FURG

Tese de Doutorado

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MAGNETOLIPOSSOMAS PARA APLICAÇÃO COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FÁRMACO

Sandra Cruz dos Santos

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2018

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MAGNETOLIPOSSOMAS PARA APLICAÇÃO COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FÁRMACO

por

SANDRA CRUZ DOS SANTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de DOUTOR EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS –Brasil

2018

Universidade Federal do Rio Grande

Escola de Química e Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Tese de Doutorado

PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MAGNETOLIPOSSOMAS PARA APLICAÇÃO COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FÁRMACO

elaborada por

SANDRA CRUZ DOS SANTOS

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Profa. Dra. Vania Rodrigues de Lima (Orientadora, FURG - RS)

_____
Prof. Dr. Alexandre Luiz Parise (Co-orientador, UFSC - SC)

_____
Prof. Dr. Felipe Kessler (FURG - RS)

_____
Prof. Dr. Bruno Meira Soares (FURG - SC)

_____
Prof. Dr. Alexandre Gonçalves Dal-Bó (UNESC - SC)

Rio Grande, 28 de junho de 2018.

"In Memoriam"

A meu pai, Ildefonso, e minha mãe, Maria Terezinha!

Sabedoria! Sonhos! Recomeços e vitórias.
Sementes plantadas na infância
que ainda germinam.
E muito me ensinam a emoção de pensar e escrever.
Juntos, iniciamos uma grande viagem
pelas letras, livros e fórmulas
nas páginas do aprendizado.
Como agradecer a esse amor?
Fazer perdurar a imagem dessa trajetória?
Mas, ofereço a presente tese.
Ela é nossa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e não me deixar desamparada nem por um segundo, e, principalmente, por me dar forças e não me deixar fraquejar.

A minha orientadora, professora Vânia Rodrigues de Lima, pela oportunidade e apoio no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu co-orientador Alexandre Parise, pela contribuição no surgimento deste projeto, e pelas análises de DLS, potencial Zeta e magnetização.

Aos professores membros da banca avaliadora, muito obrigada, por terem aceitado contribuir com o trabalho.

Ao professor João Cardoso de Lima (UFSC) e seus alunos de Doutorado, Ailton Ferreira e Zeane Borges, pelas análises de DSC.

Aos alunos Andrés Rengifo e Eloah Latocheski do PPGQ-UFSC pelas medidas de DLS e potencial zeta.

Aos integrantes do Centro Integrando de Análises da FURG, Caroline, Diego, Jean e Ana, pelas análises de RMN ^{1}H e ^{31}P.

A professora Tatiane Maranhão (UFSC), ao professor Bruno Soares (FURG) e ao aluno de Doutorado do PPGQTA-FURG, João Batista Junior, pelas análises de absorção atômica.

Ao professor Fernando Carlos Giacomelli da UFABC pela realização das medidas de SAXS.

Ao físico Dr. Fabrício Luiz Faita (UFRGS) pelas medidas de magnetização.

A aluna de Doutorado do PPGQ-UFSC, Natalia Branco, pelas medidas de magnetização e MET.

Ao professor Juliano Vicenti (FURG), pelo auxílio nas medidas de DRX.

A professora Ana Paula Horn (FURG) e seu aluno de Doutorado, Marcelo Marinho, pelos ensaios biológicos.

A aluna de Doutorado do PPGQTA, Valéria Cavalheiro, pelo auxílio nas medidas de DRIFT-FTIR das NPM.

A aluna do curso de Bacharelado em Química da FURG, Aline Loise Faria, pelo auxilio no preparo dos magnetolipossomas.

A aluna de mestrado do PPGQTA Nichole Silva, pelo auxílio nas medidas de TBARS.

A Universidade Federal do Rio Grande e à Escola de Química e Alimentos pelo espaço cedido para que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus colegas de trabalho e aos meus amigos que de alguma forma sempre me apoiaram.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa GIIMM que sempre estiveram dispostos a me ajudar!

Agradeço, finalmente, à minha família, por tudo. Em especial, meus amores, Felipe, Rejane e Alessandro pelo incentivo, companheirismo e suporte. Amo vocês!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5
2.1 Constituintes dos magnetolipossomas 5
2.1.1 Nanopartículas magnéticas 5
2.1.2 Fosfolipídios 14
2.2 Magnetolipossomas 29
2.3 Quercetina como fármaco-modelo 31
2.4 Métodos de caracterização físico-química de magnetolipossomas 35
2.4.1 Estudos de estabilidade 35
2.4.2 Eficiência de encapsulamento 41
2.4.3 Estudos de movimentos molecular 41
2.4.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) 54
2.4.5 Ensaios de magnetização 56
3 OBJETIVO 57
3.1 Objetivo geral 57
3.2 Objetivos específicos 57
4 MATERIAIS E MÉTODOS 58
4.1 Reagentes utilizados 58
4.2 Preparo dos magnetolipossomas 58
4.2.1 Método de hidratação de vesículas (HV) 59
4.2.2 Método de evaporação em fase reversa (FR) 60

4.2.3 Encapsulamento da quercetina nos magnetolipossomas 64
4.3 Determinação da estabilidade 65
4.3.1 Análises do tamanho 65
4.3.2 Análise da peroxidação lipídica nas membranas 67
4.3.3 Análise da carga superficial – Medidas de potencial zeta 67
4.4 Determinação da incorporação das nanopartículas magnéticas 68
4.4.1 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis) 68
4.4.2 HR-CS AAS com atomização em forno de grafite (HR-CS GF AAS) 69
4.4.3 HR-CS AAS com atomização em chama (HR-CS F AAS) 69
4.5 Determinação do percentual de encapsulamento de quercetina 71
4.6 Caracterização físico-química 72
4.6.1 Estudos com espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) 72
4.6.2 Estudos com ressonância magnética nuclear (RMN) 73
4.6.3 Ensaios de calorimetria de varredura diferencial (DSC) 73
4.6.4 Medidas de turbidez por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis) 74
4.6.5 Ensaios de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) 74
4.7 Medidas de propriedades magnéticas 75
4.8 Ensaio de viabilidade celular 75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 77
5.1 Estabilidade dos magnetolipossomas 77
5.2 Percentagem de incorporação das nanopartículas magnéticas 96
5.3 Caracterização dos magnetolipossomas segundo o método de preparo 100

5.3.1 Caracterização físico-química dos magnetolipossomas preparados pelo método de hidratação de vesículas 105

5.3.2 Caracterização físico-química dos magnetolipossomas preparados pelo método de evaporação em fase reversa 120

5.3.2.1 Região polar 120

5.4. Ensaios de SAXS no sistema de magnetolipossoma mais estável 137

5.5 Estabilidade dos magnetolipossomas contendo quercetina 140

5.5.1 Medidas de diâmetro médio, atividade oxidante e potencial zeta dos magnetolipossomas contendo quercetina 141

5.6 Percentagem de incorporação das nanopartículas magnéticas nos magnetolipossomas contendo quercetina (fármaco-modelo)..... 146

5.7 Eficiência de encapsulamento da quercetina (fármaco-modelo) nos magnetolipossomas..... 147

5.8 Caracterização dos magnetolipossomas contendo quercetina (fármaco-modelo). 149

5.8.1 Interação da quercetina com a região polar dos magnetolipossomas..... 151

5.8.2 Interação da quercetina com a região de interface dos magnetolipossomas 154

5.8.3 Interação da quercetina com a região apolar dos magnetolipossomas..... 155

5.9 Estudos de magnetização das nanopartículas magnéticas e magnetolipossomas..... 159

5.10 Ensaio Biológico: MTT..... 162

5.11 Correlação entra a atividade antitumoral com as propriedades dos magnetolipossomas contendo quercetina..... 166

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 168

7 PERSPECTIVAS 172

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 173

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representações esquemáticas dos alinhamentos dos momentos magnéticos atômicos nos materiais.....7
Figura 2: Esquema de cela unitária de Fe_3O_4.....8
Figura 3: Estrutura cristalina da maghemita..... 9
Figura 4: Curva de histerese da magnetização de materiais ferrimagnético macroscópicos em função de um campo magnético externo..... 11
Figura 5: Representação do alinhamento dos spins em NPM, em comparação com os domínios magnéticos em um sólido na ausência e na presença de um campo magnético..... 13
Figura 6: Representação estrutural de uma molécula de fosfatidilcolina. 15
Figura 7: Representação esquemática da associação de fármacos hidrofílicos/ hidrofóbicos com fosfolipídios, formando os lipossomas. 20
Figura 8: Representação dos lipossomas de acordo com o tamanho e número de lamelas..... 21
Figura 9: Degradação da fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina via reação de hidrólise... 25
Figura 10: Mecanismo de lipoperoxidação em membranas lipídicas em diferentes etapas. 26
Figura 11: Estrutura química da quercetina: 3,3´,4´,5,7-pentahidroxiflavona. 32
Figura 12: Mecanismo de ação antioxidante da quercetina (envolvendo a região 3',4'-diOH flavonoides)..... 33
Figura 13: Mecanismo de ação pró-oxidante da quercetina..... 34
Figura 14: Sítios de ligação de metais de transição em uma molécula de quercetina... 35
Figura 15: Reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malonildialdeído (MDA). 37
Figura 16: Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada e os seus respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido. 38

Figura 17: Diferentes modelos conformacionais dos grupos polares da fosfatidilcolina que influenciam os valores de potencial zeta. 40
Figura 18: A) Modelo para representar a movimentação lipídica ao longo do eixo: rotação ao longo do eixo *y* (também conhecida como rotação axial, $D_{\parallel}$) e a rotação restrita ao longo do eixo ($D_{\perp}$, rotação wobble). B) Ilustração da rotação do núcleo de fósforo de um fosfolipídio em relação ao eixo da cadeia de ácido graxo. 46
Figura 19: Espectros de RMN de ^{31}P de lipossomas no estado sólido (a) e influência da fase lipídica na forma dos espectros de RMN de ^{31}P: associação de lipídios em forma de bicamada “b” e “c”, fase hexagonal “d” e micelas “e”. 48
Figura 20: Espectro de RMN de ^{1}H de a) fosfatidilcolina e b) fosfatidiletanolamina em solução de $CDCl_3$. 50
Figura 21: Esquema de transição de fase gel para líquido cristalino em membranas... 52
Figura 22: Representação esquemática de um experimento de SAXS. 55
Figura 23: Representação das diferentes etapas de preparo de magnetoliopossomas via o método de hidratação de vesículas com a adição da NPM na etapa de hidratação do filme lipídico. 60
Figura 24: Representação das diferentes etapas do método de evaporação em fase reversa com a adição da NPM durante a etapa de solubilização do fosfolipídio.... 62
Figura 25: Representação das diferentes etapas do método de evaporação em fase reversa com a adição da NPM na etapa de hidratação. 63
Figura 26: Difratograma obtido para as NPM de maghemita. 78
Figura 27: Micrografias obtidas via microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de maghemita. 79
Figura 28: Diâmetro hidrodinâmico médio (<D>) dos magnetolipossomas HV 83
Figura 29: Diâmetro hidrodinâmico médio (<D>) dos magnetolipossomas FR. 85
Figura 30: Influência das NPM nos valores de peroxidação lipídica induzida pela peroxidação basal nas amostras de magnetolipossomas em relação aos seus lipossomas-controle. 87
Figura 31: Esquema da geração de radicais livres de •OH via ação denanopartículas de óxido de ferro em ambientes com pH maior que 4,2. 89

Figura 32: Esquema do empacotamento molecular de magnetolipossomas de diferentes tamanhos: preparado pelo método de HV e pelo método FR..... 90
Figura 33: Ilustração da influência da força iônica do meio em fosfatidilcolina em água (A) e em tampão (B)..... 95
Figura 34: Espectro de infravermelho com transformada de Fourier com refletância difusa (DRIFT) das NPM de maghemita em KBr. 100
Figura 35: Espectros de HATR-FTIR e suas ampliações: Magnetolipossomas, HV(1)_NP e HV(2)_NP..... 102
Figura 36: Espectros de HATR-FTIR e suas ampliações: Magnetolipossomas, FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP e FRb(2)_NP..... 103
Figura 37: Variações de frequência e largura para a região polar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Magnetolipossomas, HV(1)_NP e HV(2)_NP..... 106
Figura 38: Espectros de RMN de ^{31}P de amostras de magnetolipossomas, HV(1)_NP e HV(2)_NP..... 107
Figura 39: Curvas referentes à relaxação longitudinal dos hidrogênios da colina (região entre 3,2-3,4 ppm) em lipossomas de ASO puro e na presença de NPM..... 109
Figura 40: Variações de frequência e largura para a região apolar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Magnetolipossomas, HV(1)_NP e HV(2)_NP..... 111
Figura 41: Tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da cadeia acil (região entre 1-2 ppm) de ASO na ausência (quadrados abertos) e na presença (círculos abertos) de NPM. Magnetolipossomas, HV(1)_NP e HV(2)_NP..... 113
Figura 42: Ampliação das curvas de DSC para magnetolipossomase seus lipossomas-controle, preparados por HV. 116
Figura 43: Esquema simplificado do efeito das NPM dos magnetolipossomas (HV1)_NP e HV(2)_NP) em relação aos seus lipossomas-controle..... 118
Figura 44: Variações de frequência e largura para a região polar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Magnetolipossomas FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP..... 121

Figura 45: Espectros de RMN de ^{31}P de magnetolipossomas preparados pelo método de evaporação em fase reversa (FR); Magnetolipossomas FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP. 123
Figura 46: Interação de moléculas de água com o grupo colina de fosfatidilcolinas. .. 125
Figura 47: Curvas referentes à relaxação longitudinal dos hidrogênios da colina (região entre 3,2-3,4 ppm) dos magnetolipossomas e lipossomas-controle, preparados pelo método de evaporação em fase reversa. 127
Figura 48: Variações de frequência e largura para a região de interface dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Magnetolipossomas FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP. 128
Figura 49: Variações de frequência e largura para a região apolar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Magnetolipossomas FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP. 130
Figura 50: Tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios do do CH_2 de magnetolipossomas. Magnetolipossomas FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP.. 131
Figura 51: Zoom das curvas de DSC para os magnetolipossomas FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP. 133
Figura 52: Esquema simplificado do efeito da NPM nos magnetolipossomas (FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP). 135
Figura 53: Dados experimentais de SAXS para as amostras de magnetolipossomas, FR(2)_NP, círculos abertos, e lipossomas-controle (FR(2), círculos fechados. ... 138
Figura 54: Esquema ilustrativo da ação antioxidante da quercetina através da formação de complexos entre quercetina-Fe quando encapsulados em magnetolipossomas 144
Figura 55: Ilustração da orientação do plano do grupo colina para acima do plano do grupo fosfato em relação ao plano da bicamada lipídica dos fosfolipídios ocasionado pela quercetina. 145
Figura 56: Espectros de HATR-FTIR e suas ampliações: Magnetolipossomas de ASO: puro (ML) e contendo quercetina (ML_QC). 150

Figura 57: Espectros de RMN de ^{31}P de magnetolipossomas de ASO puros (ML) e na presença de quercetina (ML_QC). 152
Figura 58: Curvas referentes à relaxação longitudinal dos hidrogênios da colina (-$N^{+}(CH_3)_3$, região entre 3,2-3,4 ppm no espectro de RMN ^{1}H) em magnetolipossomas de ASO na ausência (ML, quadrados) e na presença de quercetina (ML_QC, círculos). 154
Figura 59: Curvas referentes à relaxação longitudinal dos hidrogênios dos metilenos da cadeia acil (CH_2, região entre 1-2 ppm no espectro de RMN ^{1}H) em magnetolipossomas de ASO na ausência (ML, quadrados) e na presença de quercetina (ML_QC, círculos). 156
Figura 60: Curvas de DSC dos magnetolipossomas de ASO na ausência (ML) e na presença de quercetina (ML_QC). 157
Figura 61: Esquema simplificado do efeito da QC nos magnetolipossomas (sistema ML_QC) em relação aos seus controle (ML) na dinâmica molecular lipidica avaliados por diferentes técnicas instrumentais. 159
Figura 62: Curva de magnetização da NPM em pó a temperatura ambiente. 160
Figura 63: Curva de magnetização das amostras de magnetolipossomas: puros (ML) e contendo quercetina (ML_QC) a 37 °C. 161
Figura 64: Influência da quercetina nos magnetolipossomasde ASO na viabilidade celular das linhagens C6 após 24h de tratamento. 164
Figura 65: Representação esquemática da interação molecular entre a NPM/quercetina e os lipossomas de ASO preparados pelo metodo de evaporação em fase reversa. 166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes grupos que podem constituir a região polar dos fosfolipídios..... 14
Tabela 2: Exemplos de fosfolipídios com diferentes tamanhos de cadeia graxa. 16
Tabela 3: Associações e formas moleculares de diferentes fosfolipídios..... 18
Tabela 4: Denominação de cada amostra de magnetolipossomas e lipossomas–controle, de acordo com o método e condições de preparação. 64
Tabela 5: Valores de diâmetro hidrodinâmico médio (<D>) e índice de polidispersão (PDI) dos magnetolipossomas nos diferentes períodos de análise. 82
Tabela 6: Valores de potencial zeta nos magnetolipossomas e lipossomas-controle durante os diferentes tempos após o preparo. 93
Tabela 7: Determinação da concentração de NPM e percentagem de incorporação das NPM nos magnetolipossomas, através das técnicas UV-vis e HR-CS GF AAS. ... 97
Tabela 8: Valores de frequência e largura de banda e suas variações (∆) encontradas no espectro de HATR-FTIR para picos de grupos específicos do fosfolipídio presente nos magnetolipossomas e lipossomas-controle. 104
Tabela 9: Valores de largura de pico obtidos a partir dos espectros de RMN ^{31}P para os magnetolipossomas e seus lipossomas-controle. 108
Tabela 10: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) referentes aos hidrogênios da colina (deslocamentos químicos entre 3,2-3,4 ppm) para os magnetolipossomas e seus lipossomas-controle. 110
Tabela 11: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da cadeia acil (região entre 1-2 ppm) para os magnetolipossomas e seus lipossomas-controle. 114
Tabela 12: Valores de variação de entalpia (ΔH) e temperatura de transição de fase (Tm) dos magnetolipossomas e lipossomas-controle. 116
Tabela 13: Valores de turbidez obtidos a 400 nm por espectroscopia UV-vis dos magnetolipossomas e lipossomas-controle. 117

Tabela 14: Valores de largura obtidos a partir dos espectros de RMN ^{31}P dos magnetolipossomas e lipossomas-controle preparados pelo método de evaporação em fase reversa. 125
Tabela 15: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da colina dos magnetolipossomas e lipossomas-controle. 127
Tabela 16: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da cadeia acil nos magnetolipossomas e lipossomas-controle. 132
Tabela 17: Valores de variação de entalpia (ΔH) e temperatura de transição de fase (Tm) obtidos a partir dos gráficos de DSC dos magnetolipossomas e lipossomas-controle. 133
Tabela 18: Valores de turbidez obtidos, a 400 nm, dos magnetolipossomas e lipossomas-controle preparados pelo método de evaporação em fase reversa. . 134
Tabela 19: Valores dos parâmetros do modelo obtido a partir dos dados experimentais de SAXS para o magnetolipossoma, FRa(2)_NP, e lipossoma-controle, FR(2). . 139
Tabela 20: Influência da quercetina nos valores de diâmetro médio hidrodinâmico (<D>) e índice de polidispersão (PDI) dos magnetolipossomas de ASO. 141
Tabela 21: Valores de absorbância relativos a peroxidação lipídica induzida pela peroxidação basal obtidas pelo método de TBARS. 142
Tabela 22: Influência da quercetina nos valores de potencial zeta. 145
Tabela 23: Determinação da concentração de NPM e percentagem de incorporação, I%, nas amostras de magnetolipossomas puros(ML) e contendo quercetina (ML_QC), através da técnica de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização em chama (HR-CR FAAS). 146
Tabela 24: Determinação da concentração e do percentual de eficiência de encapsulamento (EEq%) de quercetina, nas amostras de magnetolipossomas, através da técnica de espectroscopia UV-vis. 148
Tabela 25: Valores de frequência e largura de banda e suas variações (∆) encontradas no espectro de HATR-FTIR para picos de grupos específicos do fosfolipídio presente nos magnetolipossomas puros (ML) e contendo quercetina (ML_QC). 150

Tabela 26: Influência da quercetina nos magnetolipossomasde ASO nos valores de largura obtidos a partir dos espectros de RMN ^{31}P. 153
Tabela 27: Influência da quercetina nos valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da colina ($N^+(CH_3)_3$, região entre 3,2-3,4 ppm) nos magnetolipossomas. 154
Tabela 28: Influência da quercetina nos valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da cadeia acil (CH_2, região entre 1-2 ppm no espectro de RMN ^1H) nos magnetolipossomas de ASO. 156
Tabela 29: Influência da quercetina nos valores de variação de entalpia (ΔH) e temperatura de transição de fase (T_m) nos magnetolipossomas de ASO. 158
Tabela 30: Influência da quercetina nos valores de turbidez, medida a 400 nm, nos magnetolipossomas de ASO. 158

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. ASO, asolecitina de soja.
2. CSA, anisotropia do deslocamento químico, do *inglês chemical shift anisotropy*.
3. C6, linhagens celulares de glioma de rato.
4. DLS, espalhamento de luz dinâmico, do inglês *dynamic light scattering*.
5. DMPC, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina, do inglês *1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*.
6. DMEM, meio Dulbecco MEM, do inglês *Dulbecco's modified eagle's medium*.
7. DOPC, 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina, do inglês *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine.*
8. DPPC, 1,2-dipamiltoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina, do inglês *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine.*
9. DRX, difração de raios-X.
10. DSC, calorimetria de varredura diferencial, do inglês *differential scanning calorimetry*.
11. DSPC, 1,2-distearoil-sn-glicerl-3-fosfatidilcolina, do inglês *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*.
12. DSPE, 1,2-distearoil-sn-glicerl-3-fosfatidiletanolamina, do inglês *1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine.*
13. ERMOS, espécies reativas do metabolismo do oxigênio.

14. FR, evaporação em fase reversa.

15. FTIR, infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared*.

16. H, campo magnético aplicado.

17. H_c, campo magnético coersivo.

18. H_I, fase hexagonal.

19. H_{II}, fase hexagonal invertida.

20. HATR-FTIR, infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada horizontal, do inglês *horizontal attenuated total reflectance Fourier transform infrared*.

21. HR-CS GF AAS, espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com forno de grafite, do *inglês hight resolution continuum source grafite furnace atomic abortion spectrometry*.

22. HV, hidratação de vesículas.

23. I%, percentagem de incorporação.

24. LNLS, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron.

25. LUVs, vesículas unilamelares grandes, do inglês *large unilamellar vesicles*.

26. MDA, malonildialdeído.

27. MET, microscopia eletrônica de transmissão.

28. MLVs, vesículas multilamelares grandes, do inglês *multilamellar large vesicles*.

29. M_r, magnetização remanescente.

30. M_s, magnetização de saturação.
31. MTT, 3-(4,5-dimetiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio de brometo, do inglês *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*.
32. NP, nanopartículas.
33. NPM, nanopartículas magnéticas.
34. RMN, ressonância magnética nuclear, do inglês *ressonance magnetic nuclear*.
35. SAXS, espalhamento de raios-X a baixo ângulo, do *inglês small angle x-ray scattering*.
36. SFB, soro fetal bovino.
37. SUVs, vesículas unilamelares pequenas, do inglês *small unilamellar vesicles*.
38. T_1, tempo de relaxação longitudinal.
39. TBA, ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid*.
40. TBARS, substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*.
41. T_m, temperatura de transição de fase.
42. UV-vis, ultravioleta-visível.
43. VSM, magnetometria de amostra vibrante.
44. ΔH, variação de entalpia.
45. ΔG, energia livre de Gibbs.
46. ν_s, estiramento axial simétrico.

47. ν_{as}, estiramento axial assimétrico.

48. γ-Fe_2O_3, maghemita.

49. χ, susceptibilidade magnética.

RESUMO

Título: PREPARO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MAGNETOLIPOSSOMAS PARA APLICAÇÃO COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FÁRMACO

Autor: Sandra Cruz dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Vania Rodrigues de Lima

Co-orientador: Alexandre Luiz Parise

Este estudo objetivou investigar o efeito de dois métodos de preparo de magnetolipossomas na sua estabilidade e propriedades físico-químicas, variando-se o solvente, força iônica e afinidade por polaridade. Com este fim, magnetolipossomas constituídos de asolecitina de soja (ASO) e nanopartículas magnéticas (NPM) de maghemita (γ-Fe_2O_3) foram preparados pelos métodos de hidratação de vesículas (HV) e evaporação em fase reversa (FR) e investigados através do uso das seguintes técnicas: espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), difração de raios-X (DRX), espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis), espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada horizontal (HATR-FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). No magnetolipossoma considerado mais estável, foi estudada sua interação com um fármaco-modelo, a quercetina, bem como investigadas suas propriedades magnéticas e seu efeito na viabilidade celular de células de glioma. O método de FR proporcionou a obtenção de magnetolipossomas de tamanhos menores e estáveis por um maior período que os sistemas preparados pelo método de HV. Em geral, a presença de tampão tricina/ $MgCl_2$ pH 7,4 reduziu o tamanho e diminuiu a ordem do sistema lipossomal. A etapa de adição da NPM influenciou na percentagem de incorporação (I%) das mesmas nos magnetolipossomas, mas não influenciou no

tamanho, estabilidade e dinâmica dos sistemas. Estes parâmetros foram afetados pela presença de tampão. A inserção da quercetina (fármaco-modelo) nos magnetolipossomas reduziu a I% de NPM em 11%. A quercetina reduziu discretamente a magnetização de saturação dos magnetolipossomas, mas não afetou o comportamento superparamagnético. Os resultados de FTIR, RMN e DSC mostraram que a quercetina desordenou as regiões de interface e apolar dos magnetolipossomas e ordenou a região polar. O encapsulamento da quercetina nos magnetolipossomas ocasionou uma redução da peroxidação lipídica e da viabilidade celular de glioma. Assim, a produção de magnetolipossomas de ASO/ maghemita/ quercetina, através de um método simples, gerou um sistema estável e superparamagnético, viável para uso como carreador ou sistema de liberação prolongada de fármaco.

PALAVRAS-CHAVE: magnetolipossomas, maghemita, asolecitina, hipertermia.

ABSTRACT

Title: PREPARATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF MAGNETOLIPOSOMES FOR APPLICATION AS PROLONGED DRUG DELIVERY SYSTEMS

Author: Sandra Cruz dos Santos

Advisor: Prof. Dr. Vania Rodrigues de Lima

Co-advisor: Alexandre Luiz Parise

This study aimed to investigate the effect of two methods of preparation of magnetoliposomes on their stability and physicochemical properties, varying the solvent, ionic strength and affinity by polarity. To this end, magnetoliposomes consisting of soybean asolectin (ASO) and maghemite magnetic nanoparticles (NPM) were made by the methods of vesicle hydration (VH) and reverse phase evaporation (RP) and investigated by the following techniques: high resolution continuum source atomic abortion spectrometry (HR-CS AAS), X-ray diffraction (DRX), ultraviolet-visible spectroscopy (UV-vis), dynamic light scattering (DLS), zeta potential, horizontal attenuated total reflectance Fourier transform infrared (HATR-FTIR) spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR), differential scanning calorimetry (DSC) and small-angle X-ray scattering (SAXS). In the magnetoliposomes considered to be more stable, their interaction with a model drug, quercetin, was investigated, as well as their magnetic properties and effect on cell viability of glioma. The RP method provided smaller stable magnetoliposomes for a longer period than magnetoliposomes prepared by the VH method. In general, the presence of tricine/$MgCl_2$ pH 7.4 buffer reduced the size and decreased the order of the system. The MNP addition step influenced the incorporation percentage (I%) in the magnetoliposomes but did not influence the size, stability or dynamics of the systems.

These parameters were affected by the presence of the buffer. The insertion of quercetin into the magnetoliposomes reduced the I% of the NPM by 11%. Quercetin discreetly reduced the magnetization saturation from magnetoliposomes but did not affect superparamagnetic behavior. The results of FTIR, NMR and DSC showed that quercetin disoriented the interface and apolar regions and ordered the polar region of the magnetoliposomes. The encapsulation of quercetin in the magnetoliposomes caused a reduction of lipid peroxidation and the cell viability of glioma. Thus, the production of ASO/maghemite/quercetin magnetoliposomes, through a simple method, generated a stable and superparamagnetic system, which can enable the use of the magnetoliposomes as a carrier or prolonged drug release system.

KEYWORDS: magnetoliposomes, maghemite, asolectin, hypertermia.

1. INTRODUÇÃO

O uso de nanopartículas (NP) em sistemas de administração de fármacos, visando o transporte e a vetorização a tecidos específicos, tem sido de grande interesse no tratamento do câncer (Donaldson, 2006; Knudsen *et al.*, 2015). As nanopartículas magnéticas (NPM) apresentam propriedades elétricas, ópticas, magnéticas e químicas que favorecem seu uso em diferentes aplicações, tais como, transporte magnético de complexos bioquímicos e imagem de ressonância magnética (Francisquini *et al.*, 2012; Hosni *et al.*, 2017).

O uso de NPM é destacado devido à suas propriedades de elevada área superficial, capacidade de passar através da membrana celular e sua retenção no tecido tumoral (Garcia-Jimeno *et al.*, 2012; Hardiansyah *et al.*, 2014). Com o tamanho reduzido as NPM conseguem penetrar em pequenos capilares onde são capturadas por células, acumulando-se eficientemente em órgãos específicos (Pankhurst *et al.*, 2003). Assim, através da aplicação de um campo magnético externo, podem atuar como agentes indutores de hipertermia, através do aumento da temperatura local nas células tumorais (Hayashi *et al.*, 2010; Hardiansyah *et al.*, 2014).

Neste contexto, o uso de NPM em sistemas superparamagnéticos tem sido vantajoso, por esses não apresentarem magnetização residual. Após a remoção do campo magnético esses materiais tornam-se desmagnetizados, não atingindo, ou, atingindo minimamente, as células saudáveis (Acar *et al.*, 2005; Akal *et al.*, 2016b).

Apesar da baixa toxicidade das NPM de maghemita, quando comparadas a outros sistemas magnéticos (Prodan *et al.*, 2013), esses materiais apresentam como tendência a formação de agregados. Com o objetivo de evitar a agregação, as NPM podem ser revestidas por polímeros, dextran, proteínas, ácidos graxos ou fosfolipídios (Floris *et al.*, 2014). A incorporação de NPM em lipossomas, vesículas lipídicas, geran-

do os magnetolipossomas, possibilita maior eficiência, biocompatibilidade e vetorização de fármacos (Bixner e Reimhult, 2016).

Os magnetolipossomas, por apresentarem propriedades magnéticas têm sido aplicados em imunoensaios, marcação celular, no diagnóstico de células cancerígenas, através de imagens por ressonância magnética, bem como, no tratamento do câncer (Laurent *et al.*, 2010; Akbarzadeh *et al.*, 2012).

No entanto, a estabilidade dos magnetolipossomas ainda é um desafio para o seu design, uma vez que eles são suscetíveis a peroxidação das membranas. Esta pode ser induzida por íons metálicos presentes nas NPM, como ferro e cobre (Kiwada *et al.*, 1986; Fagali e Catala, 2009). Neste contexto, a quercetina pode ser utilizada para prevenir a oxidação dos magnetolipossomas. Este flavonoide também apresenta ação antitumoral (Wong e Chiu, 2011; Chakraborty *et al.*, 2012; Patir *et al.*, 2012) e a sua encapsulação em membranas lipídicas facilita a sua entrega nas células alvo (Takagi *et al.*, 1998; Hirpara *et al.*, 2009).

Apesar do extenso conhecimento documentado sobre a interação da quercetina com os lipossomas, existem poucas informações sobre o comportamento do flavonoide nos magnetolipossomas. É relatado que NPM conjugadas com quercetina apresentam uma ação anticancerígena promissora (Barreto *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2014; Akal *et al.*, 2016a; b). Assim, considerando a susceptibilidade à peroxidação dos magnetolipossomas e a promissora atividade antitumoral da associação entre a quercetina e as NPM, torna-se importante caracterizar esses sistemas no contexto de interações moleculares e atividades oxidantes e antitumorais.

A farmacodinâmica e a farmacocinética dos sistemas de administração de fármacos baseados em lipossomas, tais como, os magnetolipossomas, são definidas por suas características de tamanho, morfologia e carga superficial, todas refletidas pela dinâmica e interações de conteúdo molecular (Sen *et al.*, 2010).

Caracterizar os parâmetros do sistema, como estabilidade, percentagem de incorporação (I%) e propriedades físico-químicas, como localização da NPM, tamanho, carga superficial, morfologia, estados e transições de fases, ordem e mobilidade, grau de hidratação, variação de entalpia e magnetização é fundamental para o design e aplicação eficiente dos magnetolipossomas em terapias contra doenças, como o câncer (Guo *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016).

O método utilizado para o preparo de magnetolipossomas pode influenciar em nos seus parâmetros físico-químicos, principalmente ao considerar variáveis, como tamanho, solvente, força iônica e afinidade por polaridade dos compostos (Montero *et al.*, 1998; Bermudez *et al.*, 1999).

Assim, a partir das informações descritas acima, este estudo objetivou investigar o efeito de dois métodos de preparo básicos de magnetolipossomas, em diferentes condições (solvente, força iônica e afinidade por polaridade) na estabilidade, I% das NPM e nas propriedades físico-químicas do sistema. Com este fim, magnetolipossomas constituídos de asolecitina de soja (ASO) e NPM de maghemita (γ-Fe_2O_3) foram preparados pelos métodos de hidratação de vesículas (HV) e evaporação em fase reversa (FR) e investigados através do uso das seguintes técnicas: espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), difração de raios-X (DRX), espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis), espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada horizontal (HATR-FTIR), ressonância magnética nuclear de fósforo e de hidrogênio (RMN de ^{31}P e de ^{1}H), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

A interação do magnetolipossoma mais estável com um fármaco-modelo (a quercetina) também foi estudada. Nestes sistemas, além dos estudos citados anteriormente, foram realizados ensaios de magnetização, para comparar o tipo de magnetização obtida com respostas detectadas em NPM em solução, e ensaios *in vitro* para in-

vestigar o efeito da quercetina na viabilidade celular das linhagens de glioma através de ensaio de viabilidade celular.

Diante da grande aplicabilidade dos magnetolipossomas, cabe mencionar que caracterizações físico-químicas detalhadas em nível molecular destes sistemas ainda são pouco descritas na literatura, principalmente considerando fontes lipídicas naturais como material componente dos magnetolipossomas. Assim, a partir dos resultados obtidos, este trabalho pretende contribuir com um banco de informações para o design, preparo e maior eficiência dos magnetolipossomas a serem usados na terapia antitumoral.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para um maior entendimento sobre os assuntos abordados na introdução deste trabalho, a revisão bibliográfica desta Tese abordará informações sobre os magnetolipossomas, quercetina, assim como, as técnicas instrumentais que podem ser utilizadas para a determinação da I% das NPM, estabilidade e propriedades físico-químicas dos magnetolipossomas.

2.1 Constituintes dos magnetolipossomas

2.1.1 Nanopartículas magnéticas

As NPM são materiais de ordem nanométrica (10^{-9} m) e apresentam propriedades elétricas, ópticas, magnéticas e químicas que favorecem seu uso em diferentes aplicações, tais como: microeletrônica, memória magnética, transporte magnético de complexos bioquímicos e imagem de ressonância magnética (Hosni *et al.*, 2017). Por serem magnéticos, estes materiais apresentam como grande vantagem à possibilidade de serem manipulados por um campo magnético externo (Lieber, 1998).

2.1.1.1 Magnetismo

As propriedades magnéticas macroscópicas de um material são oriundas dos momentos magnéticos associados a cada elétron desse material. Há dois tipos de movimentos do elétron, o movimento orbital e movimento de spin, e cada um destes tem um momento magnético associado, sendo estes: (i) o momento magnético orbital, associado ao movimento do elétron em torno do núcleo atômico, e (ii) o momento magnético de spin, associado ao giro do elétron em torno do seu próprio eixo. Para um átomo

que possui vários elétrons, o momento magnético do átomo é a soma vetorial de todos os momentos magnéticos eletrônicos (Cullity e Graham, 2008).

As propriedades magnéticas dos materiais decorrem de um somatório de dipolos magnéticos intrínsecos devidos ao spin do elétron, pois este movimento cria um dipolo magnético próprio.

O magnetismo é o fenômeno físico que consiste nas forças de atração e repulsão exercidas por materiais devido a presença de cargas elétricas em movimento. O comportamento dos materiais magnéticos em um campo magnético externo é determinado pela origem e natureza da interação de seus dipolos (Cullity e Graham, 2008).

Se um material magnético é exposto a um campo magnético externo, *H*, os momentos magnéticos atômicos individuais no material se alinham contribuindo para a sua resposta ao campo magnético B_0, isso resultará em um campo magnético induzido *B*, conforme a Equação 1.

$$B = \mu_0(H + B_0) \qquad \text{Eq. 1}$$

Onde μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo e é equivalente a $4\pi \times 10^{-7}$ T m A^{-1} (Landee e Turnbull, 2014).

A magnetização (*M*) de um material é definida como a soma de todos os momentos magnéticos elementares (m_i) por unidade de volume (*V*), e pode ser representada na Equação 2.

$$M = \sum_i^n \frac{m_i}{V} \qquad \text{Eq. 2}$$

A intensidade de *M* é proporcional ao campo aplicado (*H*) e a susceptibilidade magnética (χ):

$$M = \chi \mathrm{H} \qquad \text{Eq. 3}$$

A χ mensura a capacidade de um material em magnetizar-se sob a ação de um estímulo magnético ao qual este é submetido, descrevendo, assim, o comportamento magnético dos materiais.

Segundo o tipo de magnetização, quando submetidos a um campo magnético externo, os materiais podem ser classificados em diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos e antiferromagnéticos (Callister Jr., 2012). A Figura 1 apresenta os diferentes tipos de comportamentos magnéticos segundo o alinhamento dos spins eletrônicos.

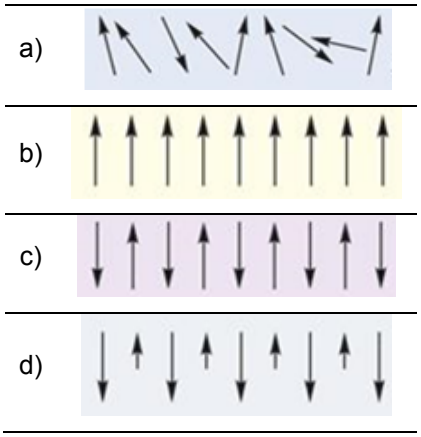


Figura 1: Representações esquemáticas dos alinhamentos dos momentos magnéticos atômicos nos materiais: a) diamagnéticos e paramagnéticos; b) ferromagnéticos; c) antiferromagnéticos; d) ferrimagnéticos.

Os materiais paramagnéticos e diamagnéticos, sob a ação de um campo, apresentam magnetização proporcional à estimulação magnética aplicada. Nesses materiais, quando o campo magnético é removido a magnetização desaparece (Francisquini *et al.*, 2012). Por outro lado, materiais ferromagnéticos, como ferro, níquel e cobalto apresentam valores altos de χ (>>1) e o campo de magnetização se mantém quando se remove o campo aplicado.

Nos materiais ferrimagnéticos (ferritas, magnetitas, em geral óxidos metálicos) os átomos possuem momentos de dipolo permanentes que interagem entre si, causando alinhamento antiparalelo e desigual. Na presença de um campo magnético externo, alinham-se na direção e sentido do campo aplicado, apresentando valores altos e positivos de χ entre, 10^{-2} e 10^{6} (Francisquini *et al.*, 2012).

Os óxidos de ferro são um dos minerais mais importantes encontrados na natureza (Yang et al, 2006). A magnetita é um mineral ferrimagnético presente em rochas ígneas, sedimentares e metamórficas. Sua fórmula química é Fe_3O_4, sendo dois íons de Fe^{3+} e um íon de Fe^{2+}. A magnetita apresenta estrutura espinélio inversa formando uma rede cúbica de face centrada, Figura 2 (Yamauchi e Barone, 2014). A cela unitária é formada por um conjunto de quatro unidades. Cada cela é composta por sítios tetraédricos e sítios octaédricos. Nos sítios tetraédricos encontramos oito íons de Fe^{3+} cada um fazendo ligações com quatro íons de oxigênio na forma de tetraedros e nos sítios octaédricos encontramos 16 íons de ferro (8 Fe^{2+} e 8 Fe^{3+}), cada íon fazendo ligações com 6 íons de oxigênio na forma de octaedros (Francisquini *et al.*, 2012).

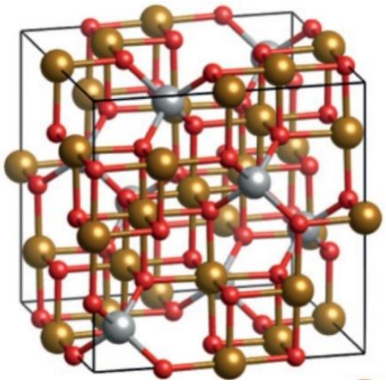


Figura 2: Esquema de cela unitária de Fe_3O_4. Círculos cinzas e marrons representam cátions em coordenação tetraédrica (sítio A) e octaédrica (sítio B), respectivamente, com os íons de O^{2-} (círculos vermelhos). Adaptado da Ref Yamauchi e Barone (2014).

A maghemita (γ-Fe_2O_3), a forma oxidada da magnetita (Fe_3O_4), é um material ferrimagnético. A letra γ é usada para diferenciá-la da hematita, a qual apresenta a mesma fórmula química. Este material apresenta como forma cristalina uma estrutura cúbica de espinélio inverso formando uma rede cúbica de face centrada. Cada célula unitária (cúbica) da maghemita contém uma média de 32 íons O^{2-}, 21,33 íons Fe^{3+} e 2,66 vacâncias, sendo que os cátions estão distribuídos em 8 e 16 sítios tetraédricos e octaédricos, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2013). Os ânions de oxigênio (raio ≈ 0,13 nm) apresentam empacotamento cúbico de face centrada, e os íons metálicos (raios entre 0,07 a 0,08 nm) ocupam os espaços entre os ânions. Há 2 tipos distintos de espaços: o sítio A (tetraédrico) e o sítio B (octaédrico), conforme representado na Figura 3.

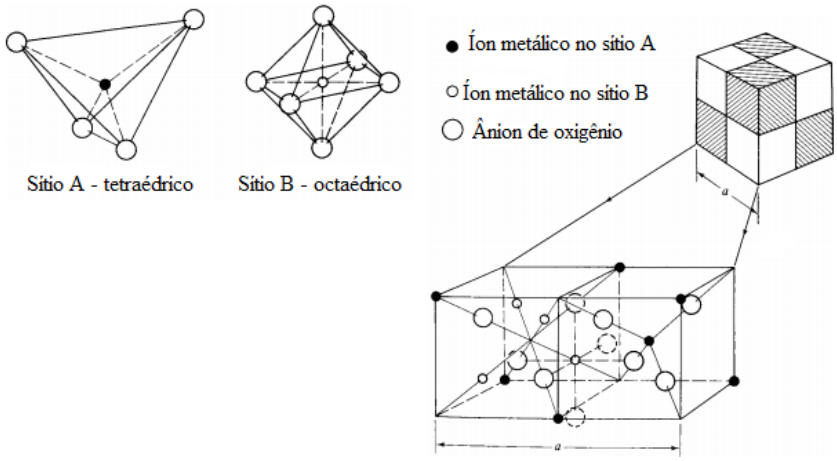


Figura 3: Estrutura cristalina da maghemita. Adaptado de Cullity e Graham (2009).

Devido à presença de íons de ferro, a maghemita apresenta elétrons desemparelhados, cujos momentos magnéticos estão acoplados de tal forma que resultam em uma magnetização espontânea, ou seja, possuem um momento magnético total não nulo na ausência de um campo magnético externo. A presença de vacâncias nos sítios octaédricos que geram um cancelamento incompleto dos momentos magnéticos anti-

paralelos dos sítios tetraédricos e octaédricos são responsáveis pelo comportamento ferrimagnético deste material (Oliveira *et al.*, 2013).

2.1.1.2 Curvas de histerese

A histerese é a tendência de um sistema de conservar suas propriedades na ausência de um estímulo que as gerou, ou ainda, é a capacidade de preservar uma deformação efetuada por um estímulo. A histerese magnética é o fenômeno que causa o atraso entre a densidade de fluxo e o campo magnético (Vajda e Dellatorre, 1993). O ciclo traçado por esta curva de magnetização é denominado curva de histerese e fornece o comportamento da magnetização do material em função do campo magnético aplicado.

A Figura 4 mostra o comportamento da curva de magnetização da maghemita, tipicamente ferrimagnética, em função do campo magnético externo aplicado (B) (Cullity e Graham, 2008).

O anel de magnetização “abcdefa” é conhecido como curva de histerese. Inicialmente, ao aplicar um campo magnético ao material desmagnetizado, o mesmo irá aumentar sua magnetização em função do aumento do campo até chegar ao ponto “a”. Nesse instante, o material está magnetizado com os momentos magnéticos dos domínios orientados na mesma direção do campo. Nesse ponto, a magnetização do material atinge um valor máximo (magnetização de saturação, M_s).

Quando o campo magnético é reduzido a zero (sentido “a-b” da curva), ocorre uma diminuição da magnetização do material, porém ainda existe uma magnetização, denominada como magnetização remanescente, M_r, ponto “b” da curva. Para que a magnetização do material chegue a zero, é necessário a aplicação de um campo no sentido oposto ao inicial (denominado campo coercitivo, representado pelo ponto “c” da curva). À medida que este campo é aumentado, o material passa novamente a apre-

sentar uma M_s (ponto “d” da curva) e após a remoção do campo magnético, o material volta a apresentar uma M_r (ponto “e” da curva).

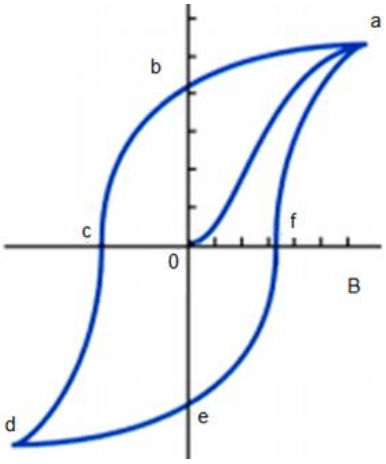


Figura 4: Curva de histerese da magnetização de materiais ferrimagnético macroscópicos em função de um campo magnético externo (B). Adaptado de Cullity e Graham (2008).

A razão entre a M_r e a M_s indica o fator de quadratura, ou seja, o quanto a forma do *loop* de histerese se aproxima de um retângulo (Hertel, 2001). Por fim, a curva segue o sentido “efa” até fechar o anel após a aplicação de um campo magnético no mesmo sentido do campo inicial (Cullity e Graham, 2008).

2.1.1.3 Magnetismo aplicado às nanopartículas

As NPM apresentam propriedades diferentes dependentes do tamanho, morfologia e estrutura cristalina. Em uma escala nanométrica, a área da superfície aumenta drasticamente, o que irá apresentar um novo material com propriedades físicas diferenciadas em comparação ao mesmo em tamanho maior (Yadollahpour e Hosseini, 2016).

As principais características das NPM responsáveis por torná-las potencialmente importantes na aplicação tecnológica são: a formação de monodomínios magnéticos (resultantes a partir do confinamento quântico dos elétrons), a existência de grande área superficial em relação ao volume e a possibilidade de recobri-las com diversos tipos de ligantes específicos (Lu *et al.*, 2007; Francisquini *et al.*, 2012).

Um dos benefícios da utilização de NPM é o uso de gradientes de campo magnético para atrair as partículas para um determinado local, onde as mesmas permanecem durante a terapia (Barreto *et al.*, 2011). Como uma alternativa aos campos magnéticos, pode-se explorar algumas propriedades das NPM, como o tamanho e a superfície, a fim de se conseguir um direcionamento ao tecido-alvo (Buschow, 1995). Nesse sentido, as NPM têm sido avaliadas no uso de tratamento por magnetohipertermia. Este procedimento terapêutico se baseia na elevação da temperatura das células de uma região específica do corpo que estejam afetadas por um tumor. Nesse tipo de tratamento, as NPM são fagocitadas pelas células tumorais e um campo magnético alternado externo é utilizado para promover a agitação das nanopartículas e consequente aquecimento da célula (Orozco-Henao *et al.*, 2016).

Os materiais, quando em escala macroscópica, apresentam diversos multidomínios, sendo que estes, quando exposto a um campo magnético, não sofrem um alinhamento completo. Porém, quando os materiais ferro e ferrimagnéticos se encontram na dimensão nanométrica, pode ser observado um comportamento magnético relacionado ao superparamagnetismo (Tasca *et al.*, 2015). Na Figura 5 está apresentada uma ilustração dos momentos magnéticos em um material superparamagnético.

O superparamagnetismo é observado quando as partículas dos materiais se encontram abaixo de um volume crítico, no qual são consideradas como um monodomínio magnético (Tasca *et al.*, 2015). Com a diminuição do tamanho de partícula, abaixo do valor crítico, a formação de domínios torna-se energeticamente desfavorável e o domínio magnético pode coincidir com o diâmetro da NPM.

Em uma partícula monodomínio, a mudança na orientação da magnetização ocorre através de uma rotação coerente dos spins onde os momentos magnéticos se alinham completamente na direção do campo (Tasca *et al.*, 2015). Nesse caso, o fenômeno de histerese magnética não existe e os valores de M_r e coercividade (campo necessário para trazer a magnetização a zero, H_c) são nulos (Lu *et al.*, 2007; Martins e Trindade, 2012).

As NPM de maghemita com diâmetros inferiores a 10 nm são superparamagnéticas à temperatura ambiente (Mahmoudi *et al.*, 2011). Nesse caso, a magnetização das NPM cresce com o aumento do campo aplicado até atingir um ponto de saturação. Nesse ponto, a magnetização torna-se independente do campo e proporciona uma excelente medida do caráter magnético das NPM através dos dados de M_s.

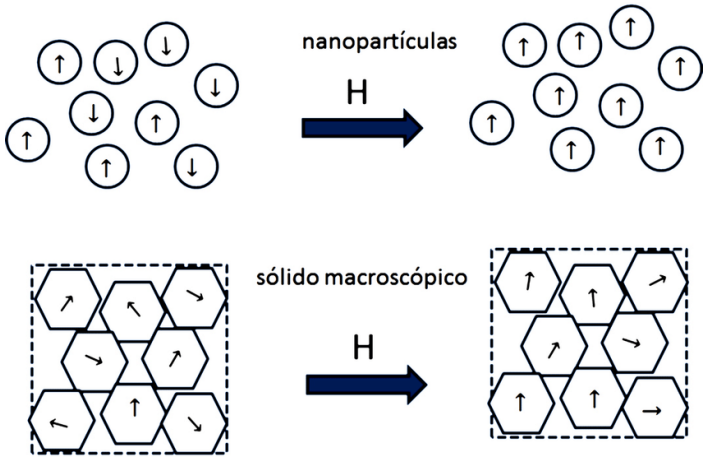
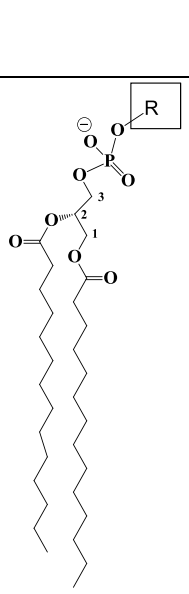
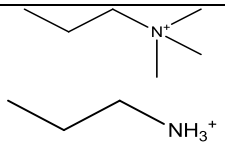
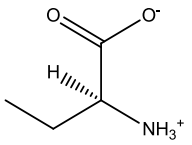
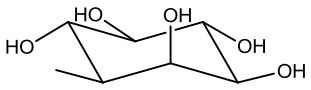


Figura 5: Representação do alinhamento dos spins em NPM, em comparação com os domínios magnéticos em um sólido na ausência e na presença de um campo magnético, *H*. Adaptado de Tasca e colaboradores (2015).

2.1.2 Fosfolipídios

Os fosfolipídios são moléculas anfipáticas, que possuem duas regiões distintas: uma hidrofílica constituída de um grupo fosfato, e uma região hidrofóbica, constituída de ácidos graxos com longas cadeias de hidrocarbonetos (Li *et al.*, 2015). A estrutura molecular dos glicerofosfolipídios, uma das classificações dos fosfolipídios, corresponde basicamente a uma molécula de glicerol (1,2,3-propanotriol) a qual encontra-se esterificada a dois ácidos graxos nos carbonos 1 e 2, e a um grupo fosfato no carbono 3 (Tabela 1).

Tabela 1: Diferentes grupos que podem constituir a região polar dos fosfolipídios. Adaptado de Li e colaboradores (2015).

	Grupo
	Colina
	Etanolamina
	Serina
	Ácido fosfatídico
	Inositol

As numerações indicadas referem-se aos três carbonos pertencentes ao grupo glicerol (1,2,3-propanotriol).

O grupo fosfato de uma moléculas de fosfolipídio, por sua vez, é também esterificado a um grupo alcoólico: este último pode ser simplesmente uma hidroxila (OH), ou

grupos de maior complexidade tais como, colina, etanolamima, serina, ácido fosfatídico e inositol (Li *et al.*, 2015). Esses diferentes grupos, que podem ser neutros ou carregados, afetam o potencial da superfície da membrana e fornecem locais de ligação para os íons a partir da solução (Yeagle *et al.*, 1977).

A fosfatidilcolina, Figura 6, é um glicerofosfolipídio majoritário da membrana celular (Ohvo-Rekila *et al.*, 2002). Isto viabiliza o seu uso em sistemas carreadores de fármaco, devido à sua biocompatibilidade. Além disso, as fosfatidilcolinas são as mais empregadas em estudos de formulação de lipossomas, pois apresentam grande estabilidade frente a variações de pH ou da concentração de sal no meio (Batista *et al.*, 2007). Estes fosfolipídios possuem uma parte polar constituída por um grupo colina ($N^+(CH_3)_3$ e por um grupo fosfato $(PO_2)^-$ e duas cadeias de ácidos graxos de extensão similar entre si.

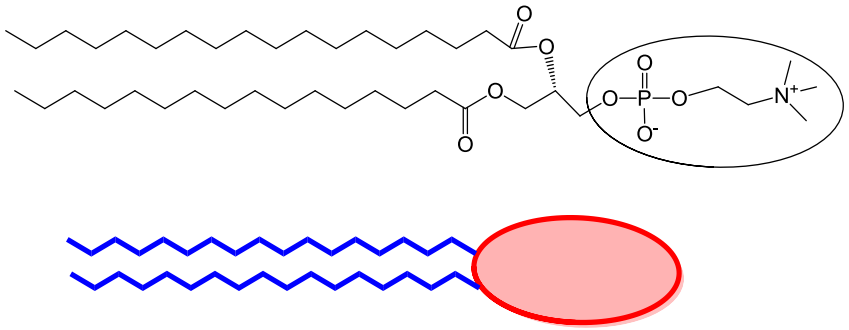


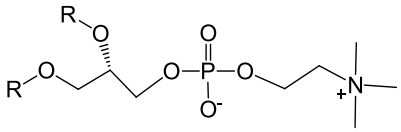
Figura 6: Representação estrutural e esquemática de uma molécula de fosfatidilcolina.

Por apresentar uma cabeça polar com uma carga positiva e outra negativa, as fosfatidilcolinas são moléculas classificadas como anfóteras ou zwiteriônicas (Pasenkiewicz-Gierula *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2015). Dois tipos de interações podem ocorrer entre os grupos polares dessas moléculas. Uma é a formação de ligações cruzadas (cross-linked) entre os grupos negativamente carregados de duas moléculas de fosfatidilcolina com um hidrogênio da molécula de água. Nesse caso, aproximadamente

70% das moléculas de fosfatidilcolinas formam ligações cruzadas com hidrogênio que estão contidos em clusters de duas a sete moléculas de água (Pasenkiewicz-Gierula *et al.*, 1999). Outra forma é a interação intermolecular entre uma porção de N-metil carregada positivamente e o grupo fosfato (negativo) de um fosfolipídio vizinho (Yeagle *et al.*, 1977).

Com relação à região apolar dos fosfolipídios, o comprimento das cadeias conduz a diferentes glicerofosfolipídios: dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e distearoilfosfatidilcolina (DSPC), Tabela 2. Em geral, uma das cadeias dos ácidos graxos dos fosfolipídios apresenta-se saturada, enquanto a outra costuma possuir de uma a seis duplas ligações (Ohvo-Rekila *et al.*, 2002).

Tabela 2: Exemplos de fosfolipídios com diferentes tamanhos de cadeia graxa.

Fórmula estrutural	R (cadeia hidrofóbica) (nome)	Abreviação (quando ligado a fosfatidilcolina)
Fosfolipídio 	CH_3-$(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_7$-C(O)- (oleoil)	DOPC
	CH_3-$(CH_2)_{12}$-C(O)- (miristoil)	DMPC
	CH_3-$(CH_2)_{14}$-C(O)- (palmitoil)	DPPC
	CH_3-$(CH_2)_{16}$-C(O)- (estearoil)	DSPC

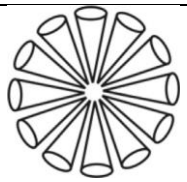
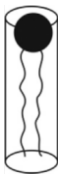
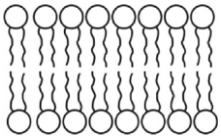
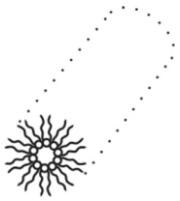
As abreviaturas são: dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e distearoilfosfatidilcolina (DSPC).

As propriedades biológicas e físico-químicas, tais como, a velocidade de lipoperoxidação por espécies reativas, estado de fase e permeabilidade podem ser influenciadas pelo grau de insaturação e o comprimento da cadeia lateral das fosfatidilcolinas (Mclean e Hagaman, 1992; Li *et al.*, 2015). Por exemplo, fosfolipídios com ligações insaturadas em conformação trans, apresentam conformação semelhante à dos ácidos graxos saturados, o que favorece as interações intermoleculares e a rigidez da membrana. Por sua vez a presença de ligações insaturadas na conformação do tipo cis, na qual as cadeias hidrocarbônicas apresentam "inclinações" nas regiões dessas insaturações, o que reduz as interações intercadeias, contribui para a fluidez do sistema (Ziblat *et al.*, 2012).

2.1.2.1 Polimorfismo e estado de fase dos fosfolipídios

Os fosfolipídios podem se associar de diferentes formas, tais como micelas (na forma de fase hexagonal, H_I), bicamadas (em fase lamelar) e micelas reversas (em fase hexagonal invertida, H_{II}). Essas diferentes formas de associações estão atribuídas às distintas formas e áreas moleculares dos fosfolipídios. As associações e formas moleculares de diferentes fosfolipídios em água estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3: Associações e formas moleculares de diferentes fosfolipídios. Adaptado de Lasic (1998).

Fosfolipídio	Forma molecular	Organização	Fase
Lisofosfolipídio	Cone invertido	 Micelas	Hexagonal
Fosfatidilcolina, fosfatidil-serina, fosfatidilinositol, esfingomielina, ácido fosfatídico	 Cilindro	 Bicamadas	Lamelar (cúbica)
Fosfatidiletanolamina, colesterol	Cone	 Micelas reversas	Hexagonal invertida

A compreensão dos polimorfismos lipídicos é necessária para estabelecer um transportador estável e um sistema de liberação controlada adequado. Além de ser influenciada pela distintas formas e áreas moleculares dos fosfolipídios, a forma de organização lipídica pode ser modulada por fatores como a temperatura, a insaturação de hidrocarbonetos, a força iônica, o pH, a incorporação de moléculas de cone invertidas (por ter área da região polar maior que a apolar) e a presença de cátion divalentes, tais como, Ca^{2+} (Cullis *et al.*, 1986). São exemplos:

a) A pequena área correspondente à região polar da fosfatidiletanolamina, juntamente ao grau de insaturação e comprimento da cadeia acil, conduzem a uma forma molecular de cone, permitindo uma organização em fase H_{II} (Cullis *et*

al., 1986). Tal fase consiste em arranjos cilíndricos de lipídios, dispostos ente si em ângulos de 60°, com um núcleo hidrofílico (Verkleij, 1984).

b) A fosfatidiletanolamina quando em mistura com a fosfatodilserina que se associa na forma de bicamada (um fosfolipídio que tem uma forma parecida com um cilindro, por ter a região apolar semelhante a polar) pode ser estabilizada em estrutura de bicamada. Para que a associação em forma de bicamada seja efetiva, é necessario que a mistura lipídica apresente 20 a 50% de concentração molar de lipídios que se associem nesta forma (Li *et al.*, 2015).

c) A hidratação da região polar pode modular os polimorfismos. Para fosfatidiletanolamina, a redução do grau de hidratação ou o aumento da força iônica intensifica a organização em fase H_{II} (Li *et al.*, 2015).

d) No caso do ácido fosfatídico, uma elevada concentração de sal no meio propicia uma organização em fase H_{II} (Tilcock, 1986);

e) A fase H_{II} também é favorecida através da protonação da carboxila de fosfatidilserinas, bem como a do grupo fosfato do ácido fosfatídicoa baixos valores de pH (Hope e Cullis, 1980; Farren *et al.*, 1983). Observações semelhantes estendem-se a sistemas de lipídicos mistos, onde as transições de fase lamelar para hexagonal são observadas para sistemas fosfatidilserina-fosfatidiletanolamina à medida que o pH é reduzido para valores abaixo de 5,0 (Hope *et al.*, 1983).

2.1.2.2 Automontagem (self-assembly) de fosfolipídios: lipossomas para liberação prolongada de fármacos

Os fosfolipídios podem associar-se em estruturas fechadas do tipo concha esférica, denominadas lipossomas (Santos e Castanho, 2002). A fosfatidilcolina está dentre os fosfolipídios que podem ser utilizados no preparo dos lipossomas. Os lipossomas

podem ser vantajosos como sistemas de liberação prolongada de fármacos, visto que são biocompatíveis e possuem a capacidade de carrear compostos ativos hidrofóbicos e hidrofílicos, protegendo-os da degradação após administração, e de permitir com que maiores concentrações destes compostos alcancem o sítio de ação, potencializando a administração de doses menores no organismo. Na Figura 6 estão apresentadas as diferentes associações que podem ocorrer entre os lipossomas (formados por fosfolipídios) e um fármaco (ou substância ativa), sejam estes hidrofílicos ou hidrofóbicos (De Lima *et al.*, 2010).

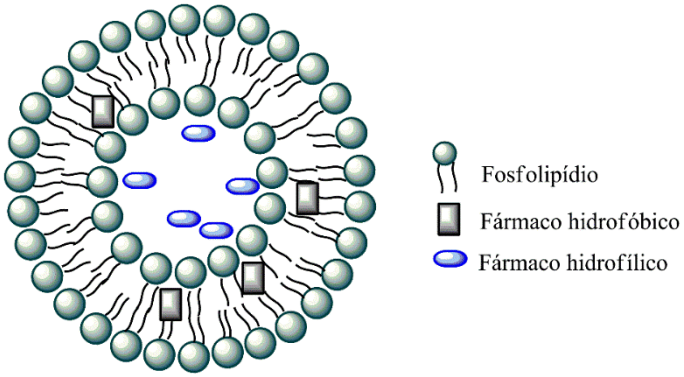


Figura 7: Representação esquemática da associação de fármacos hidrofílicos/ hidrofóbicos com fosfolipídios, formando os lipossomas.

Os lipossomas podem ser preparados por diversos métodos, a partir de lipídios extraídos e purificados de fontes naturais, bem como de lipídios sintéticos. A ASO, por exemplo, é constituída de uma mistura de fosfolipídios naturais extraídos da soja com uma composição aproximada de 25% de fosfatidilcolina, 25% de fosfatidiletanolamina, 25% de fosfatidilinositol, e pequenas quantidades de outros fosfolipídios polares (Navratil *et al.*, 2011; Johns *et al.*, 2015). Aproximadamente, 24% da cadeia de ácidos graxos são saturados, 14% contêm apenas uma insaturação e 62% são poli-insaturados (Santos e Castanho, 2002; Navratil *et al.*, 2011).

As associações fosfolipídicas podem possuir tamanhos e constituições variáveis (Lichtenberg e Barenholz, 1988). De acordo com Vemuri e Rhodes (1995), os lipossomas podem ser classificados quanto ao seu tamanho ou ao seu número de bicamadas lipídicas (lamelas). Os lipossomas podem ser denominados como vesículas multilamelares grandes (MLVs: “multilamellar vesicles”, Figura 8A), apresentando mais de quatro lamelas e podendo variar seu diâmetro entre 50 e 10000 nm; vesículas unilamelares grandes (LUVs: “large unilamellar vesicles”, Figura 8B), com uma lamela de diâmetro superior a 100 nm e vesículas unilamelares pequenas (SUVs: “small unilamellar vesicles”, Figura 8C), com diâmetro entre 25 e 50 nm (Vemuri e Rhodes, 1995).

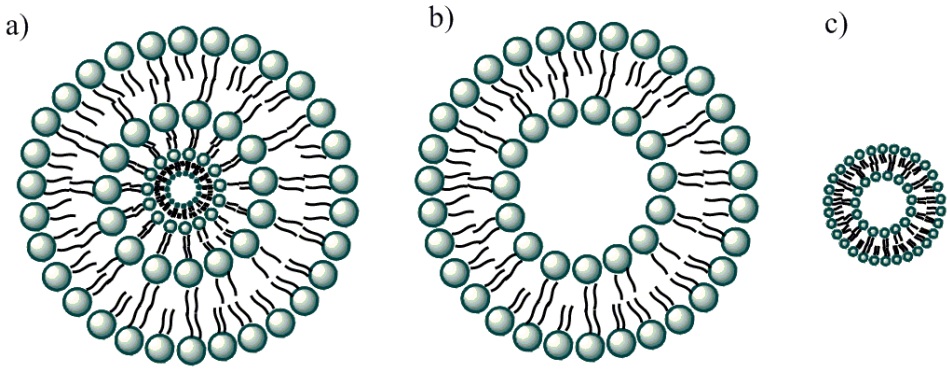


Figura 8: Representação dos lipossomas de acordo com o tamanho e número de lamelas. Vesículas (a) multilamelares, (b) unilamelares grandes e (c) unilamelares pequenas.

As MLVs são frequentemente usadas para encapsular substratos a serem liberados após a ruptura da membrana em um momento posterior (Van Swaay e De Mello, 2013). As LUVs são mais indicadas quando uma transferência rápida do fármaco é requerida. Devido ao maior espaço aquoso, cerca de quatro vezes maior do que em lipossomas multilamelares, as LUVs podem encapsular uma grande percentagem de materiais hidrofílicos (Akbarzadeh *et al.*, 2013).

Em estudos de permeabilidade da membrana e das funções das proteínas, as estruturas ideais são as LUVs devido a sua maior semelhança às células vivas, tanto na estrutura como na função. Entretanto, nas aplicações como veículos, as MLVs fornecem uma liberação do fármaco mais sustentada que as LUVs, pois as suas membranas vão sendo degradadas gradualmente no local de ação. Adicionalmente, quando se pretende avaliar propriedades estruturais, dinâmicas e termodinâmicas das membranas, nas quais a sensibilidade pode ser frequentemente um problema, as MLVs são indicadas devido à sua maior concentração lipídica (Perkins *et al.*, 1993; Van Swaay e De Mello, 2013).

O uso de diferentes métodos de preparo proporciona a obtenção de lipossomas com distintos tamanhos. Os lipossomas podem ser preparados pelo método de HV para obtenção de fases lamelares grandes em meio aquoso e após serem dispersos mecanicamente através de sonicação ou extrusão (Marie *et al.*, 2013). Assim, as vesículas preparadas por este método são do tipo MLVs. Ao inserir-se NPM no sistema, este procedimento produz magnetolipossomas multilamelares com uma distribuição de tamanho e diâmetros médios entre 100 a 400 nm (Marie *et al.*, 2013).

Outro método de preparo de lipossomas amplamente utilizado é o FR. Os lipossomas preparados por este método, normalmente apresentam-se como LUVs de 100-200 nm de diâmetro (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Bixner e Reimhult, 2016).

O tamanho e uniformidade dos lipossomas determinam a segurança da rota de administração do sistema (Immordino *et al.*, 2006). Os tumores, assim como as regiões de infecção e inflamação, devido a angiogênese, apresentam capilares com maiores diâmetros (entre 100 a 800 nm) quando comparado aos poros das células saudáveis (Lasic, 1998). Os lipossomas de longa duração, pelo fato de poderem circular por tempo prolongado e extravasar nos tecidos com permeabilidade vascular elevada, podem ser passivamente direcionados para vários tipos de tumores. Segundo Laverman e colaboradores (1999), uma diferença significativa no tempo de permanência nos vasos sanguíneos foi observada em função do tamanho dos lipossomas. Os lipossomas

grandes (400 nm) foram removidos do sangue mais rapidamente, enquanto que as vesículas menores (200 nm) apresentaram maior tempo de meia vida (Laverman *et al.*, 1999).

O tipo de solvente usado durante o preparo dos lipossomas também influencia suas propriedades. A utilização de solventes zwiteriônicos, como a tricina, durante a preparação de lipossomas é responsável pelo aumento da fluidez das bicamadas lipídicas, quando comparada a lipossomas em que a água é utilizada como solvente (Koerner *et al.*, 2011). Sovago e colaboradores avaliaram o efeito de íons de sódio e cálcio sobre as monocamadas de fosfolipídios de DPPC. No trabalho citado, os íons de sódio afetaram sutilmente a estrutura da monocamada, enquanto que o cálcio causou um desordenamento da monocamada (Sovago *et al.*, 2007).

2.1.2.3 Estabilidade de membranas lipídicas: lipossomas

Dentre os desafios do uso de lipossomas como sistemas de liberação prolongada de fármacos está a sua estabilidade (Batista *et al.*, 2007). A estabilidade dos lipossomas está associada à capacidade dos mesmos de manter o nível de I% ainda que com mudanças nas propriedades químicas da suspensão, tais como, pH, composição de eletrólitos, agentes oxidantes e presença de compostos como tensoativos, colesterol e sais biliares. A habilidade dos lipossomas de manter o tamanho em várias condições de armazenamento e estoque também está relacionada com a estabilidade (Maherani *et al.*, 2011).

De uma forma geral, as vesículas são estabilizadas com base na formação de diferentes forças: de Van der Waals entre os fosfolipídios, repulsivas entre grupos carregados de moléculas de fosfolipídios, repulsivas entre os grupos polares e ligações de hidrogênio entre a água e moléculas de fosfolipídios (Maherani *et al.*, 2011). As forças repulsivas eletrostáticas são formadas entre vesículas após a adição de substância com carga a bicamada, aumentando a estabilidade do sistema (Maherani *et al.*, 2011).

A estabilidade também depende da curvatura natural da mistura lipídica, ou seja, da curvatura de equilíbrio do lipossoma, onde a energia livre do sistema ou função de Gibbs, *ΔG*, é minimizada.

Outro fator importante é a rigidez da bicamada lipídica (Lasic, 1993). A hidratação dos grupos polares, a organização das moléculas anfipáticas em agregados para proteger as cadeias hidrofóbicas da exposição à água e as forças de atração (hidrofóbicas e de Van der Waals) entre as cadeias hidrocarbonadas são fatores responsáveis pela diminuição de *ΔG* (Lasic, 1998). As membranas mais rígidas (com pontos de fusão mais altos) são mais estáveis contra ao aumento de temperatura, cisalhamento, vibração e ciclos de congelamento-descongelamento (Maherani *et al.*, 2011).

Por outro lado, reações de hidrólise podem comprometer a estabilidade dos lipossomas. Em um ambiente aquoso, ácido ou básico, as moléculas de fosfolipídios podem sofrer hidrólise sob uma cinética de pseudo-primeira ordem (Grit *et al.*, 1993). A taxa de hidrólise é dependente da temperatura e pH, onde a velocidade mínima ocorre a pH 6,5 (Zhang e Pawelchak, 2000; Xia *et al.*, 2014). A degradação de um fosfolipídio via hidrólise de fosfatidilcolina, Figura 9, leva a formação da lisofosfatidilcolina o que acentua a permeabilidade dos lipossomas e altera a integridade da formulação (Saetern *et al.*, 2005; Ickenstein *et al.*, 2006). Várias formas da lisofosfatidilcolina, com diversas cadeias acil, já foram identificadas, como os ácidos: palmítico (16: 0), esteárico (18: 0), oleico (18: 1), linoleico (18: 2), araquidônico (20: 4) e docosahexaenóico (22: 6) (Riederer *et al.*, 2010).

Juntamente à hidrólise das ligações éster que ligam os ácidos graxos ao esqueleto de glicerol, as reações de peroxidação das cadeias acílicas insaturadas, respondem por fenômenos como agregação, fusão, deposição e ruptura da membrana (Yadav *et al.*, 2011). Esses fenômenos podem resultar em liberação ou extravasamento da substância ativa e mudanças de tamanho dos lipossomas, diminuindo a estabilidade dos mesmos (Batista *et al.*, 2007). Os processos de peroxidação lipídica em membranas ocorrem devido à ação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ER-

MOS). Este processo, quando ocorre de forma controlada e está restrito a certos compartimentos celulares, apresenta efeitos benéficos para as células, como a diferenciação, maturação, transporte de vesículas intracelulares, fagocitose e apresentação de antígenos (Cejas et al., 2004). Também tem papel importante na formação de prostaglandinas e, portanto, na resposta inflamatória (Halliwell e Gutteridge, 1990).

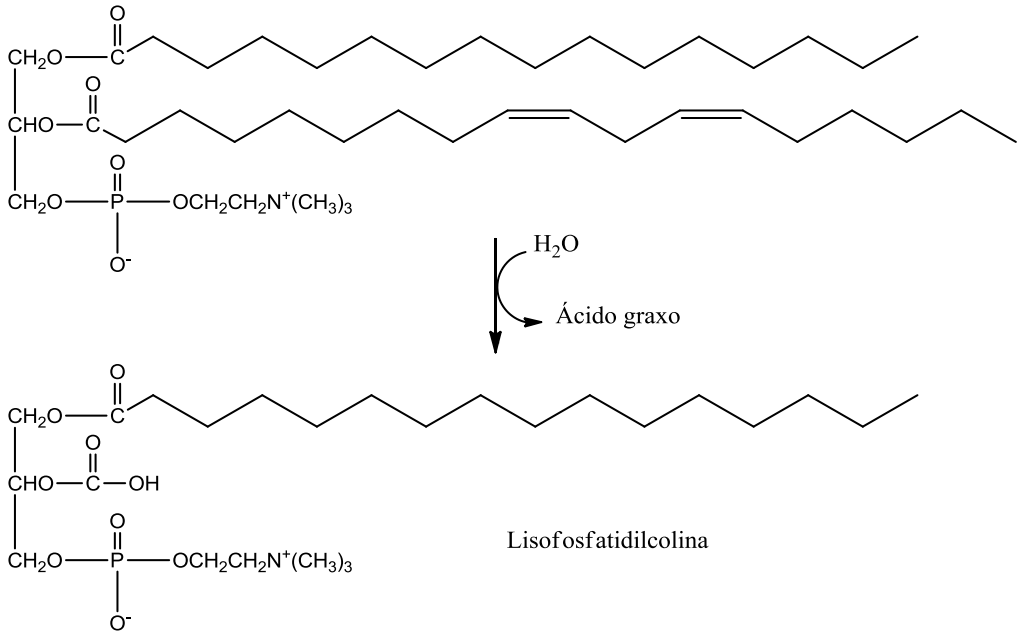


Figura 9: Degradação da fosfatidilcolina a lisofosfatidilcolina via reação de hidrólise.

Porém, a peroxidação lipídica, também está associada aos mecanismos de envelhecimento, câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (Ghosh *et al.*, 1993). A lipoperoxidação resulta em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (Mello *et al.*, 1984), podendo ocasionar perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonildialdeído, MDA), culminando com a morte celular (Hershko, 1989).

A lipoperoxidação em membranas é uma reação em cadeia representada por três etapas: iniciação, propagação e terminação (Mylonas e Kouretas, 1999). Estas etapas estão apresentadas na Figura 10, onde *L* representa o lipídio (Gaschler e Stockwell, 2017).

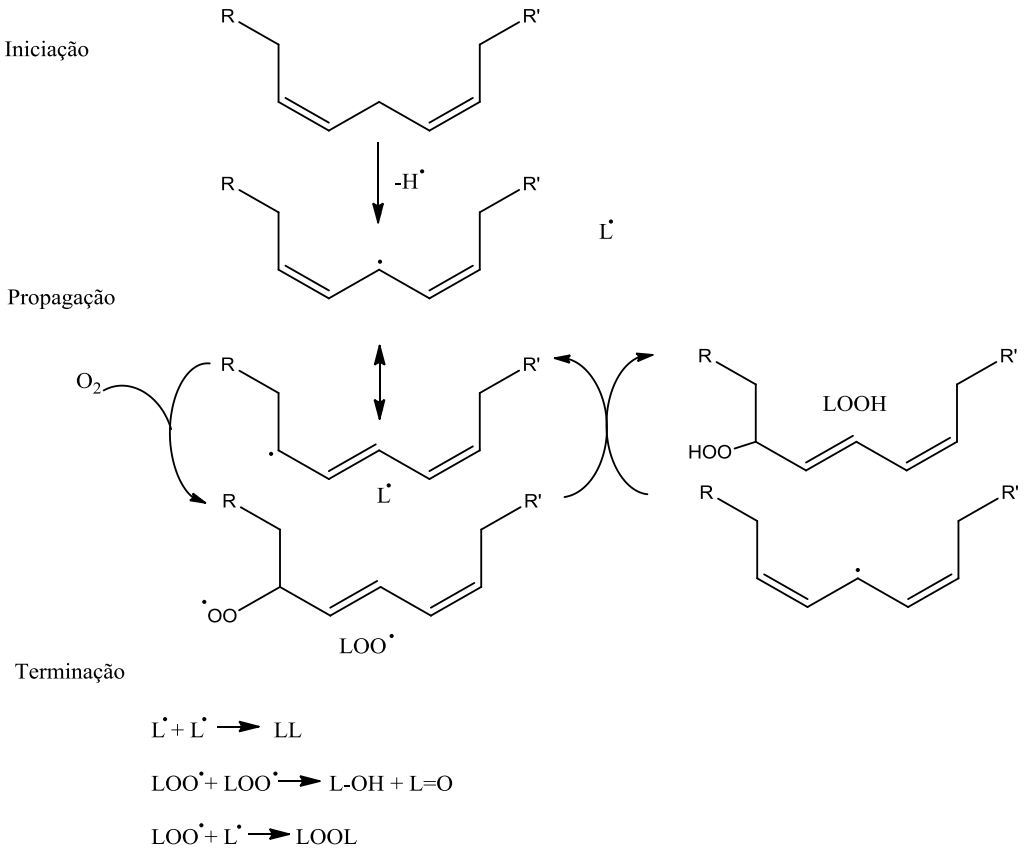


Figura 10: Mecanismo de lipoperoxidação em membranas lipídicas em diferentes etapas:*Iniciação* - ataque no ácido graxo de uma espécie reativa capaz de abstrair um átomo de hidrogênio do grupo metileno. O radical formado será estabilizado por um rearranjo molecular (radical alquila)que em meios aeróbicos forma o radical peroxila, LOO•). *Propagação* - A peroxila formada abstrai um hidrogênio alílico de outro ácido graxo gerando outro radical. A reação do radical peroxila com o hidrogênio dá origem a um hidroperóxido lipídico (LOOH). *Terminação* - Nessa etapa ocorre a formação de produtos não radicalares. Adaptado de Gaschler e Stockwell (2017).

A etapa de iniciação ocorre quando uma espécie reativa abstrai um hidrogênio pertencente à cadeia de hidrocarbonetos insaturados. Essa abstração é favorecida energeticamente para um hidrogênio alílico (aproximadamente 88 $kcalmol^{-1}$) do que para um alquílico (cerca de 101 $kcal\ mol^{-1}$). Após a abstração do hidrogênio, uma espécie radicalar é formada ($L^{\bullet}$) e essa poderá interagir com o oxigênio molecular para formar um radical lipídico peroxil que poderá, por sua vez, sofrer ciclização e rearranjos.

O radical $L^{\bullet}$ pode abstrair um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando outro radical centrado no carbono e um hidroperóxido lipídico (*LOOH*). Estas reações caracterizam a etapa de propagação do processo oxidativo. Nessa etapa peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando ocorre a reação da peroxila com uma dupla ligação da mesma cadeia do ácido graxo. Íons de ferro e cobre podem participar dessa etapa formando radicais lipídicos alcoxila, peroxila e hidroxila a partir dos hidroperóxidos.

A etapa de terminação ocorre através da hidrólise dos endoperóxidos ou o fornecimento de energia via calor, para as reações que gerarão produtos não radicalares como MDA e 4-hidroxialcenais (Mylonas e Kouretas, 1999).

As nanopartículas de óxido de ferro, dependendo do pH do meio, podem induzir a produção de ERMOS, como $^1O_2$, $O_2^{\bullet -}$ e $OH^{\bullet}$ (Zhang *et al.*, 2012). O ferro é um importante metal de transição redox-ativo responsável pela geração de radicais livres altamente reativos através das reações de Fenton e Haber-Weiss em sistemas biológicos (Wang *et al.*, 2013):

(1) Reação de Fenton

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$$

(2) Reações tipo Fenton (*Fenton-like)*

$$Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow FeOOH^{2+} + H^+$$

$$FeOOH^{2+} \rightarrow Fe^{2+} + + HO_2\bullet$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$$

(3) Reação de Haber−Weiss

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$$

Em adição, como iniciadores da lipoperoxidação, íons de Fe (2+ ou 3+), podem ser usados para gerar espécies de radicais livres na presença de lipídios (*LOOH*). Nesse caso, a iniciação pode ocorrer por duas vias (Fagali e Catala, 2009):

1) A espécie reativa de Fe^{3+} abstrai um hidrogênio pertencente à cadeia de hidrocarbonetos insaturados, formando a espécie radicalar (*LOO*$^{\bullet}$). O radical pode abstrair um hidrogênio de outro ácido graxo, gerando outro radical.

$LOOH + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + LOO\bullet + H^+$

$LOO\bullet + LH \rightarrow L\bullet + LOOH$

2) Ou a espécie reativa de Fe^{2+} abstrai um hidrogênio pertencente à cadeia de hidrocarbonetos insaturados, formando a espécie radicalar (*LO*$^{\bullet}$). O radical pode abstrair um H de outro ácido graxo, gerando, também, outro radical.

$LOOH + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + LO\bullet + OH^-$

$LO\bullet + LH \rightarrow L\bullet + LOH$

Com relação à ação de NP, estas quando em pH fisiológico, podem agir como catalisadores na geração de OH• através de mecanismos heterogêneos que envolvem simultaneamente as reações de Fenton / Haber-Weiss. Em carreadores lipídicos, o processo espontâneo de lipoperoxidação pode propiciar efeitos no grau de fluidez do sistema lipossomal. Geralmente, provocando enrijecimento da bicamada (Ghosh *et al.*, 1993).

2.2 Magnetolipossomas

O uso de lipossomas para a incorporação das NPM é vantajoso por propiciar maior biocompatibilidade, possibilidade de vetorização dos fármacos/substâncias ativas, e menor toxicidade das NPM (Schladt *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2014). Ao híbrido de componentes magnéticos e lipossomas é denominado o termo magnetolipossomas. Os magnetolipossomas têm sido utilizados como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética nuclear, na separação magnética de células ou de moléculas biológicas, em marcadores para células alvo e na terapêutica do câncer por magnetohipertermia (Weissleder *et al.*, 1990; Clement *et al.*, 1991).

Assim como as NPM na forma livre, os magnetolipossomas podem ser vetorizados a um alvo específico através do uso de campos magnéticos externos (Decuyper e Joniau, 1988; Lubbe *et al.*, 1996; Lacava *et al.*, 1999). Como sistemas de liberação controlada de quimioterápicos, os magnetolipossomas podem encapsular e aumentar a atividade de drogas antitumorais (hidrofílicas e/ou hidrofóbicas) (Fortin-Ripoche *et al.*, 2006; Dandamudi e Campbell, 2007). Além disto, deve-se considerar que a liberação de fármacos por magnetolipossomas pode ser específica para o tumor se este for acessível através do sistema arterial e tiver suficiente suprimento de sangue. Nesse caso, a liberação do fármaco antitumoral por um carreador magnético ocorre com menos efeitos colaterais e proporciona tratamentos mais curtos e menos tóxicos aos pacientes (Gupta e Gupta, 2005).

Os magnetolipossomas vêm sendo destacados na literatura de diferentes formas. Hardiansyah e colaboradores (2014) demonstraram efeitos sinérgicos da quimioterapia e da hipertermia em tratamento de células tumorais com magnetolipossomas contendo doxorrubicina (Hardiansyah *et al.*, 2014). O uso de um campo magnético alternado permitiu a liberação controlada de doxorrubicina a partir de magnetolipossomas constituídos de NPM de γ-Fe_2O_3 e bicamadas fosfolipídicas (Chen *et al.*, 2014; German *et al.*, 2015).

Magnetolipossomas baseados em NPM de γ-Fe_2O_3 incorporados em LUVs de 200 nm foram descritos e caracterizados para aplicação em ressonância magnética por imagem. Tais magnetolipossomas, através do uso de campos magnéticos externos, foram vetorizados, por via intravenosa, aos tecidos de adenocarcinoma prostático humano. Durante o transporte dos magnetolipossomas a estrutura da vesícula e a carga de ferro foram preservadas (Martina *et al.*, 2005; Martina *et al.*, 2008).

Magnetolipossomas superparamagnéticos preparados a partir de MLVs e γ-Fe_2O_3 apresentaram maior eficiência como agentes de contraste quando comparados a agentes de contraste comerciais na detecção e caracterização de lesões hepáticas (Meyre *et al.*, 2011).

Yang e colaboradores (2016) investigaram o uso de magnetolipossomas termo sensíveis contendo NPM de óxido de ferro e marcadores de células tronco em células tronco tumorais hepáticas. Tais magnetolipossomas apresentaram diâmetro médio de 130 ± 4,6 nm e resposta superparamagnética. Os testes *in vitro* e *in vivo* evidenciaram um aumento da eficácia da morte de células tumorais em comparação com os magnetolipossomas sem marcador (Yang *et al.*, 2016).

Assim como nos lipossomas, a eficiência dos sistemas de liberação de fármacos baseados em magnetolipossomas é influenciada pelo tamanho, carga de superfície e características estruturais dos sistemas (Sen *et al.*, 2010). As diferentes estratégias de inserção de NPM em lipossomas podem alterar as características estruturais das vesículas, como os estados de hidratação, ordem e fase e os movimentos vibracionais, rotacionais e translacionais de grupos lipídicos específicos (Biltonen e Lichtenberg, 1993; Chen e Tripp, 2008; Nappini *et al.*, 2011; Villasmil-Sanchez *et al.*, 2013; Lopes De Azambuja *et al.*, 2015). Assim, a estabilidade dos magnetolipossomas ainda é um desafio para o seu design e produção.

Vale também considerar que os magnetolipossomas também são suscetíveis à peroxidação da membrana induzida por Fe^{2+} e Fe^{3+} que, por sua vez, são componentes

de nanopartículas de maghemita (Gutteridge, 1995; Fagali e Catala, 2009). Neste contexto, o uso de compostos de origem natural com propriedades antioxidantes torna-se interessante. Lipossomas contendo quercetina exibem uma forte capacidade de inibição da peroxidação lipídica via quelação de metais (Gabrielska *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2017).

Apesar do extenso conhecimento sobre a interação da quercetina com os lipossomas, há pouca informação sobre o comportamento de quercetina com os magnetolipossomas. Além disso, é relatado que as NPM conjugadas com quercetina podem ser um promissor agente antineoplásico (Barreto *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2014; Akal *et al.*, 2016a).

Assim, considerando a possibilidade de reduzira susceptibilidade dos magnetolipossomas à peroxidação e a promissora atividade antitumoral da associação magnetolipossomas-quercetina, é importante caracterizá-los no contexto de interações moleculares e atividades antioxidantes / antitumorais. Isto pode contribuir para um design adequado dos sistemas magnetolipossomas.

2.3 Quercetina como fármaco-modelo

A quercetina (3,3´,4´,5,7-pentahidroxiflavona, Figura 11) é um polifenol pertencente à classe dos flavonoides (Movileanu *et al.*, 2000; Hirpara *et al.*, 2009). É abundantemente encontrada em frutos comestíveis, vegetais e plantas medicinais (Wu *et al.*, 2008; Kumari *et al.*, 2010). Os flavonoides, um grupo de derivados naturais da benzoil-pirona, têm apresentado diversas propriedades biológicas, incluindo antioxidantes, hepatoprotetoras, antitrombóticas, anti-inflamatórias, bactericidas e atividades antivirais e antitumorais (Saija, Bonina*, et al.*, 1995; Movileanu *et al.*, 2000).

A quercetina apresenta em sua estrutura química cinco grupos hidroxilas, que conferem determinado grau de polaridade e caráter de ácido fraco, bem como dois

anéis aromáticos A e B ligados por anel heterocíclico contendo oxigênio, que conferem hidrofobicidade à estrutura (Pawlikowska-Pawlega *et al.*, 2014). A porção 3,4'-dihidroxi do anel B (anel catecol B), é conhecida por possuir uma alta capacidade antioxidante através da eliminação de radicais livres (Pawlikowska-Pawlega *et al.*, 2014).

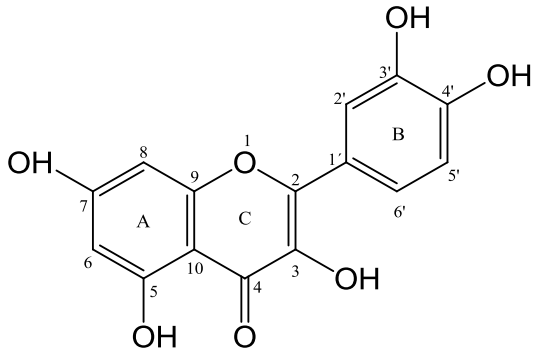


Figura 11: Estrutura química da quercetina: 3,3´,4´,5,7-pentahidroxiflavona.

Os mecanismos de ação antioxidante da quercetina incluem: a eliminação direta dos radicais livres reativos e a quelação dos íons metálicos envolvidos na formação de radicais livres (Riceevans *et al.*, 1996; Amic *et al.*, 2007).

Como principal mecanismo de sequestro de radicais livres, a doação de átomos de hidrogênio é uma das características da quercetina. Neste mecanismo, os grupos hidroxilas doam hidrogênio a um radical, dando origem a um radical fenoxil-flavonoide (Figura 12). O radical fenoxil-flavonoide pode reagir com um segundo radical ($RO^{\bullet}$), adquirindo, assim, uma estrutura de quinona estável.

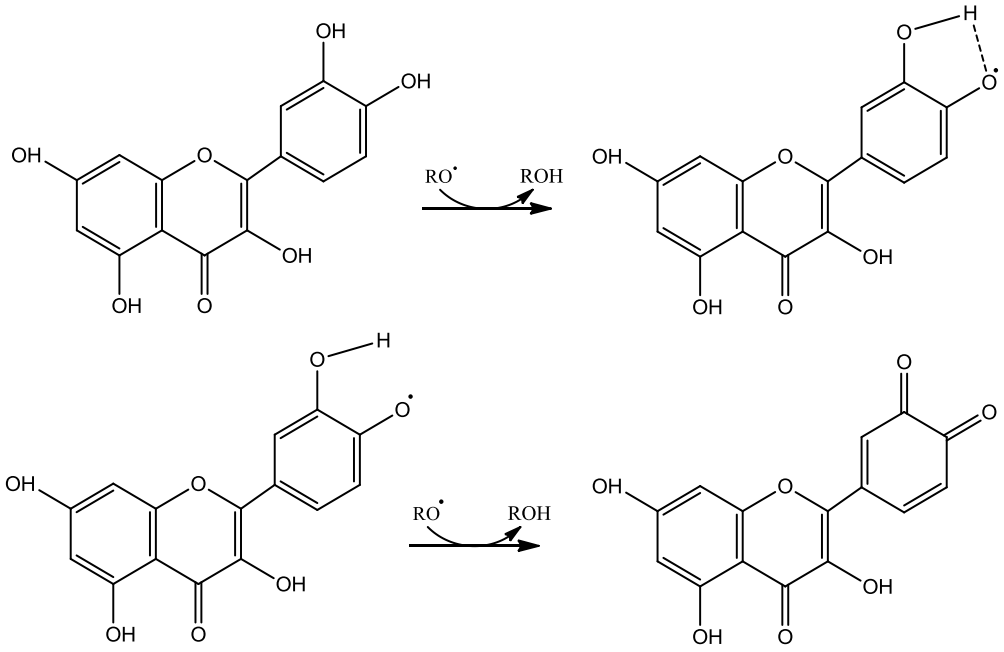


Figura 12: Mecanismo de ação antioxidante da quercetina (envolvendo a região 3',4'-diOH flavonoides): a) radical fenoxil estabilizado através de ligações de ligações de hidrogênio; b) estrutura da quinona estável. Adaptado de Amic et al. (2007).

No entanto, a estabilidade do radical fenoxil-flavonoide pode favorecer uma ação pró-oxidante dos flavonoides (Bors *et al.*, 1995). O radical fenoxil-flavonoide pode interagir com o oxigênio, gerando quinonas e ânions superóxidos que induzem a peroxidação como espécies reativas (Figura 13). Esta reação pode ocorrer na presença de alta quantidade de íons de metais de transição e pode ser responsável pelo efeito pró-oxidante dos flavonoides (Yoshino *et al.*, 1999). Tal atividade mostrou-se uma importante ferramenta no combate a células de glioblastoma humano, através da indução do apoptose celular (Sakagami e Satoh, 1997).

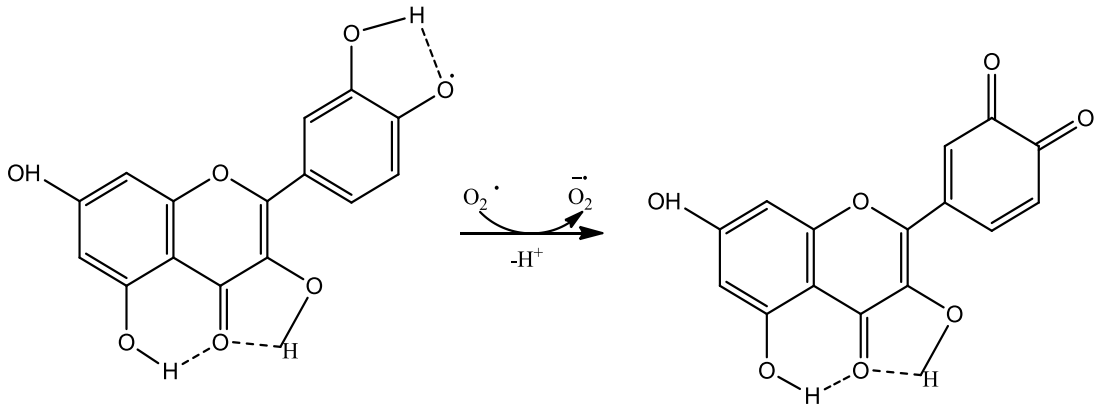


Figura 13: Mecanismo de ação pró-oxidante da quercetina. Adaptado de Amic et al. (2007).

A quelação de íons metálicos (como Fe^{2+} e Cu^{+}) é outro mecanismo de ação antioxidante da quercetina, bem como, de outros flavonoides (Pietta, 2000). As NP de ferro quando dissociadas também podem promover a formação de ERMOS e de radicais livres induzindo a apoptose de células saudáveis através da reação de Fenton, conforme mostrado no item 2.1.2.3 (Solanki *et al.*, 2008; Markides *et al.*, 2012). Na reação de Fenton, ocorre a redução do peróxido de hidrogênio com a geração do radical hidroxila que é altamente agressivo (Riceevans *et al.*, 1997). O local de ligação proposto para os íons metálicos nos flavonoides é a porção 3',4'-diOH do anel B, como mostrado na Figura 14. Além disso, os grupos C-3 e C-5 OH e o grupo 4-carbonílico também contribuem para a quelação desses íons (Riceevans *et al.*, 1997; Amic *et al.*, 2007).

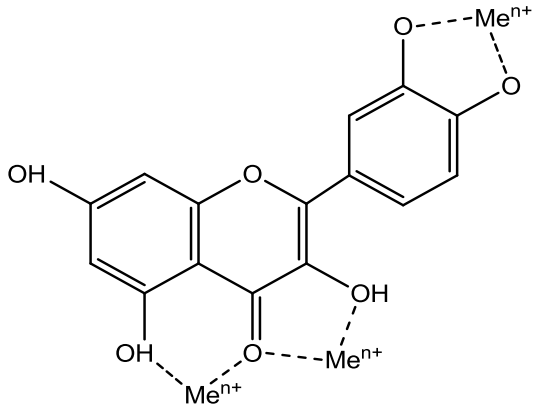


Figura 14: Sítios de ligação de metais de transição em uma molécula de quercetina. Adaptado de Amic et al. (2007).

A baixa biodisponibilidade da quercetina, bem como a sua baixa solubilidade (~2%) em meio aquoso e extenso metabolismo no intestino e no fígado, limitam suas aplicações na farmacologia (Gugler *et al.*, 1975; Hadrich *et al.*, 2016). Várias abordagens visando a melhora da solubilidade em água da quercetina, e consequentemente, sua aplicação como fármaco antitumoral, são encontradas na literatura.

2.4 Métodos de caracterização físico-química e biológica de magnetolipossomas

2.4.1. Estudos de estabilidade

Como citado anteriormente, na seção 2.2.2, a estabilidade dos magnetolipossomas pode ser influenciada pelo tamanho, morfologia, grau de empacotamento e ordem, bem como da carga superficial do sistema (Sen et al., 2010). Para o estudo da estabilidade de magnetolipossomas, diferentes técnicas podem ser utilizadas, tais como DLS, TBARS e potencial zeta.

2.4.1.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

A técnica de DLS considera a interação entre a radiação visível do espectro eletromagnético com a matéria. Quando uma onda eletromagnética atinge uma determinada substância, faz surgir um dipolo induzido oscilante. O espalhamento de luz pode ser descrito como a emissão secundária de radiação eletromagnética produzida pelo dipolo oscilante. A polarização oscila com a mesma frequência da radiação incidente servindo como uma fonte que espalha pequenas quantidades de radiação em todas as direções (Atkins e De Paula, 2014).

A técnica de DLS é eficaz para detectar flutuações de concentração e densidade em uma amostra devido ao movimento das partículas em movimento Browniano (Zhou *et al.*, 2017). Devido ao movimento Browniano, as partículas presentes no sistema se encontram em constante deslocamento, o que faz com que a intensidade da luz espalhada por elas forme um padrão de movimento. As partículas maiores se movem mais lentamente que as pequenas, o que faz com que a taxa de flutuação da luz espalhada também seja mais lenta. Sendo assim, a técnica de DLS utiliza a taxa de mudança dessas flutuações para determinar a distribuição de tamanho das partículas (Atkins e De Paula, 2012).

O diâmetro hidrodinâmico (<D>), que no caso da esfera, coincide com seu diâmetro físico, é determinado pera relação de Stookes-Einstein:

$$<D>= \frac{k_B T q^2}{3\pi\eta}\tau \qquad \text{Eq. 4}$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, q é o vetor de espalhamento, η é a viscosidade do solvente e τ é o tempo médio de relaxamento relacionado com o coeficiente de difusão.

2.4.1.2 Peroxidação lipídica nas membranas: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A lipoperoxidação das membranas, que pode influenciar na estabilidade dos lipossomas, pode ser detectada através do método de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Ohkawa *et al.*, 1979; Bird e Draper, 1984). Este método caracteriza-se pela formação de um produto de coloração rósea a partir da reação entre o MDA, produto majoritário da lipoperoxidação, e ácido tiobarbitúrico (TBA), representado na Figura 15 (Ohkawa *et al.*, 1979; Bird e Draper, 1984; Fagali e Catala, 2009). Assim, a percentagem de substâncias reativas ao TBARS é determinada a partir de leitura espectrofotométrica a 535 nm, comprimento de onda respectivo ao produto supracitado.

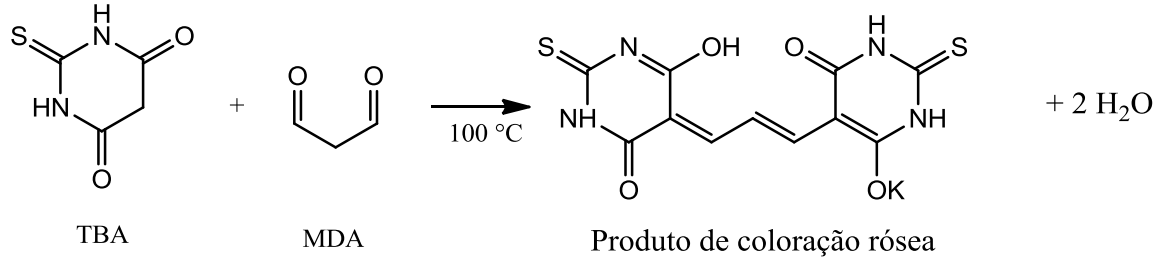


Figura 15: Reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malonildialdeído (MDA) para formar um aduto de coloração rosa.

2.4.1.3 Potencial zeta

O potencial zeta corresponde ao potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento que está a uma determinada distância da superfície (Atkins e De Paula, 2012). A carga da superfície da partícula influencia a distribuição dos íons da solução no meio, atraindo e repelindo contra-íons e co-íons, respectivamente. Essa distribuição de íons, desde a superfície da partícula até o interior da solução (meio de dispersão),

gera diferentes potenciais e está representada esquematicamente na Figura 16 (Junior e Varanda, 1999).

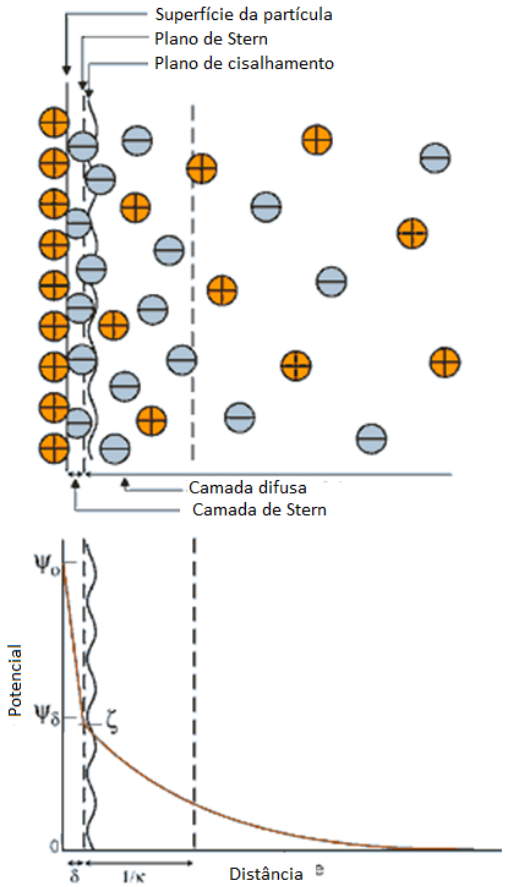


Figura 16: Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada e os seus respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido. Adaptado de Junior e Varanda (1999).

A medida do potencial zeta é realizada indiretamente, através da medida da mobilidade eletroforética, onde é possível estimar o valor do potencial na superfície. Para realizar-se esta medida, introduz-se a suspensão a ser analisada em uma cubeta constituída de dois eletrodos, onde um potencial elétrico é aplicado. As espécies carregadas

eletricamente irão se mover na direção do eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado.

O potencial zeta é dado em função da carga superficial de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que o circunda. O potencial zeta (ζ) pode ser calculado pela aproximação de Helmholtz-Smoluchowski:

$$\zeta = \frac{4\pi\mu\eta}{E\varepsilon} \qquad \text{Eq. 5}$$

Em que μ é a mobilidade eletroforética, E é o campo elétrico aplicado, η é a viscosidade do solvente e ε é a constante dielétrica do meio.

As medidas de potencial zeta podem ser usadas para o estudo da distribuição de cargas, estabilidade e orientação molecular dos fosfolipídios nas membranas (Makino *et al.*, 1991). Por ser um indicador útil da carga efetiva nas partículas, os dados de potencial zeta podem ser usados para controlar a estabilidade de suspensões coloidais. Quanto maior for o valor absoluto do potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem e essa força supera a tendência espontânea de agregação (Schaffazick *et al.*, 2003). Valores de potencial zeta superiores a |30| mV são capazes de estabilizar lipossomas suspensos devido à mútua repulsão eletrostática entre as vesículas, impedindo assim a sua agregação (Wongsagonsup *et al.*, 2005; Hadrich *et al.*, 2016).

A distância do plano de cisalhamento ao plano de carga, conforme descrito pela teoria de Gouy-Chapman-Stern, depende fortemente da força iônica do meio, diminuindo com o aumento da concentração de sal (Sabin *et al.*, 2006). Os valores médios de potencial zeta dos magnetolipossomas podem variar de acordo com a natureza dos seus componentes, bem como, com as mudanças na orientação dos grupos polares dos lipídios (Fatouros e Antimisiaris, 2002).

A parte polar de fosfolipídios, tais como a fosfatidilcolina, é zwiteriônica, esperando-se assim que, a pH neutro, não apresente efeito de carga. Por outro lado o fosfatidilinositol, presente em asolecitina de soja, é um fosfolipídio aniônico responsável pelos valores negativos de potencial zeta observados experimentalmente (Ohki *et al.*, 2010).

Os valores de potencial zeta são dependentes do meio em que o lipídio está disperso e têm sido interpretados em termos de camadas de hidratação formadas em torno da superfície da membrana e da orientação dos grupos polares dos lipídios (Garcia-Manyes *et al.*, 2005). Na Figura 17 estão apresentadas as diferentes orientações dos grupamentos fosfo-colina que influenciam os valores de potencial zeta. Quando a região polar está perpendicular à superfície de modo que o grupo fosfato está acima do grupo de colina, o potencial zeta torna-se mais negativo. Quando o grupo fosfo-colina está paralelo à superfície, o potencial zeta iguala-se a zero. Por fim, quando o grupo está perpendicular à superfície da membrana, de tal forma que o grupo colina está acima do grupo fosfato, o valor de potencial zeta torna-se mais positivo (Makino *et al.*, 1991).

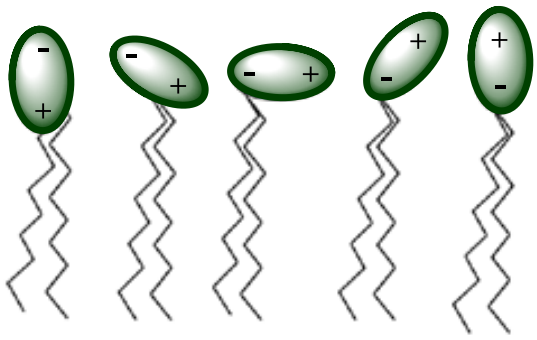


Figura 17: Diferentes modelos conformacionais dos grupos polares da fosfatidilcolina que influenciam os valores de potencial zeta. Adaptado de Makino *et al.* (1991).

2.4.2 Eficiência de encapsulamento

Em geral, a eficiência de encapsulamento determina a capacidade de encapsulamento de fármacos no sistema coloidal. No caso da incorporação de NPM em magnetolipossomas, o termo que relaciona a concentração de NPM incorporada com a concentração inicial adicionada durante o preparo dos magnetolipossomas, pode ser descrito como I% (Floris *et al.*, 2014). A eficiência de encapsulamento pode ser influenciada pelo coeficiente de partição da molécula alvo nos solventes usados durante a preparação da formulação, o método usado para realizar o processo de encapsulamento (temperatura, pH, estresse mecânico) e a distribuição de tamanho dos sistemas.

De uma forma geral, a eficiência de encapsulamento pode ser calculada a partir da seguinte equação:

$$EE(\%) = \left[(fármaco)_{encapsulada}/(fármaco)_{total}\right] \times 100 \qquad \text{Eq. 6}$$

Onde $(\text{fármaco})_{\text{total}}$ refere-se à concentração de fármaco em mg L^{-1} adicionada nos lipossomas e $(\text{fármaco})_{\text{encapsulada}}$ refere-se à concentração de fármaco em mg L^{-1} após a etapa de purificação.

2.4.3 Estudos de movimentos molecular

A caracterização físico-química de magnetolipossomas pode ser realizada através de diferentes técnicas instrumentais, tais como, HATR-FTIR, RMN de ^{31}P e de ^{1}H, DSC e UV-vis.

2.4.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada horizontal (HATR-FTIR)

O estudo de FTIR em sistemas lipossomais é realizado no modo de refletância total atenuada horizontal (HATR), pois este minimiza danos causados pela irradiação do laser infravermelho à membrana, já que nesta técnica, o raio infravermelho penetra pouco na amostra (Tatulian, 2003).

Como cada banda do espectro de infravermelho tem uma posição característica, indicada pelo seu número de onda, absorção máxima e largura, se uma molécula exógena interage com a bicamada fosfolipídica, poderão ocorrer mudanças nesses parâmetros espectroscópicos. Essa mudança ocorre porque as formas vibratórias dependem da natureza dos átomos envolvidos e da sua conformação no meio em que estão dispersos (Mantsch e Mcelhaney, 1991; Moreno *et al.*, 2009). Assim, esta técnica pode fornecer informações sobre a localização de uma substância ativa, bem como seu efeito no grau de hidratação e ordem molecular de grupos funcionais de regiões lipídicas características. Tais informações podem ser obtidas via análise da frequência e largura dos picos característicos de modos vibracionais do lipídio (Moreno *et al.*, 2009).

A largura de bandas é afetada por efeitos rotacionais, translacionais e/ ou de colisões. Portanto, variações na largura de bandas de grupos específicos de fosfatidilcolinas fornecem informações sobre a dinâmica do sistema (Lee e Chapman, 1986). Por exemplo, o aumento da largura de banda de uma região de absorção específica do lipídio pode ser relacionado com o aumento da dinâmica, ou seja, aumento da mobilidade dessa região (Toyran e Severcan, 2003).

Para o estudo de fosfatidilcolinas, o espectro de HATR-FTIR mostra bandas de vibração que podem ser classificadas em três regiões diferentes do lipídio (Mantsch e Mcelhaney, 1991):

a) **Polar:** estiramento assimétrico do grupo fosfato (ν_{as} PO_2^-) em torno de 1240-1220 cm^{-1}, estiramento simétrico do grupo fosfato (ν_s PO_2^-) em 1085 cm^{-1} e esti-

ramento assimétrico do grupo colina (ν_{as} $N^+(CH_3)_3$) em cerca de 970 cm^{-1}. A frequência do estiramento assimétrico do fosfato também é sensível ao grau de hidratação. Ou seja, um aumento no grau de hidratação do grupo PO_2^- está relacionado a um alargamento desta banda, juntamente ao deslocamento de sua frequência para valores menores (Chen e Tripp, 2008). Já, com relação ao grupo colina, os deslocamentos no valor da frequência de suas respectivas bandas de FTIR estão relacionados à associação deste grupo com a água, através de interações dipolo e à interação com uma molécula exógena (Moreno *et al.*, 2009). A separação do grupo colina com o grupo fosfato, causada pela intercalação de moléculas de água, também pode refletir em variações de intensidade e deslocamentos relacionados às bandas de estiramentos da colina (Grdadolnik *et al.*, 1991).

b) **Interfacial:** estiramento do grupo carbonila (ν C=O) na faixa de 1725-1740 cm^{-1}. A posição (frequência) desta banda é sensível à geometria da porção de glicerol e ao empacotamento das cadeias acílicas. O estiramento da carbonila é um sensor do grau de hidratação da região interfacial do lipídio, também sensível à polaridade, ao grau e à natureza das interações da ligação de hidrogênio na interface lipídio-água (Manrique-Moreno *et al.*, 2010). Um deslocamento da frequência desse grupo, para valores menores, pode indicar um fortalecimento da ligação de hidrogênio existente ou a formação de nova ligação de hidrogênio entre o lipídio e a molécula de interação (Severcan *et al.*, 2005).

As alterações conformacionais na região de interface da membrana podem também refletir em variações relacionadas com a largura de banda referente ao estiramento da carbonila, onde um aumento da largura da banda de ν C=O indica um aumento no grau de liberdade desta região (Arsov e Quaroni, 2007).

c) **Hidrofóbica:** estiramento simétrico (ν_s CH_2) e estiramento assimétrico (ν_{as} CH_2) dos grupos metilênicos presentes na cadeia acil em aproximadamente 2850 cm^{-1} e 2929 cm^{-1}, respectivamente. As frequências destas bandas são sensíveis à conformação da cadeia lipídica e respondem a alterações da razão trans / gauche nas cadei-

as acil lipídicas (Casal *et al.*, 1980). As alterações no grau de liberdade da região hidrofóbica lipídica estão diretamente relacionadas às larguras das bandas referentes aos grupos metilênicos (Garcia *et al.*, 1993). Assim, quando os lipídios estão em uma fase mais ordenada, como a fase gel, as bandas correspondentes a estes grupos são nítidas e centradas em frequências menores, o que indica a predominância de cadeias de hidrocarbonetos com pouca dinâmica e menos movimento (Lewis e Mcelhaney, 1998). Nesse caso, as cadeias acil estão organizadas entre si de uma forma paralela, devido a maior presença de ligações de hidrocarbonetos em conformação trans, e são estabilizadas por interações de Van der Waals. À medida que o estado de fase desses lipídios torna-se mais desordenado, estas bandas tendem a alargar e as suas frequências tendem a aumentar. Esta alteração está relacionada com o aumento da presença de ligações hidrocarboneto do tipo gauche onde as interações de Van der Waals são menores (Casal *et al.*, 1980).

Nos espectros de FTIR de fosfolipídios, também podem aparecer outros modos vibracionais de grupos metileno e metílico, como os modos vibracionais originários dos grupos terminais metilênicos a 2956 cm^{-1} (estiramento assimétrico) e 2870 cm^{-1}(estiramento simétrico), bem como referente a ligação =C-H (a 3010 cm^{-1}) de cadeias de acil insaturadas. Bandas de *scissoring* (1462-1474 cm^{-1}), deformação simétrica de CH_3 (vibração tipo *umbrella*) a 1375 cm^{-1}, a progressão da banda de oscilação de CH_2 (uma série de bandas regularmente espaçadas entre 1190 e 1345 cm^{-1}) e a progressão da banda de oscilação / torção CH_2 (bandas entre 720 e 1150 cm^{-1}) com uma banda de intensidade forte (720-730 cm^{-1}) também aparecem no espectro de FTIR.

2.4.3.2 Ressonância magnética nuclear de fósforo (RMN de ^{31}P)

RMN de ^{31}P é uma técnica que pode ser usada para o estudo das interações e conformações de fosfolipídios (Da Costa *et al.*, 2007; Villasmil-Sanchez *et al.*, 2013). Em geral, estudos de RMN de ^{31}P, podem ser utilizados para caracterizar e controlar a

distribuição fosfolipídica na bicamada (Nordlund *et al.*, 1981; Moreau *et al.*, 2001), o tamanho (Hauser, 1989; Jung *et al.*, 1996; Traikia *et al.*, 2000) ou os processos de fusão de vesículas (Schullery *et al.*, 1980; Eum *et al.*, 1989).

Nas medidas de RMN, a nuvem eletrônica que circunda o núcleo induz a formação de um campo magnético local que interfere na densidade de fluxo de um campo magnético estacionário ($\vec{B}_0$), segundo a equação:

$$\vec{\mathrm{B}}_{\mathrm{eff}} = \vec{\mathrm{B}}_0 - \sigma\vec{\mathrm{B}}_0 = \mathrm{B}_0(1-\sigma) \qquad \text{Eq. 7}$$

Onde σ é o tensor de anisotropia de deslocamento químico, cujo valor é proporcional ao grau de blindagem (Silverstein *et al.*, 2013).

Em uma bicamada lipídica, a nuvem eletrônica em torno do núcleo de fósforo é geralmente anisotrópica. O campo real percebido pelo núcleo não é, portanto, o mesmo em todas as direções do espaço. O termo σ pode ser descrito por uma matriz de tensores geralmente simétrica representada em forma de diagonal:

$$\sigma = \begin{bmatrix} \delta_{11} & & \\ & \delta_{22} & \\ & & \delta_{33} \end{bmatrix} \qquad \text{Eq. 8}$$

Os componentes δ_{11}, δ_{22} e δ_{33} fornecem os desvios químicos ao longo do eixo principal nas direções *x*, *y* e *z*, respectivamente. Em uma molécula de fosfolipídio a dinâmica rotacional é composta por três movimentos distintos: rotação ao longo do eixo *y* (também conhecida como rotação axial, $D_{\parallel}$), a rotação restrita ao longo do eixo ($D_{\perp}$, wobble) e reorientação interna do fosfato tetraédrico em relação as moléculas presentes no glicerol (Klauda *et al.*, 2008).

Na Figura 18 estão ilustrados os tipos de movimentos relacionados a essas rotações. Nessa figura, β é o ângulo entre o vetor de interesse (vermelho) e o eixo $D_{\parallel}$ do lipídio. A reta normal a direção da bicamada está apresentada em marrom. A extensão média de rotação wobble e reorientação interna do vetor é representada pelo disco

maior em verde e azul, respectivamente. Uma trajetória hipotética é projetada no disco maior para ilustrar o a rotação wobble (Seelig, 1978).

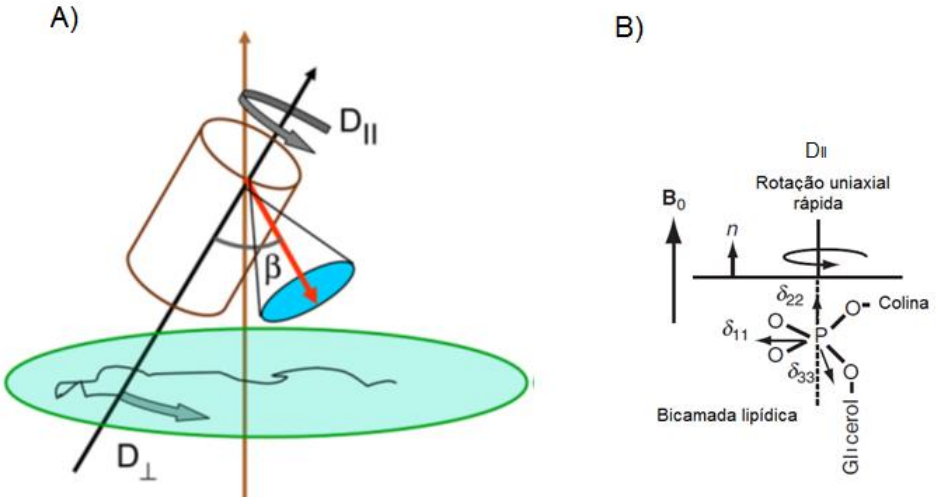


Figura 18: A) Modelo para representar a movimentação lipídica ao longo do eixo: rotação ao longo do eixo *y* (também conhecida como rotação axial, $D_{\parallel}$) e a rotação restrita ao longo do eixo ($D_{\perp}$, rotação wobble). B) Ilustração da rotação do núcleo de fósforo de um fosfolipídio em relação ao eixo da cadeia de ácido graxo. 3 eixos principais: δ_{11}, δ_{22} e $\delta_{33;}$ A componente δ_{22} do grupo fosfato é colinear a $D_{\parallel}$. Adaptado de Klauda et al. (2008) e Seelig (1978).

Em experimentos de RMN de ^{31}P, realizados com desacoplamento de hidrogênio, o alargamento do espectro é causado pela anisotropia do deslocamento químico (CSA) do núcleo de fósforo (Seelig, 1978). No caso limitante, de ausência de movimento molecular (por exemplo, um pó policristalino) o espectro de RMN do fósforo mostra uma superposição de espectros para todas as orientações (diferentes vetores) em relação a $\vec{B}_0$ (Figura 19). Por exemplo, espectros de vesículas de DMPC realizados a uma temperatura de 168 K, onde todos os movimentos são bloqueados, apresentam uma

forma de espectro semelhante ao mostrado na Figura 18A com os seguintes valores de tensores: σ_{xx} = -123 ppm, σ_{yy} = -24 ppm, σ_{zz} = 147 ppm (Dufourc *et al.*, 1992).

A obtenção de valores de CSA de núcleos de ^{31}P ($\Delta\sigma$) pode ser calculada a partir da equação de Seelig que relaciona a distância entre os tensores paralelos e perpendiculares obtidos no gráfico de RMN (Seelig, 1978):

$$\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp} \qquad \text{Eq. 9}$$

Onde $\sigma_{\parallel}$ é o limite do ombro de baixa intensidade e $\sigma_{\perp}$ é o limite do pico de maior intensidade em um espectro de RMN de ^{31}P (Seelig, 1978).

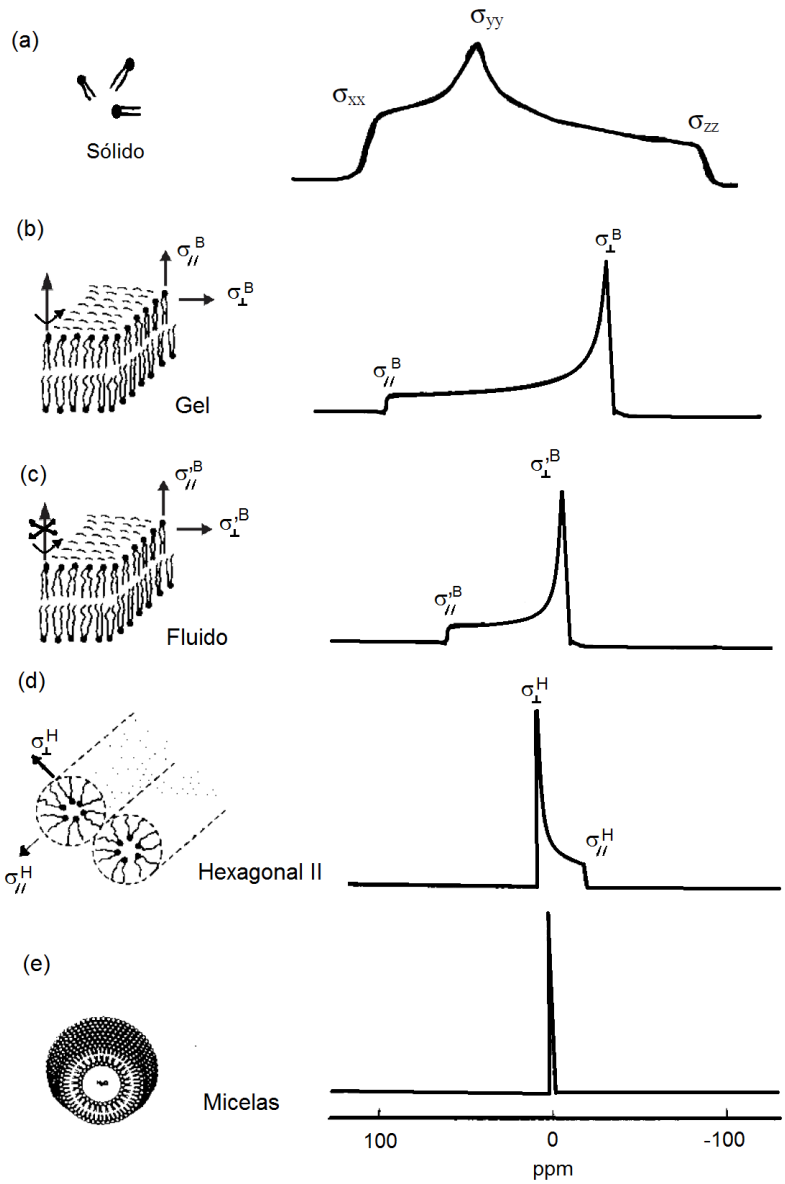


Figura 19: Espectros de RMN de ^{31}P de lipossomas no estado sólido (a) e influência da fase lipídica na forma dos espectros de RMN de ^{31}P: associação de lipídios em forma de bicamada “b” e “c”, fase hexagonal “d” e micelas “e”. Onde 3 eixos principais: δ_{11}, δ_{22} e δ_{33} estão mostrados como os tensores σ_{xx}, σ_{yy} e σ_{zz}, respectivamente. Onde $\sigma_{\parallel}$ é o limite do ombro de baixa intensidade e $\sigma_{\perp}$ é o limite do pico de maior intensidade. Adaptado de Seelig, 1978.

Como mostrado anteriormente, os fosfolipídios podem se associar em diferentes conjuntos, tais como micelas, bicamadas e H_{II} (Villasmil-Sanchez *et al.*, 2013). A forma dos espectros de RMN de ^{31}P pode indicar o tipo de associação lipídica. Por exemplo, os espectros de fosfolipídios que se associam em bicamada se apresentam com um ombro voltado para campo baixo e um pico isotrópico a campo alto (Figura 19b e c). Já no caso de uma associação fosfolipídica em H_{II}, o espectro apresenta uma assimetria invertida em comparação com os espectros de bicamada (Figura 19d). No caso de fosfolipídios associados na forma cúbica e rombica, bem como, em micelas invertidas, observa-se um espectro simétrico, Figura 19e (Pfeiffer *et al.*, 2012; Villasmil-Sanchez *et al.*, 2013).

Uma ressonância estreita é típica de um grupo de fósforo em arranjo desordenado (como em estado fluido, Figura 19c), enquanto que o fósforo com mobilidade restrita (típico de fase gel) apresenta um pico de ressonância mais largo (Figura 19b) (Debouzy *et al.*, 2002; Villasmil-Sanchez *et al.*, 2013).

Assim, o efeito de uma substância exógena em uma membrana lipídica pode ser avaliado pela técnica de RMN de fósforo: o aumento do valor da largura do espectro, quando comparado a um espectro de lipossomas puros, indica que a substância exógena causa um decréscimo da liberdade de movimento do grupo fosfato da membrana (Debouzy *et al.*, 2002; Timoszyk *et al.*, 2004).

2.4.3.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^{1}H)

A técnica de RMN de ^{1}H também pode ser usada para o estudo das configurações de fosfolipídios (Cheung e Olson, 1990). A Figura 20 mostra os espectros característicos de RMN ^{1}H da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina apresentados por Cheung e Oson (1990). Nesses espectros, pode-se observar a diferença entre os picos característicos de cada fosfolipídio. Para a fosfatidilcolina é verificado um pico a 3,3 ppm atribuído aos nove prótons da $-N(CH_3)_3$. Já para a fosfatidiletanolamina, observa-

se um pico deslocado para uma região de campo mais alto (~ 3,1 ppm), característico dos dois prótons do -CH_2N. Cabe salientar que, para uma mistura de fosfolipídios como, por exemplo, a ASO, espera-se uma sobreposição dos picos característicos de cada fosfolipídio presente.

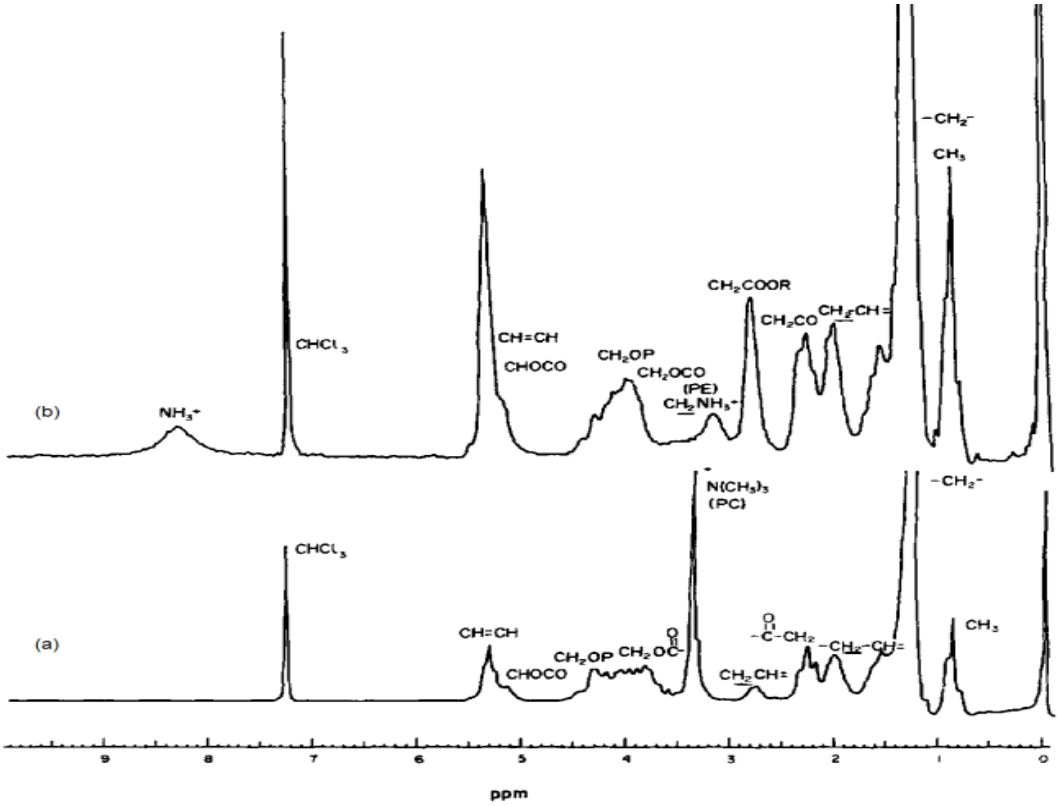


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H de a) fosfatidilcolina e b) fosfatidiletanolamina em solução de $CDCl_3$. Adaptado de Cheung e Olson (1990).

Estudos de relaxação de spin, revelam informações sobre a mobilidade das moléculas ou partes das moléculas (Atkins e De Paula, 2014). Estes estudos utilizam sequências de pulsos de energia na região da radiofrequência do ^1H, para estimular os spins em orientações especiais e monitorar o seu retorno para o equilíbrio. Por exemplo, estudos que envolvem a determinação de tempos de relaxação longitudinais (T_1)

de spins de prótons nas cadeias hidrocarbônicas de bicamadas podem fornecer informações sobreo efeito de substâncias na velocidade e ordem molecular de regiões específicas dos lipídios (De Lima *et al.*, 2007).

Os valores de T_1 estão relacionados ao tempo de correlação, definido como o tempo médio que uma molécula leva para girar em um (1,0) radiano, sendo um parâmetro para se estudar o efeito de um fármaco nos movimentos moleculares rotacionais da membrana, em função do regime de mobilidade do sistema a ser analisado.

O T_1 de ^1H está associado a contribuições de todos os núcleos do lipídio. As medidas de T_1 de ^1H dos prótons presentes nos grupos colina (a 3,2–3,4 ppm) e metilenos (a 1–2 ppm) lipídicos podem ser calculadas através da sequência de pulsos de recuperação de inversão (o qual consiste em aplicar a sequência de pulso 180º - τ - 90º). O pulso de 180º inverte a magnetização longitudinal e durante o intervalo de tempo τ, a magnetização evolui segundo o processo de relaxação longitudinal. Após a aplicação de um pulso de 90° surge um *FID* cuja amplitude é diretamente proporcional ao valor da magnetização (M_z) no instante τ. A partir desta sequência de pulsos é obtida uma curva que pode ser ajustada com a seguinte equação:

$$M_z = M_0 \left[1 - 2exp\left(\frac{\tau}{T_1}\right)\right] \qquad \text{Eq. 10}$$

Esta equação descreve o comportamento da magnetização M_z em função de τ. Assim, o valor do T_1 pode ser determinado a partir de um gráfico de amplitude de relaxação versus tempo de correlação.

2.4.3.4 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

A técnica de DSC mede a diferença de energia fornecida a uma amostra e a uma referência, em função de um gradiente de temperatura (Yonashiro, 2004). A técnica de DSC fornece informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas

de uma substância (Villasmil-Sanchez et al., 2013). As curvas de DSC relacionam a taxa de fluxo de calor contra temperatura. Desta curva, pode-se obter a variação de entalpia (*ΔH*) associada a processos exotérmicos e endotérmicos que ocorrem na amostra. A *ΔH* de transição é a energia, ou o calor, necessária para que a transição de fase gel para líquido-cristalino se complete (Atkins e De Paula, 2014). O valor de *ΔH* para cada evento é obtido através da integração da área sob o pico correspondente.

O estudo da transição da fase gel para líquido-cristalina em bicamadas lipídicas pode ser realizado através da análise da *ΔH* no sistema. A *ΔH* de transição de fase está relacionada ao ordenamento do arranjo molecular lipídico (El Maghraby *et al.*, 2005). Assim, informações relacionadas com as transições e ordenamento da membrana podem ser obtidas pela técnica de DSC (Biltonen e Lichtenberg, 1993).

O uso da técnica de DSC também pode elucidar efeitos de um agente externo sobre a temperatura de transição de fase principal (T_m) em membranas (Qiu *et al.*, 2012). A T_m descreve a temperatura de transição da membrana de uma fase gel para líquido cristalino, Figura 21, e é definida como a temperatura em que ocorre 50% de presença de lipídios em estado gel e o restante em estado fluido, em um sistema (Qiu *et al.*, 2012).

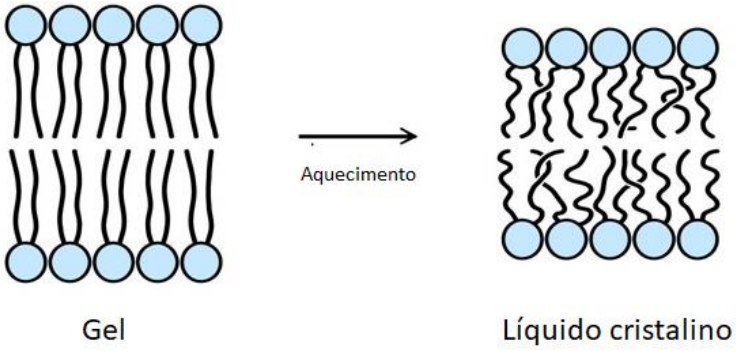


Figura 21: Esquema de transição de fase gel para líquido cristalino em membranas. Adapatado de Koynova e Caffrey (2001).

Como descrito anteriormente, a ASO é composta por uma mistura de fosfolipídios insaturados, que apresentam entre 16 a 18 carbonos na sua cadeia hidrocarbônica. Consequentemente, uma transição relativamente ampla, porém, bem definida, pode ser verificada entre -20 a -30 °C (Ulrich *et al.*, 1994; Taylor e Morris, 1995; Koynova e Caffrey, 2001). Dentre as relações entre a estrutura de um lipídio e a sua T_m constam: (i) à medida que a cadeia hidrocarbônica do lipídio aumenta, são verificados maiores valores de T_m, devido a maiores interações hidrofóbicas entre as cadeias maiores; (ii) cadeias insaturadas lipídicas apresentam cadeias hidrocarbonetos na conformação cis e/ou gauche, reduzindo os valores de T_m (Atkins e De Paula, 2012).

2.4.3.5 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

Através da técnica de UV-vis, pode-se observar a variação nos valores de absorbância de amostras contendo diferentes razões de substância ativa e lipídio. Através dos valores das absorbâncias, seguindo a Lei de Lambert-Beer, pode-se calcular a concentração molar da substância, bem como detectar o seu ponto de saturação quando incorporada para cada sistema lipossomal (Martins *et al.*, 2014).

Análises de turbidez em membranas podem ser realizadas através da espectroscopia UV-vis. Os valores de turbidez de sistemas coloidais puros e/ou contendo uma substância ativa, avaliados em, aproximadamente, 400 nm, podem indicar variações de tamanhos das partículas. Por exemplo, uma diminuição no valor da absorbância do sistema pode estar relacionada a uma redução no tamanho das partículas (Matsuzaki *et al.*, 2000).

Em adição, a diminuição da turbidez lipídica também pode estar relacionada a desordenamento de fases, devido a alterações na densidade lipídica nas transições de fase (Abramson, 1971).

2.4.4 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS têm sido de grande importância na determinação de tamanho, forma e interações das partículas (Chen e Luo, 2018). O SAXS tem sido muito utilizado para avaliar a nanoestrutura dos lipossomas. Os princípios do SAXS são similares aos da técnica de espalhamento de luz, ou seja, baseiam-se na interação da radiação com a matéria, gerando energia absorvida para amostra, ou espalhada para o meio (Keshari e Pandey, 2008).

Em uma dispersão coloidal, parâmetros como tamanho e a forma das partículas influenciam a intensidade, polarização e distribuição angular da energia espalhada. O tipo de interações entre as partículas e a diferença entre seus índices de refração também são responsáveis pelas variações da energia espalhada. Na técnica de SAXS, os ângulos de espalhamento acessados são muito pequenos (entre 0,5° e 4°) e detalhes estruturais de sistemas com comprimentos de correlação na região entre 0,5 e 50 nm podem ser estudados (Chen e Luo, 2018).

A intensidade do raio-X espalhado está relacionado com a diferença na densidade eletrônica entre diferentes partes do sistema em estudo (Keshari e Pandey, 2008). A Luz Sincrotron é uma luz de altíssima intensidade que abrange as faixas do infravermelho a dos raios-X, incluindo, as faixas da luz visível e a do ultravioleta. Neste contexto, os raios-X (apresentando comprimento de onda (λ) entre 0,01 e 0,2 nm) são produzidos quando elétrons, que viajam num anel próximos à velocidade da luz, são desacelerados (isso acontece quando eles são defletidos pelos ímãs dipolares). A Figura 22 mostra esquematicamente um experimento de SAXS (Chen e Luo, 2018).

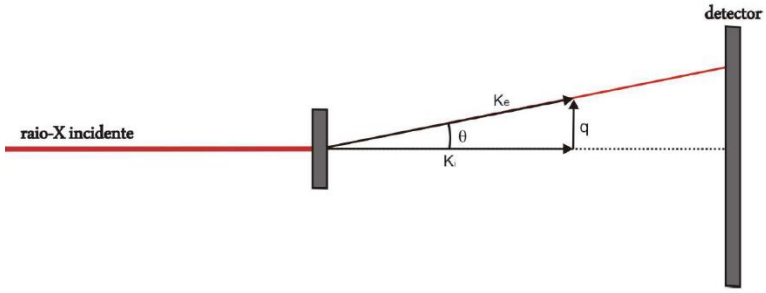


Figura 22: Representação esquemática de um experimento de SAXS. Um feixe de raios-X com vetor de onda incidente ki (altamente colimado e monocromático com comprimento de onda da radiação variável) incidindo sobre uma amostra e o espalhamento resultante (feixe espalhado, com vetor de onda *ke*) sendo coletado por um detector.

A Figura 22 mostra um feixe de raios-X com vetor de onda incidente ki altamente colimado e monocromático, com comprimento de onda da radiação variável incidindo sobre uma amostra, e o espalhamento resultante (feixe espalhado, com vetor de onda ks) sendo coletado por um detector. Neste experimento, o número de fótons como função do ângulo de espalhamento q é determinado (Keshari e Pandey, 2008). O módulo do vetor de espalhamento q é dado por:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda}\operatorname{sen}\frac{\theta}{2} \qquad \text{Eq. 11}$$

A intensidade de raios-X espalhada por uma determinada amostra em função de *q* é dada pela Equação:

$$I_s(q) = \frac{N_S(q)}{t_s} = I_0(\lambda)A_S\Delta\Omega\varepsilon Tt\left(\frac{d\Sigma}{d\Omega}\right)(q) + BG \qquad \text{Eq. 12}$$

Onde $I_s(q)$ é a intensidade medida durante um experimento e corresponde ao número de fótons (N_s) espalhados para um ângulo q, que chega a uma pequena área do detector por unidade de tempo t_s. O parâmetro $I_0(\lambda)$ corresponde ao fluxo incidente,

A_S é a área iluminada pelo feixe, $\Delta\Omega$ é o ângulo sólido definido pelo tamanho do pixel do detector, ε é a eficiência do detector, T e t são respectivamente a transmitância e a espessura da amostra e BG é o ruído (background). Finalmente, a expressão $\left(\frac{d\Sigma}{d\Omega}\right)(q)$ está associada ao espalhamento diferencial da seção transversal, em cm^{-1}. Tal expressão pode ser usada para comparar intensidades de espalhamento entre diferentes amostras, instrumentos ou volumes de espalhamento (Keshari e Pandey, 2008).

2.4.5 Ensaios de magnetização

As medidas de magnetização de amostras de NPM ou de magnetolipossomas podem ser realizadas usando a técnica de magnetometria de amostra vibrante (VSM). Nesta técnica, um material magnético é colocado sob a ação de um campo magnético uniforme, entre os polos de um eletroímã. Inicialmente o campo magnético é nulo, porém, com o aumento desse campo, seus momentos magnéticos se alinham produzindo um incremento de momento magnético (Lu *et al.*, 2007). O gráfico obtido fornece o comportamento da magnetização do material em função do campo magnético aplicado. Nos materiais ferri ou ferromagnéticos, o gráfico apresenta a forma de uma histerese magnética (descrita no item 2.1.1.2). Nesses materiais, quando o campo magnético é reduzido até zero, a partir da saturação, a magnetização não é reduzida proporcionalmente ao campo, produzindo assim a *Mr*. No caso de NP superparamagnéticas, a M_r e o H_c são zero (Martins e Trindade, 2012).

Diante do exposto, conhecer as interações moleculares entre os componentes dos magnetolipossomas e caracterizar o efeito do método de preparo, uso do solvente e força iônica em propriedades físico-químicas do sistema, é imprescindível para um design adequado e definição de parâmetros como, por exemplo, estabilidade, I% e cinética de liberação de fármacos (Montero *et al.*, 1998; Bermudez *et al.*, 1999).

3 Objetivo

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo investigar o efeito de dois métodos de preparo na eficiência de incorporação, estabilidade e propriedades físico-químicas de magnetolipossomas. No sistema mais estável, inserir um fármaco-modelo (quercetina) e caracterizar suas interações moleculares, propriedades físico-químicas, magnéticas e biológicas. Assim, contribuir com um banco de informações a serem usadas para o design e preparo de magnetolipossomas mais estáveis e eficientes para a terapia antitumoral.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar magnetolipossomas constituídos de ASO e NPM de maghemita através de dois métodos de preparo: hidratação de vesículas e evaporação em fase reversa.
- Determinar a percentagem de incorporação das NPM nos magnetolipossomas, através das técnias de UV-vis e HR-CS AAS;
- Avaliar a estabilidade dos magnetolipossomas, através das técnicas de DLS, UV-vis e potencial zeta;
- Estudar as propriedades físico-químicas dos magnetolipossomas, caracterizadas pelas técnicas de HATR-FTIR, RMN de ^{31}P e de ^{1}H, DSC e UV-vis;
- No sistema de magnetolipossoma mais estável avaliar os parâmetros de forma e estrutura através de medidas de SAXS;
- Incorporar a quercetina no sistema de magnetolipossoma mais estável e avaliar a sua influência sobre a incorporação, estabilidade e propriedades físico-químicas (através das técnicas descritas nos itens anteriores), bem como, o seu efeito nas propriedades magnéticas, a partir da técnica de VSM, e na viabilidade celular de células de glioma.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes utilizados

Para o desenvolvimento do presente trabalho, a ASO (constituída de uma mistura de fosfolipídios naturais extraídos da soja, com uma composição aproximada de 25% de fosfatidilcolina, 25% de fosfatidiletanolamina, 25% de fosfatidilinositol, e pequenas quantidades de outros fosfolipídios polares), NPM de maghemita (γ-Fe_2O_3, com tamanho menor que 50 nm), quercetina, hidrocloreto de hidroxilamina, cloreto de magnésio, tricina, 1,10-fenantrolina monohidratada, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido nítrico, hidróxido de amônio e etanol foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os ácidos nítrico e clorídrico utilizados para decomposição das amostras foi destilado em um destilador de ácido modelo duoPUR 2.0E (Milestone, Itália).

O clorofórmio, metanol e isopropanol foram obtidos através da Synth (São Paulo, Brasil). A água ultrapura utilizada neste trabalho foi previamente destilada, deionizada em uma coluna de troca iônica (condutividade máxima de 0,6 μS cm^{-1}) e purificada em um sistema Milli-Q, modelo Ultrapure Water Purification Systems (Millipore Corp., EUA) com resistividade de 18,2 MΩ cm. Os lipídios foram utilizados sem qualquer purificação adicional.

As soluções de referência monoelementar de ferro foram preparadas a partir de solução estoque de 1000 mg mL^{-1} (Assurance®, SpexCertiPrep, EUA) em HNO_3 5% (v/v). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Preparo dos magnetolipossomas

Os magnetolipossomas e seus controles foram preparados por dois métodos distintos, descritos a seguir.

4.2.1 Método de hidratação de vesículas (HV)

O método HV foi usado na preparação de magnetolipossomas. As etapas desse método consistiram em:

1) solubilizar o lipídio (100 mg mL^{-1}) em clorofórmio;

2) evaporar o solvente a 33 °C e a pressão reduzida, através do uso de rota evaporador (modelo 801A Fisatom de 70W), e eliminar os traços de solvente através de dessecador a vácuo;

3) hidratar o filme lipídico com NPM, na razão NPM: lipídio 0,002 m/m, baseado nos estudos realizados por Qiu e colaboradores (2012), dispersos em 1 mL de água ultrapura (definindo a amostra a ser denominada como HV(1)_NP) ou 1 mL de tampão tricina 10 mmol L^{-1} / $MgCl_2$ 2,5 mmol L^{-1} pH 7,4 (definindo a amostra a ser denominada como HV(2)_NP);

4) agitar em vortex, para formação das vesículas.

Os lipossomas-controle foram preparados através das mesmas etapas, na ausência de NPM (Hope *et al.*, 1986; Akbarzadeh *et al.*, 2013).

As diferentes organizações dos lipídios nas etapas 1 (solubilização do lipídio em clorofórmio), 2 (evaporação do solvente para formação do filme lipídico) e 3 (hidratação do filme lipídico com solução contendo NPM) descritas acima estão representadas na Figura 23.

As formulações foram submetidas ao ultrassom (em um banho sonicador Ultrasonic Clean 750A) por 15 min para obtenção da uniformidade do tamanho. Em seguida, os magnetolipossomas foram centrifugados a 1000 × G a 25 °C durante 15 min para remover as NPM não incorporadas.

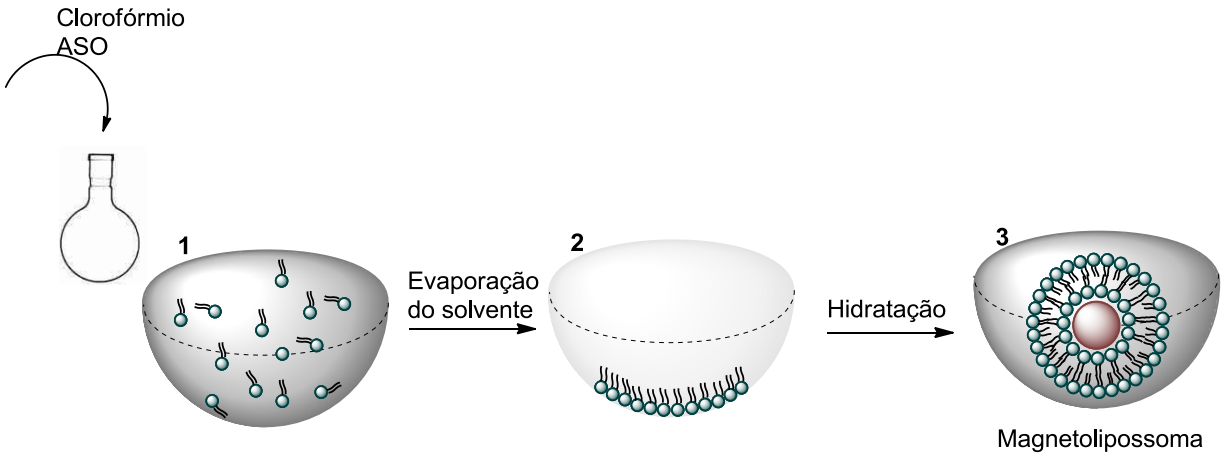


Figura 23: Representação das diferentes etapas de preparo de magnetoliopossomas via o método de hidratação de vesículas com a adição da NPM na etapa de hidratação do filme lipídico. Etapas: 1 (solubilização do lipídio em clorofórmio); 2 (evaporação do solvente para formação do filme lipídico); e 3 (hidratação do filme lipídico com solução contendo NPM para formação do magnetolipossoma).

4.2.2 Método de evaporação em fase reversa (FR)

O método FR foi usado na preparação de magnetolipossomas com tamanhos menores. Esta metodologia contemplou as seguintes etapas:

1) solubilizar o lipídio (ASO de 100 mgmL^{-1}) em clorofórmio e dispersar tal solução em uma fase aquosa (razão água/clorofórmio igual a 1:50, v/v). Durante a dispersão em fase aquosa, ocorre a formação de duas fases. A tendência é que o fosfolipídio esteja depositado sobre a interface água/solvente orgânico, por afinidade de polaridade entre: (i) as regiões polares lipídicas e a água, e (ii) entre as cadeias de hidrocarboneto e o solvente orgânico;

2) sonicar a suspensão por 3 min em um banho de ultrassom (Ultrasonic Clean 750A), para formação de uma dispersão opalescente de micelas reversas, onde as gotículas de água são cercadas pelos fosfolipídios;

3) evaporar o solvente, a 33 °C e a pressão reduzida, através de rotaevaporador (modelo 801A Fisatom de 70W) e eliminar os traços de solvente através de dessecação a vácuo. Nessa etapa, muitas micelas rompem e ocorre a formação de um organogel de alta viscosidade;

4) hidratar o filme lipídico para formação dos lipossomas com 1 mL de água ultrapura (definindo a amostra FR(1)), ou 1 mL de tampão tricina 10 mmol L^{-1} / $MgCl_2$ 2,5 mmol L^{-1} pH 7,4 (definindo a amostra FR(2)), e agitar em vortex (Hope *et al.*, 1986; Akbarzadeh *et al.*, 2013).

A inserção das NPM, com proporção de NPM: lipídio de 0,002 (m/m) no sistema foi realizada em duas etapas distintas, caracterizando quatro sistemas a serem testados e comparados:

a) as NPM foram adicionadas antes da etapa de evaporação do clorofórmio, juntamente com adição da fase aquosa. As amostras suspensas em água ultrapura foram denominadas FRa(1)_NP, e as suspensas em tampão tricina 10 mmol L^{-1} / $MgCl_2$ 2,5 mmol L^{-1} pH 7,4, FRa(2)_NP. As diferentes etapas para este procedimento estão representadas na Figura 23;

b) as NPM foram adicionadas na etapa de hidratação do filme lipídico com solvente. Quando o solvente constou de água ultrapura, as amostras foram denominadas FRb(1)_NP. Quando constou de tampão tricina 10 mmol L^{-1} / $MgCl_2$ 2,5 mmol L^{-1} pH 7,4 as amostras foram denominadas FRb(2)_NP. As diferentes organizações dos lipídios para este procedimento estão representadas na Figura 25.

Assim como no método de HV, as formulações foram colocadas em um banho de ultrassom por 15 min para obtenção da uniformidade do tamanho dos lipossomas. Após as amostras contendo NPM (magnetolipossomas) foram centrifugadas a 25 °C e 1000 × G durante 15 min para remover as NPM não incorporadas.

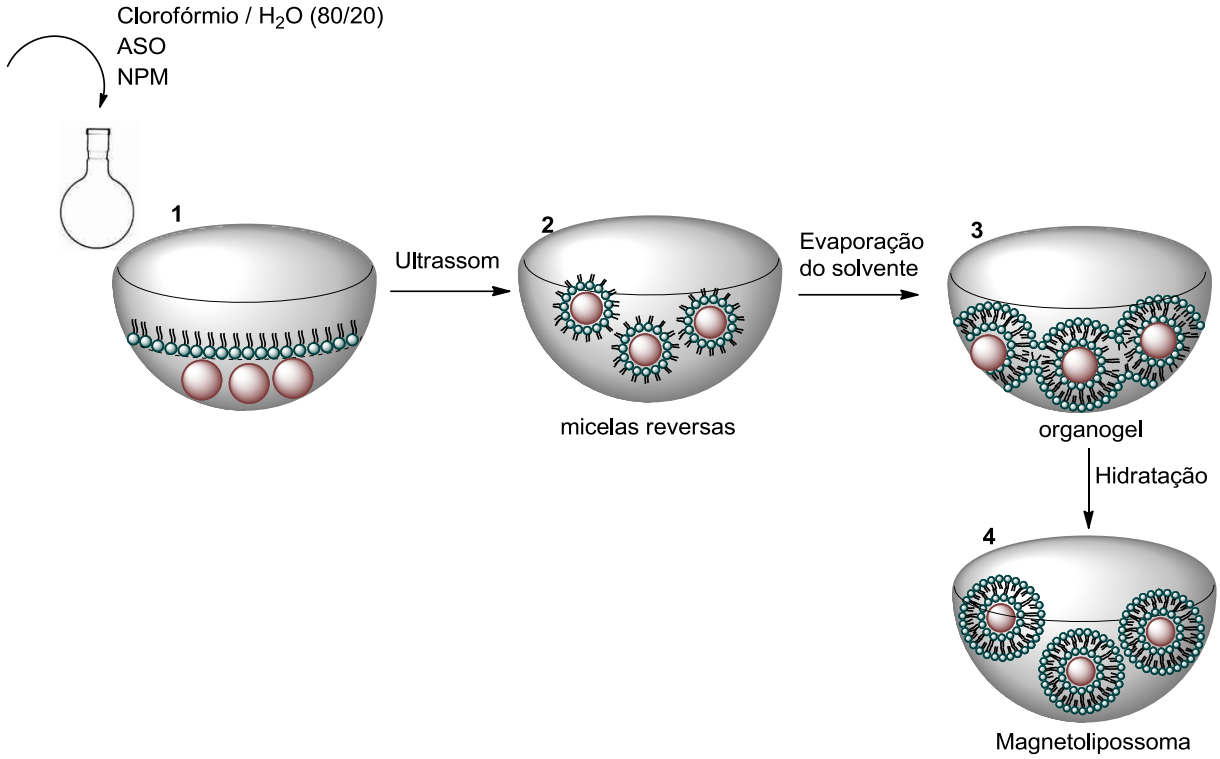


Figura 24: Representação das diferentes etapas do método de evaporação em fase reversa com a adição da NPM durante a etapa de solubilização do fosfolipídio: 1) solubilização do lipídio em clorofórmio e solução contendo NPM; 2) sonicação da suspensão para formação de micelas reversas, 3) evaporação do solvente com a formação de um organogel de alta viscosidade; 4) hidratação do filme lipídico para formação dos lipossomas através de agitação em vortex.

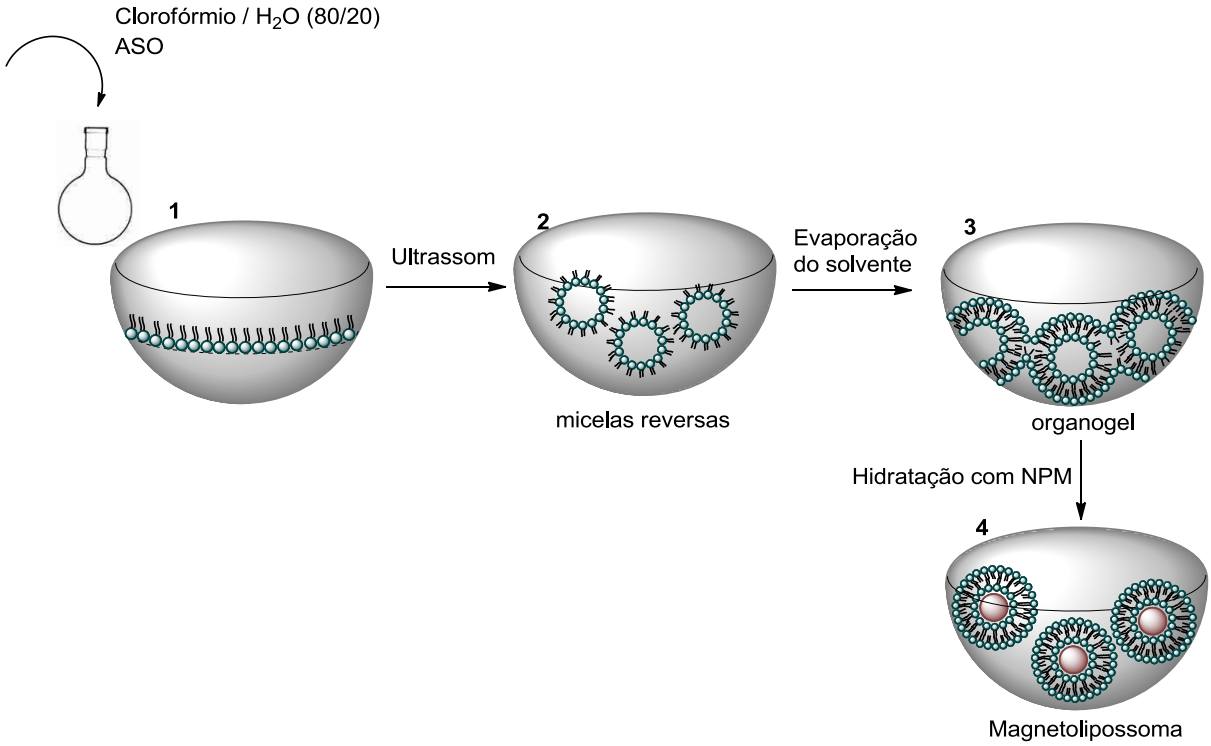


Figura 25: Representação das diferentes etapas do método de evaporação em fase reversa com a adição da NPM na etapa de hidratação.1) solubilização do lipídio em clorofórmio e solução aquosa; 2) sonicação da suspensão para formação de micelas reversas; 3) evaporação do solvente com a formação de um organogel de alta viscosidade; 4) hidratação do filme lipídico para formação dos lipossomas através de agitação em vortex. A NPM foi adicionada na etapa 4.

Os lipossomas-controle foram preparados através das mesmas etapas, na ausência de NPM. A Tabela 4 resume a descrição dos magnetolipossomas e seus lipossomas-controle (e suas abreviações), segundo seu método e condições de preparo.

Tabela 4: Denominação de cada amostra de magnetolipossomas e lipossomas–controle, de acordo com o método e condições de preparação.

Formulação	Método e condições de preparo
HV(1)	Lipossoma-controle preparado pelo método de hidratação de vesículas: hidratação usando água
HV(1)_NP	Magnetolipossoma preparado pelo método de hidratação de vesículas, NPM dispersa em água
HV(2)	Lipossoma-controle preparado pelo método de hidratação de vesículas: hidratação usando tricina/$MgCl_2$
HV(2)_NP	Magnetolipossoma preparado pelo método de método de hidratação de vesículas: NPM dispersa em tampão tricina/$MgCl_2$
FR(1)	Lipossoma-controle preparado pelo método de evaporação em fase reversa: hidratação usando água
FRa(1)_NP	Magnetolipossoma preparado pelo método de evaporação em fase reversa: NPM dispersa em água, adicionada antes da etapa de rotaevaporação do solvente, juntamente com a dispersão do lipídio em $CHCl_3/H_2O$
FRb(1)_NP	Magnetolipossoma preparado pelo método de evaporação em fase reversa: NPM dispersa em água, adicionada na etapa de hidratação do lipídio
FR(2)	Lipossoma-controle preparado pelo método de evaporação em fase: hidratação usando tampão tricina/$MgCl_2$
FRa(2)_NP	Magnetolipossoma preparado pelo método de evaporação em fase reversa: NPM dispersa em tampão tricina/$MgCl_2$, adicionada antes da etapa de rotaevaporação do solvente, juntamente com a dispersão do lipídio em $CHCl_3$/tampão
FRb(2)_NP	Magnetolipossoma preparado pelo método de evaporação em fase reversa: NPM dispersa em tampão tricina/$MgCl_2$, adicionada na etapa de hidratação do lipídio

4.2.3 Encapsulamento da quercetina nos magnetolipossomas

A quercetina foi encapsulada em apenas um dos sistemas de magnetolipossomas testados (no sistema abreviado como ML_QC), assim como em um sistema lipossomal (para ensaio-controle, abreviado como LP_QC). As amostras com quercetina foram preparadas pelo método de FR, a partir de uma mistura de 100 mg mL^{-1} de lipí-

dio, 0,2 mg mL^{-1} de NPM de maghemita (para o preparo de magnetolipossomas) e 500 µmol L^{-1} de quercetina (razão quercetina: lipídio igual a 0,0015, m/m no sistema), em uma proporção de clorofórmio: álcool metílico: tampão igual a 50: 17: 1 (v/v) (Szoka e Papahadjopoulos, 1978; Mertins *et al.*, 2005).

Para o preparo do magnetolipossoma-controle (amostra denominada ML) e magnetolipossoma contendo quercetina (amostra ML_QC) as NPM foram adicionadas na etapa de evaporação do clorofórmio juntamente com adição da fase aquosa. As etapas subsequentes foram idênticas às descritas nos itens 4 e 5 da seção 4.2.2. A hidratação dos magnetolipossomas e seus controles foi realizada usando tampão tricina 10 mmol L^{-1} / $MgCl_2$ 2,5 mmol L^{-1} pH 7,4.

4.3 Determinação da estabilidade

Os ensaios de estabilidade dos magnetolipossomas foram realizados por determinação e análise do tamanho dos sistemas (definido como 0, 20 e 50 dias após o preparo dos sistemas). O ensaio de TBARS, associado à lipoperoxidação dos sistemas, foi realizado para correlacionar a influência do grau de oxidação do sistema com o tamanho dos magnetolipossomas ao longo do tempo. Em complementação aos estudos de estabilidade também foram realizadas medidas da carga superficial ao longo do tempo (0, 20 e 50 dias) nos magnetolipossomas e seus controles.

4.3.1 Análises do tamanho

4.3.1.1 Difração de raios-X

Esta técnica foi usada para determinar o tamanho das NPM de maghemita, para comparação e controle com as amostras de magnetolipossomas. Previamente à caracterização por DRX, as NPM foram secas a 80 °C durante 2 h. Os difratogramas de rai-

os-X foram obtidos em um equipamento D8 Advance X-ray diffractometer (radiação de Cu K α_1, λ=1,5406 Å, Bruker-AXS, Alemanha), operando com uma corrente de 40 mA e fonte com potência de 40 kV, com padrão de Si (SRM640). A fenda de divergência foi de 0,1° e a fenda de recepção foi de 0,15°. Os ângulos 2θ inicial e final foram estabelecidos a 10° e 120°, respectivamente. A velocidade de varredura foi de 3°min^{-1}. Os resultados foram avaliados com o auxílio do software Diffrac.Eva v3. O diâmetro médio das partículas foi determinado pela fórmula de Scherrer usando a meia-largura dos picos de difração de raios-X mais intensos (Patterson, 1939). O tamanho médio das NPM de γ-Fe_2O_3 foi determinado utilizando o pico a 2θ = 35,6 ° (índices de Miller (3 1 1).

4.3.1.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Esta técnica foi usada para determinar o forma e distribuição de tamanho das NPM de maghemita, para comparação com os resultados obtidos pela técnica de DRX. As imagens de MET das NPM foram obtidas no microscópio JEOL JEM-1011 TEM. As NPM foram dispersas em isopropanol e 6 µL da dispersão foram depositados sobre grid de cobre recoberto com filme de carbono ultrafino. Após secagem do solvente, o grid foi analisado no microscópio em tensão de 100 kV.

4.3.1.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Os ensaios de DLS dos magnetolipossomas foram realizados utilizando-se um equipamento Zetasizer – Malvern UK – Nano ZS (Worcestershire, Inglaterra). As medidas foram realizadas a 25ºC, usando-se como dispersante água ultrapura, um caminho óptico de 1 cm e um ângulo fixo de 173 ºC. Um volume de 25 µL da suspensão foi disperso em 1mL de água ultrapura, sendo posteriormente homogeneizado em vortex. Como dito anteriormente, foram realizadas medidas no tempo zero (após o preparo), 20 e 50 dias.

4.3.2 Análise da peroxidação lipídica nas membranas

Para correlacionar os dados de tamanho dos magnetolipossomas (medidos ao longo do tempo) com o seu grau de lipoperoxidação induzido pelas espécies reativas presentes na atmosfera, foi realizado o ensaio de TBARS (Ohkawa *et al.*, 1979; Bird e Draper, 1984). Assim, magnetolipossomas e lipossomas-controle (12,5 mg mL^{-1} de ASO em tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1}, pH 7,4; razão m/m NPM para lipídio 0,002), foram incubados durante 30 minutos a 37 ºC. Em seguida, foram incubados com ácido tricloroacético (12%, m/v) e TBA (0,73%, m/v) por 30 minutos a 100 °C. A percentagem de TBARS foi determinada a partir de leitura espectrofotométrica a 535 nm do complexo MDA-TBA, como mostrado anteriormente na Figura 15 (Bird e Draper, 1984; Halliwell e Gutteridge, 1990; Fagali e Catala, 2009).

4.3.3 Análise da carga superficial – Medidas de potencial zeta

A avaliação do potencial zeta foi realizada nas NPM de maghemita dispersas em água e em tampão (para uma concentração de 0,2 mg mL^{-1}), bem como nos magneto-lipossomas e seus controles. Essas suspensões, antes das análises, foram dispersas em um banho de ultrassom durante 5 minutos. Para as medidas, 25 µL das dispersões e dos sistemas de magnetolipossomas e seus controle foram diluídos em 1mL de água ultrapura, e homogeneizadas em vortex. A seguir, foram transferidos para a célula eletroforética e os valores de potencial zeta foram obtidos utilizando um equipamento Zetasizer – Malvern UK – Nano ZS, a 25ºC. As medidas foram realizadas em triplicatas conduzidas em 14 ciclos sob uma voltagem de 4 mV. Foram realizadas medidas no tempo zero (após o preparo), 20 e 50 dias.

4.4 Determinação da percentagem de incorporação das nanopartículas magnéticas

A determinação da I%, expressa como a percentagem total de NPM nas formulações estudadas, foi determinada por duas diferentes técnicas: UV-vis e HR-CS AAS. Para as medições por HR-CS AAS foram realizados dois ensaios: com atomização em forno de grafite e com atomização em chama.

4.4.1 Espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

A determinação de Fe usando espectrofotometria UV-vis foi realizada em um espectrofotômetro modelo UV-2550 da Shimadzu (Japão), com células de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. O ferro foi determinado como um complexo de $[Fe(C_{12}H_8N_2)_3]^{2+}$, através do método colorimétrico baseado na presença de íons ferrosos, detectados a partir da orto-fenantrolina (KIWADA et al, 1986). Com este fim, 0,1 mL de magnetolipossomas foram adicionados a 0,05 mL de solução de triton X-100 a 5% (v/v). Em seguida, o óxido de ferro foi solubilizado por adição de 0,5 mL de HCl concentrado. De forma a reduzir o íon férrico, adicionou-se 0,5 mL de solução de cloridrato de hidroxilamina (10%). Depois de 15 minutos, 1mL da solução de orto-fenantrolina (0,5%) foi adicionada e a mistura foi neutralizada com NaOH 12 mol L^{-1}. O pH foi ajustado para 4,0 com solução de citrato de sódio a 30%. O volume da amostra foi então ajustado para 10mL com água ultrapura. Foi realizada a leitura de absorbância do complexo $[Fe(C_{12}H_8N_2)_3]^{2+}$ a 510 nm.

Os cálculos da concentração de Fe nas amostras foram efetuados a partir de uma curva de calibração. Tal curva de calibração foi realizada com diversas concentrações de NPM: 0,04; 0,08; 0,12; 0,16; e 0,20 mg mL^{-1}. Para a determinação espectrofotométrica, retirou-se 0,1 mL das frações contendo magnetolipossomas e após reação com a orto-fenantrolina obteve-se a concentração de ferro em mg mL^{-1}.

4.4.2 HR-CS AAS com atomização em forno de grafite (HR-CS GF AAS)

A determinação de Fe foi feita em um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua modelo contrAA 700 da Analytik Jena (Jena, Alemanha). Uma lâmpada de arco curto de Xe que opera no modo "hot-spot" foi usada como fonte de radiação. Um detector de matriz CCD linear com 588 pixels (200 pixels utilizados para fins analíticos e o restante para funções internas) também foi usado. As medidas foram realizadas utilizando a linha de ressonância principal do ferro (248,327 nm). A determinação da concentração de ferro foi realizada após tratamento dos magnetolipossomas com água-régia. Neste método, cerca de 100 mg de sobrenadante dos magnetolipossomas foram transferidas para os vasos de polipropileno contendo mistura de HNO_3 e HCl concentrados. Em seguida, as amostras foram imersas em um banho de ultrassom durante 5 min e os extratos foram diluídos a 10 mL com água ultrapura para determinação por HR-CS GF AAS.

4.4.3 HR-CS AAS com atomização em chama (HR-CS F AAS)

Para este ensaio, o mesmo modelo de espectrômetro de absorção atômica descrito no item 4.3.2 foi utilizado. A composição da chama foi operada com uma vazão de acetileno de 1,8 L min^{-1} e de ar de 60 L min^{-1}. As medidas foram realizadas utilizando a linha de ressonância principal do ferro (248,327 nm). O método de preparo de amostra foi a digestão ácida assistida por micro-ondas (MW-AD). Neste caso, um sistema de preparação de amostras de micro-ondas modelo Multiwave 3000® Anton Paar (Graz, Áustria), equipado com vasos de quartzo foi utilizado, sendo utilizados quatros vasos para este trabalho. Inicialmente, cerca de 200 mg de amostra foram transferidas para os tubos de quartzo, juntamente a 6 mL de HNO_3 concentrado. Os tubos foram colocados dentro do forno de micro-ondas com o seguinte programa de aquecimento: i) 800 W (com uma taxa de aquecimento de 15 min); ii) aplicação de 800 W durante 10 min; e

iii) 0 W durante 20 min (etapa de resfriamento). As amostras digeridas foram diluídas até 30 mL com água ultrapura para posterior determinação de Fe por HR-CS F AAS.

A I% das NPM de maghemita das amostras de magnetolipossomas analisados por diferentes técnicas foi calculada a partir da seguinte equação:

$$I(\%) = [(NPM)_{sobrenadante}/(NPM)_{total}] \times 100 \qquad \text{Eq. 13}$$

A (NPM) total refere-se à concentração de ferro convertida para concentração de NPM (mg mL^{-1}) presente na amostra não centrifugada. A (NPM) sobrenadante refere-se à concentração de ferro convertida para concentração de NPM (mg mL^{-1}) após a etapa de centrifugação, durante a preparação dos magnetolipossomas. Assim, para este ensaio, as concentrações de NPM foram analisadas nos sistemas de magnetolipossomas que não passaram pelo processo de centrifugação (para determinação da concentrçaão de NPM adicionada) e dos sobrenadantes dos magnetolipossomas centrifugados (para determinação da concentrçaão de NPM incorporada).

Para a validação do método de HR-CS AAS foram avaliados os limites de detecção (LOD, definido como a concentração mínima do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada) e de quantificação (LOQ, definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas) (Currie e Horwitz, 1994). Os valores de LOD e LOQ foram definidos como 3 e 10 vezes o desvio padrão de 10 medições do branco, dividido pelo coeficiente angular da curva de calibração, respectivamente (Little, 2015). Em adição foi realizado o ensaio de recuperação. Este ensaio está relacionado com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. O es-

tudo da recuperação consistiu na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. A quantidade percentual recuperada pelo processo foi calculada:

$$Recuperação\ (\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \qquad \text{Eq. 14}$$

Onde C_1 é a concentração de ferro determinada no magnetolipossoma fortificado, C_2 a concentração de ferro determinada na amostra não fortificada e C_3 a concentração de analito adicionada. Para a determinação da porcentagem de recuperação foi realizado a adição de 0,17 mg L^{-1} de ferro nas amostras de magnetolipossoma FRa(2)_NP.

4.5 Determinação do percentual de encapsulamento de quercetina

A percentagem da quercetina encapsulada (EEq%) nos magnetolipossomas de ASO foi determinada espectrometricamente por medidas UV-vis através do seu efluxo para o meio reacional, após solubilização das membranas com o surfactante Triton X-100. Experimentos controle (branco) foram realizados com magnetolipossomas puros, na ausência da quercetina. As medidas foram realizadas a 367 nm, considerando o coeficiente de extinção molar da quercetina em água igual a 1,8 x 10^4 $mol^{-1}L^1s^{-1}$ (Kasaikina *et al.*, 2010), através de espectrômetro Shimadzu UV-2550, utilizando células de quartzo com caminho óptico de 1 cm. Com a finalidade de verificar a real quantidade de quercetina adicionada nos magnetolipossomas durante o seu preparo foram realizadas análises em amostras de magnetolipossomas contendo quercetina (os quais não haviam passado pelo processo de centrifugação).

A EEq% da amostra foi calculada a partir da seguinte equação:

$$EEq(\%) = [(QC)_{sobrenadante}/(QC)_{total}] \times 100 \qquad \text{Eq. 15}$$

A (QC) total refere-se à concentração de quercetina (mg mL^{-1}) presente na amostra não centrifugada. A (QC) sobrenadante refere-se à concentração de querceti-

na (mg mL^{-1}) após a etapa de centrifugação, durante a preparação dos magnetolipossomas.

4.6 Caracterização físico-química

Nesta seção, serão descritos os procedimentos utilizados através das técnicas: HATR–FTIR, RMN de ^{31}P e de ^{1}H, DSC, UV-vis e SAXS. Todos os ensaios contaram com controles na forma de lipossomas em função da técnica de preparo HV ou FR.

4.6.1 Estudos com espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As NPM de maghemita foram caracterizadas através de medidas por FTIR no modo refletância difusa, DRIFT, usando um espectrômetro Shimadzu IR Prestige-21 (Quioto, Japão), equipado com uma célula de reflexão difusa com seletor Grase by Specac (Eurolabo, França). Para isto, as NPM foram previamente secas a 80 °C por 2 horas e, em seguida misturadas a KBr anidro e depositadas em um suporte cônico. O espectro foi obtido a 23 °C, considerando a média de 40 varreduras, na faixa de frequência entre 4000-400 cm^{-1}, com uma resolução de 2 cm^{-1}. Os dados obtidos foram tratados por um software da Shimadzu IR solution software 1.5.

Já as amostras de magnetolipossomas e lipossomas-controle foram caracterizadas por FTIR no modo HATR através do aparelho Shimadzu IR Prestige-21 (Kyoto, Japão). Nesta análise, 40 varreduras foram feitas à temperatura ambiente na faixa de frequência de 400 a 4000 nm, com resolução de 2 cm^{-1}. Os espectros também foram analisados utilizando o software Shimadzu IR solution 1.5. Foram analisados os valores de frequência e alargamentos a 75% da altura dos picos referentes a estiramentos axiais de grupos lipídicos.

4.6.2 Estudos com ressonância magnética nuclear (RMN)

4.6.2.1 Medidas de RMN de ^{31}P

As medidas de RMN de ^{31}P dos magnetolipossomas e lipossomas-controle foram realizadas a 161 MHz, em equipamento de RMN Bruker 400 MHz (Ettlingen, Alemanha). As amostras foram analisadas em solvente H_2O:D_2O (80:20, v/v). Para as medidas, o equipamento de RMN foi configurado com número de scans de 2048, número de dummy scans de 4s; delay: 0,2 s; tempo de aquisição de 0,5111808 s. As medidas de largura dos espectros de RMN ^{31}P foram baseados na formulação de Seelig (ver seção 2.4.3.2) onde os valores de CSA são obtidos através do cálculo entre a distância dos vetores paralelos e perpendiculares correspondentes aos tensores característicos do núcleo de fósforo dos fosfolipídios (Seelig, 1978).

4.6.2.2 Medidas de RMN de ^{1}H

As medidas de RMN de ^{1}H dos magnetolipossomas e lipossomas-controle foram realizadas a 400 MHz, em equipamento de RMN Bruker 400 MHz (Ettlingen, Alemanha). As amostras foram analisadas em solvente H_2O:D_2O (80:20, v/v). Para obtenção dos valores do T_1 de ^{1}H do grupo colina e metilênicos lipídicos, a sequência de pulsos de recuperação de inversão foi utilizada. A faixa de tempo de correlação utilizada foi de 0,4 a 12,8 s (de Lima et al., 2010). Os experimentos foram realizados a 25°C.

4.6.3 Ensaios de calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Os experimentos de DSC dos magnetolipossomas e lipossomas-controle foram efetuados em aparelho Shimadzu DSC-60 (Quioto, Japão). A faixa de temperatura utilizada foi de -45ºC a - 5ºC, segundo a temperatura de transição de fase dos componentes da ASO (por exemplo, ácido oleico a -20°C). A calibração do aparelho foi realizada

com o elemento índio. A taxa de aquecimento utilizada foi de 5 °C min^{-1}, sob fluxo de nitrogênio de 50/50 mL min^{-1}. A referência para este ensaio foi uma célula de alumínio vazia. Foram avaliadas as ΔH e T_m dos lipídios induzidas pela presença NPM. A ΔH foi obtida por integração da área sob o pico obtida utilizando o Software Universal 4.0 C (TA Instrument).

4.6.4 Medidas de turbidez por espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

As medidas da turbidez dos magnetolipossomas e lipossomas-controle foram realizadas a 400 nm por meio de espectrofotômetro de UV-vis Shimadzu UV-2550 (Kyoto, Japão). Para as medidas, 25 µL de magnetolipossomas e lipossomas-controle foram diluídos em 1mL de água ultrapura, e homogeneizadas em vortex. Os sistemas coloidais foram transferidos para a célula de quartzo com um caminho óptico de 1 cm.

4.6.5 Ensaios de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS da amostra de magnetolipossoma (definida pelos estudos de estabilidade) e do seu lipossoma-controle foram realizadas na linha D11A SAXS do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) em Campinas e foram baseadas no procedimento descrito por (Batista *et al.*, 2017). Os ensaios foram executados a 25 °C e o comprimento de onda do feixe incidente foi definido como 0,1488 nm. As amostras foram injetadas em um suporte de 1,0 mm de espessura, especialmente desenvolvidos para a linha de SAXS do LNLS. A luz do feixe incidente cruzou as amostras através de um tubo evacuado (P < 0,1 mBar) e foi espalhada para um detector 2D mar-CCD com área ativa de 16 cm^2. O ajuste das curvas que melhor se aproximam aos dados experimentais foi realizado utilizando o software SASfit que usa a aproximação dos mínimos quadrados.

4.7 Medidas de propriedades magnéticas

As medidas das propriedades magnéticas das NPM de maghemita, magnetolipossomas e lipossomas-controle foram obtidas em magnetômetro de amostra vibrante, modelo MicroSense EV9, marca MicroSense LLC (Tóquio, Japão). A faixa de campo magnético aplicado foi de -5 kOe a +5 kOe. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente para as NPM de maghemita e a 37 °C para os magnetolipossomas e lipossomas-controle. Para os dois últimos sistemas, 74 µL de cada dispersão foram previamente sonicados por 10 min. As propriedades magnéticas dos materiais foram avaliadas em termos de magnetização controlada por um microcomputador, e este gerenciado pelo software TDL-V-3.1.x, que também é responsável pela aquisição e registro de dados.

4.8 Ensaio de viabilidade celular

As linhagens celulares de glioma de rato (C6) foram cultivadas em meio de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados seguindo a redução colorimétrica do MTT, 3-(4,5-dimetiazol-2il) 2,5-difenil tetrazólio de brometo, à formazan. Resumidamente, as linhagens celulares C6 foram subcultivadas em placas de 96 poços de cultura de tecidos contendo 1000 células por poço, por 24h de cultura. Após este período, as células foram expostas ao tratamento com NPM livres (dispersas em tampão tricina na concentração de 0,2 mg mL^{-1}) e a amostras contendo: a) magnetolipossomas (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002, amostra denominada ML); b) magnetolipossomas contendo quercetina (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002 e quercetina: ASO = 0,0015, amostra denominada ML_QC); c) lipossomas na presença e na ausência de quercetina (com razões iniciais m/m quercetina: ASO = 0,0015, amostra denominada LP_QC e LP, respectivamente). Todas as amostras foram diluídas em 120 µL

de DMEM 10 % de SFB para se obter as concentrações de 50 μmol L^{-1} de quercetina. Após 24h de tratamento, os resultados do ensaio de MTT foram expressos como absorbância a 492 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma melhor compreensão, os resultados serão apresentados em duas partes: a primeira seção será referente ao estudo dos parâmetros estabilidade, incorporação e físico-químicos dos magnetolipossomas, e, a segunda, será relacionada com o efeito da quercetina (fármaco-modelo) nos parâmetros físico-químicos, magnéticos e biológicos dos magnetolipossomas.

SEÇÃO I: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE, PERCENTAGEM DE INCORPORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS MAGNETOLIPOSSOMAS

5.1 Estabilidade dos magnetolipossomas

A estabilidade dos magnetolipossomas HV(1)_NP, FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, HV(2)_NP, FRa(2)_NP e FRb(2)_NP foi monitorada através de ensaios de DLS em função do tempo (medidas realizadas em 0, 20 e 50 dias após o preparo), pelo ensaio de TBARS (no tempo zero), e potencial zeta em função do tempo (medidas realizadas em 0, 20 e 50 dias após o preparo). Da mesma forma, lipossomas-controle também foram monitorados.

Previamente às medidas de DLS dos magnetolipossomas e controle, o diâmetro médio e forma das NPM foi determinado pelas análises de DRX e MET. A Figura 26 apresenta o difratograma obtido para as amostras de NPM em pó. O difratograma apresentou os mesmos padrões de difração encontrados por outros autores, característicos de uma estrutura de espinélio inverso (Sun *et al.*, 2004). Foram observados os picos de difração com valores de 2θ em 30,2°, 35,6°, 43,3°, 53,3°, 57,3° e 62,9° correspondente aos planos cristalinos (220), (311), (400), (422), (511) e (440) (De Souza *et al.*, 2010; Da Costa e De Souza Junior, 2014). De acordo com o difratograma a

amostra de NPM em pó revelou a formação cúbica, de acordo com a ficha padrão ID COD 9006317. Utilizando-se a linha de difração mais intensa (35,6°), através da equação de Scherrer, calculou-se o tamanho médio do cristalito para as NPM de maghemita. O valor encontrado foi de 35,5 nm. As NPM têm, em média, um tamanho menor de 50 nm e devem apresentar no máximo dois cristalitos em sua estruturação (mínimo 35,5 nm e máximo 50 nm de tamanho).

Apesar do maior tamanho das NPM utilizadas neste trabalho em relação à espessura de bicamadas lipídicas (em torno de 7-9 nm) a inserção dessas NPM, tanto no interior como na superfície da membrana lipídica, é possível devido à possibilidade de distorção da membrana (Santhosh *et al.*, 2012; Nappini *et al.*, 2016).

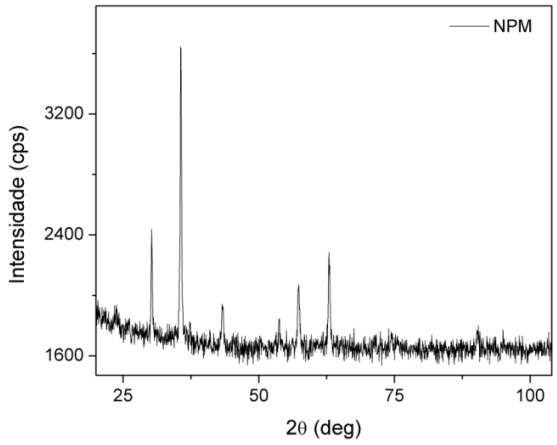


Figura 26: Difratograma obtido para as NPM de maghemita. O pico usado para determinar o tamanho médio do cristalito foi em 2θ = 35,65°, índice de Miller (3 1 1).

Em adição aos ensaios de DRX, foram obtidas micrografias por MET das NPM estudadas (Figura 27). As micrografias apresentadas na Figura 27, indicam que as NPM de maghemita tendem a ser esféricas e polidispersas, porém com tamanhos inferiores a 50 nm.

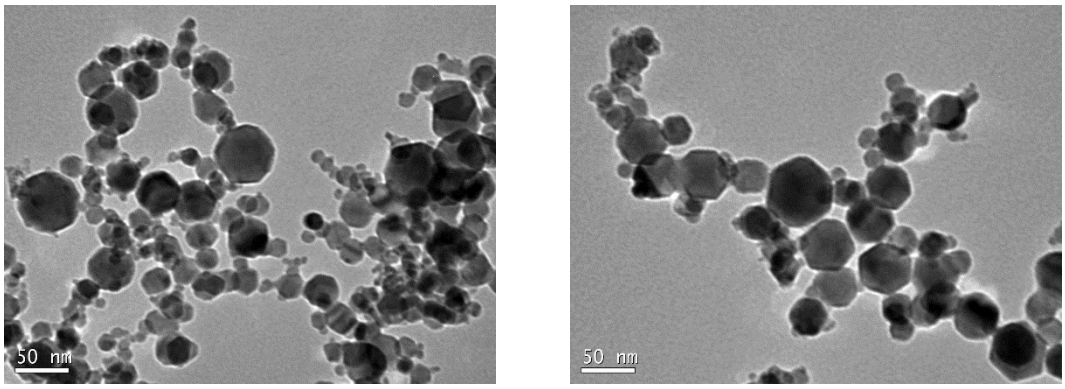


Figura 27: Micrografias obtidas via microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de maghemita.

Os dados referentes ao diâmetro médio dos magnetolipossomas e seus respectivos controles, preparados pelos métodos de HV e FR, obtidos pela técnica de DLS, estão demonstrados na Tabela 5, e ilustrados para melhor visualização na Figura 28 e na Figura 29. Diferentes valores de <D> foram encontrados: os magnetolipossomas preparados pelo método de HV apresentaram tamanhos entre 450 – 550 nm, enquanto que os preparados pelo método de FR entre 220 – 290 nm.

Pradhan e colaboradores (2007) demonstraram que a ampla distribuição de tamanho encontrada em magnetolipossomas foi influenciada pelo método de preparo utilizado (Pradhan *et al.*, 2007). No trabalho, os autores prepararam magnetolipossomas encapsulando ferrofluidos de ferrita de manganês revestidos com ácido láurico em diferentes proporções molares de fosfatidilcolina de ovo e colesterol por dois métodos diferentes: HV e dupla emulsão (DE) (Pradhan *et al.*, 2007). O menor valor de <D>, em sistemas com a mesma composição, foi obtido usando o método HV (172 nm). Já os magnetolipossomas preparados pelo método de apresentaram o dobro do tamanho (Pradhan *et al.*, 2007).

Em 2013 magnetolipossomas foram preparados pelo método de HV com posterior passagem em um extrusor (Marie *et al.*, 2013). Essas vesículas apresentaram multilamelas com <D> entre 100 a 400 nm (Marie *et al.*, 2013). Lipossomas preparados pelo método de FR, normalmente, apresentam valores de <D> entre 100-200 nm (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Allen e Cullis, 2013). Estes valores estão próximos aos tamanhos dos magnetolipossomas obtidos na presente Tese.

A eficiência da rota de administração dos lipossomas é dependente do tamanho e uniformidade dos mesmos (Immordino *et al.*, 2006; Zhu e Szostak, 2009). Com relação aos valores de PDI, os lipossomas preparados pelo método de HV apresentaram maiores valores (PDI = 0,54-0,63), enquanto que os lipossomas preparados pelo método de FR apresentaram menores valores (PDI = 0,48-0,52), aumentando, discretamente, sua uniformidade.

De uma forma geral, magnetolipossomas preparados pelo método de FR podem ser utilizados no tratamento tumoral, devido aos menores tamanhos e, por consequência, uma maior capacidade de difusão nos capilares do tumor (Liu *et al.*, 1992). Já, os magnetolipossomas preparados pelo método HV, na literatura, são destacados para encapsulação de substratos a serem liberados após a ruptura da membrana (Van Swaay e De Mello, 2013). Ao avaliar-se os dados obtidos para os sistemas de magnetolipossomas, logo após o preparo (no tempo zero, Tabela 5), pode-se verificar que a inserção das NPM nos lipossomas ocasionou um aumento nos valores de <D>. Os magnetolipossomas preparados com água, HV(1)_NP, e, tampão, HV(2)_NP, aumentaram o tamanho, respectivamente, em 29 e 44 nm, quando comparados aos seus respectivos lipossomas-controle, HV(1) e HV(2).

Chen e colaboradores (2010) prepararam magnetolipossomas de DPPC com maghemita. Para a concentração de NPM de 0,19 mg mL^{-1} (próxima a utilizada na presente Tese), os autores verificaram um aumento de tamanho de 55 nm nos magnetolipossomas quando comparados aos lipossomas sem a NPM.

O aumento de tamanho também foi verificado por Salvatore e colaboradores (2016). Nesse trabalho após a inserção de NP de magnetita em vesículas de DPPC, foi verificado um aumento do valor de <D> de 60 nm. Os autores relacionam o aumento de tamanho, após a inserção da NPM, à formação de clusters formados por magnetolipossomas. A clusterização pode ser devido ao uso de NPM em altas concentrações: enquanto que NP com diâmetros entre 2,0 a 6,5 nm podem ser incorporadas no interior aquoso dos lipossomas, a associação, e, por consequência, aumento no tamanho dos lipossomas é promovida quando a relação lipídio: NP é elevada. No geral, na presente Tese, os dados de DLS revelaram o sucesso da incorporação das NPM utilizadas neste trabalho nas membranas lipídicas com a formação de magnetolipossomas.

Através da análise da Tabela 5 e da Figura 28 pôde-se comparar o comportamento de magnetolipossomas preparados com água via o método de HV (HV(1)_NP), segundo seu diâmetro em função do tempo, com seus lipossomas-controle. Os magnetolipossomas HV(1)_NP, tipicamente MLVs (a partir da análise do tamanho), não aparentaram variação significativa no valor de diâmetro médio comparando as medidas realizadas nos tempos zero e 20 dias, ou seja, 529 nm para 539 nm, respectivamente.

Do vigésimo ao quinquagésimo dia, os magnetolipossomas apresentaram redução de 40% em seu tamanho. Já os lipossomas-controle HV(1) não apresentaram diferenças de tamanho consideráveis em relação aos magnetolipossomas, mas apresentaram, após 20 dias, um aumento de tamanho de 24%. Já a medida realizada no quinquagésimo dia mostrou uma diminuição no valor de diâmetro para 322 nm, equivalente a uma diminuição de tamanho de 48% em relação às medidas realizadas no vigésimo dia.

Tabela 5: Valores de diâmetro hidrodinâmico médio (<D>) e índice de polidispersão (PDI) dos magnetolipossomas nos diferentes períodos de análise (0, 20 e 50 dias).

	<D> (nm)	PDI	<D> (nm)	PDI	<D> (nm)	PDI
	0 (tempo inicial)		20 dias		50 dias	
HV(1)	500 ± 37	0,58 ± 0,03	618 ± 61	0,61 ± 0,04	322 ± 45	0,63 ± 0,06
HV(1)_NP	529 ± 33	0,63 ± 0,06	539 ± 15	0,60 ± 0,04	331 ± 29	0,65 ± 0,07
HV(2)	420 ± 30	0,57 ± 0,04	606 ± 65	0,60 ± 0,04	310 ± 33	0,62 ± 0,06
HV(2)_NP	464 ± 21	0,54 ± 0,06	413 ± 19	0,59 ± 0,01	368 ± 24	0,67 ± 0,06
FR(1)	229 ± 8	0,50 ± 0,04	229 ± 7	0,50 ± 0,02	142 ± 7	0,46 ± 0,02
FRa(1)_NP	270 ± 2	0,50 ± 0,05	133 ± 1	0,45 ± 0,03	142 ± 7	0,48 ± 0,03
FRb(1)_NP	293 ± 3	0,52 ± 0,11	289 ± 8	0,60 ± 0,09	175 ± 12	0,60 ± 0,11
FR(2)	238 ± 2	0,48 ± 0,05	220 ± 8	0,50 ± 0,02	122 ± 6	0,48 ± 0,03
FRa(2)_NP	223 ± 9	0,48 ± 0,10	219 ± 8	0,51 ± 0,07	179 ± 8	0,47 ± 0,02
FRb(2)_NP	234 ± 2	0,50 ± 0,04	224 ± 15	0,45 ± 0,04	134 ± 16	0,47 ± 0,03

Os valores são mostrados como média ± desvio padrão (n = 3). Os magnetolipossomas: constam das amostras abreviadas por HV(1)_NP, HV(2)_NP, FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP e seus respectivos lipossomas-controle, pelas amostras abreviadas como HV(1), HV(2), FR(1) e FR(2). A sigla HV refere-se a amostras preparadas pelo método de hidratação de vesículas, enquanto que a FR refere-se a amostras preparadas pelo método de evaporação em fase reversa. Os índices 1 e 2 correspondem, respectivamente, a amostras hidratadas com água e tampão tricina. As identificações “a” e “b” indicam a etapa de adição da NPM: “a” refere-se a NPM adicionada juntamente com a dissolução do lipídio e “b”, a NPM adicionada na etapa de hidratação.

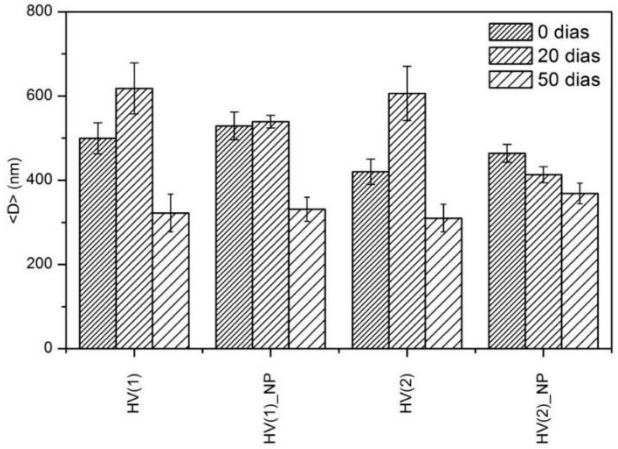


Figura 28: Diâmetro hidrodinâmico médio (<D>) dos magnetolipossomas: HV(1)_NP e HV(2)_NP e seus respectivos lipossomas-controle HV(1), HV(2) preparados pelo método de hidratação de vesículas (HV) nos diferentes tempos de análise (0, 20 e 50 dias). Índices 1 e 2 correspondem, respectivamente, a amostras hidratatas com água e tampão tricina.

Os magnetolipossomas preparados com tampão tricina via o método de HV (HV(2)_NP), apresentaram tamanhos de 464 nm, típicos de MLVs (Tabela 5 e Figura 28). Com relação às medidas realizadas nos tempos zero e vigésimo dia, foi verificada uma diminuição no valor de diâmetro médio de 10% e, do vigésimo ao quinquagésimo dia, os magnetolipossomas apresentaram redução de 10% em seu tamanho.

Com relação às medidas realizadas nos tempos zero e vigésimo dia, os lipossomas-controle HV(2) apresentaram um aumento no valor de diâmetro médio de 44%. Já a medida realizada no quinquagésimo dia mostrou uma diminuição de tamanho de 49% em relação às medidas realizadas no vigésimo dia.

Os processos físicos como agregação / floculação / coalescência podem resultar em aumento do tamanho dos magnetolipossomas, bem como na cinética de liberação de agentes exógenos (Yadav *et al.*, 2011). Tais processos podem ter ocorrido nos lipossomas-controle avaliados. Assim, para os magnetolipossomas preparados pelo método de HV a partir das medidas realizadas no vigésimo dia não foi verificada aglome-

ração, como havia sido observado nos lipossomas-controle. Este comportamento dos magnetolipossomas pode ser devido à ação das NPM no processo de peroxidação nas membranas de ASO, o que será discutido posteriormente.

Com relação à influência do tampão tricina, pode-se verificar uma redução do diâmetro médio nos magnetolipossomas (HV(2)_NP) de 13% quando comparado o tamanho de magnetolipossomas preparados com água (HV(1)_NP). O uso de solventes zwiteriônicos (como a tricina) pode causar uma diminuição nas forças de atração de Van der Waals entre as membranas vizinhas, diminuindo o diâmetro médio dos magnetolipossomas (Koerner *et al.*, 2011).

Os magnetolipossomas preparados pelo método de FR em solvente água apresentaram no momento da preparação, aumento no tamanho de 17% para FRa(1)_NP e 28% para FRb(1)_NP, em relação aos seus lipossomas controle (ver Tabela 5 e Figura 29), indicando incorporação das NPM nos magnetolipossomas. Já para os magnetolipossomas preparados com tampão (FRa(2)_NP e FRb(2)_NP), foi verificado uma discreta diminuição no tamanho de 6% e 2%, respectivamente, em comparação aos seus lipossomas-controle, o que pode estar relacionado com o tipo de solvente utilizado, como mencionado no parágrafo anterior.

Com relação à estabilidade dos magnetolipossomas preparados pelo método de FR ao longo do tempo, no FRa(1)_NP (magnetolipossoma hidratado com água e NPM adicionada juntamente com a dissolução do lipídio) foi verificada uma diminuição de 50% no diâmetro médio durante o vigésimo dia, comparando-se as medidas realizadas nos tempos zero e 20 dias. Para o seu lipossoma-controle, FR(1), não foi verificada variação significativa neste período. Adicionalmente, para os demais magnetolipossomas (FRb(1)_NP, FRa(2)_NP e FRb(2)_NP) e seus lipossomas-controle preparados pelo método de FR, não foram verificadas variações significativas nos valores de diâmetro médio, o que indica estabilidade até o vigésimo dia desses sistemas.

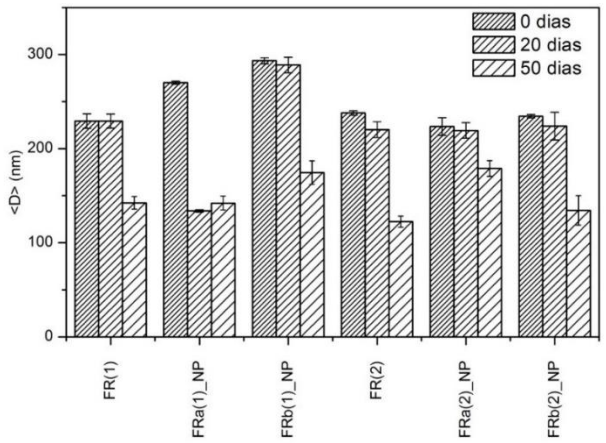


Figura 29: Diâmetro hidrodinâmico médio (<D>) dos magnetolipossomas: FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP e seus respectivos lipossomas-controle FR(1) e FR(2) preparados pelos métodos de evaporação em fase reversa (FR) nos diferentes tempos de análise (0, 20 e 50 dias). Os índices 1 e 2 correspondem, respectivamente, a amostras hidratadas com água e tampão tricina. As identificações “a” e “b” indicam a etapa de adição da NPM: “a” refere-se a NPM adicionada juntamente com a dissolução do lipídio e “b” refere-se a NPM adicionada na etapa de hidratação.

Com exceção de FRa(1)_NP, os demais magnetolipossomas e lipossomas-controle apresentaram redução de diâmetro médio no quinquagésimo dia após seu preparo, em comparação aos dados obtidos no vigésimo dia, Tabela 5 e Figura 29. Os magnetolipossomas preparados em água, FRb(1)_NP, apresentaram uma redução de tamanho de 40% e os preparados com tampão, FRa(2)_NP e FRb(2)_NP, uma diminuição de 19% e 40%, respectivamente, em comparação aos dados obtidos no vigésimo dia. Nos lipossomas-controle, FR(1) e FR(2), a redução de tamanho foi de 40% e 45%, respectivamente, entre o vigésimo e o quinquagésimo dia após o preparo. A mesma tendência de redução do diâmetro médio verificada nos lipossomas-controle e magnetolipossomas preparados pelo método FR indica que a inserção da NPM não influenciou na estabilidade dos sistemas.

Ao comparar-se os valores de <D> dos magnetolipossomas FRa(1)_NP com FRa(2)_NP e FRb(1)_NP com FRb(2)_NP, pode-se verificar uma diminuição de 17 e 20%, respectivamente. Assim como verificado nos magnetolipossomas preparados pelo método de HV, a redução do diâmetro médio causada pela adição do tampão nos magnetolipossomas preparados pelo método de FR, pode estar relacionada a uma diminuição nas forças de atração de Van der Waals entre as membranas vizinhas dos magnetolipossomas (Koerner *et al.*, 2011).

A etapa de adição das NPM nos magnetolipossomas preparados pelo método de FR também influenciou nos valores de <D>. Os sistemas de magnetolipossomas preparados em água em que a NPM foi adicionada na etapa de hidratação (FRa(1)_NP) em comparação a adição da NPM durante a dissolução do fosfolipídio (FRb(1)_NP) apresentaram valores de diâmetros maiores em 8%. Ao comparar-se os sistemas preparados com tampão (amostra FRa(2)_NP e FRb(2)_NP) a adição da NPM na etapa de hidratação, magnetolipossoma FRb(2)_NP, apresentou valores de <D> 6% maiores. O aumento de tamanho, verificado nos sistemas de magnetolipossomas em que a NPM foi adicionada na etapa de hidratação, parece estar relacionado com a concentração de NPM incorporada nos magnetolipossomas.

As ERMOS, induzidas por partículas de metal de transição, podem levar a peroxidação das cadeias acílicas insaturadas e a hidrólise das ligações éster (que ligam os ácidos graxos ao esqueleto de glicerol) dos lipídios (Zhu *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2011). Esse processo pode ocasionar uma diminuição do tamanho dos lipossomas (Yadav *et al.*, 2011).

Com relação aos dados obtidos neste trabalho, foi verificada uma maior variação de tamanho, já nas medidas realizadas no vigésimo dia, nos magnetolipossomas preparados pelo método HV. Possivelmente, a presença das NPM nos magnetolipossomas preparados pelo método HV (amostras HV(1)_NP e HV(2)_NP) promoveu um processo de oxidação dos lipossomas mais efetivo do que em os magnetolipossomas preparados por FR (FRb(a)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP e FRb(2)_NP). Esta hipótese

ainda pode ser confirmada ao se analisar os lipossomas-controle (FR(1) e FR(2)), que não sofreram grandes variações de tamanho ao longo do tempo.

Assim, no presente trabalho, o comportamento das NPM de maghemita no progresso da peroxidação lipídica foi avaliado através da quantificação de TBARS. A Figura 30 mostra a influência das NPM na peroxidação lipídica dos magnetolipossomas testados logo após seu preparo.

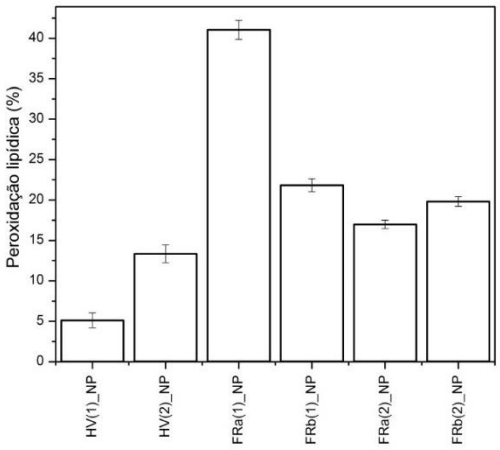


Figura 30: Influência das NPM nos valores de peroxidação lipídica induzida pela peroxidação basal nas amostras de magnetolipossomas em relação aos seus lipossomas-controle. Os resultados foram obtidos pelo método de TBARS, logo após o preparo, e estão descritos como média ± desvio padrão (n=3). Os magnetolipossomas preparados pelos métodos de hidratação de vesículas (HV) e fase reversa (FR). Índices 1 e 2 correspondem, respectivamente, a amostras hidratatas com água e tampão tricina. As identificações “a” e “b” indicam a etapa de adição da NPM: “a” refere-se a NPM adicionada juntamente com a dissolução do lipídio, enquanto “b” refere-se a NPM adicionada na etapa de hidratação. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

Em todos os sistemas foi verificado um efeito pró-oxidante. Para HV(1)_NP, a membrana foi oxidada em aproximadamente 5%. Para o sistema onde foi utilizado

tampão como solvente para hidratação, HV(2)_NP, foi verificado um maior efeito pró-oxidante, cerca de 13%. Esse maior efeito oxidante do sistema hidratado com tampão pode ser devido ao maior número de NPM incorporadas nos lipossomas de ASO (ver Tabela 7, que reporta a I% dos sistemas). Para os magnetolipossomas preparados pelo método de FR, o magnetolipossoma FRa(1)_NP apresentou o maior efeito pró-oxidante (41,48 %). Para os demais magnetolipossomas (FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP) foram verificados efeitos pró-oxidantes em torno de 20%.

Fatores como pH, força iônica e solventes, desempenham um papel importante na estabilização de uma formulação lipossomal. Adicionalmente, temperatura, luz, oxigênio e íons de metais também podem iniciar as reações químicas ou físicas que são responsáveis pela alteração de tamanho dos sistemas carreadores, causando processos oxidativos e de hidrólise dos lipídios (Vemuri e Rhodes, 1995).

Hoskins e colaboradores (2012) investigaram o estresse oxidativo celular (medido pela produção de ERMOS) e a peroxidação lipídica ocasionada por NPM de magnetita revestidas com poli(etilenoimina) e poli(etileno glicol). No trabalho, os autores verificaram que a peroxidação lipídica é iniciada pela presença dos íons de Fe^{2+} e Fe^{3+}. Em pH baixo, conforme apresentado por Shubayev et al. (2009), as NPM de óxido de ferro, sofrem uma maior degradação a íons de ferro devido a facilidade de dissolução desses íons a meios ácidos. Assim, os íons de hidrogênio podem catalisar as reações hidrólise lipídica diminuindo a estabilidade e I% dos lipossomas. Uma maior integridade das NPM em lipossomas preparados em tampão (pH 7,4) foi verificada (Hoskins *et al.*, 2012). No entanto, a pH neutro, uma vez que uma pequena quantidade de íons de ferro está dissolvida, a decomposição da H_2O_2 ocorre pela ação dos íons de ferro que estão presentes na superfície da NPM, via mecanismo heterogêneo envolvendo as reações de Fenton e Fenton-like, como ilustrado na Figura 31 (Wang *et al.*, 2013).

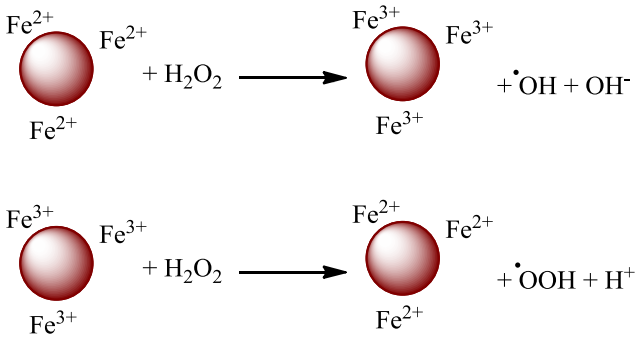


Figura 31: Esquema da geração de radicais livres de •OH via ação denanopartículas de óxido de ferro em ambientes com pH maior que 4,2. Adaptado da Ref (Wang *et al.*, 2013).

A curvatura de superfície ou o empacotamento dos fosfolipídios na membrana exerce um efeito significativo na susceptibilidade oxidativa das bicamadas lipídicas não saturadas(Li *et al.*, 2000). Os sistemas formados por lipossomas menores exibem menor resistência ao estresse oxidativo, induzido pelas fontes de radicais livres solúveis em água (Li et al., 2000). O efeito da curvatura da membrana também é evidente em outros parâmetros, como a *Tm*. Por exemplo, o tamanho de vesículas de DMPC é diretamente proporcional à *Tm* (Biltonen e Lichtenberg, 1993). Uma redução no tamanho e *Tm* é explicada pela dificuldade de organização dos lipídios dentro de uma geometria fortemente curvada (Li et al., 2000). Ou seja, a redução de tamanho proporciona uma maior curvatura da superfície dos fosfolipídios, tornando a disposição menos empacotada, permitindo, assim, uma maior difusão de radicais que aceleram a oxidação (Fagali e Catala, 2009; Reis e Spickett, 2012).

A Figura 32 apresenta um esquema de empacotamento dos magnetolipossomas com tamanhos de 500 nm e 200 nm, que podem ser característicos do método de preparo utilizado: HV e FR, respectivamente. O esquema foi proposto com base nos resultados apresentados no manuscrito atual, bem como em discussões da literatura (Li *et al.*, 2000; Fagali e Catala, 2009; Reis e Spickett, 2012). Nesse esquema, pode-se verificar que as vesículas com menores tamanhos apresentam espaços que facilitam a entrada dos íons de ferro provenientes da NPM e, por conseguinte, o processo de peroxi-

dação lipídica é facilitado. Isto pode justificar o maior índice de oxidação verificado para os magnetolipossomas preparados pelo método de FR.

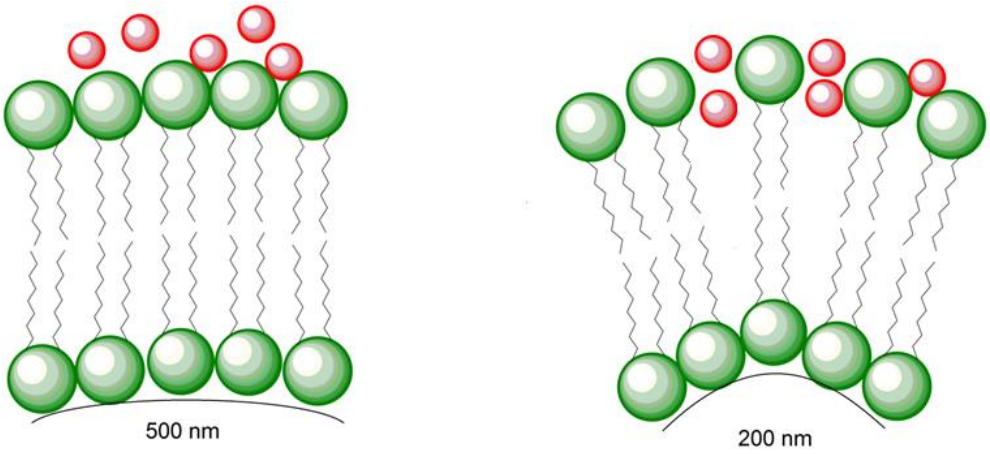


Figura 32:Esquema do empacotamento molecular de magnetolipossomas de diferentes tamanhos: preparado pelo método de hidratação de vesículas (à esquerda, ~500 nm) e pelo método de evaporação em fase reversa (à direita, ~200 nm). As linhas pretas representam a posição da interface água / lipídio do centro da bicamada. Os círculos vermelhos representam íons de ferro provenientes da NPM responsáveis pelo geração de ERMOS. Pode-se observar na figura (a) uma membrana lipídicaminimamente curva, comalto grau de empacotamento; (b) uma membrana lipídica altamente curva, com menor grau de empacotamento.

A utilização do tampão proporcionou um menor índice de oxidação aos magnetolipossomas preparados pelo método FR. Wang e colaboradores (2013) evidenciaram que íons de ferro presentes na superfície da NPM são responsáveis por causar o processo de peroxidação. Adicionalmente, em pH neutro, uma menor quantidade de íons de ferro livres diminui a intensidade do processo de peroxidação lipídica(Wang *et al.*, 2013). Assim, a menor dissociação dos íons de ferro da NPM nos magnetolipossomas preparados pelo método de FR, utilizando o tampão tricina (pH 7,4) como solvente, pode explicar a menor intensidade de oxidação na membrana. Porém, tal influência do tampão tricina não foi verificada nos magnetolipossomas preparados pelo método de

HV. Nestes magnetolipossomas (HV(1)_NP e HV(2)_NP), por apresentarem tamanhos maiores e mais lamelas (MLVs) a quantidade de NPM incorporada pode influenciar diretamente nos processos de peroxidação lipídica.

As medidas de potencial zeta das NPM puras, dispersas em água ou em tampão tricina, foram realizadas para compreender as propriedades destes componentes dos magnetolipossomas, bem como facilitar nas interpretações dos resultados referentes aos mesmos. As medidas de potencial zeta indicaram que as NPM de maghemita, quando dispersas em água, apresentaram um valor de potencial zeta de -34,7 ± 0,9 mV e, quando em tampão, de -14,5 ± 1,3 mV.

Como mencionado anteriormente, a estabilidade das NPM de ferroé dependente do pH em que elas estão dispersas (Martina *et al.*, 2005). Quanto mais distantes do ponto isoelétrico (pH em que as partículas apresentam carga líquida igual a zero, e, por consequência, as forças repulsivas entre os óxidos metálicos é zero) mais estáveis serão as partículas coloidais (Christensen *et al.*, 2015).

Nurdin e colaboradores (2015) avaliaram o potencial zeta e o tamanho de NP de maghemita em diferentes pH. A pH 6,6 a suspensão apresentou um valor de potencial zeta igual a zero e a valores superiores a superfície da partícula apresentou ter carga negativa (Nurdin *et al.*, 2015). Além disso, os autores verificaram no ponto isoelétrico a formação de agregados (de 4670 nm), enquanto que, em pH 10,0 (onde o valor de potencial zeta era de -40,4 mV) um tamanho de 58,2 nm (Nurdin *et al.*, 2015). Na presente Tese, os valores de pH dos solventes utilizados, água e tampão tricina/$MgCl_2$, foram, respectivamente, de 6,0 e 7,4. Em ambos os solventes, os valores de potencial zeta foram negativos, evidenciando um deslocamento no valor do ponto isoelétrico para as NPM utilizadas neste trabalho em comparação aos dados obtidos por Nurdin e colaboradores (2015). Isto pode estar relacionado com a diferença de concentração das NP analisadas (0,2 mg mL^{-1} neste trabalho, enquanto que para os autores, 0,1 mg mL^{-1}).

Com relação ao pH avaliado, as NPM quando dispersas em tampão (pH 7,4) deveriam ter apresentado um maior valor de potencial zeta do que quando dispersas em água (pH 6,0) (Nurdin et al., 2015). Porém, na presença do tampão (pH 7,4), as NPM apresentaram potencial zeta menos negativo (mais próximo do ponto isoelétrico) do que quando em água, demonstrando a forte influência dos íons provenientes do $MgCl_2$ (presentes no tampão) na formação de camada de solvatação em torno das NPM (Patil *et al.*, 2016). O maior valor de potencial zeta das NPM dispersas em água indicam uma maior estabilidade do sistema quando comparadas com as dispersas em tampão. Isso pode ser devido à combinação de estabilização estérica e eletrostática das NPM com as moléculas de água (Patil *et al.*, 2016). Estes resultados indicam que as moléculas de água proporcionam um impedimento estérico entre as NPM ajudando, assim, a diminuir o índice de aglomeração (Garcia-Jimeno e Estelrich, 2013; Patil *et al.*, 2016).

Valores de potencial zeta maiores que |30| mV são necessários para a estabilização eletrostática de um sistema coloidal (Wongsagonsup *et al.*, 2005; Bolfarini *et al.*, 2012). Em geral, as NP agregam em suspensão devido às forças atrativas de Van der Waals para minimizar a energia superficial e interfacial total. Na presença de um eletrólito, a natureza e o comportamento de superfície conduz a aglomeração das NP (Mahmoudi *et al.*, 2011). Os lipossomas podem servir de “dispersantes naturais” das NPM, fornecendo-lhes estabilidade coloidal em função de sua carga superficial e pela biodistribuição das NPM no sistema (Mahmoudi *et al.*, 2011). Os valores de potencial zeta dos magnetolipossomas e lipossomas-controle obtidos durante diferentes períodos após o preparo (0, 20 e 50 dias) são mostrados na Tabela 6.

No tempo zero, ou seja, logo após o preparo dos magnetolipossomas, os sistemas preparados via HV com solventes distintos (água e tampão), bem como os preparados pelo método de FR, em comparação aos seus lipossomas-controle, não apresentaram variações significativas de potencial zeta. Indicando que a inserção da NPM não ocasionou mudanças conformacionais, quantos aos planos dos grupos polares lipídicos: fosfato e colina (Fatouros e Antimisiaris, 2002).

Tabela 6: Valores de potencial zeta nos magnetolipossomas e lipossomas-controle durante os diferentes tempos após o preparo (0, 20 e 50 dias).

	Potencial zeta (mV)		
	0	20	50
HV(1)	-68,8 ± 1,3	-66,3 ± 0,5	-59,3 ± 0,6
HV(1)_NP	-66,7 ± 1,6	-71,2 ± 0,1	-62,3 ± 0,9
HV(2)	-63,3 ± 0,0	-66,3 ± 0,5	-59,3 ± 0,6
HV(2)_NP	-62,7 ± 1,1	-70,5 ± 1,5	-63,2 ± 1,0
FR(1)	-68,0 ± 2,3	-65,7 ± 2,1	-59,8 ± 0,5
FRa(1)_NP	-67,1 ± 1,2	-63,1 ± 1,8	-63,4 ± 0,8
FRb(1)_NP	-65,9 ± 2,5	-66,4 ± 0,5	-64,3 ± 0,4
FR(2)	-64,5 ± 2,0	-65,7 ± 2,0	-61,1 ± 0,5
FRa(2)_NP	-63,7 ± 1,4	-65,8 ± 0,3	-60,1 ± 0,4
FRb(2)_NP	-64,2 ± 1,1	66,3 ± 1,6	-63,7 ± 1,0

Os valores são mostrados como média ± desvio padrão (*n* = 3). Os magnetolipossomas são descritos com as abreviações HV(1)_NP, HV(2)_NP, FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, e seus respectivos lipossomas-controle como HV(1), HV(2), FR(1) e FR(2). As siglas HV referem-se a amostras preparadas pelo método de hidratação de vesículas, enquanto FR refere-se a amostras preparadas pelo método de evaporação em fase reversa. Os índices 1 e 2 correspondem, respectivamente, a amostras hidratadas com água e tampão tricina. As identificações “a” e “b” indicam a etapa de adição da NPM: “a” refere-se a NPM adicionada juntamente com a dissolução do lipídio e “b” refere-se a NPM adicionada na etapa de hidratação. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

Em todos os sistemas de magnetolipossomas e lipossomas-controle foram verificados valores de potencial zeta negativos (-69 a -63 mV). As fosfatidilcolina são fosfolipídios zwiteriônicos com um ponto isoelétrico entre pH 6,0 e 6,7 (Chain e Kemp, 1934). Nos sistemas preparados em tampão (pH 7,4), em que o pH é maior do que o ponto isoelétrico, as vesículas de fosfatidilcolina apresentam uma carga global negativa (Subongkot e Ngawhirunpat, 2015). No entanto os magnetolipossomas preparados com água (pH 6,0) apresentaram valores de potencial zeta negativos, diferentemente do

esperado pelas informações do ponto isoelétrico da fosfatidilcolina. Cabe relembrar, que os magnetolipossomas deste trabalho são constituídos de ASO, uma mistura de fosfolipídios que contém cerca de 25% de fosfatidilinositol (Navratil *et al.*, 2011). A presença do fosfatidilinositol, um fosfolipídio aniônico, pode ser a responsável pelos valores negativos de potencial zeta observados experimentalmente (Ohki *et al.*, 2010). Alguns trabalhos relatam valores de potencial zeta negativos semelhantes a este trabalho (De Sousa *et al.*, 2013; De Azambuja *et al.*, 2015). Essas formulações lipossômicas carregadas negativamente também apresentaram valores de potencial zeta suficientes para estabilização eletrostática.

Uma forte influência da força iônica foi verificada nos valores de potencial zeta dos lipossomas-controle (sem NPM). Uma variação de 5,5 mV foi verificada ao serem comparados os sistemas HV(1) e HV(2). A mesma variação foi verificada para os lipossomas preparados pelo método de FR. Interações eletrostáticas entre cátions e o grupo fosfato dos fosfolipídios são favorecidas devido a carga negativa de maior intensidade deste grupo em relação ao grupo carbonílico (da região de interface) (Chen, X. K. *et al.*, 2010).

À temperatura constante, à medida que a força iônica aumenta (por exemplo, a partir do uso do tampão tricina, contendo íons Cl^- e Mg^{+2}), o plano do grupo da colina lipídica se aproxima da superfície da bicamada lipídica enquanto o plano do grupo fosfato fica abaixo da superfície (Makino *et al.*, 1991). Assim sendo, tal orientação da colina voltada para a superfície da bicamada pode estar mais acentuada em magnetolipossomas preparados com tampão, justificando o potencial zeta mais positivo (ou menos negativo), Figura 33.

Com relação aos dados de estabilidade, os valores de potencial zeta para as amostras de magnetolipossomas e lipossomas-controle preparados pelo método de HV, ficaram mais negativos no vigésimo dia, em comparação aos valores obtidos no tempo logo após o preparo. Esta variação de potencial zeta foi mais evidente para o magnetolipossoma preparado com tampão (HV(2)_NP), onde foi verificado uma dimi-

nuição do valor de potencial zeta de 12%, evidenciando uma maior estabilização eletrostática para o sistema em comparação ao HV(1)_NP. As medidas de potencial zeta de HV(2)_NP) e de HV(1)_NP, bem como as de seus lipossomas-controle, realizadas no quinquagésimo dia, mostraram valores mais positivos, quando comparado as medidas realizadas nos períodos anteriores.

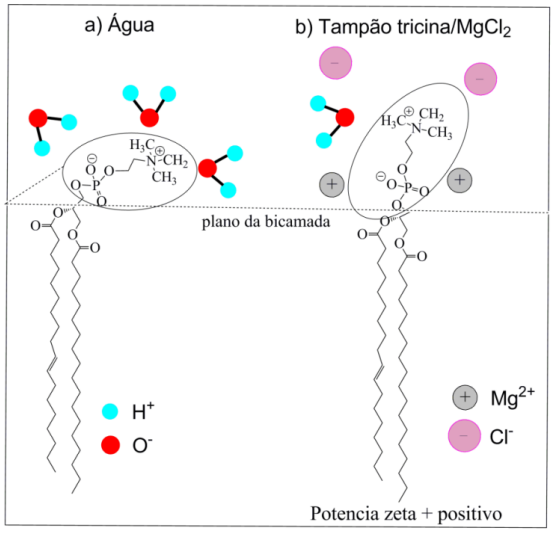


Figura 33: Ilustração da influência da força iônica do meio em fosfatidilcolina em água (A) e em tampão (B): Mudança de orientação do plano do grupo colina para acima do plano do grupo fosfato em relação ao plano da bicamada lipídica dos fosfolipídios ocasionada pela presença de íons provenientes do tampão tricina/$MgCl_2$. Adaptado da Ref (Makino *et al.*, 1991).

Com exceção da amostra FRa(1)_NP, as medidas de potencial zeta de magnetolipossomas preparados pelo método FR, realizadas no vigésimo dia após o preparo, não mostraram variações significativas em seus valores, comparadas aos dados obtidos no dia do seu preparo (tempo zero). Os magnetolipossomas FRa(1)_NP (em que a água foi utilizada como solvente e a NPM foi adicionada na etapa de dissolução do fosfolipídio) apresentaram valores de potencial zeta mais positivos, cerca de 6%, no vigésimo dia quando comparado ao período logo após o preparo. Como visto anteriormen-

te, este magnetolipossoma (FRa(1)_NP) apresentou redução de tamanho de 50% no vigésimo dia após o preparo. Assim, a reorganização dos fosfolipídios para lipossomas de tamanhos menores pode estar relacionada com a variação dos valores de potencial zeta verificados para este sistema.

As medidas de potencial zeta realizadas para as amostras de magnetolipossomas e lipossomas controle, preparados pelo método de FR, no quinquagésimo dia mostraram magnetolipossomas mais positivos quando comparados aos valores obtidos no vigésimo dia. Isto também pode estar relacionado com a diminuição do diâmetro médio, também verificada para este período.

5.2. Percentagem de incorporação das nanopartículas magnéticas nos magnetolipossomas

A I% das NPM nos magnetolipossomas preparados pelos métodos de HV e FR foi determinada através da determinação da concentração de ferro presente no sistema por três métodos diferentes: (i) espectroscopia de UV-vis, (ii) HR-CS GF AAS após extração com água régia e (iii) HR-CS F AAS após MW-AD. O conteúdo de ferro determinado foi relacionado com a quantidade de NPM presente no sistema. Os resultados da I% das NPM, bem como os resultados da concentração de NPM estão apresentados na Tabela 7.

Para o cálculo da I% das NPM nos magnetolipossomas, a concentração de NPM total adicionada durante o preparo dos magnetolipossomas (ou seja, nas amostras sem centrifugação) também foi detectada, sendo esta de 0,133 ± 0,001 mg mL^{-1}. Assim, para a determinação da I%, o valor da concentração de NPM encontrado nas amostras de magnetolipossomas após a etapa de centrifugação, foi dividido pela concentração de NPM adicionada durante o preparo dos magnetolipossomas (0,133 mg mL^{-1}), Equação 13 apresentada no item 4.3.3.

Tabela 7: Determinação da concentração de NPM e percentagem de incorporação, I%, das NPM nos magnetolipossomas, através das técnicas UV-vis e HR-CS GF AAS.

	UV-vis		HR-CS GF AAS	
	[NPM], mg mL^{-1}	I%	[NPM], mg mL^{-1}	I%
HV(1)_NP	0,116 ± 0,03	87,1	0,114 ± 0,001	86,0
HV(2)_NP	0,122 ± 0,02	91,4	0,112 ± 0,002	89,0
FRa(1)_NP	0,090 ± 0,02	67,7	0,091 ± 0,002	68,8
FRb(1)_NP	0,079 ± 0,04	59,4	0,080 ± 0,001	60,1
FRa(2)_NP	0,090 ± 0,02	67,7	0,091 ± 0,002	68,8
FRb(2)_NP	0,083 ± 0,04	62,4	0,086 ± 0,002	64,5

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 2. Os magnetolipossomas: constam das amostras abreviadas por HV(1)_NP, HV(2)_NP, FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP. A sigla HV refere-se a amostras preparadas pelo método de hidratação de vesículas, enquanto que a FR refere-se a amostras preparadas pelo método de evaporação em fase reversa. Os índices 1 e 2 correspondem, respectivamente, a amostras hidratadas com água e tampão tricina. As identificações “a” e “b” indicam a etapa de adição da NPM: “a” refere-se a NPM adicionada juntamente com a dissolução do lipídio e “b”, a NPM adicionada na etapa de hidratação.

Os resultados mostraram boa concordância (já que não houve diferença significativa, $p > 0,05$) entre os dois métodos avaliados para determinação de NPM nas amostras. As características hidrofílicas das NPM proporcionam uma incorporação das mesmas no interior aquoso dos lipossomas. Além disso, interações entre os grupos polares (localizados na camada externa do lipossoma) dos fosfolipídios podem ocorrer (Elersic *et al.*, 2012; Martinez-Gonzalez *et al.*, 2016). Assim, a alta I% das NPM nos magnetolipossomas, preparados pelo método de FR (60-70%) e de HV (80-90%), verificadas neste trabalho, parece estar relacionado com o tamanho dos sistemas gerados por cada técnica de preparo: método de FR (faixa de tamanho ~200nm) e por HV (tamanho >400nm).

O tipo de fosfolipídio utilizado, bem como o método de preparo dos lipossomas, pode influenciar na I% de substâncias em lipossomas (Lichtenberg e Barenholz, 1988). Em trabalhos anteriores, magnetolipossomas constituídos por NPM de magnetita, fosfatidilcolina de soja e colesterol, preparados pelo método de HV, mostraram uma I% de 78,10% ± 0,24 (Gharib *et al.*, 2014). Outros autores encontraram uma I% de 64,7% de NPM de magnetita em lipossomas constituídos de DMPC (Hsu e Chen, 2017).

Devido ao maior espaço aquoso, cerca de quatro vezes maior do que em lipossomas multilamelares, os magnetolipossomas preparados pelo método de FR, deveriam encapsular uma maior percentagem de materiais hidrofílicos (Akbarzadeh *et al.*, 2013). No entanto, este fato não foi verificado neste trabalho, e pode estar relacionado aos valores de diâmetro médio dos magnetolipossomas obtidos, bem como sua quantidade de bicamadas.

Como o foco deste trabalho é o uso dos magnetolipossomas para o tratamento do câncer, e sabendo-se que lipossomas preparados pelo método de FR, normalmente apresentam-se com 100-200 nm de diâmetro (Akbarzadeh *et al.*, 2013; Bixner e Reimhult, 2016) facilitando sua penetração nos capilares do tumor (Liu *et al.*, 1992), testou-se um sistema preparado por FR para análise de I% através de HR-CS F AAS após MW-AD. O objetivo deste teste foi averiguar o efeito do método de análise na I% do sistema. A amostra constou de FRa(2)_NP. Através deste método de preparo, foram detectados 0,093 ± 0,003 mg mL^{-1} de NPM, representando 69,8% de I%, considerando a quantidade detectada de NPM adicionado (antes da etapa de centrifugação de 0,133 mg mL^{-1}). As concentrações de NPM, determinadas a partir de ferro, para esta amostra apresentaram boa exatidão, com desvio padrão relativo (RSD) de 3, 2 e 5%, para espectroscopia UV-vis, HR-CS GFAAS e HR-CS F AAS, respectivamente.

Petralito e colaboradores (2012) avaliaram diferentes métodos analíticos para determinação da I% de NPM de magnetita em magnetolipossomas de fosfatidilcolina de soja. Os autores verificaram que o método de espectrometria de absorção atômica foi mais adequado por apresentar maior repetitibilidade, em comparação com o ensaio

de orto-fenantrolina (Petralito *et al.*, 2012). No entanto, nesta Tese, comparando os dois métodos de preparo de amostra para HR-CS AAS e as medidas realizadas por UV-vis, os valores obtidos por estas técnicas não apresentaram variações significativas ($p > 0,05$), referente aos magnetolipossomas de FRa(2)_NP, demonstrando concordância entre os dados. Isto indica que, para os sistemas analisados, a técnica de UV-vis via *o*-fenantrolina também é bastante adequada para avaliação por sua precisão e exatidão.

Assim, partir dos estudos de estabilidade e incorporação das NPM nos magnetolipossomas pôde-se verificar uma melhor estabilidade nos sistemas preparados pelo método de FR quando o tampão tricina foi utilizado como solvente. Assim sendo, considerando os fatores I%, tamanho e potencial zeta (estes dois últimos ao longo do tempo após o preparo) e oxidação dos sistemas, pode-se constatar que:

1) Com relação aos valores de I%, foi verificado que os magnetolipossomas preparados pelo método de HV apresentaram maior valor. Porém, estes sistemas foram menos estáveis (sofrendo oxidação em 20 dias após o preparo). Os magnetolipossomas preparados por este método apresentaram valores de diâmetro médio entre 450-550 nm;

2) Com relação aos magnetolipossomas preparados pelo método de FR, a amostra FRa(2)_NP, na qual a NPM foi adicionada na etapa de dissolução do fosfolipídio, foi a mais estável com relação aos valores de diâmetro médio e potencial zeta (até o vigésimo dia após o preparo). A amostra apresentou menor variação de tamanho a partir do vigésimo dia até o quinquagésimo dia após o preparo. Também apresentou satisfatória I% e menor índice de peroxidação em reação aos demais magnetolipossomas preparados pelo mesmo método de FR, porém com outras variáveis (solvente e etapa de adição da NPM).

5.3. Caracterização dos magnetolipossomas segundo o método de preparo

Inicialmente, as NPM de maghemitaforam caracterizadas pela técnica de FTIR, para compreender a influência destes componentes nos magnetolipossomas. O espectro de FTIR das NPM foi realizado por DRIFT e está apresentado na Figura 34.

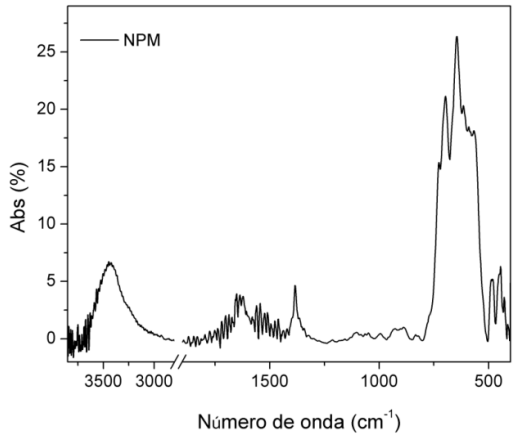


Figura 34: Espectro de infravermelho com transformada de Fourier com refletância difusa (DRIFT) das NPM de maghemita em KBr.

As bandas e frequências detectadas para as NPM de maghemita estão de acordo com espectros descritos na literatura (de Farias *et al.*, 2002; Iyengar *et al.*, 2014). O espectro apresentou bandas na faixa de 650-550 cm^{-1}, atribuídas às vibrações de ligações Fe_T-O-Fe_O, onde Fe_T e Fe_O correspondem ao ferro ocupando sítios tetraédricos e octaédricos, respectivamente. As bandas de vibração em 470 cm^{-1} e em 426 cm^{-1} estão associadas, respectivamente, as vibrações de Fe_O-O e Fe_T-Fe_O (De Farias *et al.*, 2002; Iyengar *et al.*, 2014). A presença de picos de estiramento de O–H em aproximadamente 3411 cm^{-1} e deformação angular de O–H a 1630 cm^{-1} está atribuída à presença de grupos hidroxilas ou de moléculas de água adsorvidas nas NPM (Iyengar *et al.*, 2014).

Após a interpretação do espectro de FTIR das NPM, foram obtidos espectros de HATR-FTIR de magnetolipossomas preparados por HV e FR, em água (HV(1)_NP, FRa(1)_NP e FRb(1)_NP) e em tampão (HV(2)_NP, FRa(2)_NP e FRb(2)_NP) e de seus lipossomas-controle (HV(1), HV(2), FRa(2) e FRb(2)) (Figura 35 e Figura 36). A partir dos espectros de FTIR, foram detectados e analisados os seguintes estiramentos axiais referentes à fosfatidilcolina presentes em ASO: assimétrico do grupo fosfato, ν_{as} PO_2^-, assimétrico do grupo colina, ν_{as} $N^+(CH_3)_3$, da carbonila, ν C=O e simétrico e assimétrico dos grupos metilênicos da cadeia acil, ν_s CH_2 e ν_{as} CH_2, respectivamente (Garcia *et al.*, 1993; Manrique-Moreno *et al.*, 2010). As atribuições e variações dos estiramentos, referentes aos seus valores de frequência e largura de banda, estão apresentadas na Tabela 7.

Para interpretação dos efeitos de NPM nos sistemas, torna-se necessária a compreensão de como as interações entre os grupos funcionais lipídicos afetam os parâmetros analisados por FTIR. Como visto na seção 2.4.3.1, os valores de frequência do ν_{as} PO_2^- e da C=O são sensíveis à variação do número de ligações de hidrogênio (Chen e Tripp, 2008; Moreno *et al.*, 2009). Já, alterações nas frequências dos estiramentos axiais simétricos e assimétricos dos metilenos da cadeia acil lipídica podem refletir no grau de ordem conformacional e na isomerização trans / gauche do sistema lipídico (Severcan *et al.*, 2005). Em adição, as variações da largura da banda refletem na influência da amplitude e na velocidade de movimento dos grupos lipídicos analisados: Quanto menor for à fluidez da membrana, menor será a largura de banda para a região avaliada e vice-versa (Casal *et al.*, 1980; Lee e Chapman, 1986).

Para a interpretação dos resultados de HATR-FTIR de cada tipo de magnetolipossoma, foi considerada a influência da NPM nas regiões polar, interfacial e hidrofóbica de ASO. Os resultados foram complementados a partir das análises realizadas com as técnicas de RMN, DSC e UV-vis.

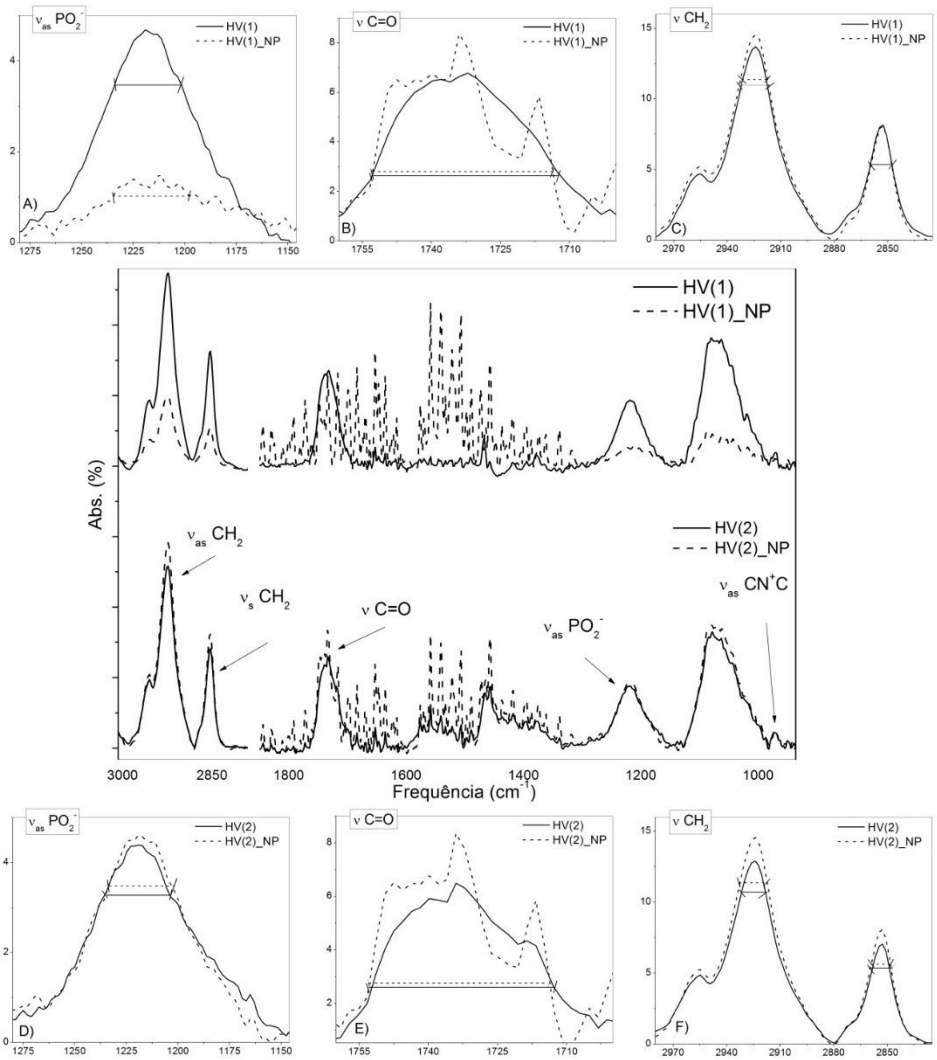


Figura 35: Espectros de HATR-FTIR e suas ampliações: Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

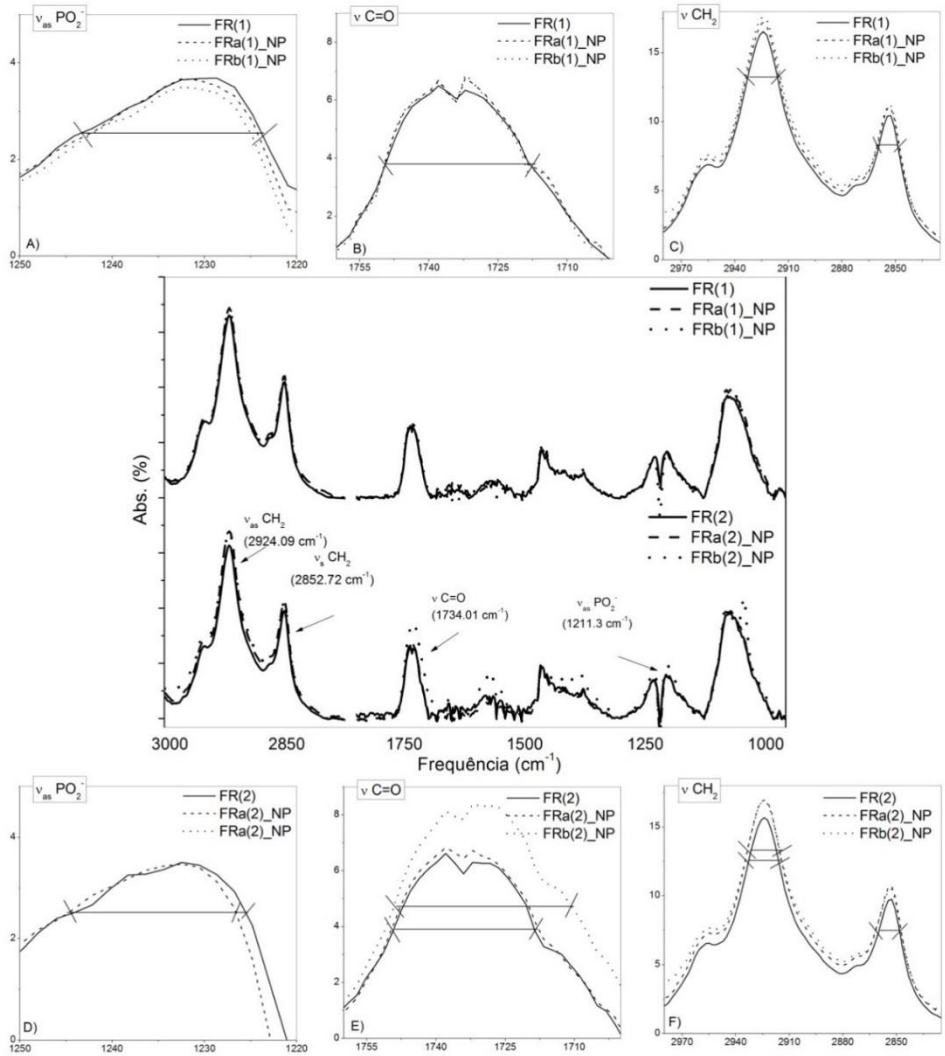


Figura 36: Espectros de HATR-FTIR e suas ampliações: Magnetolipossomas, FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP e FRb(2)_NP e lipossomas-controle;FR(1) e FR(2), preparados pelo método de evaporação em fase reversa (FR), usando água (índice 1) ou tampão tricina (índice 2) como solventes; a identificação “a” refere-se à adição da NPM juntamente à dissolução do lipídio e “b” refere-se à NPM adicionada na etapa de hidratação. A razão m/m de NPM:ASO foi de 0,002.

Tabela 8: Valores de frequência e largura de banda e suas variações (∆) encontradas no espectro de HATR-FTIR para picos de grupos específicos do fosfolipídio presente nos magnetolipossomas e lipossomas-controle.

	HV(1)	HV(1)_ NP	∆	HV(2)	HV(2)_ NP	∆	FR(1)	FRa(1)_ NP	∆	FRb(1)_NP	∆	FR(2)	FRa(2)_ NP	∆	FRb(2)_NP	∆
							Frequência (cm^{-1})									
$\nu\ N^+(CH_3)_3$	974	972	2	977	975	2	972	972	-	972	-	974	978	4	978	4
$\nu_{as}\ PO_2^-$	1219	1211	8	1215	1211	4	1213	1209	4	1211	2	1209	1207	2	1209	-
ν C=O	1732	1732	-	1732	1734	2	1732	1735	4	1732	-	1734	1734	-	1734	-
$\nu_{as}\ CH_2$	2924	2924	-	2924	2924	-	2924	2924	-	2924	-	2924	2924	-	2924	-
$\nu_s\ CH_2$	2852	2852	-	2852	2852	-	2852	2852	-	2852	-	2852	2852	-	2854	2
							Largura medida a 75% do pico em cm^{-1}									
$\nu_{as}\ PO_2^-$	22	14	8	36	16	20	16	15	1	14	2	20	20	-	20	-
ν C=O	30	30	-	30	30	-	30	30	-	25	5	30	25	5	20	10
$\nu_{as}\ CH_2$	22	25	3	20	25	5	20	20	-	20	-	20	20	-	20	-
$\nu_s\ CH_2$	15	15	-	15	15	-	15	10	5	15	-	15	15	-	15	-

Magnetolipossomas: HV(1)_NP, HV(2)_NP, FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, e seus respectivos lipossomas-controle: HV(1), HV(2), FR(1) e FR(2). HV: método de hidratação de vesículas; FR: método de evaporação em fase reversa. Índices 1 e 2 correspondem, respectivamente, a amostras hidratadas com água e tampão tricina. A identificação “a” refere-se a NPM adicionada juntamente com a dissolução do lipídio e “b” refere-se a NPM adicionada na etapa de hidratação. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

5.3.1 Caracterização físico-química dos magnetolipossomas preparados pelo método de hidratação de vesículas

5.3.1.1 Região polar

5.3.1.1.1 Região Fosfato

As variações de frequência, apresentadas na Tabela 7, para a região polar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles estão ilustradas na Figura 37. As frequências referentes ao estiramento axial do grupo fosfato lipídico (ν_{as} PO_2^-) para os sistemas HV(1)_NP e HV(2)_NP, diminuíram, respectivamente, em 7,71 e 3,85 cm^{-1}, quando comparadas aos respectivos valores dos seus lipossomas-controle (ver Tabela 7). Assim sendo, os resultados indicam que a NPM disponibiliza um aumento na quantidade de ligações de hidrogênio no grupo fosfato lipídico, aumentando o seu grau de hidratação, de forma mais expressiva no sistema preparado com água (Lopezgarcia et al., 1993).

A interação molecular via ligação hidrogênio parece ser mais preservada no magnetolipossoma preparado com tampão, em relação ao lipossoma-controle. Porém, ao comparar-se os lipossomas-controle preparados com água e tampão (amostras HV(1) e HV(2), respectivamente) pode-se verificar que o sistema preparado com tampão apresentou uma diminuição no valor do ν_{as} PO_2^- de3,86 cm^{-1}, indicando um aumento na quantidade de ligações de hidrogênio no grupo fosfato lipídico.

Slater e colaboradores (1993) evidenciaram que a intercalação de agentes, como o etanol, entre os grupos polares dos lipídios aumentou a difusão de moléculas de água na bicamada, aumentando o número de ligações de hidrogênio na região (Slater *et al.*, 1993). O aumento no número de ligações de hidrogênio, verificado neste trabalho, entre a molécula de água com o grupo fosfato seria facilitado pela presença dos íons do tampão. Assim, a menor variação verificada do número de ligações de hidrogênio para os magnetolipossomas preparados em tampão (HV(2)_NP) se deve a presença dos íons que já estavam presentes no lipossoma-controle.

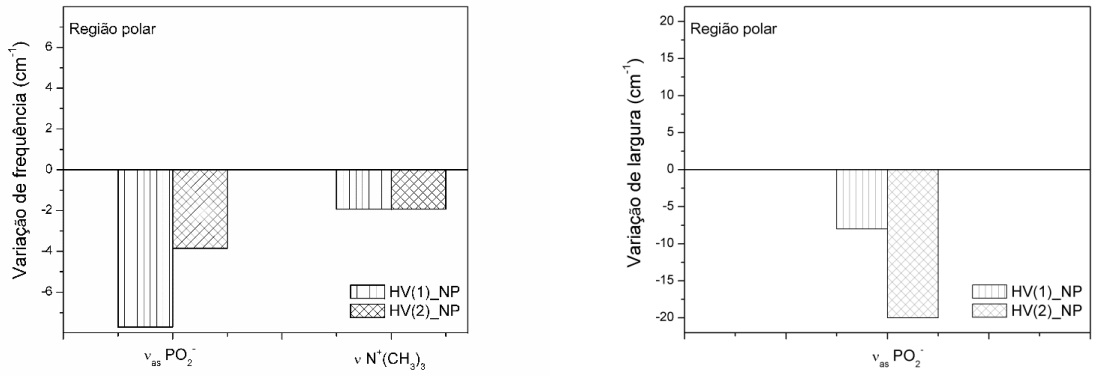


Figura 37: Variações de frequência e largura para a região polar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

Para os magnetolipossomas preparados pelo método de HV, hidratados com água ou tampão (sistemas HV(1)_NP e HV(2)_NP, respectivamente) os valores de largura de banda referentes ao estiramento axial do grupo fosfato lipídico (ν_{as} PO_2^-) diminuíram, respectivamente, em 8 e 20 cm^{-1}, quando comparadas aos respectivos valores dos seus lipossomas-controle (ver Tabela 7). Este resultado indica uma menor fluidez da membrana do magnetolipossomas em relação ao seu lipossoma controle. Alterações no ordenamento do sistema podem ser induzidas por mudanças na concentração de cátions uni e bivalentes (Boggs, 1980). Neste trabalho, foi verificada uma fluidificação dos lipossomas-controle preparado com tampão, HV(2), em comparação aos preparados em água, HV(1): aumento na largura de banda de 14 cm^{-1}. Com isso, pode-se verificar um forte efeito de ordenamento ocasionado pela NPM no sistema preparado com tampão, HV(2)_NP, visto que o magnetolipossoma apresentou uma maior varia-

ção no valor de largura de banda referente ao ν_{as} PO_2^- em comparação ao seu controle, HV(2).

Adicionalmente, foram efetuadas análises de RMN de ^{31}P para obtenção de informações sobre a dinâmica rotacional do grupo fosfato em magnetolipossomas. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 12. Estes espectros apresentam um ombro a campo alto e um pico isotrópico a campo baixo, típicos de fosfolipídios associados em fase H_{II} (Villasmil-Sanchez *et al.*, 2013). Tal fase é associada a misturas de fosfolipídios que contêm fosfatidiletanolamina, como tipicamente a ASO, componente dos magnetolipossomas estudados (Rand *et al.*, 1971; Higashi *et al.*, 1987).

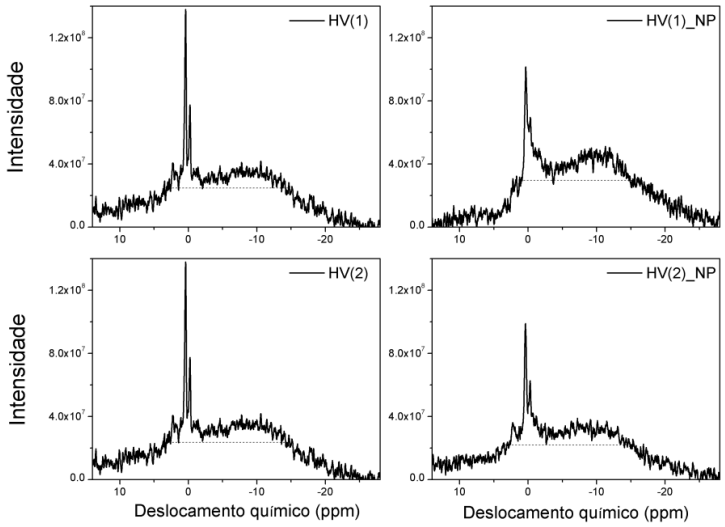


Figura 38: Espectros de RMN de ^{31}P de amostras de magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas-controle, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas (HV) usando água como solvente; bem como de magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas-controle, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas (HV) usando tampão tricina como solvente. A razão m/m de NPM:ASO foi de 0,002.

Os valores de CSA foram obtidos para as amostras e estão listados na Tabela 9. Os resultados demonstram que a NPM induz um aumento da largura do pico de RMN ^{31}P equivalente a 0,45 ppm para o sistema hidratado com água (HV(1)_NP) e 5,78 ppm para o sistema hidratado com tampão (HV(2)_NP), em comparação aos lipossomas-controle, indicando uma restrição da liberdade de movimento dos grupos fosfatos presentes nos magnetolipossomas. Esta restrição pode estar relacionada com interações eletrostáticas entre o grupo fosfato e os íons de ferro presentes nas NPM estudadas (Santhosh *et al.*, 2012).

Tabela 9: Valores de largura de pico obtidos a partir dos espectros de RMN ^{31}P para os magnetolipossomas e seus lipossomas-controle.

	HV(1)	HV(1)_ NP	Δ	HV(2)	HV(2)_ NP	Δ
largura (ppm)	15,91	16,36	0,45	14,22	20,00	5,78

A largura (CSA) em relação aos tensores paralalos e perpendiculares dos movimentos do núcleo de fósforo.Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

5.3.1.1.2 Região Colina

Os resultados descritos na Tabela 7, referentes ao estiramento do grupo colina, $\nu\ N^{+}(CH_3)_3$, mostraram que não houve variações na frequência ao compararem-se os valores associados a magnetolipossomas e seus lipossomas controle. Assim, através da técnica de HATR-FTIR, não foi possível evidenciar uma interação entre o grupo colina e a NPM para os sistemas preparados pelo método HV (Wong e Mantsch, 1988; Moreno *et al.*, 2009).

Assim, para complementar os estudos realizados sobre a dinâmica do grupo colina em magnetolipossomas preparados por HV, foram realizadas medidas de RMN de ^{1}H. A Figura 39 mostra a curva referente à recuperação do sinal de decaimento por indução livre (FID), através dos quais são calculados os valores de T_1 dos hidrogênios da colina (região entre os deslocamentos químicos de 3,2 a 3,4 ppm). Os valores de T_1 estão apresentados na Tabela 10. No sistema, em que o solvente utilizado foi água (HV(1)_NP), o T_1 aumentou em 51,2%, quando comparado ao seu lipossoma-controle. Os resultados refletem uma redução da mobilidade molecular, induzida pela NPM, na região da colina do magnetolipossoma. No entanto, para os sistemas em que o solvente utilizado foi o tampão tricina (HV(2)_NP), não foi verificada influência da NPM nessa região.

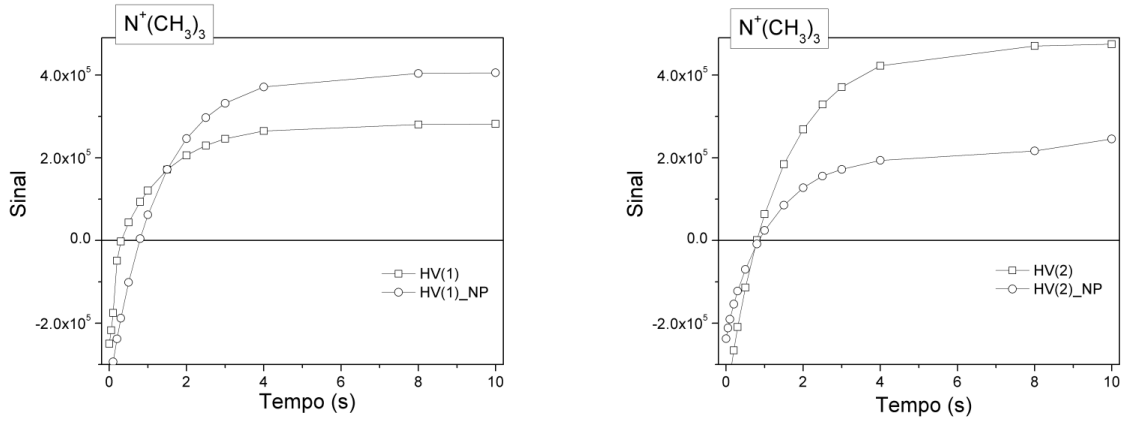


Figura 39: Curvas referentes à relaxação longitudinal dos hidrogênios da colina (região entre 3,2-3,4 ppm) em lipossomas de ASO puro e na presença de NPM. A partir destas curvas os valores de T_1 foram obtidos. Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

Tabela 10: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) referentes aos hidrogênios da colina (deslocamentos químicos entre 3,2-3,4 ppm) para os magnetolipossomas e seus lipossomas-controle.

	HV(1)	HV(1)_ NP	Δ	HV(2)	HV(2)_ NP	Δ
T_1 (s)	0,64	1,25	0,61	1,13	1,12	0,01

Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

Diante desses resultados, pode-se verificar que a NPM apresentou um maior efeito de ordenamento e no grau de hidratação nos magnetolipossomas preparados pelo método de hidratação de vesículas em que o tampão foi usado como solvente, amostra HV(2)_NP. O uso do tampão no preparo do lipossoma-controle, sistema HV(2), ocasionou um aumento no número de ligações de hidrogênio no grupo fosfato, bem como uma fluidificação da região polar, quando comparado ao controle, HV(1). A presença dos íons provenientes do tampão pode justificar a maior susceptibilidade de variação verificada no magnetolipossoma, HV(2)_NP.

5.3.3.2 Região de interface

As variações de frequência obtidas pela técnica de HATR-FTIR para os magnetolipossomas analisados (obtidos a partir da Figura 35 e apresentados na Tabela 7) para a região de interface dos magnetolipossomas indicaram que os magnetolipossomas não sofreram alterações na frequência referente ao estiramento axial do grupo carbonila (ν C=O). Assim, não foram verificadas interações diferenciadas em relação aos lipossomas-controle, via ligações de hidrogênio, com o grupo carbonila lipídico (Arrondo e Goni, 1998). Através da análise da largura da banda da região de ν C=O não foi observada uma variação significativa. Assim, por FTIR, para as amostras prepa-

radas pelo método de HV, não foi verificada influência da NPM, nem do tampão, sobre a ordem conformacional desta região.

5.3.3.3 Região apolar

Os resultados de variações de frequência e largura obtidos pela técnica de HATR-FTIR para os magnetolipossomas analisados (obtidos a partir da Figura 35 e da Tabela 7) estão ilustradas na Figura 38. Os dados não indicaram alterações nos valores de frequência referentes aos estiramentos axiais simétricos e assimétricos dos metilenos da cadeia acil lipídica (ν_s CH_2 a 2854,05 cm^{-1} e ν_{as} CH_2 a 2924,09 cm^{-1}), quando comparados aos seus lipossomas controle. Tampouco o uso de solventes diferentes (água e tampão) provocou alterações nos valores de frequência dos estiramentos estudados. Assim, por FTIR, para as amostras preparadas pelo método de HV, não foi verificada influência da NPM sobre a ordem conformacional e isomerização trans / gauche desta região.

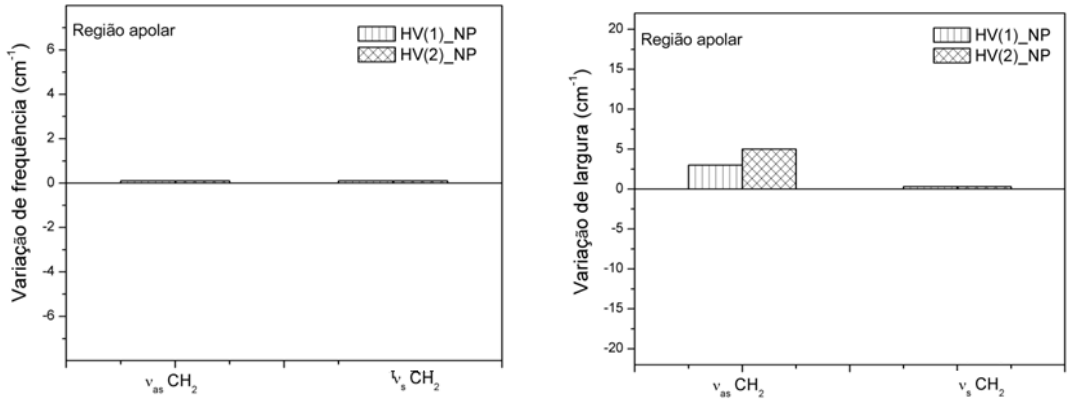


Figura 40: Variações de frequência e largura para a região apolar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de

hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

A ampliação do espectro de HATR-FTIR na região de ν_s CH_2, demonstrada na Figura 35, mostra um aumento na largura do pico de 3 cm^{-1} e de 5 cm^{-1} para as amostras hidratadas com água e tampão, HV(1)_NP e HV(2)_NP, respectivamente (ver Tabela 7), quando comparado com os lipossomas-controle. Isto indica que a presença de NPM provoca um desordenamento na região hidrofóbica dos magnetolipossomas, quando comparados a lipossomas-controle, para ambos os solventes usados no preparo por HV. Comparado ao uso de água como solvente, a presença de tampão parece estar associada ao maior desordenamento da região hidrofóbica dos magnetolipossomas, em relação aos respectivos lipossomas-controle. O aumento da fluidez pode ser importante por facilitar a circulação de moléculas de fosfolipídios e de proteínas na membrana, auxiliando em várias funções biológicas, como transporte de íons, sinalização e crescimento celular (Park *et al.*, 2005). Estudos sobre os efeitos das NP na estabilidade da membrana revelaram que a incorporação de NP metálicas dentro da membrana alteram o comportamento de fase dos lipídios: aumentando a fluidez da bicamada (Roiter *et al.*, 2008; Bhandary *et al.*, 2011).

A fim de obter maiores informações sobre os parâmetros físico-químicos da região acil de magnetolipossomas, comparando-os com seus lipossomas-controle, foram realizadas medidas de T_1 de ^1H nesta região, considerando os picos a 1-2 ppm no espectro de RMN. As curvas referentes ao FID, através dos quais foram calculados os valores de T_1 dos hidrogênios dos metilenos da cadeia acil dos magnetolipossomas, estão demonstradas na Figura 39. Os valores de T_1 estão apresentados na Tabela 11. Através dos resultados obtidos, observou-se uma diminuição discreta no T_1 da região metílica de magnetolipossomas hidratados com água de 0,47s (amostra HV(1)_NP), em relação aos lipossomas-controle, HV(1). Para os magnetolipossomas hidratados com tampão (amostra HV(2)_NP), a diminuição do valor de T_1 foi de 0,15 s, quando

comparado aos lipossomas-controle, HV(2). A redução do ordenamento da região hidrofóbica verificado nos magnetolipossomas preparados pelo método HV está de acordo com os resultados obtidos pela técnica de HATR-FTIR, bem como dados da literatura: Santhosh et al (2012 e 2014).

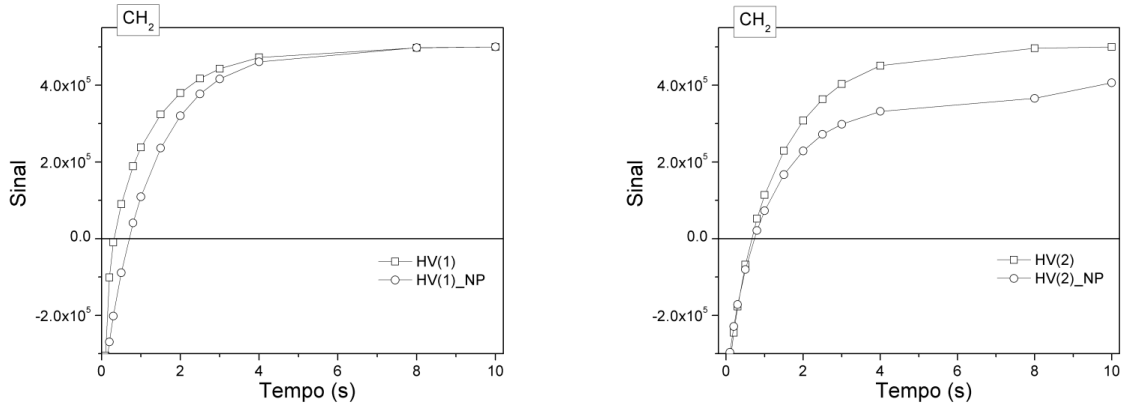


Figura 41: Tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da cadeia acil (região entre 1-2 ppm) de ASO na ausência (quadrados abertos) e na presença (círculos abertos) de NPM. Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

Tabela 11: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da cadeia acil (região entre 1-2 ppm) para os magnetolipossomas e seus lipossomas-controle.

	HV(1)	HV(1)_ NP	Δ	HV(2)	HV(2)_ NP	Δ
T_1 (s)	1,61	1,14	0,47	1,16	1,01	0,15

Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

As informações sobre a região apolar dos magnetolipossomas foram complementadas por análise calorimétrica. As curvas de DSC dos magnetolipossomas preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água e tampão tricina como solventes (amostras HV(1)_NP e HV(2)_NP, respectivamente) e seus lipossomas-controle (HV(1) e HV(2)), estão apresentadas na Figura 42. Em todas as curvas, foi observada uma transição endotérmica na faixa de -30 a -18 ° C, que corresponde à faixa de temperatura típica de fosfatidilcolina insaturada, completamente hidratada. As curvas estão de acordo com as descritas na literatura para fosfolipídios insaturados demonstrando uma transição relativamente ampla, mas bem definida (Ulrich *et al.*, 1994; Taylor e Morris, 1995). A partir desta transição, foram calculados os valores referentes à *ΔH* e de *Tm* dos sistemas. Tais valores estão expressos na Tabela 8.

A partir dos dados obtidos, observou-se que, tanto em água como em tampão, os magnetolipossomas apresentam valores discretamente reduzidos de *ΔH* e *Tm* em relação aos lipossomas-controle. Isto indica um rearranjo molecular muito discreto na fosfatidilcolina para um estado menos ordenado, ou seja, com maior rotação e mobilidade (Biltonen e Lichtenberg, 1993).

Salvatore e colaboradores (2016) verificaram o mesmo efeito de fluidificação em membranas constituídas de DMPC e NPM de magnetita revestida com ácido oleico. No entanto, na literatura, a influência da NP na *Tm* ainda é discutida devido aos tipos de

estabilizantes usados nas NP, bem como, diferenças de carga e tamanho das mesmas (Ester Anstad 2011). Por exemplo, NP de Ag estabilizadas com decantiol e com tamanhos de 5,7 nm incorporadas em membranas zwiteriônicas (em uma razão lipídio para NP de 73:1) não influenciaram a *Tm* (Bothun, 2008). Por outro lado, NP de óxido de ferro revestidas com ácido oleico ocasionaram um aumento da *Tm* de lipossomas zwiteriônicos (Chen, Y. *et al.*, 2010), enquanto que um decréscimo foi verificado em lipossomas catiônicos contendo NP de ZnS/ CdSe (Bothun *et al.*, 2009).

Apesar destas diferenças encontradas na literatura, cabe mencionar que o efeito de diminuição de *Tm* ocasionado pelas NPM deste trabalho estão de acordo com o comportamento observado via técnica de FTIR e RMN. É possível que a interação verificada entre as NPM e grupos polares dos fosfolipídios seja a responsável pela alteração do comportamento de fase da região apolar. Este efeito de fluidificação da membrana também foi verificado por Bhandary e colaboradores (2011) e Roiter e colaboradores (2008).

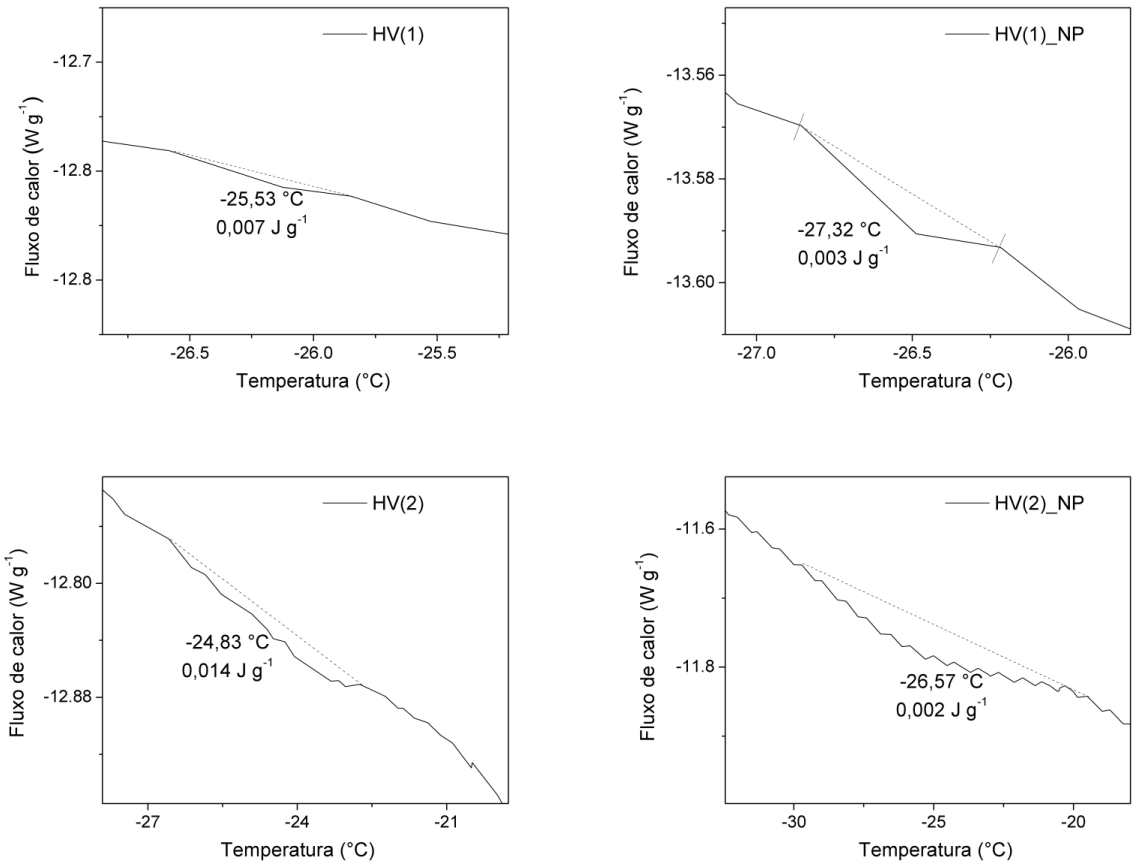


Figura 42: Ampliação das curvas de DSC para magnetolipossomase seus lipossomas-controle, preparados por HV. Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

Tabela 12: Valores de variação de entalpia (*ΔH*) e temperatura de transição de fase (*Tm*) dos magnetolipossomas e lipossomas-controle.

	HV(1)	HV(1)_ NP	Δ	HV(2)	HV(2)_ NP	Δ
ΔH (J g^{-1})	0,007	0,003	0,004	0,014	0,002	0,012
Tm (°C)	-25,53	-27,32	1,79	-24,83	-26,57	1,74

Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e

lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

Ensaios de turbidez, a 400 nm, foram realizados para avaliar variações de ordenamento e/ou tamanho dos magnetolipossomas em relação aos seus lipossomas-controle. Os valores de absorbância de tais amostras estão apresentados na Tabela 13. O volume total de lipossomas é reciprocamente proporcional à turbidez em 400 nm (Matsuzaki *et al.*, 2000). Porém, os magnetolipossomas não apresentaram variação de turbidez frente aos lipossomas-controle.

Tabela 13: Valores de turbidez obtidos a 400 nm por espectroscopia UV-vis dos magnetolipossomas e lipossomas-controle.

	HV(1)	HV(1)_ NP	Δ	HV(2)	HV(2)_ NP	Δ
Abs (u.a.)	0,52 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,02	0,42 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,03

Ensaios realizados em triplicata; Magnetolipossomas, HV(1)_NP, e lipossomas, HV(1), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando água como solvente; magnetolipossomas, HV(2)_NP, e lipossomas, HV(2), preparados pelo método de hidratação de vesículas usando tampão tricina como solvente. Razão m/m NPM: ASO de 0,002.

Em magnetolipossomas preparados pelo método HV as NPM parecem interagir mais fortemente com o grupo fosfato e colina lipídicos, ordenando-os quando o sistema foi preparado com água. Entretanto, quando preparado com tampão, somente parece ordenar o grupo fosfato. Não foram observadas interações das NPM com a interface lipídica de magnetolipossomas, porém a região hidrofóbica foi afetada indiretamente e discretamente, tornando-se mais fluida. Nesta região, ambos os preparos em diferentes solventes parecem influenciar da mesma forma, suportando a hipótese do efeito das NPM na região hidrocarboneto do magnetolipossoma ser uma consequência da intera-

ção com a região polar do mesmo. Um esquema simplificado, determinado através das comparações entre os dados obtidos por diferentes técnicas, da influência da inserção das NPM sobre a dinâmica molecular lipídica dos magnetolipossomas preparados pelo método HV estão apresentados na Figura 43.

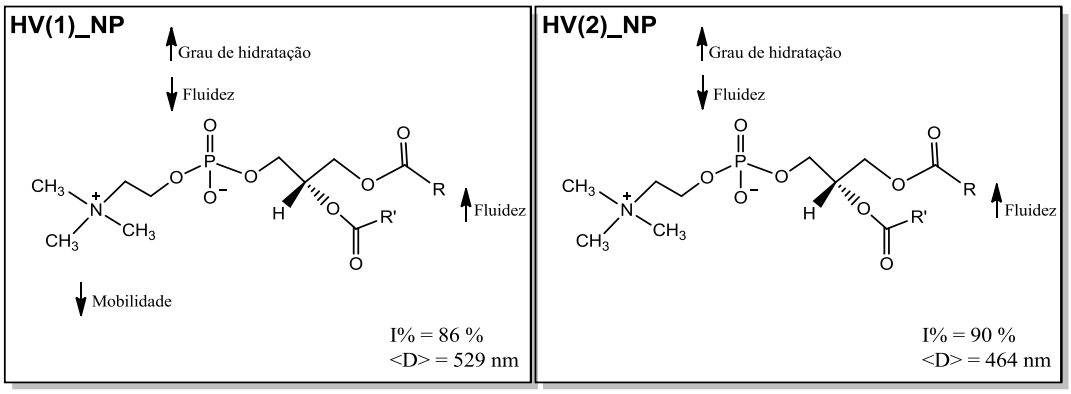


Figura 43: Esquema simplificado do efeito das NPM dos magnetolipossomas (HV1)_NP e HV(2)_NP) em relação aos seus lipossomas-controle (HV(1) e HV(2)) na dinâmica molecular lipidica avaliados por diferentes técnicas instrumentais. A percentagem de incorporação da NPM nestes magnetolipososmas, bem como o diâmetro médio <D> verificado pela técnica de DLS logo após o prepararo também estão apresentados. Solventes utilizados: 1) água e 2) tampão tricina.

5.3.3.4 Correlação das propriedades físico-químicas com a estabilidade e incorporação nos magnetolipossomas preparados pelo método de hidratação de vesículas

De uma forma geral, a inserção de NPM nos magnetolipossomas preparados pelo método HV apresentaram maiores alterações da dinâmica molecular nos sistemas preparados com tampão (amostra HV(2)_NP) quando comparados aos preparados em água. Uma maior diferença entre cargas (variação de |51,8| mV quando comparados os valores de potencial zeta obtidos para as NPM e o lipossoma-controle, ambos em tam-

pão) pode explicar a maior I% (ver Tabela 7, que reporta a I% dos sistemas) verificada no magnetolipossoma HV(2)_NP. Além disso, a orientação da colina voltada para a superfície da bicamada pareceu estar mais acentuada em magnetolipossomas preparados com tampão, o que deixaria a colina mais disponível para realizar interações eletrostáticas com a NPM (de carga negativa), aumentando, assim, a I%. Michel e Gradzielski (2012) mostraram que quanto mais intensas forem as atrações eletrostáticas entre a membrana e a superfície da NP, maior quantidade de NP será incorporada ou adsorvida na membrana. Porém, ao apresentar maior concentração de NPM, o magnetolipossoma preparado em tampão sofreu uma maior oxidação, como visto pelo método de TBARS. Este aumento no percentual de peroxidação lipídica foi causado, não somente, pelo maior número de NPM incorporadas nos lipossomas de ASO, mas, também pelo aumento da fluidez destes sistemas. Os magnetolipossomas, quando em tampão, apresentaram uma fluidificação nas regiões polar (visto pelas variações de largura de banda do $\nu_{as}\, PO_2^-$ e os valores de T_1 do grupo colina) e hidrofóbica (verificado pelos dados de T_1 dos CH_2 presentes na cadeia acil).

A diminuição nas forças de atração de Van der Waals entre as membranas vizinhas devido ao uso de solventes zwiteriônicos (como a tricina) pode causar uma diminuindo do diâmetro médio dos magnetolipossomas (Koerner *et al.*, 2011). Além disso, a redução do tamanho (de cerca de 65 nm) do magnetolipossoma preparado com tampão, HV(2)_NP, em relação ao preparado em água, HV(1)_NP proporcionou uma maior curvatura da superfície dos fosfolipídios, tornando a disposição menos empacotada, permitindo, assim, uma maior difusão de radicais que aceleram a oxidação (Fagali e Catala, 2009; Reis e Spickett, 2012). Quanto a estabilidade ao longo do tempo, verificada através das medidas de diâmetro médio, os magnetolipossomas preparados em água pareceram ser mais estáveis. Este comportamento dos magnetolipossomas também pode ser devido à ação das NPM no processo de peroxidação nas membranas de ASO.

5.3.2 Caracterização físico-química dos magnetolipossomas preparados pelo método de evaporação em fase reversa

5.3.2.1 Região polar

5.3.2.1.1 Região Fosfato

A partir dos dados apresentados na Tabela 7, as variações de frequência e largura para a região polar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles estão ilustradas na Figura 44.

Comparando-se o espectro de FTIR do magnetolipossoma (FRa(1)_NP, preparado usando água como solvente e NPM adicionada juntamente com a dissolução do fosfolipídio) com seu lipossomas-controle, FR(1), a frequência referente ao estiramento axial do grupo fosfato lipídico ($\nu_{as}\ PO_2^-$) para o sistema diminuiu em 3,86 cm^{-1}. O magnetolipossoma, preparado pelo método descrito acima, apresentou maior quantidade de ligações de hidrogênio entre o grupo fosfato lipídico e a água, aumentando o seu grau de hidratação em relação aos seu lipossoma-controle (Lopezgarcia et al., 1993). Em água, a inserção de NPM no lipossoma HV(1) também ocasionou um aumento no número de ligações de hidrogênio entre a água e o grupo fosfato lipídico. Porém, a variação verificada do $\nu_{as}\ PO_2^-$ foi mais intensa no magnetolipossoma preparado pelo método HV.

No entanto, para os demais sistemas (FRb(1)_NP, FRa(2)_NP e FRb(2)_NP), não foram verificadas variações quanto ao número de ligações de hidrogênios do grupo fosfato lipídico em relação aos respectivos lipossomas-controle, devido a adição de NPM, através da técnica de HATR-FTIR.

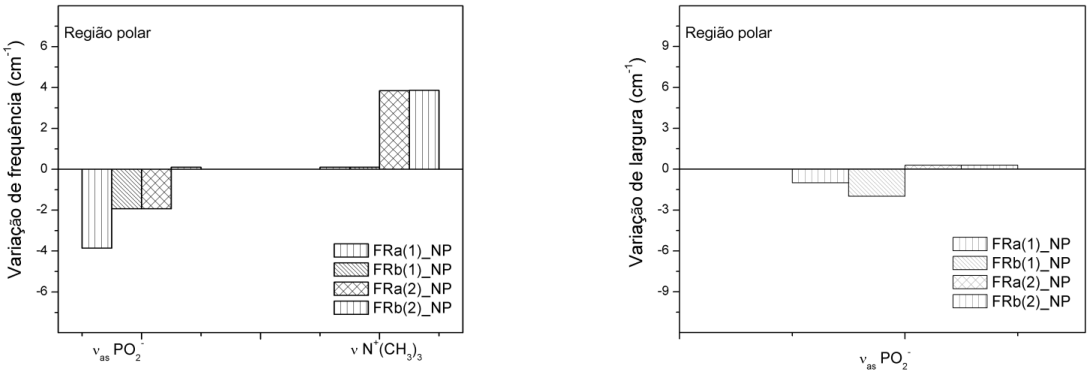


Figura 44: Variações de frequência e largura para a região polar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Os magnetolipossomas estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que oslipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

Para os magnetolipossomas preparados pelo método de FR hidratados com tampão (FRa(2)_NP e FRb(2)_NP) não foram observadas variações na largura de banda referentes à região polar dos lipossomas de ASO induzidas pela NPM. Já para os sistemas hidratados com água (FRa(1)_NP e FRb(1)_NP) foi verificada uma discreta diminuição na largura de banda do estiramento axial assimétrico do grupo fosfato (ν_{as} PO_2^-) de 1 e 2 cm^{-1}, respectivamente.

Como dito anteriormente, na discussão sobre os efeitos da NPM sobre os magnetolipossomas preparados pelo método HV (item 5.3.1.1.1), a diminuição de largura de banda de HATR-FTIR indica um aumento da ordem da membrana da região de estiramento avaliada (Toyran e Severcan, 2003; Moreno *et al.*, 2009). Os magnetolipossomas preparados pelo método de HV apresentaram uma maior variação referentes aos valores de largura de banda do grupo fosfato (ν_{as} PO_2^-) quando comparados aos valores dos controles. Diante dos resultados, pode-se verificar que os magnetolipossomas preparados pelo método HV apresentaram uma maior susceptibilidade de variação na

dinâmica molecular do grupo fosfato lipídico, indicando uma maior influência da NPM para estes magnetolipossomas. De fato, os magnetolipossomas preparados pelo método HV apresentaram um maior I% (cerca de 90%), quando comparados aos preparados pelo método de FR (I% cerca de 60%). Assim, a maior percentagem de NPM incorporada poderia estar influenciando, com maior intensidade, a dinâmica de movimentos desse grupo.

Com relação à influência do tampão sobre a dinâmica molecular do grupo fosfato nos magnetolipossomas preparados pelo método de FR, pode-se verificar um aumento na largura de banda do estiramento axial assimétrico do grupo fosfato ($\nu_{as}\ PO_2^-$) de 5 cm^{-1} (quando comparados o magnetolipossoma FRa(2)_NP com o FRa(1)_NP, sistemas em que a NPM foi adicionada com a dissolução do fosfolipídio e preparados com tampão e água, respectivamente). O aumento nos valores de largura de banda de $\nu_{as}\ PO_2^-$ indica um aumento da fluidez da membrana no magnetolipossoma em que o solvente utilizado foi o tampão (Toyran e Severcan, 2003; Moreno *et al.*, 2009). O efeito de fluidificação causado pelo tampão também foi verificado nos magnetolipossomas preparados pelo método HV, porém com menor intensidade (variação de 2 cm^{-1}, quando comparadas as larguras de banda referentes ao $\nu_{as}\ PO_2^-$ do magnetolipossoma HV(2) e HV(1), preparados em água e tampão, respectivamente.

De forma a obter mais informações sobre a dinâmica rotacional do grupo fosfato dos magnetolipossomas avaliados, foram efetuadas análises de RMN de ^{31}P. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 45. Esses espectros, assim como os obtidos pelos lipossomas preparados pelo método de HV (item 5.3.1.1.1), mostram um ombro a campo alto e um pico isotrópico a campo baixo, típico de fosfolipídios associados em fase H_{II}, devido à presença de fosfatidiletanolamina, um dos constituintes da ASO (Rand *et al.*, 1971; Higashi *et al.*, 1987).

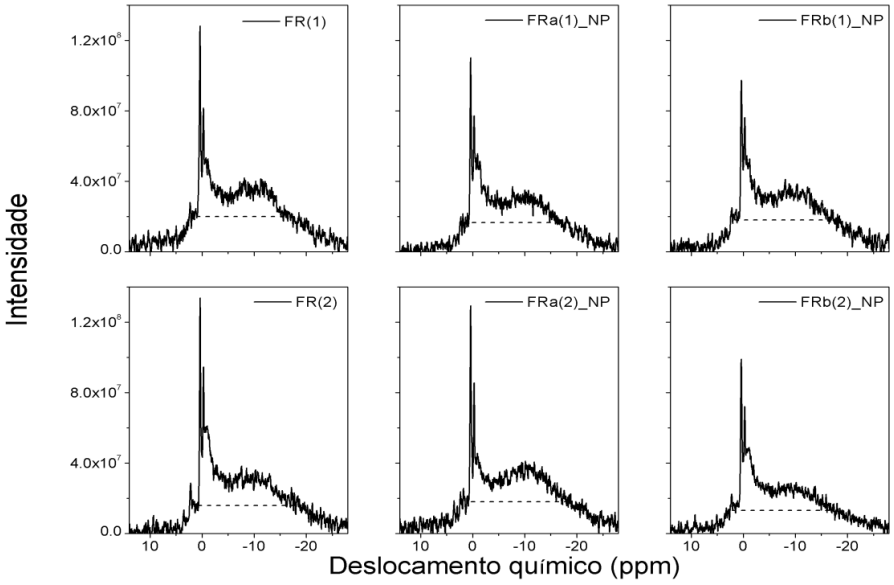


Figura 45: Espectros de RMN de ^{31}P de magnetolipossomas preparados pelo método de evaporação em fase reversa (FR); Os magnetolipossomas estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

Os valores da largura considerando os tensores paralelos e perpendiculares relativos às diferentes orientações do núcleo de fósforo foram obtidos para as amostras de magnetolipossomas e seus lipossomas-controle e estão listados na Tabela 14. Nos magnetolipossomas em que foi utilizada água como solvente (amostras FRa(1)_NP e FRb(1)_NP), não foram verificadas variações significativas nos valores de CSA em relação aos lipossomas-controle. Porém para os sistemas em que foi utilizado o tampão tricina como solvente (amostras FRa(2)_NP e FRb(2)_NP) foi verificado um aumento na distância entre os tensores analisados dos espectros de RMN ^{31}P de 20 e 23%, respectivamente, em comparação ao lipossoma-controle (FR(2). Assim, os resultados indicam que os magnetolipossomas apresentam uma restrição de movimento do grupo

fosfato em relação aos seus controles (Timoszyk *et al.*, 2004). O efeito de ordenamento do grupo fosfato devido a presença de NPM também foi verificado no magnetolipossoma preparado pelo método HV quando foi utilizado como solvente o tampão. Assim, como visto pela técnica de HATR-FTIR, os magnetolipossomas preparados pelo método HV apresentaram uma maior susceptibilidade as mudanças orientacionais do grupo fosfato lipídico ocasionada pela inserção da NPM.

Com relação a influência do tampão no preparo dos magnetolipossomas, a partir da técnica de RMN de ^{31}P, não foi possível verificar alterações na conformação do grupo fosfato, as quais haviam sido verificadas pela técnica de HATR-FTIR.

5.3.2.1.2 Região Colina

O comportamento do grupo colina (região de estiramento da amina, $\nu\ N^{+}(CH_3)_3$), dos diferentes magnetolipossomas dos sistemas preparados pelo método de FR, foi estudado a partir da análise dos espectros de HATR-FTIR. Os resultados de variação de frequência para a região do grupo colina, Tabela 7, não mostraram variações significativas para os magnetolipossomas preparados água (FRa(1)_NP e FRb(1)_NP) em relação aos lipossomas-controle, FR(1). Porém, para os sistemas em que o tampão tricina foi usado como solvente (FRa(2)_NP e FRb(2)_NP), foi verificado um aumento no valor de frequência (de 3,84 cm^{-1}) em relação aos controles. De acordo com Wong e Mantsch (1988) o grupo colina pode interagir com moléculas de água através de interações de dipolo, Figura 46, e alterações nas regiões de $\nu\ N^{+}(CH_3)_3$ indicam variações nas interações água-colina (Wong e Mantsch, 1988). Assim, os resultados obtidos para a região de banda de vibração do grupo amina revelam interações eletrostáticas entre a NPM e a parte polar do fosfolipídio nos magnetolipossomas em que a tricina foi utilizada como solvente.

Tabela 14: Valores de largura obtidos a partir dos espectros de RMN ^{31}P dos magnetolipossomas e lipossomas-controle preparados pelo método de evaporação em fase reversa.

	FR(1)	FRa(1)_ NP	Δ	FRb(1)_NP	Δ	FR(2)	FRa(2)_NP	Δ	FRb(2)_ NP	Δ
largura	17,84	17,78	0,06	18,89	1,05	15,56	18,67	3,11	19,11	3,55

A largura foi calculada em relação aos tensores paralalos e perpendiculares dos movimentos do núcleo de fósforo. Os magnetolipossomas estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação. Razão NPM: lipídio igual a 0,002.

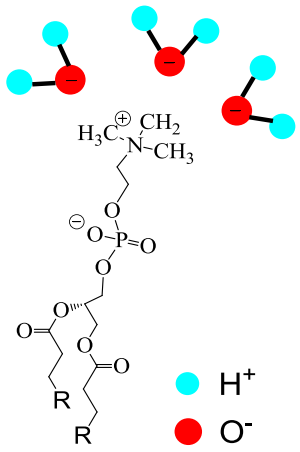


Figura 46: Interação de moléculas de água com o grupo colina de fosfatidilcolinas.

Para complementar os estudos realizados no grupo colina, a caracterização dos magnetolipossomas e lipossomas-controle foi efetuada por RMN ^{1}H. A Figura 47 mostra a curva referente à recuperação do sinal de FID dos hidrogênios da colina (região entre 3,2-3,4 ppm) dos sistemas. A partir desta curva, os valores de T_1 obtidos estão mostrados na Tabela 15. Em todos os magnetolipossomas preparados pelo método de

FR, foi verificado um aumento no tempo de T_1 dos hidrogênios da colina em relação aos seus controles. Nos magnetolipossomas em que água foi utilizada como solvente (FRa(1)_NP e FRb(1)_NP, onde no primeiro a NPM foi adicionada na etapa de dissolução do fosfolipídio e no segundo, na etapa de hidratação) foi verificado um aumento, nos valores de T_1, de 0,76 e 0,84 s, respectivamente, quando comparado aos valores obtido para o lipossoma-controle FR(1). Já para os magnetolipossomas preparados em tampão a variação foi menor: de 0,66 para o sistema FRa(2)_NP e de 0,59 s para o FRb(2)_NP. As alterações observadas nos valores de T_1 dos hidrogênios do grupo colina, para os diferentes magnetolipossomas preparados por este método, refletem uma redução da mobilidade molecular em relação aos seus lipossomas-controle(Brown, 1984; Bloom e Thewalt, 1994). A maior variação observada nos valores de T_1 para o grupo colina nos magnetolipossomas preparados pelo método de FR em água (FRa(1)_NP e FRb(1)_NP) também foi verificada no magnetolipossoma preparado pelo método HV com o mesmo solvente (amostra HV(1)_NP). Isto pode ser um reflexo da maior diferença entre cargas (NPM/lipossomas) e a maior I% observada nos sistemas em que a água foi utilizada como solvente (ver Tabela 7), como discutido no item 5.3.3.4.

Diante dos dados obtidos, pode-se verificar que a NPM ocasionou um efeito de ordenamento na região polar nos magnetolipossomas preparados pelo método de FR. Pelas medidas de HATR-FTIR uma maior interação da NPM com o grupo colina foi verificada nos magnetolipossomas preparados em tampão. O efeito de fluidificação nos magnetolipossomas, ocasionado pelo uso do tampão, como verificado nos magnetolipossomas preparados pelo método de HV, foi verificado pelo aumento da largura de banda do estiramento do grupo fosfato. A etapa de adição da NPM pareceu não influenciar nos dados de dinâmica dos grupos polares lipídicos.

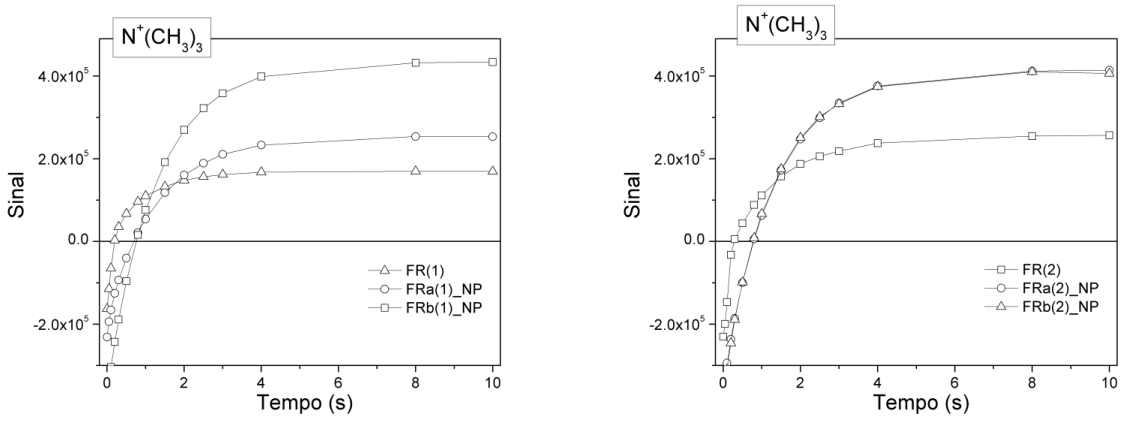


Figura 47: Curvas referentes à relaxação longitudinal dos hidrogênios da colina (região entre 3,2-3,4 ppm) dos magnetolipossomas e lipossomas-controle, preparados pelo método de evaporação em fase reversa. A partir destas curvas os valores de T_1 foram obtidos. Os magnetolipossomas estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e(2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

Tabela 15: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da colina dos magnetolipossomas e lipossomas-controle.

	FR(1)	FRa(1)_ NP	Δ	FRb(1)_NP	Δ	FR(2)	FRa(2)_NP	Δ	FRb(2)_ NP	Δ
T_1 (s)	0,37	1,13	0,76	1,21	0,84	0,60	1,26	0,66	1,19	0,59

Os magnetolipossomas estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

5.3.2.2. Região de interface

As variações de frequência e largura para a região de interface, calculados a partir dos dados obtidos por HATR-FTIR (Tabela 7) dos magnetolipossomas em relação aos seus controles estão ilustradas na Figura 48.

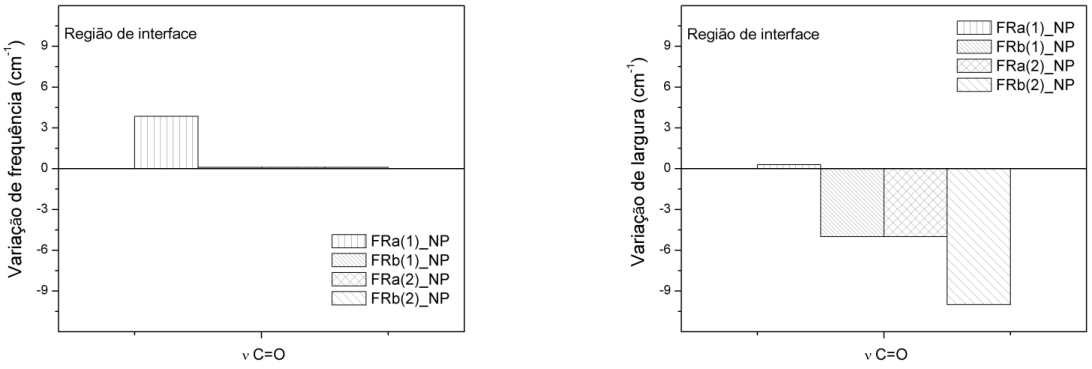


Figura 48: Variações de frequência e largura para a região de interface dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Os magnetolipossomas estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que oslipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

Os magnetolipossomas apresentaram alterações na frequência referente ao estiramento axial do grupo carbonila (ν C=O) somente para o sistema FRa(1)_NP quando comparados aos seus lipossomas-controle. O aumento no valor de frequência observado, de 3,85 cm^{-1}, indica uma diminuição das interações via ligações de hidrogênio do grupo carbonila lipídico (Arrondo e Goni, 1998). Porém, para os demais magnetolipossomas, a inserção da NPM não provocou alterações na frequência do grupo carbonila.

Através da análise da largura da banda referente ao grupo carbonila lipídico (ν C=O a 1734,01 cm^{-1}) presente no fosfolipídio dos magnetolipossomas preparados pelo método de FR (ilustrado na Figura 48) observou-se que os magnetolipossomas apresentaram uma diminuição na largura de banda nesta região em relação aos seus controles. Uma maior variação foi verificada no sistema hidratado com tampão FRb(2)_NP (diminuição na largura de banda de 10 cm^{-1}) indicando um maior aumento da ordem da membrana para estes sistemas (Moreno et al., 2009; Toyran e Severcan, 2003). Nos magnetolipossomas preparados pelo método de HV, não havia sido verificada influência das NPM na dinâmica molecular da região de interface. O menor tamanho dos magnetolipossomas preparados pelo método de FR (como apresentado na Tabela 5), e, por consequência, menores empacotamento e ordenamento dos grupos polares lipídicos poderia estar facilitando uma interação da NPM com a região de interface.

5.3.2.3. Região apolar

Assim como nos estudos de magnetolipossomas preparados por HV, a região apolar dos sistemas preparados por FR foram avaliados por FTIR, RMN e DSC. A partir dos dados apresentados na Tabela 7, as variações de frequência para a região apolar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles estão ilustradas na Figura 49.

Os dados de HATR-FTIR indicaram que os magnetolipossomas preparados pelo método FR não apresentaram alterações significativas na frequência referente aos estiramentos axiais simétricos (ν_s CH_2) e assimétricos (ν_{as} CH_2) dos metilenos da cadeia acil lipídica em ambos os sistemas (água e solvente), Figura 49. Assim, para as amostras preparadas pelo método FR não foi verificada influência da NPM sobre esta região por esta técnica.

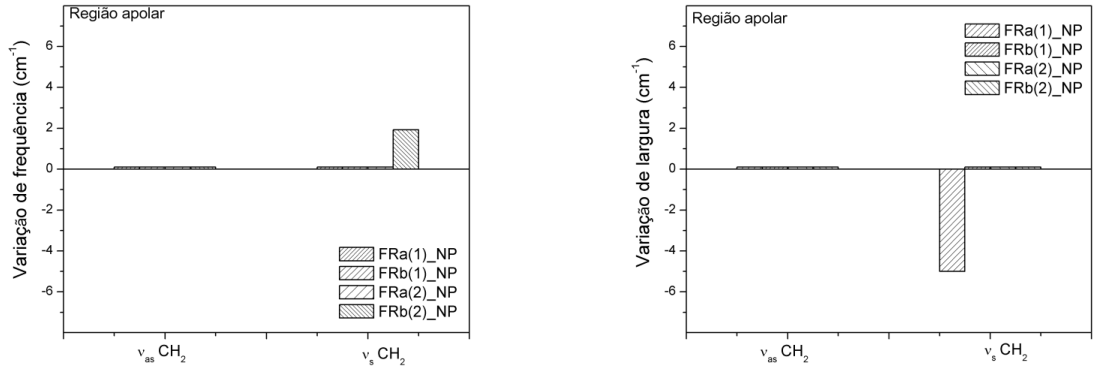


Figura 49: Variações de frequência e largura para a região apolar dos magnetolipossomas em relação aos seus controles. Os magnetolipossomas estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

A ampliação do espectro de HATR-FTIR na região da banda de estiramento dos metilenos do grupo acil lipídico (ν_s CH_2 a 2854,05 cm^{-1} e ν_{as} CH_2 a 2924,09 cm^{-1}) está apresentada na Figura 36, bem como as variações calculadas entre os magnetolipossomas e seus controles estão apresentados na Figura 49. Para o magnetolipossoma FRa(1)_NP foi verificada uma diminuição na largura da banda de 5 cm^{-1} em relação ao lipossoma-controle, ver Figura 49. Isto indica um aumento na presença de ligações gauche no sistema, tornando esta região hidrofóbica mais ordenada. Para os demais sistemas, não foi verificada influência da NPM no ordenamento da região do grupo acil lipídico (Moreno *et al.*, 2009).

As curvas referentes à intensidade do pico de RMN de hidrogênios presentes nos metilenos da cadeia acil (1-2 ppm), dos magnetolipossomas e lipossomas-controle, em função do intervalo entre pulsos de radiofrequência, estão demonstradas na Figura 50. A partir destas curvas, os valores de T_1 foram calculados para a região lipídica em estudo e estão apresentados na Tabela 16.

Nos magnetolipossomas hidratados com água, amostras FRa(1)_NP e FRb(1)_NP, foram verificados um aumento nos valores de T_1 da região metílica de 0,49e 0,64 s, respectivamente. Isto demonstra que os magnetolipossomas preparados pelo método de FR apresentaram uma redução da mobilidade na região acil, o que está de acordo com os resultados obtidos pela técnica de HATR-FTIR para a amostra FRa(1)_NP. Para os magnetolipossomas hidratados com tampão, amostras FRa(2)_NP e FRb(2)_NP foram verificados um aumento nos valores de T_1 da região metílica de 0,56 e 0,48 s, respectivamente. No entanto, para os magnetolipossomas preparados pelo método HV, a inserção da NPM aumentou a fluidez dos sistemas, o que pode estar relacionado aos maiores tamanhos dos magnetolipossomas preparados pelo método HV.

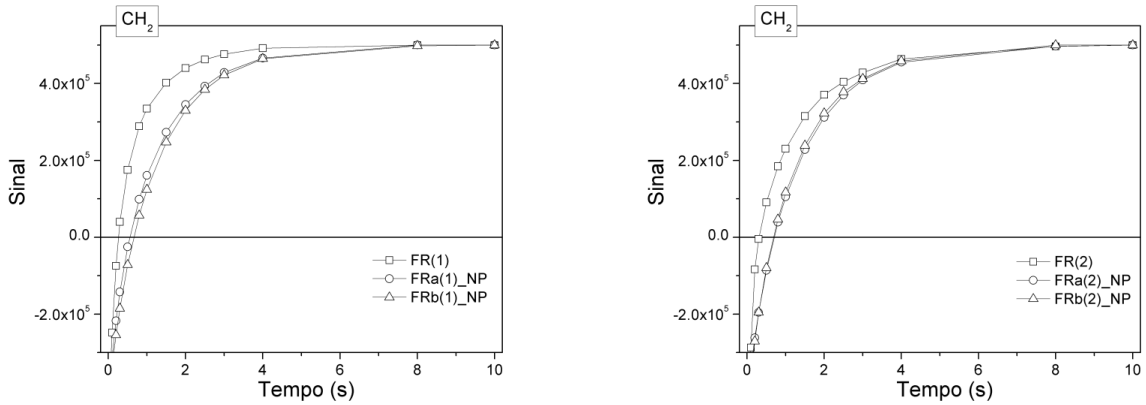


Figura 50: Tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios do do CH_2 de magnetolipossomas. Os magnetolipossomas estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

Tabela 16: Valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da cadeia acil nos magnetolipossomas e lipossomas-controle.

	FR(1)	FRa(1)_ NP	Δ	FRb(1)_NP	Δ	FR(2)	FRa(2)_NP	Δ	FRb(2)_ NP	Δ
T_1 (s)	0,46	0,95	0,49	1,10	0,64	0,6	1,16	0,56	1,08	0,48

Os magnetolipossomas preparados pelo método de evaporação por fase reversa (FR) estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

Em adição, foram realizadas medidas calorimétricas para os magnetolipossomas e lipossomas-controle, preparados pelo método de FR. As curvas de DSC dos magnetolipossomas estão apresentadas na Figura 51 e os resultados de ΔH e T_m obtidos a partir destas curvas estão expressos na Tabela 17. Os magnetolipossomas preparados pelo método de FR apresentaram um aumento discreto nos valores de ΔH. O magnetolipossoma FRa(1)_NP, em relação aos demais magnetolipossomas, apresentou a maior variação (em torno de 0,05 J g^{-1}) quando comparado ao seu controle, FR(1). A influência da NPM nos valores de T_m foi evidente nos magnetolipossomas preparados com tampão tricina (o aumento da T_m foi de, aproximadamente, 3°C para os magnetolipossomas FRa(2)_NP e FRb(2)_NP em relação aos controles. Para os magnetolipossomas preparados com água (amostras FRa(1)_NP e FRb(1)_NP) foi verificado um discreto aumento nos valores de T_m. Assim, o aumento nos valores de ΔH e T_m verificados para os magnetolipossomas em relação aos seus respectivos controles indicam que a NPM promove um discreto rearranjo molecular na fosfatidilcolina para um estado mais ordenado, ou seja, com menor mobilidade. Tal comportamento é sustentado com os dados obtidos pelas análises de HATR-FTIR e RMN de ^{1}H.

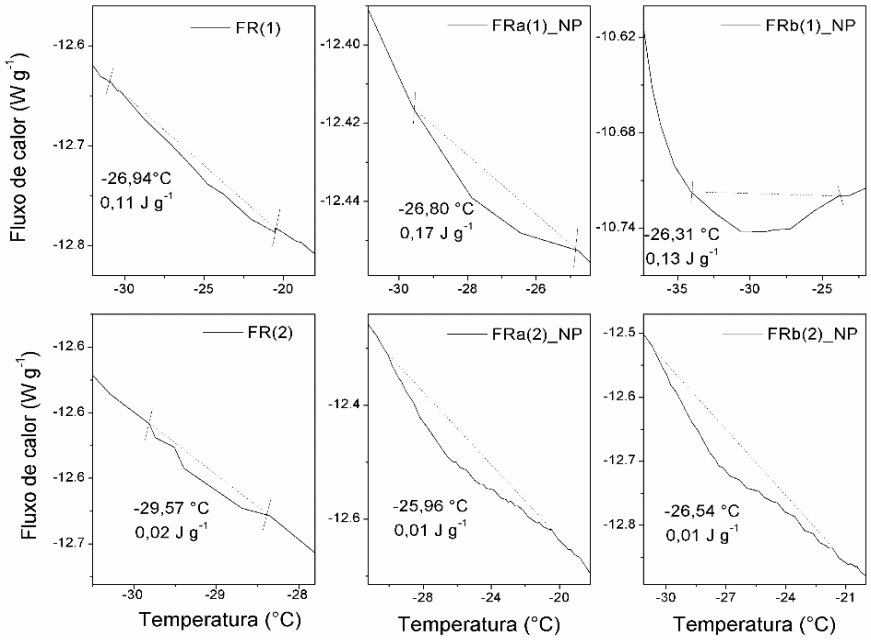


Figura 51: Zoom das curvas de DSC para os magnetolipossomas. Os magnetolipossomas estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

Tabela 17: Valores de variação de entalpia (*ΔH*) e temperatura de transição de fase (*Tm*) obtidos a partir dos gráficos de DSC dos magnetolipossomas e lipossomas-controle.

	FR(1)	FRa(1)_ NP	Δ	FRb(1)_NP	Δ	FR(2)	FRa(2)_NP	Δ	FRb(2)_ NP	Δ
ΔH (J g^{-1})	0,11	0,17	0,05	0,13	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
Tm (°C)	-26,94	-26,80	0,14	26,31	0,31	-29,57	-25,96	3.61	-26,54	3,03

Os magnetolipossomas preparados pelo método de evaporação em fase reversa (FR) estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números das abreviações indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

Os valores de turbidez estão mostrados na Tabela 18. Com relação à comparação dos magnetolipossomas preparados pelo método de FR e o solvente utilizado água (FRa(1)_NP e FRb(1)_NP) e de seus lipossomas-controle (FR(1), não foram verificadas variações significativas. Já nos magnetolipossomas preparados pelo mesmo método, mas usando tampão tricina como solvente (amostras FRa(2)_NP e FRb(2)_NP) foram verificadas variações discretas, mas significativas: uma variação nos valores de absorbância de aproximadamente 0,03 e 0,04 u.a. para os magnetolipossomas FRa(2)_NP e FRb(2)_NP, respectivamente em relação ao controle FR(2). A redução dos valores de absorbância observados está relacionado à diminuição do tamanho médio desses sistemas (Matsuzaki *et al.*, 2000) o que está de acordo com os dados obtidos de diâmetro médio pela técnica de DLS, Tabela 5.

Tabela 18: Valores de turbidez obtidos, a 400 nm, dos magnetolipossomas e lipossomas-controle preparados pelo método de evaporação em fase reversa.

	FR(1)	FRa(1)_ NP	Δ	FRb(1)_NP	Δ	FR(2)	FRa(2)_NP	Δ	FRb(2)_ NP	Δ
Abs (u.a.)	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0	0,47 ± 0,01	0	0,45 ± 0,01	0,42 ± 0.01	0,03	0,41 ± 0,01	0,04

Ensaios realizados em triplicata. Os magnetolipossomas preparados pelo método de evaporação em fase reversa (FR) estão abreviados como FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP, enquanto que os lipossomas-controle por FR(1) e FR(2). Os números indicam os solventes utilizados: (1) água e (2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM durante a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

Em frente aos dados obtidos pelas técnicas de HATR-FTIR, RMN, DSC e UV-vis pode-se verificar que nos magnetolipossomas preparados pelo método FR, as NPM parecem interagir mais fortemente com o grupo fosfato e colina lipídicos, tornando-os mais ordenados. Quando comparados os controles entre si, FR(1) e FR(2), foi verificado um desordenamento na região polar induzido pelo tampão. Assim, pode-se verificar

a forte interação da NPM com a região polar (grupos fosfato e colina) com os magneto-lipossomas preparados com tampão. Também foi observada interação da NPM com a interface lipídica de magnetolipossomas, em qual foi observada um ordenamento. A região hidrofóbica lipídica foi afetada indiretamente e discretamente, tornando-se mais ordenada. Nesta região, ambos os preparos em diferentes solventes parecem influenciar da mesma forma, suportando a hipótese do efeito das NPM na região hidrocarboneto do magnetolipossoma ser uma consequência da interação com a região polar do mesmo. Um esquema simplificado sobre o efeito da NPM nos magnetolipossomas comparados aos seus lipossomas-controle, estão apresentados na Figura 43.

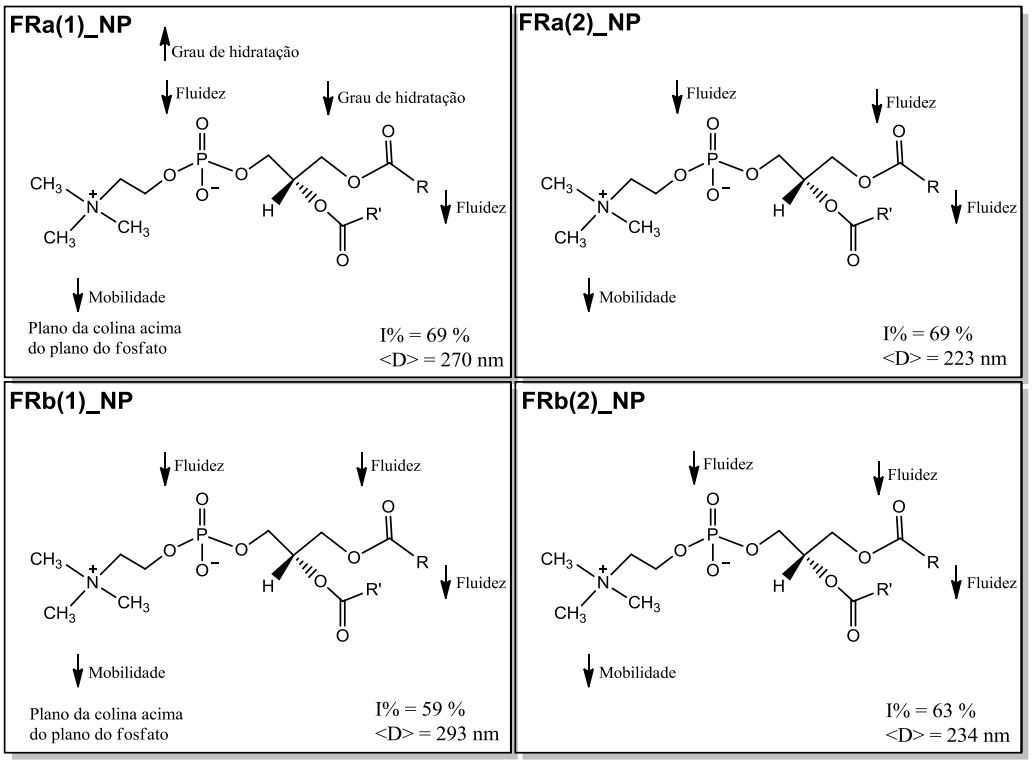


Figura 52: Esquema simplificado do efeito da NPM nos magnetolipossomas (FRa(1)_NP, FRb(1)_NP, FRa(2)_NP, FRb(2)_NP) em relação aos seus lipossomas-controle (FR(1) e FR(2)) na dinâmica molecular lipidica, percentagem de incorporação e diâmetro médio. Solventes utilizados: 1) água e 2) tampão tricina. A identificação “a” indica a adição da NPM juntamente com a dissolução do lipídio e “b” a adição da NPM na etapa de hidratação.

5.3.3.4 Correlação das propriedades físico-químicas com a estabilidade e percentagem de incorporação nos magnetolipossomas preparados pelo método de evaporação em fase reversa

Diante dos dados obtidos, pode-se verificar que a NPM ocasionou um efeito de ordenamento na região polar nos magnetolipossomas preparados pelo método de FR. Pelas medidas de HATR-FTIR uma maior interação da NPM com o grupo colina foi verificada nos magnetolipossomas preparados em tampão. Além disso, a orientação da colina voltada para a superfície da bicamada (verificada pelas medidas de potencial zeta) pareceu estar mais acentuada em magnetolipossomas preparados com tampão. A região de interface e apolar dos fosfolipídios dos magnetolipossomas preparados pelo método de FR, apresentou-se mais ordenada após inserção da NPM, o que não havia sido verificado nos preparados pelo método de HV.

O menor tamanho dos magnetolipossomas preparados pelo método de FR, e, por consequência, menores empacotamento e ordenamento dos grupos polares lipídicos poderia estar facilitando uma interação da NPM com a regiões de interface e hidrofóbicas, sugerindo que o efeito das NPM sobre essas regiões ser uma consequência da interação com a região polar. Um efeito de redução de tamanho (verificado pelas medidas de DLS) e fluidificação (verificada pelas técnicas de HATR-FTIR, DSC e RMN) da membrana foi verificado nos magnetolipossomas preparados com tampão, em relação aos preparados em água.

A etapa de adição da NPM influenciou a I% de NPM nos magnetolipossomas, sendo que os magnetolipossomas em que a inserção da NPM ocorreu durante a etapa de dissolução do fosfolipídio, apresentaram maiores concentrações de NPM incorporada. Porém não foram verificadas grandes influências da etapa de adição da NPM sobre o tamanho, estabilidade e dinâmica dos grupos lipídicos. Estes últimos fatores parecem ter sido fortemente influenciados pela utilização do tampão, como também havia sido verificado pelo método de HV. Os magnetolipossomas preparados em água apresentaram um maior efeito pró-oxidante. Como mencionado anteriormente, o tamanho dos

lipossomas exerce um efeito significativo na susceptibilidade oxidativa das membranas (Li *et al.*, 2000). Assim, seria esperado que os magnetolipossomas preparados em tampão apresentassem um maior efeito pró-oxidante. Porém, pôde-se perceber que a diferença entre os tamanhos (de, aproximadamente, 50 nm ao comparar-se os magnetolipossomas preparados em água e tampão) não foi determinante para os resultados de atividade oxidante nos magnetolipossomas preparados pelo mesmo método: FR.

Dentre todos os magnetolipossomas avaliados neste trabalho, o método de FR, bem como o uso do tampão e adição da NPM na etapa de dissolução do fosfolipídio (amostra denominada FRa(2)_NP) proporcionaram a obtenção de um sistema mais estável, com menor variação de tamanho, satisfatória I% e menor índice de peroxidação. Para esta amostra, em complementação aos estudos realizados anteriormente, foram realizadas medidas de SAXS para estudar a morfologia dos magnetolipossomas formados. Após a otimização do método de preparo, neste trabalho, foi realizado o encapsulamento de um fármaco-modelo e sua influência sobre a I% de NPM, estabilidade e dinâmica molecular nos magnetolipossomas será discutida na seção 2.

5.4. Ensaios de SAXS no sistema de magnetolipossoma mais estável

Para a avaliação de parâmetros de rigidez, tamanho e número das bicamadas formadas nos magnetolipossomas FRa(2)_NP, e do seus lipossomas-controle, FR(2), foram realizadas medidas de SAXS (Figura 53). Os perfis de espalhamento foram descritos pelos fatores de forma *P(q)* e estrutura *S(q)*, sendo este último, baseado na teoria de Caillé. Foram necessários ajustes experimentais em função da presença do espalhamento difuso (N_{difuso}), geralmente formado pela presença de vesículas não interagentes. Portanto, a intensidade de espalhamento foi ajustada de acordo com a Equação:

$$I(q) = \frac{(1 - N_{difusa})P(q)S(q) + N_{difusa}P(q)}{q^2} \qquad \text{Eq. 16}$$

A Figura 53 apresentou semelhanças nos perfis de SAXS de magnetolipossomas FRa(2)_NP, e lipossoma-controle, FR(2). A existência de vesículas multilamelares é facilmente evidenciada pela presença de um pico de correlação ~ 0,98 nm^{-1} sobreposto ao espalhamento difuso. Sabe-se que magnetolipossomas multilamelares têm importantes aplicações biomédicas. Por exemplo, na área de ressonância magnética e segmentação celular, os magnetolipossomas compostos por várias lamelas destacam-se como agentes de contraste (Meyre *et al.*, 2011).

Através dos parâmetros determinados no ajuste das curvas experimentais, foram obtidos os parâmetros que descrevem a flexibilidade e a estrutura das bicamadas. Na Tabela 19, estão representados os valores para a periodicidade lamelar *(d)*, o parâmetro de Caillé *(n)* relacionado à rigidez de flexão da bicamada, o número de bicamadas *(N)* e a espessura da bicamada lipídica.

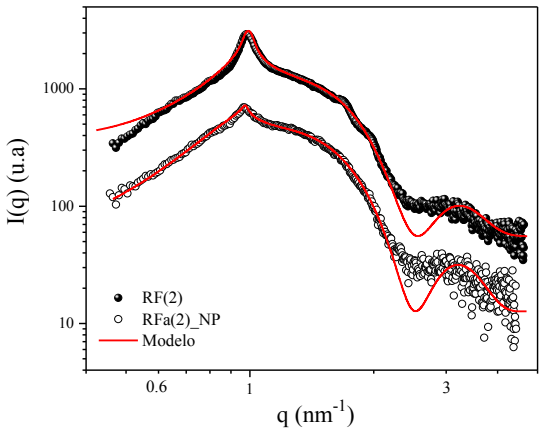


Figura 53: Dados experimentais de SAXS para as amostras de magnetolipossomas, FR(2)_NP, círculos abertos, e lipossomas-controle (FR(2), círculos fechados. As linhas solidas mostram os melhores ajustes alcançados usando-se teoria de Caillé modificada.

Tabela 19: Valores dos parâmetros do modelo obtido a partir dos dados experimentais de SAXS para o magnetolipossoma, FRa(2)_NP, e lipossoma-controle, FR(2).

	d (nm)	n	N	Espessura da bicamada (nm)
FR(2)	6,3	0,79	9	4,8
FRa(2)_NP	6,4	1,25	9	4,9

Periodicidade lamelar (*d*); Parâmetro de Caillé (*n*); número de bicamadas (*N*).

Conforme os dados apresentados da Tabela 19, pode-se verificar que os parâmetros de periodicidade lamelar, número e espessura da bicamada lipídica apresentaram valores semelhantes para magnetolipossoma e lipossoma-controle. Nappini e colaboradores (2016) avaliaram o encapsulamento de NPM de magnetita revestidas com citrato em lipossomas de POPC por SAXS. Foi verificado que a presença das NPM não alterou os valores de espessura da bicamada, indicando o seu encapsulamento no interior aquoso dos lipossomas (Nappini *et al.*, 2016).

O parâmetro Caillé (*n*) na amostra de magnetolipossoma foi maior do que o valor obtido para o lipossoma-controle. O parâmetro de Caillé é inversamente proporcional à raiz quadrada da rigidez de flexão da bicamada. Consequentemente, pode-se verificar que a amostra de magnetolipossoma apresentou uma menor rigidez quando comparado ao controle (verificado pelo aumento no parâmetro Caillé). As diferenças na rigidez da bicamada podem refletir na permeabilidade e estabilidade dos sistemas (Yadav *et al.*, 2011).

SEÇÃO II: ENCAPSULAMENTO DE QUERCETINA (FÁRMACO-MODELO) NOS MAGNETOLIPOSSOMAS

Nesta seção será discutida a influência da quercetina (fármaco-modelo) sobre a estabilidade, I% das NPM, e propriedade físico-químicas dos magnetolipossomas. Tal estudo, baseou-se na inserção da quercetina no magnetolipossoma definido, a partir da seção 1 deste trabalho, através de parâmetros que correlacionaram a I%, estabilidade e dinâmica molecular de diferentes magnetolipossomas.

O magnetolipossoma definido para o estudo foi o preparado pelo método de FR onde o tampão foi usado como solvente e a NPM adicionada na etapa de dissolução do fosfolipídio: amostra denominada FRa(2)_NP). Assim, nesta parte serão apresentados 2 sistemas: o magnetolipossoma contendo quercetina (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002 e quercetina: ASO = 0,0015, amostra denominada nessa seção de ML_QC); o magnetolipossoma-controle, sem a quercetina (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002, amostra denominada de ML).

Nesta seção, a discussão dos resultados será apresentada da seguinte forma: primeiramente serão apresentados os estudos referentes a influência da quercetina nos parâmetros de estabilidade, I% e propriedades físico-química dos magnetolipossomas, posteriormente serão avaliados o efeito da quercetina sobre as propriedades magnéticas e biológicas nestes magnetolipossomas.

5.5 Estabilidade dos magnetolipossomas contendo quercetina

A estabilidade dos magnetolipossomas de ASO contendo quercetina (ML_QC) foi monitorada através de ensaios de DLS, TBARS e potencial zeta. Da mesma forma, magnetolipossomas-controle (ML) foram monitorados.

5.5.1 Medidas de diâmetro médio, atividade oxidante e potencial zeta dos magnetolipossomas contendo quercetina

A influência da quercetina nos valores de <D> e PDI dos magnetolipossomas de ASO foi avaliada através de medidas por DLS e os seus valores estão apresentados na Tabela 20. Para o magnetolipossomas de ASO o valor de<D> foi de 145,62 nm. A inserção da quercetina no sistema ocasionou um aumento no valor de <D> de 63 nm, demonstrando o seu encapsulamento.Com relação aos valores de PDI não foi verificado variação significativa ($p > 0,05$). Assim, a inserção da quercetina nos magnetolipossomas não influenciou na forma de distribuição de tamanho das partículas.

Tabela 20: Influência da quercetina nos valores de diâmetro médio hidrodinâmico (<D>) e índice de polidispersão (PDI) dos magnetolipossomas de ASO.

	ML_QC	ML	Δ
<D> (nm)	208,62 ± 13,34	145,62 ± 14,29	63 nm
PDI	0,461 ± 0,078	0,471 ± 0,017	

Os resultados estão descritos como média ± desvio padrão (n=3). As amostras são: ML_QC: lipossomas de ASO contendo NPM e quercetina (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002 e quercetina: ASO = 0,0015); ML: lipossomas de ASO contendo NPM (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002);

Para determinar a influência da quercetina na peroxidação, *in vitro*, da membrana causada por espécies reativas presentes na atmosfera, as amostras de magnetolipossomas foram submetidas ao teste de TBARS. Os resultados estão mostrados na Tabela 21. Para o ensaio de TBARS foram preparados mais dois lipossomas-controle, amostras denominadas como LP_QC (lipossomas de ASO contendo quercetina, com razões iniciais m/m quercetina: ASO igual a 0,0015) e LP (lipossomas de ASO com uma concentração de 100 mg mL^{-1}.

Tabela 21: Valores de absorbância relativos a peroxidação lipídica induzida pela peroxidação basal obtidas pelo método de TBARS.

	Abs (u.a.)	μmol TBARS mg^{-1}de lipídio	% de peroxidação lipídica
ML_QC	0,013 ± 0,002	0,0067	12,43
ML	0,105 ± 0,008	0,0539	100
LP_QC	0,020 ± 0,002	0,0103	64,78
LP	0,031 ± 0,004	0,0159	100

Os resultados estão descritos como média ± desvio padrão (n=3). As amostras são: ML_QC: lipossomas de ASO contendo NPM e quercetina (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002 e quercetina: ASO = 0,0015); ML: lipossomas de ASO contendo NPM (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002); LP_QC: lipossomas de ASO contendo quercetina (com razões iniciais m/m quercetina: ASO = 0,0015); LP: lipossomas de ASO.

Como mostrado na Tabela 21, a quercetina incorporada nos magnetolipossomas de ASO inibiu a peroxidação lipídica em 8 vezes (equivalente a uma diminuição de 87,62% nos valores de absorbância, quando comparado ao valor obtido no magnetolipossomas de ASO). As NPM incorporadas nos lipossomas de ASO aumentaram a peroxidação em 3,39 vezes, quando comparados aos lipossomas puros (amostra LP). Com este resultado, pode-se perceber que a quercetina é capaz de inibir o processo de peroxidação lipídica causado pelas NPM.

Um dos mecanismos de ação antioxidante da quercetina é a quelação de íons metálicos, como Cu (II) e Fe (II), que acaba impedindo-os de participar na formação de radicais livres (por exemplo, •OH) (Riceevans *et al.*, 1997; Gabrielska *et al.*, 2006; Amic *et al.*, 2007). Neste caso, os anéis B (grupos 3′ e 4′-hidroxilícos, grupos do catecol) e C (grupos 3-hodroxil-4-carbonil e 5-hidroxil-4-carbonil) da molécula de quercetina são responsáveis pela quelação de metais (Tarahovsky *et al.*, 2014). Os sítios preferidos para quelação são localizados no grupo 3-hidroxil-4-carbonil, sendo que o ferro pode produzir complexos com uma, duas ou três moléculas de quercetina (Ren *et al.*, 2008).

A Figura 54 ilustra uma proposta da ação antioxidante da quercetina nos magnetolipossomas via eliminação de radicais livres juntamente com a quelação dos íons férricos da NPM. Gabrielska e colaboradores (2006) mostraram que a quercetina reduziu a ação prooxidante de compostos organometálicos em membranas de lipossomas de fosfatidilcolina irradiadas com ultravioleta a 253,7 nm (Gabrielska *et al.*, 2006). A quercetina em uma concentração de 5 μmol L^{-1} foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica em 50% das membranas quando irradiadas durante 10 minutos. Além disso, a formação de complexos da quercetina com trifenitilcloreto ($(C_6H_5)_3SnCl$) aumentou para 65% sua atividade antioxidante (Gabrielska *et al.*, 2006).

Assim, a partir dos resultados apresentados na Tabela 21, pode-se supor que a interação entre a quercetina e a NPM apresenta um papel importante na estabilidade dos sistemas ML_QC. A quercetina incorporada nos lipossomas de ASO inibiu a peroxidação em 1,55 vezes (equivalente a uma diminuição de 35,48% nos valores de absorbância, quando comparado ao valor obtido nos lipossomas de ASO), Tabela 21. Os resultados obtidos indicam que, na concentração avaliada, a quercetina apresenta uma atividade antioxidante, contra o dano, *in vitro*, induzido pela peroxidação basal em lipossomas de ASO.

Como mencionado anteriormente, os mecanismos de ação antioxidante da quercetina incluem: a eliminação direta dos radicais livres reativos, a quelação dos íons metálicos envolvidos na formação de radicais livres, a inibição das enzimas envolvidas na produção de radicais livres e a regeneração de antioxidantes ligados à membrana como o α-tocoferol (Riceevans *et al.*, 1996; Amic *et al.*, 2007). Além disso, foi verificado um aumento da atividade antioxidante da quercetina nos magnetolipossomas de ASO (amostra ML) em comparação a sua inserção nos lipossomas de ASO (sistemas LP). Ou seja, a quercetina incorporada nos magnetolipossomas de ASO inibiu a peroxidação lipídica em 8 vezes, enquanto que, quando incorporada em lipossomas de ASO essa redução foi de apenas 1,55 vezes.

A eficiência de proteção é dependente de fatores, como, a estrutura molecular do complexo, a capacidade dos respectivos compostos para eliminar os radicais livres e a localização do antioxidante na membrana (Gabrielska *et al.*, 2006). Além disso, a eficácia de determinados compostos fenólicos como antioxidantes também pode ser influenciada pelo seu grau de incorporação, uniformidade de distribuição e orientação na bicamada lipídica (Serbinova *et al.*, 1991). Ao ocasionar um maior grau de ordem e rigidez à membrana, os flavonoides podem reduzir a mobilidade dos radicais livres na bicamada lipídica (Arora *et al.*, 2000). Consequentemente, a diminuição da fluidez da membrana resulta na inibição da peroxidação lipídica devido a um abrandamento das reações dos radicais livres. A formação de complexos que ocasionaram o enrijecimento da bicamada lipossomal também aumentaram a ação antioxidante frente à peroxidação lipídica (Gabrielska *et al.*, 2006).

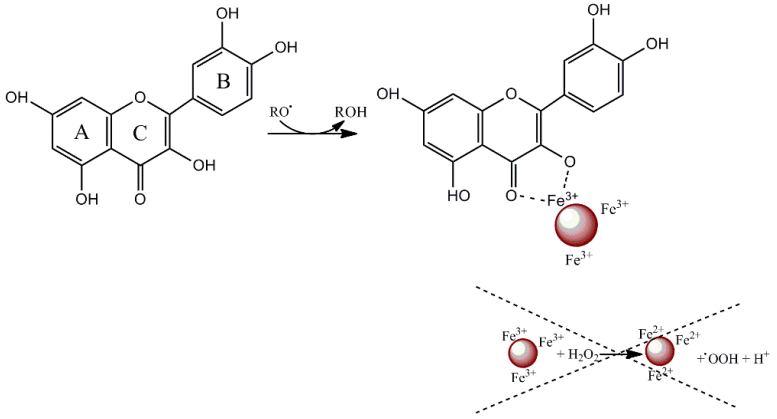


Figura 54: Esquema ilustrativo da ação antioxidante da quercetina através da formação de complexos entre quercetina-Fe quando encapsulados em magnetolipossomas (ML_QC).

Os valores de potencial zeta obtidos para os magnetolipossomas de ASO na ausência e na presença da quercetina estão apresentados na Tabela 22. O valor de potencial zeta para o magnetolipossoma foi -71,5 mV, sugerindo a obtenção de uma suspensão estável (Wongsagonsup *et al.*, 2005; Bolfarini *et al.*, 2012; Hadrich *et al.*, 2016).

A quercetina nos magnetolipossomas promoveu um aumento no valor de 3,0 mV, indicando um redirecionamento do plano do grupo colina para acima do plano do grupo fosfato, Figura 55 (Fatouros e Antimisiaris, 2002). É possível que a reorientação da colina e a mudança de potencial zeta relacionada com valores mais positivos possam ser consequência da interação entre as hidroxilas do flavonoide e o grupo do fosfato lipídico (Pawlikowska-Pawlega *et al.*, 2014).

Tabela 22: Influência da quercetina nos valores de potencial zeta.

	ML_QC	ML	Δ
Potencial zeta (mV)	-68,5 ± 1,72	-71,5 ± 1,33	3,0

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão (*n* = 3). Magnetolipossoma (ML) e magnetolipossoma contendo quercetina (ML_QC).

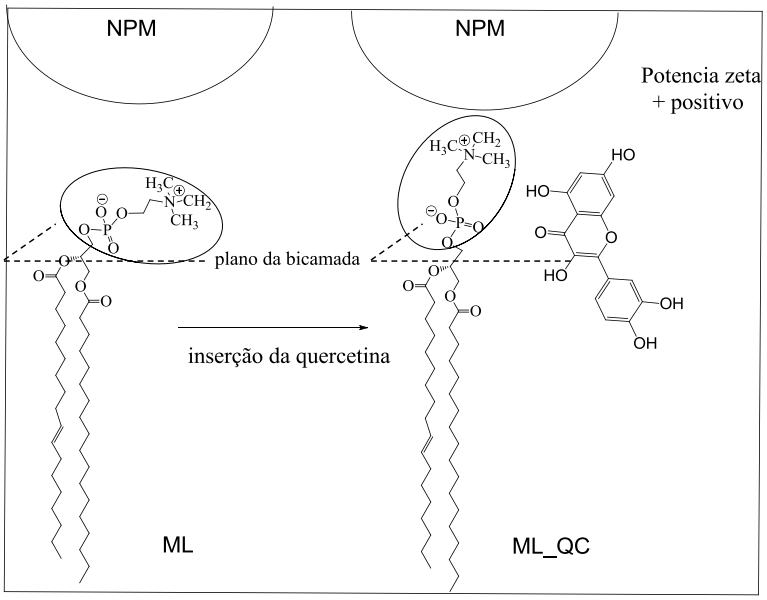


Figura 55: Ilustração da orientação do plano do grupo colina para acima do plano do grupo fosfato em relação ao plano da bicamada lipídica dos fosfolipídios ocasionado pela quercetina. Magnetolipossoma (ML) e magnetolipossoma contendo quercetina (ML_QC).

5.6 Percentagem de incorporação das nanopartículas magnéticas nos magnetolipossomas contendo quercetina (fármaco-modelo)

Os magnetolipossomas puros (amostra denominada ML, considerada a partir de agora como controle) e contendo quercetina (amostra denominada ML_QC) foram preparados pela modificação do método de FR descrito anteriormente na seção 4.2.3. Os sistemas preparados foram centrifugados (para separação das NPM não incorporadas). Assim, como observado na seção 1 deste trabalho, foram formadas duas fases distintas relacionadas com a precipitação das NPM não incorporadas (fase com precipitado escuro, fase 1) e aos magnetolipossomas formados (um sobrenadante de coloração marrom claro, fase 2) (Floris *et al.*, 2014). A I% das NPM nos magnetolipossomas foi determinada através da determinação da concentração de ferro presente no sistema através da técnica de HR-CS FAAS, após MW-AD. Os resultados da I%, bem como os resultados da concentração de ferro, são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23: Determinação da concentração de NPM e percentagem de incorporação, I%, nas amostras de magnetolipossomas puros (ML) e contendo quercetina (ML_QC), através da técnicade espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua com atomização em chama (HR-CR FAAS).

	Parâmetro	HR-CS FAAS
ML_QC	[NPM], mg mL^{-1}	0,101 ± 0,001
	I%	50
ML	[NPM], mg mL^{-1}	0,116 ± 0,006
	I%	58

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 2. O preparo de amostra baseou-se na a digestão ácida assistida por micro-ondas (MW-AD)

Aproximadamente 0,101 mg mL^{-1} de NPM foram incorporadas no magnetolipossoma, equivalente a uma I% de 50%. Os valores de concentração de NPM mostraram boa precisão, com recuperação de 103%, com RSD menor que 9% e LOD de 0,025 mg

mL^{-1}. Em estudos envolvendo magnetolipossomas contendo fosfatidilcolina de soja, a I% de NPM de magnetita foi de 78,10% ± 0,24 (Gharib *et al.*, 2014). A I% de NPM de ferro em magnetolipossomas termosensíveis a base de metotrexato modificado (em uma razão de NPM: lipídio = 0,33 m/m), preparado pelo método de HV, foi de 87,6 ± 1,83% (Guo *et al.*, 2017). O tipo de concentração lipídica, pH e força iônica do tampão, carga de superfície, método de preparado, número de ciclos de congelamento-descongelamento e o tempo de cada ciclo são fatores conhecidos por afetarem a I% (Shariat *et al.*, 2014).

O método utilizado neste trabalho para o preparo dos magnetolipossomas contendo quercetina, como descrito na seção 4.2.3, foi o método de FR. Este método é conhecido por encapsular uma grande quantidade de substâncias hidrofílicas (Akbarzadeh *et al.*, 2013). Porém a I% encontrada neste trabalho foi inferior ao citado na literatura. A diferença entre os resultados experimentais com os dados reportados da literatura podem dever-se ao tipo de lipídio, bem como o tipo de método de preparo utilizado (Lichtenberg e Barenholz, 1988).Além disso, a inserção da quercetina no magnetolipossomas reduziu a I% de ferro em torno de 15%, indicando uma competição entre o flavonoide e as NPM pela mesma região. A redução de I% foi mencionada por Hardiansyah e colaboradores (2014). Os autores compararam a I% de doxorrubicina em lipossomas e magnetolipossomas a base de DSPC. A I% da doxorrubicina foi 22,1 e 15,5% nos lipossomas e magnetolipossomas, respectivamente (Hardiansyah *et al.*, 2014).

5.7 Eficiência de encapsulamento da quercetina (fármaco-modelo) nos magnetolipossomas

A quantificação da concentração de quercetina incorporada nos magnetolipossomas foi determinada por espectroscopia UV-vis a 367 nm. Experimentos controle foram realizados em magnetolipossomas puros, na ausência da quercetina. Os resulta-

dos de EEq%, bem como os resultados da concentração de quercetina (em mg mL^{-1}) verificado nos magnetolipossomas contendo quercetina (amostra ML_QC) estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Determinação da concentração e do percentual de eficiência de encapsulamento (EEq%) de quercetina, nas amostras de magnetolipossomas, através da técnica de espectroscopia UV-vis.

	Parâmetro	UV-vis
ML_QC	[quercetina], mg mL^{-1}	0,0088 ± 0,001
	EEq%	56,05

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão, n = 3.

Com a finalidade de verificar e quantificar o conteúdo total de quercetina que havia sido adicionado nos magnetolipossomas de ASO, antes da etapa de centrifugação (que foi realizada para retirar a parte de quercetina não encapsulada), a determinação da concentração de quercetina por UV-vis também foi realizada. Assim, na amostra de magnetolipossomas contendo quercetina (sem passar pela etapa de centrifugação), ML_QC, a concentração de quercetina encontrada foi de 0,0157 ± 0,001mg mL^{-1}. Esse valor foi utilizado para determinar a EEq%, como mencionado na seção 4.4.

A configuração planar da quercetina que facilita sua intercalação entre as moléculas de fosfolipídios explica a sua alta afinidade com lipossomas (Van Dijk *et al.*, 2000). Lipossomas preparados com uma mistura de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e quercetina em uma proporção molar de 1:1:2 apresentaram uma EEq% entre 62 - 81% (Priprem *et al.*, 2008). Em outros trabalhos, a quercetina quando inserida em lipossomas constituídos de lecitina de soja preparados pelo método de emulsificação apresentou uma EEq% de 69,42% (Gang *et al.*, 2012), o que é similar aos resultados deste trabalho.

5.8 Caracterização dos magnetolipossomas contendo quercetina (fármaco-modelo)

Neste capítulo, a influência da quercetina na dinâmica molecular das membranas lipídicas dos magnetolipossomas foi avaliada. Como mencionado anteriormente, a localização da quercetina, bem como sua influência sobre as propriedades físico-químicas dos magnetolipossomas de ASO (concentração inicial de NPM igual a 0,2 mg mL^{-1}, equivalente à proporção inicial de NPM:ASO de 0,002 (m/m)), e concentração inicial de quercetina igual a 0,15 mg mL^{-1}, equivalente à proporção inicial de quercetina: ASO de 0,0015 (m/m)), foram investigadas pelas seguintes técnicas instrumentais: HATR-FTIR, RMN ^{31}P, RMN ^{31}H, DSC e UV-vis.

Para o estudo da influência da quercetina na dinâmica de regiões específicas do lipídio, através do estudo dos seus movimentos vibracionais, foram obtidos espectros de HATR-FTIR do magnetolipossomas puro e contendo quercetina, como mostra a Figura 56.

A influência da quercetina nos valores de frequência e largura de banda referentes as regiões polar, interfacial e hidrofóbica dos magnetolipossomas de ASO, estão apresentadas na Tabela 25. Tais resultados serão complementados a partir das análises realizadas com as outras técnicas instrumentais citadas anteriormente, de acordo com a região lipídica estudada.

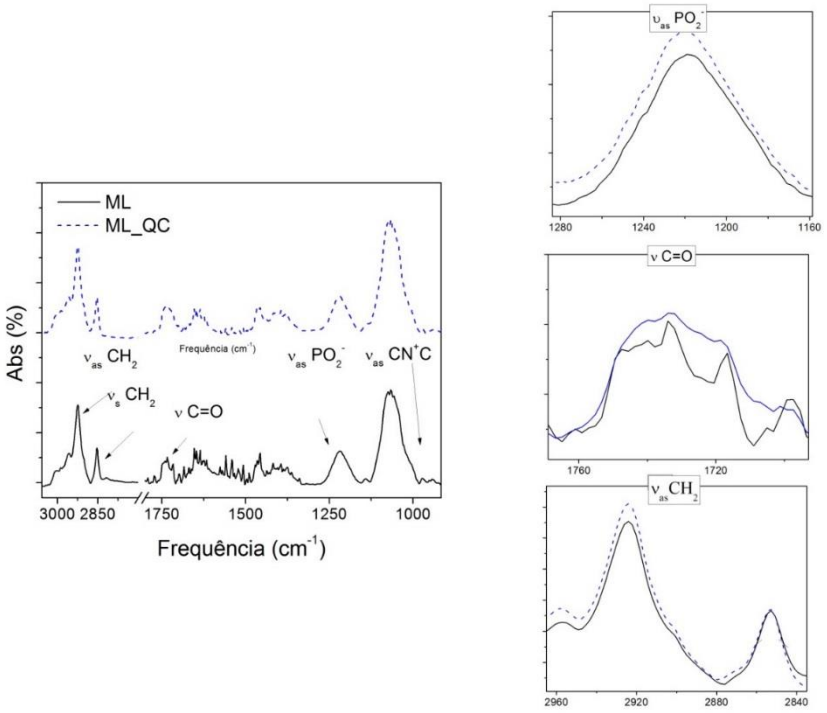


Figura 56: Espectros de HATR-FTIR e suas ampliações: Magnetolipossomas de ASO: puro (ML) e contendo quercetina (ML_QC). Razão de NPM: ASO de 0,002 (m/m) e quercetina: ASO de 0,0015 (m/m).

Tabela 25: Valores de frequência e largura de banda e suas variações (∆) encontradas no espectro de HATR-FTIR para picos de grupos específicos do fosfolipídio presente nos magnetolipossomas puros (ML) e contendo quercetina (ML_QC).

	ML_QC	ML	∆	ML_QC	ML	∆
	Frequência (cm^{-1})			Largura a 75% da altura do pico (cm^{-1})		
ν_{as} CH_2	2924,72	2924,09	-	6,44	6,44	-
ν_s CH_2	2852,72	2852,72	-	6,44	6,44	-
ν C=O	1734,01	1734,01	-	10,00	6,44	3,56
ν_{as} PO_2^-	1219,01	1219,01	-	11,67	11,11	0,56
ν_{as} $N^+(CH_3)_3$	972,12	972,12	-	-	-	-

Razão de NPM: ASO de 0,002 (m/m) e quercetina: ASO de 0,0015 (m/m).

5.8.1 Interação da quercetina com a região polar dos magnetolipossomas

Como pode ser observado na Tabela 25, comparando-se o espectro de magnetolipossomas de ASO puro (ML) com o espectro de magnetolipossomas na presença de quercetina (ML_QC), não houve variação na frequência referente ao estiramento axial do grupo fosfato (ν_{as} PO_2^-) lipídico. Para esse sistema, através da técnica de HATR-FTIR, os resultados obtidos indicam que a quercetina não influenciou no número de ligações de hidrogênio entre o grupo fosfato lipídico e a água (Lopezgarcia et al., 1993).

A Figura 56 apresenta uma ampliação do espectro de HATR-FTIR da região de banda do estiramento axial assimétrico do grupo fosfato (ν_{as} PO_2^-). Os resultados calculados para variação da largura nessa região são apresentados na Tabela 25. Através dos resultados, não foi verificada influência significativa da quercetina nos valores de largura da banda, referente ao estiramento axial assimétrico do grupo fosfato, indicando que a quercetina não influencia na fluidez da membrana nesta região.

Em adição, ensaio de RMN de ^{31}P foram realizados, para a obtenção de informações sobre o efeito da quercetina na dinâmica rotacional do grupo fosfato. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 57. Os espectros obtidos apresentaram a mesma forma dos magnetolipossomas estudados na seção I deste trabalho: associação em fase H_{II} (Rand *et al.*, 1971; Higashi *et al.*, 1987). Em adição, a inserção da quercetina não ocasionou alteração da fase H_{II} dos magnetolipossomas. Sabe-se que os complexos de flavonoides e metais podem influenciar o comportamento da fase de fosfatidiletanolamina, como a transição de bicamadas para H_{II} de palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina depois de interagir com o complexo quercetina-ferro (20 μmol L^{-1} de quercetina para 10 μmol L^{-1} de NPM) (Kim *et al.*, 2013). É possível que, neste trabalho a concentração de NPM não tenha sido suficiente para realizar uma transição de fase dos ML.

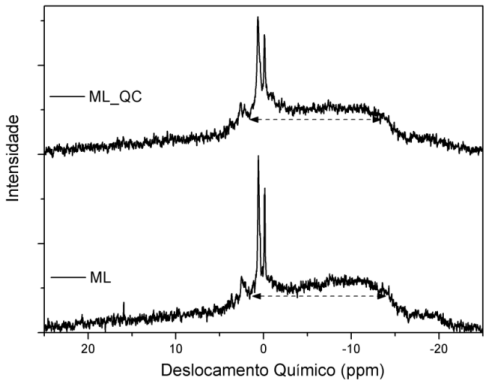


Figura 57: Espectros de RMN de ^{31}P de magnetolipossomas de ASO puros (ML) e na presença de quercetina (ML_QC).

Os valores da largura do pico, obtido a partir da equação de Seelig, Equação 9, foram obtidos para as amostras e estão listados na Tabela 26. A adição da quercetina ocasionou um aumento da largura do pico de equivalente a 9,4%. Assim, o resultado indica que a quercetina induz uma diminuição da liberdade de movimento do grupo fosfato dos magnetolipossomas de ASO (Timoszyk *et al.*, 2004).Estudos sobre a interação entre apigenina e membranas de DPPC associam um efeito de rigidez na cabeça polar lipídica induzida por flavonoides através da formação de ligações de hidrogênio (Pawlikowska-Pawlega *et al.*, 2013). Assim, na ausência de ligações de hidrogênio entre quercetina-fosfato em ML_QC, o efeito de ordenamento na região do grupo fosfato pode ser devido a uma interação física entre NPM e o flavonoide (complexo quercetina-ferro) (Kim *et al.*, 2013).

Tabela 26: Influência da quercetina nos magnetolipossomasde ASO nos valores de largura obtidos a partir dos espectros de RMN ^{31}P.

	ML_QC	ML	Δ
largura (ppm)	18,14	16,58	1,56

A largura foi medida em relação aos tensores paralalos e perpendiculares dos movimentos do núcleo de fósforo obtidos no espectros de RMN ^{31}P.

O comportamento do grupo colina foi estudado a partir da análise dos espectros de HATR-FTIR, ν_{as} $N^{+}(CH_3)_3$, Tabela 25. Os resultados obtidos mostraram que a quercetina não induziu, significativamente, alterações nas interações dipolares entre o grupo colina e o grupo fosfato do fosfolipídio vizinho (Moreno *et al.*, 2009).

Para complementar os estudos realizados sobre a influência da quercetina no grupo colina foram realizados estudos de RMN de ^{1}H. A Figura 58 mostra a curva referente do sinal de FID após pulsos de inversão e recuperação nos magnetolipossomas. Os valores de T_1 obtidos estão mostrados na Tabela 27. A inserção da quercetina aumentou o T_1 em torno de 20%: de 1,58 s (verificado no sistema ML) para 1,86 s (verificado no ML_QC). Assim, as alterações observadas nos valores de T_1, obtidas para a região do grupo colina, refletem variações nos movimentos deste grupo, indicando uma redução da mobilidade molecular induzida pela quercetina (Brown, 1984; Bloom e Thewalt, 1994). Em trabalho divulgado por Pawlikowska-Pawlęga (2014) e colaboradores foi verificado que a inserção de quercetina em lipossomas de DPPC também ocasionou um ordenamento na parte polar do fosfolipídio.

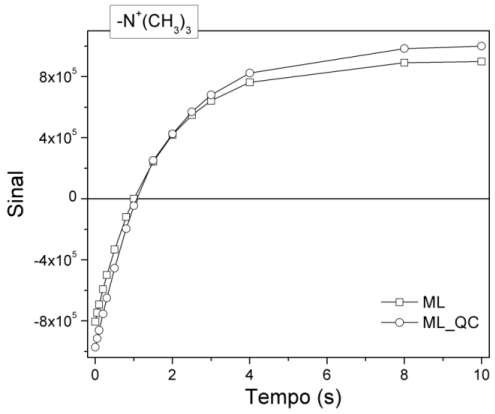


Figura 58: Curvas referentes à relaxação longitudinal dos hidrogênios da colina (-$N^+(CH_3)_3$, região entre 3,2-3,4 ppm no espectro de RMN ^1H) em magnetolipossomas de ASO na ausência (ML, quadrados) e na presença de quercetina (ML_QC, círculos).

Tabela 27: Influência da quercetina nos valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da colina, $N^+(CH_3)_3$, região entre 3,2-3,4 ppm nos magnetolipossomas.

	ML_QC	ML	Δ
T_1 (s)	1,86	1,58	0,28

5.8.2 Interação da quercetina com a região de interface dos magnetolipossomas

Os dados de HATR-FTIR, Tabela 25, indicaram que a presença da quercetina não provocou alterações na frequência referente ao estiramento axial do grupo carbonila (ν C=O). A ampliação do espectro de HATR-FTIR na região do estiramento axial do grupo carbonila (1734,01 cm^{-1}) presente no fosfolipídio, esta apresentada na Figura 56. Através da análise da largura da banda referente ao grupo carbonila lipídico, observou-se que a presença da quercetina provocou um aumento de 3,56 cm^{-1} na largura de banda nesta região. Este aumento indica que a inserção da quercetina ocasionou um aumento na fluidez da membrana para estes sistemas na região de interface. A conformação planar assumida pela quercetina, bem como, sua interação via ligações de

hidrogênio entre seus próprios grupos hidroxílicos e os grupos polares no segmento C-O-P-O-C dos fosfolipídios podem ser responsáveis pela modificação do grau de ordenamento da bicamada lipídica (Saija, Scalese*, et al.*, 1995; Pawlikowska-Pawlega *et al.*, 2014).

5.8.3 Interação da quercetina com a região apolar dos magnetolipossomas

A ampliação do espectro de HATR-FTIR na região da banda do estiramento assimétrico e simétrico dos metilenos do grupo acil lipídico (ν_{as} CH_2 e ν_{as} CH_2, respectivamente) e os valores de frequência para os sistemas de magnetolipossomas puros e contendo quercetina estão apresentados na Figura 56 e Tabela 23. O encapsulamento da quercetina não provocou alterações na frequência para esta região, indicando que a presença da quercetina não alterou o número de ligações gauche no sistema lipídico (Moreno *et al.*, 2009).

A fim de obter maiores informações sobre a influência da quercetina na dinâmica lipídica da região acil de lipossomas de ASO, foram realizadas medidas de T_1, a partir de RMN de ^1H. As curvas referentes à intensidade do pico de RMN de hidrogênios presentes nos metilenos da cadeia acil (1-2 ppm), com e sem quercetina, ao tempo de intervalo entre pulsos de radiofrequência estão demonstradas na Figura 59.

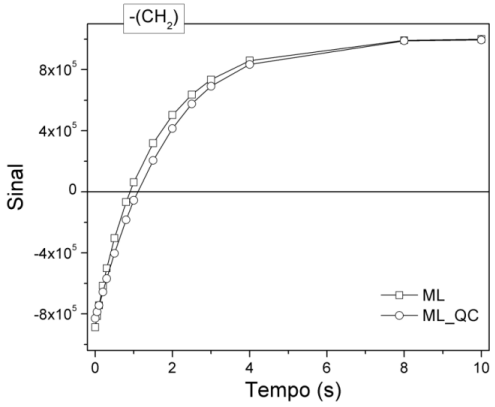


Figura 59: Curvas referentes à relaxação longitudinal dos hidrogênios dos metilenos da cadeia acil (CH_2, região entre 1-2 ppm no espectro de RMN ^1H) em magnetolipossomas de ASO na ausência (ML, quadrados) e na presença de quercetina (ML_QC, círculos).

A partir destas curvas, os valores de T_1foram calculados para a região lipídica em estudo e estão apresentados na Tabela 28. Para o magnetolipossomas de ASO o valor de T_1 obtido foi de 1,46 s, já a inserção da quercetina nos magnetolipossomas de ASO, o valor de T_1 foi de 0,48 s. Esse decréscimo no valor de T_1 (de 0,98 s) indica que a inserção da quercetina aumentou a mobilidade na região acil.

Tabela 28: Influência da quercetina nos valores de tempo de relaxação longitudinal (T_1) dos hidrogênios da cadeia acil (CH_2, região entre 1-2 ppm no espectro de RMN ^1H) nos magnetolipossomas de ASO.

	ML_QC	ML	Δ
T_1 (s)	0,48	1,46	0,98

Em adição, para a compreensão sobre o efeito da quercetina na região apolar dos magnetolipossomas de ASO foram realizados ensaios de DSC. As curvas obtidas

para os magnetolipossomas de ASO puro e na presença de quercetina, bem como os valores de ΔH e de T_m, estão apresentados na Figura 60 e Tabela 29. Os resultados mostraram que a adição da quercetina nos magnetolipossomas de ASO ocasionou uma diminuição nos valores de ΔH (0,1267 J g^{-1}) e de T_m (3,66 °C). Os resultados indicam que a quercetina promoveu um rearranjo molecular na fosfatidilcolina para um estado menos ordenado, ou seja, com maior mobilidade.

Günther e colaboradores (2015) verificaram que a presença de quercetina em lipossomas de DPPC ocasionou a fluidificação da membrana (Gunther *et al.*, 2015). Este efeito fluidificante pode ser devido à introdução de moléculas de quercetina na estrutura ordenada da bicamada lipídica que atua como um espaçador, em tal estrutura, causando uma desestabilização do mosaico lipídico, e por consequência, uma diminuição na T_m (Saija, Bonina*, et al.*, 1995). A interação de moléculas de quercetina com a interface lipídica ocasiona uma modificação estrutural das cadeias acil (inclinação) perto da região de interface (Movileanu *et al.*, 2000). Esse resultado também foi sustentado pelas análises de RMN ^{1}H.

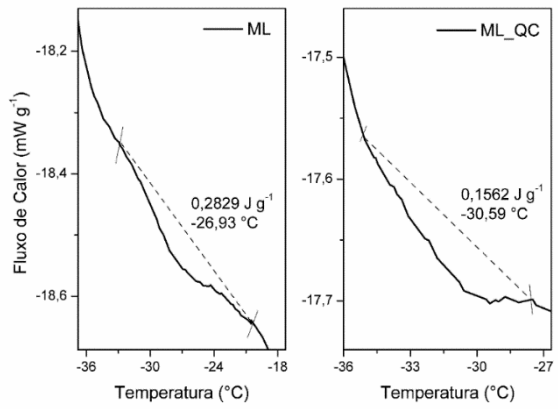


Figura 60: Curvas de DSC dos magnetolipossomas de ASO na ausência (ML) e na presença de quercetina (ML_QC).

Tabela 29: Influência da quercetina nos valores de variação de entalpia (*ΔH*) e temperatura de transição de fase (T_m) nos magnetolipossomas de ASO.

	ML_QC	ML	Δ
ΔH (J g^{-1})	0,1562	0,2829	0,1267
T_m (°C)	-30,59	-26,93	3,66

A influência global da quercetina (razão quercetina/ASO (m/m) igual a 0,0015) nos magnetolipossomas de ASO foi monitorada através de ensaios de turbidez a 400 nm, Tabela 30. A adição da quercetina nos magnetolipossomas de ASO ocasionou um aumento nos valores de absorbância de 0,064 u.a. Assim, o aumento dos valores de absorbância está relacionado ao aumento do tamanho médio desses sistemas (Matsuzaki *et al.*, 2000). Conforme as medidas de DLS, a inserção da quercetina no sistema ocasionou um aumento no valor de <D> de 63 nm, o que está de acordo com os dados de turbidez obtidos.

Tabela 30: Influência da quercetina nos valores de turbidez, medida a 400 nm, nos magnetolipossomas de ASO.

	ML_QC	ML	Δ
Abs (u.a.)	0,613 ± 0,003	0,549 ± 0,003	0,064

Os ensaios foram realizados em triplicata.

Em resumo, a inserção da quercetina nos magnetolipossomas reduziu a I% das NPM de maghemita em 11%, mostrando uma competição entre o flavonoide e as NPM em uma região específica do sistema. A peroxidação lipídica dos magnetolipossomas foi prevenida 8 vezes pela presença da quercetina. Os resultados de RMN de ^{31}P e ^{1}H mostraram que a quercetina não alterou o estado da fase do sistema hexagonal invertido, mas diminui a mobilidade da parte polar lipídica. O flavonoide também pareceu ori-

entar o grupo de colina acima do plano fosfato da membrana, conforme indicado pelos valores do sistema de potencial zeta.

As respostas de FTIR, RMN e DSC mostraram que a quercetina desordenou as regiões de interface e hidrofóbicas dos magnetolipossomas. A quercetina, pareceu estar localizada na região de interface dos magnetolipossomas, diminuindo a comunicação intermolecular lipídica nas regiões de interface e hidrofóbicas. Um esquema simplificado, determinado através das comparações entre os dados obtidos por diferentes técnicas dos magnetolipossomas contendo quercetina aos magnetolipossomas puros, está apresentados na Figura 43.

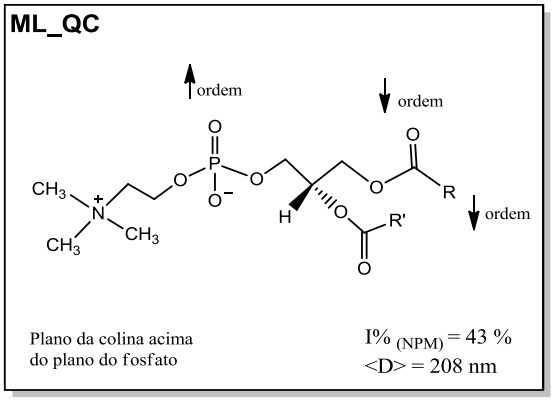


Figura 61: Esquema simplificado do efeito da QC nos magnetolipossomas (sistema ML_QC) em relação aos seus controle (ML) na dinâmica molecular lipidica avaliados por diferentes técnicas instrumentais. A percentagem de incorporação da NPM nestes magnetolipososmas, bem como o diâmetro médio <D> verificado pela técnica de DLS logo após o prepararo também estão apresentados.

5.9Estudos de magnetização das nanopartículas magnéticas e magnetolipossomas

A curva de magnetização mostrada na Figura 62 exibe o comportamento magnético das NPM puras. As NPM apresentaram H_c de 111 Oe, M_s de 63,3 emu g^{-1} e M_r de

15,1 emu g^{-1}. Esses resultados estão próximos com valores citados na literatura (Wahajuddin e Arora, 2012; Kucheryavy *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2016).

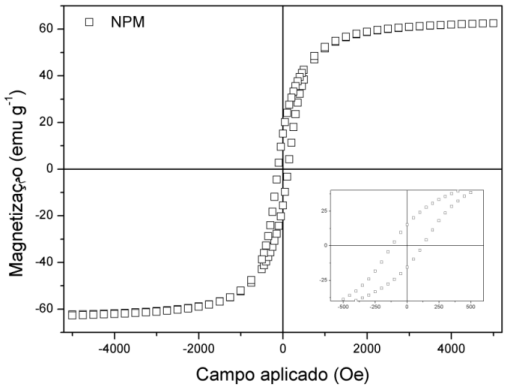


Figura 62: Curva de magnetização da NPM em pó a temperatura ambiente.

A temperatura ambiente, as NPM de maghemita apresentaram fator de quadratura de 0,25, indicativo de material ferrimagnético (Buschow 2005). Em materiais ferrimagnéticos os átomos possuem momentos de dipolo permanentes que interagem entre si, causando alinhamento antiparalelo e desigual, e na presença de um campo magnético externo alinham-se na direção e sentido do campo aplicado sendo assim atraídos por campos magnéticos (Callister Jr., 2012). Era esperado que as NPM apresentassem comportamento superparamagnético. Entretanto, para apresentarem tal comportamento as NPM necessitam ter um tamanho menor que 20 nm (Ajroudi *et al.*, 2014) e o valor de tamanho encontrado através da técnica de difração de raios X para as NPM utilizadas neste trabalho, foi de 35,5 nm.

A curva de magnetização mostrada na Figura 63exibe o comportamento magnético dos magnetolipossomas. Em comparação a NPM na forma livre, os magnetolipossomas puros apresentaram menor valor de magnetização de saturação em 5,5 emu g^{-1}. Como relatado em outros trabalhos, a incorporação de NPM em sistemas lipossomais

deve ocasionar uma diminuição nos valores de magnetização de saturação (Rodrigues *et al.*, 2017).

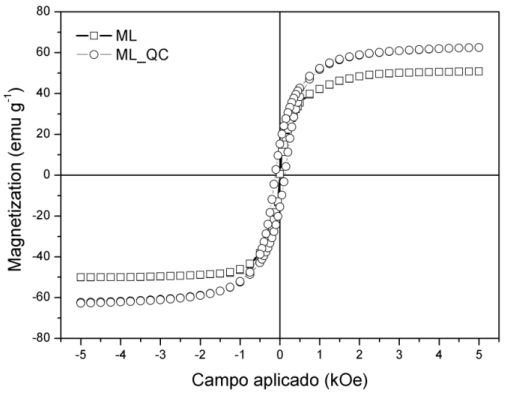


Figura 63: Curva de magnetização das amostras de magnetolipossomas: puros (ML) e contendo quercetina (ML_QC) a 37 °C.

Os ciclos de histerese magnética dos magnetolipossomas exibem comportamento magnético típico de material superparamagnético, ou seja, na aplicação de um campo magnético externo, as NPM tornam-se magnetizadas até sua M_s e, na remoção do campo magnético, não apresentam mais nenhuma interação magnética residual (Callister Jr., 2012). As amostras não apresentaram M_r, indicando que a incorporação em lipossomas favorece o comportamento superparamagnético das NPM de maghemita. Assim, a produção de magnetolipossomas de ASO pelo método de FR é um preparo simples e que gera um sistema estável, com propriedade de superparamagnetismo, o que pode viabilizar o uso do magnetolipossoma como sistema carreador, ou de liberação prolongada de fármaco.

A curva de magnetização do magnetolipossoma contendo quercetina (amostra ML_QC) está mostrada na Figura 63. Esta curva apresenta um comportamento típico de material superparamagnético. O valor de M_s encontrado para os magnetolipossoma

contendo quercetina foi de 52,5 emu g^{-1}. A inserção da quercetina ocasionou uma pequena diminuição nos valores da M_s (1,2 emu g^{-1}).

A presença de polímeros, moléculas orgânicas ou surfactante na superfície de NPM pode diminuir a M_s devido a um aumento da constante de energia de anisotropia magnética e da supressão dos momentos magnéticos de superfície (Berkowitz *et al.*, 1980; Dresco *et al.*, 1999). Neste contexto, a M_s foi 2,2% menor para a amostra ML_QC do que para a amostra ML que pode ser devido à adição de moléculas de quercetina que também podem interagir com a superfície das NPM e diminuir um pouco mais a magnetização. Além disso, os valores de M_s encontrados para os magnetolipossomas puros e contendo quercetina permaneceram em uma região de campo sensível a exposição de ímãs externos (por exemplo, ímãs de neodímio) tornando-os promissores para aplicação em terapias antitumorais (Ding *et al.*, 2012).

5.10. Ensaio Biológico: MTT

Visto que a peroxidação lipídica (dados descritos no item 5.6) também está relacionada com o processo de tumorigênese e com alterações nas propriedades físico-químicas da membrana (item 5.7), procurou-se obter mais informações sobre uma possível relação entre os efeitos antioxidantes e antitumorais observados na quercetina, e sua influência na dinâmica molecular das membranas de magnetolipossomas. Os resultados referentes ao estudo de atividade antitumoral estão descritos a seguir.

Para determinar o efeito dos magnetolipossomas contendo quercetina sobre a viabilidade celular das linhagens de glioma C6, estas foram expostas a magnetolipossomas puros e contendo quercetina durante 24h. Controles contendo NPM (dispersas em tampão, em uma concentração de 0,2 mg mL^{-1}), lipossomas-controle puros (amostra LP, contendo somente ASO em uma concentração de 100 mg mL^{-1}) e contendo quercetina (amostra LP_QC, contendo quercetina em uma proporção de quercetina:

ASO igual a 0,0015, m/m) também foram analisados. No final da incubação, foi realizado o ensaio MTT, como descrito na seção 4.8.

Como mostrado na Figura 64, a exposição das células de glioma C6 à magnetolipossomas de ASO contendo quercetina na concentração de 50 μmol L^{-1}, resultou em uma redução da viabilidade celular em 44,93%. Comparado com a atividade do magnetolipossoma, que reduziu a viabilidade em 33,88%, ML_QC foi 11% mais eficiente sobre as células C6. Além disso, ML_QC e ML foram, respectivamente,16% e 5% mais eficientes que o controle contendo NPM. O sistema LP_QC foi 12% mais ativo sobre as células C6 do que o controle LP (ambos reduziram a viabilidade celular em 38,77 e 26,12 %, respectivamente) evidenciando um efeito da quercetina na viabilidade celular.

Zamim e colaboradores (2009) avaliaram o efeito da quercetina na forma livre sobre viabilidade celular de células C6 (Zamin *et al.*, 2009). A quercetina quando em concentrações de 25 e 100 μmol L^{-1} reduziu a viabilidade das células em, respectivamente, 10 e 30%, após 24 horas de incubação. Na presente Tese, porém os sistemas contendo quercetina incorporada em lipossomas e em magnetolipossomas ocasionou uma redução da viabilidade de 38,77 e 44,93%, respectivamente. Assim, o encapsulamento da quercetina pareceu ser mais efetiva quanto ao crescimento das células C6 nos sistemas de magnetolipossomas.

Wang e colaboradores(2012) avaliaram o efeito sobre células C6 de lipossomas a base de distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE)/ polietilenoglicol contendo quercetina (Wang *et al.*, 2012). Os resultados demonstraram que os lipossomas contendo quercetina em uma concentração de 50 μmol L^{-1} (a mesma concentração avaliada nessa Tese) reduziu a porcentagem de células viáveis em, aproximadamente, 25% (Wang *et al.*, 2012). Este dado é inferior ao obtido no presente trabalho. Vale mencionar que o grupo experimental, utilizado por Wang e colaboradores (2012), tratado apenas com lipossomas de DSPE não alterou a viabilidade das células C6, já nos lipossomas de ASO avaliados neste trabalho (amostra LP) foi verificada uma redução da viabilidade celular de 26,12%. Lipossomas constituídos de DMPC mostraram um efeito, *in vitro*, inibitório no

crescimento de células derivadas da leucemia promielocítica humana em cerca de 25% (Nagami *et al.*, 2006).

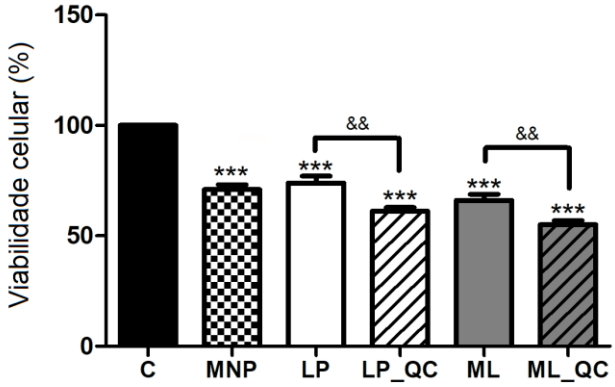


Figura 64: Influência da quercetina nos magnetolipossomasde ASO na viabilidade celular das linhagens C6 após 24h de tratamento. ML_QC: lipossomas de ASO contendo NPM e quercetina (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002 e quercetina: ASO = 0,0015); ML: lipossomas de ASO contendo NPM (com razões iniciais m/m NPM: ASO = 0,002); LP_QC: lipossomas de ASO contendo quercetina (com razões iniciais m/m quercetina: ASO = 0,0015); LP: lipossomas de ASO; NPM: nanopartículas de maghemita dispersas em tampão (com concentração 0,2 mg mL^{-1}). A concentração de quercetina usada foi 50 µmol L^{-1}. n = 15 poços, ANOVA seguido pelo teste Tukey-Kramer. *** p <0.001 (diferença a partir do controle) && p <0.01 (diferença comparando a quercetina incorporada nos lipossoma ou magnetolipossomas e seus respectivos controles). C: controle (DMEM).

Os grupos hidroxílicos e os orbitais conjugados através dos quais a quercetina pode doar elétrons ou íons de hidrogênio, bem como eliminar H_2O_2 e ânions superóxidos tornam a quercetina um excelente agente antioxidante através da eliminação de radicais livres (Heijnen *et al.*, 2001). Também é possível que a hidrofobicidade da quercetina tenha um papel considerável para reduzir a viabilidade das células C6, uma vez que a inserção de NPM em bicamadas lipídicas (ML) não afetou significativamente

a respiração mitocondrial celular (a variação na viabilidade celular das células C6 após interação com ML e LP foi de cerca de 7%).

A redução da viabilidade celular ocasionado pelas NPM se deve, provavelmente, por processos de agregação e mecanismos oxidativos nas células (Yarjanli *et al.*, 2017). No entanto, é importante notar que nenhum campo magnético foi aplicado nestas experiências. A aplicação de uma força magnética externa em lipossomas magnéticos contendo transferrina e artemisina aumentou a morte celular de MCF-7(Gharib *et al.*, 2014). Venugopal e colaboradores (2016) avaliaram a citotoxicidade das NPM carregadas com doxorrubicina em células de glioma C6. Os resultados mostraram uma melhor redução da viabilidade celular nas amostras em que um campo magnético foi aplicado (Venugopal *et al.*, 2016).

Em destaque, vale ressaltar que, sem a presença de um campo magnético, o sistema ML_QC foi mais eficiente (cerca de 45%) na redução da viabilidade celular C6 que os sistemas ML, MNP, LP_QC e LP. Além disso, a inserção da quercetina ocasionou uma redução (8 vezes) do processo de peroxidação lipídica ocasionado pela NPM.

O ordenamento do grupo polar lipídico, bem como a formação de complexos que aumentam a rigidez da bicamada lipossomal tendem a aumentar a ação antioxidante frente à peroxidação lipídica (Gabrielska *et al.*, 2006). As alterações da dinâmica lipídica, como o aumento da fluidez nas regiões de interface e hidrofóbicas nos magnetolipossomas de ASO, podem ter influenciado na atividade antitumoral da quercetina, visto que as membranas de células tumorais são mais desorganizadas e fluidas do que as normais (Yu *et al.*, 1999). Em adição ao caráter antioxidante e a atividade antitumoral da quercetina já estabelecido para a quercetina, o seu encapsulamento em magnetolipossomas de ASO pode ter facilitado a interação entre a quercetina e a membrana das células tumorais. Assim, a amostra de magnetolipossoma contendo quercetina, ML_QC, preparada pelo método de FR (usando como solvente o tampão tricina e com a adição da NPM na etapa de dissolução do fosfolipídio) mostra-se um sistema com atividade antitumoral promissora contra células de glioma.

5.11 Correlação entra a atividade antitumoral com as propriedades dos magneto-lipossomas contendo quercetina

A quercetina, pareceu estar localizada na região de interface dos magnetolipossomas, desordenando-a e diminuindo a comunicação intermolecular lipídica. Para o sistema ML_QC na Figura 65 está apresentado um esquema que ilustrando os efeitos relacionados à interação da NPM/quercetina com os fosfolipídios dos lipossomas de ASO verificado neste trabalho. Neste esquema, é mostrada a interação da NPM e da quercetina com o grupo polar do fosfolipídio em questão. Além disso, a orientação do grupo colina para acima do grupo fosfato em relação ao plano da bicamada lipídica devido a inserção da quercetina.

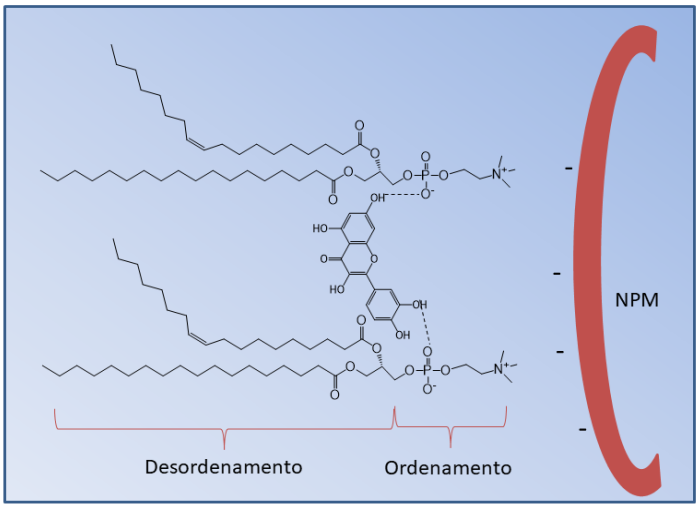


Figura 65: Representação esquemática da interação molecular entre a NPM/quercetina e os lipossomas de ASO preparados pelo metodo de evaporação em fase reversa. A quercetina ordenou a região polar e desordenou as regiões de interface e hidrofóbica da membrana e guiou o plano do grupo colina para acina do plano do grupo fosfato.

O efeito de aumento na ordem do grupo polar lipídico dos magnetolipossomas contendo quercetina parece estar relacionado com a elevada ação antioxidante verifi-

cada. A formação de complexos que aumentam a rigidez da bicamada lipossomal tendem a aumentar a ação antioxidante frente à peroxidação lipídica, reduzindo a mobilidade dos radicais livres na bicamada lipídica (Gabrielska et al., 2006). Além disso, a inserção da quercetina não influenciou no comportamento superparamagnético verificado nos magnetolipossomas e reduziu em cerca de 45% de viabilidade celular C6 sem a aplicação de um campo magnético.

As células tumorais por apresentarem tipicamente maior fluidez e menor estabilidade frente às células saudáveis podem ser estabilizadas através da redução da fluidez de membranas (Arora et al., 2000). Isto pode implicar em uma importante capacidade antitumoral por ocasionar uma maior susceptibilidade das células tumorais aos oxidantes (Gabrielska et al., 2006). Assim, o enrijecimento da região polar, devido à formação de complexos, entre a quercetina e as NPM, pode ser um mecanismo de ação importante no combate ao câncer (Matsuda et al., 1994).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da grande aplicabilidade dos magnetolipossomas, sistemas constituídos de ASO e NPM de maghemita foram preparados por dois métodos. Para cada um dos sistemas preparados, a estabilidade, percentagem de incorporação, processos de oxidação e dinâmica molecular foram avaliados. Estes dados foram complementados por estudos de caracterização dos efeitos da NPM em regiões específicas dos lipídios, bem como sua correlação com a atividade antioxidante e antitumoral. Os resultados mais importantes inferiram que:

1. O método de preparo de magnetolipossomas influenciou em todos os parâmetros citados acima, principalmente ao considerar variáveis, como o solvente utilizado. O uso do tampão no preparo dos magnetolipossomas proporcionou a obtenção de magnetolipossomas menores, mais fluidos e estáveis.

2. O método de HV proporcionou a obtenção de magnetolipossomas com maior I% de NPM (80-90%) e com valores de diâmetro médio entre 450-550 nm. Esses sistemas apresentaram maiores valores de PDI (0,54 e 0,63) menor estabilidade (sofrendo oxidação após 20 dias de preparo), quando comparados aos magnetolipossomas preparados pelo método FR. Uma forte interação eletrostática entre as NPM com o grupo fosfato e colina lipídicos, e a diminuição da fluidez da região polar, foi verificada. A região hidrofóbica lipídica tornou-se mais fluida após inserção das NPM. O preparo dos magnetolipossomas com tampão tricina/ $MgCl_2$ (pH 7,4) parece ter influenciado na maior I% das NPM, bem como, no ordenamento e no maior grau de hidratação dos magnetolipossomas, quando comparado com os sistemas preparados com água. Tais respostas, parecem estar relacionadas a efeitos provindos dos íons presentes no tampão, que aumentaram a força iônica do sistema.

3. O método de FR proporcionou a obtenção de magnetolipossomas de menores tamanhos (<D> entre 220-290 nm), com menores valores de I% (60-70%), PDI (0,48-0,52) e estáveis por um maior período, comparados aos produzidos por HV.

A etapa de adição da NPM influenciou a I% nos magnetolipossomas, sendo que os magnetolipossomas em que a inserção da NPM ocorreu durante a etapa de dissolução do fosfolipídio apresentou maiores concentrações de NPM incorporada. Porém, não foi verificada influência da etapa de adição da NPM sobre o tamanho, estabilidade e dinâmica dos grupos lipídicos. Já a presença de tampão, durante o preparo, assim como, nos sistemas produzidos por HV, contribuiu na redução de tamanho e fluidificação da membrana, em relação aos magnetolipossomas preparados em água. A região de interface e apolar dos fosfolipídios dos magnetolipossomas preparados pelo método de FR, apresentou-se mais ordenada após inserção da NPM, quando comparados aos lipossomas sem NPM. O menor tamanho dos magnetolipossomas preparados pelo método de FR, e, por consequência, menores empacotamento e ordenamento dos grupos polares lipídicos, poderiam estar facilitando uma interação da NPM com a regiões de interface e hidrofóbicas.

A produção de magnetolipossomas de ASO pelo método de FR, especialmente, quando o tampão tricina foi utilizado, mostrou-se um preparo simples e que gera um sistema mais estável que HV, o que pode viabilizar o uso do magnetolipossoma como sistema carreador ou de liberação prolongada de fármaco. Dentre todos os magnetolipossomas avaliados neste trabalho, o método de FR, bem como o uso do tampão e adição da NPM na etapa de dissolução do fosfolipídio (amostra denominada FRa(2)_NP) proporcionaram a obtenção de um sistema mais estável, com menor variação de tamanho ao longo do tempo, satisfatória I% e menor índice de peroxidação. Para este magnetolipossoma, as análises de SAXS evidenciaram a formação de magnetolipossomas multilamelares com bicamadas lipídicas mais organizadas em relação ao lipossoma-controle.

A estabilidade dos magnetolipossomas ainda é um desafio para o seu design, uma vez que suas membranas são suscetíveis a peroxidação por íons metálicos presentes em NPM, como ferro e cobre (Fagali e Catala, 2009; Kiwada et al., 1986). Assim, após a otimização do método de preparo, visando o aprimoramento da estabilidade dos magnetolipossomas, foi realizado o encapsulamento da quercetina (fármaco-modelo) e sua influência sobre a estabilidade, I% das NPM, e dinâmica molecular nos magnetolipossomas foram avaliados.

O efeito de ordenamento do grupo polar lipídico dos magnetolipossomas contendo quercetina parece estar relacionado com a sua elevada ação antioxidante. A formação de complexos (quercetina com NP), que aumentam a rigidez da bicamada lipossomal, tendem a aumentar a ação antioxidante frente à peroxidação lipídica, reduzindo a mobilidade dos radicais livres na bicamada lipídica (Gabrielska et al., 2006).

A inserção da quercetina não influenciou no comportamento superparamagnético verificado nos magnetolipossomas, e propiciou a redução em cerca de 45% da viabilidade celular de células de glioma de rato sem a aplicação de um campo magnético. As células tumorais, por apresentarem tipicamente maior fluidez e menor estabilidade frente às células saudáveis podem ser estabilizadas através da redução da fluidez de membranas (Arora et al., 2000). Assim, o enrijecimento da membrana na região polar, devido a formação de complexos entre a quercetina e as NPM, pode ser um mecanismo de ação importante no combate ao câncer (Matsuda et al., 1994).

A quercetina tornou o potencial zeta dos magnetolipossomas mais positivos (3,0 mV), podendo favorecer a endocitose mediada por adsorção na barreira hematoencefálica (Vieira e Gamarra, 2016) em relação aos magnetolipossomas sem quercetina. Além disso, os sistemas de magnetolipossomas contendo quercetina, por apresentarem valores de diâmetro médio em torno de 200 nm, tem promissora aplicação no tratamento do câncer devido a possibilidade de penetrar seletivamente nos capilares do tumor, além de apresentarem um maior tempo de meia vida quando comparado a lipossomas maiores (Liu et al., 1992).

Cabe relembrar, que as caracterizações físico-químicas detalhadas em nível molecular dos magnetolipossomas ainda são pouco descritas na literatura, principalmente considerando fontes lipídicas naturais como material componente. Além disso, apesar do extenso conhecimento documentado sobre a interação da quercetina com os lipossomas, até o momento não existem informações detalhadas sobre o comportamento do flavonoide nos magnetolipossomas. Diante do exposto, o conhecimento das propriedades físico-químicas dos magnetolipossomas avaliados nesse trabalho contribuem para a escolha adequada de materiais de forma a aumentar a eficiência de sistemas de magnetolipossomas, seja como agente terapêutico ou carreador de fármacos antitumorais.

Em destaque, a produção de magnetolipossomas de ASO e maghemita contendo quercetina através de um método de preparo simples gerou um sistema estável, com propriedade de superparamagnetismo, o que pode viabilizar o uso dos magnetolipossomas como sistemas carreadores ou de liberação prolongada de fármaco. Além disso, a abordagem de interação molecular descrita neste trabalho é pioneira para a correlação e aplicação do design para sistemas de liberação de medicamentos baseados em magnetolipossomas.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados e discussões descritos neste trabalho permitiram propor as seguintes perspectivas:

A) Testar a quercetina incorporada em magnetolipossomas em diferentes razões molares, através de ensaios de RMN de ^{31}P, para averiguar seus efeitos na cabeça polar e por RMN de ^{1}H, para obter maiores informações sobre seus efeitos na cadeia apolar dos lipídios. Nestas condições experimentais, realizar os testes em diferentes associações de fosfatidilcolinas como o DMPC, variando a composição de acordo com a permeabilidade do sistema;

B) Investigar os efeitos da quercetina em membranas através de estudos de anisotropia de fluorescência de sondas localizadas nas regiões apolares e interfacial dos lipídios, tais como o difenilhexatrieno e a merociania-540;

C) Investigar os efeitos da quercetina nas regiões polares através do uso de reagentes de deslocamento para medidas de RMN ^{1}H como o ferricianeto de potássio, $K_3[Fe(CN)_6]$, a partir da comparação entre os valores de integrais dos picos espectrais referentes aos hidrogênios ligados à porção colina localizada na face externa e interna da bicamada;

D) Em complementação aos estudos de estabilidade, realizar estudos, em função do tempo, dos processos de peroxidação lipídica dos sistemas de magnetolipossomas, via ensaio de TBARS.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, M. B. Structural changes in lecithin-water systems - Thermal-turbidimetric studies. **Biochimica Et Biophysica Acta,** v. 225, n. 2, p. 167-178, 1971.

ACAR, H. Y. C. et al. Superparamagnetic nanoparticles stabilized by polymerized PEGylated coatings. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 293, n. 1, p. 1-7, 2005.

AJROUDI, L. et al. Magnetic, electric and thermal properties of cobalt ferrite nanoparticles. **Materials Research Bulletin,** v. 59, p. 49-58, 2014.

AKAL, Z. U.; ALPSOY, L.; BAYKAL, A. Biomedical applications of SPION@APTES@PEG-folic acid@carboxylated quercetin nanodrug on various cancer cells. **Applied Surface Science,** v. 378, p. 572-581, 2016a.

AKAL, Z. U.; ALPSOY, L.; BAYKAL, A. Superparamagnetic iron oxide conjugated with folic acid and carboxylated quercetin for chemotherapy applications. **Ceramics International,** v. 42, n. 7, p. 9065-9072, 2016b.

AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters,** v. 8, n. 1, p. 102-111, 2013.

AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale Research Letters,** v. 7, p. 1-13, 2012.

ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 65, n. 1, p. 36-48, 2013.

AMIC, D. et al. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. **Current Medicinal Chemistry,** v. 14, n. 7, p. 827-845, 2007.

ARORA, A. et al. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 373, n. 1, p. 102-109, 2000.

ARRONDO, J. L. R.; GONI, F. M. Infrared studies of protein-induced perturbation of lipids in lipoproteins and membranes. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 96, n. 1-2, p. 53-68, 1998.

ARSOV, Z.; QUARONI, L. Direct interaction between cholesterol and phosphatidylcholines in hydrated membranes revealed by ATR-FTIR spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 150, n. 1, p. 35-48, 2007.

ATKINS, P. W.; DE PAULA, J. **Físico Química:** 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

ATKINS, P. W.; DE PAULA, J. **Físico-química - Fundamentos:** 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2014.

BARRETO, A. C. H. et al. Magnetic nanoparticles for a new drug delivery system to control quercetin releasing for cancer chemotherapy. **Journal of Nanoparticle Research,** v. 13, n. 12, p. 6545-6553, 2011.

BATISTA, C. C. S. et al. Nano-Sized Silver Colloids Produced and Stabilized by Amino-Functionalized Polymers: Polymer Structure-Nanoparticle Features and Polymer Structure-Growth Kinetics Relationships. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 28, n. 9, p. 1608-1618, 2017.

BATISTA, C. M.; DE CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Liposomes and their therapeutic: state of art applications. ***Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*,** v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BERKOWITZ, A. E.; LAHUT, J. A.; VANBUREN, C. E. Properties of magnetic fluid particles. **Ieee Transactions on Magnetics,** v. 16, n. 2, p. 184-190, 1980. ISSN 0018-9464.

BERMUDEZ, M. et al. Molecular and physicochemical aspects of the interactions of the tuberculostatics ofloxacin and rifampicin with liposomal bilayers: a P-31-NMR and DSC study. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 158, n. 1-2, p. 59-66, 1999.

BHANDARY, S. et al. A Study on the Modulation of the Phase Behavior of Lipid Aggregates—Effect of Some Metal Nanoparticles. **Advanced Science, Engineering and Medicine: American Scientific Publishers.** v. 3, p. 213-218, 2011.

BILTONEN, R. L.; LICHTENBERG, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 64, n. 1-3, p. 129-142, 1993.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods in Enzymology,** v. 105, p. 299-305, 1984.

BIXNER, O.; REIMHULT, E. Controlled magnetosomes: Embedding of magnetic nanoparticles into membranes of monodisperse lipid vesicles. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 466, p. 62-71, 2016.

BLOOM, M.; THEWALT, J. Spectroscopic determination of lipid dynamics in membranes. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 73, n. 1-2, p. 27-38, 1994.

BOGGS, J. M. Intermolecular hydrogen-bonding between lipids - influence on organization and function of lipids in membranes. **Canadian Journal of Biochemistry,** v. 58, n. 10, p. 755-770, 1980.

BOLFARINI, G. C. et al. In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbit 7 uril zinc

phthalocyanine complex on melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology,** v. 115, p. 1-4, Oct 3 2012.

BORS, W.; MICHEL, C.; SCHIKORA, S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potential - A pulse-radiolysis study. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 19, n. 1, p. 45-52, 1995.

BOTHUN, G. Hydrophobic silver nanoparticles trapped in lipid bilayers: Size distribution, bilayer phase behavior, and optical properties. **J Nanobiotechnology,** v. 12, p. 6-13, 2008.

BOTHUN, G. D.; RABIDEAU, A. E.; STONER, M. A. Hepatoma Cell Uptake of Cationic Multifluorescent Quantum Dot Liposomes. **Journal of Physical Chemistry B,** v. 113, n. 22, p. 7725-7728, 2009.

BROWN, M. F. Theory of spin-lattice relaxation on lipid bilayers and biological-membranes - Dipolar relaxation. **Journal of Chemical Physics,** v. 80, n. 6, p. 2808-2831, 1984.

BUSCHOW, K. H. J. Introduction to hard magnetic materials. **Interstitial Intermetallic Alloys,** v. 281, p. 349-369, 1995.

BUSCHOW , K. H. J. **Concise Encyclopedia of Magnetic and Superconducting Materials**. 2. ed. Elsevier Science, 2005.

CALLISTER JR., W. D. **Ciência Engenharia de Materiais - Uma Introdução:** 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

CAO, D. R. et al. High saturation magnetization of gamma-Fe2O3 nano-particles by a facile one-step synthesis approach. **Scientific Reports,** v. 6, 2016.

CASAL, H. L. et al. Acholeplasma-laidlawii membranes - Fourier-transform infrared study of the influence of protein on lipid organization and dynamics. **Biochemistry,** v. 19, n. 3, p. 444-451, 1980.

CHAIN, E.; KEMP, I. The isoelectric points of lecithin and sphingomyelin. **Biochemical Journal**, v. 28, p. 2052-2055, 1934.

CHAKRABORTY, S. et al. The use of nano-quercetin to arrest mitochondrial damage and MMP-9 upregulation during prevention of gastric inflammation induced by ethanol in rat. **Biomaterials,** v. 33, n. 10, p. 2991-3001, 2012.

CHEN, C.; TRIPP, C. P. An infrared spectroscopic based method to measure membrane permeance in liposomes. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1778, n. 10, p. 2266-2272, 2008.

CHEN, S.; LUO, S. N. Small-angle scattering of polychromatic X-rays: effects of bandwidth, spectral shape and high harmonics. **Journal of Synchrotron Radiation,** v. 25, p. 496-504, 2018.

CHEN, X. K. et al. Interfacial Water Structure Associated with Phospholipid Membranes Studied by Phase-Sensitive Vibrational Sum Frequency Generation Spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society,** v. 132, n. 32, p. 11336-11342, 2010.

CHEN, Y.; BOSE, A.; BOTHUN, G. D. Controlled Release from Bilayer-Decorated Magnetoliposomes via Electromagnetic Heating. **Acs Nano,** v. 4, n. 6, p. 3215-3221, 2010.

CHEN, Y. et al. Low-dose chemotherapy of hepatocellular carcinoma through triggered-release from bilayer-decorated magnetoliposomes. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 116, p. 452-458, 2014.

CHEUNG, A. P.; OLSON, L. L. H-1-NMR assay of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in AL721. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 8, n. 8-12, p. 729-734, 1990.

CHRISTENSEN, G. et al. Effects of solvent hydrogen bonding, viscosity, and polarity on the dispersion and alignment of nanofluids containing Fe2O3 nanoparticles. **Journal of Applied Physics,** v. 118, n. 21, 2015.

CLEMENT, O. et al. Liver-tumors in cirrhosis - Experimantal-study with SPIO-enhanced MR imaging. **Radiology,** v. 180, n. 1, p. 31-36, 1991.

CULLIS, P. R.; HOPE, M. J.; TILCOCK, C. P. S. Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 40, n. 2-4, p. 127-144, 1986.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to Magnetic Materials**. Second. New Jersey: 2008.

CURRIE, L. A.; HORWITZ, W. IUPAC recommendations for defining and measuring detection and quantification limits. **Analusis,** v. 22, n. 5, p. 24-26, 1994.

DA COSTA, G. et al. NMR of molecules interacting with lipids in small unilamellar vesicles. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters,** v. 36, n. 8, p. 933-942, 2007.

DA COSTA, R. C.; DE SOUZA JUNIOR, F. G. Preparation of Maghemite and Polyaniline Nanocomposites Assisted by Ultrasound. **Polimeros-Ciencia E Tecnologia,** v. 24, n. 2, p. 243-249, 2014.

DANDAMUDI, S.; CAMPBELL, R. B. Development and characterization of magnetic cationic liposomes for targeting tumor microvasculature. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1768, n. 3, p. 427-438, 2007.

DE AZAMBUJA, C. R. L. et al. Physico-chemical characterization of asolectin-genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 193, p. 24-35, 2015.

DE FARIAS, R. F. et al. Adsorption of Cr(III) and Fe(III) on an inorganic-organic silicon hybrid surface. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 211, n. 2-3, p. 295-298, 2002.

DE LIMA, V. R. et al. Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine-based membranes. **Journal of Pineal Research,** v. 49, n. 2, p. 169-175, 2010.

DE LIMA, V. R. et al. Melatonin location in egg phosphatidylcholine liposomes: possible relation to its antioxidant mechanisms. **Journal of Pineal Research,** v. 43, n. 3, p. 276-282, 2007.

DE SOUSA, R. S. et al. Effects of alpha-eleostearic acid on asolectin liposomes dynamics: Relevance to its antioxidant activity. **Bioorganic Chemistry,** v. 51, p. 8-15, 2013.

DE SOUZA, F. G. et al. Magnetic field sensor based on a maghemite/polyaniline hybrid material. **Journal of Materials Science,** v. 45, n. 18, p. 5012-5021, 2010.

DEBOUZY, J. C. et al. Phospholipid matrix as a target for sulfur mustard (HD): NMR study in model membrane systems. **Cell Biology and Toxicology,** v. 18, n. 6, p. 397-408, 2002.

DECUYPER, M.; JONIAU, M. Magnetoliposomes - Formation and structural characterization. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters,** v. 15, n. 5, p. 311-319, 1988.

DING, X. W. et al. Biocompatible magnetic liposomes for temperature triggered drug delivery. **Nanoscale,** v. 4, n. 20, p. 6289-6292, 2012.

DONALDSON, K. Resolving the nanoparticles paradox. **Nanomedicine,** v. 1, n. 2, p. 229-234, 2006.

DRESCO, P. A. et al. Preparation and properties of magnetite and polymer magnetite nanoparticles. **Langmuir,** v. 15, n. 6, p. 1945-1951, 1999.

DUFOURC, E. J. et al. Dynamics of phosphate head groups in biomembranes - Comprehensive analysis using P-31 Nuclear-Magnetic-Resonance lineshape and relaxation-time measurements. **Biophysical Journal,** v. 61, n. 1, p. 42-57, 1992.

EL MAGHRABY, G. M. M.; WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 292, n. 1-2, p. 179-185, 2005.

ELERSIC, K. et al. Electric-field controlled liposome formation with embedded superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 165, n. 1, p. 120-124, 2012.

EUM, K. M. et al. Temperature-induced fusion of small unilamellar vesicles formed from satured long-chain lecithins and diheptanoylphosphatidylcholine. **Biochemistry,** v. 28, n. 20, p. 8206-8213, 1989.

FAGALI, N.; CATALA, A. Fe2+ and Fe3+ initiated peroxidation of sonicated and non-sonicated liposomes made of retinal lipids in different aqueous media. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 159, n. 2, p. 88-94, 2009.

FARREN, S. B.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Polymorphic phase preferences of phosphatidic-acid - A P-31 and H-2 NMR-study. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 111, n. 2, p. 675-682, 1983.

FATOUROS, D. G.; ANTIMISIARIS, S. G. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: A study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 251, n. 2, p. 271-277, 2002.

FLORIS, A. et al. Characterization and cytotoxicity studies on liposome-hydrophobic magnetite hybrid colloids. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 425, p. 118-127, 2014.

FORTIN-RIPOCHE, J. P. et al. Magnetic targeting of magnetoliposomes to solid tumors with MR imaging monitoring in mice: Feasibility. **Radiology,** v. 239, n. 2, p. 415-424, 2006.

FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, J. A. Nanopartículas Magnéticas e suas aplicações. **Química Supramolecular e Nanotecnologia**, v.1, p. 269-289, 2012.

GABRIELSKA, J. et al. Antioxidative effect of quercetin and its equimolar mixtures with phenyltin compounds on liposome membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 54, n. 20, p. 7735-7746, 2006.

GANG, W. et al. Liposomal quercetin: evaluating drug delivery in vitro and biodistribution in vivo. **Expert Opinion on Drug Delivery,** v. 9, n. 6, p. 599-613, 2012.

GARCIA, F. L. et al. Infrared spectroscopic study of the interaction of diacylglycerol with phosphstidylserine in the presence of calcium. **Biochimica Et Biophysica Acta,** v. 1169, n. 3, p. 264-272, 1993.

GARCIA-JIMENO, S. et al. External magnetic field-induced selective biodistribution of magnetoliposomes in mice. **Nanoscale Research Letters,** v. 7, n. 1, p. 452-459, 2012.

GARCIA-JIMENO, S.; ESTELRICH, J. Ferrofluid based on polyethylene glycol-coated iron oxide nanoparticles: Characterization and properties. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 420, p. 74-81, 2013.

GARCIA-MANYES, S.; ONCINS, G.; SANZ, F. Effect of ion-binding and chemical phospholipid structure on the nanomechanics of lipid bilayers studied by force spectroscopy. **Biophysical Journal,** v. 89, n. 3, p. 1812-1826, 2005.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.

GERMAN, S. V. et al. Liposomes loaded with hydrophilic magnetite nanoparticles: Preparation and application as contrast agents for magnetic resonance imaging. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 135, p. 109-115, 2015.

GHARIB, A. et al. Preparation, characterization and in vitro efficacy of magnetic nanoliposomes containing the artemisinin and transferrin. **Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 22, n. 1, p. 44-51, 2014.

GHOSH, C.; DICK, R. M.; ALI, S. F. Iron ascorbate-induced lipid-peroxidation changes membrane fluidity and muscarinic cholinergic receptor-binding in rat frontal-cortex. **Neurochemistry International,** v. 23, n. 5, p. 479-484, 1993.

GRDADOLNIK, J.; KIDRIC, J.; HADZI, D. Hydratation of phosphatidylcholine reverse micelles and multilayers - An infrared spectroscopic study. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 59, n. 1, p. 57-68, 1991.

GRIT, M.; UNDERBERG, W. J. M.; CROMMELIN, D. J. A. Hydrolisis of satured soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. **Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 82, n. 4, p. 362-366, 1993.

GUGLER, R.; LESCHIK, M.; DENGLER, H. J. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. **European Journal of Clinical Pharmacology,** v. 9, n. 2-3, p. 229-234, 1975.

GUNTHER, G. et al. Flavonoids in Microheterogeneous Media, Relationship between Their Relative Location and Their Reactivity towards Singlet Oxygen. **Plos One,** v. 10, n. 6, 2015.

GUO, H. et al. Theranostic magnetoliposomes coated by carboxymethyl dextran with controlled release by low-frequency alternating magnetic field. **Carbohydrate Polymers,** v. 118, p. 209-217, 2015.

GUO, Y. et al. Light/magnetic hyperthermia triggered drug released from multifunctional thermo-sensitive magnetoliposomes for precise cancer synergetic theranostics. J**ournal of Controlled Release,** v. 272, p. 145-158, 2017.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials,** v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid-peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue-damage. **Clinical Chemistry,** v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.

HADRICH, G. et al. Lipid-based nanocarrier for quercetin delivery: system characterization and molecular interactions studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy,** v. 42, n. 7, p. 1165-1173, 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free-radical and catalytic metal-ions in human-disease - An overview. **Methods in Enzymology,** v. 186, p. 1-85, 1990.

HARDIANSYAH, A. et al. Magnetic liposomes for colorectal cancer cells therapy by high-frequency magnetic field treatment. **Nanoscale Research Letters,** v. 9, n. 1, p. 497-510, 2014.

HAUSER, H. Mechanism of spontaneous vesiculation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 86, n. 14, p. 5351-5355, 1989.

HAYASHI, K. et al. High-Frequency, Magnetic-Field-Responsive Drug Release from Magnetic Nanoparticle/Organic Hybrid Based on Hyperthermic Effect. **Acs Applied Materials & Interfaces,** v. 2, n. 7, p. 1903-1911, 2010.

HEIJNEN, C. G. M. et al. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. **Toxicology in Vitro,** v. 15, n. 1, p. 3-6, 2001.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red-cell membrane damage. **Seminars in Hematology,** v. 26, n. 4, p. 277-285, 1989.

HERTEL, R. Micromagnetic simulations of magnetostatically coupled nickel nanowires. **Journal of Applied Physics,** v. 90, n. 11, p. 5752-5758, 2001.

HIGASHI, K. et al. Preparation and some properties of giant liposomes and proteoliposomes. **Journal of Biochemistry,** v. 101, n. 2, p. 433-440, 1987.

HIRPARA, K. V. et al. Quercetin and Its Derivatives: Synthesis, Pharmacological Uses with Special Emphasis on Anti-Tumor Properties and Prodrug with Enhanced Bio-Availability. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry,** v. 9, n. 2, p. 138-161, 2009.

HOPE, M. J. et al. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid-vesicles. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 40, n. 2-4, p. 89-107, 1986.

HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Effects of divalent-cations and pH on phosphatidylserine model membranes - P-31 NMR-study. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 92, n. 3, p. 846-852, 1980.

HOPE, M. J.; WALKER, D. C.; CULLIS, P. R. Ca-2+ and pH induced fusion of small unilamellar vesicles consisting of phosphatidylethanolamine and negatively charged phospholipids - A freeze-fracture study. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 110, n. 1, p. 15-22, 1983.

HOSKINS, C.; CUSCHIERI, A.; WANG, L. J. The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism. **Journal of Nanobiotechnology,** v. 10, p. 15-27, 2012.

HOSNI, N. et al. Semi-hard magnetic properties of nanoparticles of cobalt ferrite synthesized by the co-precipitation process. **Journal of Alloys and Compounds,** v. 694, p. 1295-1301, 2017.

HSU, H. L.; CHEN, J. P. Preparation of thermosensitive magnetic liposome encapsulated recombinant tissue plasminogen activator for targeted thrombolysis. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 427, p. 188-194, 2017.

HUANG, M. G. et al. Encapsulation of flavonoids in liposomal delivery systems: the case of quercetin, kaempferol and luteolin. **Food & Function,** v. 8, n. 9, p. 3198-3208, 2017.

ICKENSTEIN, L. M. et al. Effects of phospholipid hydrolysis on the aggregate structure in DPPC/DSPE-PEG(2000) liposome preparations after gel to liquid crystalline phase transition. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1758, n. 2, p. 171-180, 2006.

IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine,** v. 1, n. 3, p. 297-315, 2006.

IYENGAR, S. J. et al. Magnetic, X-ray and Mossbauer studies on magnetite/maghemite core-shell nanostructures fabricated through an aqueous route. **Rsc Advances,** v. 4, n. 110, p. 64919-64929, 2014.

JOHNS, A. et al. Asolectin from soybeans as a natural compatibilizer for cellulose-reinforced biocomposites from tung oil. **Journal of Applied Polymer Science,** v. 132, n. 17, 2015.

JUNG, H. et al. Conformation of a beta-adrenoceptor-derived signal transducing peptide as inferred by circular dichroism and H-1 NMR spectroscopy. **Biochemistry,** v. 35, n. 20, p. 6399-6405, 1996.

JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O Mundo dos Colóides. **Química nova na Escola,** v. 9, p. 9-13, 1999.

KASAIKINA, O. T. et al. Consumption of quercetin and rutin in reactions with free radicals. **Bulgarian Chemical Communications,** v. 42, n. 2, p. 153-160, 2010.

KESHARI, A. K.; PANDEY, A. C. Size and distribution: A comparison of XRD, SAXS and SANS study of II-VI semiconductor nanocrystals. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology,** v. 8, n. 3, p. 1221-1227, 2008.

KIM, Y. A. et al. Lipophilicity of flavonoid complexes with iron(II) and their interaction with liposomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 431, n. 4, p. 680-685, 2013.

KIWADA, H. et al. Feasibility of magnetic liposomes as a targeting debice for drugs. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** v. 34, n. 10, p. 4253-4258, 1986.

KLAUDA, J. B. et al. Rotation of lipids in membranes: Molecular dynamics simulation, P-31 spin-lattice relaxation, and rigid-body dynamics. **Biophysical Journal,** v. 94, n. 8, p. 3074-3083, 2008.

KNUDSEN, K. B. et al. In vivo toxicity of cationic micelles and liposomes. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine,** v. 11, n. 2, p. 467-477, 2015.

KOERNER, M. M. et al. Electrodynamics of Lipid Membrane Interactions in the Presence of Zwitterionic Buffers. **Biophysical Journal,** v. 101, n. 2, p. 362-369, 2011.

KOYNOVA, R.; CAFFREY, M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1513, n. 1, p. 82-82, 2001.

KUCHERYAVY, P. et al. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Variable Size and an Iron Oxidation State as Prospective Imaging Agents. **Langmuir,** v. 29, n. 2, p. 710-716, 2013.

KUMAR, S. R. et al. Quercetin conjugated superparamagnetic magnetite nanoparticles for in-vitro analysis of breast cancer cell lines for chemotherapy applications. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 436, p. 234-242, 2014.

KUMARI, A. et al. Development of biodegradable nanoparticles for delivery of quercetin. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 80, n. 2, p. 184-192, 2010.

LACAVA, Z. G. M. et al. Toxic effects of ionic magnetic fluids in mice. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 194, n. 1-3, p. 90-95, 1999.

LANDEE, C. P.; TURNBULL, M. M. Review: A gentle introduction to magnetism: units, fields, theory, and experiment. **Journal of Coordination Chemistry,** v. 67, n. 3, p. 375-439, 2014.

LASIC, D. D. **Liposomes: From Physics to Applications**. New York: Elsevier Science Ltd, 1993.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology,** v. 16, n. 7, p. 307-321, 1998.

LAURENT, S. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications (vol 108, pg 2064, 2008). **Chemical Reviews,** v. 110, n. 4, p. 2574-2574, 2010.

LAVERMAN, P. et al. Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 37, n. 1-3, p. 225-235, 1999.

LEE, D. C.; CHAPMAN, D. Infrared spectroscopic studies of biomembranes and model membranes. **Bioscience Reports,** v. 6, n. 3, p. 235-256, 1986.

LEWIS, R.; MCELHANEY, R. N. The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 96, n. 1-2, p. 9-21, 1998.

LI, J. et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences,** v. 10, n. 2, p. 81-98, 2015.

LI, Q. T.; YEE, M. H.; TAN, B. K. Lipid peroxidation in small and large phospholipid unilamellar vesicles induced by water-soluble free radical sources. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 273, n. 1, p. 72-76, 2000.

LICHTENBERG, D.; BARENHOLZ, Y. Liposomes - Preparation, characterization and preservation. **Methods of Biochemical Analysis,** v. 33, p. 337-462, 1988.

LIEBER, C. M. One-dimensional nanostructures: Chemistry, physics & applications. **Solid State Communications,** v. 107, n. 11, p. 607-616, 1998.

LITTLE, T. A. Method Validation Essentials, Limit of Blank, Limit of Detection, and Limit of Quantitation. **Biopharm International,** v. 28, n. 4, p. 48-51, 2015.

LIU, D. X.; MORI, A.; HUANG, L. Role of liposome size and res blockade in controlling biodistribuition and tumor uptake of GM1-containing liposomes. **Biochimica Et Biophysica Acta,** v. 1104, n. 1, p. 95-101, 1992.

LOPES DE AZAMBUJA, C. R. et al. Physico-chemical characterization of asolectin-genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 193, p. 24-35, 2015.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHUTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie-International Edition,** v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007.

LUBBE, A. S. et al. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: Tolerance and efficacy. **Cancer Research,** v. 56, n. 20, p. 4694-4701, 1996.

MAHERANI, B. et al. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. **Current Nanoscience,** v. 7, n. 3, p. 436-452, 2011.

MAHMOUDI, M. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews,** v. 63, n. 1-2, p. 24-46, 2011.

MAKINO, K. et al. Temperature-induced and ionic strenght-induced conformational-changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta-potential data. **Biophysical Chemistry,** v. 41, n. 2, p. 175-183, 1991.

MANRIQUE-MORENO, M. et al. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen on human erythrocytes and on cell membrane molecular models. **Biophysical Chemistry,** v. 147, n. 1-2, p. 53-58, 2010.

MANTSCH, H. H.; MCELHANEY, R. N. Phospholipid phase-transitions in model and biological-membranes as studied by infrared-spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 57, n. 2-3, p. 213-226, 1991.

MARIE, H.; PLASSAT, V.; LESIEUR, S. Magnetic-fluid-loaded liposomes for MR imaging and therapy of cancer. **Journal of Drug Delivery Science and Technology,** v. 23, n. 1, p. 25-37, 2013.

MARKIDES, H.; ROTHERHAM, M.; EL HAJ, A. J. Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine. **Journal of Nanomaterials**, 2012. I

MARTINA, M. S. et al. Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging. **Journal of the American Chemical Society,** v. 127, n. 30, p. 10676-10685, 2005.

MARTINA, M. S.; WILHELM, C.; LESIEUR, S. The effect of magnetic targeting on the uptake of magnetic-fluid-loaded liposomes by human prostatic adenocarcinoma cells. **Biomaterials,** v. 29, n. 30, p. 4137-4145, 2008.

MARTINEZ-GONZALEZ, R.; ESTELRICH, J.; BUSQUETS, M. A. Liposomes Loaded with Hydrophobic Iron Oxide Nanoparticles: Suitable T-2 Contrast Agents for MRI. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 17, n. 8, 2016.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Nanomaterials and the discovery of new worlds at the chemist's bench. **Quimica Nova,** v. 35, n. 7, p. 1434-1446, 2012.

MARTINS, V. H. G. et al. The effect of furazolidone on the physico-chemical properties of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers: Relevance to anti-leishmanial therapy. **Journal of Molecular Structure,** v. 1059, p. 225-231, 2014.

MATSUZAKI, K. et al. Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1467, n. 1, p. 219-226, 2000.

MCLEAN, L. R.; HAGAMAN, K. A. Effect of lipid physical state on the rate of peroxidation of liposomes. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 12, n. 2, p. 113-119, 1992.

MELLO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen-peroxide are mediated by intracelular iron. **Biochemical Journal,** v. 218, n. 1, p. 273-275, 1984.

MERTINS, O. et al. Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 138, n. 1-2, p. 29-37, 2005.

MEYRE, M. E. et al. Production of magnetic multilamellar liposomes as highly T(2)-efficient MRI contrast agents. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine,** v. 7, n. 1, p. 18-21, 2011.

MONTERO, M. T.; HERNANDEZ-BORRELL, J.; KEOUGH, K. M. W. Fluoroquinolone-biomembrane interactions: Monolayer and calorimetric studies. **Langmuir,** v. 14, n. 9, p. 2451-2454, 1998.

MOREAU, C. et al. Sarcolemma phospholipid structure investigated by immunogold electron microscopy and P-31 NMR spectroscopy with lanthanide ions. **Febs Letters,** v. 509, n. 3, p. 417-422, 2001.

MORENO, M. M. et al. The membrane-activity of Ibuprofen, Diclofenac, and Naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1788, n. 6, p. 1296-1303, 2009.

MOVILEANU, L.; NEAGOE, I.; FLONTA, M. L. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 205, n. 1-2, p. 135-146, 2000.

MYLONAS, C.; KOURETAS, D. Lipid peroxidation and tissue damage. **In Vivo,** v. 13, n. 3, p. 295-309, 1999.

NAGAMI, H. et al. Two methylene groups in phospholipids distinguish between apoptosis and necrosis for tumor cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** v. 16, n. 4, p. 782-785, 2006.

NAPPINI, S. et al. Structure and permeability of magnetoliposomes loaded with hydrophobic magnetic nanoparticles in the presence of a low frequency magnetic field. **Soft Matter,** v. 7, n. 10, p. 4801-4811, 2011.

NAPPINI, S. et al. Magnetic field responsive drug release from magnetoliposomes in biological fluids. **Journal of Materials Chemistry B,** v. 4, n. 4, p. 716-725, 2016. NAVRATIL, T.; SESTAKOVA, I.; MARECEK, V. Supported Phospholipid Membranes Formation at a Gel Electrode and Transport of Divalent Cations across them. **International Journal of Electrochemical Science,** v. 6, n. 12, p. 6032-6046, 2011.

NORDLUND, J. R.; SCHMIDT, C. F.; THOMPSON, T. E. Transbilayer distribution in small unilamellar phosphatidylglycerol-phosphatidylcholine vesicles. **Biochemistry,** v. 20, n. 22, p. 6415-6420, 1981.

NURDIN, I.; RIDWAN; SATRIANANDA. The Effect of pH and Time on The Stability of Superparamagnetic Maghemite Nanoparticle Suspensions. **2nd International Conference on Chemical and Material Engineering (ICCME)**, 2015, Phuket, THAILAND. Dec 27-28.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry,** v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OHKI, S. et al. Surface potential of phosphoinositide membranes: Comparison between theory and experiment. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 79, n. 1, p. 210-218, 2010.

OHVO-REKILA, H. et al. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Progress in Lipid Research,** v. 41, n. 1, p. 66-97, 2002.

OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Iron oxides and their applications in catalytic processes: A review. **Quimica Nova,** v. 36, n. 1, p. 123-130, 2013.

OROZCO-HENAO, J. M. et al. Effects of Nanostructure and Dipolar Interactions on Magnetohyperthermia in Iron Oxide Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C,** v. 120, n. 23, p. 12796-12809, 2016.

PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D-Applied Physics,** v. 36, n. 13, p. 167-181, 2003.

PARK, S. H. et al. Effects of silver nanoparticles on the fluidity of bilayer in phospholipid liposome. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 44, n. 2-3, p. 117-122, 2005.

PASENKIEWICZ-GIERULA, M. et al. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study. **Biophysical Journal,** v. 76, n. 3, p. 1228-1240, 1999.

PATIL, R. M. et al. In vitro hyperthermia with improved colloidal stability and enhanced SAR of magnetic core/shell nanostructures. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications,** v. 59, p. 702-709, 2016.

PATIR, H. et al. Quercetin as a prophylactic measure against high altitude cerebral edema. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 53, n. 4, p. 659-668, 2012.

PATTERSON, A. L. The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination. **Physical Review Journals Archive**, v. 56, p. 978-989, 1939.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B. et al. Characteristics of quercetin interactions with liposomal and vacuolar membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1838, n. 1, p. 254-265, 2014.

PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, B. et al. FTIR, H-1 NMR and EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1828, n. 2, p. 518-527, 2013.

PERKINS, W. R. et al. The determination of liposome captured volume. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 64, n. 1-3, p. 197-217, 1993.

PETRALITO, S. et al. Preparation and characterization of lipid vesicles entrapping iron oxide nanoparticles. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering,** v. 7, p. 335-341, 2012.

PFEIFFER, H. et al. Hydration behaviour of POPC/C-12-Bet mixtures investigated by sorption gravimetry, P-31 NMR spectroscopy and X-ray diffraction. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 165, n. 2, p. 244-251, 2012.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products,** v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PRADHAN, P. et al. Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials,** v. 311, n. 1, p. 208-215, 2007.

PRIPREM, A. et al. Anxiety and cognitive effects of quercetin liposomes in rats. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine,** v. 4, n. 1, p. 70-78, 2008.

PRODAN, A. M. et al. Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: Characterization and Toxicity Evaluation by In Vitro and In Vivo Assays. **Journal of Nanomaterials**, 2013.

QIU, D. et al. Microstructure study of liposomes decorated by hydrophobic magnetic nanoparticles. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 165, n. 5, p. 563-570, 2012.

RAND, R. P.; TINKER, D. O.; FAST, P. G. Popymorphism of phosphatidylethanolamines from 2 natural sources. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 6, n. 4, p. 333-342, 1971.

REIS, A.; SPICKETT, C. M. Chemistry of phospholipid oxidation. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1818, n. 10, p. 2374-2387, 2012.

REN, J. et al. Complexation of flavonoids with iron: Structure and optical signatures. **Journal of Physical Chemistry B,** v. 112, n. 6, p. 1845-1850, 2008.

RICEEVANS, C. A.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science,** v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RICEEVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIEDERER, M. et al. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelial prostacyclin production. **Journal of Lipid Research,** v. 51, n. 10, p. 2957-2966, 2010.

RODRIGUES, A. R. O. et al. Magnetoliposomes as carriers for promising antitumor thieno 3,2-b pyridin-7-arylamines: photophysical and biological studies. **Rsc Advances,** v. 7, n. 25, p. 15352-15361, 2017.

ROITER, Y. et al. Interaction of nanoparticles with lipid membrane. **Nano Letters,** v. 8, n. 3, p. 941-944, 2008.

SABIN, J. et al. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. **European Physical Journal E,** v. 20, n. 4, p. 401-408, 2006.

SAETERN, A. M. et al. Camptothecin-catalyzed phospholipid hydrolysis in liposomes. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 288, n. 1, p. 73-80, 2005.

SAIJA, A. et al. Flavonoid-biomembrane interactions - A calorimetric study on dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 124, n. 1, p. 1-8, 1995.

SAIJA, A. et al. Flavonoids as antioxidant agents - importance of thir interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 19, n. 4, p. 481-486, 1995.

SANTHOSH, P. B. et al. A study on the interaction of nanoparticles with lipid membranes and their influence on membrane fluidity. **17th International School on Condensed Matter Physics (ISCMP)** - Open Problems in Condensed Matter Physics, Biomedical Physics and their Applications, 2012, Bulgaria. Sep 02-07. p.1-6.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. Liposomes: Has the magic bullet hit the target? **Quimica Nova,** v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Quimica Nova,** v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHLADT, T. D. et al. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. **Dalton Transactions,** v. 40, n. 24, p. 6315-6343, 2011.

SCHULLERY, S. E. et al. Fusion of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. **Biochemistry,** v. 19, n. 17, p. 3919-3923, 1980.

SEELIG, J. P-31 nuclear magnetic-resonance and head group structure of phospholipids in membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta,** v. 515, n. 2, p. 105-140, 1978.

SEN, T. et al. Magnetoliposomes: Stability of Magnetic Nanoparticles in Suspension for drug delivery. **Nanotechnology**, v. 1, p. 924-927, 2010.

SERBINOVA, E. et al. Freeradical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 10, n. 5, p. 263-275, 1991.

SEVERCAN, F.; SAHIN, I.; KAZANCI, N. Melatonin strongly interacts with zwitterionic model membranes - evidence from Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1668, n. 2, p. 215-222, 2005.

SHARIAT, S. et al. Optimization of a Method to Prepare Liposomes Containing HER2/Neu- Derived Peptide as a Vaccine Delivery System for Breast Cancer, **Iran J. Pharm Res**, v. 13, p. 15-25, 2014.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. Singapore: 2013.

SLATER, S. J. et al. Contribution of hydrogen-bonding to lipid lipid interactions in membranes and the role of lipid order- effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation, and ethanol. **Biochemistry,** v. 32, n. 14, p. 3714-3721, 1993.

SOLANKI, A.; KIM, J. D.; LEE, K. B. Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging. **Nanomedicine,** v. 3, n. 4, p. 567-578, 2008.

SOVAGO, M. et al. Calcium-induced phospholipid ordering depends on surface pressure. **Journal of the American Chemical Society,** v. 129, n. 36, p. 11079-11084, 2007.

SUBONGKOT, T.; NGAWHIRUNPAT, T. Effect of liposomal fluidity on skin permeation of sodium fluorescein entrapped in liposomes. **International Journal of Nanomedicine,** v. 10, 2015.

SUN, Y. K. et al. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 245, n. 1-3, p. 15-19, 2004.

SZOKA, F.; PAPAHADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 75, n. 9, p. 4194-4198, 1978.

TAKAGI, T. et al. Quercetin, a flavonol, promotes disassembly of microtubules in prostate cancer cells: Possible mechanism of its antitumor activity. **Acta Histochemica Et Cytochemica,** v. 31, n. 5, p. 435-445, 1998.

TARAHOVSKY, Y. S. et al. Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1838, n. 5, p. 1235-1246, 2014.

TASCA, R. A. et al. Desenvolvendo habilidades e conceitos de nanotecnologia no ensino médio por meio de experimento didático envolvendo preparação e aplicação de nanopartículas superparamagnéticas. **Química Nova na Escola**, v. 37, p. 236-240, 2015.

TATULIAN, S. A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: A method of choice for studying membrane proteins and lipids. **Biochemistry,** v. 42, n. 41, p. 11898-11907, 2003.

TAYLOR, K. M. G.; MORRIS, R. M. Thermal-analysis of phase-transition behavior in liposomes. **Thermochimica Acta,** v. 248, p. 289-301, 1995.

TILCOCK, C. P. S. Lipid polymorphism. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 40, n. 2-4, p. 109-125, 1986.

TIMOSZYK, A.; GDANIEC, Z.; LATANOWICZ, L. The effect of polysialic acid on molecular dynamics of model membranes studied by P-31 NMR spectroscopy. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance,** v. 25, n. 1-3, p. 142-145, 2004.

TOYRAN, N.; SEVERCAN, F. Competitive effect of vitamin D-2 and Ca2+ on phospholipid model membranes: an FTIR study. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 123, n. 2, p. 165-176, 2003.

TRAIKIA, M. et al. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and P-31-nuclear magnetic resonance. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters,** v. 29, n. 3, p. 184-195, 2000.

ULRICH, A. S.; SAMI, M.; WATTS, A. Hydration of DOPC bilayers by differential scanning calorimetry. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes,** v. 1191, n. 1, p. 225-230, 1994.

VAJDA, F.; DELLATORRE, E. Efficient numerical implementation of complete-moving-hysteresis models (invited). **Ieee Transactions on Magnetics,** v. 29, n. 2, p. 1532-1537, 1993.

VAN DIJK, C.; DRIESSEN, A. J. M.; RECOURT, K. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. **Biochemical Pharmacology,** v. 60, n. 11, p. 1593-1600, 2000.

VAN SWAAY, D.; DE MELLO, A. Microfluidic methods for forming liposomes. **Lab on a Chip,** v. 13, n. 5, p. 752-767, 2013.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Preparation and Characterization of Liposomes as Therapeutic Delivery Systems: A Review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 95-111, 1995.

VENUGOPAL, I. et al. Magnetic field-enhanced cellular uptake of doxorubicin loaded magnetic nanoparticles for tumor treatment. **Materials Research Express,** v. 3, n. 9, p. 1-13, 2016.

VERKLEIJ, A. J. Lipidic intramembranous particles. **Biochimica Et Biophysica Acta,** v. 779, n. 1, p. 43-63, 1984.

VILLASMIL-SANCHEZ, S.; RABASCO, A. M.; LUISA GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. Thermal and P-31-NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in Phosphatidylcholine/Cholesterol liposomes. Comparative P-31-NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** v. 105, p. 14-23, 2013.

WAHAJUDDIN; ARORA, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine,** v. 7, p. 3445-3471, 2012.

WANG, B. et al. Physicochemical Origin for Free Radical Generation of Iron Oxide Nanoparticles in Biomicroenvironment: Catalytic Activities Mediated by Surface Chemical States. **Journal of Physical Chemistry C,** v. 117, n. 1, p. 383-392, 2013.

WANG, G. et al. Effects of quercetin nanoliposomes on C6 glioma cells through induction of type III programmed cell death. **International Journal of Nanomedicine,** v. 7, p. 271-280, 2012.

WEISSLEDER, R. et al. Ultrasmall superparamagnetic iron-oxide - An introvenous contrast agent for assessing lynph-nodes with MR imaging. **Radiology,** v. 175, n. 2, p. 494-498, 1990.

WONG, M. Y.; CHIU, G. N. C. Liposome formulation of co-encapsulated vincristine and quercetin enhanced antitumor activity in a trastuzumab-insensitive breast tumor xenograft model. **Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine,** v. 7, n. 6, p. 834-840, 2011.

WONG, P. T. T.; MANTSCH, H. H. High-pressure infrared spectroscopic evidence of water binding-sites in 1,2-diacyl phospholipids. **Chemistry and Physics of Lipids,** v. 46, n. 3, p. 213-224, 1988.

WONGSAGONSUP, R. et al. Zeta potential (zeta) analysis for the determination of protein content in rice flour. **Starch-Starke,** v. 57, n. 1, p. 25-31, 2005.

WU, T. H. et al. Preparation, physicochernical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 346, n. 1-2, p. 160-168, 2008.

XIA, S. D. et al. In situ precipitation: a novel approach for preparation of iron-oxide magnetoliposomes. **International Journal of Nanomedicine,** v. 9, p. 2607-2617, 2014.

YADAV, A. V. et al. Stability Aspects of Liposomes. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research,** v. 45, n. 4, p. 402-413, 2011.

YADOLLAHPOUR, A.; HOSSEINI, S. A. Magnetic nanoparticle based hyperthermia: A review of the physiochemical properties and synthesis methods. **International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences,** v. 5, n. 2, p. 242-246, 2016.

YAMAUCHI, K.; BARONE, P. Electronic ferroelectricity induced by charge and orbital orderings. **Journal of Physics-Condensed Matter,** v. 26, n. 10, 2014.

YANG, R. et al. Effective elimination of liver cancer stem-like cells by CD90 antibody targeted thermosensitive magnetoliposomes. **Oncotarget,** v. 7, n. 24, p. 35894-35916, 2016.

YARJANLI, Z. et al. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. **Bmc Neuroscience,** v. 18, p. 51-63, 2017.

YEAGLE, P. L. et al. Phospholipid head-group conformations - Intermolecular interations and cholesterol effects. **Biochemistry,** v. 16, n. 20, p. 4343-4349, 1977.

YONASHIRO, M. G. **Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial / Calorimetria Exploratória Diferencial.** São Paulo: Giz Editorial**:** 1-97 p. 2004.

YOSHINO, M. et al. Prooxidant activity of flavonoids: Copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Molecular Genetics and Metabolism,** v. 68, n. 4, p. 468-472, 1999.

YU, J. T. et al. Effects of genistein and daidzein on membrane characteristics of HCT cells. **Nutrition and Cancer-an International Journal,** v. 33, n. 1, p. 100-104, 1999.

ZAMIN, L. L. et al. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. **Cancer Science,** v. 100, n. 9, p. 1655-1662, 2009.

ZHANG, H. Y. et al. Use of Metal Oxide Nanoparticle Band Gap To Develop a Predictive Paradigm for Oxidative Stress and Acute Pulmonary Inflammation. **Acs Nano,** v. 6, n. 5, p. 4349-4368, 2012.

ZHANG, J. A. A.; PAWELCHAK, J. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions Part 1: Lipid hydrolysis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 50, n. 3, p. 357-364, 2000.

ZHOU, W.; SU, M. X.; CAI, X. S. Advances in Nanoparticle Sizing in Suspensions: Dynamic Light Scattering and Ultrasonic Attenuation Spectroscopy. **Kona Powder and Particle Journal**, n. 34, p. 168-182, 2017.

ZHU, M.-T. et al. Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats. **Toxicology,** v. 247, n. 2-3, p. 102-111, 2008.

ZHU, T. F.; SZOSTAK, J. W. Preparation of Large Monodisperse Vesicles. **Plos One,** v. 4, n. 4, 2009.

ZIBLAT, R. et al. Spontaneous Formation of Two-Dimensional and Three-Dimensional Cholesterol Crystals in Single Hydrated Lipid Bilayers. **Biophysical Journal,** v. 103, n. 2, p. 255-264, 2012.