 9,0 mL de metanol, sendo agitado vigorosamente.

Para determinar a linearidade do método, diferentes concentrações de AmB na faixa de  $1,0\text{-}10\text{ }\mu\text{g. mL}^{-1}$  em  $\text{CH}_3\text{OH: DMSO}$  (99,9: 0,1 v: v) foram preparadas e analisadas. A curva de calibração resultou linear com um coeficiente de correlação de 0,999.

### 3.3.3 Estudos de agregação da Anfotericina B por métodoespectrofotométrico

Os espectros de absorção foram obtidos em uma faixa de comprimento de onda de 300–450 nm, usando os comprimentos de onda na correlação de 398 e 409 nm resolução 1nm, temperatura  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no espectrofotômetro UV-2401PC

(SHIMADZU, Japan). As amostras foram preparadas dispersando-se 1,0 mL de lipossoma contendo AmB em 9,0 mL de água purificada.

#### 3.3.4 Estabilidade das formulações

Foram analisadas as amostras de lipossoma contendo AmB a cada oito dias como descrito nos itens 3.3.2, avaliando-se a eficiência de encapsulamento. As formulações também foram avaliadas quanto ao  $D_{happ}$  para cada formulação. O potencial zeta de cada uma das formulações foi medido no equipamento Stabino particle Charge mapping usando pistão com *gap* de 400  $\mu\text{m}$ .

#### 3.3.5 Estudo da estabilidade na polimerização “*in situ*” das formulações de lipossomas contendo AmB

Foi realizado um estudo com as formulações contendo AmB. Neste estudo se realizou a polimerização “*in situ*” em duas temperaturas 70 °C e 40 °C. Os lipossomas (DODAB e DODAB: DOPE 10: 2 mol: mol e DODAB: DOPE tocoferol todas elas contendo AmB), foram revestidos usando concentrações de AA 5 e 7 mmol L<sup>-1</sup>, o volume final de solução foi 10 mL, contendo 6 mL de dispersão de lipossoma a 1 mmol L<sup>-1</sup> de DODAB, com proporção de DODAB: DOPE de 10: 2 mol: mol e AmB em concentração 100  $\mu\text{g/mL}$ . Foram usados volumes de AA (de uma solução estoque a 30 mmol L<sup>-1</sup>) para obter a concentração final de 5 e 7 mmol L<sup>-1</sup> em pH 5. Quantidade de água suficiente (qsp) foi adicionada para completar do volume final, e essas soluções foram agitadas e mantidas sob atmosfera de nitrogênio durante 60 min. Após desse tempo, essa solução foi colocada em banho-maria à 70°C ou 40 °C, e quando a solução atingiu o valor de temperatura desejado os iniciadores foram adicionados com uma concentração final de 3 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 18 mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio, ou 6 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 1 mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio. As amostras foram mantidas a 70 °C durante 30 min ou 40 °C durante 60min. Em seguida, a solução foi resfriada a 25 °C e caracterizada após 24 h.

### *3.3.6 Determinação da quantidade de AmB presente após polimerização*

Os lipossomas recobertos obtidos no ponto 3.3.5 foram submetidos a um processo de extração líquido-líquido utilizando uma parte de clorofórmio e uma da dispersão do lipossoma visando remoção do surfactante e da AmB para a fase clorofórmica e mantendo o polímero na fase aquosa. Foram realizadas no mínimo 3 lavagens com agitação em vortex por 1 min, até que amostra não apresentasse turbidez, que foi monitorada visualmente. A fase orgânica foi rotaevaporada e o sólido obtido foi suspenso em metanol. Depois foi quantificado como descrito no ponto 3.3.2.

### *3.3.7 Preparação de polímero pré-formado e estabilidade com lipossoma DODAB contendo AmB*

Foram usados volumes de AA (de uma solução estoque a  $30 \text{ mmol L}^{-1}$ ) para obter a concentração final de 7 e  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 5. Quantidade de água suficiente (qsp) foi adicionada para completar do volume final de 30mL. Após desse tempo, essa solução foi colocada em banho-maria à  $70^\circ\text{C}$ , e quando a solução atingiu o valor de temperatura desejado os iniciadores foram adicionados com uma concentração final de  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido ascórbico e  $18 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio, ou  $6 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido ascórbico e  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio. As amostras foram mantidas a  $70^\circ\text{C}$  durante 30 min ou  $40^\circ\text{C}$  durante 60min. Em seguida, a solução foi resfriada a  $25^\circ\text{C}$  e caracterizada após 24 h.

Depois foi acrescentado este PAA obtido em lipossomas de DODAB, se testou agregar o PAA nos lipossomas ou agregar o lipossoma no PAA até chegar num potencial zeta de 30mV.

### *3.3.8 Tratamento estatístico*

Os resultados foram analisados estatisticamente usando teste t para duas amostras usando variâncias equivalentes com hipóteses nulas da diferencia media bi-caudal com 95% de confiança.

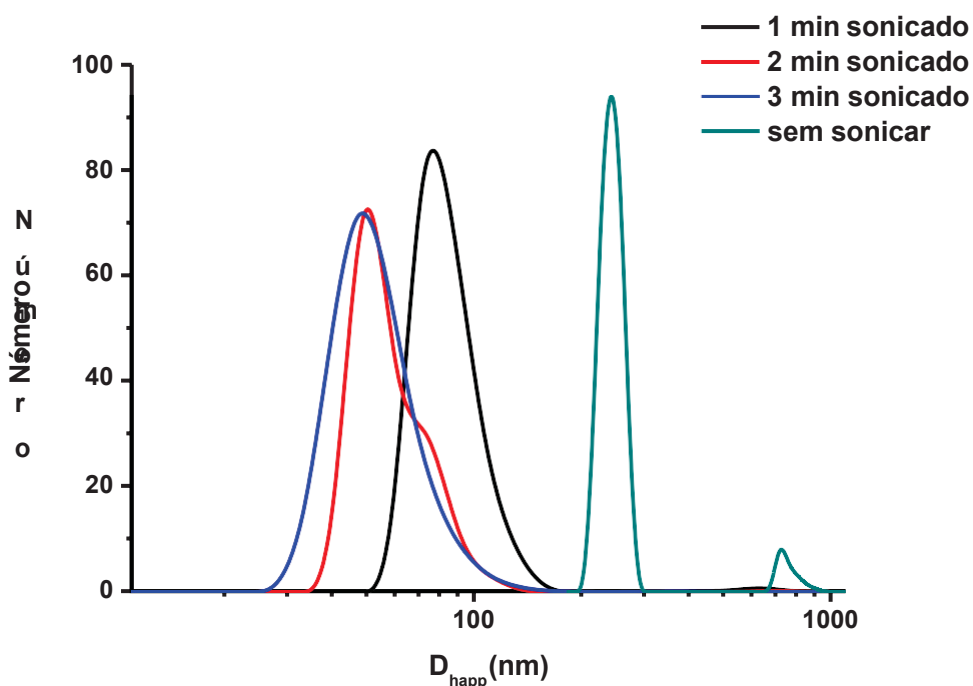
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Formação de filmes e nanocápsulas de lipídeo catiônico dimetildiocetadecilamônio (DODAB), revestidos por polimerização “*in situ*” com ácido acrílico

#### 4.1.1 Preparação dos lipossomas

Foram realizados estudos sobre os métodos de preparo do lipossoma. Para isto foi escolhido primeiramente o método de dissolução em água, associado à sonicação, para padronizar o tamanho dos lipossomas (FEITOSA; EDWARDS, 2006). Foram usados tempos de sonicação curtos, pois estruturas multilamelares podem ser formadas ao utilizar tempos maiores de sonicação (FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000). As vesículas formadas com DODAB  $1\text{mmol L}^{-1}$  em água, e aquecidas durante 1 hora à  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foram utilizadas nos testes de sonicação em tempos de 1, 2, e 3 min, a uma amplitude de 20%. Foi determinado por espalhamento de luz dinâmico o  $D_{\text{happ}}$  a uma temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os resultados podem ser observados na FIGURA 9.

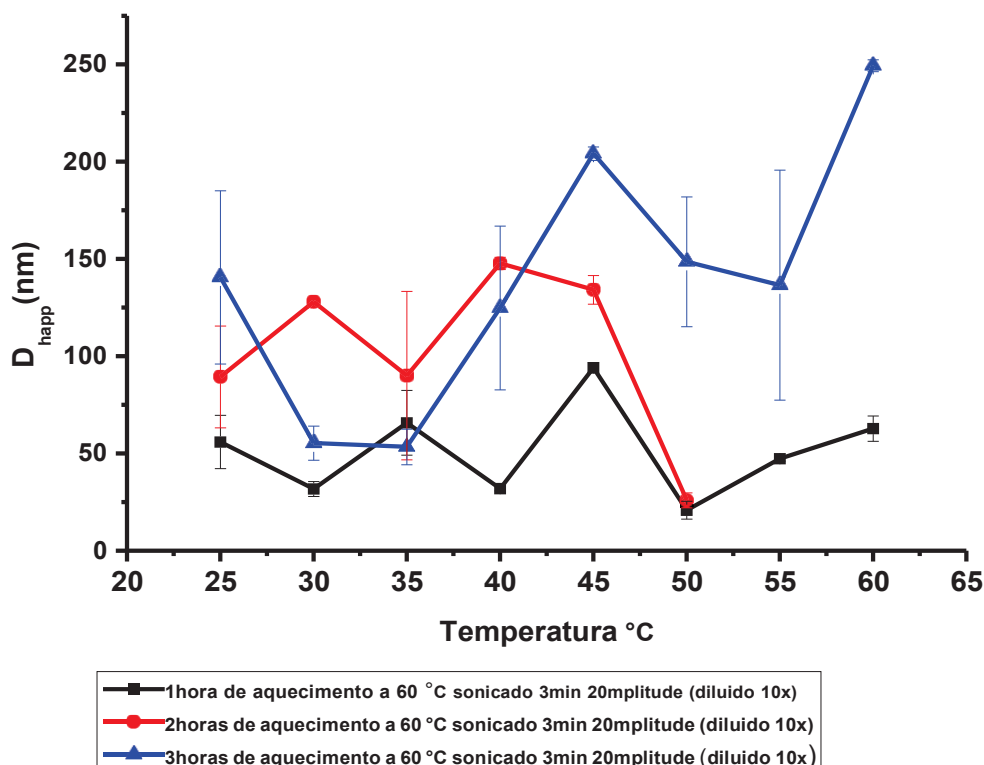
FIGURA 9 RESULTADOS DE  $D_{\text{happ}}$  PARA O LIPOSSOMA DODAB  $1\text{mmol L}^{-1}$  EM ÁGUA SONICADO A 20% AMPLITUDE EM TEMPOS DE 1, 2, 3 min.



Por meio deste estudo foi observado que para pequenos tempos de sonicação foi atingida uma modificação no tamanho dos lipossomas, diminuindo o  $D_{happ}$  em função do tempo, e gerando uma distribuição monomodal, quando comparada com o lipossoma sem sonicação, que apresentou uma distribuição bimodal. Com base nos resultados apresentados, o tempo de 3 min de sonicação foi escolhido, tanto pela geração de amostras homogêneas e de menor tamanho.

Paralelamente, o tempo que o lipossoma foi mantido sob aquecimento, 1 h, 2 h ou 3 h, antes da sonicação, padronizada nesta etapa em 3 min, foi utilizado para avaliar o  $D_{happ}$  dos lipossomas, em experimentos em função da temperatura, de 25 a 60 °C. Os resultados dos  $D_{happ}$  em função de temperatura de aquecimento e tempo estão na FIGURA 10.

FIGURA 10 RESULTADOS DO DLS OBTIDOS PARA LIPOSSOMA DODAB 1mmol L<sup>-1</sup> 3min SONICAÇÃO PELO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO EM ÁGUA, EM DIFERENTES TEMPOS DE AQUECIMENTO: 1, 2, 3 h.



O lipossoma de DODAB em água (FIGURA 10) apresentou mudança no  $D_{happ}$  frente às temperaturas testadas, nos três tempos de aquecimento 1, 2, e 3 horas de aquecimento à 60 °C. Adicionalmente, em conjunto com um desvio padrão elevado, observa-se que as amostras sofreram grande influência da temperatura. Estes resultados revelaram que o lipossoma de DODAB preparado em água não apresenta boa estabilidade frente a mudanças de temperaturas. Este aspecto é importante para os experimentos de polimerização “*in situ*” com ácido acrílico, pois a reação de polimerização tinha sido planejada à 70 °C. Assim, foi preciso encontrar uma forma de aumentar a estabilidade do lipossoma frente à temperatura, decidindo-se assim por adicionar um surfactante anfotérico para aumentar a estabilidade ao lipossoma de DODAB como foi realizado por Scarioti *et al.* (2011).

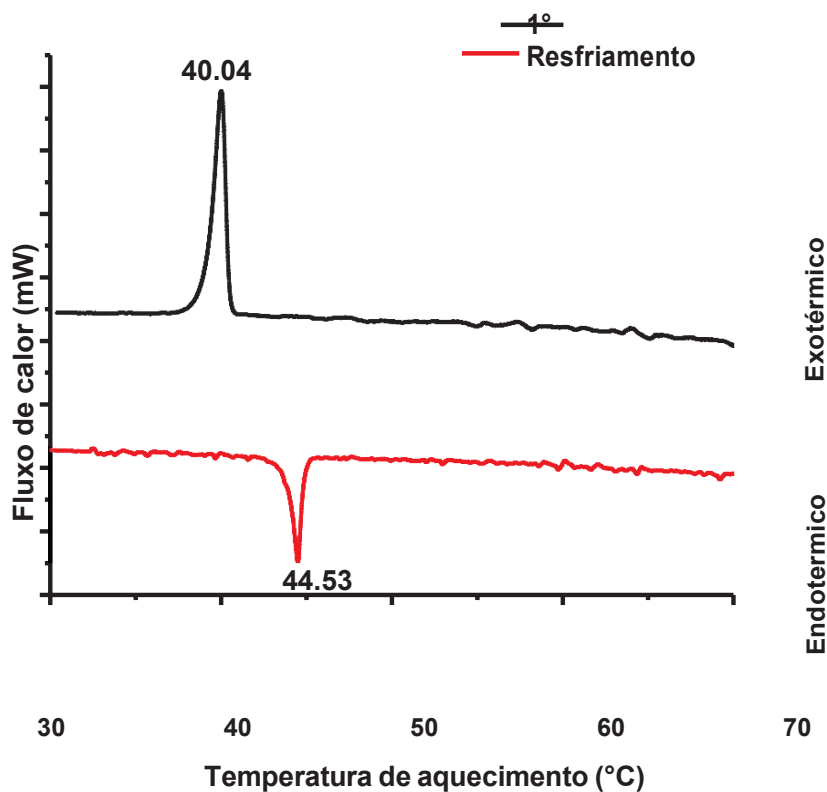
#### 4.1.1.1 Estudos da temperatura de transição do lipossoma DODAB

1 mmol L<sup>-1</sup> em água

Foi realizado para o lipossoma DODAB 1mmol L<sup>-1</sup> um teste calorimétrico medido em um micro-DSC, determinando assim a  $T_m$ , das vesículas, os resultados podem ser visualizados na FIGURA 11. Para tais experimentos foi utilizado o lipossoma produzido com aquecimento em banho-maria por 60 min.

A temperatura de transição ( $T_m$ ) no resfriamento para o lipossoma de DODAB 1mmol L<sup>-1</sup> apresentou-se em 40,04 °C e para o aquecimento em 44,53 °C, este fenômeno é conhecido como histerese do comportamento termotrópico (BENATTI *et al.*, 2001; FEITOSA; BARRELEIRO; OLOFSSON, 2000; NASCIMENTO; RAPUANO; LESSA, 1998), e é típico destas estruturas de DODAB. Este resultado coincide com trabalhos anteriores de Feitosa *et al.* (2005), onde foram realizadas análises calorimétricas por micro-DSC para distintos lipossomas encontrando valores entre 35 e 40 °C para o aquecimento de lipossomas 1 mmol L<sup>-1</sup> de DODAB em água, e entre 43 e 47 °C para o resfriamento. Nestas temperaturas a bicamada do lipossoma DODAB passava de um estado mais rígido (estado gel) a um estado mais brando (líquido cristalino). A entalpia encontrada para o resfriamento foi de -72,6 J/g sendo exotérmica e para o aquecimento foi 73,5 J/g sendo endotérmica.

FIGURA 11 RESULTADOS DO DSCII-MICRO OBTIDOS PARA LIPOSSOMA DODAB  $1\text{mmol.Lmol L}^{-1}$  PELO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO EM ÁGUA, 60 MIN DE AQUECIMENTO DE 25 A  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



#### 4.1.1.2 Estudos calorimétricos das interações do lipossoma DODAB com o monômero ácido acrílico

A interação do lipossoma DODAB com o monômero ácido acrílico, nas distintas concentrações, foram analisadas por meio de um estudo calorimétrico. Os gráficos obtidos estão apresentados na FIGURA 12. Para tanto, foram determinadas os valores de  $T_m$  na presença de ácido acrílico, e a temperatura de transição aumentou de  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  para  $47\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante o aquecimento. O mesmo ocorreu como o processo de resfriamento onde a  $T_m$ , que inicialmente era de  $39.9\text{ }^{\circ}\text{C}$  e se deslocou para  $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em geral, conforme TABELA 2, a  $T_m$  teve aumentos de aproximadamente  $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  relativos as concentrações de ácido acrílico adicionadas, tanto para o aquecimento como para o resfriamento.

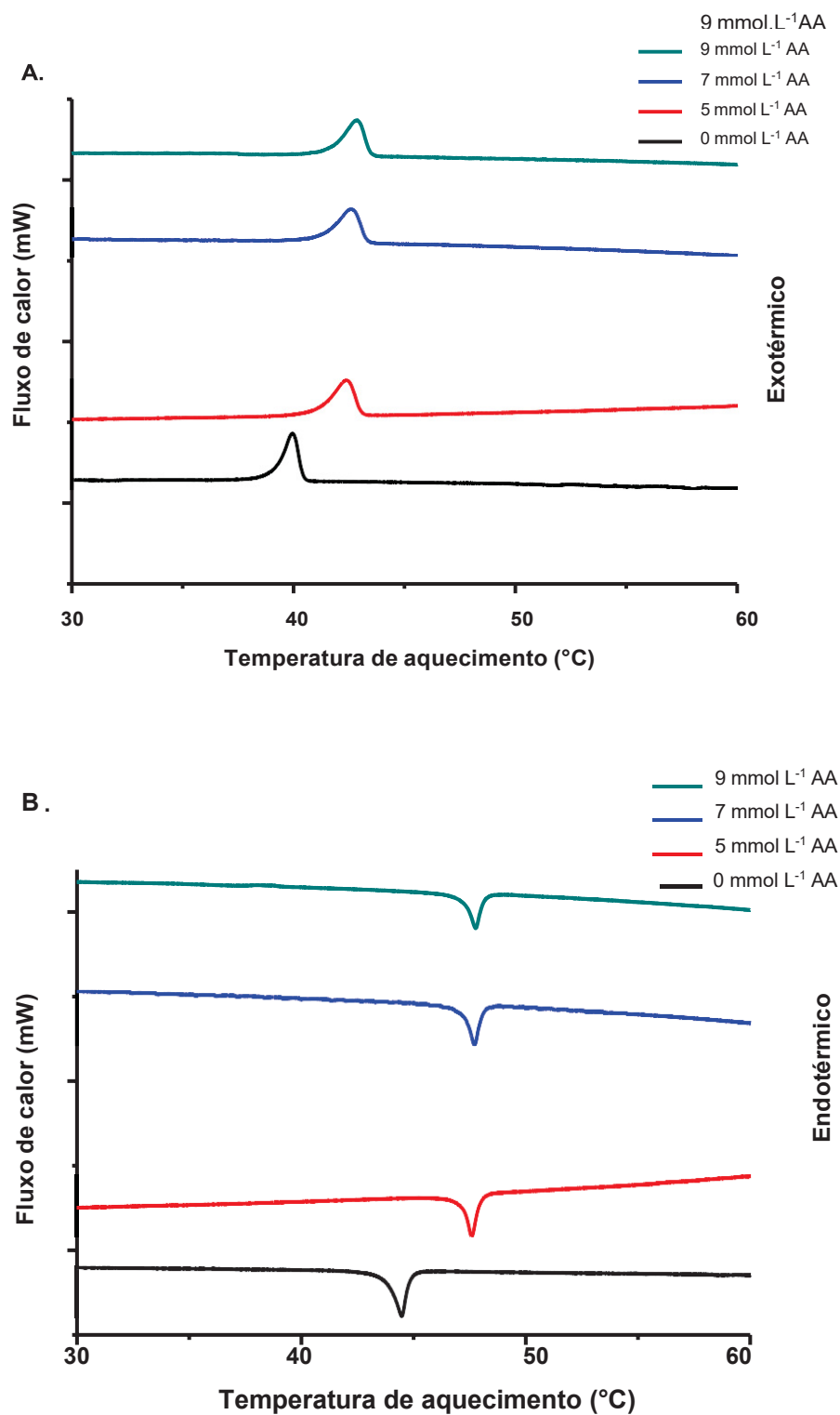
TABELA 2 TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO OBTIDA PARA OS DISTINTOS LIPOSSOMAS POR ANÁLISE CALORIMÉTRICA, ADICIONANDO ÁCIDO ACRÍLICO A DISTINTAS CONCENTRAÇÕES, pH 5.

| Lipossoma pH 5                                             | T <sub>m</sub><br>aquecimento<br>(°C) | Entalpia<br>(J/g) | T <sub>m</sub><br>resfriamento | Entalpia<br>(J/g) |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|
| DODAB 1 mmol L <sup>-1</sup>                               | 44,7                                  | 55,8              | 39,9                           | -57,6             |
| DODAB 1 mmol L <sup>-1</sup><br>+AA 5 mmol L <sup>-1</sup> | 47,6                                  | 51,1              | 42,4                           | -60,3             |
| DODAB 1 mmol L <sup>-1</sup><br>+AA 7 mmol L <sup>-1</sup> | 47,7                                  | 51,5              | 42,6                           | -59,1             |
| DODAB 1 mmol L <sup>-1</sup><br>+AA 9 mmol L <sup>-1</sup> | 47,8                                  | 51,8              | 42,9                           | -58,6             |

Ao estudar as entalpias para cada etapa de aquecimento e resfriamento dos lipossomas DODAB com AA (TABELA 2), foi observado que para o aquecimento, a entalpia foi de 55 para 51 J/g, e no resfriamento o valor da entalpia diminuiu de -57 J/g a aproximadamente -60 J/g novamente sem grande variação nas diferentes concentrações de AA usadas.

Em conclusão, as T<sub>m</sub> para o aquecimento e resfriamento aumentam com a adição de AA. Embora, as entalpias diminuam ao se adicionar AA, indicando uma interação entre o DODAB e o AA. A diminuição de energia pode ser por uma estabilização devido ao ajuste a pH 5, onde interagem as cabeças polares do surfactante com a parte do acrilato, isto faz que o lipossoma mantenha uma organização na sua estrutura (estado gel FIGURA 4).

FIGURA 12. RESULTADOS DOS ANÁLISES CALORIMÉTRICO OBTIDOS COM DSCIII: LIPOSSOMAS DE DODAB (ÁGUA SON 3 min) COM O MONÔMERO ÁCIDO ACRÍLICO (AA) A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM pH 5. A) RESFRIAMENTO. B) AQUECIMENTO.



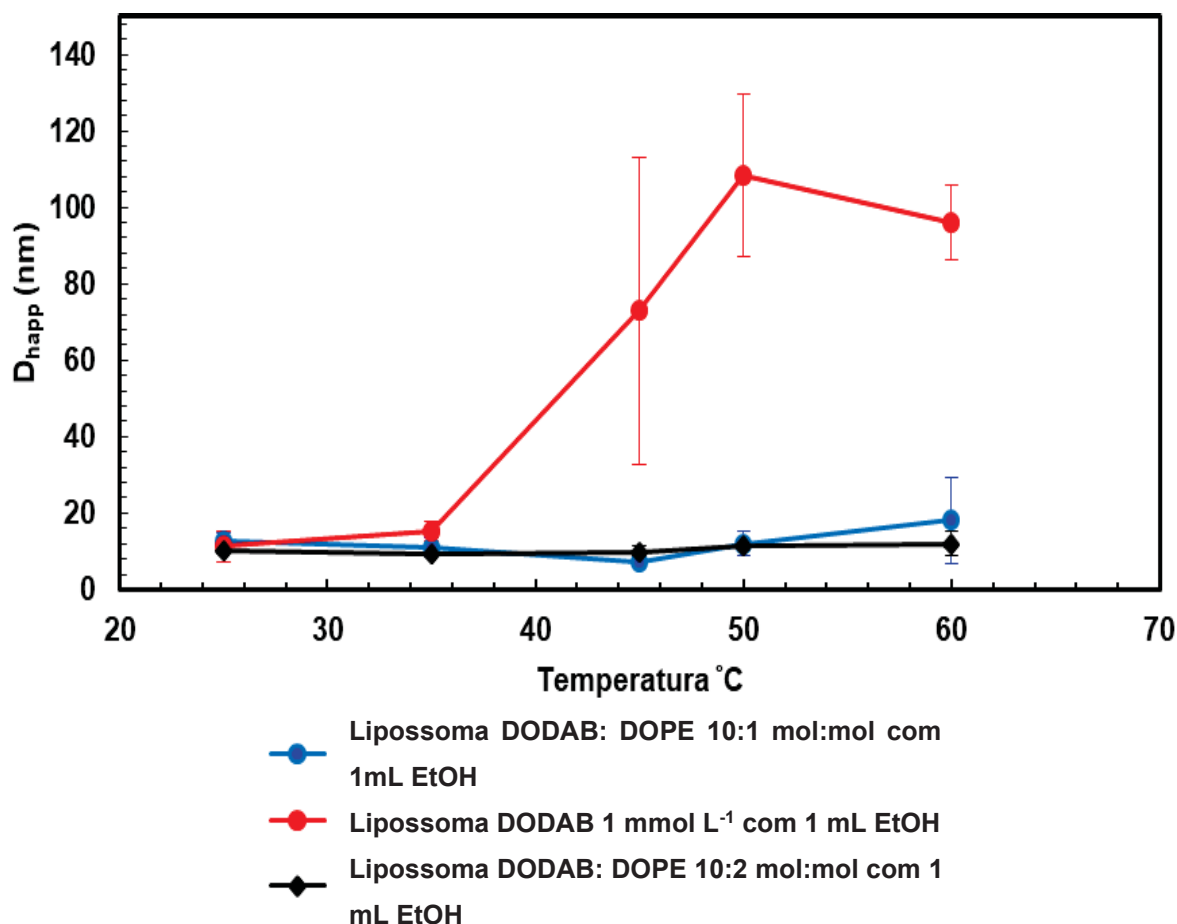
#### 4.1.1.3 Lipossomas DODAB:DOPE por injeção de etanol

O surfactante DOPE foi adicionado às formulações para melhorar a estabilidade dos lipossomas de DODAB frente a mudanças de temperatura. Isto já havia sido realizado anteriormente por outros autores (SCARIOTI et al., 2011). Com a finalidade de melhorar a dissolução do DOPE e aumentar assim seu efeito estabilizante, optou-se por fazer lipossomas por injeção de etanol. Para isto foi usado inicialmente 1 mL de etanol para dissolver a quantidade necessária de DODAB:DOPE 10:1 com concentração de DODAB  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Durante 30 min de agitação foi observada uma boa dissolução. Foram preparados dois lipossomas por injeção de etanol em água, os quais foram avaliadas as temperaturas de  $25^\circ\text{C}$  e  $60^\circ\text{C}$ , seguido por sonicação durante 5 min, uma vez prontos, foram guardados durante 24 horas antes de medidos no DLS.

Para o lipossoma que foi preparado a  $25^\circ\text{C}$ , foi observada uma separação de fase, uma vez que a quantidade de etanol utilizada não foi suficiente para solubilizar os surfactantes e induzir a auto-organização do lipossoma. O lipossoma preparado a  $60^\circ\text{C}$  não apresentou separação, ficando transparente. Deste último obtiveram-se os  $D_{\text{happ}}$  medidos no DLS (FIGURA 13).

Com o lipossoma de DODAB  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ , preparado por injeção de etanol, foi observada uma variação no  $D_{\text{happ}}$ , incrementando com o aumento da temperatura, mas com o lipossoma DODAB:DOPE (10:1 mol:mol) e (10:2 mol:mol) observamos uma estabilidade nos tamanhos em toda a faixa de temperatura estudada. Embora, foi estudada a quantidade de etanol que seria adicionada na formulação DODAB:DOPE.

FIGURA 13 RESULTADOS DO ANÁLISES DO DIÂMETRO MÉDIO DE PARTÍCULA OBTIDOS PARA LIPOSSOMA DODAB: DOPE 1mmol L<sup>-1</sup> PELO MÉTODO DE INJEÇÃO DE ETANOL 5 MIN DE SONICAÇÃO, COMPARADO COM O LIPOSSOMA DE DODAB PREPARADO POR INJEÇÃO DE ETANOL.



#### 4.1.1.4 Ajuste da quantidade de etanol no preparo de lipossomas DODAB:DOPE

Foram realizados novos lipossomas usando uma menor quantidade de etanol, 300µL, preparados conforme descritos na metodologia (Item 3.2.2). Os resultados do tamanho a distintas temperaturas foram medidos no DLS (FIGURA 14). Os tamanhos dos lipossomas aumentaram e mantiveram estabilidade com a temperatura no DLS, concluindo assim que o etanol tem um efeito sobre o tamanho destes lipossomas. Assim, lipossomas preparados com dispersão prévia em 300 µL de etanol foram utilizados nos métodos de injeção de etanol.

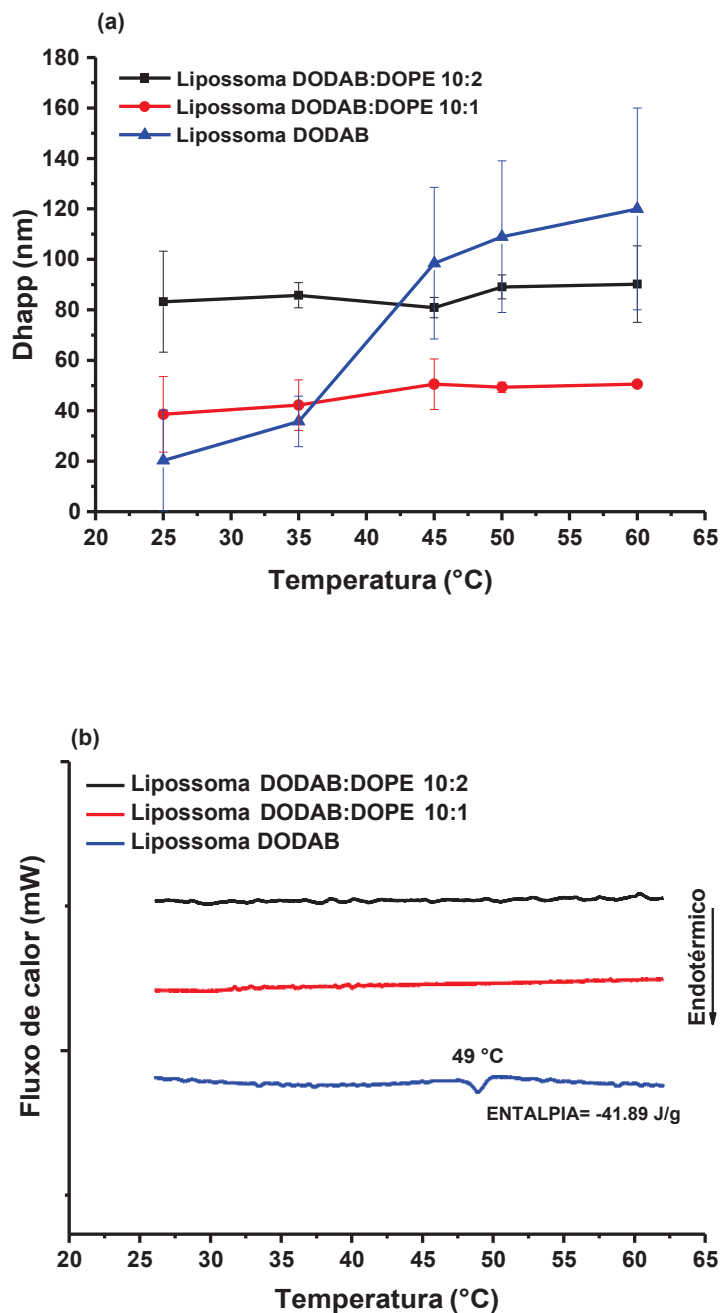
#### 4.1.2 Tamanho e estabilidade térmica dos lipossomas

Após a preparação pelo método de injeção de etanol dos lipossomas DODAB e DODAB: DOPE, utilizando como referência a concentração de DODAB a  $1\text{ mmol L}^{-1}$ , foram analisados por micro-DSC e DLS (FIGURA 14). O  $D_{\text{happ}}$  e a temperatura de transição de fase, de gel para líquido cristalino ( $T_m$ ), para os lipossomas foram determinados como mostrado na FIGURA 14. A dependência do  $D_{\text{happ}}$  em função da temperatura para os lipossomas de DODAB e DODAB: DOPE também foi observada por Scarioti *et al.* (2011) em estudos por espalhamento de luz dinâmico.

A presença de uma  $T_m$  indica a formação de uma vesícula (ALVES et al., 2007; FEITOSA, 2004) e os lipossomas preparados com DODAB apresentaram  $T_m$  mensurável a  $49\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Porém, para DODAB: DOPE, a  $T_m$  não foi observada na faixa de temperatura avaliada. Junto com os resultados obtidos no DLS pode-se ver que a estrutura do lipossoma DODAB é mantida na presença do DOPE (HUNGERFORD et al., 2006; SCARIOTI et al., 2011; TOOMBES et al., 2002), sendo possível proporcionar estabilidade térmica do lipossoma, que é desejada para o processo de polimerização dependente da temperatura.

Como a polimerização de AA na superfície dos lipossomas DODAB: DOPE ocorre a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a estabilidade térmica dos lipossomas foi considerada como um parâmetro importante para os seguintes experimentos, e principalmente foi usada a razão DODAB: DOPE de 10: 2 mol: mol,  $1\text{ mmol L}^{-1}$  DODAB na continuação dos experimentos de polimerização “*in situ*” assistidos pela interface.

FIGURA 14 TESTES DE ESTABILIDADE DE TEMPERATURA PARA DODAB, DODAB: DOPE 10: 1 (mol: mol) OU 10: 2 (mol: mol) TODOS ELES COM CONCENTRAÇÃO DE DODAB DE 1 mmol L<sup>-1</sup>, A) D<sub>HAPP</sub> DOS TRES LIPOSSOMAS MEDIDO POR DLS E B) TESTE CALORIMÉTRICO MEDIDOS POR DSC (2º CICLO DE AQUECIMENTO EM ATMOSFERA INERTE DE NITROGÊNIO, COM TAXA DE AQUECIMENTO 0,2 °C.min<sup>-1</sup>).



#### 4.1.3 Experimentos de adsorção de ácido acrílico em filmes DODAB e lipossomas

Filmes de DODAB foram formados sob um cristal de quartzo piezoelétrico coberto com ouro. Previamente, a superfície do ouro foi modificada com 1-hexanotiole posteriormente com DODAB (FIGURA 15). O ângulo de contato para a camada realizada com 1-hexanotiol foi de  $99^\circ$  (FIGURA 15a) indicando uma tensão superficial mais alta que quando comparada com o cristal limpo a qual foi de  $90^\circ$ , sugerindo que a primeira modificação tinha sido atingida, pelo caráter hidrofóbico do 1-hexanotiol. Depois com a camada DODAB o ângulo diminuiu para  $49^\circ$ , indicando que o grupo da cabeça catiônica estava exposto na superfície, de forma semelhante como foi descrito por outros autores (KAMINSKI et al., 2016; KWON et al., 2006; TREVOY; JOHNSON, 1958; ULMAN, 1996).

A adsorção de AA em cristais QCM foi avaliada com uma interface modificada. O efeito do pH e da concentração também foram avaliados. Para AA, o  $pK_a$  é de 4,25 (CHARMAN et al., 1991), a adsorção de AA começa a aumentar significativamente em  $pH > 4,4$ . Este fato foi associado ao grau de ionização do AA promovendo a interação com o DODAB e uma efetiva adsorção em  $pH\ 5,0$ .

O pH foi mantido em 5,0 para construção da isoterma de adsorção e um esquema representativo dessa interação foi apresentado na FIGURA 16. Uma vez que o pH ficou naturalmente em  $\sim 5$ , após a dissolução do AA em água, evitando assim ajustar o pH, devido ao aumento na solução da força iônica, o pH 5 foi usado em todos os experimentos a seguir.

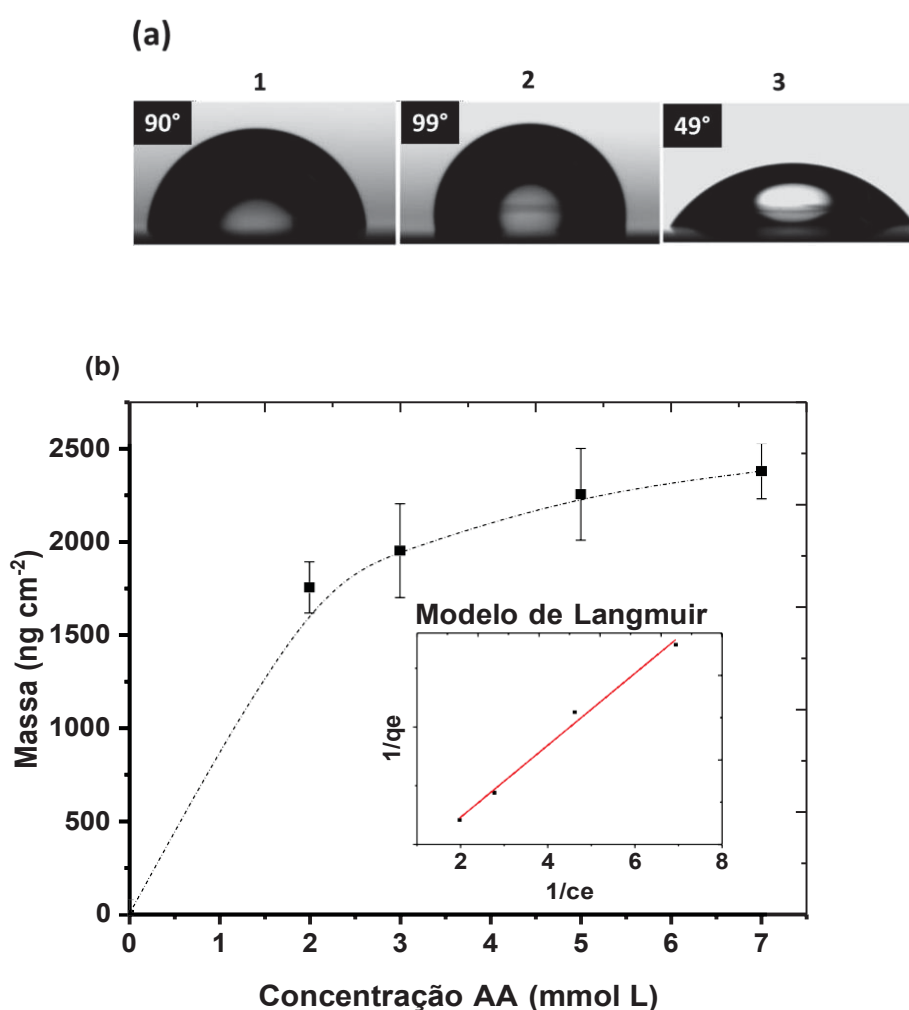
A adsorção do filme de DODAB foi medida em uma concentração de  $2\text{ mmol L}^{-1}$  de AA, o qual estava no limite inferior de quantificação pelo QCM. Para 5 e  $7\text{ mmol L}^{-1}$  a massa adsorvida foi de  $2.283$  e  $2.360\text{ ng cm}^{-2}$ , respectivamente. Em concentrações mais altas, a adsorção tende a formar um platô, sugerindo uma deposição em monocamada. Posteriormente, os dados foram ajustados ao modelo de adsorção de Langmuir, conforme apresentado na FIGURA 15b. Usando o modelo de Langmuir, **equação 3**, foi possível obter a quantidade máxima de AA adsorvido ( $q_m$ ) e a constante de Langmuir ( $K_L$ ), como  $2760 \pm 670\text{ ng cm}^{-2}$  e  $11,82 \pm 2,75\text{ L mmol}^{-1}$ , respectivamente.

$$\frac{1}{qe} = \left( \frac{1}{K_L q_m} \right) \frac{1}{ce} + \frac{1}{q_m} \quad (\text{eq. 3})$$

A  $q_e$  é a quantidade absorvida no equilíbrio;  $K_L$  é a constante de Langmuir referida à afinidade de adsorção entre o adsorvente e o adsorbato,  $ce$  é a concentração no equilíbrio e  $q_m$  é a quantidade máxima adsorvida.

Os resultados indicam claramente uma adsorção favorável de AA nos filmes de DODAB, uma vez que  $K_L$  apresenta a razão entre as constantes de equilíbrio de adsorção/dessorção.

FIGURA 15 EXPERIMENTOS DE ADSORÇÃO DE ÁCIDO ACRÍLICO EM FILMES DODAB E LIPOSSOMAS. A) ÂNGULO DE CONTATO DE UMA GOTTA DE ÁGUA EM CRISTAIS DE OURO: 1) OURO PURO; 2) OURO MODIFICADO COM 8 mmol L<sup>-1</sup> DE 1-HEXANOTIOL; 3) OURO MODIFICADO COM 1-HEXANOTIOL E 10 mmol L<sup>-1</sup>. B) ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE ÁCIDO ACRÍLICO EM UMA ÚNICA CAMADA DE DODAB EM PH 5 NO GRÁFICO INSERTO, É DADA A LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE LANGMUIR.



A interação do AA com o lipossoma também foi testada em diferentes valores de pH (FIGURA 17a). Com o aumento do pH, o potencial zeta diminuiu acentuadamente até a estabilização em  $\text{pH} \geq 4,4$ . Esta é uma indicação clara de que a adsorção de AA na superfície do lipossoma DODAB se deve à redução do potencial zeta positivo. A superfície do lipossoma interage com o AA desprotonado devido à dupla camada de contra-íons de AA na interface. A interação Colômbica afeta o potencial zeta e, em  $\text{pH} > 4,4$ , o potencial zeta foi de  $\sim 65\text{mV}$  a estabilização no potencial indica que os sítios disponíveis na interface foram ocupados, conforme previamente observado por QCM e estudos bidimensionais (FIGURA 16).

FIGURA 16 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ADSORÇÃO DO ÁCIDO ACRÍLICO NA MONOCAMADA DODAB. OS DOIS OXIGÊNIOS (CÍRCULOS VERMELHOS) NO ÁCIDO ACRÍLICO ÍON INTERAGEM COM A CABEÇA DO SURFACTANTE POLAR DODAB.

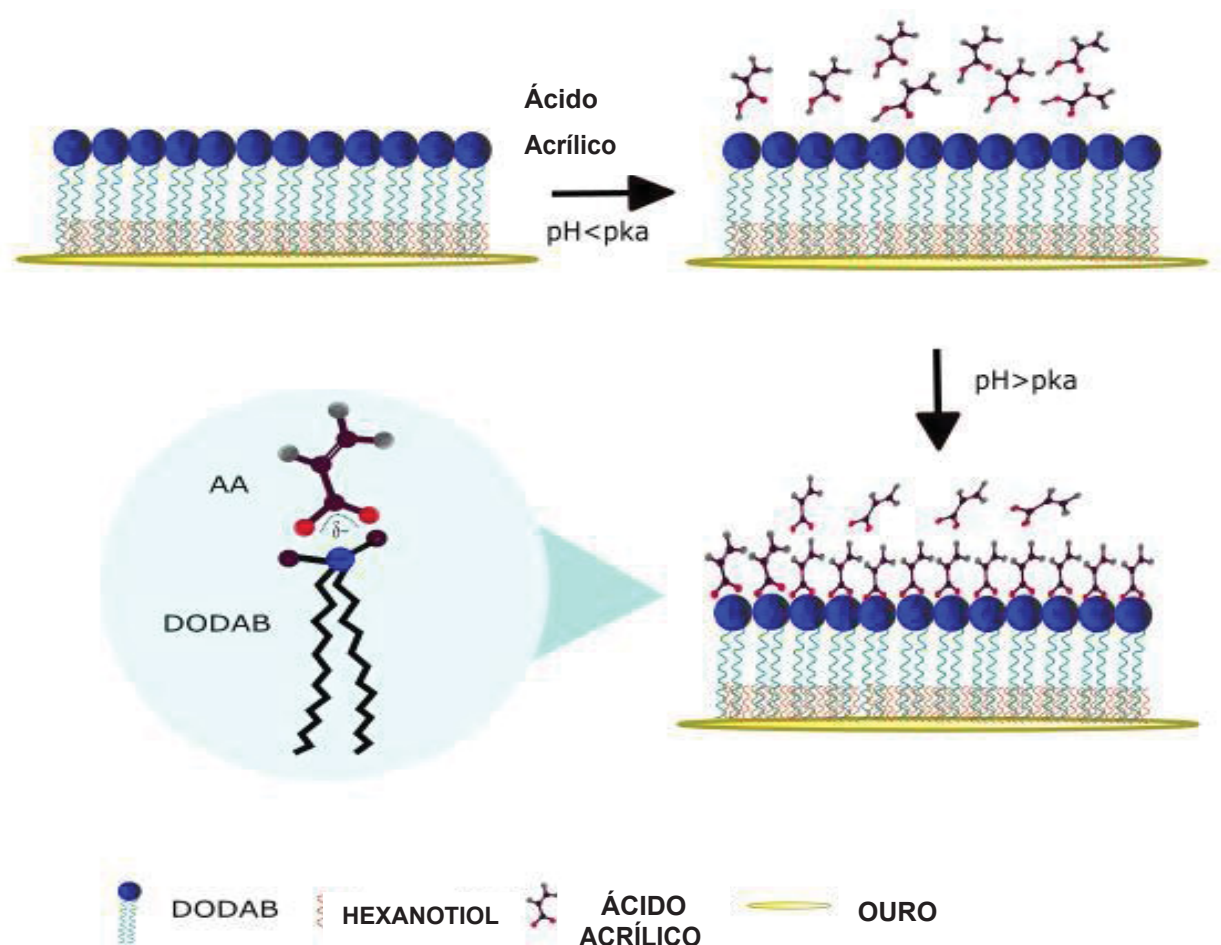
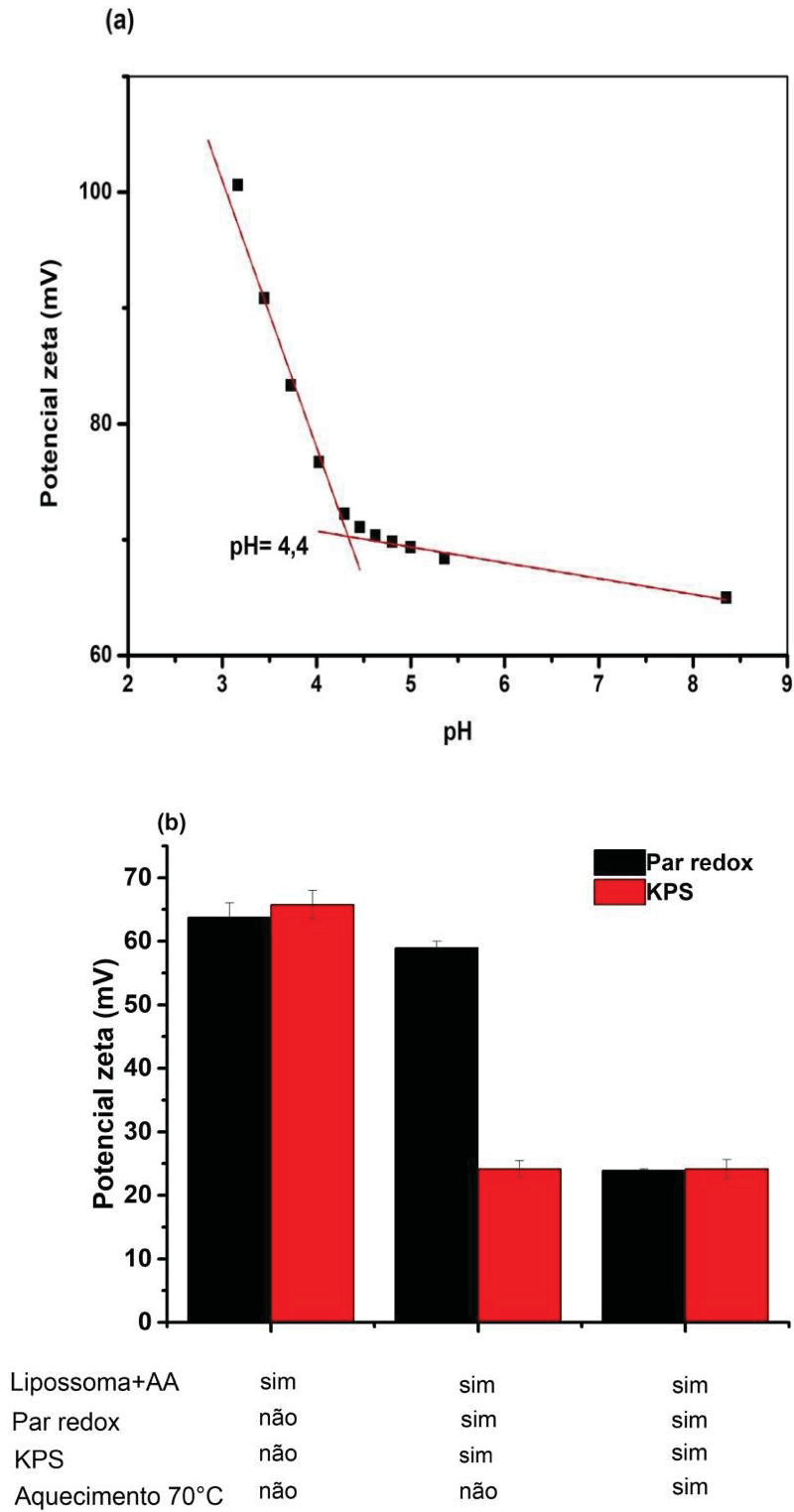


FIGURA 17 ANÁLISES DE POTENCIAL ZETA COM LIPOSSOMAS EM DIFERENTES pH E COM E SEM INICIADORES. (A) POTENCIAL ZETA DE LIPOSSOMAS DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol) E CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ACRÍLICO DE 7 mmol L<sup>-1</sup> COM VARIAÇÃO DE pH. (B) POTENCIAL ZETA DE DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol) EM PH 5 E 7 mmol L<sup>-1</sup> DE ÁCIDO ACRÍLICO COM O INICIADOR DE PAR REDOX VERMELHO (3 mmol L<sup>-1</sup> DE ÁCIDO ASCÓRBICO E 18 mmol. L<sup>-1</sup> COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO) E PRETO KPS (0,15 mmol L<sup>-1</sup> ) ANTES E DEPOIS DA POLIMERIZAÇÃO INDUZIDA POR AQUECIMENTO.



Após a definição do pH para a polimerização de AA em PAA, foi avaliado o efeito do iniciador e do processo de polimerização induzido por aquecimento (FIGURA 17b) sobre o potencial zeta. Foram estudados os iniciadores: o par redox ou KPS, em uma mistura de lipossomas e AA a 25 °C. Para os iniciadores do par redox não foram observadas diferenças no potencial zeta (de +60 a +57mV), no entanto, após aquecimento a 70 °C, o potencial zeta diminuiu a +22mV. Isso indica que a polimerização ocorreu com uma adsorção significativa na interface do lipossoma, produzindo as cápsulas do lipossoma.

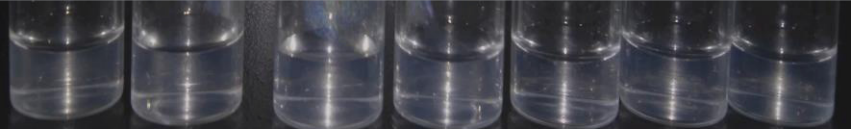
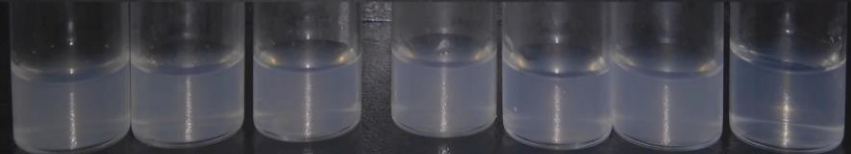
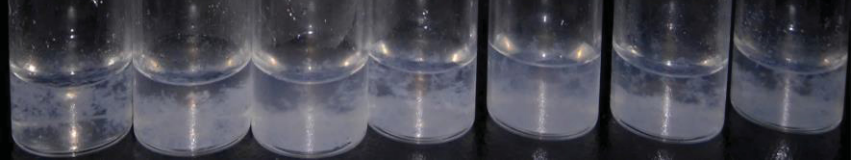
Para o iniciador KPS foi observada diferença no potencial logo após a adição sobre o lipossoma, diminuindo o potencial para +20 mV. Após o aquecimento a 70°C, o potencial zeta manteve-se relativamente inalterado. A diminuição do potencial zeta gerou problemas de estabilidade nas cápsulas de lipossoma, reduzindo o potencial repulsivo, caracterizado por turvação, mesmo antes da polimerização.

#### *4.1.4 Estudos do iniciador persulfato de potássio e a sua interação com lipossoma DODAB:DOPE na polimerização “in situ” com AA*

Na primeira parte deste trabalho foi estudada a interação do KPS com o lipossoma e o AA, tendo sido observado que quando era adicionado este iniciador ao lipossoma DODAB: DOPE (10: 2 mol:mol) a dispersão apresentava um aspecto esbranquiçado, mesmo sem aquecimento. Assim, devido ao indício de instabilidade coloidal, foram testadas diferentes concentrações do iniciador KPS com o lipossoma e diferentes concentrações de AA, com o objetivo de avaliar visualmente diferenças quanto a mudança de cor sem aquecimento (FIGURA 18).

A partir desta visualização, foi escolhida, dentre as concentrações avaliadas, a concentração de 0,15 mmol L<sup>-1</sup> de KPS, uma vez que a formulação se apresentou menos turva e sem separação de fase.

FIGURA 18 SISTEMA DE LIPOSSOMA DODAB: DOPE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE KPS E AA, COM AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE KPS APARECE TURBIDEZ E SEPARAÇÃO, TODOS A  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

| KPS                  | Ácido Acrílico (AA/ $\text{mmol L}^{-1}$ )                                         |   |   |   |   |   |   |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| $\text{mmol L}^{-1}$ | 1                                                                                  | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 0,15                 |  |   |   |   |   |   |   |
| 0,25                 |  |   |   |   |   |   |   |
| 0,50                 |  |   |   |   |   |   |   |

Posteriormente, foram realizadas medidas do diâmetro hidrodinâmico aparente ( $D_{\text{happ}}$ ) utilizando a técnica de DLS, e foram obtidos os  $D_{\text{happ}}$  de  $62 \pm 14$  e  $102 \pm 14$  nm para o lipossoma sem o iniciador e com  $0,15\text{ mmol L}^{-1}$  do iniciador (KPS), respectivamente. O aumento no  $D_{\text{happ}}$  sugere uma interação entre o persulfato de potássio com a cabeça catiônica do surfactante. Possivelmente, houve uma desidratação das cabeças polares do DODAB, acarretando em um rearranjo de sua estrutura associado à uma mudança do parâmetro crítico de empacotamento do surfactante e reduzindo a repulsão destas cabeças polares. Este efeito tem sido explicado pela série Hofmeister, segundo a qual os ânions e cátions em solução são organizados por a sua capacidade de desidratar a cabeça do surfactante (cosmotrópicos) ou não afetar a hidratação (caotrópicos), associados à capacidade do cátion ou ânion em interagir com a água. De acordo com essa série, o íon persulfato é ser mais forte que o íon  $\text{Br}^-$  como um agente desestabilizante (AROTI et al., 2007; BLACHECHEN L., SILVA J., BARBOSA L., 2012; LEE; NGUYEN, 2013; LOPEZ, 2006).

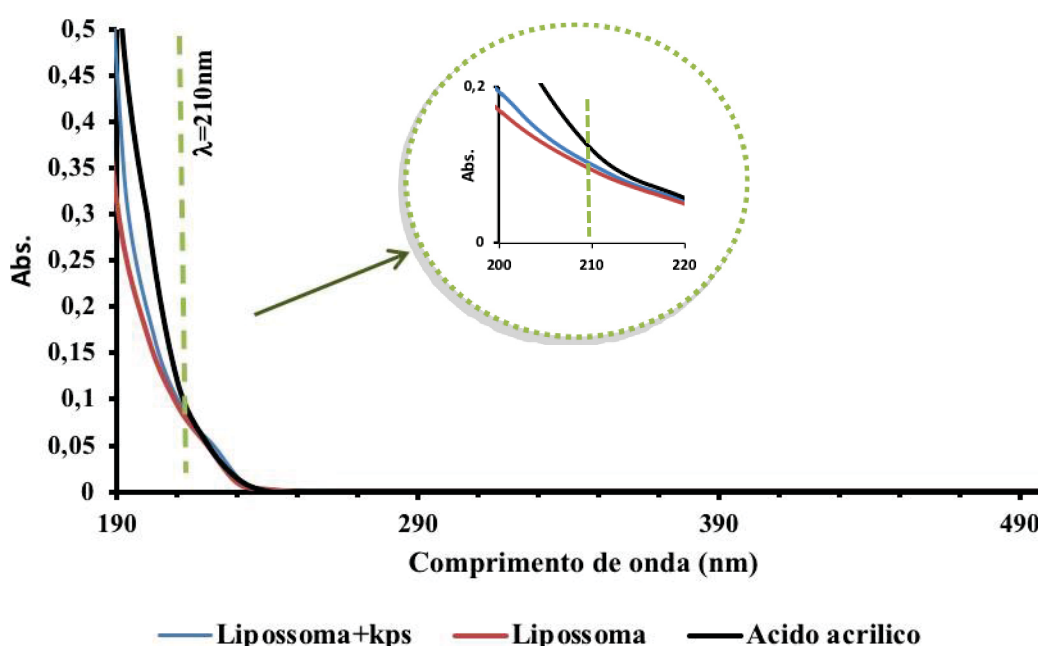
Além disso, outro possível cenário foi que de que a reação de polimerização com o iniciador KPS iniciou a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Entretanto, estudos anteriores revelem que a formação do radical, bem como o início da reação de polimerização, só ocorrem

após a ativação térmica ( $\geq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (HENTON; POWELL; REIM, 1996; MANO; MENDES, 2004). Em concordância com essa afirmação, os estudos de polimerização “*in situ*” com lipossoma foram realizados com este iniciador à  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (SCARIOTI et al., 2011). Portanto, a possivelmente a mudança de turvação ocorre pelo efeito dos sais cosmotrópicos sobre a estrutura dos surfactantes, no entanto, mais estudos são necessários para explicar as características macroscópicas observadas nesse experimento.

#### 4.1.4.1 Conversão de AA a PAA utilizando quantificação por UV-Vis

Após o experimento de interação do KPS com o lipossoma (FIGURA 18), foi realizada a polimerização com KPS. Para tanto, foram utilizados  $0,15\text{ mmol L}^{-1}$  do iniciador, diferentes concentrações de AA ( $1\text{--}15\text{ mmol L}^{-1}$ ), tempo reacional de 1 h e temperatura de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Essas amostras foram diluídas 1:20 (para as concentrações de AA  $1\text{--}6\text{ mmol L}^{-1}$ ) ou 1:30 (para as concentrações de AA  $7\text{--}15\text{ mmol L}^{-1}$ ) e analisadas por UV-Vis, usando como branco a água. Entretanto, foi observado através de varreduras na região do UV-Vis de 190-500 nm que o lipossoma absorvia na mesma região do AA, 210 nm (FIGURA 19).

FIGURA 19 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO LIPOSSOMA DODAB A  $1\text{ mmol L}^{-1}$ , LIPOSSOMA DODAB  $1\text{ mmol L}^{-1}$ +KPS  $0,15\text{ mmol L}^{-1}$  E AA  $2\text{ mmol L}^{-1}$ . AS AMOSTRAS FORAM DILUÍDAS 1:20, MEDIÇÃO REALIZADA NA FAIXA DE 190 A 500 nm.



Portanto, devido a influência do lipossoma nas medidas de absorção no UV-Vis, foram realizadas centrifugações das amostras à 12.000 g, com o objetivo de separar o lipossoma do AA não convertido a PAA. Entretanto, mesmo após 4 h de centrifugação houve uma interferência na quantificação do teor de AA, associada a não sedimentação do lipossoma durante a centrifugação, que culminaram na busca de outros métodos analíticos.

Uma modificação proposta foi a utilização de um branco com lipossoma e KPS, que conforme processamento da amostra também foi aquecido a 70 °C. Sendo assim, esse branco foi utilizado para subtrair a influência do lipossoma na absorção do UV. A partir deste procedimento, foi possível determinar o consumo de 0,254 mmol L<sup>-1</sup> para os lipossomas polimerizados com AA de 1 a 6 mmol L<sup>-1</sup>, correspondendo a uma conversão de AA em PAA de 8%. Para concentrações de monômero maiores que 8 mmol L<sup>-1</sup> não foi possível determinar a conversão em função de influências do lipossoma sobre a quantificação (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2017), conforme TABELA 3.

TABELA 3 CONVERSÃO DO ÁCIDO ACRÍLICO EM POLI(ÁCIDO ACRÍLICO) PELA POLIMERIZAÇÃO “*IN SITU*” COM O LIPOSSOMA DE DODAB 1 mmol L<sup>-1</sup> (DODAB:DOPE 10:2 mol:mol) E O INICIADOR KPS (2 h A 70 °C). AS AMOSTRAS FORAM LIDAS APÓS 24 h DE REPOUSO A 25 °C, MEDIDO ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-Vis NA FAIXA DE 210 nm.

| Concentração AA<br>(mmol L <sup>-1</sup> ) inicial | Concentração AA<br>(mmol L <sup>-1</sup> ) consumido | Conversão<br>% |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------|
| 1                                                  | 0,140                                                | 14,01          |
| 3                                                  | 0,251                                                | 8,35           |
| 5                                                  | 0,273                                                | 5,46           |
| 6                                                  | 0,352                                                | 5,87           |

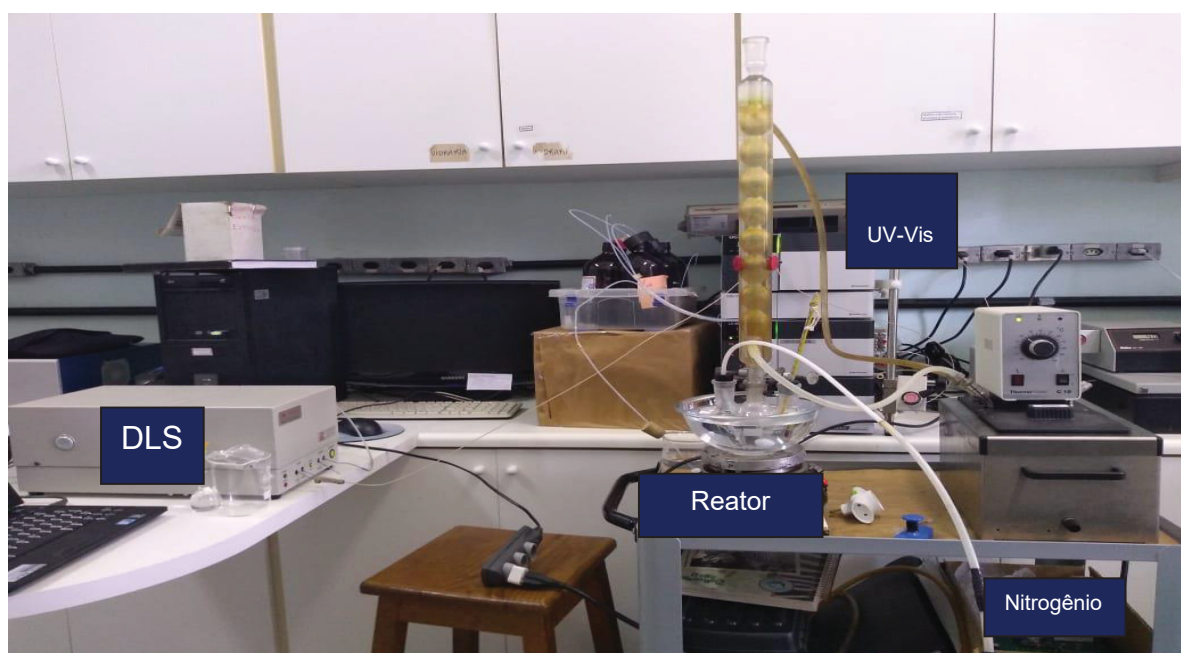
O método UV-Vis para a identificação na conversão de AA em PAA tem sido usado por outros autores (D’AGOSTINI-JUNIOR et al., 2011; SCARIOTI et al., 2011) junto com o sistema ACOMP, e com outras metodologias de identificação usando como iniciador KPS em reações simples de polimerização de AA, não usando lipossomas, conseguiram conversões de aproximadamente 75% (BERNARDY, 2009; CUTIE, 1997). Considerando que é possível que existam interferências na

absorção na região do UV associadas à presença de lipossoma, o que pode subestimar a quantificação da conversão do AA, foram realizados experimentos utilizando o ACOMP (*automatic continuous online monitoring polymerization*), tentando-se controlar a interferência da absorção do lipossoma sobre a quantificação da conversão do AA em PAA (D'AGOSTINI-JUNIOR et al., 2011; SCARIOTI et al., 2011).

#### 4.1.4.2 Polimerização de AA em PAA utilizando sistema ACOMP

O sistema ACOMP foi usado para observar a mudança nas medidas de absorção utilizando o espectrofotômetro UV-Vis e o detector de espalhamento de luz dinâmico (DLS) a 90° e assim conseguir a monitorização em tempo real da reação de polimerização com o iniciador KPS e o sistema desenvolvido com lipossoma DODAB: DOPE (10:2 mol:mol) (FIGURA 20).

FIGURA 20 SISTEMA ACOMP PARA SISTEMAS TRIDIMENSIONAIS A SEREM APLICADOS NA MONITORAÇÃO EM TEMPO REAL DO PROCESSO DE SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS DE DODAB: DOPE (10:2 MOL:MOL) E REVESTIDAS COM PAA POR POLIMERIZAÇÃO “*IN SITU*”.



Utilizando um sistema que monitora continuamente a absorvância da amostra, esperava-se reduzir a influência do lipossoma na absorção, e que a polimerização pudesse ser monitorada pela redução do sinal de absorção no UV-Vis em 210 nm, associado à conversão do AA em PAA. Ressalta-se que não há

absorção apreciável do PAA em 210 nm (D'AGOSTINI-JUNIOR et al., 2011; SEEYANGNOK et al., 2016). Não foi constatada mudança de absorção mesmo após 8, 10 ou 12 horas. Esse resultado pode ser atribuído à uma baixa conversão de monômero em polímero. Adicionalmente, efeitos da turbidez da amostra e da co-absorção no mesmo comprimento de onda do lipossoma podem interferir na quantificação do AA. Portanto, a quantificação da conversão de AA em PAA não foi possível utilizando o sistema ACOMP pelo detector de UV-Vis. (ANEXO B)

Assim, em função da dificuldade em conseguir mensurar claramente a polimerização, foi sugerida uma nova estratégia, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como ferramenta para quantificar as conversões de AA a PAA.

#### 4.1.4.3 Outros estudos da polimerização do lipossoma com KPS

Para quantificar o AA consumido a PAA, em função da incapacidade da espectrometria na região do UV-Vis e do sistema ACOMP ter se mostrado ineficiente, foi utilizada a separação cromatográfica para quantificar a conversão de AA não convertido à PAA. A quantidade de AA consumida foi determinada após 1 (uma) hora de polimerização com o iniciador KPS e foram realizadas medidas após 24 h de iniciada a polimerização. Os resultados estão registrados na TABELA 4.

TABELA 4 CONCENTRAÇÃO DO AA CONSUMIDO PELA POLIMERIZAÇÃO “*IN SITU*” COM O LIPOSSOMA DODAB: DOPE (10:2 mol:mol) A 1mmol L<sup>-1</sup> DE DODAB E O INICIADOR KPS APÓS DE 1 h E 24 h.

| Concentração<br>de AA (mmol L <sup>-1</sup> ) | Concentração<br>AA (mmol L <sup>-1</sup> )<br>consumido<br>1h | Concentração<br>AA (mmol L <sup>-1</sup> )<br>consumido 24h |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1,00                                          | NQ                                                            | NQ                                                          |
| 3,00                                          | NQ                                                            | NQ                                                          |
| 5,00                                          | NQ                                                            | 0,02                                                        |
| 7,00                                          | 0,51                                                          | 1,02                                                        |

NQ= não quantificável

Os resultados obtidos estão abaixo do LQ do método que é 1,07 mmol L<sup>-1</sup>. Dessa maneira, o método também não foi apropriado para este sistema, para esta concentração de DODAB e AA utilizada. Entretanto, foi possível observar uma baixa conversão.

O ensaio inicial do potencial zeta (FIGURA 17b) demonstrou que a interação entre o DODAB e o iniciador KPS causou uma desestabilização do sistema, antes mesmo da polimerização, associado à uma queda do potencial zeta, e que esta instabilidade no sistema pode estar afetando a polimerização “*in situ*”, com baixas conversões.

Na sequência, em função das baixas conversões de AA para PAA na presença do iniciador KPS, foi utilizado um par redox de peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico, usado por outros autores para polimerização em emulsão, com resultados de até 90% de conversão citados por (DA SILVA, 2016; ROMIO et al., 2009).

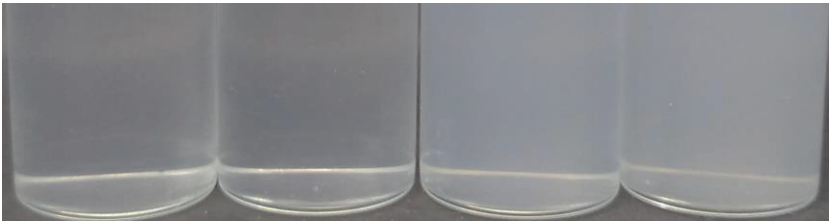
#### *4.1.5 Estudos do iniciador par redox: peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico, e a sua estabilidade com o lipossoma DODAB:DOPE na polimerização “in situ” com AA*

O par redox de iniciadores peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico, foram utilizados em proporções similares às usadas por outros autores (DA SILVA, 2016; ROMIO et al., 2009). Assim, foram avaliadas diferentes concentrações de iniciador e monômero em uma concentração fixa de DODAB: DOPE (10:2 mol: mol) a 1 mmol L<sup>-1</sup> de DODAB. Para estes sistemas, não foram observadas mudanças de turvação na presença do lipossoma ou do lipossoma na presença de AA sem aquecimento, indicando que na presença do par redox há uma menor desestabilização coloidal (FIGURA 20).

A estabilidade das nanocápsulas, após aquecimento a 70 °C, também foi avaliada, uma vez que o objetivo era conseguir a polimerização sem que houvesse a separação de fase. Foi observada turbidez após o aquecimento, conforme observado por Scariotti *et al.* (2011) para a polimerização “*in situ*” de outro sistema lipossômico, sugerindo, a ocorrência da polimerização. Pode-se observar também que o sistema não apresentou separação de fases (FIGURA 21). As

proporções para alcançar esta estabilidade foram 3 mmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e 18 mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio, e foram as utilizadas para os próximos estudos.

FIGURA 21 POLIMERIZAÇÃO “*IN SITU*” DE AA (1 A 7 mmol L<sup>-1</sup>) A PAA PARA O REVESTIMENTO DO LIPOSSOMA DODAB: DOPE (10:2 mol:mol) A 1 mmol L<sup>-1</sup> DE DODAB CONCENTRAÇÃO INICIADORES PAR REDOX DE ACIDO ASCÓRBICO 3mmol L<sup>-1</sup> E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 18 mmol L<sup>-1</sup>

| Amostras                      | Ácido acrílico (AA)                                                                 |                        |                        |                        |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                               | 1 mmol L <sup>-1</sup>                                                              | 3 mmol L <sup>-1</sup> | 5 mmol L <sup>-1</sup> | 7 mmol L <sup>-1</sup> |
| Lipossoma + par redox à 25°C  |   |                        |                        |                        |
| Lipossoma + par redox à 70°C. |  |                        |                        |                        |

#### 4.1.6 Estudo da conversão de AA em PAA utilizando sistema ACOMP usando como iniciadores peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico

De forma similar ao primeiro estudo com KPS, o sistema ACOMP foi utilizado para observar a mudança nas medidas de absorção. Para isto foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis e o detector de espalhamento de luz dinâmico (DLS) à 90°.

Assim foi realizada a monitorização em tempo real da reação de polimerização com os iniciadores ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio e o sistema desenvolvido com lipossoma DODAB: DOPE (10:2 mol:mol) a 1 mmol L<sup>-1</sup> DODAB (FIGURA 22). Para uma melhor visualização dos resultados destes experimentos foi usado o comprimento de onda de 240nm, mas todas as espécies apresentaram absorção em 210 e 240nm, e um comportamento similar.

Na FIGURA 22 foi observado um aumento do sinal em mV do detector de UV ao inserir o lipossoma com ácido acrílico no sistema nos primeiros 5 min, devido ao fato de que o lipossoma e o AA absorvem no mesmo comprimento de onda (240nm). Também pode-se observar um aumento do sinal associado ao aumento da concentração de AA. Após 20 min o sinal aumenta novamente devido a adição dos iniciadores ácido ascórbico e o peróxido de hidrogênio, que também absorvem em 240 nm. Aos 25 min de reação o sinal de absorção à 240 nm começou a diminuir, corroborando a reação de polimerização no sistema, com o consumo de AA para PAA.

Similarmente, foi realizada uma avaliação no sistema ACOMP da reação entre os iniciadores a 70 °C. Após 20 minutos (tempo em chegar ao detector UV-Vis ou “delay time”) há aumento do sinal, mas este aumento não correspondeu a soma do sinal de absorção do ácido ascórbico e do peróxido de hidrogênio quando eles foram medidos isoladamente (FIGURA 21). Ao contrário do esperado, observa-se um sinal muito menor do que a simples soma das absorções, o que indica a formação do radical ascorbila, pelo consumo dos iniciadores para suas formas radicalares (KLESZCZEWSKA; WIESLAWA, 1999), com a final conversão a ácido deshidroascórbico (WHITE-STEVENSON, 1982) mantendo-se constante até 35 min.

Pela complexidade da reação de polimerização radicalar e também uma vez que todos os componentes adsorviam no comprimento de onda de 240 nm, além do próprio consumo de AA ocorrer no mesmo comprimento de onda, houve uma dificuldade ainda maior na interpretação dos resultados. Foram realizados cálculos assumindo que o consumo na reação entre os iniciadores peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico era igual para as reações onde estavam presentes os lipossomas e o AA, usando-se a fórmula para o tratamento dos sinais (eq. 4),

$$S_{AAf} = S_{Tf} - S_{fa} \text{ (eq. 4)}$$

$$C_{AAf} = \frac{S_{AAf}}{\epsilon_{AA} * b} \text{ (eq. 5)}$$

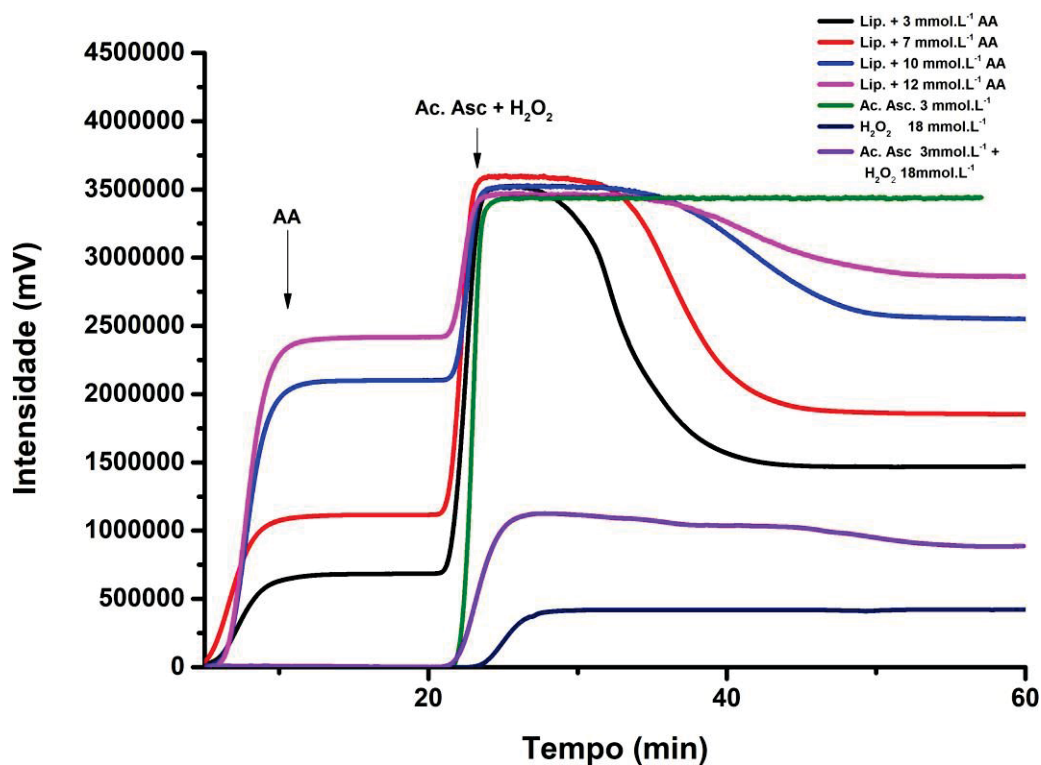
$$\%C_{AA} = \left( \frac{C_{AAi} - C_{AAf}}{C_{AAi}} \right) * 100 \text{ (eq. 6).}$$

Onde a  $S_{AAf}$  é o sinal de AA final,  $S_{Tf}$  o sinal total final, e  $S_{fa}$  o sinal final da reação dos iniciadores sem a presença do polímero. A  $C_{AAf}$  é a concentração de AA,  $\epsilon$  a absorvidade molar do AA e  $b$  o caminho ótico.

Com base no apresentado, foi assim possível calcular a conversão de AA em PAA (% $C_{AA}$ ), que em média foi de  $19 \pm 3$  %, conforme eq. 5 e 6. Claramente, a baixa conversão pode indicar que há outros parâmetros influenciando na quantificação da conversão.

Para evitar subestimações da conversão e para otimizar o estudo da cinética e a quantificação do consumo de AA, foi decidido utilizar o método da CLAE, com a finalidade de conseguir separar todos os produtos de reação e melhorar a quantificação do consumo de AA durante a reação.

FIGURA 22 MONITORAMENTO PELO SISTEMA ACOMP DA POLIMERIZAÇÃO “*IN SITU*” DE AA (3, 7, E 10 E 12 mmol L<sup>-1</sup>) A PAA PARA O REVESTIMENTO DO LIPOSSOMA DODAB :DOPE (10:2 mol:mol) A 1 mmol L<sup>-1</sup> DE DODAB, COM INICIADORES ACIDO ASCÓRBICO (3mmol L<sup>-1</sup>) E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (18 mmol L<sup>-1</sup>)  $\lambda = 240$  nm.



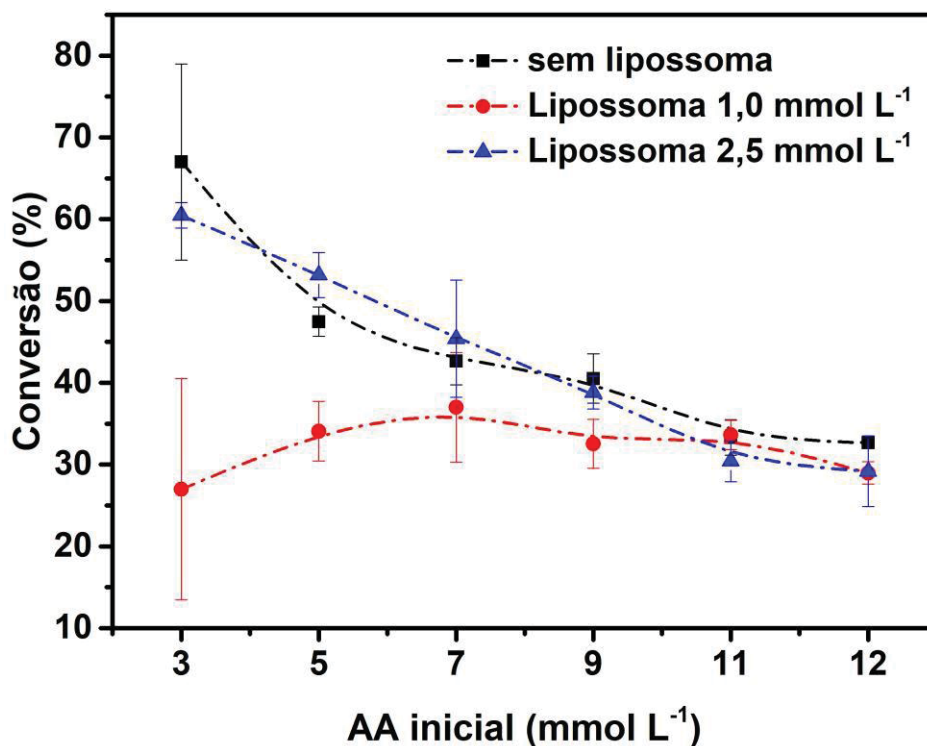
#### 4.1.7 Resultados da determinação da quantidade consumida de AA com iniciador ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio

Através da CLAE foi determinado o consumo de AA na reação de polimerização “*in situ*” utilizando a dupla redox. Para tanto, diferentes variáveis foram testadas, injetando amostras com diferentes concentrações de AA (3 até 12 mmol L<sup>-1</sup>), com ou sem lipossoma (1, 2,5 mmol L<sup>-1</sup>) e contendo ou não a dupla redox a 70 °C.

O  $D_{\text{happ}}$  inicial obtido para os lipossomas, previamente à polimerização, foi de  $83 \pm 20$  nm, independente da concentração de DODAB. Como os lipossomas apresentavam o mesmo diâmetro e todos eram vesículas unilamelares, o aumento da concentração de DODAB aumentou proporcionalmente as quantidades de lipossomas formados e, conseqüentemente, a área superficial total, conforme a resultados obtidos por estimativas teóricas feitas considerando o número de moléculas de DODAB / lipossoma e o número de lipossoma / mL, fato corroborado pela informação de espalhamento de luz (ANEXO C).

Para vesículas com 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de DODAB, foi observada uma conversão constante de AA em PAA (FIGURA 23). A baixa área interfacial total parece ser um fator limitante em baixa concentração de AA. Aumentando a concentração de DODAB para 2,5 mmol L<sup>-1</sup>, a quantidade de vesículas aumentou proporcionalmente, produzindo uma grande área superficial total, não limitando a conversão em baixa concentração de AA. A conversão foi semelhante a AA sem DODAB e com DODAB 2,5 mmol L<sup>-1</sup>, para tanto, em ambos casos, como a concentração do iniciador foi mantida constante durante todos os experimentos, a polimerização em maiores quantidades de AA poderia ser limitada pelo iniciador (ARIZMENDI et al., 2016; LIU et al., 2018). Comparativamente, em baixas concentrações de AA (3 mmol L<sup>-1</sup>) os lipossomas DODAB a 2,5 mmol L<sup>-1</sup> apresentaram um aumento na conversão de AA em comparação aos lipossomas DODAB a 1,0 mmol L<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ), mas em concentrações mais altas de AA ( $\geq 7$  mmol L<sup>-1</sup>) as conversões foram as mesmas para concentrações de DODAB de 1,0 e 2,5 mmol L<sup>-1</sup> ( $p > 0,05$ ) (FIGURA 23).

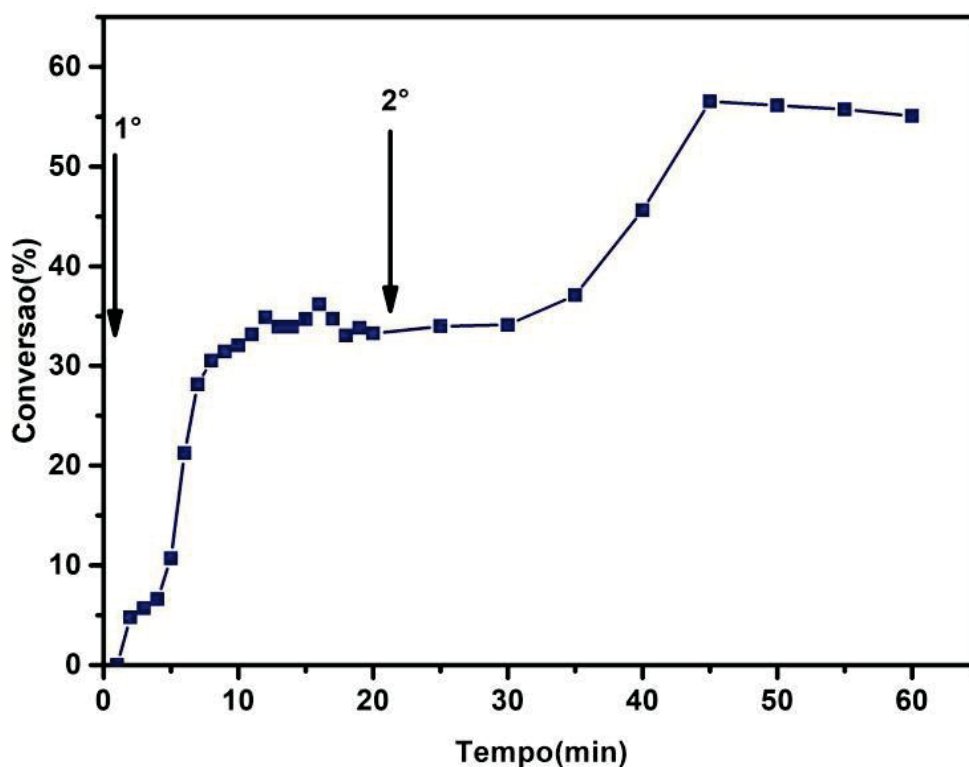
FIGURA 23 CONVERSÃO DE AA EM PAA OBTIDA PELA POLIMERIZAÇÃO “*IN SITU*” DE TRÊS LIPOSSOMAS DIFERENTES DE DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol) USANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DODAB ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  E  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ) E ÁCIDO ACRÍLICO ( $3\text{-}12 \text{ mmol L}^{-1}$ ). AS MEDIÇÕES FORAM FEITAS EM TRIPLICATA E OS TRÊS LIPOSSOMAS APRESENTAVAM TAMANHO INICIAL DE  $83 \pm 20 \text{ nm}$ .



Consequentemente, em concentrações mais altas de AA, a conversão foi limitada pela razão entre o iniciador e o monômero, e essa conversão poderia ser ampliada aumentando a concentração do iniciador. Isto foi confirmado em um teste realizado a uma concentração de  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  de AA e acrescentando mais iniciador após 30 min foi observado aumento na conversão (FIGURA 24).

O  $D_{\text{happ}}$  do lipossoma DODAB: DOPE antes da polimerização era de  $83 \pm 20 \text{ nm}$ , aumentando para  $150 \pm 43 \text{ nm}$ , após a polimerização a  $7 \text{ mmol L}^{-1}$  de AA, e para todas as concentrações de DODAB nos lipossomas. Como será observado nas imagens de AFM, seção 5.6, onde uma espessa camada de PAA se formou na superfície do lipossoma.

FIGURA 24 CONVERSÃO DE ÁCIDO ACRÍLICO EM POLI (ÁCIDO ACRÍLICO) USANDO UMA QUANTIDADE EXTRA DOS INICIADORES PAR REDOX. NO TEMPO 0 (SETA INDICADA COMO 1°) FOI ADICIONADO O PAR REDOX (3 mmol L<sup>-1</sup> DE ÁCIDO ASCÓRBICO E 18 mmol L<sup>-1</sup> DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO) EM 21 min (SETA INDICADA 2°) FOI ADICIONADO UMA QUANTIDADE EXTRA DE PAR REDOX INICIADOR DOBRANDO A CONCENTRAÇÃO.



Também foram avaliados os efeitos de tamanho do lipossoma sob a conversão de AA em PAA, usando três lipossomas de  $D_{\text{happ}}$  20, 100 e 200 nm, para os três sistemas foram coletados os dados de concentração de AA durante 30 min de reação com uma concentração fixa de AA de 7 mmol L<sup>-1</sup> (FIGURA 17a). Com os resultados obtidos foi avaliada a cinética da reação, estes dados foram ajustados a uma lei de pseudo-primeira ordem **equações 7 e 8** e os parâmetros obtidos pelo ajuste estão registrados na TABELA 5.

$$[A]_t = [A]_0 e^{-k' t} \quad (\text{eq. 7})$$

$$k' = k[I] \quad (\text{eq. 8})$$

A  $[A]_t$  é a concentração de AA;  $[A]_0$  é a concentração inicial de AA;  $k'$  é a constante de pseudo-primeira ordem,  $k$  a constante de velocidade para o iniciador e  $[I]$  é a concentração do iniciador.

Quando aplicado o ajuste para uma reação de pseudo-primeira ordem na polimerização de AA, foi considerado que essa reação era dependente tanto da concentração do monômero quanto do iniciador. Mas neste caso a concentração do iniciador ficou constante, como foi observado no experimento com o sistema ACOMP (FIGURA 21), durante o tempo que é formado o radical ascorbila, mas o monômero durante este tempo foi consumindo-se. Para tanto o par de iniciador redox foi mantido em um ciclo de regeneração nos primeiros minutos da reação, comportando-se como um reagente em excesso ( $[I] \gg [M]$ ), ao fazer esta consideração foi suportado que a reação se ajustou à pseudo-primeira ordem em relação ao monômero AA. Isso ocorreu até que a regeneração do radical ascorbil cessou, levando ao ácido deidroascórbico, e então o monômero se torna o reagente em excesso. Por esse motivo, a concentração do par redox é incluída na constante de pseudo-primeira ordem  $k'$ . De tal modo, os dados experimentais na FIGURA 25a foram ajustados adequadamente considerando essas suposições (TABELA 5).

A taxa de reação foi influenciada pelo tamanho do lipossoma (TABELA 5), onde o lipossoma com  $D_{happ}$  20 nm alcançou uma constante de reação mais alta ( $k'$ ) do que para as reações com lipossomas de  $D_{happ}$  mais alto (100 e 200 nm) (TABELA 5). No entanto, o  $k'$  da reação sem lipossoma foi maior do que as outras constantes, especialmente em comparação com lipossomas de 100 e 200 nm, mas era muito próximo aos de lipossomas com  $D_{happ}$  20 nm.

FIGURA 25 (a) CINÉTICA DE AA CONSUMIDO NA POLIMERIZAÇÃO A PAA, COM TRÊS TAMANHOS DIFERENTES DE LIPOSSOMAS:  $16 \pm 8$  nm;  $117 \pm 21$  nm;  $190 \pm 60$  nm. TODAS AS CURVAS FORAM AJUSTADAS USANDO A PSEUDO PRIMEIRA ORDEM, EQUAÇÃO 7. (b) DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE ( $D_{happ}$ ) DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol) E  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  DE LIPOSSOMAS DODAB A 20 nm, 100 nm E 200 nm, ANTES E DEPOIS DA POLIMERIZAÇÃO DE AA A  $7 \text{ mmol L}^{-1}$ .

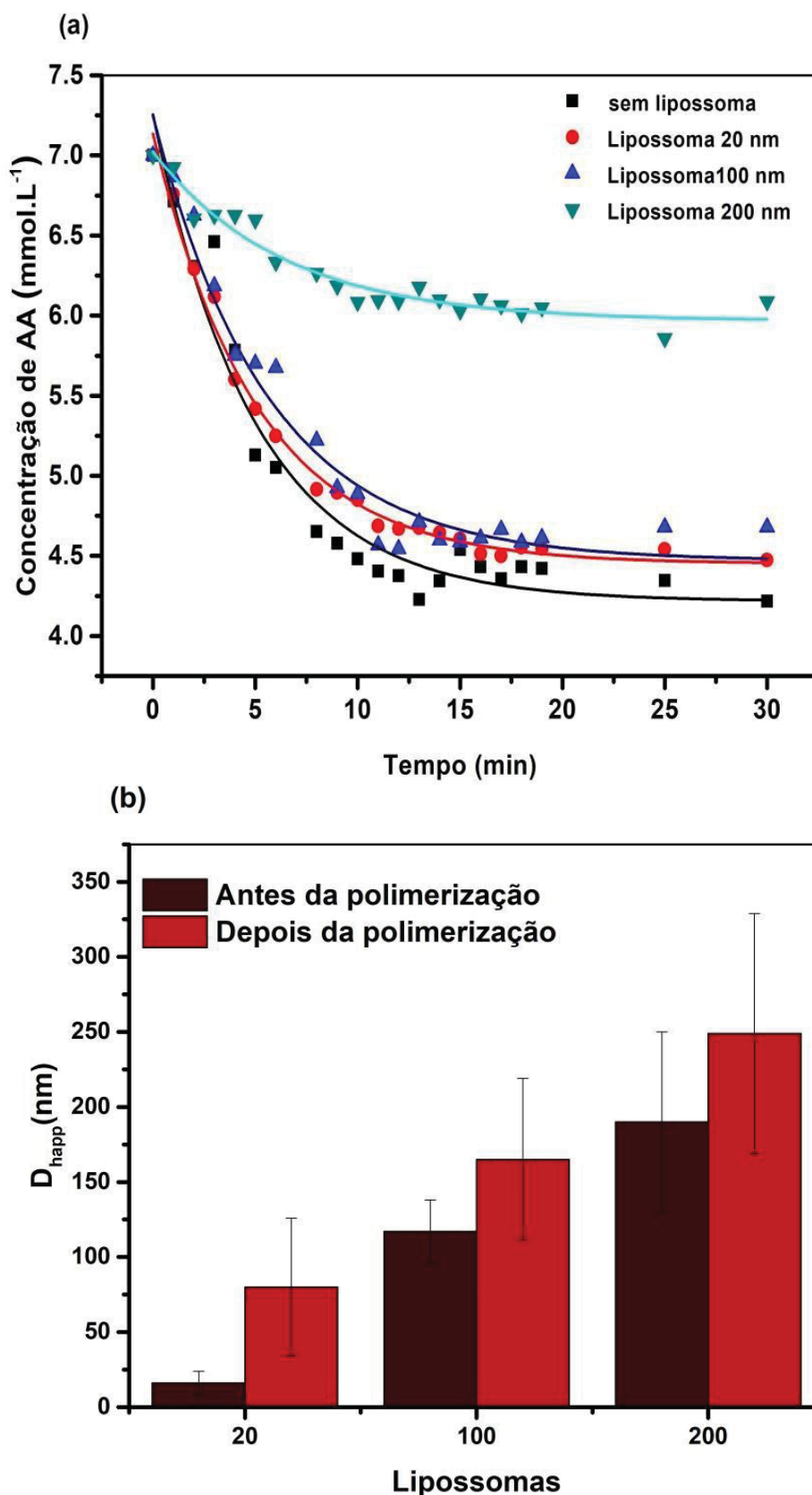


TABELA 5 CONSTANTE DE PSEUDO PRIMEIRA ORDEM PARA A POLIMERIZAÇÃO “*IN SITU*” DE AA<sup>a</sup>

| <b>Parâmetros</b>  | <b>Lipossomas</b>    |              |               |               |
|--------------------|----------------------|--------------|---------------|---------------|
|                    | <b>sem lipossoma</b> | <b>20 nm</b> | <b>100 nm</b> | <b>200 nm</b> |
| <b><i>k'</i></b>   | 0,200±0,026          | 0,197±0,010  | 0,177±0,020   | 0,157±0,024   |
| <b>% Conversão</b> | 40%                  | 36%          | 36%           | 15%           |

<sup>a</sup> Ajuste dos gráficos dados na FIGURA 25a com a equação 7.

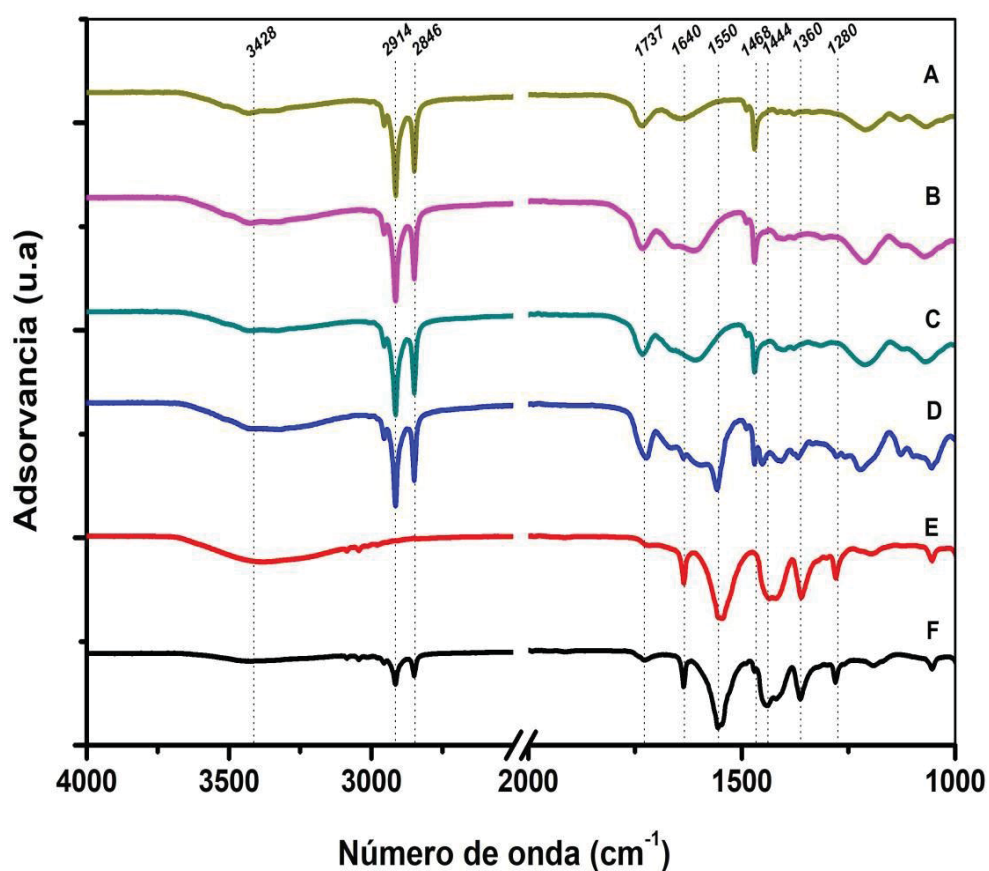
Quando o lipossoma é muito pequeno (20 nm) o tamanho não afeta a taxa de reação devido à maior área/ volume superficial e o tamanho não interfere na conversão do AA, atuando como um sistema homogêneo. A heterogeneidade no sistema é muito mais evidente para tamanhos de lipossomas maiores (100 e 200 nm), reduzindo  $k'$ . O tamanho do lipossoma proporciona um efeito de impedimento estérico, produzindo um efeito de gaiola, no qual o tamanho do lipossoma impede a livre movimentação tanto do iniciador quanto do monômero, reduzindo a constante de velocidade e até afetando sua conversão (ARIZMENDI et al., 2016; WOLFF; RENE BOS, 1997). Normalmente é esperado que as constantes de taxa de reações análogas sejam menores em sistemas heterogêneos, em contraste com os homogêneos.

Além disso, a FIGURA 25b apresenta  $D_{happ}$  antes e depois da polimerização “*in situ*” onde foi observado um aumento no diâmetro após a polimerização. Esta alteração representa o efeito de revestimento do lipossoma pelo PAA. Em geral, os estudos cinéticos esclarecem a forma de como os lipossomas afetam a polimerização e, como será apresentado nas seguintes etapas, a cadeia do polímero pode ser modulada pelo tamanho do lipossoma.

#### 4.1.8 Caracterização de lipossoma revestido com poli(ácido acrílico)

Para caracterizar a conversão de AA em PAA, os lipossomas revestidos foram avaliados por análise de infravermelho, conforme demonstrado na FIGURA 26.

FIGURA 26 ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO LIPOSSOMA DODAB: DOPE (10: 2 mol: mol). CONCENTRAÇÃO DE DODAB DE 2,5 mmol L<sup>-1</sup> E CONCENTRAÇÃO DO MONÔMERO ÁCIDO ACRÍLICO DE (A) 3 mmol L<sup>-1</sup>; (B) 5 mmol L<sup>-1</sup>; (C) 7 mmol L<sup>-1</sup> e (D) 12 mmol L<sup>-1</sup>. COMO CONTROLE, (E) 7 mmol L<sup>-1</sup> DE ÁCIDO ACRÍLICO SEM O PAR REDOX E O LIPOSSOMA DODAB: DOPE E (F) 7 mmol L<sup>-1</sup> DE ÁCIDO ACRÍLICO COM DODAB: LIPOSSOMA DOPE SEM O PAR REDOX.



Conforme observado, a banda em 3580-3200 cm<sup>-1</sup> foi relacionada ao alongamento do grupo OH, sugerindo a presença de traços de água nas amostras. Na faixa de 2910-2846 cm<sup>-1</sup> foi observado um conjunto de bandas que tem sido relacionada a deformações axiais de ligações CH de grupos -CH<sub>3</sub> e -CH<sub>2</sub> as quais não estavam presentes no espectro de monômero AA (E) devido à ausência de

surfactante. Este resultado era esperado porque esta banda é característica das caudas hidrofóbicas dos surfactantes de lipossomas DODAB: DOPE. Outra banda característica observada foi o alongamento simétrico e assimétrico de  $-\text{CH}_2$  em  $1464\text{cm}^{-1}$ .

Foi encontrada uma banda a  $1640\text{ cm}^{-1}$  presente no monômero AA não polimerizado (FIGURA 26, entradas E e F) correspondendo ao alongamento do grupo  $\text{C} = \text{C}$ , e também foi encontrada uma banda fraca a  $3046\text{ cm}^{-1}$ , relacionado ao alongamento de  $-\text{CH sp}^2$ . Porém, para sistemas polimerizados a banda em  $1640\text{ cm}^{-1}$  diminuiu proporcionalmente à conversão, e a banda em  $3046\text{ cm}^{-1}$  não foi observada. Como a conversão sempre foi inferior a 100%, esperava-se algum resíduo de AA e a presença de uma banda em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , associada a íons carboxilato. Esta diferença é facilmente observada ao comparar  $7\text{ mmol L}^{-1}$  AA, sem e com o iniciador de par redox.

A banda de estiramento de carboxilato assimétrico e simétrico foi observada em  $1550$  e  $1444\text{ cm}^{-1}$  para a maioria dos sistemas (FIGURA 26), o que era esperado uma vez que o AA durante a polimerização estava em pH 5 ( $\text{pH} > \text{pKa}$ ) gerando assim a formação de uma mistura poli (acrilato) e poli (ácido acrílico). A  $1360\text{ cm}^{-1}$  associado a deformação angular do C-H e a  $1280\text{ cm}^{-1}$  C-O associado a um estado líquido de ácido acrílico dimérico associado por ligação de hidrogênio, para produzir um espectro próximo ao esperado de uma molécula dupla (FEAIRHELLER; KATON, 1967).

A banda  $\text{C}=\text{O}$  aparece fortemente em  $1737\text{ cm}^{-1}$  para os sistemas polimerizados (FIGURA 26 entradas A, B, C, D). Embora, para o sistema de AA (FIGURA 26 entrada E) esta banda não é observada, devido a que o ácido acrílico monomérico apresenta uma conjugação com  $\text{C}=\text{C}$  que desloca a banda a frequências mais baixa, especialmente no pH 5 que esta por acima do pKa.

As morfologias dos lipossomas revestidos e não revestidos foram obtidas por AFM com áreas de micrografia de  $4 \times 4\text{ }\mu\text{m}$  ou  $1 \times 1\text{ }\mu\text{m}$ , no modo tapping. Os resultados evidenciaram um aumento no diâmetro e modificação da forma (FIGURA 27). As dimensões dos lipossomas foram determinadas estatisticamente utilizando o software Gwyddion e os valores médios e desvios foram  $81 \pm 11\text{ nm}$  e  $144 \pm 25\text{ nm}$ , semelhantes ao  $D_{\text{happ}}$  obtido por DLS, que foram  $83 \pm 20\text{ nm}$  e  $150 \pm 43\text{ nm}$ . Essas alterações não são estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Porém, para as análises de AFM as amostras foram submetidas à secagem, sendo esperado que o diâmetro

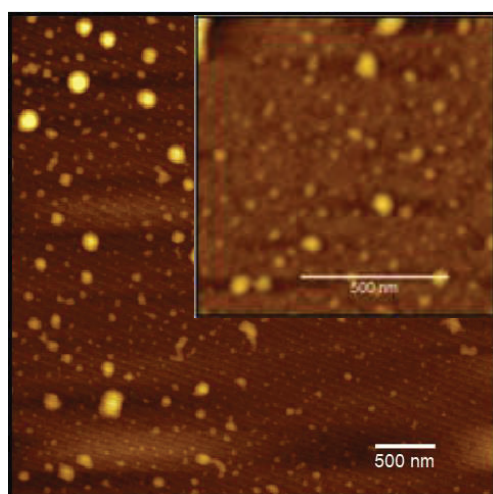
fosse menor que o resultado de DLS obtido. Outra explicação para isso pode ser atribuída às estruturas do lipossoma que são deformáveis ao interagem com a pontado AFM, resultando em uma leve deformação, e achatamento que compensaria o aumento de tamanho, e explicaria porque conseguimos tamanhos similares aos obtidos por DLS.

As duas imagens de topografia e de fase são colocadas, para uma melhor visualização, na imagem de fase é possível observar a forma do lipossoma, parece ser mais grande porque ela é capaz de determinar variações de elasticidade, adesão e fricção, esta imagem de fase então melhora a visualização do lipossoma DODAB: DOPE por ter ele propriedades elásticas que com este modo se representa melhor, lembrando que o DOPE faz que a estrutura esteja menos rígida. Os tamanhos já foram calculados com a imagem de topografia que são mais exatas para este parâmetro (FIGURA 27) (HIESGEN; FRIEDRICH, 2011; MAO; LIANG; SIMON, 2004).

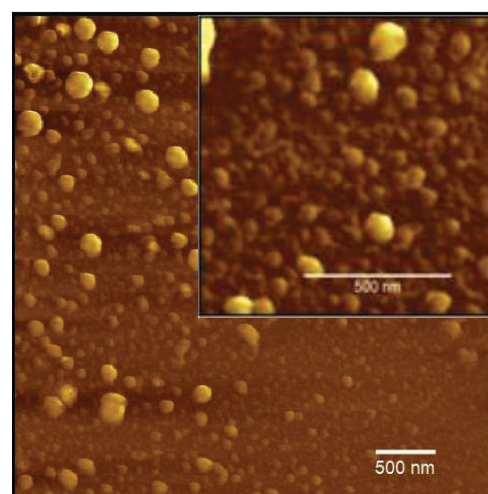
FIGURA 27 MICROGRAFIAS TOPOGRÁFICAS E DE FASE OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA PARA DODAB: LIPOSSOMAS DOPE (10: 2 mol: mol) COM CONCENTRAÇÕES DE DODAB DE 1 mmol L<sup>-1</sup>, NÃO REVESTIDAS E REVESTIDAS, REALIZADAS SOB MICA. PARA ESTE PROCEDIMENTO FOI UTILIZADA A CONCENTRAÇÃO DE AA 7 mmol L<sup>-1</sup>. ESCALA (4x4 µm, MODO DINÂMICO) E ESCALA DE AMPLIAÇÃO (1x1 µm, MODO DINÂMICO).

### Lipossomas DODAB: DOPE

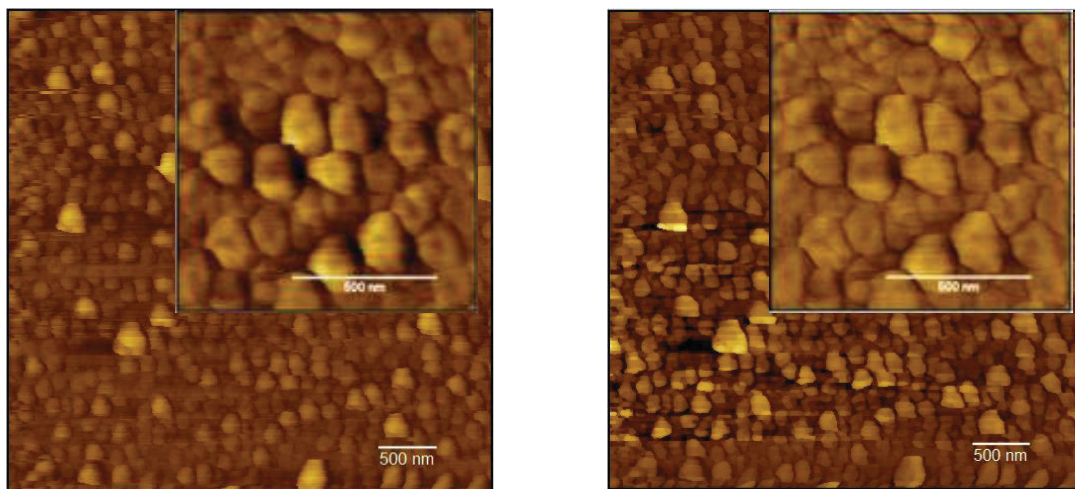
#### Topografia



#### Fase



### Lipossomas DODAB:DOPE recobertos com ácido acrílico



As massas molares dos polímeros formados foram determinadas por SEC, porém não foi possível determinar a massa molar para o PAA obtido a partir de baixas concentrações de AA. Portanto, para concentrações menores não foi possível comprovar claramente a polimerização. Provavelmente, em uma concentração inicial menor, massas molares muito baixas foram produzidas.

Aumentando a concentração de AA para 7 e 9 mmol L<sup>-1</sup>, a massa molar média numérica ( $M_n$ ) obtida para o poli(ácido acrílico) foi de 20.000 g.mol<sup>-1</sup> com uma razão molar iniciador / monômero de 0,42. Aumentamos consideravelmente a concentração de AA para 20 mmol L<sup>-1</sup> e o  $M_n$  foi de 26.000 g.mol<sup>-1</sup> e para o sistema sem lipossoma foi de 58.000 g.mol<sup>-1</sup> (razão molar iniciador / monômero de 0,15). O efeito estéreo é novamente observado quando o lipossoma foi adicionado na reação, embora a conversão tenha sido semelhante, a polimerização com lipossoma ou sem lipossoma difere nos comprimentos poliméricos da cadeia. Pode-se notar que o lipossoma no meio pode permitir a polimerização, mas afeta o crescimento da cadeia polimérica, gerando polímeros com tamanhos menores e mais orientados para o lipossoma. Correlacionando essas observações com estudos cinéticos, é possível inferir que embora a conversão de polimerização seja semelhante com e sem lipossoma (para até 100 nm) e também que a constante da taxa de polimerização é semelhante sem lipossoma e com lipossoma (para até 20 nm), a presença de lipossomas afeta muito a massa molar do polímero formado.

## 4.2 Encapsulamento de AmB nos lipossomas DODAB E DODAB-DOPE, revestidos pela polimerização “*in situ*” de AA, estabilidade, toxicidade e otimização para a polimerização

### 4.2.1 Encapsulamento de Anfotericina B (AmB)

Inicialmente os ensaios de encapsulamento foram realizados nos lipossomas obtidos a partir de injeção por etanol. Contudo, a massa de AmB a ser testada não conseguiu ser dissolvida na quantidade de etanol usada no preparo deste lipossoma, conforme resultados obtidos no desenvolvimento do lipossoma DODAB: DOPE (ANEXO D). A quantidade de etanol não foi aumentada pois poderia modificar as dimensões do lipossoma. Assim, o método usado foi para o encapsulamento foi a hidratação de filme (OLIVEIRA; BENATTI; LAMY, 2011b; PEREZ et al., 2015), que permitiu a dissolução da AmB em solventes orgânicos, os quais foram empregados em uma proporção 1:1 de clorofórmio e metanol, acrescentando-se 1,5 mL de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> a 25 mL desta mistura. Assim, através deste procedimento garantiu-se a completa dissolução da AmB para a formação de filme, que depois foi reidratado para o encapsulamento da AmB pelo lipossoma DODAB: DOPE (10:2 mol:mol), considerando a concentração de 1 mmol L<sup>-1</sup> de DODAB (lipossoma DD).

Foi necessário ajustar o tamanho do lipossoma obtidos pelo método de hidratação de filme, pelo qual foram realizados testes em quatro formulações com e sem AmB, sonicadas e não sonicadas, medidas no DLS e potencial zeta, para determinar suas estabilidade e dimensões (TABELA 6).

Nestes testes foi observado que as dimensões dos lipossomas diminuíram com o uso da sonicação ( $p < 0,05$ ). Os primeiros resultados de lipossomas polimerizados “*in situ*”, contendo AmB, reforçam os resultados obtidos anteriormente, que demonstraram um aumento de tamanho e diminuição do potencial zeta como foi observado na primeira parte do desenvolvimento das cápsulas de lipossoma. Foi desta maneira selecionado o método de preparo para o encapsulamento da AmB junto com a sonicação para gerar um lipossoma com aproximado 60nm de  $D_{happ}$ .

TABELA 6 FORMULAÇÕES DE LIPOSSOMA DD (DODAB: DOPE 10: 2 mol:mol 1mmol L<sup>-1</sup> EM DODAB) PARA ENCAPSULAMENTO DE AmB.

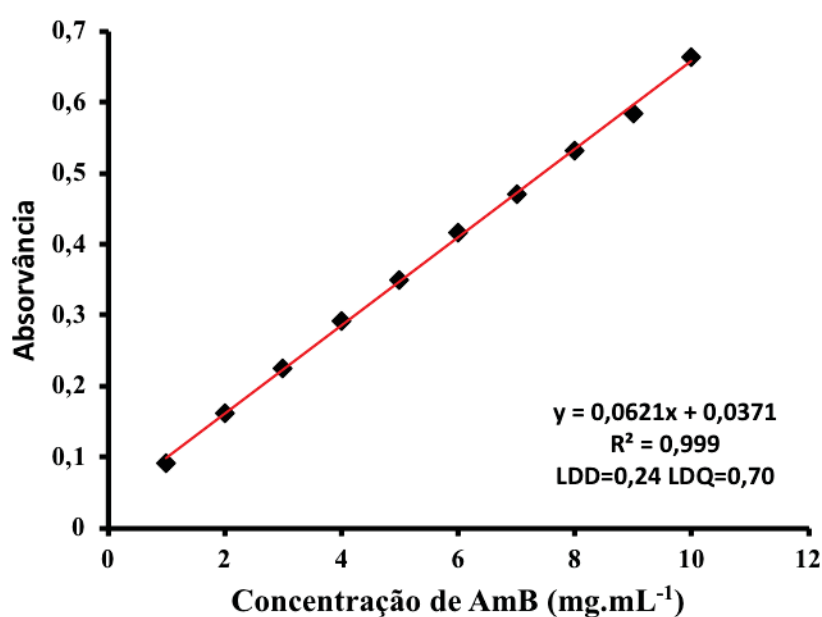
| Formulações                                                      | D <sub>happ</sub><br>(nm) | D <sub>happ</sub><br>(nm)<br><sup>a</sup> AP | Potencial<br>zeta/ mV | Potencial<br>zeta/ mV<br><sup>a</sup> AP |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------|
| 1. Lipossoma DD sem AmB                                          | 149±67                    | 174±81                                       | +84±08                | 27                                       |
| 2. Lipossoma DD sem AmB e sonificada por 3 min                   | 55±20*                    | 120±17                                       | +102±10               | 26                                       |
| 3. Lipossoma DD 60µg.ml <sup>-1</sup> AmB                        | 115±18                    | 216±78                                       | +80±05                | 27                                       |
| 4. Lipossoma DD 60µg.ml <sup>-1</sup> AmB e sonificada por 3 min | 57±18*                    | 151±22                                       | +97±08                | 27                                       |

<sup>a</sup>AP= Após polimerização “*in situ*”.

#### 4.2.1. Quantificação de AmB encapsulada no lipossoma DODAB:DOPE

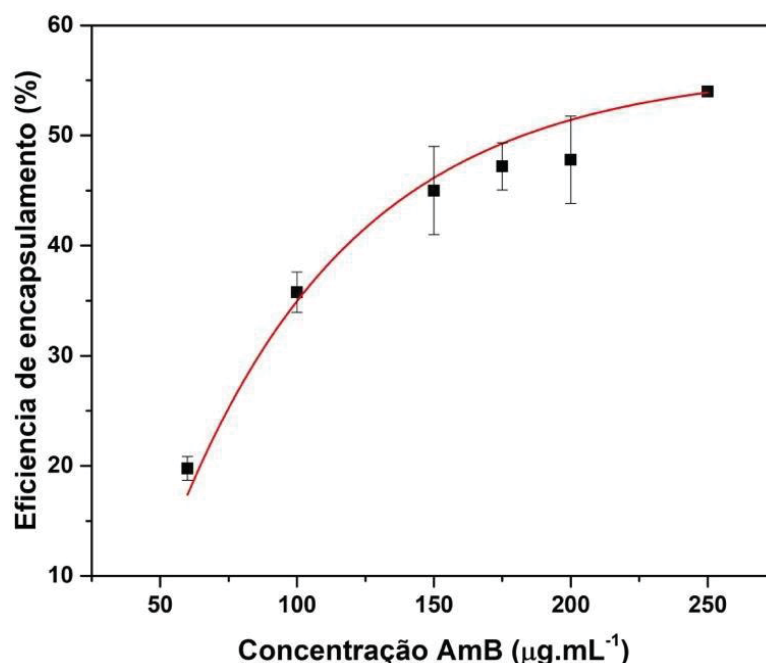
Para a determinação da quantidade de AmB encapsulada no sistema lipossoma e lipossoma revestido foi preparada uma curva de calibração utilizando o espectrofotômetro na região do UV-Vis, por meio da medição de triplicatas de soluções de AmB em metanol (1-10 µg.L<sup>-1</sup>). O ajuste da curva foi de 0,999 e os LDD e LDQ foram 0,24 e 0,70 µg.L<sup>-1</sup> respectivamente (FIGURA 28).

FIGURA 28 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE AmB POR ESPECTROMETRIA UV-Vis EM METANOL TEMPERATURA 24 °C.



Para a quantificação da eficiência de encapsulamento de AmB foram preparadas triplicatas de lipossomas encapsulados com diferentes concentrações de AmB de 60, 100, 150, 175, 200 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e após sonicação, foram filtrados para remover a AmB em excesso que é insolúvel em pH 4, depois foram medidos em UV-Vis. Como observação 0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$  de AmB é solúvel em água no pH 2 ou 11 (WAUGH, 2007).

FIGURA 29 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DE AmB NOS LIPOSSOMAS DODAB:DOPE 10:2 1  $\text{mmol L}^{-1}$  DE DODAB.

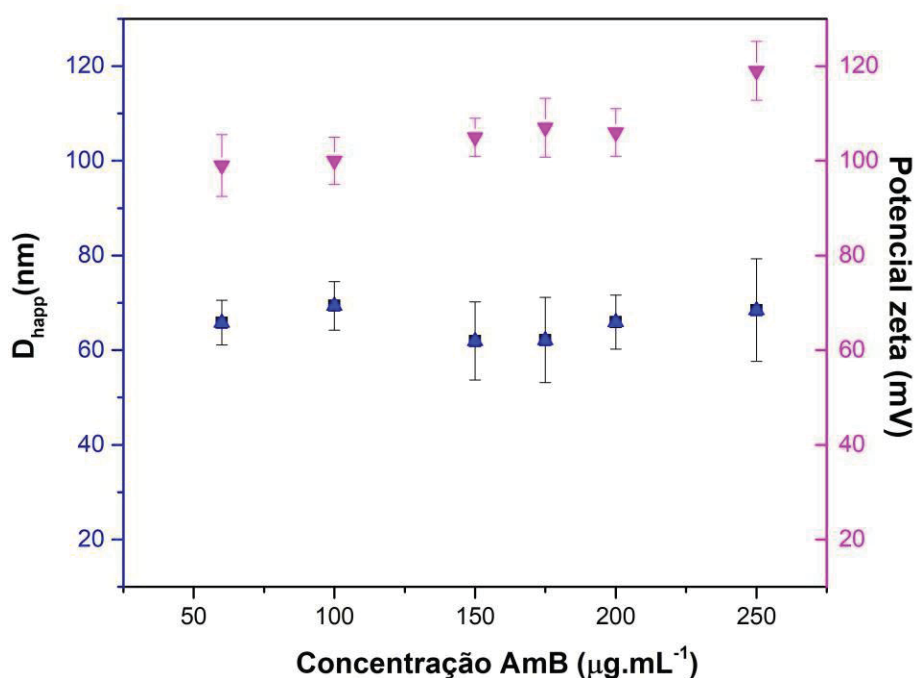


Foi obtida a quantidade encapsulada de AmB em cada uma das formulações, considerando que o lipossoma é uma membrana permeável obtendo um maior encapsulamento em maior concentração de AmB. Embora após 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  o sistema parece chegar a um platô de eficiência de encapsulamento em aproximadamente 50%, a concentração pode gerar agregados do AmB que possuem efeito tóxico. Assim, além da eficiência de encapsulamento, o estado de agregação da AmB é decisivo na escolha da concentração para futuros testes biológicos.

#### 4.2.2 Estudo do tamanho e potencial zeta das formulações com AmB

Foram determinados o  $D_{happ}$  e potencial zeta das diferentes formulações contendo AmB (FIGURA 30).

FIGURA 30 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO APARENTE ( $D_{happ}$ ) (AZUL) E POTENCIAL ZETA (ROSA) DOS LIPOSSOMAS DODAB:DOPE CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AmB



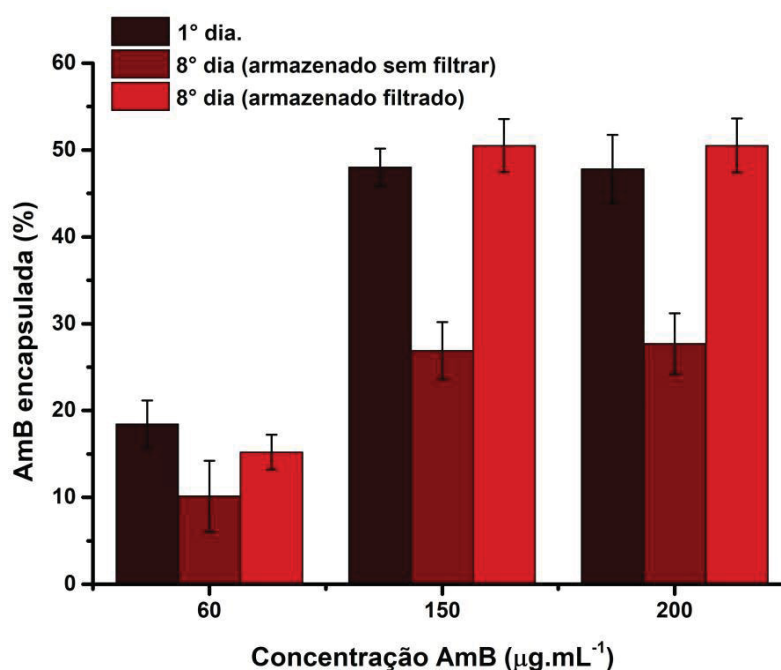
As formulações apresentaram um  $D_{happ}$  similar apesar do aumento da quantidade encapsulada de AmB, o que significa que ela não influencia no tamanho do lipossoma, residindo, provavelmente, na bicamada lipídica da membrana do lipossoma. O potencial zeta não aumentou comparado com o lipossoma sem AmB ( $p > 0,05$ ), somente para a formulação com  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AmB ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3 Armazenamento e estabilidade dos lipossomas

Foram avaliadas as formulações contendo AmB durante 8 dias, armazenadas em geladeira à  $5^\circ\text{C}$ , após filtração por membrana de  $0,22 \mu\text{m}$  ou não filtradas. As amostras que foram armazenadas sob refrigeração, sem ser filtradas, no dia dos experimentos de eficiência de encapsulamento foram

submetidas à filtração. Os resultados da % de AmB encapsulado nos lipossomas DODAB: DOPE estão apresentados FIGURA 31.

FIGURA 31 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS ARMAZENADAS SEM FILTRAR E FILTRADAS APÓS UMA SEMANA EM GELADEIRA À 5 °C



Mediante aos resultados obtidos foi observado que, ao filtrar as amostras de lipossomas imediatamente após a preparação, houve a remoção do excesso de AmB que está suspensa na fase aquosa. Assim, evita-se possivelmente que ela atue como um ponto de nucleação para a formação de agregados de AmB, e tais pontos de nucleação fazem que o fármaco, após 8 dias de armazenamento em refrigeração reduzam o seu teor. Desta forma, foi possível manter o teor de AmB para as diferentes concentrações testadas após 8 dias de armazenamento, o que não foi observado para as amostras que foram filtradas no mesmo dia da medição. A partir destes resultados foi padronizado que as amostras seriam armazenadas e filtradas após a produção para evitar a separação de fase em função do tempo.

#### 4.2.4 Estudos da agregação da AmB nas formulações

Para a determinação da agregação da AmB foram medidas as formulações na faixa de 300 a 450 nm (FIGURA 32a), água como solvente, correlacionando as medições em 349 e 409 nm e assim obtendo assim um fator de agregação.

Por ser a AmB um polieno seus espectros de UV-Vis são muito sensíveis às mudanças conformacionais induzidas por diferentes interações moleculares incluindo agregação. Em estudos realizados por Barwicks et al (1992) foram estudadas modificações espectrais induzidas pela agregação por meio de este fator que era uma razão de absorvâncias  $R_{348/409} = A_{348}/A_{409}$ . (FIGURA 32b).

O fator de agregação  $R_{348/409}$  compara dois picos de absorção de AmB, 349 por 409 nm, em água, quando a AmB está em seu estado monomérico (ideal), por exemplo em metanol, o fator de agregação é de perto de 0,32 e em água este fator aumenta devido à agregação de moléculas de AmB.

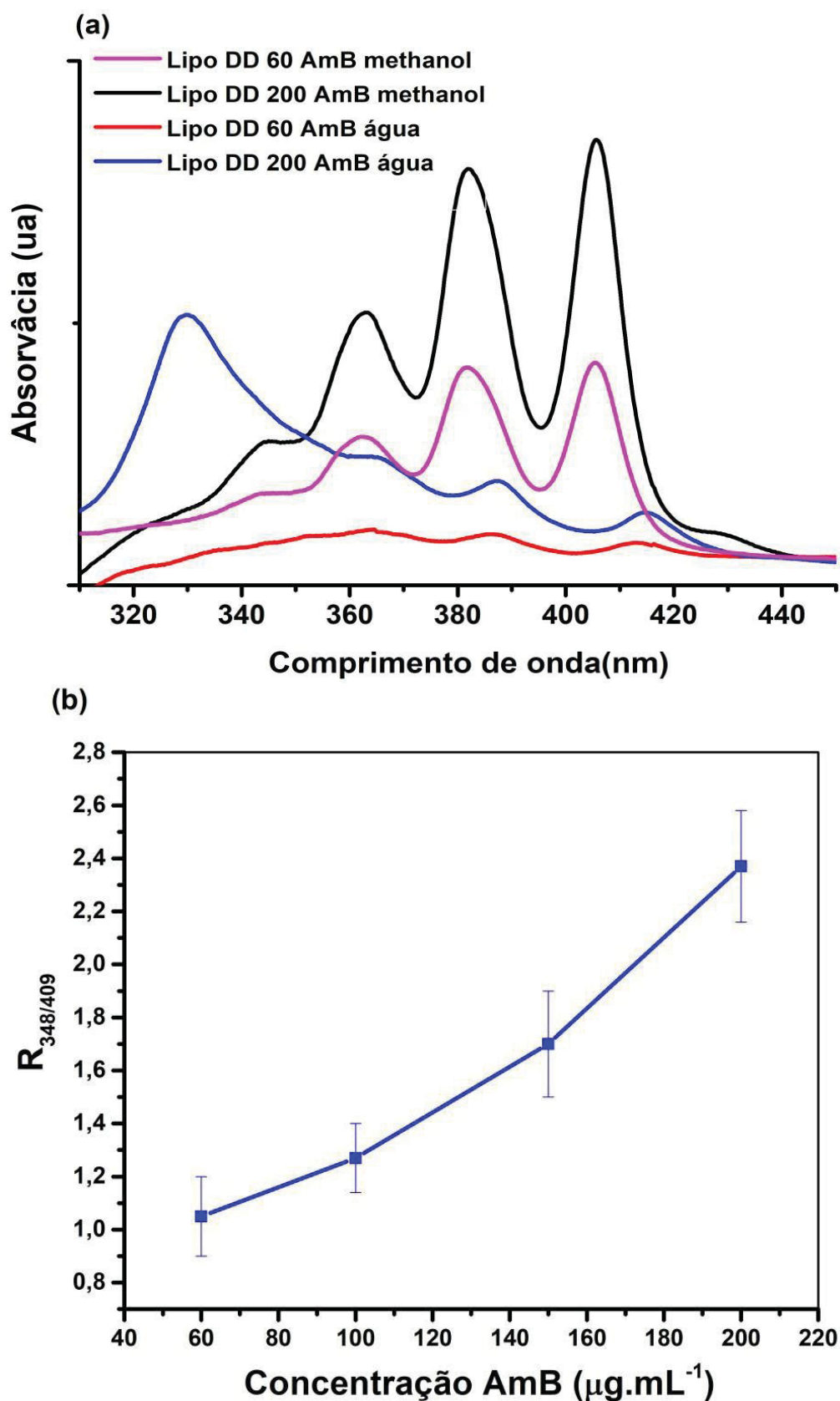
Assim as formulações que foram realizadas com maior quantidade de AmB, 150 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  resultavam em fatores de agregação de  $R_{348/409} = 2,00 \pm 0,20$  e  $2,50 \pm 0,21$ , respectivamente (FIGURA 32b). Quando a concentração de AmB está em 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  o fator reduziu para  $1 \pm 0,15$ . Portanto ao aumentar a relação molar DODAB/AmB houve um favorecimento do estado monomérico da AmB. O estado agregado da AmB esta correlacionado com a nefrotoxicidade da mesma, por isso com os resultados deste estudo é possível diminuir esta toxicidade na formulação final (BARWICZ; CHRISTIAN; GRUDA, 1992; OLIVEIRA; BENATTI; LAMY, 2011a).

Este estudo será usado nas formulações a serem testadas a nível celular para assim usar uma formulação com menor aglomeração que gere uma menor toxicidade, tomando em conta a correlação entre DODAB/ AmB.

#### *4.2.5 Testes de estabilidade coloidal para os lipossomas revestidos com polímero pré-formado*

Foram realizados testes de estabilidade coloidal para a obtenção de um lipossoma recoberto com PAA, utilizando um polímero pré-formado, ou seja, sem realizar a polimerização “*in situ*” com os lipossomas, a modo de comparação. Para isto, foi testada a sequência de adição, primeiramente o PAA em concentração inicial de AA de 7 mmol  $\text{L}^{-1}$  e 10 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi adicionado ao lipossoma, já formado, até que o potencial zeta obtido fosse de 30 mV. Depois em outro teste o lipossoma foi acrescentado a 4 mL de PAA que foi obtido a partir de uma concentração inicial de AA de 10 e 7 mmol  $\text{L}^{-1}$ . Em ambas as formas de adição o sistema apresentou separação imediata de fases.

FIGURA 32 GRÁFICOS DA AGREGAÇÃO DA AmB EM DIFERENTES FORMULAÇÕES. (a) ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA AmB EM ÁGUA E METANOL NA FAIXA DE 300 A 450 nm. (b) FACTOR  $R_{348/409}$  DE AGREGAÇÃO DE TRÊS FORMULAÇÕES DE LIPOSSOMA CONTENDO AmB (60, 150 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) AVALIADO DURANTE 16 DIAS



O polímero pré-formado com iniciadores na proporção 6:1 de ácido ascórbico/peróxido de hidrogênio foi adicionado no lipossoma até atingir 30 mV no potencial zeta, ele apresentou uma estabilização por 24 horas, e diluído 1:2 mantendo-se estável durante ao menos duas semanas. Tais formulações foram selecionadas para os experimentos biológicos.

Uma modificação adicional realizada no processo de polimerização, foi a modificação da proporção de iniciadores, gerando a formação de segmentos poliméricos de menor grau de polimerização. LIU *et al.* (2018) observaram que o radical arcorbila era formado de uma melhor forma numa proporção de 2:1 ácido ascórbico / peróxido de hidrogênio, diferentemente das demais literaturas que citavam uma proporção de 1:6 ácido ascórbico / peróxido de hidrogênio.

Utilizando a metodologia de Liu *et al.* (2018), o resultado obtido de conversão de AA a PAA foi um aumento de 40% para 60%, conforme citado no início. Entretanto, a massa molar do PAA, como esperado, diminuiu e não foi possível quantificá-la por SEC.

#### 4.2.6 Degradação de AmB durante a polimerização “*in situ*”

Em paralelo à polimerização “*in situ*” a 70 °C dos lipossomas DODAB: DOPE contendo AmB, foram quantificados os teores de AmB na amostra após a polimerização (item 3.3.6 ), através de leitura no UV-Vis em 210 nm. Observou-se uma diminuição quase total dos picos de absorção característicos da AmB no solvente metanol e água. Isto foi realizado para lipossomas contendo diferentes quantidades de AmB e os resultados foram similares. Por conseguinte, foi realizado um estudo com variação de temperatura e a relação da mesma com o teor de AmB no lipossoma polimerizado, vide 4.2.7. Um outro parâmetro que poderia afetar na molécula de AmB eram os iniciadores, como o peróxido de hidrogênio que é um agente oxidante, além de ser uma molécula muito menor que o lipossoma

DODAB: DOPE, podendo desta forma penetrar na bicamada lipídica e oxidar o fármaco AmB. Tal reação de oxidação do AmB já tinha sido estudada com outros agentes oxidantes e foi explicada devido a diminuição dos picos que são produzidos pelas duplas ligações (GAGOŚ; CZERNEL, 2014).

Para diminuir a oxidação da AmB foi agregada à fórmula dos lipossomas DODAB: DOPE o tocoferol, o qual é utilizado na formulação de Ambisoma, um fármaco comercial para AmB lipossomada, em uma porcentagem de 1% (TABELA7).

TABELA 7. FORMULAÇÕES DE LIPOSSOMA DD (DODAB: DOPE 10:2 mol:mol 1mmol L<sup>-1</sup> EM DODAB) PARA ENCAPSULAMENTO DE AmB, PRIMEIROS TESTES.

| <b>Fórmulas com<br/>AmB (200 µg mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>%Encapsulamento<br/>AmB</b> | <b>AmB após<br/>polimerização</b> |
|------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| <b>DODAB:DOPE</b>                                    | 48±2                           | 0                                 |
| <b>DODAB:DOPE + Tocoferol 1%</b>                     | 50±2                           | 28±3                              |
| <b>DODAB:DOPE + Tocoferol 2%</b>                     | 60±3                           | 15±3                              |

A porcentagem de tocoferol presente nas fórmulas diminuiu a oxidação do AmB, significativamente, quando comparado com o encapsulamento inicial e permanecendo com uma maior porcentagem após polimerização para a formulação com tocoferol de 1%. Pelos resultados observados, maiores concentrações de tocoferol não aumentaram o efeito protetor.

#### 4.2.7. Testes de temperatura na polimerização “*in situ*” dos lipossomas DODAB:DOPE contendo AmB

Foram realizados testes a diferentes temperaturas para atingir uma melhor conservação do fármaco após a polimerização. Foi também testada a formulação de DODAB sem DOPE porque ela apresentava maior rigidez em temperaturas menores que sua T<sub>m</sub>.

TABELA 8 FÓRMULAS DE LIPOSSOMAS COM AmB APÓS POLIMERIZAÇÃO A DIFERENTES TEMPERATURAS

| <b>Fórmulas com<br/>AmB (200 µg mL<sup>-1</sup>)</b> | <b>Temperatura<br/>°C</b> | <b>%AmB após<br/>polimerização</b> |
|------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| <b>DODAB:DOPE</b>                                    | 60 °C                     | 15±4                               |
| <b>DODAB:DOPE 1% tocoferol</b>                       | 60 °C                     | 30±5                               |
| <b>DODAB:DOPE</b>                                    | 40 °C                     | 44±3                               |
| <b>DODAB</b>                                         | 40 °C                     | 88±3                               |
| <b>DODAB 1%tocoferol</b>                             | 40 °C                     | 91±4                               |

As conversões da polimerização “*in situ*” nestas temperaturas também foram calculadas por meio do HPLC. Lembrando que a conversão da polimerização foi de 34±4% à 70 °C durante 30 min e à 40 °C durante 60 min foi de 28±3%, e entre elas não há diferença significativa  $p \geq 0,05$ .

Estas fórmulas foram testadas tomando em conta os estados de transição de fase em vesículas: (a) estado gel, (b) estado gel ondulado e (c) estado líquido-cristalino (FIGURA 4). Os lipossomas DODAB aumentavam seu tamanho com a temperatura, o qual podia dar problemas com a homogeneização dos tamanhos da amostra ao ter muita dispersão especialmente numa temperatura de 70 °C, pelo que se acrescentou DOPE. O DOPE é uma molécula que melhorou na estabilidade do tamanho do lipossoma embora deixou o sistema em um estado de gel ondulado, perdendo um pouco a estrutura rígida que uma vesícula de só o surfactante DODAB forma estruturas na forma de gel numa  $T < T_m$  (HUNGERFORD et al., 2006; TOOMBES et al., 2002).

Por estas razões considerou-se fazer um teste com uma temperatura inferior a transição de fase de DODAB, e com os iniciadores do par redox consegue-se fazer a polimerização numa temperatura mais baixa (ARIZMENDI et al., 2016; LIU et al., 2018). Mediante aos resultados obtidos (TABELA 8) observamos que a polimerização “*in situ*” à 40 °C, apresentou uma melhora na quantidade de fármaco presente. O que indicava que a oxidação do AmB diminuía, bem com a entrada dos oxidantes na bicamada lipídica. Este resultado foi confirmado com a quantidade de fármaco presente após a polimerização do lipossoma DODAB quando comparado com a quantidade obtida com o lipossoma DODAB: DOPE, onde a estrutura rígida do DODAB a 40 °C favoreceu a que se evitasse a oxidação de DODAB, embora o lipossoma DODAB:DOPE tivesse aumentado um pouco a quantidade de AmB para

50%, houve uma redução de 50% no teor de AmB. O lipossoma de DODAB tornou-se assim uma forma atraente para conservar a AmB durante o processo de polimerização.

#### 4.2.6 Potencial zeta e $D_{happ}$ das formulações de lipossoma DODAB polimerizado contendo AmB

Foram comparados e caracterizados estes sistemas por meio de medições feitas a seu tamanho por DLS e potencial zeta (TABELA 9).

TABELA 9 RESULTADOS COMPARATIVOS DOS  $D_{happ}$  E POTENCIAL ZETA DE LIPOSSOMAS DODAB E DD CONTENDO AmB ( $200\mu\text{g.L}^{-1}$ )

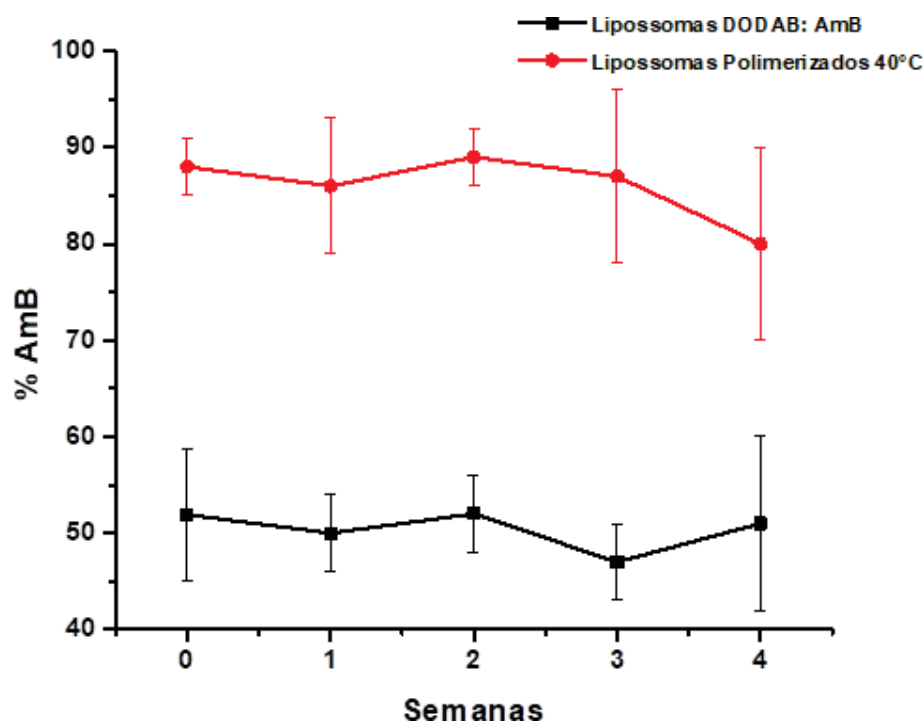
| <b>Fórmulas</b>               | <b><math>D_{happ}</math> (nm)</b> | <b>Potencial zeta (mV)</b> |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| DODAB:DOPE_AmB                | $57\pm 18$                        | $50\pm 3$                  |
| DODAB:DOPE_AmB (Polimerizado) | $151\pm 22$                       | $30\pm 3$                  |
| DODAB_AmB                     | $62\pm 1$                         | $48\pm 2$                  |
| DODAB_AmB (Polimerizado)      | $147\pm 44$                       | $32\pm 3$                  |

Assim foi encontrado que o sistema revestido com poli(ácido acrílico), através de polimerização *in situ*, sobre lipossoma DODAB a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  não foi observada diferenças ( $p \geq 0,05$ ) do  $D_{happ}$  nem de seu potencial zeta, quando comparada com o sistema de DODAB:DOPE também revestido por polimerização “*in situ*”.

#### 4.2.7 Estabilidade no tempo dos lipossomas DODAB contendo AmB

Para as formulações feitas com DODAB foram realizados os estudos de estabilidade em função do tempo. Também foi medido por UV-Vis o conteúdo de AmB dos lipossomas polimerizados a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

FIGURA 33 ESTABILIDADE DOS LIPOSSOMAS DODAB E DODAB POLIMERIZADOS (40 °C) CONTENDO INICIALMENTE 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  de AmB

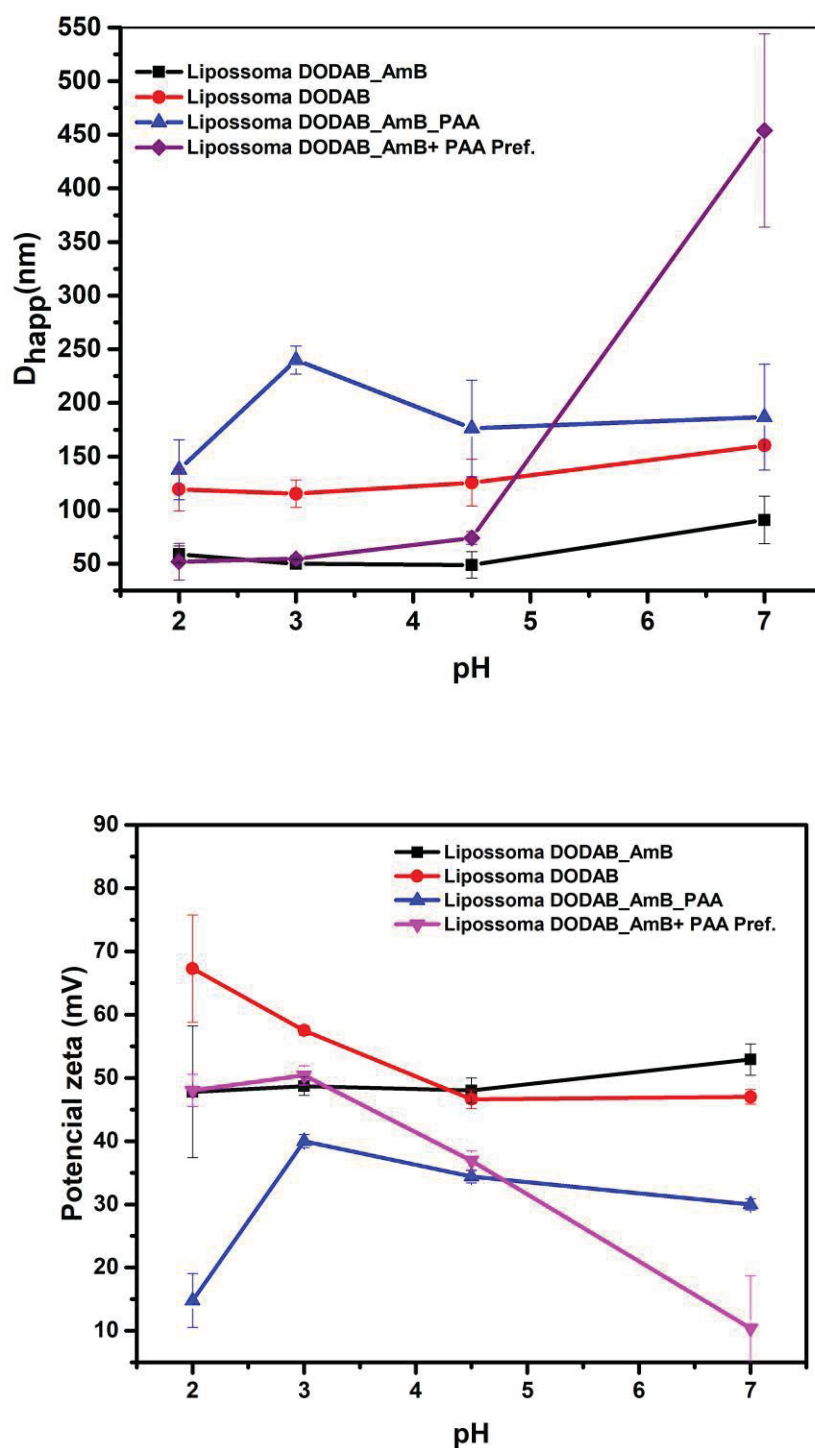


Foi observado que durante 4 semanas o teor de AmB dentro do lipossoma DODAB polimerizado e sem polimerizar foi mantido. Na FIGURA 33 o lipossoma com AmB e após polimerização a 40 °C são comparados em uma mesma diluição, e observa-se que o lipossoma polimerizado conserva as mesmas características em função do tempo.

#### 4.2.8 Potencial zeta e $D_{happ}$ em diferentes pH

Um dos objetivos deste trabalho é observar como o lipossoma polimerizado “*in situ*” com PAA podia reagir em diferentes pH, e assim monitorar a liberação de fármaco por mudanças em tamanho e potencial. Assim na FIGURA 34 são apresentados os valores de potencial zeta em função do pH.

FIGURA 34 MEDIDAS A DIFERENTES pH DO  $D_{happ}$  E DE POTENCIAL ZETA EM LIPOSSOMAS DE DODAB CONTENDO OU NÃO AMB, E DEPOIS DA POLIMERIZAÇÃO "IN SITU". OS SISTEMAS QUE CONTÉM AmB ESTÃO EM  $90 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Pref.=PRE-FORMADO).



Os quatro sistemas estudados apresentaram comportamentos diferentes com a variação do pH, através de análises de espalhamento de luz dinâmico e de

potencial zeta. Com a diminuição de pH (FIGURA 34b) observamos uma queda significativa do potencial zeta no lipossoma recoberto com poli(ácido acrílico) contendo AmB, quando obtido através da polimerização *“in situ”*. Esta queda do potencial, entre pH 2-3, pode significar uma maior interação entre o DODAB e o polímero. Para o lipossoma DODAB, contendo AmB e o polímero pré-formado poli(ácido acrílico), observa-se uma maior influência de valores de pH acima de 3 sobre o potencial zeta. Ressalta-se que para a amostra contendo polímero pré- formado, a partir da ionização dos grupos ácidos, há uma interação muito forte com a superfície do lipossoma, reduzindo o potencial zeta com aumento do pH. Já para o lipossoma recoberto pela polimerização *“in situ”* observa-se uma interação mais discreta, e conseqüentemente, uma interação mais íntima com a superfície, pouco afetada pelos pH > 4.5.

Resultados semelhantes foram observados por espalhamento de luz dinâmico (FIGURA 33). Para o lipossoma polimerizado *“in situ”* contendo AmB, os  $D_{happ}$  nos pH 4.5 e 7 não tem diferença significativa, com uma dispersão elevada. Porém, desde pH 4,5 e 3 a dispersão diminui e se observa um  $D_{happ}$  de 240 nm. Em pH 2 o  $D_{happ}$  reduziu para 140 nm, o que pode indicar a precipitação da camada de poli(ácido acrílico) na superfície do lipossoma, uma vez que o lipossoma usado para o revestimento possuía um diâmetro de 50 nm. Para o lipossoma revestido com o polímero pré-sintetizado observa-se que apenas acima do pKa do poli(ácido acrílico) é possível observar algum incremento do raio hidrodinâmico, com observação macroscópica de uma separação de fases.

Variações de tamanho do lipossoma contendo AmB recoberto com PAA formado *“in situ”* apresentou respostas em pH ácido (2 - 4,5) com o qual é promissório para vetorização de fármaco no sítio alvo onde se encontra hospedada o parasita intracelular (ANTOINE et al., 1990; ORTIZ et al., 2009). Entretanto, é necessário fazer testes em macrófagos infectados com leishmaniose para conseguir concluir se a vetorização realmente funciona. Outra vantagem, é que o mesmo mantém sua estabilidade em diferentes condições de pH, diferentemente do polímero pré-formado, que demonstrou gerar maior instabilidade nos lipossomas acima do pKa 4,5.

## 5 CONCLUSÕES

No desenvolvimento da polimerização “*in situ*” de Acido Acrílico sobre lipossomas para a fabricação de nanocapsulas de AmB, os objetivos foram atingidos. Assim, foram produzidos lipossomas e nanocápsulas de lipossoma. Além disso, foi realizado um estudo da absorção em filmes e lipossomas do monômero AA, onde foi determinado usar  $\text{pH} \geq 4,3$  para garantir uma maior adsorção do monômero na superfície do lipossoma.

O par ácido ascórbico e peróxido e hidrogênio foi mais eficiente em converter o AA em PAA que o KPS. Desta forma foi realizado um estudo da polimerização “*in situ*” e foi determinada a cinética de conversão durante 30 min a  $70^{\circ}\text{C}$ , evidenciando um comportamento de pseudoprimeira ordem, também se encontrou que a cinética foi afetada pelo tamanho do lipossoma.

As nanocápsulas de lipossoma e as superfícies dos filmes produzidas foram confirmadas e caracterizada por diferentes métodos. Os filmes foram caracterizados por tensiometria e QCM-D, e para os sistemas tridimensionais através de medidas de potencial zeta, espalhamento de luz dinâmico e microscopia de força atômica. Demonstrou-se também a formação de PAA na presença dos lipossomas, e que há um fenômeno adsortivo prévio à polimerização por meio de HPLC. Também foram determinadas as massas molares para a concentração de AA para 7 e 9  $\text{mmol L}^{-1}$ , a massa molar média numérica ( $M_n$ ) obtida para o poli(ácido acrílico) foi de 20.000  $\text{g mol}^{-1}$ , foi determinado que em presença de lipossoma a massa molar de PAA diminuiu quando comparado com um sistema sem lipossoma.

Foi realizada a incorporação e quantificação de AmB no lipossoma DODAB: DOPE, sendo que o método de encapsulamento mais eficiente foi o de reidratação de filme, com eficiência máxima de 50%, para as formulações a partir de  $150\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AmB. A concentração encapsulada afeta o estado de agregação da AmB, e consequentemente, a formulação com menor potencial tóxico foi de  $60\mu\text{g.mL}^{-1}$ , com um fator R de 1, que indica o favorecimento do estado monomérico da AmB. Para tanto, foi concluído, que as proporções de concentração fármaco/lipossoma próximos a  $60\mu\text{g mL}^{-1}$  de AmB /Lipossoma DODAB  $1\text{ mmol L}^{-1}$  podem ser usadas para diminuir o fator R e assim favorecer a um estado monomérico do fármaco.

As melhores condições para o processo de polimerização *“in situ”* de AA foram determinadas, adaptando as condições previas obtidas para assim evitar a oxidação do fármaco AmB. Os parâmetros de tempo e temperatura foram definidos como 60 min a 40 °C para evitar a degradação da AmB dentro da nanocapsula, utilizando apenas DODAB em função de sua estrutura gelificada e rígida, protegendo melhor o fármaco. As reações de conversão de AA em poli(ácido acrílico), nos tempos e temperatura indicados, não geraram diferenças significativas quando comparadas com o sistema a 70 °C com 30 min de polimerização.

As análises dos efeitos do pH na liberação de ativos foram realizadas, através de estudos com potencial zeta e tamanho de partículas pela técnica de DLS, onde foi determinado que o lipossoma DODAB mudava seu potencial zeta na faixa de pH 2 a 3, associado a modificações de tamanho. Os outros sistemas testados com polímero pré-formado apresentou instabilidade em valores de pH acima do pKa do poli(ácido acrílico), que é de 4,25.

Como aspecto final o revestimento dos lipossomas foi obtido, junto com sua caracterização, monitoramento da reação de polimerização *“in situ”*, e o encapsulamento do fármaco AmB. A nanocápsula contendo AmB apresentou resposta a mudanças no pH. O método de polimerização *“in situ”* apresentou uma vantagem significativa para a criação das nanocápsulas por apresentar estabilidade em pH maiores de 3, mantendo-se estável nos demais valores de pH avaliados.

## 6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É recomendado continuar com os estudos a nível celular com ensaios de MTT, como analisar a atividade Leishmanicida da Anfotericina B em nanocápsulas nos parasitos isolados e/ou em formas intracelulares em macrófagos. Pode-se testar o comportamento com outros fármacos comerciais. Estes ensaios não foram possíveis de serem realizados pela pandemia COVID-19.

Um trabalho futuro pode ser vetorizar as células cancerígenas porque tanto o fármaco AmB (TAVANGAR et al., 2017) como a nanocápsula tiveram repostas em pH ácido que é o pH de esta tipo de células. É possível continuar estes estudos com outros monômeros responsivos a pH. Com esta mesma nanocápsula pode-se testar a reticulação do polímero, já que é possível formar um polímero reticulado pelos grupos ácidos que apresenta.

## 7 REFERÊNCIAS

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation aspects of liposomes, and applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 102, p. 1–9, 2013.

AL-HAYDARI, M. et al. Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization with Biodegradable Surfactant and Hydrophobe. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, p. 747–751, 2009.

ALVES, F. R. **Estruturas vesiculares em misturas de surfactantes catiônicos**. 120 f. Teses (Doutorado) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto - SP, 2008. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/100458>. Acesso em 30 de Jan. 2018.

ALVES, J. B. et al. Local delivery of EGF – liposome mediated bone modeling in orthodontic tooth movement by increasing RANKL expression. **Life Sciences**, v. 85, n. 19–20, p. 693–699, 2009.

ALVES, R. et al. Vesicle – micelle transition in aqueous mixtures of the cationic dioctadecyldimethylammonium and octadecyltrimethylammonium bromide surfactants. **Colloid and Interface Science**, v. 316, p. 132–139, 2007.

ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 779–787, 1990.

ARIZMENDI, D. et al. Electron paramagnetic resonance study of hydrogen peroxide / ascorbic acid ratio as initiator redox pair in the inulin-gallic acid molecular grafting reaction. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 350–357, 2016.

AROTI, A. et al. Effects of Monovalent Anions of the Hofmeister Series on DPPC Lipid Bilayers Part I : Swelling and In-Plane Equations of State. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 5, p. 1580–1590, 2007.

AYANE, F. et al. Immunobiology Evaluation of intranasal and subcutaneous route of immunization in neonatal mice using DODAB-BF as adjuvant with outer membrane vesicles of *Neisseria meningitidis* B. **Immunobiology**, v. 223, n. 12, p. 750–760, 2018.

BANGHAM, A. D.; DE GIER, J.; GREVILLE, G. D. Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. **Chemistry and Physics of Lipids**,

Photopolymerization. **Macromolecular Symposia**, p. 124–133, 2013.

CSEMPESZ, F. Colloid Stability and Application in Pharmacy. Colloids and Interface Science Series. Budapest: Wiley Blackwell, 2010.

CUCCOVIA, I. M. et al. Effect of dialkyldimethylammonium vesicles on the thiolysis of p-nitrophenyl acetate. **Tetrahedron Letters**, n. 33, p. 3065–3068, 1979.

CUTIE, S. S. Acrylic Acid Polymerization Kinetics. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 35, p. 2029–2047, 1997.

D'AGOSTINI-JUNIOR, O. et al. Simultaneous in situ monitoring of acrylic acid polymerization reaction on N-carboxymethyl chitosan using multidetectors : Formation of a new bioadhesive and gastroprotective hybrid particle. **Materials Science & Engineering C**, v. 31, n. 3, p. 677–682, 2011.

DA SILVA, L. Formação de partículas em escala micro e sub-micro. 186 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/21424>. Acesso em: 27 de out. de 2017.

DAR, M. J. et al. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis with novel amphotericin B- miltefosine co-incorporated second generation ultra-deformable liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 573, n. November 2019, p. 118900, 2019.

DAVIS, T. P.; MATYJASZEWSKI, K. **Handbook of radical polymerization**. Canada: [s.n.]. v. 40

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases : opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195–204, 2010.

DUA, J. S.; RANA, A. C.; BHANDARI, A. K. Review Article LIPOSOME : METHODS OF PREPARATION AND APPLICATIONS. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, 2012.

EVELYN, P. Liposome and Polymer-based Nanomaterials for Vaccine Applications. **Nanomedicine Journal**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2019.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. Anfotericina B : uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and Biomedical Research**, v. 35, n. 2, p. 65–82, 2015.

FEAIRHELLER, W. R.; KATON, J. E. The vibrational spectra of acrylic acid and sodium acrylate. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy**, v. 23, n. 8, p. 2225–2232, 1967.

FEITOSA, E. The effect of ionic strength on the structural organization of dioctadecyldimethylammonium bromide in aqueous solution. **Progr Colloid Polym Sci**, p. 163–168, 2004.

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

FEITOSA, E.; EDWARDS, K. Unilamellar vesicles obtained by simply mixing dioctadecyldimethylammonium chloride and bromide with water. **Chemistry and physics of lipids**, v. 140, p. 66–74, 2006.

FLORENZANO, F. H.; STRELITZKI, R.; REED, W. F. Absolute, On-Line Monitoring of Molar Mass during Polymerization Reactions. **Macromolecules**, p. 7226–7238, 1998.

FREITAS, R. et al. Degalatosylation of xyloglucan : Effect on aggregation and conformation , as determined by time dependent static light scattering , HPSEC – MALLS and viscosimetry. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1636–1642, 2011.

GAGOŚ, M.; CZERNEL, G. Oxidized forms of polyene antibiotic amphotericin B. **Chemical Physics Letters**, v. 598, p. 5–9, 2014.

GREGORIADIS, G.; FLORENCE, A. T. Liposomes in Drug Delivery. **Drugs**, v. 45, n. 1, p. 15–28, 1993.

HENTON, D. E.; POWELL, C.; REIM, R. E. The Decomposition of Sodium Persulfate in the Presence of Acrylic Acid. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 64, n. 3, p. 591–600, 1996.

HIESGEN, R.; FRIEDRICH, K. A. Atomic force microscopy. **PEM Fuel Cell Diagnostic Tools**, p. 395–421, 2011.

HUNGERFORD, G. et al. Interaction of DODAB with neutral phospholipids and cholesterol studied using fluorescence anisotropy. **Journal of photochemistry and Photobiology A: CHEMISTRY**, v. 181, p. 99–105, 2006.

IMAN, M. et al. Characterization of the colloidal properties , in vitro antifungal activity , antileishmanial activity and toxicity in mice of a liposome-intercalated amphotericin B. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1–2, p. 163–172, 2011.

JAMRÓZ, D.; KEPCZYNSKI, M.; NOWAKOWSKA, M. Molecular Structure of the Dioctadecyldimethylammonium Bromide ( DODAB ) Bilayer. **Langmuir Letter**, v. 26, n. 12, p. 15076–15079, 2010.

KAMINSKI, G. A. T. et al. Layer-by-layer polysaccharide-coated liposomes for sustained delivery of epidermal growth factor. **Carbohydrate Polymers**, v. 140, p. 129–135, 2016.

KLESZCZEWSKA, E.; WIESLAWA, M. Spectrometric assay of reaction of L-Ascorbic Acid with promethazine occurring in quantitative determination of vitamin C. **Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research**, v. 56, n. 5, p. 347–351, 1999.

KOSSEN, S. P.; RESINS, A. N.; ZOOM, B. HPLC Determination of Free Amounts of ( Meth ) acrylic Monomers in Solvent and Water-borne Poly ( meth ) acrylates. **LC GC Europe**, n. November, p. 3–8, 2001.

KWON, S. Y. et al. A Highly Stable Quartz Crystal Microbalance Sensor and Its Application to Water Vapor Measurements. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 48, n. 1, p. 161–165, 2006.

LAURENT, A. et al. Potency and stability of liposomal Amphotericin B formulated for topical management of *Aspergillus* spp. infections in burn patients. **Burns Open**, v. 4, n. 3, p. 110–116, 2020.

LEE, S. M.; NGUYEN, S. T. Smart nanoscale drug delivery platforms from stimuli-responsive polymers and liposomes. **Macromolecules**, v. 46, n. 23, p. 9169–9180, 2013.

LEE, Y. S. **Self-Assembly and nanotechnology: a force balance Approach**. United State: Jhon Wiley & sons, Inc., 2008.

LEGRAND, P. et al. Effects of Aggregation and Solvent on the Toxicity of Amphotericin B to Human Erythrocytes. **Antimicrobial Agents An Chemotherapy**, v. 36, n. 11, p. 2518–2522, 1992.

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 327–341, 2004.

LI, M. et al. Composition design and medical application of liposomes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 640–653, 2019.

LI, W. et al. Acid labile liposomes constructed with poly(acrylic acid) modified lipids. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 1, p. e74–e75, nov. 2013.

LIU, J. et al. Reaction Mechanisms and Structural and Physicochemical Properties of Caffeic Acid Grafted Chitosan Synthesized in Ascorbic Acid and Hydroxyl Peroxide Redox System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 279–289, 2018.

LOPEZ, T. **Efectos Hofmeister en Sistemas Coloidales**. 325 f. Teses (Doutorado)- Departamento de Física aplicada, Universidad de Granada, Cocis, 2006. Disponível em: <https://hera.ugr.es/tesisugr/16433476.pdf>. Acesso em: 18 de Nov. 2021.

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma Revisão Sobre os Processos de Polimerização em Suspensão. **Polimeros: Ciência e tecnologia**, v. 17, p. 166–179, 2007.

MACHADO, P. F. DE M. P. B. **Polimerização via radical livre para polímeros lineares e ramificados usando iniciadores mono e difuncional**. 158 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil, 2004. Disponível em: [https://oasisbr.ibict.br/vufind/Record/CAMP\\_01354ad6f1a83886c9f77edb58df3aa6](https://oasisbr.ibict.br/vufind/Record/CAMP_01354ad6f1a83886c9f77edb58df3aa6). Acesso em 30 de out. 2021.

MAJA, L.; ŽELJKO, K.; MATEJA, P. Sustainable technologies for liposome preparation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, 2020.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução aos polímeros**. 2a. ed. Brasil: EDGARD BLUCHER, 2004.

MAO, G.; LIANG, X.; SIMON, K. Y. Direct Force Measurement of Liposomes by Atomic Force Microscopy. **Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, 2004.

MOAD, G.; SOLOMON, D. H. **The Chemistry of Radical Polymerization**. 2. a. ed. Australia: Elsevier, 2005.

MORAES, T. C. et al. Assessment of in vitro antifungal efficacy and in vivo toxicity of Amphotericin B-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 27, n. 4, p. 519–529, 2017.

MOSTAFAVI, M. et al. Niosomal formulation of amphotericin B alone and in combination with glucantime: In vitro and in vivo leishmanicidal effects. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 116, n. March, 2019.

NASCIMENTO, D. B.; RAPUANO, R.; LESSA, M. M. Counterion Effects on Properties of Cationic Vesicles. **Langmuir**, n. 24, p. 7387–7391, 1998.

NIE, N. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Synthesis of copolymers using dendronized polyethylene glycol and assay of their blood compatibility and antibacterial adhesion activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 226–235, 2012.

NKANGA, C. I.; BAPOLISI, A. M. General Perception of Liposomes : Formation , Manufacturing and Applications. In: **Liposomes - Advances and Perspectives**. London: IntechOpen, 2019.

NORBETO, A. et al. Dioctadecyldimethylammonium : Monoolein Nanocarriers for Efficient in Vitro Gene Silencing. **Applied Materials & interfaces**, 2014.

OLIVEIRA, T. **Caracterização estrutural de agregados formados pelo antifúngico anfotericina B e lipídios catiônicos : uma possível formulação farmacológica**. 147f. Dissertação (Mestrado) -Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-03032009-140235/pt-br.php>. Acesso em: 18 out. de 2019.

OLIVEIRA, T. R.; BENATTI, C. R.; LAMY, M. T. Structural characterization of the interaction of the polyene antibiotic Amphotericin B with DODAB bicelles and vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, n. 11, p. 2629–2637, 2011a.

OLIVEIRA, T. R.; BENATTI, C. R.; LAMY, M. T. Structural characterization of the interaction of the polyene antibiotic Amphotericin B with DODAB bicelles and vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, n. 11, p. 2629–2637, 2011b.

ORTIZ, D. et al. An acid-activated nucleobase transporter from Leishmania major. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 24, p. 16164–16169, 2009.

OSWALD, M. et al. HPLC analysis as a tool for assessing targeted liposome composition. **International Journal of pharmaceutics**, 2015.

PANDEY, H.; RANI, R.; AGARWAL, V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 59, p. 1–10, 2016.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 177, p. 8–18, 2014.

PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, 2015.

PAULA, R. et al. Part III Nanotherapeutics for NTD. In: **Applications of Nanobiotechnology for Neglected Tropical Diseases**. Fortaleza, Brasil: Elsevier Inc., 2021. p. 119–139.

PELISSARI, D. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose

Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, 2011.

PEREZ, A. et al. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro . **Colloids and Surfaces B**, 2015.

ROMIO, A. et al. Polymeric nanocapsules via miniemulsion polymerization using redox initiation. **Materials Science & Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 514–518, 2009.

ROUSSEAU, D.; RAFANAN, R. R.; YADA, R. **Microemulsions as Nanoscale Delivery Systems**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2011. v. 4

RUANO, M. **Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas**. 357f. Teses (Doutorado)- Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 2013. Disponível em: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/18042/1/T34218.pdf>. Acesso em: 18 out. 2020.

SAROJA, N. L. R. G.; THARANATHAN, R. N. Chromatographic Determination of Residual Monomers in Starch-g-Polyacrylonitrile and Starch-g-Polyacrylate. **Chromatographia**, v. 51, n. 5, p. 345–348, 2000.

SCARIOTI, D. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Nanocapsule of cationic liposomes obtained using “ in situ ” acrylic acid polymerization : Stability , surface charge and biocompatibility &. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 267–272, 2011.

SEELYANGNOK, S. et al. Synthesis of Poly (Acrylic Acid) Based Polymers as Quantitative Determined Scale Inhibitor. **The Asian Conference on Sustainability, Energy & The Environment 2016**, 2016.

SHASHI, K.; SATINDER, K.; BHARAT, P. a Complete Review on: Liposomes. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 7, p. 10–16, 2012.

SILVA, I. et al. Treatment With Liposomal Amphotericin B for All Confirmed Cases of Human Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Budget Impact Analysis. **Value in Health Regional Issues**, v. 23, p. 77–84, 2020.

SILVA, J.; OLIVEIRA, A.; GOMES, A. Development of DODAB-MO Liposomes for Gene Delivery Development of Dioctadecyldimethylammonium Bromide / Monoolein Liposomes for Gene Delivery. In: São Paulo: ResearchGate, 2012. p. 245–272.

SIMÕES, M. G. et al. Stability effect of cholesterol-poly(acrylic acid) in a

stimuli-responsive polymer-liposome complex obtained from soybean lecithin for controlled drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 103–113, abr. 2017.

SKOOG, D.; HOLLER, J.; CROUCH, S. **Principles of Instrumental Analysis**. 7. ed. São Paulo: Trilha, 2017.

SOARES BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 139–149, 2004.

SOBRAL, N. C.; SOTO, M. A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Characterization of DODAB / DPPC vesicles. **Chemistry and physics of lipids**, v. 152, p. 38–45, 2008.

TAVANGAR, F. et al. Amphotericin B potentiates the anticancer activity of doxorubicin on the MCF-7 breast cancer cells. **Journal of Chemical and Biology**, v. 10, p. 143–150, 2017.

TOOMBES, G. E. S. et al. Determination of L alpha – H II Phase Transition Temperature for 1, 2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamine. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 5, p. 2504–2510, 2002.

TORRES GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review [ version 1 ; referees : 2 approved ] Referee Status : **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

TREVOY, D. J.; JOHNSON, H. The water wettability. **Journal of Physical Chemistry**, v. 165, n. 3, p. 833–837, 1958.

ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533–1553, 1996.

WANG, J.; ZHU, H. Influence of amphotericin B on the thermodynamic properties and surface morphology of saturated phospholipid monolayer with different polar head at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 617, n. December 2020, p. 126298, 2021.

WAUGH, C. D. Amphotericin B. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1–5, 2007.

WHITE-STEVENSON, R. H. Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury. **Clinical Chemistry**, v. 28, n. 4 I, p. 578–588, 1982.

WOLFF, E. H. P.; RENÉ BOS, A. N. Modeling of Polymer Molecular Weight Distributions in Free-Radical Polymerization Reactions. Application to the Case of

Polystyrene. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 36, n. 4, p. 1163–1170, 1997.

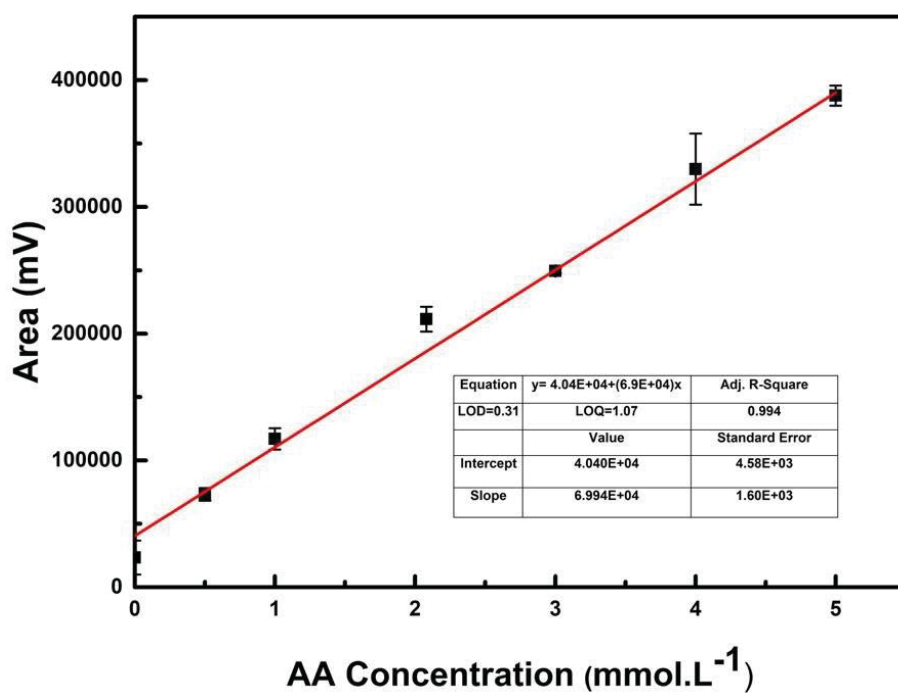
WOLFF, E. P.; RENE BOS, A. N. Modeling of Polymer Molecular Weight Distributions in Free-Radical Polymerization Reactions . Application to the Case of Polystyrene. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 36, p. 1163–1170, 1997.

YINGCHONCHAROEN, P.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: What is available and what is yet to come. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 3, p. 701–787, 2016.

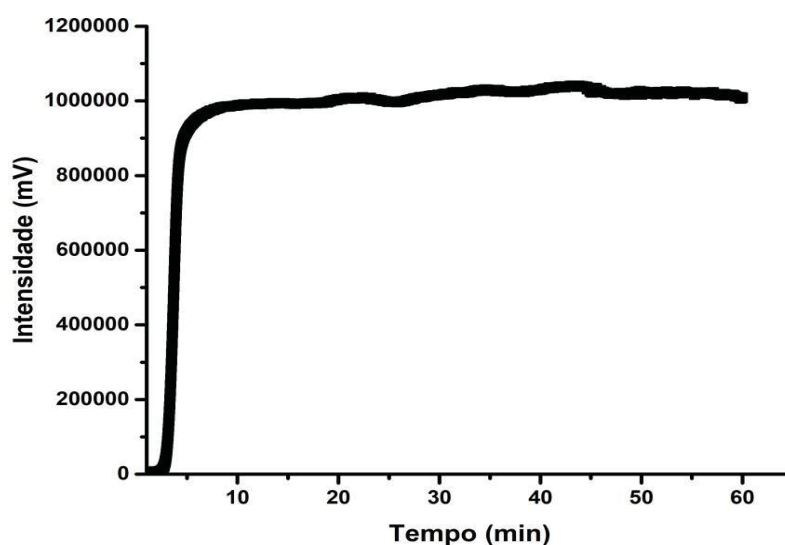
YUBA, E. Design of pH-sensitive polymer-modified liposomes for antigen delivery and their application in cancer immunotherapy. **Polymer Journal**, n. January, p. 1–11, 2016.

## 8 ANEXOS

**ANEXO A. Curva de calibração usada na CLAE para a determinação do consumo de AA. Ajuste lineal**



**ANEXO B. Monitoramento em tempo real pelo sistema ACOMP do consumo de AA na polimerização com iniciador KPS com o lipossoma DODAB:DOPE (10:2 mol:mol), 1mmol L<sup>-1</sup> em DODAB.**



### ANEXO C. Estimativa do número de moléculas / lipossomas DODAB e número de lipossomas / mL

Para estimar o número de moléculas (Nmoléculas) por lipossoma, a equação 1 foi usada:

$$N_{\text{moléculas}} = [(4\pi (D / 2)^2 + 4\pi (D / 2 - h)^2) / a] \text{ (eq.1)}$$

Onde D é o diâmetro hidrodinâmico aparente do lipossoma, h é a espessura da bicamada (4 nm para DODAB) e a área da cabeça do surfactante (0,68 nm<sup>2</sup>), conforme descrito por Kaminski *et al.* (2016). Para os três lipossomas formulados com 1,0 e 2,5 de DODAB, as moléculas N por lipossoma foram determinadas como 58.075.

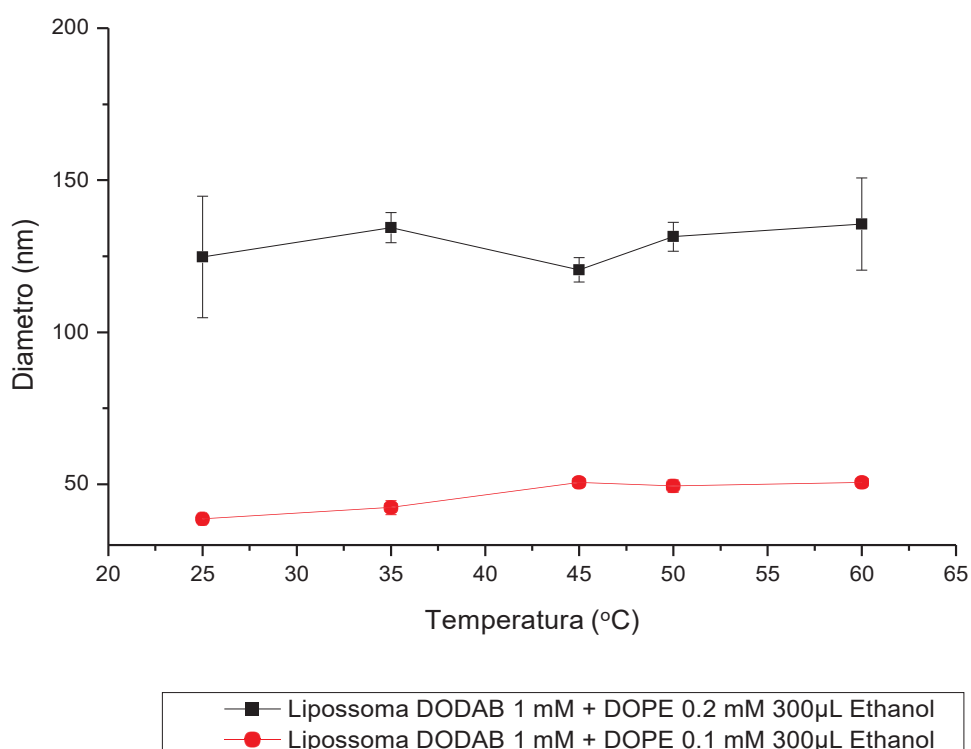
O número estimado de lipossomas / mL foi estimado de acordo com a equação 2:

$$N_{\text{lipossoma}} = [(Concentração \text{ molar DODAB} \times N_a) / (N_{\text{moléculas}} \times 1000)] \text{ (eq.2)}$$

Onde N<sub>a</sub> é o número de Avogadro e a concentração molar de DODAB foi 1,0 x10<sup>-3</sup> e 2,5 x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, e o número estimado de lipossomas, determinado usando por mL (N<sub>lipossoma</sub>) foi de 10 x 10<sup>12</sup> e 25 x 10<sup>12</sup>, respectivamente.

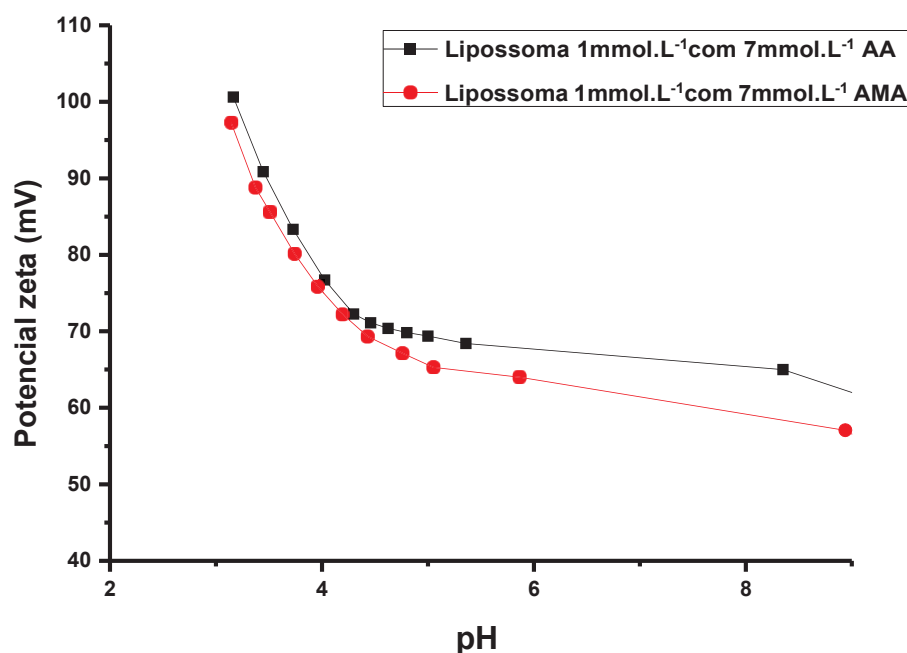
O N<sub>liposome</sub> também foi correlacionado com o espalhamento de luz total promovido pelas partículas usando informações de espalhamento de luz total de experimentos DLS. Os lipossomas DODAB 1,0 mmol / L apresentaram um espalhamento total de 435 kcps e para DODAB a 2,5 mmol / L a taxa de contagem média foi de 1178 kcps (aumento ~ 2,7 vezes). Como o espalhamento de luz é proporcional ao tamanho, massa molar e número de partículas de espalhamento ou concentração, e o tamanho das partículas foi mantido constante durante os experimentos, o aumento proporcional no sinal de espalhamento de luz indicou um aumento no número total de lipossomas por mL.

**ANEXO D Resultados do análise do diâmetro médio de partícula obtidos para lipossoma DODAB:DOPE 1mM pelo método de injeção de 300µL etanol 5 min de sonicação**



Como pode se observar no gráfico 11, os tamanhos de partícula aumentaram usando uma menor quantidade de etanol, e isto se pode comparar com o gráfico 9, onde os diâmetros da partícula ficaram com 10 nm dos lipossomas feitos com DODAB:DOPE com 1 mL de etanol. Com uma quantidade de 300 µL de etanol os diâmetro das partículas para os lipossomas DODAB:DOPE (10:1) ficaram com uma média para as distintas temperaturas de  $(46,3 \pm 1,6)$  nm e  $(129,3 \pm 9,8)$  nm para o lipossoma DODAB:DOPE (10:2).

**ANEXO E. Potencial zeta do lipossoma DODAB:DOPE (10:2 mol:mol) (DODAB a 1 mmol L<sup>-1</sup>) e os monômeros AA e AMA a 7 mmol L<sup>-1</sup>, em função do pH.**



**ANEXO F. Resultados no QCM pelo software Qsoft401 aos 20 min foi acrescentado acido acrílico 7 mmol L<sup>-1</sup> pH 5. A linha de cor vermelha indica a frequência e a de cor azul a dissipação.**

