

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**Síntese de Fosfatidilcolinas Diacetilênicas, Preparação e
Caracterização de Lipossomas Polimerizados para Aplicações
na Liberação Controlada de Medicamentos.**

Eng. Paulo de Tarso Hennies
Autor

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana
Orientadora

Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia
Co-orientador

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em
Engenharia Química.**

**Campinas – São Paulo
Fevereiro/2001**

UNICAMP

UNIDADE	00
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP
	H393s
V.	Ex.
TOMBO BC/	44915
PROC.	16-392/01
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$ 11,00
DATA	26/06/01
N.º CPD	

CM00158106-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

H393s Hennies, Paulo de Tarso
Síntese de fosfatidilcolinas diacetilênicas, preparação e caracterização de lipossomas polimerizados para aplicações na liberação controlada de medicamentos / Paulo de Tarso Hennies. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana, Carlos Roque Duarte Correia.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Fosfatídeos. 2. Acetileno. 3. Lipossomos. 4. Polímeros. I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Correia, Carlos Roque Duarte. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

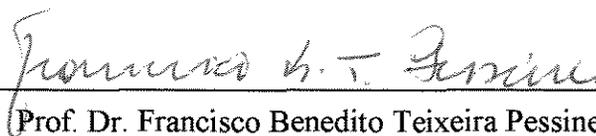
Tese de Doutorado defendida por Paulo de Tarso Hennies e aprovada em 19 de fevereiro de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.^a. Dr.^a. Maria Helena Andrade Santana - Orientadora



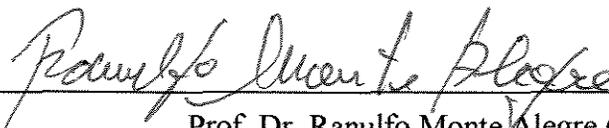
Dr.^a. Maria Inês Ré (titular)



Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (titular)



Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero (titular)



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre (titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



Prof.^a Dr.^a Maria Helena Andrade Santana (Orientadora)

**Aos meus pais
Maria e Waldemar.**

À Emi.

**Aos amigos Maurício, Mayard,
Paulo de Tarso Seixas e Deva Manik.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Andrade Santana e Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia, pelo apoio, incentivo, compreensão, paciência, confiança e ensinamentos.

Aos amigos Claudia, Marcos, Elias, Paulo César, Luiz, Italo, Edson, João e Ângelo, pelo apoio tanto na síntese quanto fora dela.

À Elaine e à Maria Helena Zanin, pela amizade e pela importante ajuda nos ensaios com lipossomas.

Aos amigos e colegas do grupo de síntese: Rafael, Adrian, Denilson, Daniela, Elias Severino, Ariel e Antonio.

Aos meus amigos e colegas do DPB: Giuliana, Heron, Fernanda, Alessandro, Basilino, Salah, Cristiane, Oselys, Carla, Adriano e Terezinha.

Ao Prof. Dr. Francisco Pessine e ao seu grupo, especialmente à Débora, pelo apoio material e pelas ótimas discussões e sugestões.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, pelo uso do liofilizador.

Ao Prof. Dr. Pilli e ao Prof. Dr. Fernando Coelho, e aos seus respectivos grupos, pelo companheirismo, dicas e empréstimos de reagentes.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana, pela utilização dos seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Éverson, pelas conversas, corridas e incentivo.

À Prof^ª. Dr^ª. Ângela e ao Prof. Dr. Paulo de Tarso Rosa pelas sugestões e apoio.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

RESUMO

O desenvolvimento de diversas aplicações dos lipossomas tem sido limitado pela instabilidade da bicamada lipídica, principalmente nas aplicações *in vivo*. A utilização de lipídios polimerizáveis proporciona a formação de lipossomas mais estáveis após a polimerização, constituindo-se em uma alternativa muito promissora para a administração de medicamentos encapsulados, particularmente por via oral. Neste trabalho foram sintetizadas, purificadas e caracterizadas fosfatidilcolinas polimerizáveis contendo o grupo diacetileno nas cadeias acila. Esses grupos foram diferentemente posicionados ao longo de cadeias com mesmo número de átomos de carbono, ou localizados na mesma posição em cadeias de diferentes comprimentos, produzindo os fosfolipídios 1,2-bis(heptadeca-10,12-diinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DC_{8,3}PC, *1a*), 1,2-bis(tricosa-4,6-diinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DC_{2,15}PC, *1c*) e 1,2-bis(tricosa-10,12-diinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DC_{8,9}PC, *1b*). Lipossomas do tipo unilamelares pequenos (SUV) foram preparados a partir dos lipídios puros, e polimerizados através de radiação ultra-violeta. Eles foram caracterizados através do conteúdo de fosfolipídios, raio hidrodinâmico, cinética de polimerização e estabilidade em presença de tensoativos. Os resultados indicaram o sucesso na síntese do DC_{8,9}PC, fosfolipídio diacetilênico mais usado em lipossomas e disponível comercialmente, e também na síntese de duas novas moléculas, DC_{8,3}PC e DC_{2,15}PC, até então inéditas na literatura. Inovações introduzidas no processo de síntese conduziram ao seu aprimoramento, com o uso de reagentes menos agressivos ao meio ambiente, e à obtenção de intermediários mais estáveis. As variações no posicionamento dos grupos diacetilênicos e no comprimento das cadeias produziram bicamadas com diferentes propriedades físico-químicas. Os lipossomas polimerizados apresentaram-se mais estáveis que os monoméricos. A redução das insaturações do polímero conjugado mostrou-se factível através da reação com diimida. A capacidade de encapsulamento de drogas hidrofílicas nas estruturas formadas com os fosfolipídios puros foi avaliada usando-se o tuberculostático isoniazida.

Palavras-chave: *fosfatídeos, acetileno, lipossomos, polímeros.*

ABSTRACT

Development of liposome applications has been limited by lipid bilayer instability, mainly for *in vivo* applications. Polymerizable lipids leads to more stable liposomes after polymerization process, which represents a promising alternative for drug delivery by the oral administration route specially. In this work, diacetylenic polymerizable phospholipids analogous to phosphatidylcholine were synthesized, purified and characterized. Diacetylenic groups were located at different positions in acyl chains with the same length (23 carbon atoms), or located at the same position in acyl chains with different length, generating the following phospholipids: 1,2-bis(heptadeca-10,12-diynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DC_{8,3}PC, *1a*), 1,2-bis(tricosa-4,6-diynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DC_{2,15}PC, *1c*), and 1,2-bis(tricosa-10,12-diynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DC_{8,9}PC, *1b*). Small unilamellar vesicles (SUV) were prepared from pure diacetylenes and polymerized by ultra-violet (UV) radiation. Liposomes were characterized by their lipid contents, hydrodynamic radius, polymerization kinetics and stability in the presence of surfactants. Synthesis of DC_{8,9}PC, the only commercially available and the most used polymerizable diacetylenic phospholipid, was reached, as well as the synthesis of two new molecules, DC_{8,3}PC and DC_{2,15}PC. Innovation introduced in the synthesis process has lead to its improvement by using environmental less aggressive reagents and obtention of more stable intermediate compounds. Changes on diacetylenic group positioning and acyl chain length generated lipid bilayers with different physical-chemical properties. Polymerized liposomes were more stable than the corresponding monomeric liposomes. Insaturations of the polymeric conjugated chain could be reduced by reaction with diimide molecules. The trapping ability of hydrophilic drugs in the lipid aggregates was evaluated for the tuberculostatic isoniazid.

Key-words: *phosphatidylcholines, diacetylene, liposomes, polymer.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	9
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1. Fosfatidilcolinas diacetilênicas.....	11
3.1.1. Síntese.....	12
3.1.2. Polimerização	13
3.1.2.1. Mecanismo da reação.....	13
3.1.2.2. Fatores que influenciam a polimerização.....	14
3.1.2.3. Cromismo dos polímeros diacetilênicos.....	20
3.1.3. Alterações morfológicas das bicamadas de DCPC.....	27
3.1.4. Encapsulação de compostos em lipossomas polimerizados de DCPC.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1. Síntese e caracterização dos fosfolipídios diacetilênicos.....	35
4.1.1. Síntese química.....	35
4.1.1.1. Preparação do ω -bromo-1-(metoximetil)alcanol (2).....	36
4.1.1.2. Preparação do ω -bromo-1-(tetraidropiranyl)alcanol (3).....	37
4.1.1.3. Preparação dos intermediários ω -(metoximetil)-1,3-alcadiinol e ω -(tetraidropiranyl)-1,3-alcadiinol (4).....	37
4.1.1.4. Preparação do 1-(metoximetil)alcadiinol e do 1-(tetraidropiranyl)alcadiinol (5).....	38
4.1.1.5. Preparação do alcadiinol-1 (6).....	39

4.1.1.6. Preparação do ácido alcadiinóico (7).....	39
4.1.1.7. Preparação da fosfatidilcolina diacetilênica (1).....	40
4.1.2. Comportamento de agregação dos fosfolipídios diacetilênicos.....	40
4.2. Preparação e caracterização dos lipossomas polimerizados.....	40
4.2.1. Temperatura de transição de fase dos fosfolipídios diacetilênicos.....	42
4.2.2. Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas.....	42
4.2.3. Quantificação dos fosfolipídios diacetilênicos.....	42
4.2.4. Polimerização dos fosfolipídios diacetilênicos.....	43
4.2.5. Estabilidade dos lipossomas em presença de tensoativos.....	44
4.2.6. Redução das insaturações em lipossomas polimerizados.....	45
4.3. Avaliação da encapsulação de drogas hidrofílicas.....	45
4.3.1. Estabilidade da isoniazida e da pirazinamida frente à radiação UV.....	45
4.3.2. Quantificação da isoniazida.....	46
4.3.3. Encapsulação de isoniazida em lipossomas polimerizados.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. Síntese e Caracterização dos Fosfolipídios Diacetilênicos.....	49
5.1.1. Síntese química.....	49
5.1.1.1. Preparação dos ω -bromo-1-alcânóis protegidos ω -bromo-1-(metoximetil)alcanol (2) e ω -bromo-1-(tetraidropirani)alcanol (3).....	49
5.1.1.2. Preparação dos intermediários ω -(metoximetil)-1,3-alcadiinol e ω -(tetraidropirani)-1,3-alcadiinol (4).....	51
5.1.1.3. Preparação do 1-(metoximetil)alcadiinol e do 1-(tetraidropirani)alcadiinol (5).....	53
5.1.1.4. Preparação do alcadiinol-1 (6).....	55

5.1.1.5. Preparação do ácido alcadiinóico (7).....	56
5.1.1.6. Preparação da fosfatidilcolina diacetilênica (I).....	58
5.1.2. Influência do grupo protetor.....	60
5.1.3. Influência do co-solvente.....	60
5.1.4. Rendimento do processo.....	61
5.1.5. Estabilidade dos intermediários.....	62
5.1.6. Comportamento de agregação dos fosfolípidios diacetilênicos.....	62
5.2. Preparação e Caracterização dos Lipossomas Polimerizados.....	65
5.2.1. Temperatura de transição de fase.....	65
5.2.2. Cinética de polimerização dos fosfolípidios diacetilênicos.....	67
5.2.3. Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas.....	73
5.2.4. Estabilidade dos lipossomas em presença de tensoativo.....	77
5.2.4.1. Tensoativo C ₁₂ E ₅ (polioxietileno-5-lauril éter).....	78
5.2.4.2. Tensoativo taurocolato de sódio.....	83
5.2.4.3. Tensoativo Triton X-100.....	85
5.2.5. Redução das insaturações em lipossomas poliméricos de DC _{8,9} PC.....	89
5.3. Avaliação da Capacidade de Encapsulação	92
5.3.1. Influência da posição das insaturações na eficiência de encapsulação.....	95
5.3.2. Influência da extensão da polimerização sobre a capacidade de encapsulação.....	99
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	103

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ANEXO 1: Espectro de Emissão da Lâmpada UV.....	117
ANEXO 2: Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (^1H -RMN e ^{13}C -RMN) e Espectros de Infravermelho (I.V.) dos Fosfolipídios Diacetilênicos Sintetizados.....	121
ANEXO 3: Termogramas Obtidos para as Suspensões de Lipossomas Preparadas com Fosfolipídios Diacetilênicos.....	129

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.1:** Estrutura das fosfatidilcolinas diacetilênicas DC_{8,9}PC, DC_{8,3}PC e DC_{2,15}PC sintetizadas neste trabalho, relacionando os subíndices “m” e “n” da sigla DC_{m,n}PC com o número de grupos metileno nas cadeias acila entre o diacetileno e o carbono carboxílico, e entre o diacetileno e o grupo metila terminal.....6
- Esquema 3.1:** Lipídios diacetilênicos naturais recentemente isolados: ácidos 12,14-octadecadiinóico e triglicerídeo derivado..... 11
- Esquema 3.2:** Reação de polimerização de compostos diacetilênicos..... 13
- Esquema 3.3:** Representação do termocromismo e reversibilidade cromática de filmes poliméricos monomoleculares do ácido 10,12-pentacosadiinóico.... 23
- Esquema 3.4:** Representação das moléculas de PDA e de PDATAZ; e ilustração da rede de ligações de hidrogênio formada entre moléculas de PDATAZ e BA na interface ar-água..... 25
- Esquema 4.1:** Síntese dos fosfolipídios diacetilênicos DC_{8,3}PC (*1a*), DC_{8,9}PC (*1b*) e DC_{2,15}PC (*1c*).....36
- Esquema 4.2:** Estrutura molecular do ácido etanosulfônico 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina (tampão Hepes)..... 41
- Esquema 5.1:** Reação de proteção dos ω-bromoalcanóis com os grupos protetores MOM e THP..... 49
- Esquema 5.2:** Reação de monoalquilação para a preparação dos intermediários ω-(metoximetil)-1,3-alcadiinol e ω-(tetraidropiranyl)-1,3-alcadiinol (*4*)..... 51
- Esquema 5.3:** Reação de alquilação do diino terminal para a preparação dos intermediários *5*..... 53

Esquema 5.4: Reação de desproteção da hidroxila para a preparação dos álcoois 6	55
Esquema 5.5: Reação de oxidação dos álcoois 6 para a preparação dos ácidos carboxílicos diacetilênicos 7	56
Esquema 5.6: Reação de esterificação dos ácidos 7 à glicerofosforilcolina para a preparação das fosfatidilcolinas diacetilênicas 1	58
Esquema 5.7: Reação de geração da diimida a partir da hidrazina.....	91
Esquema 5.8: Reação de redução de olefinas em presença de diimida.....	91
Esquema 5.9: Estrutura molecular dos compostos isoniazida e pirazinamida, ambos utilizados no tratamento da tuberculose.....	92

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1:** Histerese de fotossensibilidade para bicamadas lipídicas de DC_{8,9}PC.....16
- Figura 3.2:** Modelos representativos de prováveis polímeros de DCPC:
(a) linear, e (b) ramificado.....20
- Figura 3.3:** Efeito do empacotamento coplanar e não-coplanar de PDA, PDATAZ e da mistura de ambos em monocamadas sobre a polimerização e propriedades cromáticas.....26
- Figura 3.4:** Modelo de cadeia polimérica em zigue-zague para explicar as propriedades cromáticas de filmes polidiacetilênicos devido à prolongada exposição à radiação UV.....26
- Figura 3.5:** Ilustração da formação de túbulo a partir de lipossoma preparado com DCPC.....28
- Figura 3.6:** Comportamento de fase de DC_{8,9}PC em função da estrutura morfológica inicial e da temperatura.....29
- Figura 4.1:** Representação esquemática da camisa de resfriamento usada para irradiação da suspensão de lipossomas.....43
- Figura 5.1:** Isotermas de compressão dos fosfolípidios diacetilênicos DC_{8,9}PC, DC_{8,3}PC e DC_{2,15}PC, a 23°C.....64
- Figura 5.2:** Espectros de UV/vis de suspensão de lipossomas de DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids) 1mM em tampão Hepes 10mM (pH7,4), irradiada por exposição direta à luz UV (lâmpada: Germetec – mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W) durante 120 minutos, a 5cm da lâmpada, e sob temperatura de 4°C.....68

- Figura 5.3:** Espectros de UV/vis de suspensão de lipossomas de DC_{8,3}PC (*1a*) 1,1mM em tampão Hepes 10mM (pH7,4), irradiada por exposição direta à luz UV (lâmpada: Germetec – mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W) durante 120 minutos, a 5cm da lâmpada e sob temperatura de 4°C.....69
- Figura 5.4:** Espectros de UV/vis de suspensão de lipossomas de DC_{2,15}PC (*1c*) 0,6mM em tampão Hepes 10mM (pH7,4), irradiada por exposição direta à luz UV (lâmpada: Germetec – mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W) durante 120 minutos, a 5cm da lâmpada e sob temperatura de 4°C.....70
- Figura 5.5:** Curvas de diferença de absorvância ($A-A_0$) a $\lambda=476\text{nm}$ em função do tempo de irradiação de suspensão de lipossomas de DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids), DC_{2,15}PC (*1c*) e DC_{8,3}PC (*1a*) em tampão Hepes 10mM (pH7,4), irradiada por exposição direta à luz UV (lâmpada: Germetec – mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W) durante 5,5 horas, a 5cm da lâmpada e sob temperatura de 4°C.....71
- Figura 5.6:** Aspecto das suspensões 1mM de lipossomas monoméricos de DC_{8,9}PC (1), e de lipossomas poliméricos de DC_{2,15}PC (2), DC_{8,9}PC (3) e DC_{8,3}PC (4) em tampão Hepes 10mM pH7,4.....72
- Figura 5.7:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C₁₂E₅ para lipossomas de DC_{8,9}PC (0,8mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).....79
- Figura 5.8:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C₁₂E₅ para lipossomas de DC_{8,9}PC (1,0mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 6 horas com luz UV (“poliméricos”).....79
- Figura 5.9:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C₁₂E₅ para lipossomas de DC_{8,3}PC (1,1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).....80

- Figura 5.10:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C_{12}E_5 para lipossomas de $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ (1,1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).....81
- Figura 5.11:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C_{12}E_5 para lipossomas de $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ (1,0mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 6 horas com luz UV (“poliméricos”).....81
- Figura 5.12:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de $\text{DC}_{8,3}\text{PC}$ (1,1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”)..... 83
- Figura 5.13:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ (0,8mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).....84
- Figura 5.14:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ (0,7mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).....84
- Figura 5.15:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ (0,8mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).....86
- Figura 5.16:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ (1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 6 horas com luz UV (“poliméricos”).....87
- Figura 5.17:** Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas

de DC_{8,3}PC (1,1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).....88

Figura 5.18: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de DC_{2,15}PC (0,7mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).....88

Figura 5.19: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de DC_{2,15}PC (1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 6 horas com luz UV (“poliméricos”).....89

Figura 5.20: Espectros de UV/vis da solução tampão Hepes10mM pH7,4, da suspensão de lipossomas poliméricos de DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids) 1mM em tampão, e dos meios reacionais compostos por esta suspensão de lipossomas mais: hidrazina; hidrazina e CuCl₂; e hidrazina, CuCl₂ e peróxido de hidrogênio, após agitação sob 37°C±2°C por uma noite.....90

Figura 5.21: Espectros de UV/vis do tampão Hepes 10mM (pH7,4), e das soluções aquosas de isoniazida e de pirazinamida em tampão Hepes 10mM (pH7,4), não irradiadas e irradiadas com luz UV (lâmpada Germetec), a 5cm de distância da lâmpada, sob temperatura de 4°C durante 2 horas.....93

Figura 5.22: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{8,9}PC 5mM em tampão com $[D/L]_0=3,33$96

Figura 5.23: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{8,9}PC 5mM em tampão com $[D/L]_0=6,66$97

Figura 5.24: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{8,9}PC 5mM em tampão com $[D/L]_0=26,67$97

- Figura 5.25:** Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{2,15}PC 5mM em tampão com $[D/L]_0=2,91$98
- Figura 5.26:** Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{2,15}PC 5mM em tampão com $[D/L]_0=5,81$98
- Figura 5.27:** Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 6 horas) de DC_{8,9}PC 5mM em tampão com $[D/L]_0=6,66$100
- Figura 5.28:** Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 6 horas) de DC_{2,15}PC 5mM em tampão com $[D/L]_0=5,81$100
- Figura 5.29:** Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (“field emission scanning electron micrography”-FESEM) de lipossomas de DC_{2,15}PC polimerizados por irradiação com luz UV durante 2 horas, liofilizados e reidratados, com $[D/L]_0=0$102
- Figura A1:** Espectro de emissão da lâmpada UVC Germetec mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W.....119
- Figura A2.1:** Espectro de ¹H-RMN do fosfolípido diacetilênico DC_{8,9}PC (*1b*) sintetizado.....123
- Figura A2.2:** Espectro de ¹³C-RMN do fosfolípido diacetilênico DC_{8,9}PC (*1b*) sintetizado.....123
- Figura A2.3:** Espectro de ¹H-RMN do fosfolípido diacetilênico DC_{8,3}PC (*1a*) sintetizado.....124

Figura A2.4: Espectro de ^{13}C -RMN do fosfolipídio diacetilênico $\text{DC}_{8,3}\text{PC}$ (<i>1a</i>) sintetizado.....	124
Figura A2.5: Espectro de ^1H -RMN do fosfolipídio diacetilênico $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ (<i>1c</i>) sintetizado.....	125
Figura A2.6: Espectro de ^{13}C -RMN do fosfolipídio diacetilênico $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ (<i>1c</i>) sintetizado.....	125
Figura A2.7: Espectro de I.V. do fosfolipídio diacetilênico $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ (<i>1b</i>) sintetizado.....	126
Figura A2.8: Espectro de I.V. do fosfolipídio diacetilênico $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ (<i>1c</i>) sintetizado.....	126
Figura A2.9: Espectro de I.V. do fosfolipídio diacetilênico $\text{DC}_{8,3}\text{PC}$ (<i>1a</i>) sintetizado.....	127
Figura A3.1: Termograma de aquecimento (microDSC) obtido para suspensão monomérica de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ em tampão Hepes 10mM pH7,4.....	131
Figura A3.2: Termograma de aquecimento (microDSC) obtido para suspensão polimérica de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ em tampão Hepes 10mM pH7,4.....	131
Figura A3.3: Termograma de aquecimento (microDSC) obtido para suspensão polimérica de $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ em tampão Hepes 10mM pH7,4.....	132
Figura A3.4: Termograma de aquecimento (DSC) obtido para suspensão monomérica de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ em tampão Hepes 10mM pH7,4.....	133
Figura A3.5: Termograma de resfriamento (DSC) obtido para suspensão monomérica de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ em tampão Hepes 10mM pH7,4.....	133
Figura A3.6: Termograma de aquecimento (DSC) obtido para suspensão monomérica de $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ em tampão Hepes 10mM pH7,4.....	134

Figura A3.7: Termograma de resfriamento (DSC) obtido para suspensão monomérica de DC_{2,15}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.....134

Figura A3.8: Termograma de aquecimento (DSC) obtido para suspensão monomérica de DC_{8,3}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.....135

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1:** Reagentes e suas quantidades utilizados na reação de redução do polímero obtido pela irradiação dos fosfolipídios diacetilênicos DC_{8,9}PC previamente agregados em lipossomas.....45
- Tabela 5.1:** Comparação dos rendimentos obtidos para a preparação de alguns dos compostos intermediários 4 e 5 conforme o co-solvente utilizado (HMPA ou DMPU).....61
- Tabela 5.2:** Temperaturas de transição de fase (T_c) para os fosfolipídios diacetilênicos, através de calorimetria de varredura diferencial (DSC) e de microcalorimetria de varredura diferencial (microDSC). Os dados foram obtidos para suspensões monoméricas, e para ciclo de aquecimento exceto onde especificado o contrário.....66
- Tabela 5.3:** Efeito da estocagem sob refrigeração sobre o tamanho dos lipossomas monoméricos e poliméricos preparados com o fosfolipídio diacetilênico DC_{8,3}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.....74
- Tabela 5.4:** Efeito da estocagem sob refrigeração sobre o tamanho dos lipossomas monoméricos e poliméricos preparados com o fosfolipídio diacetilênico DC_{2,15}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.....74
- Tabela 5.5:** Efeito da estocagem sob refrigeração sobre o tamanho dos lipossomas monoméricos e poliméricos preparados com o fosfolipídio diacetilênico DC_{8,9}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4 (superíndices iguais, à esquerda dos valores dos diâmetros, indicam se tratar da mesma amostra).....75
- Tabela 5.6:** Efeito dos ciclos de congelamento e descongelamento (20ciclos) entre as etapas de hidratação do filme lipídico e extrusão da suspensão lipídica, durante a preparação dos lipossomas, sobre o tamanho dos lipossomas monoméricos e poliméricos de DC_{8,9}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.....77
- Tabela 5.7:** Tamanho das partículas nas suspensões de lipossomas em tampão Hepes 10mM pH7,4 antes da liofilização, e após a reidratação dos

lipossomas liofilizados com tampão Hepes 10mM pH7,4, determinado por espalhamento de luz quasi-elástico (QLS). Os lipossomas polimerizados foram irradiados por 2 horas com luz UV.....94

Tabela 5.8: Efeito do tempo de irradiação (2 horas ou 6 horas) sobre o tamanho das partículas após a reidratação dos lipossomas liofilizados com tampão Hepes 10mM pH7,4, determinado por espalhamento de luz quasi-elástico (QLS).....101

NOMENCLATURA

λ : comprimento de onda da radiação eletromagnética (nm)

BA: ácido barbitúrico

Br-MOM: brometo de metoxi-metila

BTMSBD: 1,4-bis(trimetilsilil)butadiino

CCD: cromatografia em camada delgada

CF: carboxifluoresceína

CMC: concentração micelar crítica

^{13}C -RMN: espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono

DCC: dicicloexilcarbodiimida

DCPC: fosfatidilcolina diacetilênica (*diacetylenic phosphatidylcholine*)

DC_{m,n}PC: fosfatidilcolina diacetilênica, onde o subíndice “m” indica o número de grupos metileno presentes na cadeia proximal (entre o grupo diacetileno e o carbono carboxílico), e o subíndice “n” indica o número de grupos metileno na cadeia distal (entre o grupo diacetileno e a metila terminal).

DHP: diidropirano

DIC: diisopropilcarbodiimida

DIPEA: diisopropiletilamina

[D/L]: relação molar droga:lipídio

DMAP: dimetilaminopiridina

DMF: dimetilformamida

DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina

DMPU: *N,N*-dimetilpropileneuréia

DNPC: 1,2-dinonanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

DRV: vesículas obtidas por desidratação e reidratação (*dehydration-rehydration vesicles*)

DSC: calorimetria de varredura diferencial

EtOAc: acetato de etila

GPC.CdCl₂: glicerofosforilcolina complexada com cloreto de cádmio

HMPA: hexametilfosforamida

¹H-RMN: espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton

I: intensidade de energia radiante por unidade de área (mW/cm²)

IV: infravermelho

LUV: lipossomas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles*)

MLV: lipossomas multilamelares (*multilamellar vesicles*)

MOM: metoxi-metila

PC: fosfatidilcolina (*phosphatidylcholine*)

PDA: ácido 10,12-pentacosadiinóico (*pentacosadiynoic acid*)

PDATAZ: molécula com duas cadeias de PDA ligadas covalentemente aos grupos amina na posição orto da molécula de triaminotriazina

PDC: dicromato de piridínio

QLS: espalhamento de luz *quasi* elástico (*quasielastic light scattering*)

SUV: lipossomas unilamelares pequenos (*small unilamellar vesicles*)

TAZ: triaminotriazina

T_c : temperatura de transição de fase

T_m : temperatura de transição de fase principal

THF: tetraidrofurano

THP: tetraidropirano

TMS: trimetilsilano

TsOH: ácido *para*-toluenosulfônico

UV: ultravioleta

UV/vis: espectrometria na região do ultravioleta e do visível

1. INTRODUÇÃO

No último século, houve um grande desenvolvimento na tecnologia de obtenção de novos medicamentos, mas o modo de administração das drogas para a terapia de diversas doenças não se desenvolveu significativamente. Desta forma, os compostos terapêuticos ainda são, na sua maioria, administrados ao paciente de maneira arcaica e pouco eficiente, o que geralmente conduz à manifestação de efeitos colaterais indesejáveis.

Desde meados da década de 1960 quando foram descobertos, o campo de utilização dos lipossomas vem crescendo muito, envolvendo aplicações na biofísica e na química (catálise, separação e purificação, bioeletrônica, fotossíntese, reconstituição de proteínas e estudo de membranas celulares), na farmacologia e na medicina (administração de drogas e vacinas, diagnósticos *in vitro*), na cosmética, na engenharia genética (como veículos para introdução de ácidos nucleicos nas células) e na indústria de alimentos (Lasic, 1993).

Lipossomas, ou vesículas lipídicas, são estruturas ocas nas quais o volume aquoso central é completamente circundado por uma membrana composta de lipídios (normalmente, fosfolipídios e colesterol), podendo apresentar diâmetros da ordem de dezenas de nanômetros a dezenas de micra. Por consistirem de uma parte polar ou cabeça hidrofílica (grupo fosfato), ligada a uma cauda hidrofóbica apolar (geralmente formada por duas cadeias longas de ácidos graxos), os fosfolipídios exibem propriedades anfifílicas e tendem a agregar-se em estruturas ordenadas acima de uma concentração crítica. A estrutura em bicamadas, característica dos lipossomas, confere-lhes a capacidade de alojamento de substâncias de natureza hidrofílica, hidrofóbica ou anfifílica, bem como a permeação de compostos hidrofílicos encapsulados através da membrana lipídica (Ostro, 1987a; Lasic, 1992).

Os lipossomas fazem parte dos sistemas de liberação controlada de medicamentos da medicina moderna ao lado dos hidrogéis e “patches” tópicos, dentre outros. Destacam-se entre as demais macromoléculas empregadas como veículos de administração de drogas, tais como os copolímeros sintéticos, os polissacarídeos, os poliânions e os anticorpos, por mimetizarem a membrana

celular e interagirem mais efetivamente com as células. Vários estudos demonstram as aplicações dos lipossomas em doenças que afetam o sistema retículoendotelial e as células sanguíneas, e como veículos para agentes usados na terapia de câncer. Além disso, formulações de lipossomas contendo agentes antivirais, anti-malária, anti-inflamatórios, anti-fúngicos, antibióticos, prostaglandinas, esteróides e broncodilatadores têm sido pesquisadas com resultados promissores nos últimos anos (Ranade, 1989).

Vários grupos de pesquisa demonstraram em estudos pré-clínicos a potencialidade do uso de diferentes drogas encapsuladas em lipossomas na terapia de diversas doenças, entre elas a leishmaniose, a artrite e especialmente o câncer (Ostro, 1987a; Ostro, 1987b; Lasic, 1992; Lasic e Martin, 1995). O projeto racional de vesículas contendo drogas ou vacinas encapsuladas aliado ao avanço recente na tecnologia de lipossomas culminou no desenvolvimento de diversas formulações injetáveis já comercializadas.

A utilização de sistemas de liberação controlada para a administração de medicamentos vem recebendo cada vez mais atenção em anos recentes. Os principais motivos desse interesse são a possibilidade de agentes biologicamente ativos serem administrados de uma forma mais segura e eficaz, aumentando o índice terapêutico de medicamentos (razão entre a eficiência da droga e seus efeitos colaterais indesejáveis) e, em alguns casos, permitir o desenvolvimento de novas terapias, bem como a crescente verificação de que o padrão de oferta da droga (contínua ou em pulsos) é um importante fator na resposta à terapia. Por outro lado, os elevados custos do desenvolvimento de novas drogas (acima de 150 milhões de dólares) frente aos custos do desenvolvimento de veículos para a administração de drogas já existentes tornam os sistemas de liberação controlada muito atrativos. (Langer, 1990).

O projeto e preparação de lipossomas para a administração de medicamentos é um campo essencialmente interdisciplinar, onde as contribuições das áreas médica, farmacológica, química e engenharia química são fundamentais, dentre outras, para a produção de veículos cuja ação seja efetiva na terapia utilizada.

Apesar do número significativo de trabalhos de pesquisas, o desenvolvimento de lipossomas para aplicações farmacêuticas tem sido lento pelo fato dos lipossomas convencionais ainda apresentarem limitações, principalmente relativas à sua incipiente estabilidade em meios fisiológicos e ao seu rápido reconhecimento pelo sistema imunológico (Haumann, 1995; Talsma e Crommelin, 1993). Além disso, eles são limitados à administração parenteral, uma vez que na administração oral os lipossomas não resistem à ação dos sais biliares e das enzimas fosfolipases presentes no sistema digestivo (Regen, 1987).

A estabilidade dos lipossomas está associada às interações com os componentes do meio, os quais tendem a ser adsorvidos na superfície ou penetrar na bicamada lipídica, desestabilizando-a. Em consequência disso, há a perda da droga encapsulada devido ao rompimento parcial ou total da sua estrutura (Talsma e Crommelin, 1993).

Devido ao rápido reconhecimento dos lipossomas pelas células de macrófagos, o seu tempo de vida na circulação sanguínea é muito curto, ocorrendo acúmulo dos lipossomas em órgãos do sistema retículoendotelial, principalmente fígado e baço (Haumann, 1995; Woodle et al., 1994). Esta limitação foi contornada pela incorporação na superfície das vesículas de monômeros lipídicos contendo cabeças polares derivatizadas com polímeros. Dentre os polímeros usados, o polietilenoglicol foi o que apresentou melhores resultados. (Woodle e Lasic, 1992; Woodle et al., 1992) Os lipossomas assim produzidos apresentam meia-vida de aproximadamente 24 horas no sistema circulatório, sendo denominados de lipossomas evasivos ou “stealth liposomes”. Mais recentemente, outros polímeros anfipáticos, como o poli(2-metil-2-oxazolina) e poli(2-etil-2-oxazolina) conduziram a bons resultados, mas as suas toxicidades ainda não foram determinadas (Woodle et al., 1994).

Lipossomas com a superfície modificada com polietilenoglicol não só resistem ao ataque de proteínas e, conseqüentemente, de macrófagos, mas também são mais estáveis em presença de moléculas pequenas como às de tensoativos não iônicos. (Ribas, 1993). Apesar da maior estabilidade alcançada com os lipossomas “stealth” nas aplicações por via intravenosa, a bicamada lipídica ainda é muito

frágil para resistir às agressões dos componentes do meio digestivo e trato intestinal nas aplicações por via oral.

Dentro desse contexto, os lipossomas polimerizados compõem uma classe relativamente nova de vesículas de fosfolípidios, cujos resultados sobre a sua maior estabilidade *in vivo* em administração por via oral têm sido promissores, quando comparados com lipossomas convencionais (Regen, 1987).

O estudo sobre a produção e caracterização de lipossomas polimerizados desenvolveu-se a partir do final da década de 1970 e início da década de 1980 (Day et al., 1979; Johnston et al., 1980; Hub et al., 1980; Kunitake et al., 1981), sendo que atualmente esta área vem recebendo atenção crescente devido às suas potencialidades. As aplicações desses lipossomas para a liberação controlada de medicamentos têm conduzido à bons resultados, embora ainda sejam escassos os trabalhos neste campo.

Existe uma grande variedade de lípidios polimerizáveis, sendo na sua maioria sintéticos ou semi-sintéticos. Conforme o monômero polimerizável empregado, a ligação polimérica pode ocorrer em diferentes regiões da membrana do lipossoma (Ringsdorf et al., 1988; Regen, 1987). Entre os monômeros mais amplamente utilizados estão os lípidios análogos aos fosfolípidios naturais. Estes lípidios normalmente contém algum dos seguintes grupos polimerizáveis: 1,3-butadieno, 1,3,5-hexatrieno, 1,3-butadieno (diacetileno), metacrilato, tiol, lipoiloxi ou estireno, que são introduzidos nas cadeias de ácido graxo ou na cabeça polar dos monômeros (Regen, 1987; Lasic, 1993; Blume, 1991).

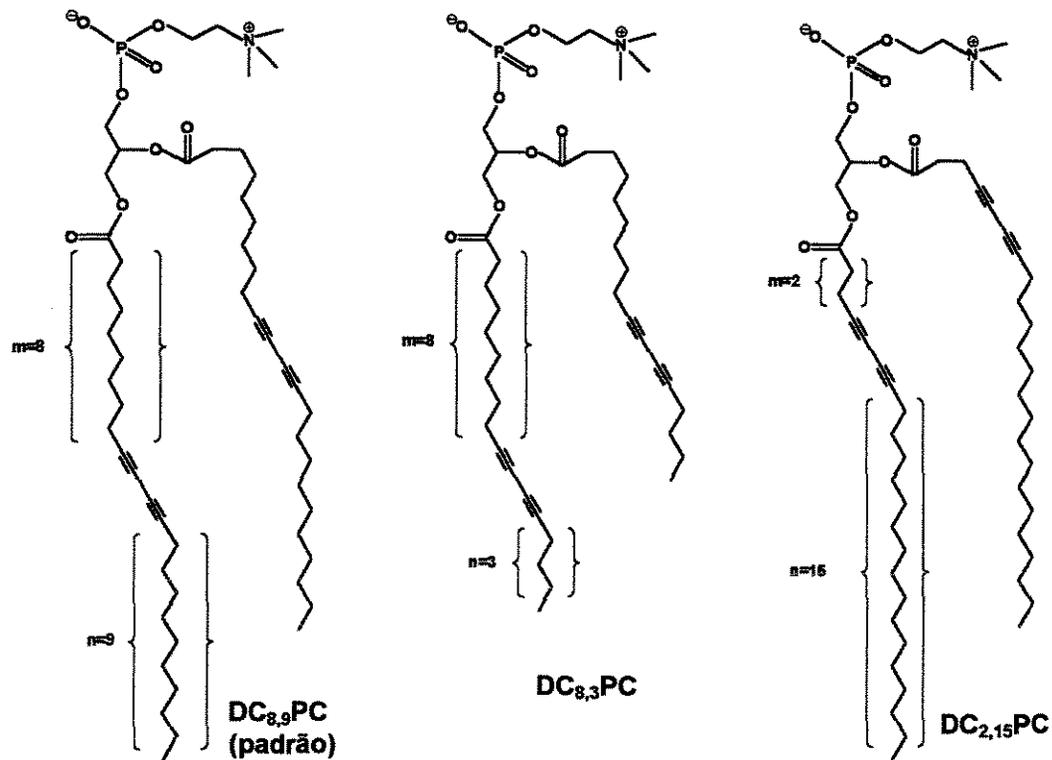
A presença de grupos diacetilênicos nas cadeias dos fosfolípidios produz ligações cruzadas quando polimerizados, originando bicamadas mais resistentes quando comparadas àquelas obtidas com os correspondentes dienos ou trienos. A posição dos grupos polimerizáveis na cadeia dos fosfolípidios produz alterações significativas nas propriedades resultantes da bicamada lipídica, muitas das quais ainda não se encontram caracterizadas. Um outro aspecto ainda não explorado na literatura é a possibilidade de se incrementar ainda mais a estabilidade da bicamada lipídica pela redução das insaturações remanescentes após a polimerização. Nesse caso a rede polimérica estaria teoricamente menos

susceptível ao ataque do meio ácido existente no estômago e dos componentes do plasma sanguíneo, minimizando-se também a degradação dos fosfolípidios por reações de oxidação.

Os lipossomas polimerizados oferecem maior estabilidade *in vitro* e *in vivo* devido à sua menor propensão aos processos de troca, remoção direta e transferência líquida de lípidios, à perda descontrolada da droga e à fusão lipossoma-lipossoma e lipossoma-célula (Regen, 1987). Os estudos sobre a aplicação farmacêutica de lipossomas polimerizados são recentes e ainda escassos; porém, a maior estabilidade dos lipossomas polimerizados em relação aos convencionais e a versatilidade de lípidios polimerizáveis, têm conduzido a relevantes pesquisas principalmente para a administração de medicamentos encapsulados (Okada et al., 1995; Chen et al., 1996a; Chen et al., 1996b), para o transporte de oxigênio *in vivo* (Hayward et al., 1985) e para o recobrimento de superfícies visando aumentar sua biocompatibilidade (Hall et al., 1989; Chapman e Charles, 1992; Von Segesser et al., 1999). Os lípidios diacetilênicos dispostos em membranas artificiais também vêm sendo estudados como biosensores, principalmente no desenvolvimento de sistemas para diagnósticos, graças às alterações colorimétricas possibilitadas com a polimerização (Charych e Nagy, 1996; Cabral, 2000). Lípidios diacetilênicos também são potencialmente úteis na obtenção de materiais especiais, por exemplo aqueles gerados pela metalização da superfície de microtubos (Singh et al., 1995), e na obtenção de padrões para impressão com alta resolução (escala nanométrica) em metais (Chan et al., 1995).

Este trabalho representa uma contribuição ao estudo dos lipossomas polimerizados, no qual foram realizados o estudos da síntese de fosfolípidios polimerizáveis, preparação e caracterização dos lipossomas, abordando os aspectos da cinética de polimerização e estabilidade em presença de tensoativos, e avaliação da capacidade de encapsulamento de drogas hidrofílicas. Os lípidios polimerizáveis sintetizados foram: 1,2-bis(heptadeca-10,12-diinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DC_{8,3}PC, **1a**) e 1,2-bis(tricosa-4,6-diinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DC_{2,15}PC, **1c**), inéditos na literatura, além do fosfolípido diacetilênico mais amplamente estudado e disponível comercialmente 1,2-

bis(tricoso-10,12-diinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina ($DC_{8,9}PC$, **1b**), tomado como referência (Esquema 1.1). Lipossomas polymerizados foram preparados com os três fosfolipídios sintetizados, e os efeitos do posicionamento do grupo diacetileno ao longo das cadeias dos ácidos carboxílicos e do tamanho das cadeias acila foram estudados com relação ao raio hidrodinâmico das vesículas, à cinética de polimerização e à estabilidade em presença de tensoativos. A capacidade de encapsulamento de drogas hidrofílicas foi avaliada com o composto terapêutico isoniazida, pela técnica da liofilização e reidratação das vesículas.



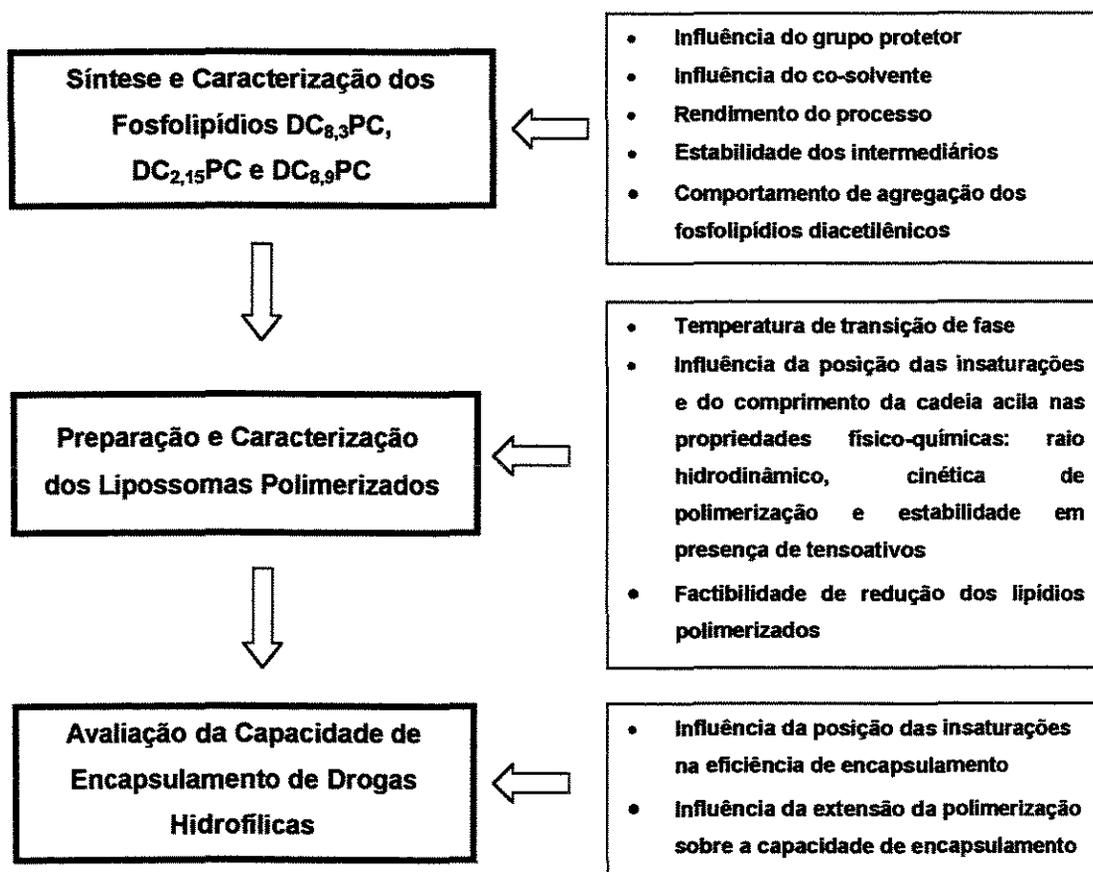
Esquema 1.1. Estrutura das fosfatidilcolinas diacetilênicas $DC_{8,9}PC$, $DC_{8,3}PC$ e $DC_{2,15}PC$ sintetizadas neste trabalho, relacionando os subíndices “m” e “n” da sigla $DC_{m,n}PC$ com o número de grupos metileno nas cadeias acila entre o diacetileno e o carbono carboxílico, e entre o diacetileno e o grupo metila terminal.

A redução das insaturações das cadeias poliméricas dos fosfolipídios diacetilênicos agregados em lipossomas, inédita na literatura, foi conduzida através da reação com o composto diimida, gerado *in situ* a partir do reagente hidrazina. Esta redução foi realizada visando aumentar ainda mais a estabilidade da bicamada e simultaneamente diminuir a permeabilidade da membrana aos compostos encapsulados.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é contribuir para o desenvolvimento do processo de produção de lipossomas polimerizados, através do estudo da síntese dos fosfolipídios diacetilênicos 1,2-bis(heptadeca-10,12-diinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DC_{8,3}PC), 1,2-bis(tricosa-4,6-diinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DC_{2,15}PC) e 1,2-bis(tricosa-10,12-diinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (DC_{8,9}PC), e da preparação e caracterização de lipossomas polimerizados com os lipídios sintetizados, visando a aplicação desses lipossomas na administração de medicamentos.

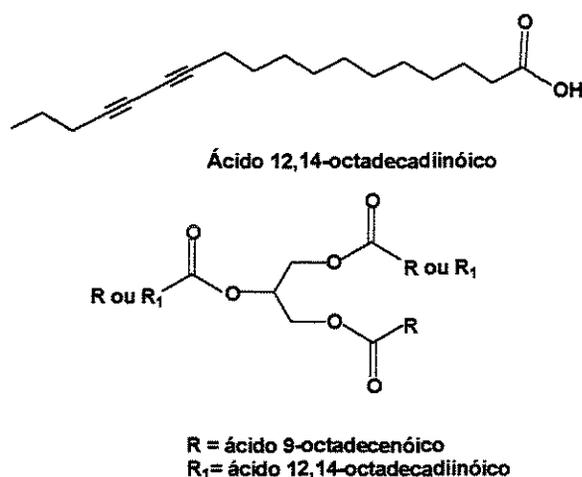
Os aspectos estudados em cada etapa e as suas interrelações são apresentados no diagrama abaixo:



3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Fosfatidilcolinas Diacetilênicas

As fosfatidilcolinas diacetilênicas são moléculas lipídicas que, até onde se sabe, não ocorrem na natureza. Elas são preparadas a partir de síntese química (Johnston et al., 1980), sendo que diferentes fosfatidilcolinas diacetilênicas têm sido sintetizadas (Blume, 1991). Por outro lado, existe na literatura relato da recuperação de fosfolípidios e glicolípidios diacetilênicos a partir da cultura da bactéria *Acholeplasma laidlawii* em meio contendo ácido carboxílico diacetilênico sintético, indicativo da possibilidade da obtenção de fosfatidilcolinas diacetilênicas pela via biossintética (Leaver et al., 1982). Ácidos carboxílicos diacetilênicos e glicerídeos diacetilênicos são de ocorrência rara na natureza. Recentemente Santos e Cavalheiro (2000) isolaram dois desses compostos a partir do óleo da semente de *Porcelia macrocarpa*: o ácido 12,14-octadecadiinóico e um triglicerídeo dele derivado (Esquema 3.1).



Esquema 3.1: Lipídios diacetilênicos naturais recentemente isolados: ácidos 12,14-octadecadiinóico e triglicerídeo derivado (Fonte: Santos e Cavalheiro, 2000).

Em relação à interação de fosfatidilcolinas diacetilênicas com sistemas biológicos, estudos indicaram que as fosfatidilcolinas diacetilênicas agregadas em lipossomas monoméricos ou polimerizados não são trombogênicas (Hayward e

Chapman, 1984; Hayward et al., 1985; Chapman e Charles, 1992). Mais recentemente, testes *ex-vivo* realizados com filmes de DCPC monoméricos e polimerizados recobrando superfícies expostas ao sangue apresentaram tromborresistência tão boa ou superior àquela obtida quando heparina foi utilizada no recobrimento da mesma superfície, demonstrando a biocompatibilidade das fosfatidilcolinas diacetilênicas (Von Segesser et al., 1994).

3.1.1 Síntese

Johnston et al. (1980) foram os primeiros a descrever a síntese química e a polimerização de fosfatidilcolinas diacetilênicas ($DC_{8,9}PC$ e $DC_{8,11}PC$). Sua rota sintética é baseada em um acoplamento assimétrico de Chodkiewicz (Chodkiewicz e Cadiot, 1955) entre um 1-iodoalcino e um ácido alcinóico para a geração do ácido diacetilênico (ou diinóico) desejado. Este composto é convertido ao seu anidrido pela adição de dicitloexilcarbodiimida (DCC). Posteriormente, o anidrido é submetido à reação com glicerofosfatidilcolina complexada com cloreto de cádmio, em presença de dimetilaminopiridina (DMAP), para a obtenção da fosfatidilcolina diacetilênica. O método desenvolvido por Johnston et al. (1980) para a preparação dos ácidos diacetilênicos apresenta como principais desvantagens a necessidade de preparação do 1-iodoalcino, o baixo rendimento para a reação de acoplamento assimétrico de Chodkiewicz quando ácidos alcinóicos de cadeia mais longa são utilizados, e a frequente contaminação dos ácidos diinóicos assimétricos por ácidos diacetilênicos simétricos (Xu et al., 1991).

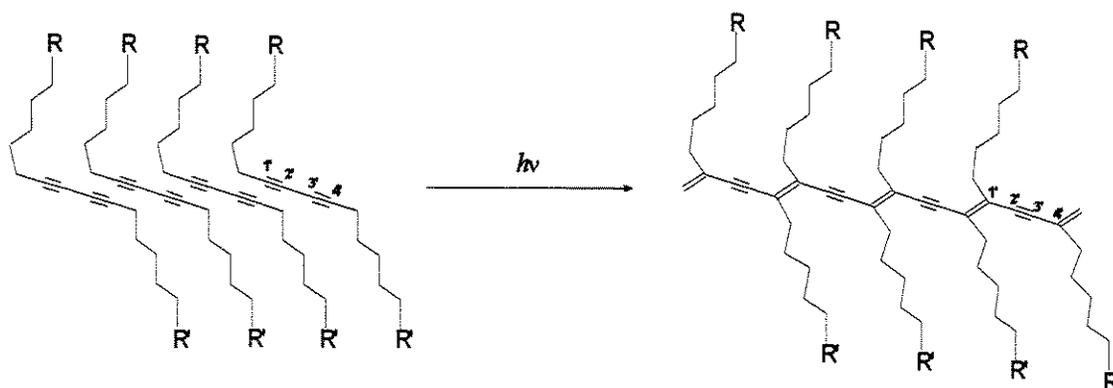
Uma segunda e mais direta rota sintética para a obtenção de ácidos graxos diacetilênicos foi proposta em 1991 por Xu et al.. Esta metodologia envolve alquilações sequenciais dos átomos de carbono 1 e 4 do composto 1,4-bis(trimetilsilil)butadiino (BTMSBD) com haletos de alquila adequados. Através desta rota sintética, os autores prepararam quatro isômeros posicionais do ácido octadecadiinóico, além dos ácidos 12,14-pentacosadiinóico e 12,14-heptacosadiinóico, todos com bons rendimentos. O método proporciona a obtenção dos ácidos diacetilênicos – etapa mais crítica da síntese dos fosfolípidios diacetilênicos - de uma forma mais simples e com rendimentos bastante

adequados, tornando-se ainda mais atraente pelo fato do composto 1,4-bis(trimetilsilil)butadiino ser comercialmente disponível (Aldrich).

3.1.2. Polimerização

3.1.2.1. Mecanismo da reação

A polimerização em estado sólido de compostos diacetilênicos ocorre através de uma reação de adição 1-4 entre o átomo de carbono 1' do grupo diacetilênico de uma molécula com o átomo de carbono 4' do grupo diacetilênico da molécula adjacente, com a formação de uma cadeia polimérica totalmente conjugada, (sempre na forma *trans*), conforme apresentado no Esquema 3.2. Neste esquema é apresentada apenas uma estrutura de ressonância da cadeia polimérica, pois as ligações simples apresentam um certo caráter de dupla ligação. A conjugação da cadeia polimérica é resultante do intercalamento de ligações simples carbono-carbono entre ligações duplas e triplas consecutivas. A polimerização dos monômeros é uma reação topoquímica, podendo ser obtida não só pela irradiação com luz ultravioleta (UV), mas também através do aumento da temperatura (abaixo da temperatura de fusão) ou sob a ação de radiação de alta energia, ou seja, radiações de baixos comprimentos de onda (Wegner, 1977).



Esquema 3.2: Reação de polimerização de compostos diacetilênicos.

Reações topoquímicas, segundo a definição de Wegner (1977), são as reações em que as alterações químicas somente ocorrem quando o sistema está estruturalmente ordenado, com as geometrias e simetrias espaciais relativas às moléculas vizinhas, bem como as possibilidades de aproximação e contato entre os sítios de reação, estritamente limitadas e bem definidas.

3.1.2.2. Fatores que influenciam a polimerização

A definição de reação topoquímica apresentada anteriormente deixa claro que a polimerização dos fosfolípidios diacetilênicos é influenciada pelo empacotamento dos monômeros no interior da bicamada lipídica. Um dos fatores que afetam a reatividade, por influir diretamente no empacotamento dos monômeros, é a estrutura da molécula diacetilênica. A partir de dados de mais de uma centena de diferentes compostos diacetilênicos, Wegner (1977) formulou algumas regras tais como: os substituintes não exercem efeitos indutivos significativos sobre o comportamento da reação; os substituintes volumosos, capazes de impedir uma aproximação adequada (menor que 0,4nm) entre os grupos diacetilênicos, minimizam ou mesmo impossibilitam a ocorrência da reação de polimerização. Isso explica a razão pela qual o composto 1,4-bis(trimetilsilil)butadiino não sofre polimerização (apresenta grupos volumosos ligados aos carbonos 1 e 4). Outras regras estabelecem que anéis aromáticos, tanto na condição de substituintes como também no caso do grupo diacetilênico fazer parte do anel, não interferem na reatividade pelo fato de uma aproximação adequada na direção perpendicular ao plano dos anéis ser possível; e que a possibilidade de formação de pontes de hidrogênio entre os grupos substituintes laterais favorece uma maior reatividade dos monômeros. Por exemplo, os álcoois e os ácidos diacetilênicos rapidamente polimerizam na fase sólida (a formação de pontes de hidrogênio e as interações de Van der Waals aproximam as partes hidrofílicas e hidrofóbicas, respectivamente, das moléculas). Apesar dessas regras e da racionalização da reação de polimerização em termos do posicionamento relativo dos monômeros, a compreensão teórica que se tem a respeito das propriedades do empacotamento das moléculas ainda é insuficiente para se

predizer com exatidão se um determinado composto vai ou não sofrer polimerização sob determinada condição (Wegner, 1977; Baugham e Yee, 1978).

Uma condição necessária para a ocorrência da polimerização dos fosfolípidios diacetilênicos é que as moléculas devem estar no estado sólido cristalino (ou gel), onde os grupos diacetilênicos encontram-se bem emparelhados, resultado da maior ordenação das cadeias acila. Entretanto, esta condição, por si só, não é suficiente para garantir o avanço da reação de polimerização. Johnston et al. (1980) estudaram a polimerização de DC_{8,9}PC disposta em monocamada na interface ar-água (a 7°C, sob N₂), em multicamada sobre suporte hidrofóbico (Teflon), em lipossomas (LUV, MLV, SUV) e, ainda, em discos obtidos pela compressão da mistura de DC_{8,9}PC com KBr. A radiação foi gerada por uma fonte com pico de intensidade de radiação em 254nm (1200μW/cm²; d=15,2cm). Os pesquisadores observaram que a polimerização somente ocorria sob temperaturas inferiores à temperatura de transição de fase (T_c=38,5 °C). A monocamada não apresentou polimerização após irradiação sob temperatura de 7°C. Nos lipossomas grandes (LUV e MLV) constatou-se a polimerização após irradiação a 0°C durante 5 minutos, porém ela não ocorreu para os lipossomas unilamelares pequenos (SUV) sob as mesmas condições. Baseado nesses resultados, pode-se dizer que a reação de polimerização depende não só das moléculas de DCPC estarem na fase gel (T<T_c), como também da forma como elas estão agregadas nesta fase. No caso dos lipossomas, a agregação também é função do tamanho das vesículas, pois a curvatura influencia o empacotamento das moléculas anfifílicas.

A influência do histórico térmico das vesículas é bem caracterizada através das curvas de fotossensibilidade para o DC_{8,9}PC, obtidas por O'Brien, Whitesides e Klingbiel (1981) e apresentadas na Figura 3.1 (Lopez, O'Brien e Whitesides, 1982(ii)). Pode-se observar que a bicamada lipídica preparada sob temperatura inferior à T_c (T_c=40°C) é fotossensível, mas quando aquecida até temperaturas superiores à T_c ela torna-se insensível à radiação UV. Por outro lado, bicamadas produzidas sob temperaturas acima da temperatura de transição de fase do fosfolípido diacetilênico são insensíveis à luz UV. Sua sensibilidade a esta

radiação somente começa a ser recuperada quando se resfria a bicamada até temperaturas próximas de 0°C. Dessa forma fica evidenciada a histerese de fotossensibilidade para as bicamadas preparadas com DC_{8,9}PC.

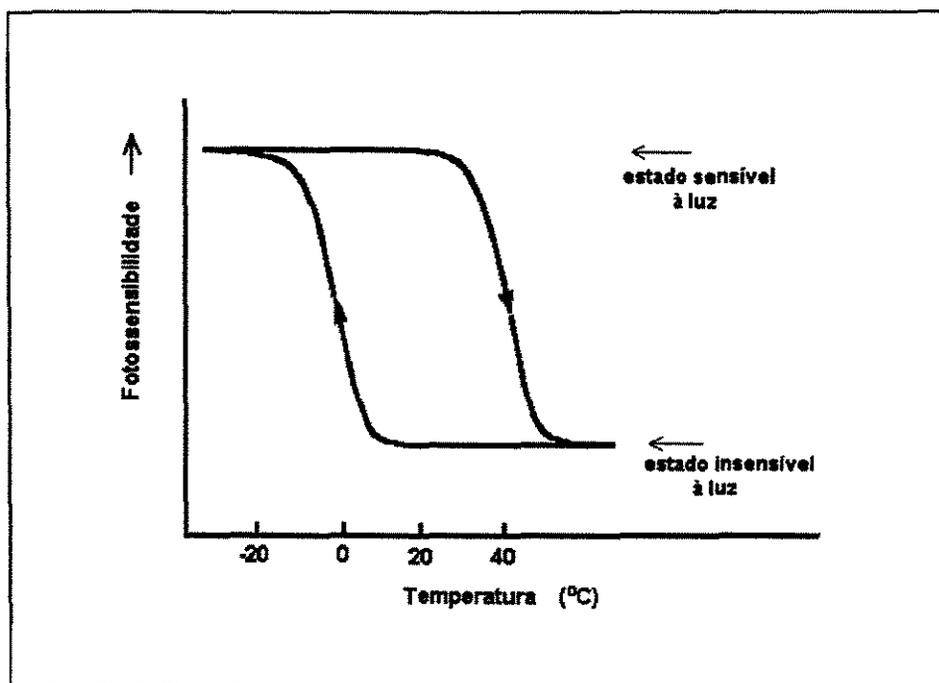


Figura 3.1: Histerese de fotossensibilidade para bicamadas lipídicas de DC_{8,9}PC. (Fonte: Lopez, O'Brien e Whitesides, 1982(ii))

A fotossensibilidade da DC_{8,9}PC foi comparada por Lopez, O'Brien e Whitesides (1982(i)) com a de outros dois lipídios diacetilênicos (um dialquilfosfato e um sal de dialquildimetilamônio). Foi verificada que a eficiência da polimerização do DC_{8,9}PC, sob as condições de maior sensibilidade (máxima intensidade de radiação em 254nm, atmosfera inerte, agregados na forma de vesículas grandes ou bicamadas hidratadas e $T < T_c$), era bem inferior à das outras duas espécies. O polímero obtido para a fosfatidilcolina diacetilênica apresentou coloração vermelha, porém aqueles obtidos para os dois outros compostos apresentaram coloração azul, o que pode indicar uma estrutura polimérica maior

e/ou melhor ordenada (Patel et al., 1978; Patel et al., 1979). Os autores sugerem que a reação de polimerização é sensível à estrutura lipídica e à sua conformação, além da temperatura relativa à T_c e do tamanho e histórico térmico das vesículas (O'Brien, Whitesides e Klingbiel, 1981). Eles se basearam no fato de que as cadeias alquila α e β das moléculas de $DC_{8,9}PC$ dispostas na bicamada não estão posicionadas simetricamente entre si, pois o grupo glicerol do fosfolípido encontra-se disposto perpendicularmente ao plano da bicamada lipídica. Desta forma, o arranjo estereoquímico favorece somente as ligações intermoleculares α - α e β - β . Além disso, a cadeia polimérica formada em cada microrregião da bicamada poderia ser do tipo α ou β , e o crescimento de uma delas tornaria menos adequado o arranjo estereoquímico para o crescimento da outra cadeia polimérica. No caso das moléculas de dialquilfosfato e do sal de dialquildimetilamônio, as cadeias estariam simetricamente dispostas, permitindo uma aproximação mais adequada entre os grupos diacetilênicos, tanto intra quanto intermolecularmente.

Com relação à extensão da polimerização e tipos de cadeias poliméricas obtidos, os resultados apresentados por Johnston et al. (1983) para a $DC_{8,9}PC$ e a $DC_{8,13}PC$ indicaram que fosfatidilcolinas diacetilênicas com cadeias acila idênticas formam cadeias poliméricas mais curtas, que podem ser interconectadas entre si através do glicerol presente nas moléculas de $DCPC$, formando co-polímeros. Por outro lado, fosfatidilcolinas diacetilênicas com cadeias acila mistas derivadas das duas moléculas acima (contendo o grupo diacetilênico em apenas uma delas) originam polímeros lineares mais longos.

No trabalho de Hupfer et al. (1983), foi estudada a polimerização de lipossomas compostos pelo fosfolípido diacetilênico $DC_{8,12}PC$. Quando as vesículas recém-preparadas eram resfriadas até a temperatura ambiente e irradiadas com luz UV (lâmpada de Hg de alta pressão e 240W, a 30 cm de distância, com a amostra em cubeta de 1cm e sob atmosfera de N_2), a polimerização não ocorria. Ela somente aconteceu quando a amostra foi resfriada até a temperatura de $0^\circ C$, bem inferior à T_c ($T_c=51,5^\circ C$ /aquecimento, e $T_c=35^\circ C$ /resfriamento, para o $DC_{8,12}PC$), com a cor da suspensão sendo alterada para vermelho/laranja após a irradiação da amostra por 114 minutos. Foi

verificado, entretanto, que a suspensão de lipossomas recém-preparada e estocada sob temperatura ambiente durante 2 semanas tornou-se susceptível à polimerização sob qualquer temperatura inferior à T_c . Os autores atribuíram essa observação a um possível efeito cinético, demonstrado pelo fato de que o resfriamento das vesículas recém-preparadas até a temperatura ambiente não conduzia à cristalização imediata do sistema, ou melhor, o arranjo das moléculas resultante do resfriamento do sistema e a sua passagem para o estado cristalino ainda não atingia a forma mais ordenada, sendo necessário maior tempo ou resfriamento até 0°C para a necessária agregação.

Os efeitos sobre a polimerização decorrentes do posicionamento do grupo diacetilênico nas cadeias acila, e do tipo de ligação (éster ou éter) destas cadeias ao glicerol foram estudados por Rhodes, Xu e Bittman (1992). Lipossomas preparados a partir do diéster $\text{DC}_{2,10}\text{PC}$ pela hidratação do filme lipídico seco com solução $0,06\text{M}$ KCl , sob temperatura inferior à T_c , sofreram polimerização após irradiação com luz UV ($\lambda=254\text{nm}$), por 1h a 4°C , com sua cor alterando-se para azul. Entretanto, lipossomas preparados com um isômero do $\text{DC}_{2,10}\text{PC}$ contendo o grupo diacetilênico deslocado do carbono $4'$ para o carbono $5'$ da cadeia acila ligada ao carbono α do glicerol, com o isômero diéster $\text{DC}_{8,4}\text{PC}$, ou com o diéter de cadeias acila derivadas dos ácidos 4,6-octadecadiinóico e 5,7-octadecadiinóico, não sofreram polimerização sob as mesmas condições. Como todos os lipídios testados apresentavam cadeias acila com o mesmo número de átomos de carbono (18), ficou demonstrado que a polimerização é dependente tanto da posição do grupo diacetilênico, quanto do tipo de ligação das cadeias acila ao glicerol. Tais variações das moléculas podem ter promovido a interdigitação entre as monocamadas e/ou um desordenamento acentuado, como indicado pelas análises por difração de raios-X de baixo ângulo.

O efeito do tamanho das vesículas sobre a polimerização foi estudado por Peek et al. (1994) através de cromatografia por exclusão de tamanho e de espectrometria de massa, utilizando o fosfolipídio $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$. Lipossomas de tamanhos definidos foram preparados por extrusão através de membranas de 50nm, 100nm, 400nm e 600nm. As suspensões (em água destilada deionizada)

foram resfriadas de 50°C até 25°C, e polimerizadas nesta temperatura pela irradiação em um reator fotoquímico Rayonette durante 5 minutos, obtendo-se suspensões levemente alaranjadas. Quando irradiadas a 4°C, a cor da suspensão tornou-se vermelha, indicando uma menor eficiência da polimerização para os polímeros obtidos à 25°C. O fato de se ter conseguido a polimerização das vesículas (previamente aquecidas acima da T_c) à temperatura de 25°C evitou as alterações morfológicas indesejáveis (descritas no item 3.1.3 a seguir), já que os tamanhos das vesículas praticamente não sofreram alterações em decorrência da fotopolimerização. A espectrometria de massa permitiu a identificação de dímeros e trímeros dos metil-ésteres das cadeias acila dos lipossomas polimerizados, porém a técnica não permitiu verificar a presença de cadeias poliméricas de maior peso molecular. Os resultados da cromatografia por separação de tamanhos obtidas com os lipídios polimerizados e com os produtos da sua transesterificação (i.e., os metil-ésteres dos ácidos diacetilênicos e dos seus derivados poliméricos) indicaram um aumento do peso molecular com o aumento do tamanho das vesículas de 50nm a 300nm, diminuindo para vesículas de 600nm. Neste caso, observou-se a precipitação de um material laranja na dispersão, compatível com um polímero de maior peso molecular. Assim os autores conseguiram uma comprovação de que a eficiência da polimerização é incrementada com o tamanho das vesículas até 300 nm. A análise comparativa dos pesos moleculares dos polímeros permitiu demonstrar a presença não só de polímeros lineares (obtidos pela participação de apenas um dos dois grupos diacetilênicos das moléculas de DCPC), como também de polímeros ramificados, indicativos da existência de ligações cruzadas, geradas pela participação das duas cadeias acila de um mesmo fosfolipídio diacetilênico na rede polimérica (Figura 3.2). Este resultado aparentemente contradiz o que Lopes, O'Brien e Whitesides (1982(i)) haviam proposto a respeito da propagação da polimerização. Entretanto, estes autores não afirmam que ligações cruzadas não possam acontecer, mas sim que as ligações lineares são preferencialmente formadas e que as ligações cruzadas poderiam levar à interrupção da propagação da cadeia. Isto está de acordo com o fato de parte significativa do polímero ser formada por cadeias diméricas e triméricas, como relatado no trabalho de Peek et al. (1994).

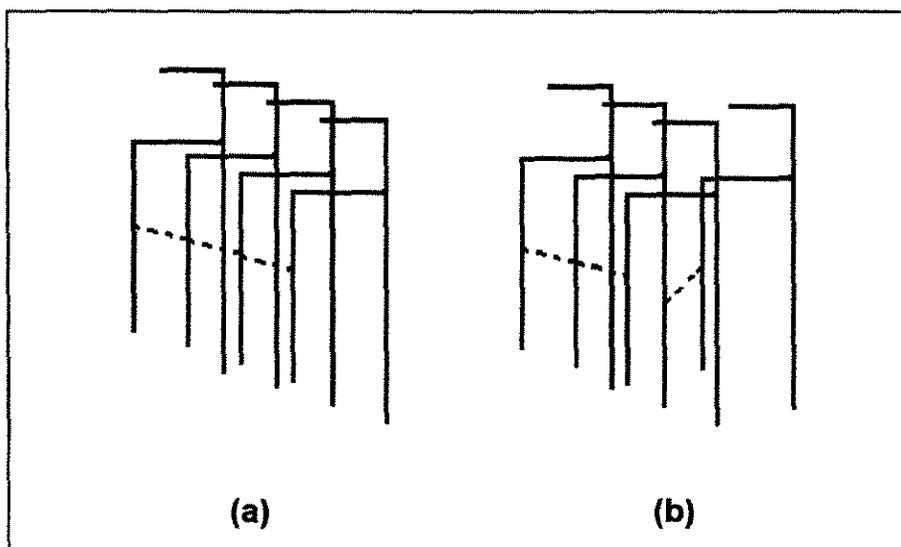


Figura 3.2: Modelos representativos de prováveis polímeros de DCPC: (a) linear, e (b) ramificado (Fonte: Peek et al., 1994).

3.1.2.3. Cromismo dos polímeros diacetilênicos

Com respeito à coloração dos polímeros diacetilênicos, Hupfer et al. (1983), sugerem que a ausência da cor azul, com a passagem direta para o vermelho-alaranjado durante a polimerização da $DC_{8,12}PC$, seria devido à presença de oligômeros compostos por 2 a 6 unidades de monômeros, correspondendo a um menor comprimento da cadeia polimérica relativamente aos polímeros azulados obtidos com outras moléculas diacetilênicas. Leaver et al. (1983) estudaram o efeito da temperatura durante a irradiação de MLV de $DC_{8,9}PC$, $DC_{8,6}PC$ e $DC_{8,11}PC$ sobre a cor do polímero obtido. Verificaram que sob temperaturas mais baixas ($-15^{\circ}C$ a $4^{\circ}C$ para o $DC_{8,6}PC$; e $4^{\circ}C$ a $10^{\circ}C$ para o $DC_{8,9}PC$) a irradiação levava à formação da cor vermelha, e sob temperaturas mais elevadas (maior que $4^{\circ}C$ para o $DC_{8,6}PC$; e maior que $10^{\circ}C$ para o $DC_{8,9}PC$), porém abaixo da T_c , a suspensão lipídica tornava-se amarelada. Para o terceiro fosfolipídio ($DC_{8,11}PC$), a formação do polímero avermelhado somente acontecia quando a irradiação era conduzida em temperaturas entre $32^{\circ}C$ e $41^{\circ}C$. Abaixo de $32^{\circ}C$ ou acima de $41^{\circ}C$,

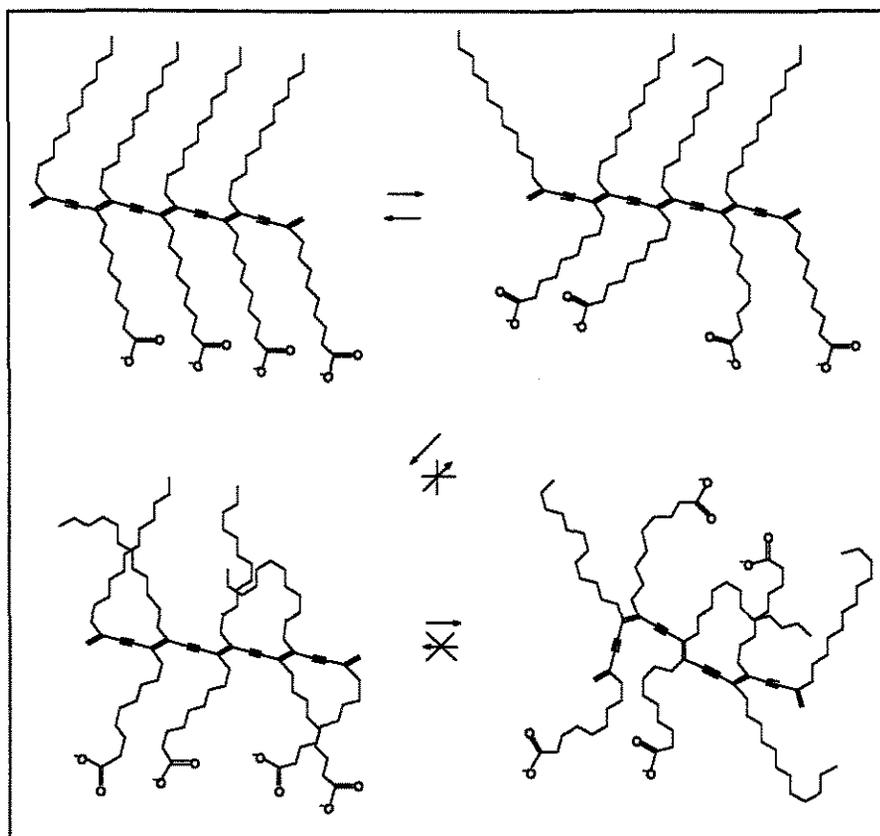
a cor do sistema tornava-se amarela. Segundo os autores (Leaver et al., 1983), a cor do polímero seria dependente do seu peso molecular (ou seja, do grau de polimerização) e, mais especialmente, do comprimento médio da conjugação sobre a qual os elétrons π de carbonos adjacentes na cadeia polimérica estão deslocalizados. O polímero vermelho representaria uma estrutura mais planar, com a cadeia polimérica menos tensionada e contendo menos defeitos estruturais que a forma amarela. Singh et al. (1986) realizaram estudos sobre o termocromismo de polímeros obtidos a partir da fosfatidilcolina diacetilênica derivada do ácido 12,14-nonacosadiinóico (DC_{10,13}PC; T_c=64°C), agregada em lipossomas (MLV). Estas vesículas foram obtidas pela simples hidratação dos lipídios secos, sob temperatura ambiente. A polimerização da dispersão foi realizada a 3°C durante 30 segundos, utilizando-se uma lâmpada de 25W ($\lambda=254\text{nm}$) em um reator fotoquímico tipo Rayonette. A suspensão teve sua cor alterada para azul escuro, tornando-se laranja após o aquecimento da amostra até temperaturas acima de 50°C. O resfriamento da amostra levou o sistema polimérico de volta à sua cor azul original, demonstrando-se que para as MLV de DC_{10,13}PC o termocromismo é reversível. Baseados nos resultados observados e nas análises fluorimétricas e espectrométricas na região do UV/visível, Singh et al. (1986) apresentaram a hipótese de que as alterações termo-induzidas na estrutura da bicamada seriam responsáveis pela alteração conformacional da cadeia polimérica, e que a conformação do polímero controlaria o efeito termocrômico. Em outras palavras, o aumento da temperatura aumentaria o grau de liberdade para a movimentação das cadeias laterais ligadas ao polímero, tornando-o menos ordenado e menos coplanar, diminuindo o comprimento de conjugação característico e conseqüentemente, acarretando alterações no espectro de absorção de luz. A reversibilidade do termocromismo seria decorrente da possibilidade das mudanças morfológicas produzidas na bicamada serem termicamente reversíveis.

Foi observado posteriormente por Rhodes e Singh (1991), que os polímeros obtidos a partir de lipossomas (MLV) compostos por mistura de DC_{8,9}PC e de uma fosfatidilcolina saturada de cadeias mais curtas (1,2-dinonanoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina, DNPC), após a irradiação no fotorreator Rayonette anteriormente mencionado, sob temperatura de 0°C a 4°C, apresentavam cor azul. Porém, quando

lipossomas compostos somente por DC_{8,9}PC foram utilizados, mantidas as mesmas condições de preparação das MLV e de irradiação, a dispersão tornou-se amarelada. Segundo os autores, tal coloração indicaria a formação de pequena quantidade de cadeias poliméricas mais curtas.

Mino et al. (1991) apresentam resultados interessantes a respeito das transições colorimétricas para filmes de Langmuir-Blodgett poliméricos do ácido 10,12-pentacosadiinóico, obtidos através de espectroscopia na região do UV/visível, de calorimetria diferencial de varredura e de espectroscopia de infravermelho. Eles demonstraram que o aumento da temperatura do filme polimérico, inicialmente azul (maior absorbância na região de 600nm a 650nm do espectro da luz visível), da temperatura ambiente até 50°C, provoca uma mudança reversível da cor na direção do vermelho (maior absorbância na faixa de 500nm a 540nm). Ao se atingir a temperatura de 60°C, ocorrem alterações mais significativas na região do espectro da luz visível, com o deslocamento do pico de absorbância de 650nm para 625nm (menos intenso), e surgimento de picos de absorbância em 540nm (mais intenso) e 500nm. O resfriamento da amostra de 60°C até a temperatura ambiente provoca um deslocamento do pico de absorbância de 625nm para comprimento de onda mais próximo de 650nm originalmente presente no espectro. Entretanto, os picos na região do vermelho (500nm e 540 nm) praticamente não se alteraram. Com isso demonstrou-se que o processo de transição cromática com o aquecimento até 60°C e posterior resfriamento é apenas parcialmente reversível. Com o aquecimento para temperaturas acima de 70°C, o filme polimérico teve sua coloração alterada de forma irreversível para o vermelho. Os autores afirmam que as alterações cromáticas são decorrentes de mudanças no comprimento efetivo das ligações polidiacetilênicas conjugadas do polímero, que dependem, por sua vez, do ordenamento das cadeias laterais à cadeia polimérica. Além disso, apontam a reversibilidade da alteração termocromática como sendo função da reversibilidade do desordenamento das cadeias laterais à cadeia polimérica, provocado pelo aumento da temperatura. Ao se atingir um estado suficientemente elevado de desordenamento, tanto das cadeias laterais quanto da própria cadeia polimérica, a alteração cromática torna-se irreversível pelo fato do sistema não mais ser capaz de retornar a uma

conformação mais ordenada (Esquema 3.3). Por outro lado, em trabalho desenvolvido por Lio et al. (1997) onde a morfologia de filmes poliméricos de Langmuir-Schaefer foi estudada em nível molecular através de microscopia de força atômica e por espectroscopia de infra-vermelho, há fortes indícios de que na fase vermelha as cadeias laterais ao polímero diacetilênico conjugado estariam mais ordenadas.



Esquema 3.3: Representação do termocromismo e reversibilidade cromática de filmes poliméricos monomoleculares do ácido 10,12-pentacosadiinóico (as setas marcadas com uma cruz indicam a irreversibilidade da alteração) (Fonte: Mino et al., 1991).

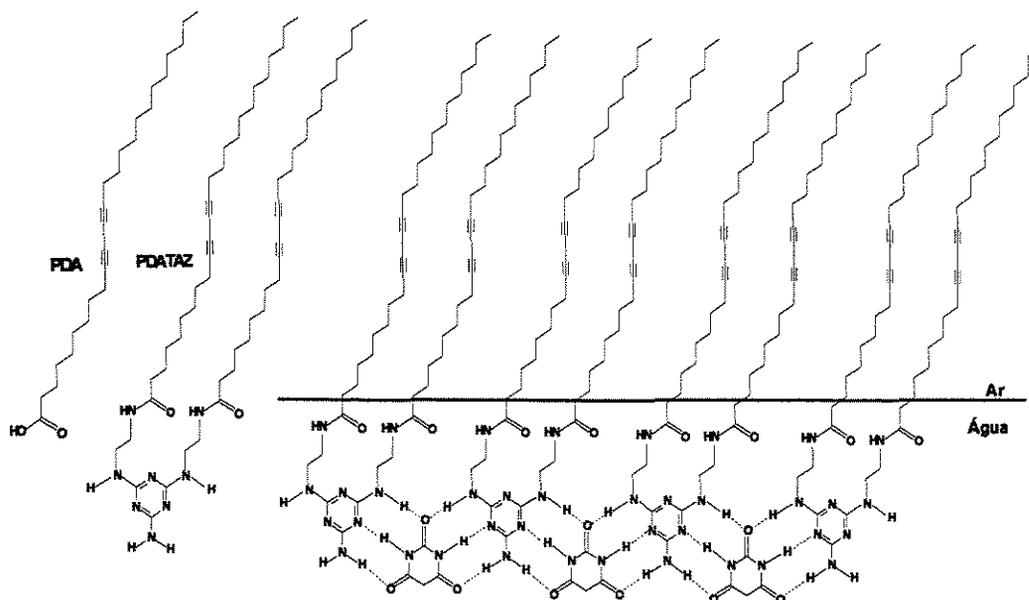
Embora o cromismo de vesículas polidiacetilênicas tenha sido muito mais estudado em função da temperatura, conforme artigo de Okada et al. (1998), é citado que as variações cromáticas não são causadas apenas pelo efeito da

temperatura, mas podem ser provocados também por perturbações causadas por “stress” mecânico ou por solventes.

Huo, Russell e Leblanc (1999) realizaram um estudo do cromismo de polidiacetilenos através de medidas de pressão superficial (filmes de Langmuir-Blodgett) e absorção na região do UV e do visível, utilizando o ácido 10,12-pentacosadiinóico (PDA) e moléculas derivadas dele, designadas pela sigla PDATAZ. Nestas moléculas, duas cadeias de PDA estão ligadas a uma molécula de triaminotriazina (TAZ) através de moléculas de etilenodiamina. Cada uma das moléculas de PDATAZ contém um grupo polar capaz de se interligar fortemente através de 3 pontes de hidrogênio com cada molécula de ácido barbitúrico (BA) ou de ácido cianúrico adjacentes (presentes na fase aquosa), conseguindo-se uma grande restrição na movimentação da cadeia lateral ao polímero polidiacetilênico conjugado (Esquema 3.4). A análise dos resultados obtidos permitiu a proposição de um mecanismo diferente daquele apresentado por Mino et al. (1991) para as alterações cromáticas e para a sua reversibilidade. Segundo os autores, as evidências experimentais demonstraram que mais do que o simples ordenamento ou desordenamento das cadeias laterais ao polímero linear, a cor do polímero está associada ao grau de coplanaridade dos monômeros no seu empacotamento, antes ou depois da polimerização (Figura 3.3 e Figura 3.4). O polímero linear inicialmente presente após a fotopolimerização pode sofrer dobras, tornando-se uma cadeia em zigue-zague, onde as cadeias alquila laterais podem ainda estar ordenadas, como apresentado na Figura 3.4. Essas dobras na cadeia seriam possíveis graças à liberdade de rotação das ligações simples na cadeia do polímero polidiacetilênico conjugado, sendo que tal rotação aconteceria quando a cadeia polimérica atingisse um determinado comprimento. Portanto, para que o processo de dobra da cadeia polimérica aconteça, é necessário um suficiente grau de liberdade de movimentação das cadeias laterais ligadas à cadeia principal do polímero.

Nos sistemas poliméricos em que se tem a reversibilidade do termocromismo dentro de uma faixa de temperatura, o modelo proposto por Huo, Russell e Leblanc (1999) indica que as cadeias alquila laterais ainda estariam

ordenadas, como observado no trabalho de Lio et al. (1997), mas haveria apenas uma pequena mudança na forma do seu empacotamento nos pontos de dobra da cadeia polimérica principal. Isto é condizente com a percepção dos autores de que, sob temperaturas inferiores à T_c , seria pouco provável uma alteração das cadeias laterais para uma conformação muito desordenada, observando-se a reversibilidade do termocromismo nesta situação. Ao se aumentar a temperatura, as dobras da cadeia polidiacetilênica conjugada seriam incrementadas significativamente, com uma mudança substancial da conformação das cadeias alquila laterais para arranjos mais desordenados ou emaranhados, que tornariam irreversível um retorno do sistema ao estado anterior e, conseqüentemente, tornando irreversível a alteração termocrômica.



Esquema 3.4: Representação das moléculas de PDA e de PDATAZ e ilustração da rede de ligações de hidrogênio formada entre moléculas de PDATAZ e BA na interface ar-água (Fonte: Huo, Russell e Leblanc, 1999).

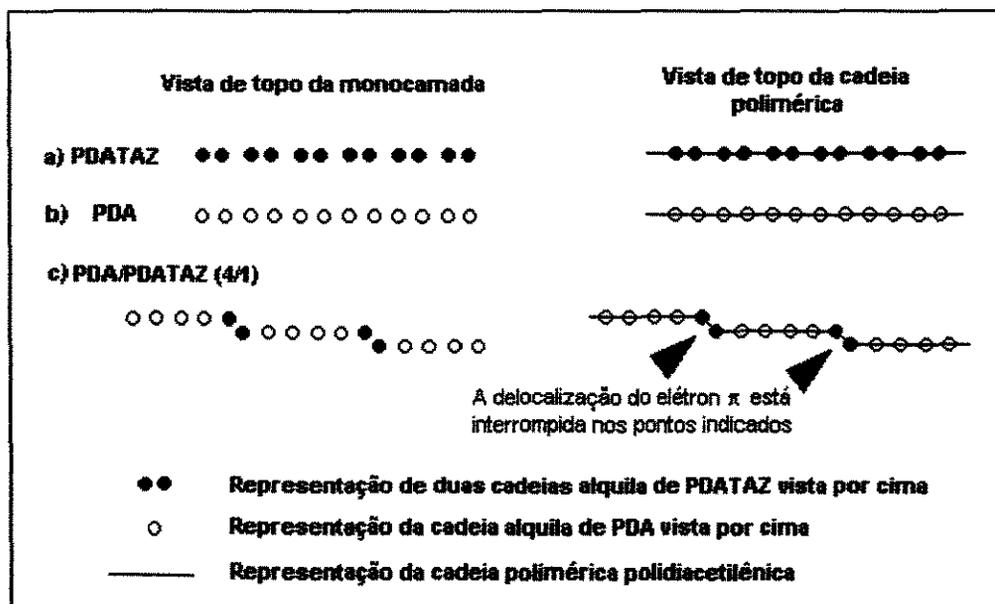


Figura 3.3: Efeito do empacotamento coplanar e não-coplanar de PDA, PDATAZ e da mistura de ambos em monocamadas sobre a polimerização e propriedades cromáticas (Fonte: Huo, Russell e Leblanc, 1999).

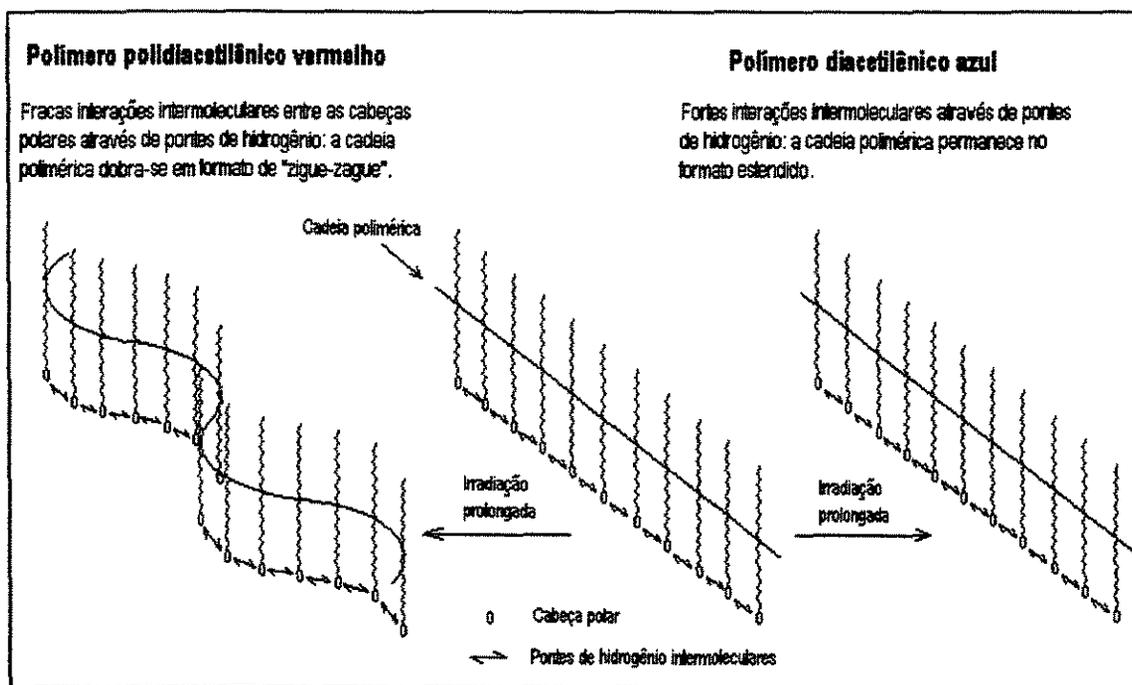


Figura 3.4: Modelo de cadeia polimérica em zigue-zague para explicar as propriedades cromáticas de filmes polidiacetilênicos devido à prolongada exposição à radiação UV (Fonte: Huo, Russell e Leblanc, 1999).

3.1.3. Alterações morfológicas das bicamadas de DCPC

Em artigo de revisão da literatura a respeito das transições de fase de fosfolipídios polimerizáveis, Blume (1991) relatou que os lipossomas preparados com fosfolipídios diacetilênicos são morfológicamente estáveis somente enquanto na fase líquido-cristalina. Na fase gel os lipossomas tornam-se instáveis, e as bicamadas se rearranjam levando a alterações da morfologia das partículas. As vesículas seriam convertidas para microcilindros, ou túbulos, abertos nas duas extremidades, com comprimentos que podem atingir até centenas de micrômetros e com diâmetros variando de $0,3\mu\text{m}$ a $1\mu\text{m}$ (Rudolph et al., 1988; Georger et al., 1987; Rudolph e Burke, 1987; Burke et al., 1988; Rhodes et al., 1988; Singh et al., 1988; Yager et al., 1988). Estes artefatos foram bem caracterizados através de diferentes técnicas, como microscopia eletrônica (Yager et al., 1988), espectroscopia Raman (Schoen e Yager, 1985) e de infra-vermelho (Rudolph e Burke, 1987), difração de raio-X (Rhodes et al., 1988) e espalhamento elástico de neutrons (Blechner et al., 1990). Mais recentemente, o dicroísmo circular demonstrou ser também uma técnica importante para o estudo da estrutura dos túbulos de DCPC (Spector et al., 1998). Até onde se sabe, tal alteração morfológica é uma característica singular das fosfatidilcolinas diacetilênicas. Ela é distinta das estruturas lamelares obtidas com a fosfatidilserina em presença de íons cálcio (Ca^{+2}), denominadas como cilindros de co-quelato, pelo fato dos túbulos gerados por DCPC apresentarem um núcleo preenchido pela fase aquosa, enquanto nos cilindros de co-quelato a parte interna é preenchida pela própria bicamada enrolada (Papahadjopoulos et al., 1975).

O mecanismo da transformação dos lipossomas de DCPC para túbulos foi estudado por Yager et al. (1988). Os autores verificaram que esta conversão morfológica envolve a rotação da bicamada lipídica formando uma espiral que origina o túbulo, conforme apresentado na Figura 3.5. Um estudo comparativo entre a $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ e a correspondente fosfatidilcolina completamente saturada determinou que o comportamento de fase da $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ é função não só da presença do grupo diacetilênico, como também da morfologia inicial da fase fluida (ou líquido-cristalina). Lipossomas do tipo MLV (com diâmetros de maiores que $1\mu\text{m}$)

originaram os túbulos diretamente quando foram resfriados até temperaturas bem inferiores à T_c . Comportamento diferente foi observado em lipossomas do tipo SUV (com diâmetros de $0,04\mu\text{m}\pm 0,10\mu\text{m}$). Estes lipossomas são meta-estáveis na fase líquido-cristalina, e o resfriamento até 2°C não leva à transformação diretamente para túbulos, mas sim a bicamadas planares sobrepostas como folhas estendidas. Somente o posterior aquecimento até temperaturas acima da T_c e o subsequente resfriamento conduziram à transformação para a fase tubular, como pode ser visualizado na Figura 3.6 (Rudolph e Burke, 1987).

Os túbulos podem também ser obtidos a partir da solubilização das moléculas de DCPC em álcool, adicionando-se água ao sistema sob temperatura acima da T_c , e posteriormente resfriando-se lentamente a mistura (Georger et al., 1987). Esta técnica possibilita a obtenção de túbulos com características diferentes em termos do comprimento e da espessura (dada pela quantidade de bicamadas presentes), em função do álcool utilizado (Ratna et al., 1992).

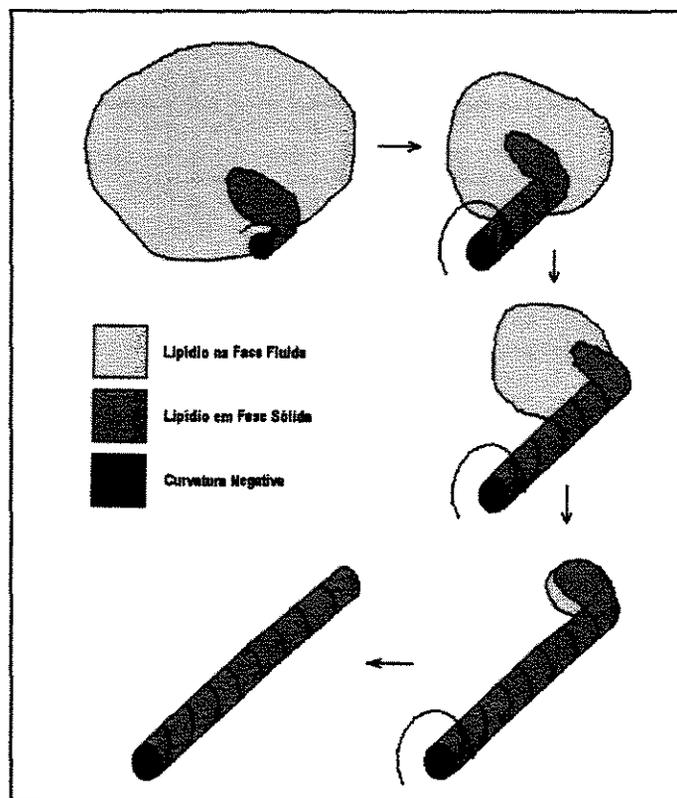


Figura 3.5: Ilustração da formação de túbulo a partir de lipossomas preparados com DCPC (Fonte: Yager et al., 1988).

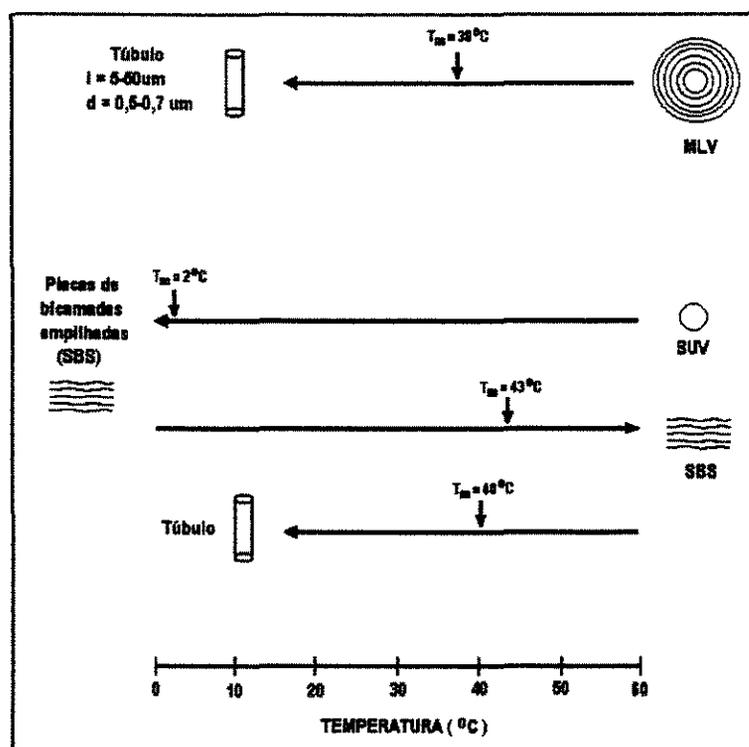


Figura 3.6: Comportamento de fase de $DC_{8,9}PC$ em função da estrutura morfológica inicial e da temperatura (Fonte: Rudolph e Burke, 1987).

3.1.4. Encapsulamento de compostos em lipossomas polimerizados de DCPC

No levantamento realizado na literatura, há poucos relatos a respeito do encapsulamento e da permeabilidade de lipossomas diacetilênicos para compostos terapêuticos, normalmente utilizando-se moléculas modelo (principalmente carboxifluoresceína, glicerol ou glicose) para esse tipo de estudo.

No trabalho realizado por Leaver et al. (1983), a permeabilidade de lipossomas multilamelares de $DC_{8,9}PC$, $DC_{8,6}PC$ ou $DC_{8,11}PC$ ao glicerol foi estudada através do levantamento das taxas de inchamento das vesículas ($d(1/A)/dt$) em função da temperatura. Sob temperaturas inferiores à de transição de fase, a permeabilidade era baixa e as vesículas polimerizadas apresentaram-se menos permeáveis que as correspondentes vesículas monoméricas. Na região próxima à temperatura de transição de fase dos fosfolipídios diacetilênicos ocorre

uma inflexão, com um acentuado aumento da permeabilidade sob temperaturas mais elevadas. No caso dos lipossomas de DC_{8,11}PC, observou-se que a permeabilidade dos lipossomas polimerizados tornou-se maior que a dos monoméricos, o que não foi verificado para os outros dois fosfolípidios diacetilênicos estudados, para temperaturas acima da T_c.

A permeabilidade de lipossomas de DC_{8,12}PC à carboxifluoresceína (CF) e à glicose foi estudada por Hupfer et al. (1983). Para lipossomas monoméricos contendo CF e mantidos a 24°C, houve a liberação de 8% da CF encapsulada após 50 horas. Quando se empregou a glicose, a sua liberação a partir do interior dos lipossomas monoméricos ocorreu a taxa semelhante àquela verificada para a CF, sob temperatura inferior a T_c (24°C). Sob temperatura acima da T_c (60°C), a liberação ocorreu a taxas bem mais elevadas (cerca de uma a duas ordens de magnitude maior). Não foram realizados os testes de permeabilidade para os lipossomas poliméricos correspondentes devido à total liberação dos compostos ao se resfriar as amostras até 0°C (temperatura necessária para a ocorrência da polimerização). É provável que o resfriamento dos lipossomas monoméricos tenha resultado em alterações da agregação da bicamada, que possibilitaram a liberação da glicose encapsulada. Os autores tentaram fazer a polimerização dos lípidios nos lipossomas antes de separar o composto não encapsulado, mas não foram bem sucedidos por causa dos maus resultados obtidos com os métodos de separação utilizados. Através de cromatografia de permeação, as vesículas ficaram fortemente adsorvidas no gel (Sephadex) e não se conseguiu a sua recuperação. Por diálise e por ultrafiltração ocorreu a precipitação das partículas.

A permeabilidade de lipossomas preparados com lípidios diacetilênicos de cadeias idênticas (DC_{8,9}PC), de cadeias mistas (DC_{8,13}PC com uma molécula do ácido palmítico ou esteárico esterificada na posição *sn*1) e com DMPC foi avaliada por Johnston et al. (1983). Os resultados indicaram que os lipossomas estudados eram impermeáveis à sacarose sob temperatura de 50°C (i.e., acima das respectivas T_c's), e que tanto os lipossomas monoméricos quanto os poliméricos preparados com os fosfolípidios diacetilênicos eram bem mais permeáveis ao glicerol que os lipossomas de DMPC, à mesma temperatura anteriormente citada. A

polimerização provocou uma significativa diminuição da permeabilidade das bicamadas lipídicas diacetilênicas em relação aos lipossomas monoméricos correspondentes.

A relação da permeabilidade de lipossomas com o tipo de fosfatidilcolina diacetilênica empregada, com o tamanho das vesículas, com a incorporação de colesterol, com o tamanho da molécula encapsulada e com a incubação em plasma foi objeto do estudo de Freeman et al. (1987). Foi observado que lipossomas polimerizados de DC_{8,11}PC apresentaram baixa permeabilidade à CF, enquanto que a irradiação dos lipossomas preparados com DC_{8,9}PC, DC_{8,6}PC, e com fosfatidilcolinas diacetilênicas de cadeias mistas (DC_{8,11}PC e DC_{8,9}PC contendo o ácido esteárico esterificado ao átomo de carbono 2 do glicerol) proporcionou um aumento da permeabilidade. Estes resultados foram relacionados com os distúrbios no empacotamento das cadeias acila causados pela substituição de uma cadeia acila diacetilênica, no caso das DCPC de cadeias mistas. E também com o grau de polimerização, já que um menor grau de polimerização pode conferir uma maior permeabilidade da bicamada lipídica devido às irregularidades presentes na interface entre os domínios monoméricos e poliméricos da membrana. O grau de polimerização é diretamente proporcional ao tamanho da cadeia acila para lipídios do tipo DC_{8,n}PC (Leaver et al., 1983). Desta forma se explicaria a menor permeabilidade dos lipossomas de DC_{8,11}PC, com maior grau de polimerização e portanto com menor área interfacial entre os domínios de monômeros e polímeros na bicamada, relativamente a dos lipossomas polimerizados de DC_{8,9}PC ou DC_{8,6}PC. Para os lipossomas polimerizados preparados com DC_{8,9}PC e colesterol, a presença do esteroide na bicamada parece ter interferido negativamente na extensão da polimerização, pois a permeabilidade foi incrementada em relação aos lipossomas poliméricos de DC_{8,9}PC 100%. A polimerização dos lipossomas unilamelares pequenos (SUV) preparados com a fosfatidilcolina diacetilênica de cadeias mistas derivada da DC_{8,11}PC acarretou em maior permeabilidade que os correspondentes lipossomas unilamelares grandes (LUV). Este fato deve ser decorrente da menor capacidade das SUV em acomodar cadeias lineares de polímeros, uma vez que estudos de permeação em gel e de solubilidade mostraram que as moléculas diacetilênicas de cadeias mistas originam polímeros de maior

peso molecular e mais lineares que as correspondentes moléculas de cadeias idênticas, como sugere também o trabalho de Johnston et al. (1983). A incubação de lipossomas monoméricos de DC_{8,11}PC em plasma proporcionou um aumento da liberação da CF encapsulada, enquanto que nos lipossomas poliméricos a permeabilidade foi menor, inclusive em relação àquelas obtidas com lipossomas convencionais de esfingomielinas e com lipossomas de PC:colesterol-3:1. Quando a inulina foi testada, verificou-se que os lipossomas polimerizados de DC_{8,11}PC apresentaram uma permeabilidade menor com relação à CF, uma molécula menor, demonstrando a dependência da permeabilidade com o tamanho do composto encapsulado (Freeman et al., 1987).

O método de encapsulamento desenvolvido por Kirby e Gregoriadis (1984), empregando-se lipossomas unilamelares pequenos (SUV) compostos por fosfatidilcolina de ovo (PC) e colesterol em quantidades equimolares, proporcionou a obtenção de elevadas eficiências de encapsulamento para os lipossomas obtidos após a desidratação e reidratação, que foram denominados pela sigla DRV (*Dehydraton/Rehydration Vesicles*). Foi avaliado o encapsulamento de diversas substâncias (CF, glicose, sacarose, albumina, DNA, ATP, KCl e NaCl, entre outras), observando-se eficiências de encapsulamento na faixa de 27% a 72% para as DRV, muito maiores que as obtidas a partir de vesículas multilamelares grandes (MLV -1,2% a 8%), de mesma composição lipídica e submetidas ao mesmo método de encapsulamento. O estudo demonstrou que a presença de colesterol ocasionou uma diminuição da eficiência de encapsulamento (E) de CF em DRV obtidas a partir de SUV (E=54% para lipossomas preparados apenas com fosfatidilcolina de ovo; e E=45% a 48% , para lipossomas contendo colesterol com fração molar variando de 0,1 a 0,5). Entretanto, a vantagem observada com o uso do esterol é a maior resistência a perdas do material encapsulado devido a gradientes osmóticos, como ficou demonstrado pela elevada retenção da CF encapsulada após se sujeitar as DRV à diálise contra diluições (1:2 e 1:4) do mesmo tampão utilizado na reidratação dos lipossomas. O efeito da concentração do soluto sobre a eficiência de encapsulamento foi avaliado para lipossomas compostos por PC:colesterol (1:1-razão molar), verificando-se que esta variável pode produzir diferentes resultados em função do composto estudado.

Concentrações crescentes de glicose, sacarose ou CF (0,01M a 0,5M) ocasionam um decréscimo significativo na eficiência de encapsulamento. Para o encapsulamento de KCl ou de NaCl, o aumento da concentração (de 0,1M até cerca de 0,3M a 0,8M) conduziu a um acréscimo da eficiência de encapsulamento, com posterior decréscimo para concentrações ainda maiores dos sais, resultando em uma região de concentração do soluto (0,2M a 1,0M) onde a máxima eficiência de encapsulamento foi alcançada. Em todo o estudo acima apresentado, Kirby e Gregoriadis (1984) adicionavam a solução do composto a ser encapsulado à suspensão de SUV (ou MLV) imediatamente antes da liofilização, uma vez que observaram que a eficiência de encapsulamento era bem maior quando se promovia um maior contato entre o soluto e os lipídios dos lipossomas, relativamente ao processo onde a adição do soluto era realizada na etapa de reidratação das vesículas. Os autores interpretaram o aumento da eficiência de encapsulamento alcançado em termos de uma maior propensão da ocorrência da fusão das vesículas durante o processo de liofilização (a desidratação deve proporcionar uma redução das forças hidrofóbicas, desestabilizando os lipossomas), com formação de vesículas maiores durante a reidratação. Eles apontam como principais vantagens do método, relativamente a outros métodos de encapsulamento, a possibilidade de se evitar degradação dos compostos a serem encapsulados ao serem submetidos aos processos necessários para a obtenção dos lipossomas (como exposição a solventes orgânicos, a temperaturas elevadas, ou ao ultrassom, por exemplo). Por outro lado, a liofilização permite a estocagem dos lipossomas e compostos terapêuticos por longos períodos, desde que sob condições adequadas, sendo que a reconstituição da suspensão através da reidratação é uma etapa simples e rápida. Além disso, o processo possibilita que a ampliação de escala até o nível de planta piloto, ou mesmo industrial, seja realizada com relativa facilidade. Estas vantagens também foram descritas por New (1990) para justificar a preparação de lipossomas pelo método da desidratação e reidratação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese e caracterização dos fosfolipídios diacetilênicos

4.1.1. Síntese química

A síntese dos ácidos diacetilênicos foi realizada através da metodologia descrita por Xu et al. (1991), com modificações e adaptações necessárias (Esquema 4.1). A reação de esterificação seguiu procedimentos apresentados na literatura (Gupta et al., 1977; Rhodes et al., 1992), utilizando-se diisopropilcarbodiimida (DIC) em substituição à dicicloexilcarbodiimida (DCC) como agente de acoplamento. Todas as reações foram realizadas sob atmosfera inerte (argônio ou nitrogênio), exceto onde especificado de outra forma. Todos os solventes foram tratados pelos métodos padrão antes de sua utilização.

Os compostos foram detectados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de alumínio, utilizando-se solução de ácido fosfomolibdico 7% em etanol e/ou radiação UV para a revelação das manchas, exceto onde especificado outro agente revelador. A purificação foi realizada através de cromatografia “flash” (Still et al., 1978), empregando-se sílica-gel 60 (230-400mesh) da Merck. Os compostos foram analisados por espectroscopia de infravermelho (IV) (Bomen/MB Series – mod. B100) em filme sobre cela de NaCl e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN) (300MHz, Varian mod. GEMINI-2000; ou 500MHz, Varian mod. INOVA-500). Os ácidos e fosfolipídios diacetilênicos foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono (^{13}C -RMN) (75.5MHz - GEMINI; ou 125.7MHz - INOVA). Os fosfolipídios diacetilênicos também foram analisados por análise elementar (Elemental Analyser PE2400). Os pontos de fusão (p.f.) foram obtidos no equipamento Thomas Hoover, onde a fusão da amostra é realizada em um tubo capilar, e não foram corrigidos.

4.1.1.2. Preparação do ω -bromo-1-(tetraidropiranyl)alcanol (3)

A uma solução de ω -bromo-1-alcanol (3-bromo-1-propanol : 11,0mmols; ou 9-bromo-1-nonanol: 5,8mmols) e diidropirano (DHP-250mol%) em diclorometano (2.3mL/mmol de ω -bromo-1-alcanol), sob agitação e à temperatura ambiente, adicionou-se uma suspensão de ácido p-toluenosulfônico monoidratado (5 mol%) em diclorometano. Após 4 horas, a mistura reacional foi lavada sucessivamente com solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), e solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). Posteriormente, as fases orgânicas combinadas foram submetidas à secagem com Na₂SO₄, e o solvente evaporado sob vácuo e à temperatura ambiente. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia flash (eluente: hexano/EtOAc=20:1, ou éter de petróleo (35°C–60°C)/EtOAc=15:1).

4.1.1.3. Preparação dos intermediários ω -(metoximetil)-1,3-alcadiinol e ω -(tetraidropiranyl)-1,3-alcadiinol (4)

Em balão septado com agitador magnético, solubilizou-se o 1,4-bis(trimetilsilil)-1,3-butadiino (BTMSBD) em THF (2,0mL/mmol de BTMSBD), sob atmosfera inerte. À esta solução resfriada a -78°C, adicionou-se 1 equivalente de metil-lítio (solução do complexo metil-lítio / brometo de lítio em éter), sob agitação. A mistura reacional foi submetida à agitação por 3,5 horas, sob temperatura ambiente. Após este período, uma solução de 115mol% do composto **2** ou **3** (**2a**: 2,5mmols; **2b**: 2,3mmols; **3a**: 2,6mmols; **3b**: 4,1mmol) em hexametilfosforamida (HMPA) (ou *N,N*-dimetilpropileneuréia - DMPU) (2,0mL/mmol de BTMSBD) foi transferida gôta-a-gôta, via cânula, para o balão contendo a mistura reacional resfriada a -78°C, e o sistema foi submetido à agitação por 30 minutos, sob temperatura ambiente. Posteriormente ela foi resfriada até 0°C e neutralizada pela adição de solução aquosa de HCl 0,3 N (o pH do sistema foi determinado com papel indicador) e extraída com hexano. As fases orgânicas combinadas foram removidas no rotaevaporador, sob vácuo e à temperatura ambiente. Ao balão contendo o resíduo da evaporação adicionou-se uma suspensão de KF (200mol%) em dimetilformamida (DMF-2,0mL/mmol de

BTMSBD). O sistema foi submetido à agitação por 30 minutos, sob temperatura ambiente e, ao final deste período, foi resfriado até 0°C e transferido para um balão contendo HCl 3N (1,5mL/mmol de BTMSBD), sob agitação e também a 0°C. As fases orgânica e aquosa foram separadas e a última extraída com hexano. As fases orgânicas combinadas foram sucessivamente lavadas com HCl 3N, solução saturada de bicarbonato de sódio e solução saturada de NaCl, fazendo-se em seguida a secagem com Na₂SO₄. Os solventes foram removidos no rotaevaporador, sob vácuo e à temperatura ambiente, e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia flash (eluente: hexano/EtOAc=15:1; ou hexano/éter etílico=10:1, 7,5:1 e 5:1).

4.1.1.4. Preparação do 1-(metoximetil)alcadiinol e do 1-(tetraidropiranyl)alcadiinol (5)

A uma solução do intermediário **4** (**4a**: 1,6mmol, p/ a síntese de **5a**; **4a**: 1,4mmol, p/ a síntese de **5b**; **4b**: 1,6mmol; **4c**: 2,6mmols, p/ a síntese de **5d**; **4c**: 0,7mmol, p/ a síntese de **5e**; **4d**: 2,6mmols) em THF (4,0mL/mmol de **4**), à temperatura de -23°C, adicionou-se gota-a-gota 120mol% de n-butil-lítio (n-BuLi - solução 1,6 M em hexano). A mistura reacional foi deixada sob agitação por uma hora, à temperatura de -23 °C. Ao final deste período, adicionou-se gota-a-gota ao meio reacional uma solução do 1-haloalcano **a**, **b** ou **c** (**a**: 1-bromobutano; **b**: 1-iododecano; **c**: 1-iodohexadecano) solubilizado em HMPA (ou DMPU) (4,0mL/mmol de **4**), mantendo-se a agitação e a temperatura de -23 °C. A mistura reacional foi mantida nestas condições durante 30 minutos iniciais, e posteriormente à temperatura ambiente por mais 1,5h a 2h. Ao final deste período, ajustou-se o pH da solução reacional para pH 6 (determinado com papel indicador) pela adição de solução aquosa de HCl 0,3N. A mistura reacional foi extraída com hexano e as fases orgânicas combinadas foram lavadas sucessivamente com solução saturada de NaHCO₃ e solução saturada de NaCl. Em seguida fez-se a secagem da fase orgânica com Na₂SO₄ anidro, e os solventes foram evaporados no rotaevaporador, à temperatura ambiente e sob vácuo. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia flash (eluente: hexano/EtOAc=20:1).

4.1.1.5. Preparação do alcadiinol-1 (**6**)

A um balão septado contendo o intermediário **5** (**5a**: 1,1mmol; **5d**: 1,9mmol; **5b**: 0,6mmol; **5e**: 0,4mmol; **5c**: 0,7mmol; **5f**: 1,2mmol) solubilizado em metanol (25mL/mmol de **5**), à temperatura ambiente, adicionou-se HCl 37% (3,0mL/mmol de **5**). O sistema foi mantido sob agitação e à temperatura ambiente por 24 horas, e ao final deste período o solvente foi evaporado no rotaevaporador, sob vácuo e à temperatura ambiente (quando **5a** era utilizado), à temperatura ligeiramente acima de 40°C (quando **5b** era utilizado), ou à temperatura de 58°C-60°C (quando **5c** era utilizado). Ao resíduo obtido adicionou-se iguais volumes de água destilada e clorofórmio e, após agitação, transferiu-se a mistura para funil de separação. As fases orgânica e aquosa foram separadas e a fase aquosa extraída com clorofórmio. As fases orgânicas combinadas foram lavadas sucessivamente com solução saturada de NaHCO₃ e solução saturada de NaCl, e posteriormente sêcas com Na₂SO₄ anidro. Os solventes foram evaporados sob vácuo, nas temperaturas acima indicadas, e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia flash (eluente: hexano/etanol=6:1; ou hexano/EtOAc=4:1; ou éter de petróleo (35°C–60°C)/EtOAc=5:1, 4:1 e 3:1).

4.1.1.6. Preparação do ácido alcadiinóico (**7**)

Solubilizou-se o dicromato de piridínio (PDC-800mol%) em DMF (8,0mL/mmol de **6**), e transferiu-se esta solução via cânula para um balão septado contendo o 1-alcadiinol (**6**) (**6a**: 1,7mmol; **6b**: 0,7mmol; **6c**: 1,0mmol), sob agitação e à temperatura ambiente. A mistura reacional foi mantida nestas condições por 24 horas, e ao término deste período o meio reacional foi transferido para um balão contendo água destilada (60mL/mmol de **6**), sob agitação e à temperatura ambiente. Em seguida fez-se a adição de éter etílico ao sistema, as fases orgânica e aquosa foram separadas, e esta última foi extraída com éter etílico. As fases orgânicas combinadas tiveram os solventes removidos no rotaevaporador, sob vácuo, e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia flash (eluente: hexano/etanol/ácido fórmico 85% = 500:100:5; ou hexano/EtOAc/ácido fórmico 85% = 500:100:5).

4.1.1.7. Preparação da fosfatidilcolina diacetilênica (1)

A uma suspensão do complexo L- α -glicerofosforilcolina com cloreto de cádmio (GPC.CdCl₂)¹ (100mol%), 400mol% de ácido diacetilênico (7) (7a: 0,58mmol; 7b: 0,45mmol; 7c: 0,69mmol) e DMAP (200mol%) em clorofórmio² (16mL/mmol de GPC.CdCl₂), à temperatura ambiente, adicionou-se a diisopropilcarbodiimida (DIC-400mol%). O meio reacional foi mantido sob agitação e protegido da luz por aproximadamente 90 horas. Ao final deste período, a mistura reacional foi filtrada através de um leito de Celite e o solvente evaporado sob vácuo. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia “flash”, normalmente sendo necessárias duas corridas cromatográficas para uma eficiente purificação (eluentes: clorofórmio:metanol:água - 65:25:4; e clorofórmio:metanol:água - 80:25:2, 65:25:4 e 50:25:5).

4.1.2. Comportamento de agregação dos fosfolipídios diacetilênicos

Preparou-se solução com concentração 1mg/mL de cada fosfolipídio diacetilênico (DC_{8,9}PC (Avanti), DC_{8,3}PC ou DC_{2,15}PC) em clorofórmio. Uma alíquota de volume conhecido foi aplicada sobre a superfície da fase estacionária (água destilada ultrafiltrada), contida em uma balança de Langmuir-Blodgett (tipo:611/série:061-NIMA Technology). A partir dos dados de pressão superficial (π) por área obtidos, e do volume aplicado da solução lipídica, levantou-se a curva de pressão superficial (π) versus área ocupada por molécula.

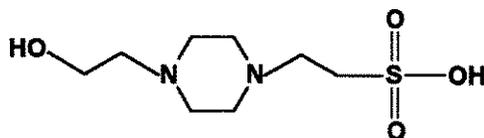
4.2. Preparação e caracterização dos lipossomas polimerizados

A preparação dos lipossomas foi feita pelo método da formação do filme seco de lipídios. A quantidade adequada do fosfolipídio diacetilênico DC_{8,9}PC (9b)

¹ Previamente seco com P₂O₅, sob vácuo e a 78°C.

² O clorofórmio P. A., que normalmente contém cerca de 1% de etanol para a sua estabilização, foi previamente lavado com água destilada (para a remoção do álcool), pré-seco com carbonato de potássio (K₂CO₃), destilado com pentóxido de fósforo (P₂O₅) para a completa remoção da água residual, e estocado em peneira molecular de 3Å antes do seu emprego na reação.

comercial (adquirido junto à Avanti Polar Lipids, USA) ou dos fosfolípidios diacetilênicos DC_{8,9}PC (*9b*), DC_{8,3}PC (*9a*) ou DC_{2,15}PC (*9c*), sintetizados previamente como descrito no item anterior, foi solubilizada em clorofórmio, em balão esférico de 50mL. O solvente foi evaporado no rotaevaporador, sob vácuo, à temperatura de 55°C, durante 30 minutos, ou então sob temperatura ambiente quando se utilizou rotaevaporador com maior pressão de vácuo (menor pressão absoluta). Ao balão contendo o filme lipídico seco, foi adicionado um volume suficiente de solução tampão Hepes 10mM pH 7,4, de forma a se obter a concentração lipídica desejada. O tampão Hepes (ácido etanosulfônico 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina) (Esquema 4.2) é um tampão biológico, com pKa=7,5 a 25°C e faixa de pH útil variando de pH6,9 a pH8,2. O balão foi fixado ao rotaevaporador e submetido à rotação, parcialmente submerso no banho a 55°C (quando se empregava os fosfolípidios DC_{8,9}PC (*9b*) ou DC_{8,3}PC (*9a*)), ou a 70°C (quando se empregava o fosfolípido DC_{2,15}PC (*9c*)), sob pressão atmosférica (vácuo desligado). O sistema foi deixado por 30 minutos nestas condições para que ocorresse a hidratação do filme lipídico. Após a hidratação, fez-se extrusão (Extrusora mod. T.001 – Lipex Biomembranes, Inc.) da suspensão do lípidio através de membranas de policarbonato, com poros da ordem de 100nm, (diâmetro 25mm; Poretics) empregando-se nitrogênio como gás de arraste, a partir de modificações nos métodos sugeridos por Madden et al. (1990) e Mayer et al. (1986). Foram realizadas 15 passagens, mantendo-se a pressão do gás de arraste entre 16 kgf/cm² e 24 kgf/cm².



Esquema 4.2: Estrutura molecular do ácido etanosulfônico 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazina (tampão Hepes)

4.2.1. Temperatura de transição de fases dos fosfolipídios diacetilênicos

As suspensões de lipossomas preparados com os fosfolipídios diacetilênicos DC_{8,9}PC (comercial), DC_{8,3}PC e DC_{2,15}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4 foram submetidas à análise por calorimetria de varredura diferencial (DSC) (Calorímetro TA Instruments 4000, módulo DCS 2910) e por microcalorimetria de varredura diferencial (microDSC) (Microcalorímetro: mod.VP-DSC, Microcal Inc.).

4.2.2. Diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas

O tamanho das vesículas foi determinado medindo-se seus raios hidrodinâmicos por espectroscopia de espalhamento de luz de frequência determinada, obtida por incidência de raios laser (“quasi elastic light scattering”, QLS) (Malvern Autosizer, mod. 4700). Neste método são medidas as flutuações da intensidade do espalhamento de luz com o tempo para a determinação do coeficiente de difusão da partícula em solução diluída (Ford, 1985).

4.2.3. Quantificação dos fosfolipídios diacetilênicos

A concentração de lipídios nas amostras foi determinada pela quantificação de fosfato, de acordo com a técnica sugerida por Chen et al. (1956). Este método baseia-se na digestão do fosfolipídio a fosfato inorgânico e CO₂ por H₂SO₄ e H₂O₂. O ortofosfato forma um complexo com molibdato de amônio que, quando reduzido por ácido ascórbico, forma um complexo azul detectável espectrofotometricamente a 830 nm. O método se inicia pela adição de H₂SO₄ 10N a soluções padrão de fosfato (e de fosfolipídio) e soluções amostras, em duplicatas, que são em seguida aquecidas por 30 minutos a 200°C. Após o resfriamento, adiciona-se o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e faz-se novo aquecimento a 200°C por 30 minutos. Terminada a digestão, resfria-se os tubos de ensaio e adiciona-se seguidamente água destilada, solução 2,5% de molibdato de amônio e solução 10% de ácido ascórbico. Os tubos de ensaio são submetidos a aquecimento em água fervente por 7 minutos e, após este período, eles são resfriados. Faz-se a

leitura da absorvância a 830 nm e, a partir da curva padrão obtida, calcula-se a concentração de fosfolipídios na amostra.

4.2.4. Polimerização dos fosfolipídios diacetilênicos

Os experimentos para polimerização dos fosfolipídios diacetilênicos foram realizados após a formação das vesículas, mediante irradiação da suspensão de lipossomas com luz ultra-violeta (UV), cuja fonte era uma lâmpada Germetec, Modelo LTD-64-S (64W/220V/60Hz). A irradiação foi realizada com a amostra da suspensão de lipossomas colocada em cubeta de quartzo suprasil de 10mm de percurso óptico (dimensões externas: 12,5mm x 12,5mm x 45mm – Hellma) posicionada a 5cm de distância da lâmpada, em uma camisa de alumínio com circulação de água a 4°C (Figura 4.1). Durante a irradiação, a amostra foi parcialmente homogeneizada através de agitação magnética. O acompanhamento da reação de polimerização foi realizado através de espectrometria na região do ultra-violeta e do visível (UV/vis), no espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A - Diode Array Spectrophotometer (ou espectrofotômetro Hitachi, mod. 2001).

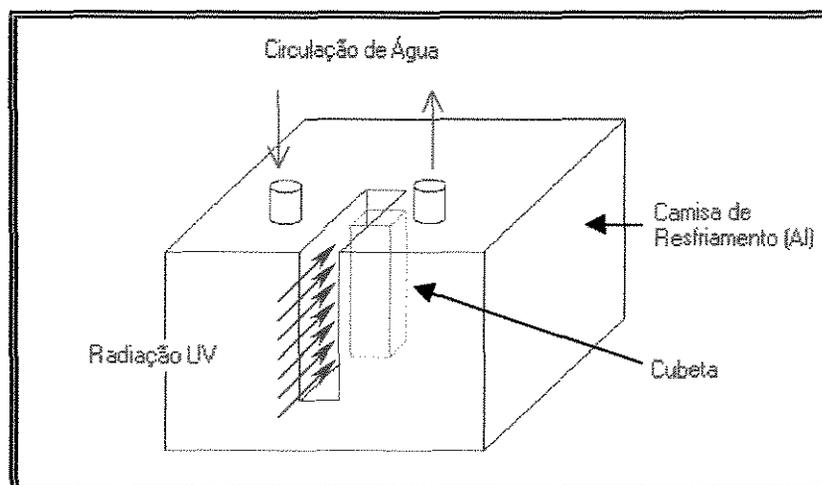


Figura 4.1: Representação esquemática da camisa de resfriamento usada para irradiação da suspensão de lipossomas.

Foram realizadas medidas da potência radiante recebida por unidade de área com um sensor UV (Radiômetro com microprocessador VLX-3W CE) posicionado a 5,0cm distância da lâmpada UV. A intensidade de radiação recebida pela amostra a 5cm foi $I=2,892\text{mW/cm}^2$ para $\lambda=254\text{nm}$; $I=0,202\text{mW/cm}^2$ para $\lambda=312\text{nm}$; e $I=0,064\text{mW/cm}^2$ para $\lambda=365\text{nm}$.

4.2.5. Estabilidade dos lipossomas em presença de tensoativos

Primeiramente foi preparada suspensão de lipossomas em tampão Hepes 10mM pH7,4 a partir do fosfolipídio diacetilênico. Ela foi purgada com nitrogênio, e, em seguida, uma alíquota submetida à irradiação com luz UV por 2 horas (ou 6 horas), determinando-se posteriormente a concentração de fosfolipídios em cada suspensão.

Logo após a preparação da suspensão de lipossomas, foram realizados os ensaios de estabilidade frente a tensoativo, como descrito a seguir: em poços previamente definidos de uma placa do tipo ELISA, foram adicionados (em duplicatas) volumes adequados de solução de tensoativo 50mM e de tampão Hepes 10mM pH7,4 para a obtenção das concentrações de tensoativo desejadas. Em seguida, adicionou-se a suspensão de lipossomas diluída para 2,5mM com o tampão, agitando-se cuidadosamente a placa ao final da adição. A placa foi deixada em repouso durante 2 horas, sob temperatura ambiente, coberta com um filme plástico para evitar variações decorrentes da evaporação da água. Ao final desse período, foram realizadas as medidas de absorbância a 340nm (Leitora de placas tipo ELISA, mod. Elx 808 / Bio-tek Instruments, Inc.). Os ensaios foram realizados com os tensoativos $C_{12}E_5$ (polioxietileno-5-lauril éter; PM=406), taurocolato de sódio (PM=537,7) e Triton-X100 (PM=625), e com os lipossomas monoméricos e poliméricos preparados a partir dos fosfolipídios diacetilênicos $DC_{8,9}PC$ (Avanti Polar Lipids Inc.), $DC_{8,3}PC$ (*1a*) e $DC_{2,15}PC$ (*1c*).

4.2.6. Redução das insaturações em lipossomas polimerizados

Em balão septado contendo 3,0mL de suspensão 1mM de lipossomas polimerizados de DC_{8,9}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4 , sob temperatura de 37°C±2°C, sob atmosfera inerte (argônio) e submetida à agitação, adicionaram-se os reagentes CuCl₂, H₂O₂ e monohidrato de hidrazina nas condições e quantidades apresentadas na Tabela 4.1. A hidrazina foi sempre o último reagente a ser incorporado ao meio reacional. Os diferentes meios reacionais foram mantidos nas condições acima descritas durante uma noite. Após este período realizou-se a espectroscopia na região do UV/visível (espectrofotômetro Hewlett Packard 8452A - Diode Array Spectrophotometer) e avaliou-se qualitativamente o andamento da reação através da comparação com um branco composto somente pela suspensão lipídica polimerizada, mantida nas mesmas condições de temperatura, atmosfera inerte, agitação e tempo de reação.

Tabela 4.1: Reagentes e suas quantidades utilizados na reação de redução do polímero obtido pela irradiação dos fosfolípidios diacetilênicos DC_{8,9}PC previamente agregados em lipossomas.

Reagente	Meio 1	Meio 2	Meio 3
Solução aquosa 1mM de CuCl ₂	---	3 gotas	3 gotas
Solução aquosa 30% de H ₂ O ₂	---	---	0,15mL
Monohidrato de hidrazina	0,15mL	0,15mL	0,15mL

4.3. Avaliação da encapsulação de drogas hidrofílicas

4.3.1. Estabilidade da isoniazida e da pirazinamida em relação à radiação UV

Preparou-se uma solução 75mM de isoniazida (Iz) em tampão Hepes 10mM pH7,4, que foi submetida à irradiação com luz UV, a 4°C, posicionada a 5cm de distância da lâmpada, durante 2 horas (mesmas condições usadas para a polimerização dos fosfolípidios nos lipossomas). Após este período a amostra irradiada foi diluída para 0,375mM e fêz-se a leitura do espectro UV/vis

(espectrofotômetro Hitachi, mod. 2001), que foi comparado com o obtido para a solução 0,375mM de Iz não irradiada. Procedeu-se da mesma forma com a pirazinamida (Pz).

4.3.2. Quantificação da isoniazida

A quantificação da isoniazida foi realizada através de uma curva padrão da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4. Soluções do composto nas concentrações de 0mM, 0,001mM, 0,005mM, 0,010mM, 0,025mM, 0,050mM, 0,100mM, 0,150mM e 0,210mM tiveram suas absorbâncias determinadas a 260nm em duplicatas (espectrofotômetro Hitachi, mod. 2001), e a curva relacionando a absorbância em função da concentração foi levantada.

Para a quantificação da isoniazida encapsulada nos lipossomas, preparou-se uma curva padrão da droga em tampão e etanol, nas mesmas condições usadas para o rompimento das vesículas. Fez-se a adição de 2700 μ l de etanol sobre 150 μ l de solução de isoniazida em tampão Hepes 10mM pH7,4, nas concentrações 0mM, 0,1mM, 0,2mM, 0,4mM, 0,6mM, 0,8mM, 1,0mM, 1,2mM, 1,6mM, 1,8mM, 2,0mM, 3,0mM e 4,0mM (em duplicatas). Em seguida quantificou-se a absorbância da solução resultante a 260nm.

4.3.3. Encapsulação de isoniazida em lipossomas polimerizados

Foram preparados lipossomas a partir dos fosfolipídios diacetilênicos DC_{8,9}PC (*9b*) e DC_{2,15}PC (*9a*) sintetizados previamente. Uma alíquota de cada suspensão de lipossomas foi submetida à irradiação UV durante 2 horas (ou 6 horas) e, em seguida, iguais volumes das suspensões de lipossomas poliméricos foram distribuídos em balões esféricos. Posteriormente se adicionou um volume fixo de solução de isoniazida (com concentração adequada para se obter a desejada relação molar droga:lipídio inicial) em tampão Hepes 10mM pH7,4 a cada balão. As suspensões foram agitadas manualmente e em seguida congeladas em banho de nitrogênio líquido (-196°C), sob rotação em rotaevaporador (vácuo desligado), e

posteriormente submetidas à liofilização por uma noite (liofilizador Edwards L5KR).

A encapsulação do composto terapêutico foi realizado através da reidratação dos lipossomas liofilizados com solução tampão Hepes 10mM pH7,4 .

Para a quantificação da droga encapsulada nos lipossomas, realizou-se a ultrafiltração (Célula de ultrafiltração Amicon – 50mL; Membrana: XM50, PAN/PVC copolymer, diâmetro=44,5mm, NMWL: 50,000, Millipore) das suspensões de lipossomas reidratados com tampão Hepes 10mM pH7,4. A cerca de 5mL de suspensão lipídica reidratada, adicionou-se 25mL de tampão e se procedeu à primeira ultra-filtração, recuperando-se cerca de 20mL de filtrado. Para cada repetição posterior desse processo, o volume de tampão adicionado foi fixado em 20mL. A concentração da droga foi monitorada nos filtrados através da quantificação da isoniazida em cada volume de filtrado recuperado, interrompendo-se os ciclos de ultra-filtração ao se atingir uma concentração insignificante da droga no filtrado. Uma alíquota da suspensão lipídica retida foi submetida ao tratamento com etanol durante 4 horas para o rompimento das vesículas (a 150µL de suspensão de lipossomas foram adicionados 2700µL de etanol). Após o período citado, procedeu-se à leitura da absorbância a 260nm (espectrofotômetro Hitachi, mod. 2001) das amostras obtendo-se a concentração da isoniazida através da sua curva padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

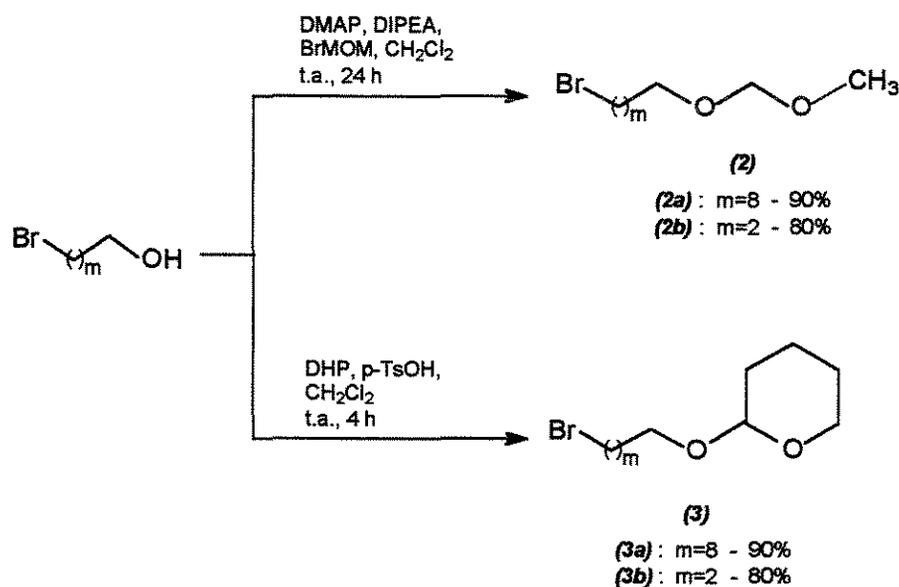
5.1. Síntese e Caracterização dos Fosfolipídios Diacetilênicos

Nesta etapa os fosfolipídios diacetilênicos DC_{8,3}PC, DC_{8,9}PC e DC_{2,15}PC foram sintetizados e caracterizados, avaliando-se a influência da substituição do grupo protetor MOM pelo grupo THP, da substituição do co-solvente HMPA por DMPU, o rendimento do processo, a estabilidade de compostos intermediários e o comportamento de agregação dos lipídios em monocamada na interface ar-água.

5.1.1. Síntese química

A seguir são apresentados os resultados obtidos para cada etapa da síntese em termos dos rendimentos parciais, apresentando-se também a caracterização básica de cada composto sintetizado.

5.1.1.1. Preparação dos ω -bromo-1-alcanóis protegidos ω -bromo-1-(metoximetil) alanol (2) e ω -bromo-1-(tetraidropiranyl)alanol (3)



Esquema 5.1: Reação de proteção dos ω -bromoalcanóis com os grupos protetores MOM e THP.

A síntese dos ácidos diacetilênicos foi iniciada pela preparação dos ω -bromo-1-(metoximetil)alcanóis **2a** e **2b**, através de uma metodologia diferente daquela apresentada por Xu et al. (1991). A reação do 9-bromononanol com o BrMOM, promovida por DMAP e em presença de DIPEA, resultou na formação do composto 9-bromo-1-(metoximetil)nonanol **2a** como um líquido incolor, com rendimento de 90%. E a mesma reação realizada com o 3-bromopropanol gerou o 3-bromo-1-(metoximetil)nonanol **2b**, também um líquido incolor, com rendimento de 80% após cuidadosa evaporação dos solventes durante a obtenção do produto bruto e após a sua purificação (Esquema 5.1). Devido à elevada volatilidade apresentada pelo composto **2b**, nas primeiras tentativas de sua preparação as perdas foram significativas, resultando em baixos rendimentos. Para se tentar contornar o problema da alta volatilidade do 3-bromo-1-(metoximetil)propanol **2b**, e, também, do intermediário seguinte da síntese derivado dele (**4b**), o grupo protetor metoximetila (MOM) foi substituído pelo grupo tetraidropirano (THP), de maior peso molecular. Os rendimentos obtidos para a reação de proteção dos mesmos ω -bromoalcanóis com DHP, em presença de *p*-TsOH catalítico, foram tão bons quanto aos obtidos na reação de proteção com o grupo MOM. O composto 9-bromo-1-(tetraidropiranyl)nonanol **3a** foi obtido com 90% de rendimento, e o 3-bromo-1-(tetraidropiranyl)propanol **3b** foi gerado com rendimento de 80%, com ambos apresentando-se como líquidos incolores nas condições ambiente.

9-Bromo-1-(metoximetil)nonanol (2a):

IV (cm^{-1}): 2929; 2854; 1464; 1385; 1244; 1213; 1149; 1111; 1047; 919; 723; 644.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ ($\text{CCl}_4/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$) (δ , ppm): 4,48 (s, OCH_2O , 2H); 3,42 (t, $-\text{CH}_2-\text{O}$, 2H, $J=6,4\text{Hz}$); 3,34 (t, BrCH_2 , 2H, $J=6,8\text{ Hz}$); 3,26 (s, OCH_3 , 3H); 1,27-1,89 (m, $(\text{CH}_2)_7$, 14H).

3-Bromo-1-(metoximetil)propanol (2b):

IV (cm^{-1}): 3422, 2930; 2878; 1467; 1441; 1383; 1284; 1258; 1219; 1144; 1111; 1083; 1047; 920; 767; 566.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ ($\text{CCl}_4/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$) (δ , ppm): 4,52 (s, OCH_2O , 2H); 3,59 (t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H, $J=5,7\text{Hz}$); 3,47 (t, BrCH_2 , 2H, $J=6,6\text{Hz}$); 3,30 (s, OCH_3 , 3H); 2,08 (quinteto, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H, $J=6,1\text{Hz}$).

9-Bromo-1-(tetraidropiranyl)nonanol (3a):

IV (cm^{-1}): 2932; 2855; 1453; 1352; 1201; 1135; 1120; 1078; 1033; 905; 869.

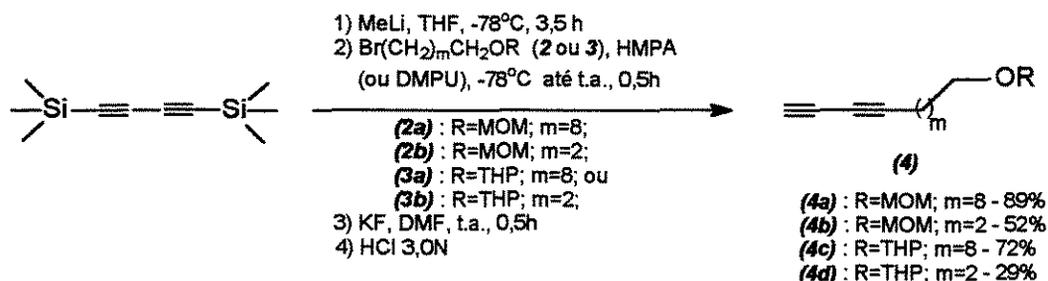
$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 4,55 (t, OCHO, 1H, $J=3,6\text{Hz}$); 3,33-3,87 (m, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{Br}$, $\text{Br}(\text{CH}_2)_9\text{OCHOCH}_2$, 6H); 1,28-1,86 (m, $(\text{CH}_2)_{10}$, 20H).

3-Bromo-1-(tetraidropiranyl)propanol (3b):

IV (cm^{-1}): 3422; 2942; 2869; 1586; 1438; 1349; 1201; 1129; 1077; 1033; 985; 869.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 4,60 (t, OCHO, 1H, $J=3,2\text{Hz}$); 3,83-3,90 (m, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{Br}$, 2H); 3,47-3,55 (m, BrCH_2 , $\text{Br}(\text{CH}_2)_3\text{OCHOCH}_2$, 4H); 2,13 (quinteto, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H, $J=6,3\text{Hz}$); 1,52-1,70 (m, $(\text{CH}_2)_3$, 6H).

5.1.1.2. Preparação dos intermediários ω -(metoximetil)-1,3-alcadiinol e ω -(tetraidropiranyl)-1,3-alcadiinol (4)



Esquema 5.2: Reação de monoalquilação para a preparação dos intermediários

ω -(metoximetil)-1,3-alcadiinol e ω -(tetraidropiranyl)-1,3-alcadiinol (4).

A introdução do cromóforo 1,3-butadiino foi realizada com a monodesproteção do BTMSBD através da reação com metil-lítio, gerando o intermediário trimetilsilil-1,3-butadiinil lítio, seguida pelo acoplamento com o ω -bromo-1-alcanol protegido 2 ou 3 (Esquema 5.2). Para esta reação acontecer de forma eficiente, é crítico se utilizar a quantidade estequiométrica exata necessária para a monodesproteção. Por isso todo o reagente metil-lítio utilizado (complexado com brometo de lítio e estocado em solução de éter etílico) teve sua concentração previamente determinada através do método de Watson-Eastman (Watson e Eastman, 1967). Outro ponto importante dessa etapa da síntese é a neutralização com solução de HCl. Para se evitar a adição de um excesso de ácido,

com consequente diminuição do rendimento da reação, optou-se por se conduzir a neutralização com solução 0,3N de HCl, ao invés de solução 3,0N descrita na metodologia original (Xu et al., 1991). Com esses cuidados, conseguiu-se obter os compostos diacetilênicos 13-(metoximetil)-1,3-tridecadiinol (**4a**), 7-(metoximetil)-1,3-heptadiinol (**4b**), 13-(tetraidropiranyl)-1,3-tridecadiinol (**4c**), e 7-(tetraidropiranyl)-1,3-heptadiinol (**4d**) com rendimentos de 89%, 52%, 72% e 29%, respectivamente. Os quatro compostos apresentaram-se como líquidos amarelos, porém os que continham o grupo MOM eram mais claros. Observando-se os resultados alcançados nesta etapa, verifica-se que a substituição do grupo protetor MOM pelo grupo THP gerou um acentuado decréscimo no rendimento da reação, que passou de 89% para 72% para os intermediários análogos de cadeia mais longa (13 átomos de carbono na cadeia principal), e de 52% para 29% para os intermediários de cadeia menor (7 átomos de carbono na cadeia principal da molécula). A substituição do reagente HMPA por DMPU foi examinada para as preparações dos compostos **4c** e **4d**, verificando-se não ocorrer alteração significativa dos rendimentos ao se empregar um ou outro reagente (Tabela 5.1).

13-(Metoximetil)-1,3-tridecadiinol (4a):

IV (cm^{-1}): 3302; 3244; 2931; 2855; 2224; 1465; 1386; 1214; 1145; 1111; 1044; 918; 618.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ ($\text{CCl}_4/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$) (δ , ppm): 4,48 (s, O-CH₂-O, 2H); 3,42 (t, -CH₂-O, 2H, J=6,5Hz); 3,26 (s, O-CH₃, 3H); 2,25 (t, CH₂-C \equiv C, 2H, J=7,0Hz); 1,82 (s, HC \equiv C, 1H); 1,32-1,55 (m, -(CH₂)₇-, 14H).

7-(Metoximetil)-1,3-heptadiinol (4b):

IV (cm^{-1}): 3288; 2936; 2884; 2227; 1442; 1383; 1222; 1150; 1112; 1039; 919.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ ($\text{CCl}_4/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$) (δ , ppm): 4,52 (s, O-CH₂-O, 2H); 3,55 (t, -CH₂-O, 2H, J=5,9Hz); 3,29 (s, O-CH₃, 3H); 2,38 (t, CH₂-C \equiv C, 2H, J=6,9Hz); 1,97 (s, HC \equiv C, 1H); 1,75-1,83 (m, CH₂-CH₂-CH₂, 2H).

13-(Tetraidropiranyl)-1,3-tridecadiinol (4c):

IV (cm^{-1}): 3311; 2932; 2856; 2225; 1466; 1454; 1441; 1352; 1323; 1260; 1201; 1184; 1136; 1120; 1078; 1032; 905; 869; 814.

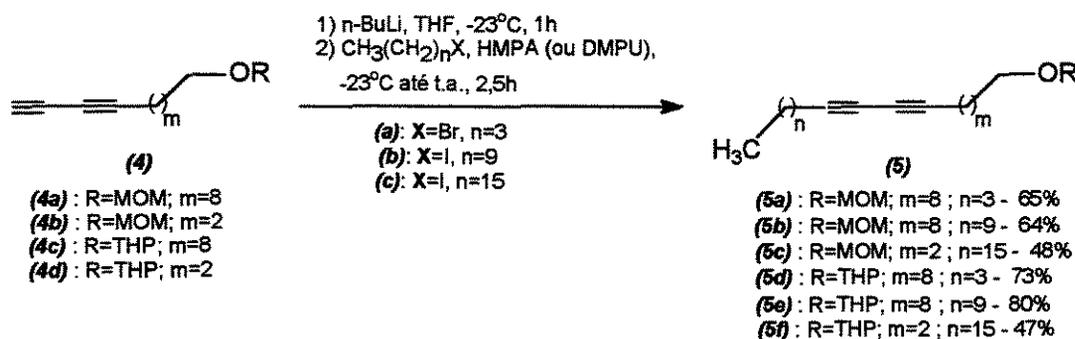
$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 4,57 (t, OCHO, 1H, $J=3,4\text{Hz}$); 3,36-3,86 (m, $(\text{CH}_2\text{O})_2$, 4H); 2,24 (t, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$, 2H, $J=7,0\text{Hz}$); 1,95 (s, $\text{HC}\equiv\text{C}$, 1H); 1,29-1,89 (m, $(\text{CH}_2)_4$, 8H).

7-(Tetrahidropiranyl)-1,3-heptadiinol (4d):

IV (cm^{-1}): 3301; 2942; 2871; 2361; 2222; 1441; 1353; 1323; 1284; 1258; 1201; 1184; 1134; 1119; 1077; 1033; 985; 932; 869; 815.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 4,58 (t, OCHO, 1H, $J=3,3\text{Hz}$); 3,77-3,86 (m, $\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{O}$, 2H); 3,42-3,52 (m, $\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2$, 2H); 2,39 (t, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}$, 2H, $J=7,0\text{Hz}$); 1,96 (s, $\text{HC}\equiv\text{C}$, 1H); 1,51-1,89 (m, $(\text{CH}_2)_4$, 8H).

5.1.1.3. Preparação do 1-(metoximetil)alcadiinol e do 1-(tetraidropiranyl)alcadiinol (5)



Esquema 5.3: Reação de alquilação do diino terminal para a preparação dos intermediários 5.

A desprotonação do diino terminal do intermediário 4 com o reagente n-butil-lítio, precedida pela alquilação com os haloalcanos adequados (a, b ou c), levou à preparação dos compostos 1-(metoximetil)-10,12-heptadecadiinol (5a), 1-(metoximetil)-10,12-tricosadiinol (5b), 1-(tetraidropiranyl)-10,12-heptadecadiinol (5d) e 1-(tetraidropiranyl)-10,12-tricosadiinol (5e) com rendimentos de 65%, 64%, 73% e 80%, respectivamente (Esquema 5.3). Estes valores são similares aos descritos na literatura para a obtenção de compostos análogos, com as hidroxilas protegidas com o grupo MOM (63% a 79% - Xu et al., 1991). Os compostos 1-(metoximetil)-4,6-tricosadiinol (5c) e 1-(tetraidropiranyl)-4,6-tricosadiinol (5f), foram obtidos com rendimentos inferiores, mas similares (respectivamente 48% e 47%). Todos os compostos (5a-f) apresentaram-se como líquidos amarelos nas

condições ambiente. Verificando-se os resultados das reações para a preparação do composto **5**, observa-se que a variação dos rendimentos parece estar mais intimamente associada ao posicionamento do grupo diino na molécula alvo, do que ao grupo protetor presente (MOM ou THP). Testado para algumas dessas reações, o DMPU demonstrou ser um adequado substituto para o HMPA (Tabela 4.1).

1-(Metoximetil)-10,12-heptadecadiinol (5a):

IV (cm^{-1}): 3442; 2930; 2856; 1464; 1383; 1322; 1211; 1145; 1112; 1045; 919; 722.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ ($\text{CCL}_4/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$) (δ , ppm): 4,48 (s, O-CH₂-O, 2H); 3,41 (t, -CH₂-O, 2H, J=6,4Hz); 3,26 (s, O-CH₃, 3H); 2,21 (t, (CH₂-C≡C)₂, 4H, J=6,0Hz); 1,25-1,54 (m, -(CH₂)₁₅-, 30H); 0,94 (t, ω-CH₃, 3 H, J=7,1Hz).

1-(Metoximetil)-10,12-tricosadiinol (5b):

IV (cm^{-1}): 2927; 2854; 1466; 1385; 1323; 1213; 1146; 1111; 1045; 920; 721.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 4,61 (s, O-CH₂-O, 2H); 3,51 (t, -CH₂-O, 2H, J=6,6Hz); 3,36 (s, O-CH₃, 3H); 2,23 (t, (CH₂-C≡C)₂, 4H, J=6,9Hz); 1,25-1,59 (m, -(CH₂)₁₅-, 30H); 0,87 (t, ω-CH₃, 3H, J=6,6Hz).

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ ($\text{CCL}_4/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$) (δ , ppm): 4,47 (s, O-CH₂-O, 2H); 3,41 (t, -CH₂-O, 2H, J=6,4Hz); 3,26 (s, O-CH₃, 3H); 2,22 (t, (CH₂-C≡C)₂, 4H, J=7,0Hz); 1,27-1,54 (m, -(CH₂)₁₅-, 30H); 0,89 (t, ω-CH₃, 3H, J=6,8Hz).

1-(Metoximetil)-4,6-tricosadiinol (5c):

IV (cm^{-1}): 2926; 2852; 1461; 1373; 1117; 909.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ ($\text{CCL}_4/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$) (δ , ppm): 4,51 (s, O-CH₂-O, 2H); 3,54 (t, -CH₂-O, 2H, J=6,0Hz); 3,28 (s, O-CH₃, 3H); 2,34 (t, CH₂(C≡C)₂-CH₂-(CH₂)₂O, 2H, J=6,9Hz); 2,22 (t, -CH₂-(C≡C)₂(CH₂)₃O, 2H, J=6,8Hz); 1,77 (quinteto, (C≡C)₂CH₂-CH₂-CH₂O, 2H, J=6,4Hz); 1,17-1,52 (m, (CH₂)₁₄, 28H); 0,89 (t, ω-CH₃, 3H, J=6,6Hz).

1-(Tetrairdopiraniil)-10,12-heptadecadiinol (5d):

IV (cm^{-1}): 2932; 2857; 1465; 1352; 1322; 1200; 1136; 1121; 1079; 1033; 905; 869; 815.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 4,57 (t, OCHO, 1H, J=3,3Hz); 3,23-3,90 (m, (CH₂O)₂, 4H); 2,20-2,26 (t, (C≡CCH₂)₂, 4H); 1,27-1,83 (m, (CH₂)₁₂, 24H); 0,89 (t, ω-CH₃, 3H, J=7,5Hz).

1-(Tetrairdopiraniil)-10,12-tricosadiinol (5e):

IV (cm^{-1}): 2927; 2855; 1466; 1352; 1323; 1200; 1136; 1121; 1079; 1033; 906; 869; 815.

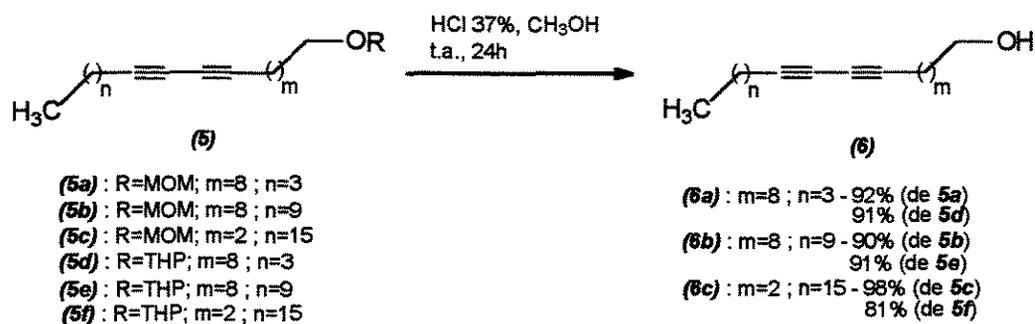
$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 4,57 (t, OCHO, 1H, $J=3,6\text{Hz}$); 3,33-3,86 (m, $(\text{CH}_2\text{O})_2$, 4H); 2,23 (t, $(\text{C}\equiv\text{CCH}_2)_2$, 4H, $J=6,9\text{Hz}$); 1,19-1,74 (m, $(\text{CH}_2)_{18}$, 36H); 0,87 (t, $\omega\text{-CH}_3$, 3H, $J=6,7\text{Hz}$).

1-(Tetrahidropiraniil)-4,6-tricosadiinol (*5f*):

IV (cm^{-1}): 2925; 2853; 1466; 1322; 1201; 1158; 1137; 1121; 1076; 1062; 1036; 1020; 991; 869; 816; 721.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 4,58 (t, O-CH-O, 1H, $J=3,4\text{Hz}$); 3,77-3,89 (m, $\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{O-CH-O}$, 2H); 3,42-3,54 (m, $\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_3\text{-O-CH-O-CH}_2$, 2H); 2,37 (t, $\text{C}\equiv\text{C-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{O}$, 2H, $J=6,7\text{Hz}$); 2,30 (t, $\text{-CH}_2\text{-(C}\equiv\text{C)}_2\text{(CH}_2)_3\text{O}$, 2H, $J=6,9\text{Hz}$); 1,18-1,82 (m, $\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{O}$, $(\text{CH}_2)_{17}$, 36H); 0,87 (t, $\omega\text{-CH}_3$, 3H, $J=6,6\text{Hz}$).

5.1.1.4. Preparação do alcadiinol-1 (*6*)



Esquema 5.4: Reação de desproteção da hidroxila para a preparação dos álcoois *6*.

A preparação dos álcoois diinólicos foi realizada pela desproteção com HCl 37% em metanol, tanto dos compostos com a hidroxila protegida com o grupo MOM (*5a*, *5b* e *5c*), quanto para aqueles protegidos com THP (*5d*, *5e* e *5f*). Os rendimentos da reação foram bons (81% a 98% - Esquema 5.4), com a obtenção do álcool 10,12-heptadecadiinol-1 (*6a*) como um líquido amarelo na temperatura ambiente. Os dois outros álcoois, 10,12-tricosadiinol-1 (*6b*) e 4,6-tricosadiinol-1 (*6c*), foram obtidos como sólidos à temperatura ambiente. A simples precipitação destes álcoois pela evaporação dos solventes, logo após a purificação por cromatografia flash, permite uma agregação na fase sólida favorável à polimerização dos compostos, que se torna perceptível a olho nú pela alteração da cor do sólido para o azul em questão de minutos.

10,12-Heptadecadiinol-1 (6a):

IV (cm^{-1}): 3345; 2930; 2857; 1465; 1427; 1321; 1056.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ ($\text{CCl}_4/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$) (δ , ppm): 3,54 (t, $\text{CH}_2\text{-OH}$, 2H, $J=6,2\text{Hz}$); 2,23 (t, $\text{CH}_2(\text{C}\equiv\text{C})_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_8\text{OH}$, 2H, $J=5,7\text{Hz}$); 2,22 (t, $\text{-CH}_2\text{-(C}\equiv\text{C})_2(\text{CH}_2)_9\text{OH}$, 2H, $J=5,8\text{Hz}$); 1,25-1,54 (m, $(\text{CH}_2)_9$, CH_2OH , 19H); 0,93 (t, $\omega\text{-CH}_3$, 3H, $J=7,2\text{Hz}$).

10,12-Tricosadiinol-1 (6b):

IV (cm^{-1}): 3413; 2919; 2850; 1468; 1343; 1056; 716.

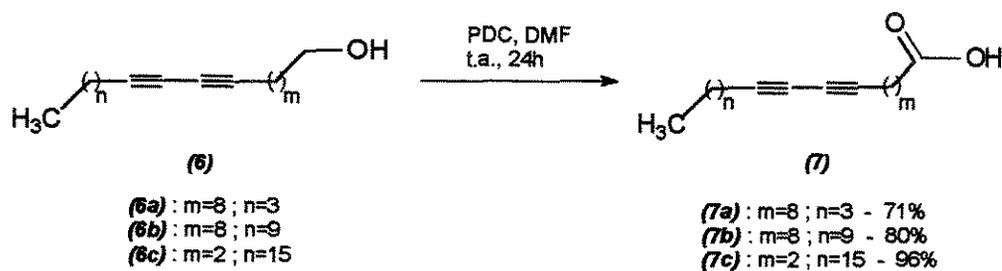
$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 3,63 (t, $\text{CH}_2\text{-OH}$, 2H, $J=6,6\text{Hz}$); 2,23 (t, $(\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C})_2$, 4H, $J=6,8\text{Hz}$); 1,19-1,58 (m, $(\text{CH}_2)_{15}$, 30 H; CH_2OH , 1H); 0,87 (t, $\omega\text{-CH}_3$, 3H, $J=6,7\text{Hz}$).

4,6-Tricosadiinol-1 (6c):

Ponto de fusão: $56^\circ\text{C} - 58^\circ\text{C}$

IV (cm^{-1}): 3202; 2920; 2849; 1471; 1423; 1056; 908; 713.

$^1\text{H-RMN}/300\text{MHz}$ ($\text{CCl}_4/\text{TMS}/\text{D}_2\text{O}$) (δ , ppm): 3,70 (t, $\text{CH}_2\text{-OH}$, 2H, $J=5,9\text{Hz}$); 2,36 (t, $\text{CH}_2(\text{C}\equiv\text{C})_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{OH}$, 2H, $J=7,0\text{Hz}$); 2,22 (t, $\text{-CH}_2\text{-(C}\equiv\text{C})_2(\text{CH}_2)_3\text{OH}$, 2H, $J=6,9\text{Hz}$); 1,73 (quinteto, $(\text{C}\equiv\text{C})_2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$, 2H, $J=6,4\text{Hz}$); 1,17-1,52 (m, $(\text{CH}_2)_{14}$ e $\text{CH}_2\text{-OH}$, 29H); 0,89 (t, $\omega\text{-CH}_3$, 3H, $J=6,9\text{Hz}$).

5.1.1.5. Preparação do ácido alcadiinóico (7)

Esquema 5.5: Reação de oxidação dos álcoois **6** para a preparação dos ácidos carboxílicos diacetilênicos **7**.

A oxidação dos álcoois **6a**, **6b** e **6c** com PDC até os correspondentes ácidos 10,12-heptadecadiinóico (**7a**), 10,12-tricosadiinóico (**7b**) e 4,6-tricosadiinóico (**7c**), foi obtida com bons rendimentos (71%, 80% e 96%, respectivamente)

(Esquema 5.5). No caso das reações realizadas com os álcoois de cadeia mais longa **6b** e **6c**, ambos na fase sólida sob as condições ambiente, a liofilização dos reagentes possibilitou a obtenção de rendimentos superiores aos observados quando esse processo não era realizado. Os três ácidos carboxílicos diacetilênicos sintetizados apresentam-se na fase sólida sob as condições ambiente. Estes ácidos diacetilênicos também sofrem polimerização ao precipitarem como sólidos em decorrência da evaporação dos solventes, mas esta reação é ainda mais rápida que a observada para os álcoois. A estocagem dos ácidos era feita em solução de clorofórmio, sob refrigeração ($\sim 4^{\circ}\text{C}$); ou então em solução de benzeno congelada e mantida em freezer, como descrito para os álcoois. A liofilização dos ácidos diacetilênicos tornou mais lenta a reação de polimerização, permitindo a manipulação dos compostos na fase sólida por algumas poucas horas antes de tornar visualmente perceptível a alteração de cor. Esse processo somente era realizado imediatamente antes da realização das análises por RMN, e antes da reação de esterificação subsequente para a preparação dos fosfolípidios diacetilênicos.

Ácido 10,12-heptadecadiinóico (7a):

IV (cm^{-1}): 2923; 2849; 1698; 1465; 1409; 1300; 929.

$^1\text{H-RMN/300MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 2,34 (t, CH_2COO , 2H, $J=7,5\text{Hz}$); 2,21-2,27 (m, $(\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C})_2$, 4H); 1,25-1,79 (m, $(\text{CH}_2)_8$, 16H); 0,90 (t, $\omega\text{-CH}_3$, 3H, $J=7,1\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-RMN/75MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 180,04 (COOH); 77,42; 77,00; 76,58; 65,27; 65,18; 33,89; 32,48; 30,28; 28,95; 28,92; 28,87; 28,81; 28,76; 28,63; 28,55; 28,17; 26,68; 24,51; 21,80; 19,05; 18,76; 13,39 ($\omega\text{-CH}_3$).

Ácido 10,12-tricosadiinóico (7b):

IV (cm^{-1}): 3019; 2924; 2854; 1708; 1464; 1415; 1300; 1216; 932; 758; 726; 669.

$^1\text{H-RMN/300MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 2,34 (t, CH_2COO , 2H, $J=7,5\text{Hz}$); 2,24 (t, $(\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{C})_2$, 4H, $J=6,9\text{Hz}$); 1,19-1,65 (m, $(\text{CH}_2)_{14}$, 28 H); 0,88 (t, $\omega\text{-CH}_3$, 3H, $J=6,8\text{Hz}$).

$^{13}\text{C-RMN/75MHz}$ (CDCl_3) (δ , ppm): 179,59 (COOH); 77,58; 77,40; 76,98; 76,56; 65,27; 65,18; 33,87; 31,84; 29,50; 29,41; 29,25; 29,04; 28,99; 28,92; 28,79; 28,68; 28,29; 28,23; 24,56; 22,61; 19,06; 14,03 ($\omega\text{-CH}_3$).

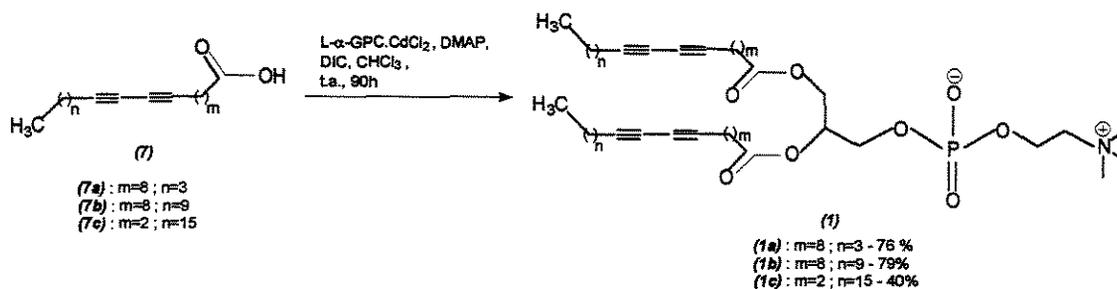
Ácido 4,6-tricosadiinoico (7c):

Ponto de fusão: 83°C – 85°C (polimerização)

IV (cm⁻¹): 2918; 2847; 1689; 1461; 1431; 1214; 1175; 924; 724.

¹H-RMN/300MHz (CDCl₃) (δ, ppm): 2,59 (m, C≡C-(CH₂)₂-COO, 4H); 2,24 (t, CH₂-C≡C)(CH₂)₂COO, 2H, J=7,0Hz); 1,18-1,53 (m, (CH₂)₁₄, 28H); 0,88 (t, ω-CH₃, 3H, J=6,7Hz).

¹³C-RMN/75MHz (CDCl₃) (δ, ppm): 175,96 (COOH); 78,55; 77,39; 77,16; 76,97; 76,55; 74,41; 66,32; 64,93; 32,58; 31,80; 29,56; 29,34; 29,24; 28,96; 28,76; 28,18; 22,55; 19,06; 14,82; 13,91(ω-CH₃).

5.1.1.6. Preparação da fosfatidilcolina diacetilênica (1)

Esquema 5.6: Reação de esterificação dos ácidos 7 à glicerofosforilcolina para a preparação das fosfatidilcolinas diacetilênicas 1.

A reação de esterificação dos ácidos diacetilênicos 7 utilizando-se o reagente DIC como agente promotor do acoplamento (Esquema 5.6) resultou em bons rendimentos para a preparação dos produtos 1,2-bis(10',12'-heptadecadiinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (**1a**) e 1,2-bis(10',12'-tricosadiinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (**1b**) (76% e 79%, respectivamente). Porém para a preparação do fosfolipídio diacetilênico 1,2-bis(4',6'-tricosadiinoil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (**1c**) o rendimento foi inferior aos anteriores (40%), mantidas as mesmas condições de reação.

As fosfatidilcolinas diacetilênicas **1a** (DC_{8,3}PC) e **1c** (DC_{2,15}PC) sintetizadas neste trabalho são compostos inéditos na literatura.

1,2-Bis(10',12'-heptadecadiinóil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (1a):

IV (cm⁻¹): 3392; 2932; 2857; 1737; 1657; 1466; 1426; 1237; 1177; 1089; 1065; 970; 759.

¹H-RMN/500MHz (CDCl₃) (δ, ppm): 5,17 (m, 1H, CH₂CHCH₂); 3,80-4,38 (m, 10H, POCH₂CH₂N, CH₂CHCH₂, 1H₂O); 3,35 (s, 9H, N(CH₃)₃); 2,21-2,29 (m, 12H, (CH₂COO)₂, (CH₂-C≡C)₄); 1,23-1,56 (m, 32H, (CH₂)₁₆); 0,89 (t, 6H, (ω-CH₃)₂, J=7,3Hz).

¹³C-RMN/75MHz (CDCl₃) (δ, ppm): 173,57 (CH₂OCO); 173,22 (CH₂OCO); 77,38; 76,97; 76,55; 70,56; 70,45; 66,38; 65,26; 63,34; 62,96; 59,30; 54,37; 34,16; 33,96; 30,28; 29,54; 28,99; 28,83; 28,70; 28,56; 28,24; 24,78; 21,77; 19,05; 18,73; 13,33 (ω-CH₃).

Análise elementar: C₄₂H₆₈NO₈P.2H₂O

Calculado: C 64,49%; H 9,28%; N 1,79%

Obtido experimentalmente: C 64,37%; H 9,59%; N 1,95%

1,2-Bis(10',12'-tricosadiinóil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (1b):

IV (cm⁻¹): 3393; 2919; 2850; 1724; 1651; 1469; 1418; 1238; 1176; 1090; 971; 719.

¹H-RMN/300MHz (CDCl₃) (δ, ppm): 5,20 (m, 1H, CH₂CHCH₂); 3,74-4,47 (m, 16H, POCH₂CH₂N, CH₂CHCH₂, 4H₂O); 3,31 (s, 9H, N(CH₃)₃); 2,21-2,29 (m, 12H, (CH₂COO)₂, (CH₂-C≡C)₄); 1,25-1,55 (m, 56H, (CH₂)₂₈); 0,87 (t, 6H, (ω-CH₃)₂, J=6,8Hz).

¹³C-RMN/75MHz (CDCl₃) (δ, ppm): 173,06 (CH₂OCO); 172,72 (CH₂OCO); 77,07; 76,98; 76,90; 76,56; 76,12; 64,87; 64,79; 53,89; 33,79; 33,62; 31,43; 29,10; 29,02; 28,84; 28,74; 28,71; 28,63; 28,53; 28,40; 27,92; 24,43; 24,35; 22,21; 18,73; 13,65 (ω-CH₃).

Análise elementar: C₅₄H₉₂NO₈P.4H₂O

Calculado: C 65,74%; H 10,22%; N 1,42%

Obtido experimentalmente: C 65,77%; H 9,91%; N 1,56%

1,2-Bis(4',6'-tricosadiinóil)-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (1c):

IV (cm⁻¹): 3411; 2918; 2850; 1720; 1640; 1472; 1233; 1089; 1064; 971; 717.

¹H-RMN/300MHz (CDCl₃) (δ, ppm): 5,22 (m, 1H, CH₂CHCH₂); 3,81-4,42 (m, 12H, POCH₂CH₂N, CH₂CHCH₂, 2H₂O); 3,35 (s, 9H, N(CH₃)₃); 2,56 (m, 8H, (C≡CCH₂CH₂COO)₂); 2,23 (t, 4H, (C≡CCH₂)₂, J=7,0Hz); 1,20-1,53 (m, 56H, (CH₂)₂₈); 0,87 (t, 6H, (ω-CH₃)₂, J=6,4Hz).

¹³C-RMN/75MHz (CDCl₃) (δ, ppm): 171,58 (CH₂OCO); 171,27 (CH₂OCO); 78,51; 78,43; 77,42; 77,00; 76,58; 74,97; 70,84; 66,13; 66,10; 65,01; 63,46; 63,13; 59,47; 54,38; 32,94; 32,75; 31,84; 29,61; 29,45; 29,27; 29,06; 28,87; 28,28; 22,58; 19,09; 14,91 (ω-CH₃); 13,98 (ω-CH₃).

Especrometria de Massa – m/z (%): 749 (M^+ -165,5); 403 (6); 327 (10); 313 (16); 286 (11); 169 (31); 145 (18); 131 (28); 91 (38); 71 (53); 57 (100); 55 (84).

Análise elementar: $C_{54}H_{92}NO_8P \cdot 4H_2O$

Calculado: C 65.74%; H 10.22%; N 1.42%

Obtido experimentalmente: C 65.97%; H 10.39%; N 1.54%

5.1.2. Influência do grupo protetor

A substituição do grupo protetor MOM pelo grupo de proteção THP proporcionou o efeito desejado de diminuição da volatilidade do bromo-propanol protegido **3b** e do composto derivado **4d**. Os rendimentos da etapa de proteção foram idênticos aos obtidos com o MOM, entretanto houve significativa diminuição do rendimento na etapa seguinte da síntese, na preparação dos compostos **4c** e **4d**. Dessa forma verifica-se que o mais adequado em termos de rendimento das duas etapas iniciais da síntese é se utilizar o grupo protetor MOM, com os necessários cuidados na manipulação dos compostos **3b** e **4d** para se evitar perdas decorrentes da volatilização durante a recuperação dessas moléculas ao final da reação.

5.1.3. Influência do co-solvente

O reagente HMPA, utilizado como co-solvente nucleofílico em duas reações intermediárias da síntese, é extremamente tóxico (mutagênico e cancerígeno). Sua manipulação envolve riscos, tanto pessoal quanto ambiental, motivo pelo qual se tentou substituí-lo pelo DMPU, reagente similar porém menos crítico quanto à toxicidez. Na Tabela 5.1 são comparados os rendimentos obtidos quando um ou outro co-solvente é utilizado na preparação de alguns dos intermediários **4** e **5**. De uma maneira geral, os rendimentos praticamente não sofreram alteração ao se substituir o HMPA pelo DMPU na preparação de compostos idênticos (**4c**, **4d** e **5e**), ou mesmo na preparação de compostos similares (**5a**, **5d**, **5c** e **5f**).

Tabela 5.1: Comparação dos rendimentos obtidos para a preparação de alguns dos compostos intermediários *4* e *5* conforme o co-solvente utilizado (HMPA ou DMPU).

Composto	Co-solvente	Rendimento (%)
<i>4c</i>	DMPU	72
<i>4c</i>	HMPA	71
<i>4d</i>	DMPU	26
<i>4d</i>	HMPA	29
<i>5a</i>	HMPA	65
<i>5d</i>	DMPU	73
<i>5e</i>	DMPU	61
<i>5e</i>	HMPA	58
<i>5c</i>	HMPA	48
<i>5f</i>	DMPU	47

5.1.4. Rendimento do processo

Os rendimentos globais de preparação dos ácidos diacetilênicos foram bastante razoáveis, considerando-se o número de etapas envolvidas na sua síntese. Os maiores rendimentos para os ácidos derivados dos intermediários protegidos com o grupo MOM (*7a*: 38%; *7b*: 41%; *7c*: 23%) em relação àqueles protegidos com o grupo THP (*7a*: 24%; *7b*: 30%; *7c*: 11%) demonstram o efeito negativo da utilização do THP como grupo protetor sobre o rendimento global da síntese.

Quanto ao rendimento da síntese dos fosfolipídios diacetilênicos DC_{8,3}PC (*1a*) e DC_{8,9}PC (*1b*) (76% e 79%, respectivamente), eles foram similares aos apresentados na literatura para compostos análogos obtidos sob condições reacionais semelhantes (Rhodes et al., 1992; Singh, 1990). Entretanto, para o fosfolipídio DC_{2,15}PC (*1c*) o rendimento foi relativamente baixo (40%). Essa última etapa da síntese dos fosfolipídios diacetilênicos envolve um grande consumo dos ácidos diacetilênicos, tendo em vista que se utiliza um excesso relativamente grande deste reagente para se obter um rendimento aceitável. Como descrito na metodologia da reação de esterificação, foram empregados 4 equivalentes do ácido para cada equivalente da glicerofosforilcolina, embora a estequiometria da reação indique que apenas dois equivalentes do ácido

carboxílico possam efetivamente reagir com cada molécula da glicerofosforilcolina. Entretanto, a utilização de quantidades de ácido diacetilênico inferiores a aproximadamente 3,5 equivalentes leva a uma substancial diminuição do rendimento da reação.

5.1.5. Estabilidade dos intermediários

Os compostos intermediários da síntese dos fosfolípidios diacetilênicos contendo o grupo diacetilênico que se apresentavam na fase sólida sob as condições ambiente (álcoois e ácidos) apresentaram uma grande propensão à polimerização. A identificação da ocorrência dessa reação indesejada era visualmente perceptível pela alteração da cor dos sólidos, passando de branco para azul.

Esta reação indesejável foi retardada através da liofilização dos álcoois **6b** e **6c** e dos ácidos **7a**, **7b** e **7c** a partir de uma solução em benzeno, tornando-se muito mais lenta. Os sólidos brancos assim obtidos permaneceram com sua cor inalterada por várias horas, permitindo tanto a preparação dos compostos para as análises quanto a sua utilização na reação subsequente da síntese de fosfatidilcolinas diacetilênicas, sem perdas significativas devido à sua polimerização. Quando necessário, estes compostos (solubilizados em benzeno e rapidamente congelados a -78°C) foram estocados durante vários dias em freezer, protegidos da luz, sem se detectar alterações decorrentes da polimerização.

5.1.6. Comportamento de agregação dos fosfolípidios diacetilênicos

A agregação dos fosfolípidios foi caracterizada por meio de filmes monoméricos na interface ar-água para cada um dos fosfolípidios diacetilênicos, obtendo-se as isotermas de Langmuir apresentadas na Figura 5.1. A isoterma referente ao DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids) apresentou comportamento similar ao relatado na literatura por Johnston et al. (1983), com exceção da região correspondente à transição da fase líquido (líquido expandido) para a fase gel (líquido condensado), na faixa de $60\text{\AA}^2/\text{molécula}$ a $100\text{\AA}^2/\text{molécula}$. Como pode

ser verificado na Fig. 5.1, à medida que o filme é comprimido, a pressão superficial (π) aumenta até 11mN/m ($A=85\text{\AA}^2/\text{molécula}$), com o aparecimento de um ponto de máximo local. A partir deste ponto, verifica-se um declive na isoterma, com uma diminuição de π com a compressão do filme, até atingir o valor mínimo de 6mN/m a $76\text{\AA}^2/\text{molécula}$. Abaixo deste valor de área por molécula, a pressão superficial volta a aumentar, desta vez abruptamente. Tanto nos dados apresentados por Johnston et al. (1983) quanto naqueles de um relato anterior para o fosfolipídio diacetilênico DC_{8,9}PC (Johnston et al, 1980), não se verifica um ponto de máximo de π tão acentuado durante esta transição de fase. Comportamento semelhante ao obtido neste trabalho, porém para outras moléculas de DCPC, foi observado em outros trabalhos (Hui et al., 1992; Thuren et al., 1983; Miller et al., 1989; Matuo et al., 1982). Segundo Hui et al. (1992), o ponto de máximo local durante a transição de fase seria decorrente de uma energia adicional necessária para alinhar os planos das ligações diacetilênicas em cadeias acila vizinhas para um maior ordenamento em relação ao arranjo hexagonal dessas cadeias, normalmente esperado na fase sólido condensado de monocamadas de fosfolipídios. Assim, seriam formados pequenos sítios de nucleação durante a primeira compressão do filme, com elevado grau de empacotamento dos fosfolipídios. Esses autores mencionam ainda o fato desse comportamento ser detectado apenas quando a taxa de compressão é baixa, ao redor de 1mm²/s para a primeira compressão.

Os outros dois fosfolipídios diacetilênicos estudados, DC_{8,3}PC (*1a*) e DC_{2,15}PC (*1c*), apresentaram comportamento convencional das isotermas, comparáveis àquelas apresentadas na literatura, referentes a compostos similares (DC_{8,4}PC e DC_{2,10}PC) (Hui et al., 1992). Pelas características dessas últimas isotermas, pode-se observar que o fosfolipídio DC_{2,15}PC é muito menos compressível, podendo formar bicamadas com estados de agregação mais densos, comparado com o DC_{8,3}PC. Os valores obtidos de área/molécula para o DC_{8,9}PC foram intermediários entre ambos após aproximadamente $80\text{\AA}^2/\text{molécula}$. O efeito do posicionamento das insaturações nas cadeias acila esterificadas ao glicerol pode ser observado somente a pressões superficiais abaixo de 10 mN/m, onde a área

ocupada por molécula no filme de DC_{8,9}PC é bem maior que a ocupada pelas moléculas de DC_{2,15}PC. Esse efeito não é tão acentuado a altas pressões.

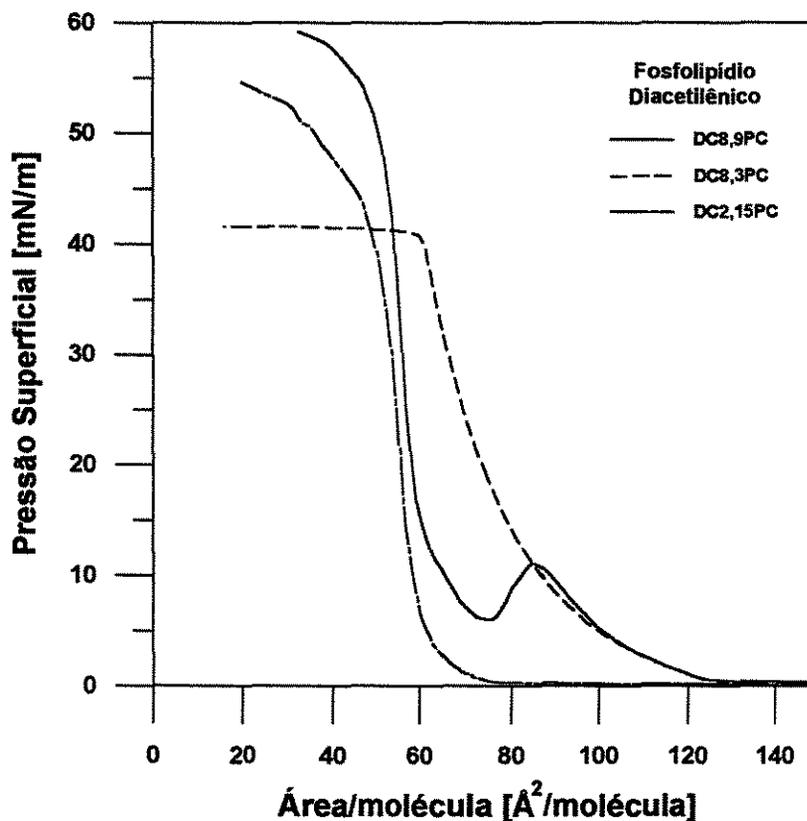


Figura 5.1: Isotermas de compressão dos fosfolipídios diacetilênicos DC_{8,9}PC, DC_{8,3}PC e DC_{2,15}PC, a 23°C (a compressão foi realizada à velocidade de 100 cm²/min).

Quando as insaturações estão localizadas em posições equivalentes, porém com diferentes tamanhos das cadeias distais, como no caso dos fosfolipídios DC_{8,9}PC e DC_{8,3}PC, os efeitos de agregação são somente diferenciados acima de 10mN/m.

5.2. Preparação e Caracterização dos Lipossomas Polimerizados

5.2.1. Temperatura de transição de fases

Os gráficos de calorimetria de varredura diferencial (DSC) e de microcalorimetria de varredura diferencial (microDSC) foram obtidos para as suspensões de lipossomas de DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids), DC_{8,3}PC (*1a*) e DC_{2,15}PC (*1c*) (Anexo 3). Para o fosfolípido DC_{8,9}PC, tanto a suspensão de lipossomas monoméricos quanto a suspensão de lipossomas poliméricos apresentaram o pico indicativo da transição de fase gel-líquido cristalino entre 42°C e 43°C (microDSC), temperaturas próximas da T_c (46°C) obtida previamente por DSC para os lipossomas monoméricos de mesma composição, para o ciclo de aquecimento. O sinal intenso obtido para os lipossomas poliméricos indica que o grau de polimerização das moléculas de DC_{8,9}PC na bicamada lipídica deve ser relativamente baixo, uma vez que há indicação na literatura relacionando a maior extensão da polimerização com a diminuição do sinal obtido na transição de fase (Leaver et al., 1983). Segundo estes autores, a irradiação prolongada de compostos diacetilênicos com luz UV pode inclusive fazer com que a transição de fase gel-líquido cristalino desapareça. Para os fosfolípidos monoméricos de DC_{8,3}PC e DC_{2,15}PC, não se observou o sinal característico indicativo da transição de fase nas análises por microDSC, provavelmente pelo emprego de suspensão lipídica excessivamente diluída. As análises por DSC dos lipossomas monoméricos de DC_{2,15}PC apresentaram uma elevada histerese da T_c conforme esta era obtida em ciclo de aquecimento (61°C) ou resfriamento (50°C). A temperatura de transição de fase para o fosfolípido DC_{8,3}PC (43 °C) foi obtida somente através da análise por DSC de lipossomas monoméricos, para o ciclo de aquecimento.

Na Tabela 5.2 são apresentadas as temperaturas de transição de fase para os fosfolípidos diacetilênicos obtidas por calorimetria de varredura diferencial (DSC) e por microcalorimetria de varredura diferencial (microDSC).

Tabela 5.2: Temperaturas de transição de fase (T_c) para os fosfolipídios diacetilênicos, através de calorimetria de varredura diferencial (DSC) e de microcalorimetria de varredura diferencial (microDSC). Os dados foram obtidos para suspensões monoméricas e para ciclo de aquecimento, exceto onde especificado o contrário.

Fosfolipídio	T_c	
	DSC	microDSC
DC _{8,9} PC	46°C ; 32°C ^(r)	43°C ; 42°C ^(p)
DC _{8,3} PC	43°C	—
DC _{2,15} PC	61°C ; 50°C ^(r)	59°C ^(p)

(p): suspensão polimérica; (r): ciclo de resfriamento

Os valores de T_c obtidos para o fosfolipídio diacetilênico DC_{8,9}PC são condizentes com os relatados na literatura (37 °C a 43,1 °C, obtidas para ciclos de aquecimento) (Blume, 1991). A temperatura de transição de fase obtida para o DC_{8,3}PC (43 °C) foi bem superior àquela que seria prevista para essa molécula considerando-se o posicionamento das insaturações (carbonos 10 e 12) e o comprimento das cadeias acila (17 átomos de carbono). Conforme dados relacionando a T_c com o comprimento das cadeias acila de fosfatidilcolinas diacetilênicas do tipo DC_{8,n}PC (insaturações sempre localizadas nos carbonos 10 e 12) e n=6 (T_c =22°C), n=7 (T_c =28°C), n=9 (T_c =37°C a 43,1°C), n=11 (T_c =48°C a 51°C), n=12 (T_c =43°C), ou n=13 (T_c =60°C a 62°C) (Blume, 1991), esperar-se-ia uma T_c inferior a 22°C para o DC_{8,3}PC.

Resultados apresentados na literatura relacionando a T_c de fosfatidilcolinas diacetilênicas com mesmo tamanho das cadeias acila (27 átomos de carbono), mas com posicionamento variável do grupo diacetilênico ao longo dessas cadeias, demonstram uma tendência para o aumento da T_c à medida que as insaturações são posicionadas mais próximas do grupo carboxílico (Blume, 1991). Esta tendência se repetiu com relação aos dados obtidos para os fosfolipídios DC_{2,15}PC e DC_{8,9}PC, em que as temperaturas de transição de fase obtidas para o primeiro (50°C a 61°C) foram mais elevadas que aquelas levantadas para o segundo fosfolipídio (32°C a 46°C). Em ambos os casos, as cadeias acila apresentam 23 átomos de carbono, porém os grupos diacetilênicos na molécula de DC_{2,15}PC estão

mais próximos da carboxila do que os grupos diacetilênicos na molécula de DC_{8,9}PC.

5.2.2. Cinética de polimerização dos fosfolipídios diacetilênicos

A suspensão de lipossomas de DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids) 1mM em tampão Hepes 10mM pH7,4 foi purgada com nitrogênio e, em seguida, submetida à irradiação durante 120 minutos com luz UV (Anexo 1), à distância de 5 cm da lâmpada e sob temperatura de 4°C. A irradiação da amostra provocou a alteração da cor da suspensão para vermelho/alaranjado, que se intensificou à medida em que o tempo de irradiação foi incrementado. Os espectros de UV/vis foram obtidos em intervalos de 15 minutos (Figura 5.2), com a amostra aquecida até a temperatura ambiente logo após a retirada da cubeta da camisa de refrigeração. Este procedimento foi necessário, pois verificou-se em testes iniciais que os espectros sofriam variações devido à ocorrência de termocromismo da amostra (a 4°C a suspensão era vermelha, passando gradualmente para laranja com o aumento da temperatura até a temperatura ambiente). Os espectros na região do UV/visível apresentam um crescente aumento da absorbância da amostra na região entre cerca de 380nm e 550nm. Os resultados indicam a ocorrência da polimerização dos fosfolipídios diacetilênicos DC_{8,9}PC na bicamada lipossomial. A cor da suspensão durante a irradiação não passou pelo azul, estando de acordo com os relatos existentes na literatura (Lopes, O'Brien e Whitesides, 1982(i); Peek et al., 1994) para a polimerização de lipossomas de DC_{8,9}PC previamente submetidos ao aquecimento acima da T_c do fosfolipídio (vide curvas de histerese de fotossensibilidade – item 3.1.2.2/Figura 3.1).

A suspensão de lipossomas preparada com o fosfolipídio sintético DC_{8,3}PC (*Ia*) 1,1mM em tampão Hepes 10mM pH7,4 foi purgada com nitrogênio, e em seguida submetida à irradiação durante 120 minutos com luz UV, à distância de 5cm da lâmpada e sob temperatura de 4°C. A amostra teve sua coloração alterada para amarelo claro a partir dos primeiros 20 minutos de irradiação, mantendo-se assim até o final do experimento. Os espectros foram obtidos como descrito para a suspensão de DC_{8,9}PC, porém em intervalos de 20 minutos (Figura 5.3). Eles não

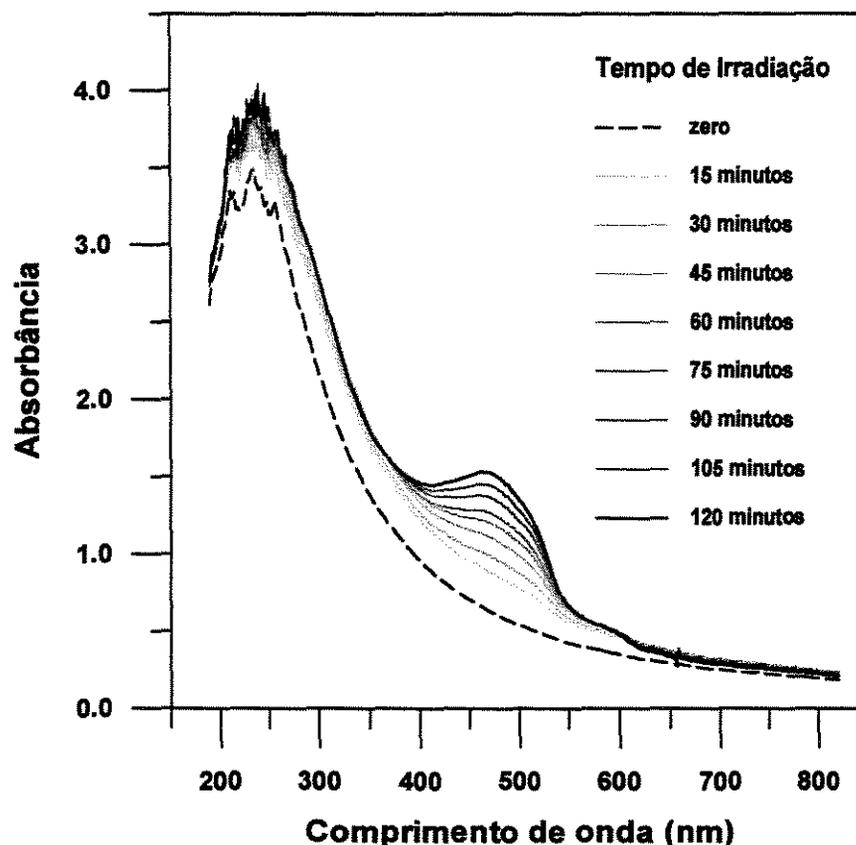


Figura 5.2: Espectros de UV/vis de suspensão de lipossomas de DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids) 1mM em tampão HEPES 10mM (pH7,4), irradiada por exposição direta à luz UV (lâmpada: Germetec – mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W) durante 120 minutos, a 4°C, posicionada a 5cm da lâmpada.

apresentaram um aumento da absorbância na região de 400nm a 550nm como aquele verificado quando da polimerização da suspensão de lipossomas preparada com o fosfolípido DC_{8,9}PC, nas mesmas condições (Fig. 5.2). Entretanto, pode-se observar um aumento relativo da absorbância na região de 300nm a 400nm nas amostras irradiadas. A polimerização dos fosfolípidos não ficou caracterizada pela espectrometria na região do UV/visível, pois o comportamento dos espectros é diferente do padrão observado para o fosfolípido DC_{8,9}PC, mas também não se pode afirmar que ela não tenha ocorrido. Os dois fosfolípidos diacetilênicos apresentam cadeias distais de hidrocarbono com diferentes comprimentos - seis grupos metileno a menos para o DC_{8,3}PC em relação ao DC_{8,9}PC -, o que certamente deve provocar alteração no empacotamento dessas moléculas na

bicamada dos lipossomas. Tal alteração pode refletir-se tanto na susceptibilidade à reação de polimerização, quanto na resposta colorimétrica obtida após a polimerização. (vide item 3.1.2.2 e item 3.1.2.3 da revisão de literatura).

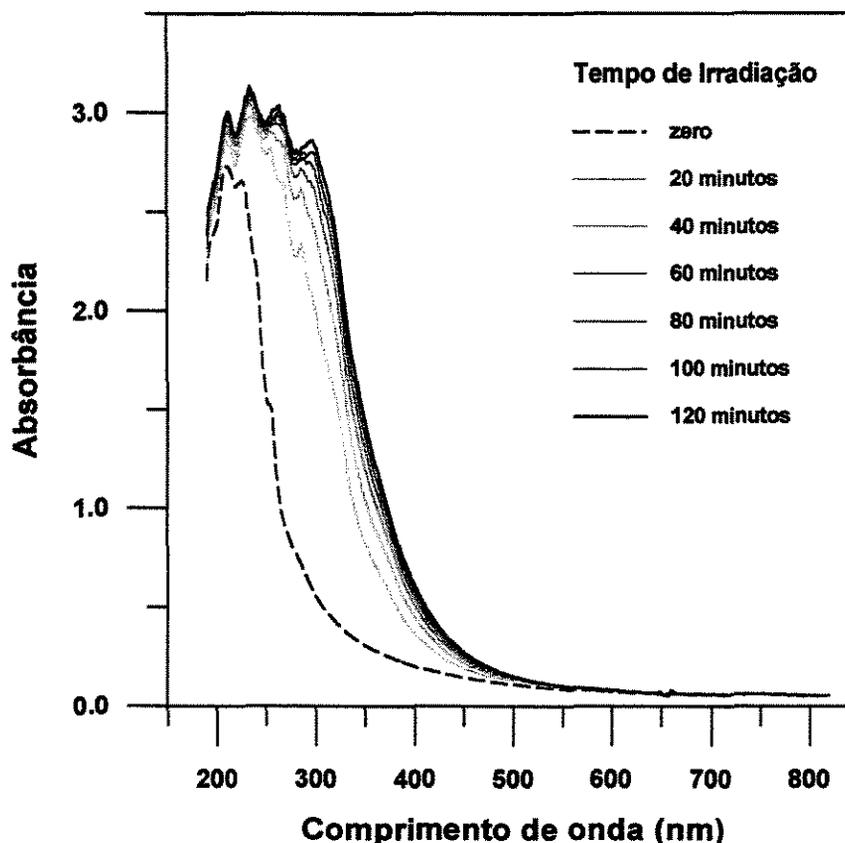


Figura 5.3: Espectros de UV/vis de suspensão de lipossomas de $DC_{8,3}PC$ (*Ia*) 1,1mM em tampão Hepes 10mM (pH7,4), irradiada por exposição direta à luz UV (lâmpada: Germetec – mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W) durante 120 minutos, a 4°C, posicionada a 5cm da lâmpada..

A suspensão de lipossomas preparados com o fosfolípido sintético $DC_{2,15}PC$ (*Ic*) 0,6mM em tampão Hepes 10mM pH7,4 foi purgada com nitrogênio, e em seguida submetida à irradiação durante 120 minutos com luz UV, à distância de 5cm da lâmpada e sob temperatura de 4°C. Após os primeiros 20 minutos de irradiação, a suspensão de lipossomas teve sua coloração alterada para laranja, que se intensificou no decorrer da irradiação. Os espectros (Figura 5.4), obtidos a cada intervalo de 20 minutos para a amostra à temperatura ambiente, apresentaram um

aumento da absorbância na região de 400nm a 550nm, como aquele verificado quando da polimerização da suspensão de lipossomas preparada nas mesmas condições com o fosfolipídio DC_{8,9}PC (Fig. 5.2). Houve também um aumento da absorbância na região entre 300nm e 400nm, similar ao verificado na irradiação da suspensão de lipossomas preparada com o fosfolipídio DC_{8,3}PC (Fig. 5.3). A polimerização dos fosfolipídios na bicamada lipídica dos lipossomas ficou caracterizada, pois o comportamento dos espectros é semelhante àquele observado para a fosfatidilcolina diacetilênica padrão DC_{8,9}PC. A diferença observada nos espectros (Fig. 5.2 e Fig. 5.4) pode ser devida a alterações no arranjo das cadeias poliméricas empacotadas na bicamada, decorrentes dos diferentes posicionamentos das insaturações nas cadeias acila de cada fosfolipídio (insaturações nos átomos de carbono 10 e 12 para a DC_{8,9}PC; e nos átomos de carbono 4 e 6 para a DC_{2,15}PC;

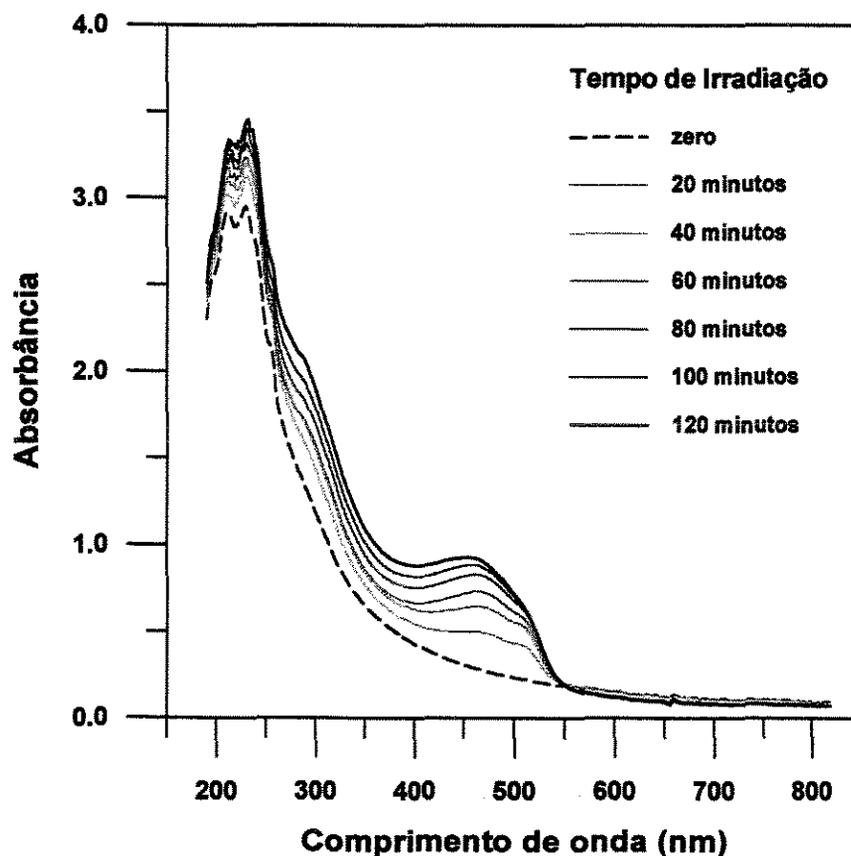


Figura 5.4: Espectros de UV/vis de suspensão de lipossomas de DC_{2,15}PC (*Ic*) 0,6mM em tampão Hepes 10mM (pH7,4), irradiada por exposição direta à luz UV (lâmpada: Germetec – mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W) durante 120 minutos, a 4°C, posicionada a 5cm da lâmpada.

em ambos os lipídios, as cadeias tem o mesmo tamanho, com 23 átomos de carbono em cada cadeia acila).

A avaliação da cinética da reação foi realizada considerando-se a hipótese de que o grau de polimerização é proporcional à variação da absorbância em $\lambda=476\text{nm}$. Os resultados obtidos para a polimerização de lipossomas preparados com os fosfolipídios DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids), DC_{8,3}PC (*1a*) e DC_{2,15}PC (*1c*) são apresentados na Figura 5.5, juntamente com as curvas ajustadas para os dados através de regressão polinomial de grau 3. Pode-se verificar que a cinética da reação de polimerização é semelhante para preparações com os fosfolipídios DC_{2,15}PC e DC_{8,9}PC. Em ambos os casos, a velocidade máxima da reação ocorre

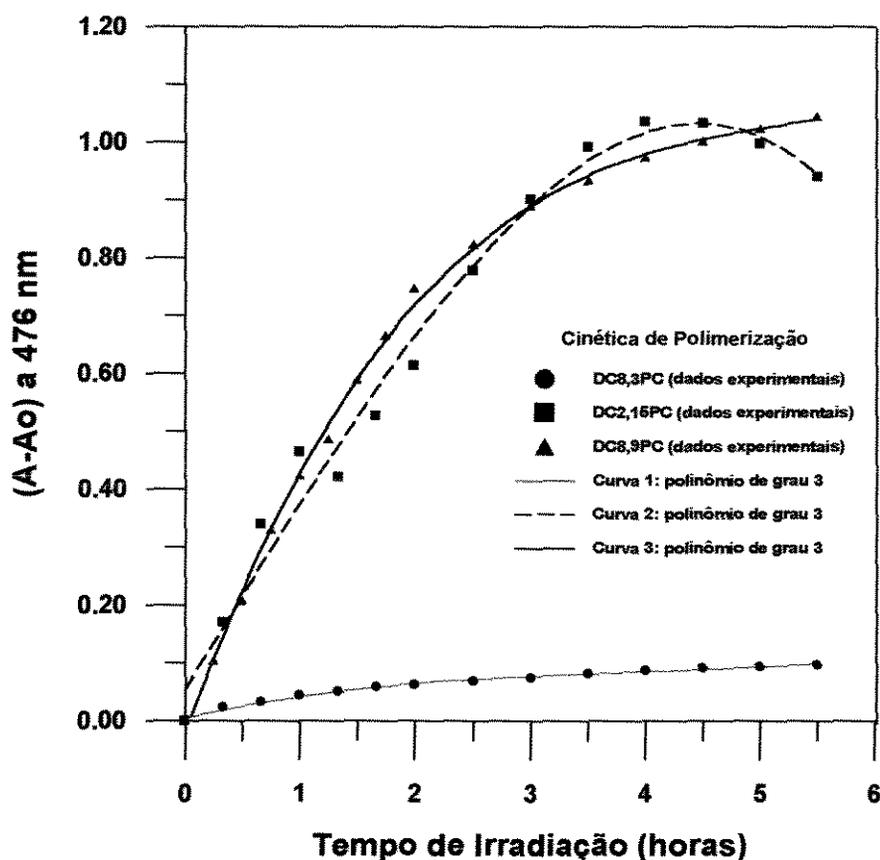


Figura 5.5: Curvas de diferença de absorbância ($A-A_0$) a $\lambda=476\text{nm}$ em função do tempo de irradiação de suspensão de lipossomas de DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids), DC_{2,15}PC (*1c*) e DC_{8,3}PC (*1a*) em tampão Hepes 10mM (pH7,4), irradiada por exposição direta à luz UV (lâmpada: Germetec – mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W) durante 5,5 horas, a 4°C, posicionada a 5cm da lâmpada.

até 2 horas de irradiação, diminuindo para períodos maiores. Para o fosfolípido $DC_{2,15}PC$, o máximo grau de polimerização ocorre entre 4 horas e 4,5 horas de irradiação, enquanto para o fosfolípido $DC_{8,9}PC$ a reação ainda apresenta taxas positivas acima de 4,5 horas. A extensão da polimerização dos fosfolípidos $DC_{8,3}PC$ é bem inferior àquela observada para os outros dois fosfolípidos diacetilênicos, com baixas taxas de reação de polimerização verificadas durante todo o período de tempo estudado.

Na Figura 5.6 pode-se verificar as alterações cromáticas para cada uma das suspensões de lipossomas (1mM) após duas horas de irradiação com luz UV, comparativamente à suspensão monomérica de lipossomas de $DC_{8,9}PC$ (as suspensões monoméricas dos outros dois lipídios polimerizáveis são semelhantes, por isso apenas uma suspensão monomérica é apresentada).

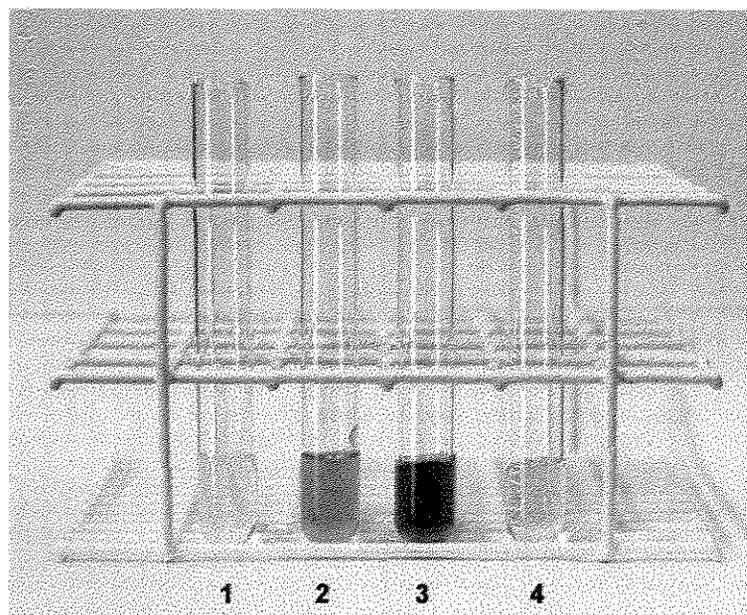


Figura 5.6: Aspecto das suspensões 1mM de lipossomas monoméricos de $DC_{8,9}PC$ (1) e de lipossomas poliméricos de $DC_{2,15}PC$ (2), $DC_{8,9}PC$ (3) e $DC_{8,3}PC$ (4) em tampão HEPES 10mM pH7,4.

Visando confirmar a eficácia do processo de polimerização utilizado neste trabalho, procurou-se a comparação com os resultados obtidos por Peek et al. (1994), já que esses pesquisadores conseguiram a polimerização sob temperatura ambiente de lipossomas de DC_{8,9}PC obtidos por extrusão através de membrana de 100nm. Nesse caso, a irradiação da amostra foi realizada em reator fotoquímico do tipo Rayonette durante 5 minutos. O processo de preparação dos lipossomas de DC_{8,9}PC descrito nesse trabalho foi seguido, realizando-se inclusive ciclos de congelamento e descongelamento após a hidratação do filme lipídico seco, antes da etapa de extrusão. A polimerização foi inicialmente testada sob temperatura ambiente, mas nenhuma alteração indicativa de polimerização foi obtida após 1 hora de exposição à irradiação UV com a lâmpada Germetec (64W). Ela somente se deu quando a suspensão de lipossomas foi refrigerada até 4°C. Desta forma ficou evidente que o sistema de irradiação disponível não é capaz de fornecer a mesma potência radiante que o reator fotoquímico Rayonette e, por este motivo, não se consegue a polimerização dos lipossomas de DC_{8,9}PC à temperatura ambiente.

5.2.3. Diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas

Este estudo visou determinar o diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas avaliando-se o processo de preparação e estocagem dos lipossomas. Buscou-se indicativos de alterações morfológicas indesejadas das bicamadas decorrentes dos diversos tratamentos físicos empregados, e também meios de evitar tais alterações durante a produção e estocagem dos lipossomas.

Foram realizadas medidas do diâmetro médio com as suspensões de lipossomas monoméricos e poliméricos de DC_{8,3}PC, logo após a sua preparação e após estocagem por 40 dias em geladeira. Os resultados (Tabela 5.3) mostram não haver variação significativa do diâmetro médio das vesículas, demonstrando que os lipossomas preparados com o fosfolípido diacetilênico DC_{8,3}PC permanecem estáveis após estocagem em geladeira durante o período estudado.

Os resultados obtidos para as suspensões de lipossomas monoméricos e poliméricos de DC_{2,15}PC apresentados na Tabela 5.4 indicam que alterações significativas ocorrem nas características das vesículas presentes na suspensão de lípidios monoméricos, pois há duas populações muito maiores que as inicialmente presentes. Os lipossomas poliméricos, por outro lado, mantêm-se com diâmetro médio ao redor de 100nm a 200nm, demonstrando que a polimerização foi capaz de evitar alterações significativas da morfologia das vesículas.

Tabela 5.3: Efeito da estocagem sob refrigeração sobre o tamanho dos lipossomas monoméricos e poliméricos preparados com o fosfolípido diacetilênico DC_{8,3}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.

Composição	Diâmetro (nm)	Distribuição de Tamanho	Observações
DC _{8,3} PC (mon.)	95±45	47nm(35%) 110nm(65%)	4°C (geladeira) por 40 dias
DC _{8,3} PC (polim.)	92±54	66nm(60%) 130nm(40%)	4°C (geladeira) por 40 dias
DC _{8,3} PC (mon.)	92±40	74nm(58%) 118nm(42%)	após a preparação
DC _{8,3} PC (polim.)	103±50	59nm(34%) 125nm(66%)	após a irradiação com luz UV

Tabela 5.4: Efeito da estocagem sob refrigeração sobre o tamanho dos lipossomas monoméricos e poliméricos preparados com o fosfolípido diacetilênico DC_{2,15}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.

Composição	Diâmetro (nm)	Distribuição de Tamanho	Observações
DC _{2,15} PC (mon.)	---	~600nm ~7000nm	(alta polidispersão) 4°C (geladeira) / 4 dias
DC _{2,15} PC (polim.)	132±75	87nm(60%) 200nm(40%)	4°C (geladeira) por 40 dias
DC _{2,15} PC (polim.)	117±73	117nm±73nm (100%)	4°C (geladeira) por 7,5meses

Para os lipossomas preparados com DC_{8,9}PC foram, também, observadas alterações significativas de tamanho (Tabela 5.5). A suspensão de lipossomas monoméricos estocada em geladeira apresentou grande polidispersão após o resfriamento, não sendo por isso possível determinar-se o tamanho das partículas presentes. A polimerização por 2 horas evitou mudanças físicas significativas, pois os diâmetros médios dos lipossomas poliméricos de DC_{8,9}PC se mantiveram na faixa de 100nm a 200nm mesmo após a estocagem em geladeira. Entretanto, um prolongamento do tempo de irradiação da amostra até 5,5h, sob temperatura de 4°C, proporcionou o surgimento de uma população com tamanho ao redor de 1780nm.

Tabela 5.5: Efeito da estocagem sob refrigeração sobre o tamanho dos lipossomas monoméricos e poliméricos preparados com o fosfolipídio diacetilênico DC_{8,9}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4 (superíndices iguais, à esquerda dos valores dos diâmetros, indicam se tratar da mesma amostra).

Composição	Diâmetro (nm)	Distribuição de Tamanho	Observações
DC _{8,9} PC (mon.)	⁽¹⁾ 116±51	67nm(38%) 143nm(62%)	temp.ambiente por 4h
DC _{8,9} PC (mon.)	⁽¹⁾ 96±54	96nm±54nm (100%)	temp.ambiente por 1 noite
DC _{8,9} PC (mon.)	104±69	104nm±69nm (100%)	logo após a preparação
DC _{8,9} PC (mon.)	(alta polidispersão)	(alta polidispersão)	4°C (geladeira) por 1 noite
DC _{8,9} PC (mon.)	⁽³⁾ 102±47	64nm(42%) 121nm(58%)	logo após a preparação
DC _{8,9} PC (polim.)	⁽³⁾ 101±38	101nm±38nm (100%)	logo após a irradiação UV
DC _{8,9} PC (polim.)	⁽¹⁾ 134±75	134nm±75nm (100%)	temp.ambiente por 1 noite
DC _{8,9} PC (polim.)	⁽¹⁾ 120±108	46nm(60%) 195nm(40%)	4°C (geladeira) por 1 noite
DC _{8,9} PC (polim.)	---	46nm (29%), 148nm (63%) e 1784nm (8%)	após irradiação UV/5,5h

As alterações detectadas para as suspensões de lipossomas estudadas provavelmente são decorrentes de alterações na morfologia da bicamada lipídica, que pode passar da estrutura esférica característica dos lipossomas unilamelares pequenos, para microtubos ou bicamadas em folhas estendidas devido ao resfriamento da suspensão, conforme Figura 3.5 e Figura 3.6, no item 3.1.3. Esta é uma característica singular apresentada somente pelas fosfatidilcolinas diacetilênicas, como é previamente descrito na literatura por Rudolph e Burke (1987). Segundo estes autores, vesículas unilamelares pequenas de DC_{8,9}PC são estruturas metaestáveis, apresentando polimorfismo ao serem submetidas a ciclos de resfriamento (até temperaturas próximas de 0°C) e aquecimento.

Peek et al. (1994) observaram que vesículas preparadas pela hidratação do filme seco de DC_{8,9}PC, seguida por ciclos de congelamento e descongelamento antes da extrusão através de membranas com poros de diâmetro 50nm, 100nm e 300nm não mantêm o tamanho e a morfologia após resfriamento lento até 4°C. Para verificar se a velocidade do resfriamento usada em nosso trabalho estava suficientemente elevada para evitar tais alterações, reproduziu-se as mesmas condições de preparação dos lipossomas, exceto na etapa de polimerização. Ciclos de congelamento e descongelamento da suspensão de lipídios logo após a hidratação do filme seco e antes da extrusão foram realizados e os tamanhos das vesículas determinados (Tabela 5.6). Comparando-se esses valores com os resultados obtidos na Tabela 5.5, observa-se que não há influência significativa dos ciclos de congelamento e descongelamento no diâmetro médio dos lipossomas monoméricos: 96nm±34nm e 98nm±50nm para preparação com ciclos de congelamento e descongelamento, e 96nm±54nm, 104nm±69nm e 116nm±51nm para preparação sem realização desse processo. Os valores acima são semelhantes aos obtidos por Peek et al. (1994), onde o diâmetro médio das vesículas monoméricas foi de 95nm±32nm.

Os lipossomas polimerizados através da irradiação a 4°C durante 2 horas apresentam diâmetros de 101nm±38nm, 134nm±75nm e 120nm±108nm. Por outro lado, observa-se o surgimento de populações com tamanhos acima de 1000nm quando a irradiação é realizada sob 4°C por 5,5 horas (Tabela 5.5) ou quando se

aplicam os ciclos de congelamento e descongelamento (Tabela 5.6). Os três valores de diâmetro acima não são muito diferentes do diâmetro de $97\text{nm}\pm 35\text{nm}$ obtido por Peek et al. (1994) para os lipossomas polimerizados, previamente submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento, e irradiados sob temperatura ambiente por 5 minutos em reator fotoquímico Rayonette. Dessa forma, o surgimento de populações com maiores tamanhos pode ser explicado pela baixa temperatura utilizada durante a irradiação (4°C), combinada com a provável menor potência radiante recebida pelas amostras irradiadas com a lâmpada Germetec (64W), em comparação à irradiação no reator fotoquímico Rayonette utilizado por Peek et al. (1994). Como a velocidade da reação de polimerização é menor, a possibilidade de alterações morfológicas dos lipossomas do tipo SUV submetidos à temperatura de 4°C é incrementada. Para minimizar a extensão dessa mudança de morfologia, nas preparações subsequentes adotou-se o procedimento de se iniciar a irradiação tão logo a amostra fôsse posicionada na camisa de resfriamento, sem se esperar a amostra atingir o equilíbrio térmico.

Tabela 5.6: Efeito dos ciclos de congelamento e descongelamento (20 ciclos) entre as etapas de hidratação do filme lipídico e extrusão da suspensão lipídica, durante a preparação dos lipossomas, sobre o tamanho dos lipossomas monoméricos e poliméricos de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ em tampão Hepes 10mM $\text{pH}7,4$.

Composição	Diâmetro (nm)	Distribuição de Tamanho	Observações
$\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ (mon.)	96 ± 34	96 ± 34 (100%)	temp. ambiente por 4h
$\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ (mon.)	98 ± 50	98 ± 50 (100%)	temp. ambiente por 1 noite
$\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ (polim.)	—	70nm (89%) 2190nm (11%)	temp. ambiente por 2,5h
$\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ (polim.)	—	134nm (86%) 4128nm (14%)	4°C (geladeira) por 1 noite

5.2.4 Estabilidade dos lipossomas em presença de tensoativo

A estabilidade dos lipossomas em presença de tensoativos reflete a integridade da bicamada lipídica e o seu grau de empacotamento. Bicamadas com

maior grau de empacotamento são mais resistentes ao ataque dos tensoativos, que agem desestruturando-as. O monitoramento da estabilidade dos lipossomas em função da concentração de tensoativos, feito por meio de medidas de turbidez das soluções a 340nm, produz perfis característicos compostos de regiões onde inicialmente há o entumescimento das vesículas, sem aumento significativo da turbidez da solução. Com o aumento da concentração de tensoativo, há o crescimento das vesículas, seguido de fusão e desintegração em micelas. Em termos de turbidez das soluções, há um aumento acentuado até um ponto de máximo, a partir do qual a absorvância diminui devido à presença de micelas na solução.

5.2.4.1. Tensoativo C₁₂E₅ (polioxietileno-5-lauril éter)

Os lipossomas monoméricos preparados a partir do fosfolipídio DC_{8,9}PC permaneceram estáveis até aproximadamente 60% de concentração do tensoativo C₁₂E₅ (PM=406; CMC=0,058mM - Hinze e Pramauro, 1993), a partir da qual evidencia-se a desestabilização devido ao aumento acentuado da absorvância. A concentração percentual do tensoativo correspondente à CMC está na faixa de 5% a 6,8% para as concentrações de DCPC utilizadas. Os lipossomas polimerizados, irradiados durante 2 horas (Figura 5.7) ou durante 6 horas (Figura 5.8), permaneceram estáveis em toda a faixa de concentrações. A maior estabilidade dos lipossomas polimerizados, relativamente aos monoméricos, pode ser creditada à estabilização proporcionada pela polimerização dos fosfolipídios diacetilênicos. Neste caso, a maior extensão da polimerização obtida com a irradiação por 6 horas com luz UV não alterou de forma evidente a estabilidade dos lipossomas polimerizados, comparativamente aos lipossomas polimerizados pela irradiação por 2 horas.

Para os lipossomas de DC_{8,3}PC (Figura 5.9), a estabilidade foi praticamente igual para os lipossomas monoméricos e polimerizados até aproximadamente 60% de tensoativo. A partir daí, verifica-se que a desestabilização foi bem maior para os lipossomas monoméricos do que para os polimerizados. Comparados com os lipossomas de DC_{8,9}PC (monoméricos e polimerizados através de irradiação por 2

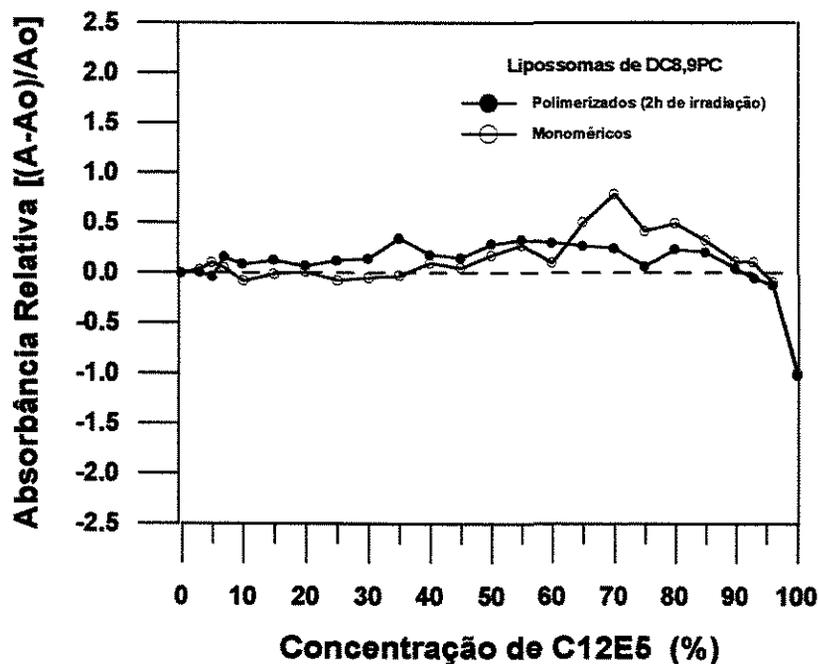


Figura 5.7: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C_{12}E_5 para lipossomas de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ ($0,8\text{mM}$) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).

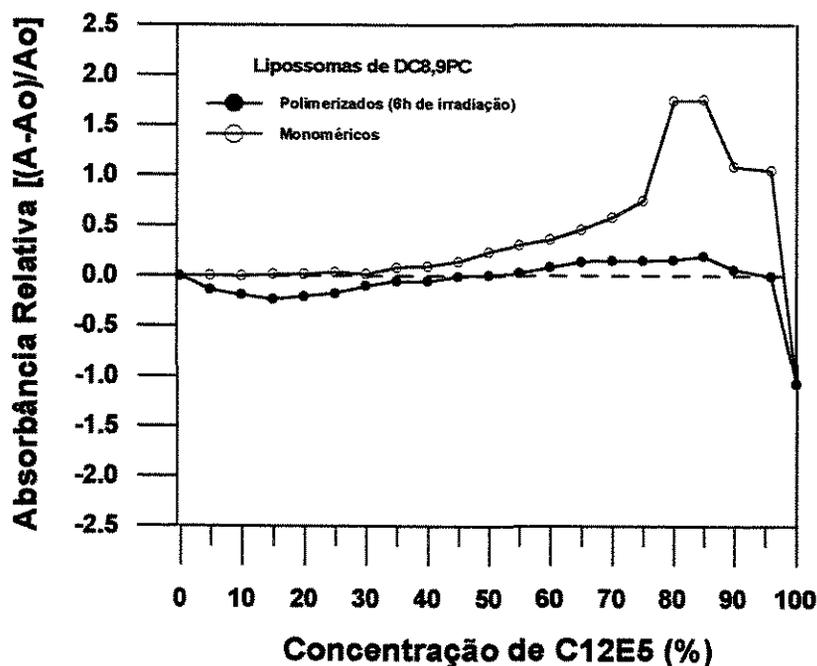


Figura 5.8: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C_{12}E_5 para lipossomas de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ ($1,0\text{mM}$) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 6 horas com luz UV (“poliméricos”).

horas), eles foram muito mais instáveis, evidenciando-se a influência do tamanho das cadeias distais no empacotamento dos lipídios na bicamada. A diferença de comportamento entre os lipossomas de DC_{8,3}PC (irradiados por 2 horas, e não irradiados) quando em presença do tensoativo C₁₂E₅ é um forte indicio de que a reação de polimerização entre os fosfolipídios diacetilênicos efetivamente ocorreu após a irradiação com luz UV, ao menos parcialmente, apesar de não ter ficado tão evidente nos espectros de UV/vis apresentados na Fig. 5.3 (item 5.2.2).

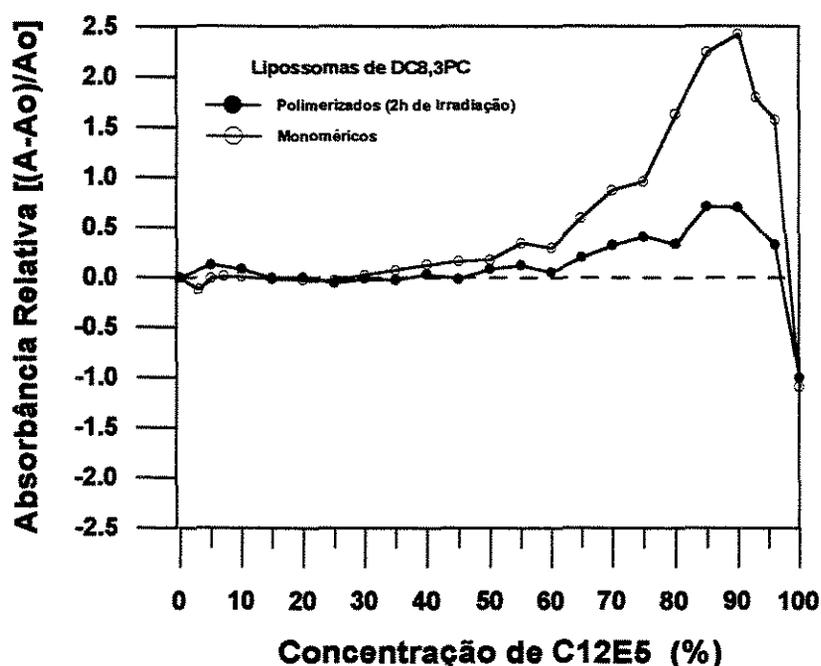


Figura 5.9: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C₁₂E₅ para lipossomas de DC_{8,3}PC (1,1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).

Os lipossomas monoméricos preparados com o fosfolipídio DC_{2,15}PC (Figura 5.10 e Figura 5.11) apresentaram-se bastante estáveis em presença do tensoativo C₁₂E₅, em praticamente toda a faixa de concentração estudada. Para os lipossomas polimerizados de mesma composição lipídica, a extensão da polimerização influenciou a estabilidade. Os lipossomas polimerizados obtidos através da irradiação por 2 horas apresentaram-se mais instáveis que aqueles irradiados por 6 horas. No primeiro caso, concentrações superiores a 25% são suficientes para desestabilizar os lipossomas polimerizados, enquanto aqueles com

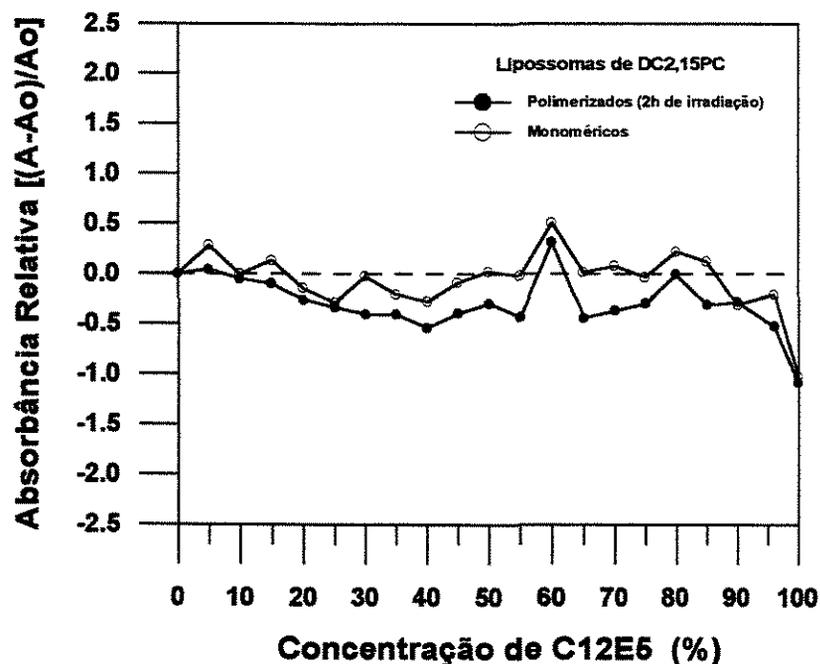


Figura 5.10: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C₁₂E₅ para lipossomas de DC_{2,15}PC (1,1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).

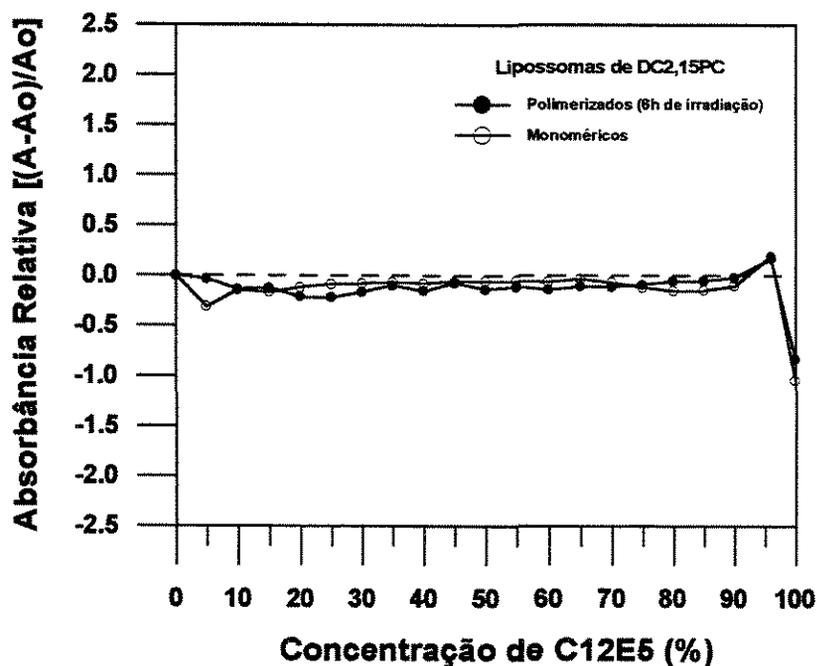


Figura 5.11: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo C₁₂E₅ para lipossomas de DC_{2,15}PC (1,0mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 6 horas com luz UV (“poliméricos”).

maior grau de polimerização permaneceram estáveis em toda a faixa de concentração estudada.

De forma geral, o comportamento dos lipossomas em presença do tensoativo pode ser relacionado aos resultados obtidos para os filmes de Langmuir de moléculas de fosfatidilcolinas diacetilênicas. Para os lipossomas preparados com DC_{8,3}PC, a maior fluidez da membrana - inferida a partir dos resultados verificados para a monocamada de mesma composição - permite a inserção das moléculas de tensoativo no seu seio com uma certa facilidade. Ao se efetuar a irradiação dos fosfolipídios nas bicamadas, essa facilidade é diminuída, já que a membrana dos lipossomas torna-se mais rígida devido às ligações intermoleculares decorrentes da polimerização. Os lipossomas de DC_{8,9}PC, por sua vez, apresentam maiores restrições à incorporação das moléculas de C₁₂E₅ na bicamada lipídica, principalmente quando polimerizados. Isto está de acordo com a maior rigidez apresentada pela monocamada composta por DC_{8,9}PC, relativamente à monocamada de DC_{8,3}PC. Porém, a bicamada lipossomial ainda está suficientemente fluída para não ser desestabilizada pelo tensoativo. O alto grau de empacotamento das moléculas de DC_{2,15}PC, como visto através da isoterma obtida para o filme monomolecular, parece proporcionar uma elevada estabilidade à bicamada monomérica. A polimerização através da irradiação por 2 horas acarreta uma diminuição da estabilidade da bicamada, talvez pelo adensamento excessivo das moléculas nos domínios monoméricos, o que possibilitaria uma desestruturação da bicamada mesmo a baixas concentrações (20% a 30%) de C₁₂E₅. Devido à maior rigidez da bicamada, o tensoativo não consegue ser acomodado no interior da lamela lipídica, provocando a saída de moléculas monoméricas de DC_{2,15}PC da membrana. Estas moléculas livres vão se agregar em conjunto com as do tensoativo, formando micelas mistas. Ao se aumentar o grau de polimerização através da irradiação por 6 horas, a estabilidade da bicamada é recuperada provavelmente pelo fato das cadeias poliméricas estarem presentes em maior número e/ou por serem mais extensas, com conseqüente diminuição dos domínios monoméricos. Isto possibilitaria uma maior coesão entre as moléculas lipídicas no interior da bicamada, evitando a penetração das moléculas do tensoativo.

5.2.4.2. Tensativo taurocolato de sódio

A concentração micelar crítica do taurocolato de sódio é bem maior que a dos outros tensoativos estudados ($CMC=3,3mM$), correspondendo a concentrações de 75% a 82,5% do tensoativo para as concentrações de DCPC utilizadas. Por este motivo o efeito desestabilizante gerado nos lipossomas sob concentrações inferiores a 55% é inexpressivo, confirmado por testes prévios. Por este motivo os perfis de estabilidade apresentados para os lipossomas em presença de taurocolato de sódio restringem-se a concentrações acima de 55% do tensoativo.

Conforme pode ser verificado na Figura 5.12, na Figura 5.13 e na Figura 5.14, a presença do tensoativo taurocolato de sódio afeta de forma similar os lipossomas monoméricos e poliméricos de $DC_{8,3}PC$, e os lipossomas poliméricos de $DC_{8,9}PC$. As vesículas apresentam alteração significativa somente quando a concentração de taurocolato de sódio atinge valores bastante elevados, acima de 85% a 90%. Isto demonstra a pouca capacidade do tensoativo taurocolato de sódio em desestabilizar a bicamada lipídica destes lipossomas.

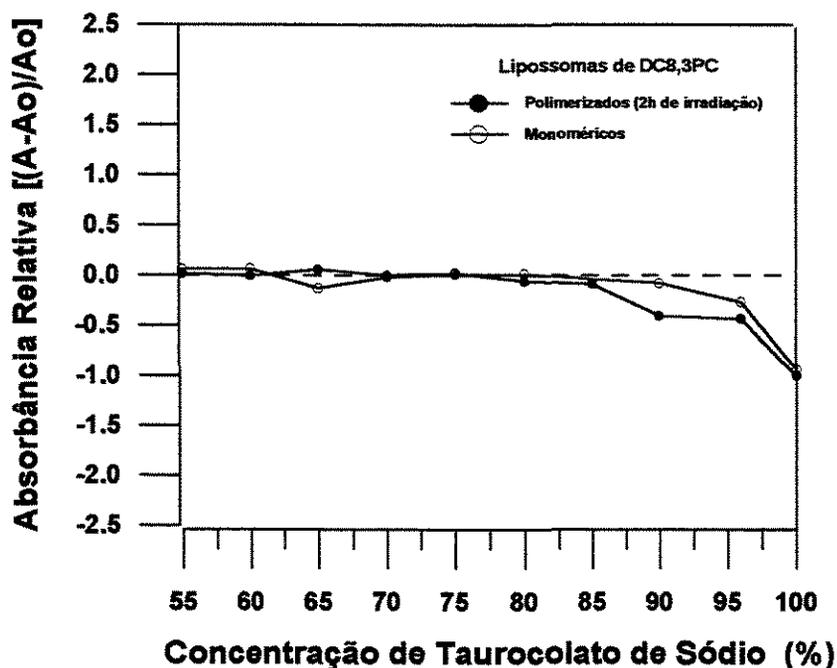


Figura 5.12: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340nm$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de $DC_{8,3}PC$ (1,1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).

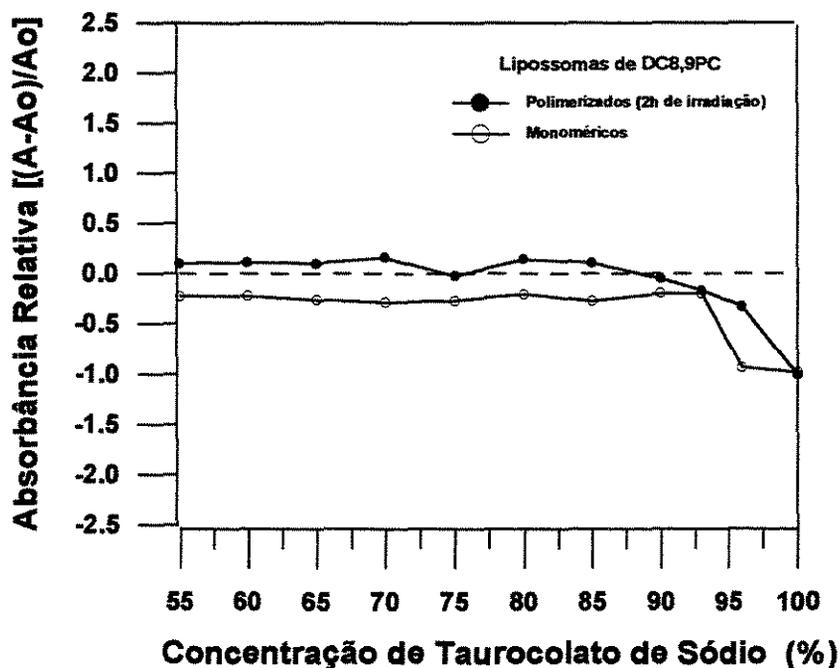


Figura 5.13: Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de DC_{8,9}PC (0,8mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).

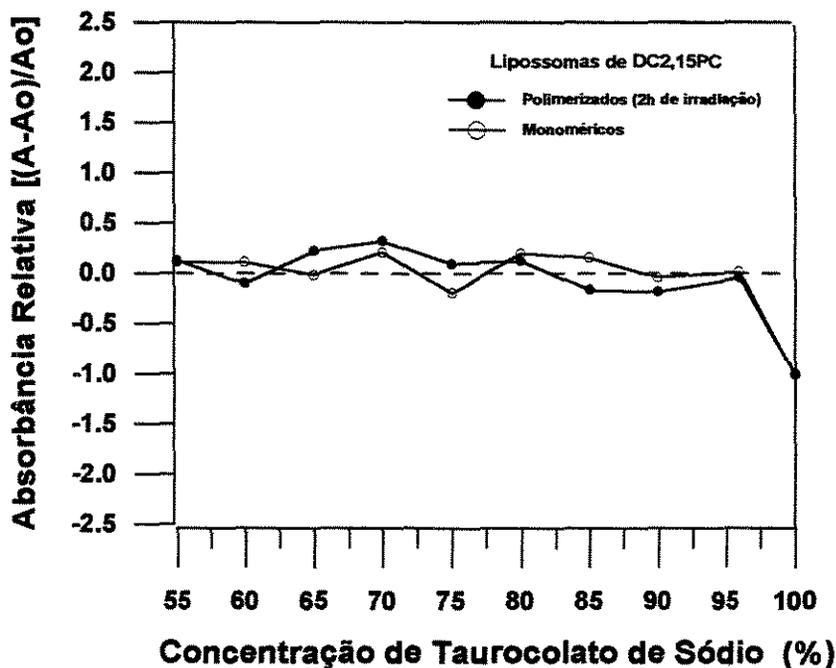


Figura 5.14: Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de DC_{2,15}PC (0,7mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 2 horas com luz UV (“poliméricos”).

Por outro lado, lipossomas monoméricos de DC_{8,9}PC sofrem diminuição do tamanho médio das partículas, mesmo sob baixas concentrações de taurocolato de sódio (a partir de 10%), indicando a perda de fosfolipídios diacetilênicos da bicamada lipossomial e formação de micelas mistas de DC_{8,9}PC e tensoativo. A presença do tensoativo taurocolato de sódio afeta de forma similar os lipossomas monoméricos e poliméricos de DC_{2,15}PC. Mesmo ao redor de 96% de concentração de tensoativo, a absorvância relativa não apresenta alteração significativa, demonstrando a pouca capacidade do tensoativo taurocolato de sódio em desestabilizar a bicamada lipídica destes lipossomas.

O taurocolato de sódio é o tensoativo com maior capacidade em solubilizar fosfolipídios dentre todos os constituintes dos sais de bile (Carey e Small, 1978). No trato intestinal, a concentração desse tensoativo é da ordem de 10mM (Xu e Shaffer, 1992), o que corresponde a uma concentração de aproximadamente 90%. Observando-se os perfis de estabilidade acima na região de 90% de concentração, pode-se dizer que os lipossomas de DC_{8,3}PC (monoméricos), DC_{8,9}PC (polimerizados) e DC_{2,15}PC (monoméricos e polimerizados) são potencialmente úteis como sistemas de carreamento de medicamentos administrados por via oral.

5.2.4.3. Tensoativo Triton X-100

O tensoativo Triton X-100 apresenta CMC=0,25mM, que corresponde à concentração de 18,5% a 26,3%. Estes valores percentuais são também função das concentrações empregadas dos fosfolipídios diacetilênicos (de 0,7mM a 1,1mM).

Os lipossomas poliméricos de DC_{8,9}PC apresentaram maior estabilidade estrutural frente ao Triton X-100 relativamente aos lipossomas monoméricos de mesma composição (Figura 5.15 e Figura 5.16). Para os lipossomas polimerizados através de irradiação durante 2 horas, percebe-se que a desestabilização ocorreu a partir da concentração de 80% do tensoativo. Os lipossomas polimerizados de DC_{8,9}PC irradiados por um período mais longo (6 horas) foram gradualmente desestabilizados a partir da concentração de 50%. Por sua vez, os lipossomas monoméricos preparados com o mesmo fosfolipídio diacetilênico sofreram

desestabilização pelo tensoativo a partir da concentração de 45%. Portanto, fica demonstrado de forma clara o efeito estabilizador da polimerização para esse sistema, relativamente aos lipossomas monoméricos de mesma composição. Além disso, o aumento do grau de polimerização decorrente do maior tempo de irradiação pouco influenciou a estabilidade dos lipossomas polimerizados de DC_{8,9}PC, verificando-se uma ligeira diminuição da estabilidade estrutural dos lipossomas mais extensamente polimerizados.

Para os lipossomas compostos pelo fosfolípido DC_{8,3}PC, o efeito da polimerização é também verificado (Figura 5.17). As vesículas poliméricas mantêm-se estruturalmente estáveis até cerca de 50% de concentração de Triton X-100, a partir daí sendo gradualmente desestabilizadas. Os lipossomas monoméricos primeiramente apresentam um aumento na absorbância relativa a partir de 40% de concentração do tensoativo, sofrendo posteriormente uma abrupta diminuição conforme a concentração de tensoativo é incrementada até cerca de

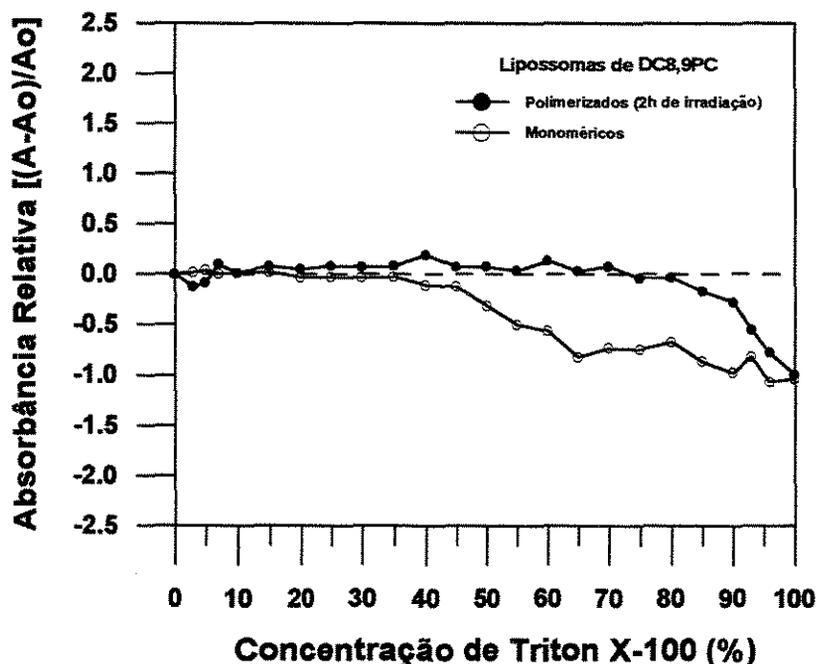


Figura 5.15: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de DC_{8,9}PC (0,8mM) não irradiados ("monoméricos") e irradiados por 2 horas com luz UV ("poliméricos").

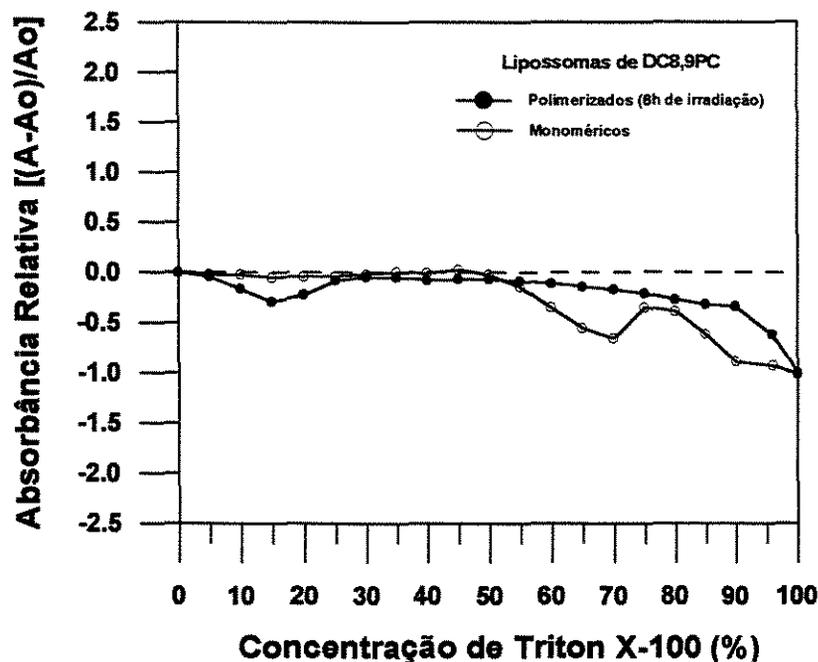


Figura 5.16: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de $\text{DC}_{8,9}\text{PC}$ (1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 6 horas com luz UV (“poliméricos”).

75%. Esta diferença de comportamento entre os lipossomas monoméricos e poliméricos frente ao tensoativo Triton X-100, assim como verificado para ao tensoativo C_{12}E_5 , é um forte indício de que a reação de polimerização entre os fosfolípidos diacetilênicos $\text{DC}_{8,3}\text{PC}$ efetivamente ocorreu, ao menos parcialmente.

Os lipossomas monoméricos e poliméricos de $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ apresentaram estabilidade estrutural similar quando em presença de Triton X-100, ao contrário do que se observa para os lipossomas monoméricos e poliméricos preparados com os outros dois fosfolípidos diacetilênicos. Os lipossomas de $\text{DC}_{2,15}\text{PC}$ monoméricos e polimerizados por 2 horas (Figura 5.18) começaram a apresentar sinais significativos de desestabilização a partir de concentrações acima de 50% do tensoativo. Por outro lado, os lipossomas com maior grau de polimerização (irradiados durante 6 horas) e os correspondentes lipossomas monoméricos (Figura

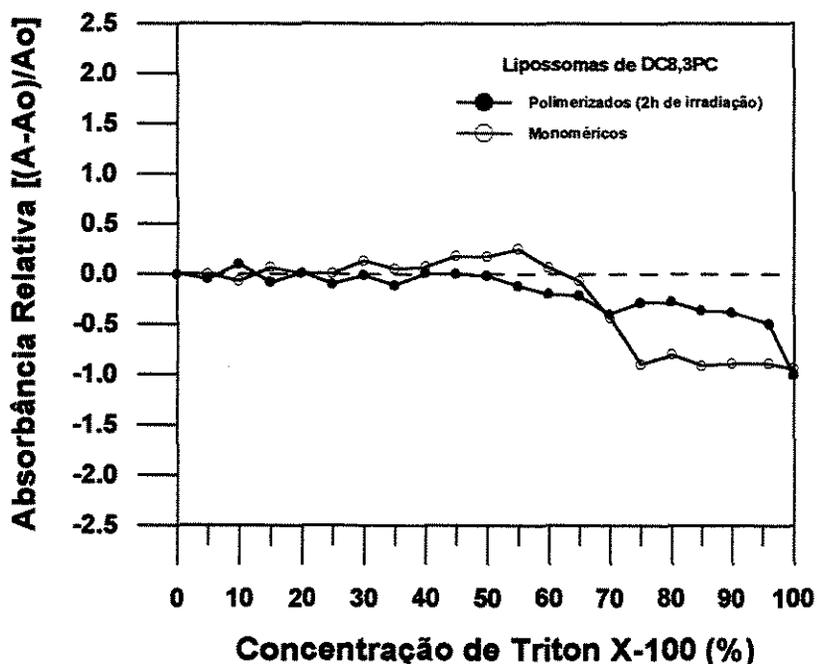


Figura 5.17: Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de DC_{8,3}PC (1,1mM) não irradiados ("monoméricos") e irradiados por 2 horas com luz UV ("poliméricos").

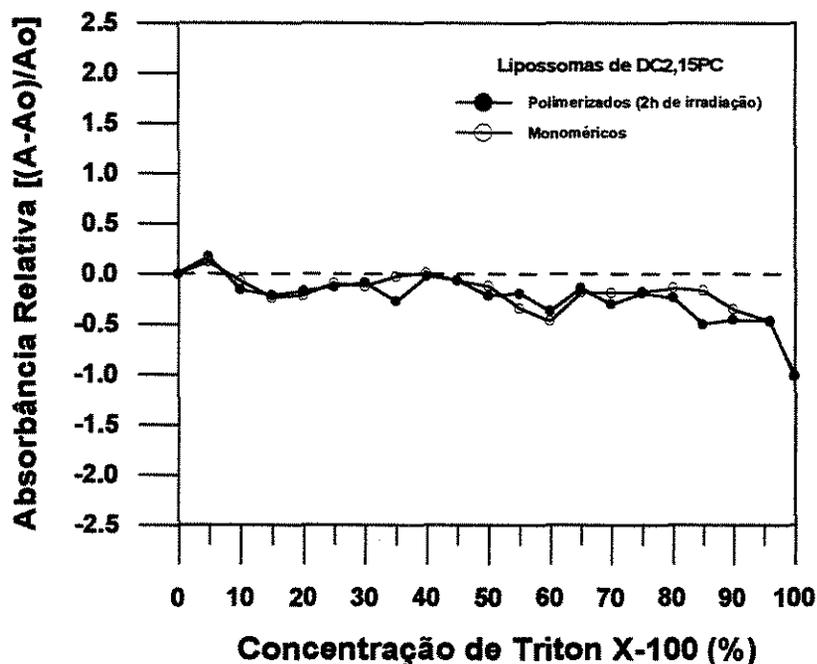


Figura 5.18: Curvas de absorvância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de DC_{2,15}PC (0,7mM) não irradiados ("monoméricos") e irradiados por 2 horas com luz UV ("poliméricos").

5.19), apresentaram-se extremamente estáveis em presença do tensoativo, já que o início da desestabilização somente é perceptível sob concentração de 96%. Para os lipossomas monoméricos e polimerizados de DC_{2,15}PC, o elevado grau de empacotamento dos fosfolipídios observado no estudo da agregação em monocamadas parece dificultar a penetração das moléculas do tensoativo na bicamada, conferindo aos lipossomas uma elevada estabilidade estrutural.

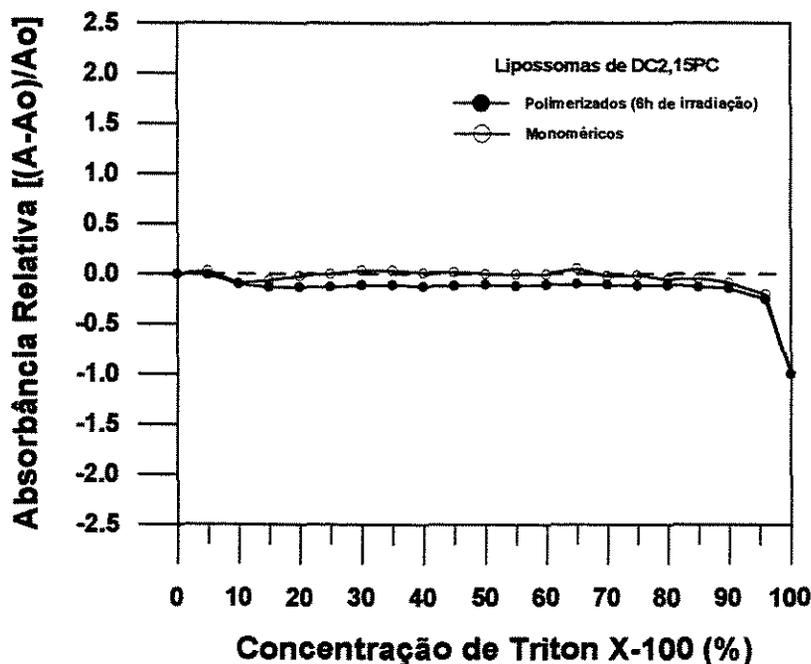


Figura 5.19: Curvas de absorbância relativa ($\lambda=340\text{nm}$) em função da concentração percentual do tensoativo taurocolato de sódio para lipossomas de DC_{2,15}PC (1mM) não irradiados (“monoméricos”) e irradiados por 6 horas com luz UV (“poliméricos”).

5.2.5. Redução das insaturações em lipossomas poliméricos de DC_{8,9}PC

A avaliação qualitativa da reação de redução foi realizada através de espectroscopia UV/vis (Figura 5.20). Comparando-se os espectros gerados pelos três meios reacionais estudados e pela suspensão de lipossomas polimerizados (branco da reação), pode-se perceber que a adição de hidrazina, ou de hidrazina e cloreto de cobre (CuCl_2) à suspensão lipídica não foi suficiente para que a reação

de redução acontecesse. Na reação em que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi empregado em conjunto com a hidrazina e com o cloreto de cobre, verificou-se uma nítida diminuição da absorbância do meio reacional, indicativa de que a reação de redução de fato aconteceu.

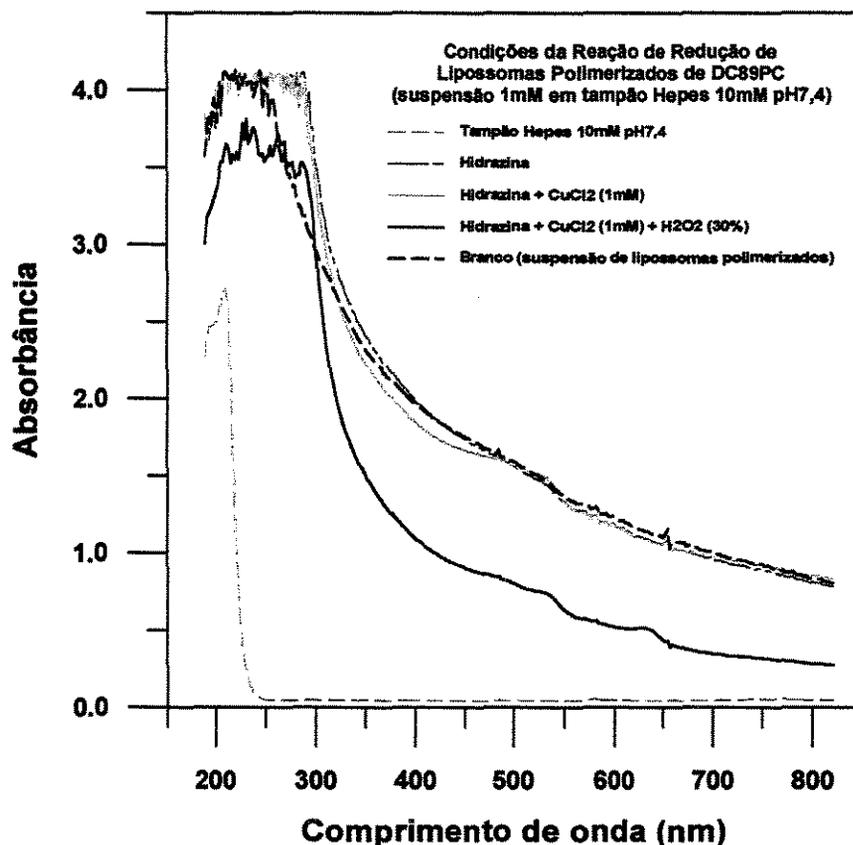
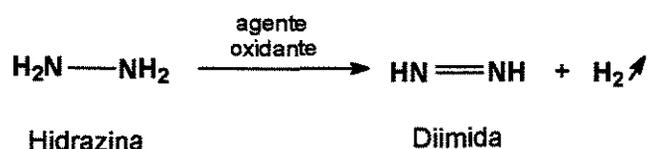


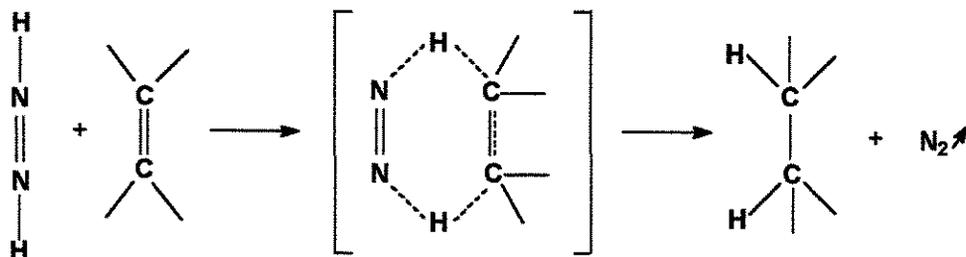
Figura 5.20: Espectros de UV/vis da solução tampão HEPES 10mM pH7,4, da suspensão de lipossomas poliméricos de DC_{8,9}PC (Avanti Polar Lipids) 1mM em tampão, e dos meios reacionais compostos por esta suspensão de lipossomas mais: hidrazina; hidrazina e CuCl₂; e hidrazina, CuCl₂ e peróxido de hidrogênio, após agitação sob 37°C±2°C por uma noite.

A alteração do perfil de absorbância na região do visível refletiu-se na cor do meio reacional: no branco da reação e nos dois primeiros meios reacionais, a cor inicial manteve-se praticamente inalterada (vermelho claro), enquanto que no meio reacional contendo peróxido de hidrogênio, a cor alterou-se rapidamente para amarelo. No espectro obtido para este meio reacional observa-se também um

ligeiro aumento da absorbância na região entre 600nm e 650nm. Outro indicativo da ocorrência da reação neste último sistema foi o intenso borbulhamento observado nos estágios iniciais da reação, pois na geração da diimida a partir da hidrazina ocorre a formação de gás hidrogênio (Esquema 5.7), e na própria reação de redução da olefina com a diimida nitrogênio gasoso é produzido (Esquema 5.8).



Esquema 5.7: Reação de geração da diimida a partir da hidrazina.

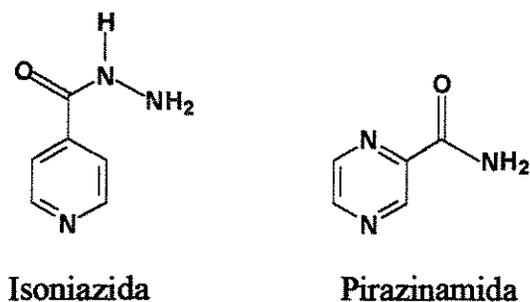


Esquema 5.8: Reação de redução de olefinas em presença de diimida.

5.3. Avaliação da Capacidade de Encapsulação

Previamente à encapsulação, avaliou-se os efeitos da radiação UV sobre os compostos terapêuticos (Esquema 5.9), uma vez que se pretendia realizar a encapsulação pelo método passivo. A metodologia da encapsulação passiva envolve a adição da droga solubilizada em tampão durante a etapa de hidratação do filme lipídico seco, ou seja, previamente à polimerização através da irradiação com luz UV. A avaliação das alterações foi feita pela irradiação direta das drogas solubilizadas em tampão e posterior comparação dos espectros de absorbância na região do UV/visível com aqueles obtidos para soluções dos compostos não irradiadas.

A isoniazida apresentou pico de maior absorbância no comprimento de onda 260nm (Figura 5.21), que é o comprimento de onda utilizado nos experimentos para a sua quantificação por espectrometria. Após a irradiação com luz UV, houve um decréscimo de 6% na absorbância (a 260nm) obtida para a isoniazida, indicando que a radiação provocou alteração no composto. Visualmente, a solução da droga em tampão não se alterou, permanecendo incolor.



Esquema 5.9: Fórmula molecular dos compostos isoniazida e pirazinamida, ambos utilizados no tratamento da tuberculose.

A pirazinamida apresentou pico de maior absorbância no comprimento de onda 270nm, ligeiramente superior ao comprimento de onda utilizado nos experimentos para a sua quantificação por espectrometria (260nm). Nos testes

realizados, houve um aumento de 15% na absorbância (a 270nm) obtida para a pirazinamida após a irradiação com luz UV, indicando que a radiação provocou alteração no composto. Visualmente, a solução da droga em tampão também se alterou, passando de incolor para amarela. O efeito da irradiação com luz UV foi mais pronunciado para a pirazinamida em relação à isoniazida.

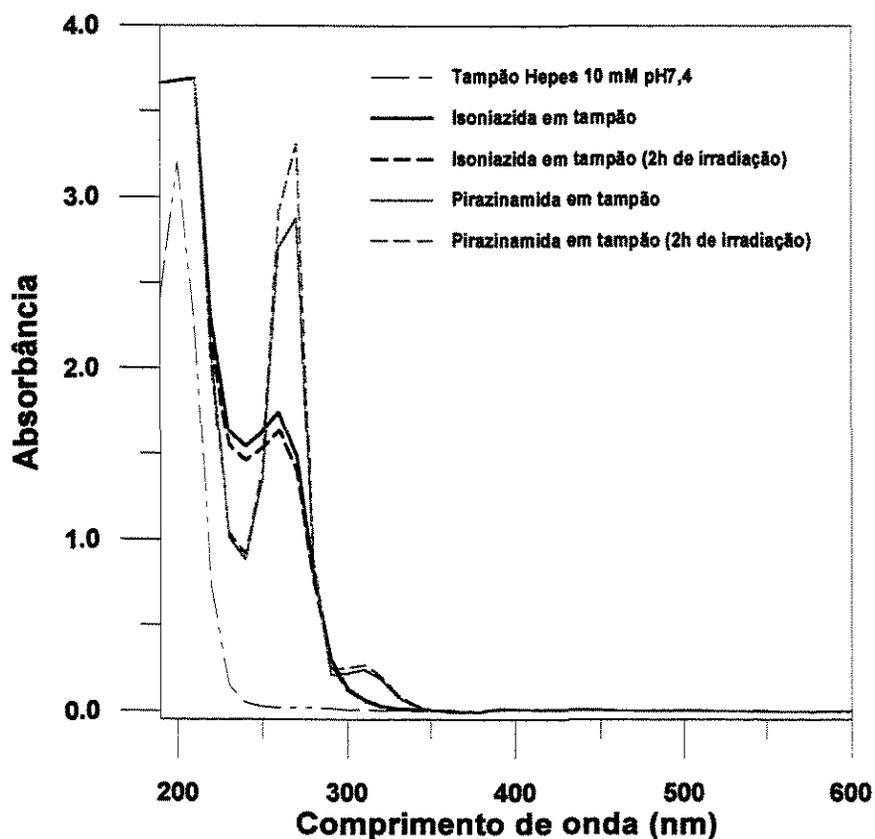


Figura 5.21: Espectros de UV/vis do tampão Hepes 10mM (pH7,4), e das soluções aquosas de isoniazida e de pirazinamida em tampão Hepes 10mM (pH7,4), não irradiadas e irradiadas com luz UV (lâmpada Germetec), a 5cm de distância da lâmpada, sob temperatura de 4°C durante 2 horas.

Ambos os compostos terapêuticos sofrem algum tipo de alteração decorrente da irradiação com luz UV, sendo que a isoniazida é menos afetada pelo processo, o que motivou a seleção desse composto para os ensaios de encapsulação em lipossomas de DCPC.

Para preservar o composto terapêutico das alterações decorrentes da irradiação com luz UV, e também para evitar efeitos adversos sobre a extensão da polimerização devidos à irradiação dos fosfolípidios diacetilênicos em presença da isoniazida, adotou-se a técnica de encapsulação através da liofilização e reidratação dos lipossomas (Kirby e Gregoriadis, 1984). Para avaliar sua viabilidade, estudos preliminares foram realizados através da reidratação dos lipossomas previamente liofilizados com solução tampão Hepes 10mM pH7,4.

Foi necessário caracterizar as vesículas em termos de seu tamanho para se avaliar as possíveis alterações morfológicas e/ou agregação das vesículas decorrentes dos processos de liofilização e reidratação aplicados ao sistema. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.7, e mostram que houve uma mudança da distribuição de tamanhos, com o surgimento de uma população com diâmetro acima de 1000nm em todos os casos estudados. O perfil desta população específica é mais compatível com os microtubos do que com vesículas, podendo estar relacionado também à agregados de vesículas.

Tabela 5.7: Tamanho das partículas nas suspensões de lipossomas em tampão Hepes 10mM pH7,4 antes da liofilização, e após a reidratação dos lipossomas liofilizados com tampão Hepes 10mM pH7,4, determinado por espalhamento de luz quasi-elástico (QLS). Os lipossomas polimerizados foram irradiados por 2 horas com luz UV.

Composição	Antes da Liofilização		Após a Liofilização/Reidratação	
	DM (nm)	DT	DM (nm)	DT
DC _{8,3} PC (m)	92±40	74nm (58%) 118nm (42%)	---	105nm (74%) 484nm (18%) 2408nm (8%)
DC _{8,3} PC (p)	103±50	59nm (34%) 125nm (66%)	---	53nm (61%) 153nm (29%) 1489nm (10%)
DC _{8,9} PC (m)	102±47	64nm (42%) 121nm (58%)	---	158nm (68%) 1460nm (32%)
DC _{8,9} PC (p)	101±38	101nm (100%)	---	183nm (78%) 2395nm (22%)
DC _{2,15} PC (p)	132±75	87nm (60%) 200nm (40%)	---	486nm (24%) 2101nm (76%)

DM: Diâmetro Médio; DT: Distribuição de Tamanhos;
(m): lipossomas monoméricos; (p): lipossomas poliméricos

5.3.1. Influência da posição das insaturações na eficiência de encapsulação

Para os ensaios de encapsulação da isoniazida nos lipossomas, procurou-se avaliar a relação entre as razões molares droga:lipídio inicial $[D/L]_o$ e final $[D/L]_f$. Na preparação dos lipossomas de DC_{8,9}PC e DC_{2,15}PC, a concentração inicial de lipídios foi fixada em 5mM, variando-se a concentração de isoniazida solubilizada em tampão Hepes 10mM pH7,4 adicionada à cada suspensão de lipossomas polimerizados imediatamente antes do congelamento e liofilização. As relações molares $[D/L]_o$ utilizadas foram 3,33 , 6,66 e 26,67 para as preparações de lipossomas de DC_{8,9}PC, e 2,91 e 5,81 para lipossomas de DC_{2,15}PC. Após a reidratação dos lipossomas liofilizados com solução tampão, procedeu-se à separação da droga não encapsulada através de ultra-filtração. O número de ciclos de ultra-filtração realizados foi função da quantidade de isoniazida recuperada no filtrado, interrompendo-se o processo ao se atingir uma concentração insignificante da droga residual. Durante esse processo verificou-se que parte dos lipídios precipitou e ficou aderida à membrana de ultra-filtração. Fez-se a quantificação dos fosfolipídios presentes na suspensão lipídica retida e quantificou-se a isoniazida liberada das vesículas após o rompimento dos lipossomas pela adição de etanol. Em todos os testes realizados verificou-se que a concentração de isoniazida obtida após o rompimento das vesículas com etanol era zero, indicando que os lipossomas não estavam encapsulando a droga, ou que esta estava permeando a bicamada a taxas elevadas.

Para avaliar se o fato da não detecção de isoniazida após o rompimento das vesículas era decorrente da remoção da isoniazida do interior dos lipossomas devido ao excessivo número de ultra-filtrações, foram levantadas as curvas de recuperação de isoniazida a partir da suspensão de lipossomas e da solução da droga em tampão com a mesma concentração inicial. Se a isoniazida estivesse de fato sendo encapsulada nos lipossomas e permeando a bicamada em função do gradiente de concentração gerado durante a ultra-filtração, as taxas de recuperação da isoniazida nos filtrados obtidos a partir da suspensão de lipossomas e a partir da solução da droga livre deveriam ser diferentes. A seguir são apresentadas as curvas de recuperação da isoniazida em função do número de ultra-filtrações, para

lipossomas preparados a partir dos fosfolipídios DC_{8,9}PC (Figura 5.22, Figura 5.23 e Figura 5.24) e DC_{2,15}PC (Figura 5.25 e Figura 5.26) com diferentes razões droga:lipídio iniciais. Como pode ser visto, o perfil obtido a partir dos lipossomas polimerizados de DC_{8,9}PC (irradiados por 2 horas) praticamente se sobrepõe ao perfil obtido a partir da solução de isoniazida livre, para todas as relações molares [D/L]₀ avaliadas. Desta forma fica evidente que não está ocorrendo encapsulação da droga pelos lipossomas. Para os lipossomas polimerizados de DC_{2,15}PC (irradiados por 2 horas) houve uma pequena diferença nos perfis de liberação da isoniazida entre o segundo e quarto ciclo de ultra-filtração. Entretanto não se pode afirmar que houve encapsulação, pois as diferenças de concentração estão dentro do erro experimental.

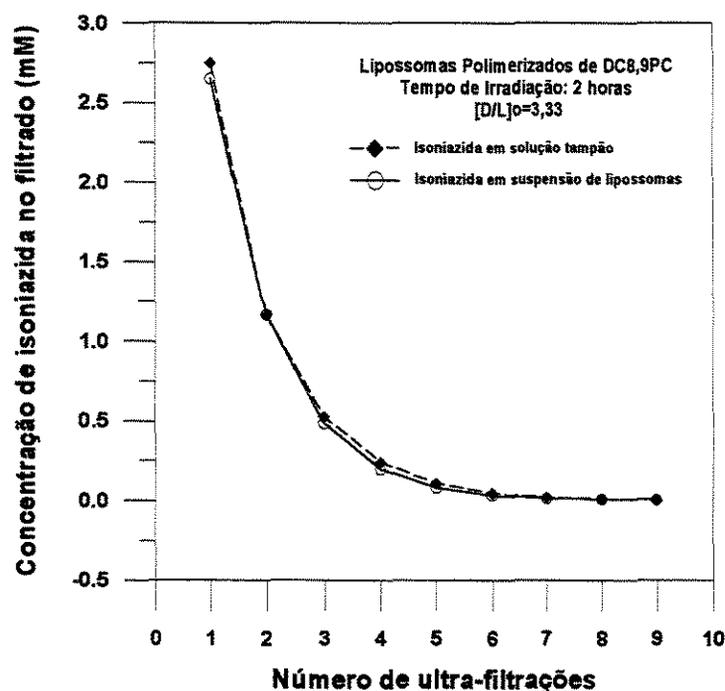


Figura 5.22: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{8,9}PC 5mM em tampão com [D/L]₀=3,33.

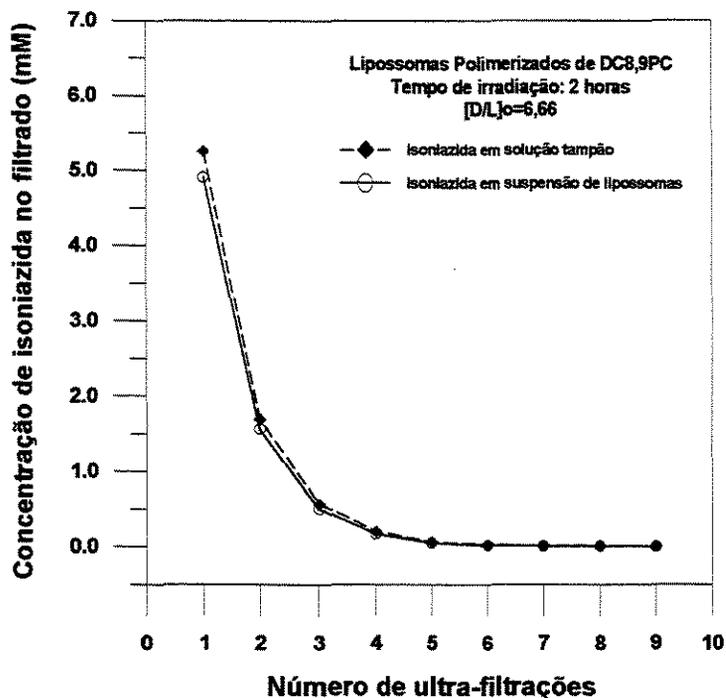


Figura 5.23: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{8,9}PC 5mM em tampão com [D/L]₀=6,66.

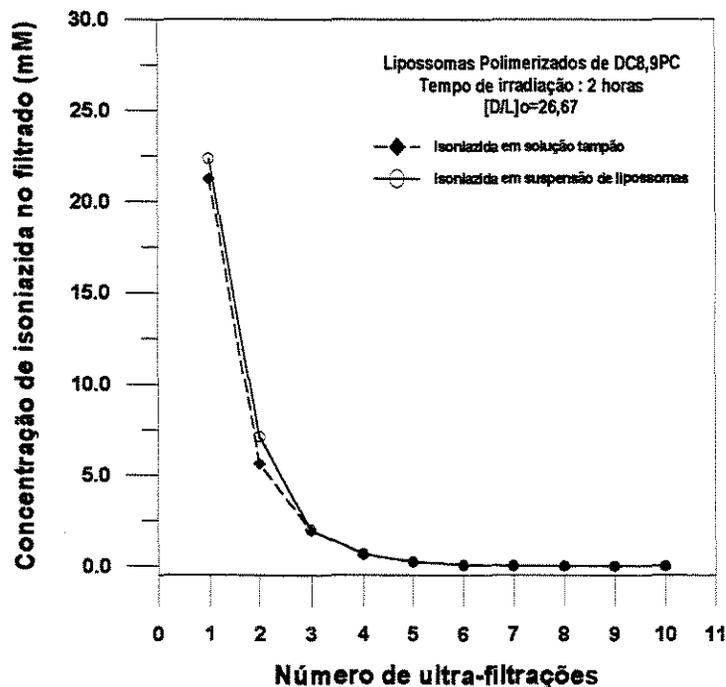


Figura 5.24: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{8,9}PC 5mM em tampão com [D/L]₀=26,67.

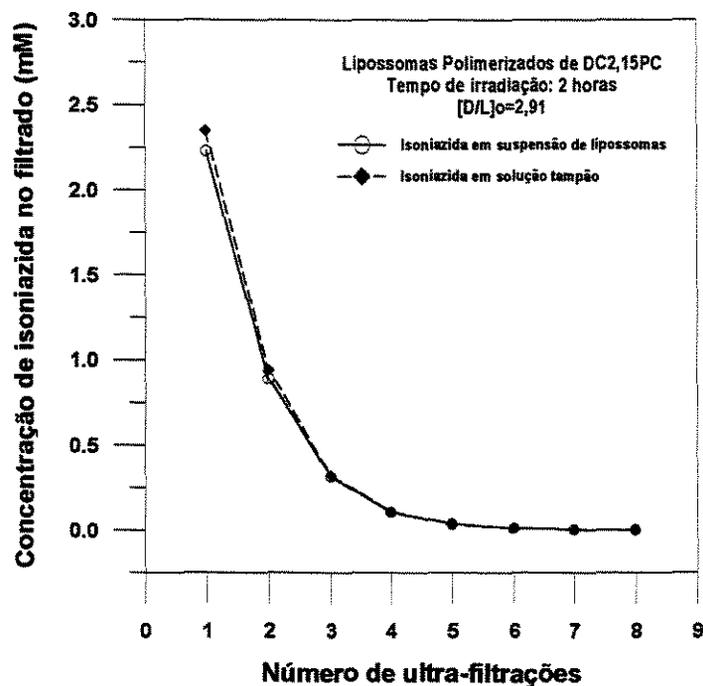


Figura 5.25: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{2,15}PC 5mM em tampão com [D/L]₀=2,91.

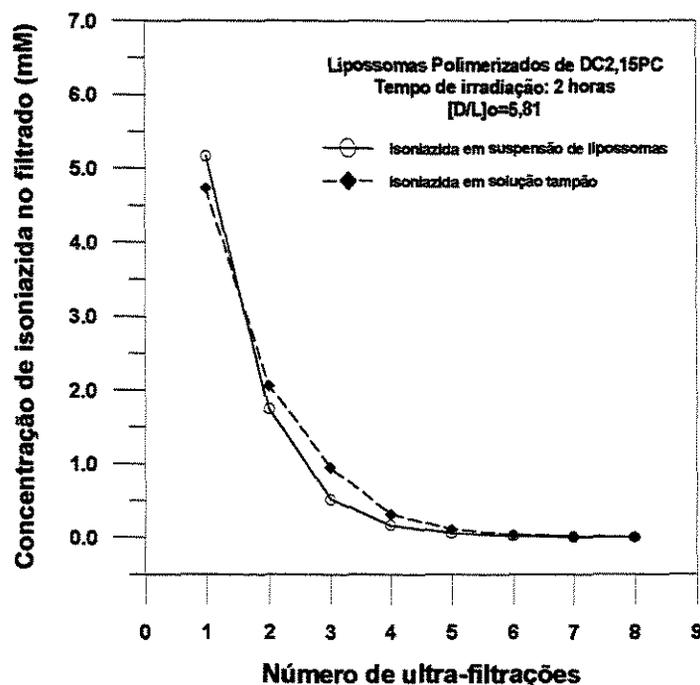


Figura 5.26: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 2 horas) de DC_{2,15}PC 5mM em tampão com [D/L]₀=5,81.

5.3.2. Influência da extensão da polimerização sobre a capacidade de encapsulação

Uma hipótese levantada para explicar a incapacidade dos lipossomas de DC_{8,9}PC e DC_{2,15}PC em encapsular a isoniazida relaciona uma provável elevada permeabilidade da bicamada lipídica à baixa extensão da polimerização obtida pela irradiação dos fosfolipídios por apenas 2 horas. Bicamadas menos extensamente polimerizadas poderiam apresentar maiores quantidades de pequenos domínios de polímero cercados por grandes domínios de moléculas monoméricas. Como na interface entre esses dois tipos de domínios podem ocorrer defeitos capazes de permitir o livre fluxo através da membrana, uma forma de minimizá-los seria aumentar o grau de polimerização dos lipídios na bicamada. Como apresentado no estudo da cinética de polimerização, a máxima extensão da polimerização foi conseguida com tempo de irradiação ao redor de 5,5 horas. Desta forma, repetiu-se o ensaio de encapsulação empregando-se lipossomas com maior grau de polimerização, irradiados com luz UV durante 6 horas (Figura 5.27 e Figura 5.28). Utilizou-se a razão molar $[D/L]_o = 6,66$ para os lipossomas de DC_{8,9}PC, e a razão molar $[D/L]_o = 5,81$ para os lipossomas de DC_{2,15}PC, em virtude do índice de encapsulação observada para os lipossomas de DC_{2,15}PC irradiados por 2 horas e com $[D/L]_o = 5,81$.

A maior extensão da polimerização não provocou alteração significativa nos perfis de recuperação da isoniazida para as duas formulações de lipossomas utilizadas, revelando novamente a ausência de encapsulação significativa da droga. Por outro lado, efeitos significativos foram detectados nas distribuições de tamanho, como pode ser visto na Tabela 5.8. Tais alterações podem ser relacionadas tanto com mudanças da morfologia das vesículas quanto com a sua fusão ou agregação, que podem estar afetando negativamente a encapsulação da isoniazida no interior das vesículas.

O processo de liofilização pode conduzir à fusão ou agregação das vesículas, uma vez que a retirada da água proporciona uma maior aproximação entre os lipossomas. Com isso, interações entre as bicamadas de vesículas distintas

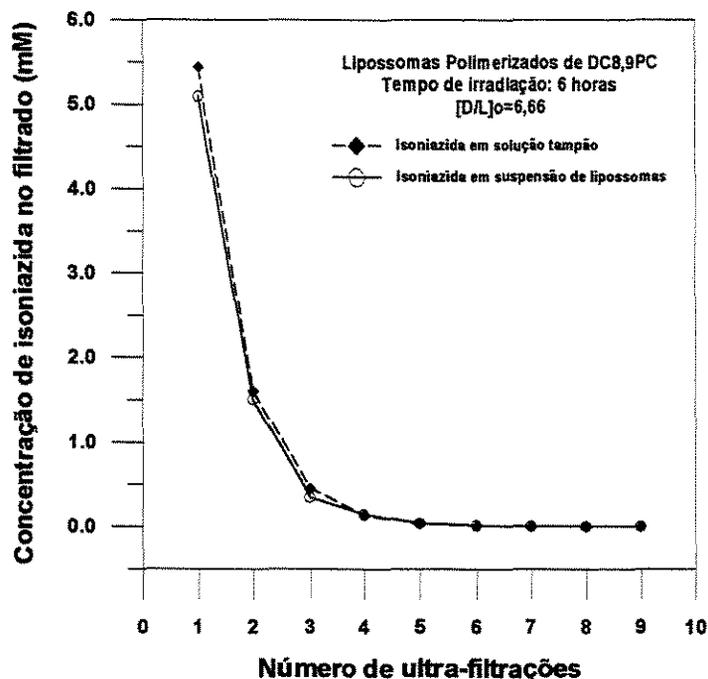


Figura 5.27: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 6 horas) de DC_{8,9}PC 5mM em tampão com [D/L]₀=6,66.

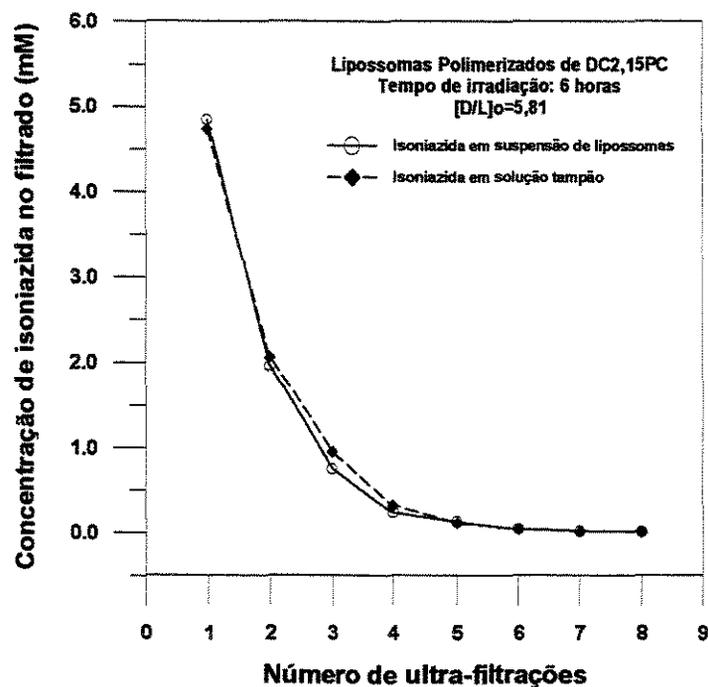


Figura 5.28: Perfis de concentração de isoniazida nos filtrados provenientes da ultra-filtração de solução da droga em tampão Hepes 10mM pH7,4 e de suspensão de lipossomas polimerizados (irradiação com luz UV por 6 horas) de DC_{2,15}PC 5mM em tampão com [D/L]₀=5,81.

(como, por exemplo, a troca de lipídios), poderiam resultar na geração de defeitos na membrana, através dos quais o composto encapsulado seria liberado. A liofilização pode ainda acarretar na desestruturação dos lipossomas, com posterior reestruturação das vesículas durante a reidratação. Isto de fato deve acontecer no caso de lipossomas convencionais, proporcionando uma maior eficiência de encapsulamento (vide item 3.1.4 – Kirby e Gregoriadis, 1984). Entretanto essa reestruturação deve ser dificultada no caso dos lipossomas polimerizados devido à presença das cadeias poliméricas, provavelmente tornando a desestruturação irreversível.

A Figura 5.29 mostra uma micrografia das vesículas de DC_{2,15}PC obtida através de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. Na amostra considerada, pode-se observar estruturas esféricas distintas, cuja ordem de grandeza (aproximadamente 100nm) corresponde à população de menor tamanho observada para estas vesículas polimerizadas preparadas a partir desse lipídio, como pode ser visto nas Tabela 5.8 e Tabela 5.4. A proximidade entre as estruturas esféricas observada na imagem fotográfica pode ser devida à desidratação sofrida pela amostra na preparação para a micrografia, ou a um início de agregação. Ressalta-se que neste último caso não se observa a fusão das vesículas.

Tabela 5.8: Efeito do tempo de irradiação (2 horas ou 6 horas) sobre o tamanho das partículas após a reidratação dos lipossomas liofilizados com tampão Hepes 10mM pH7,4, determinado por espalhamento de luz quasi-elástico (QLS).

Composição	2 horas de irradiação	6 horas de irradiação
	DT (nm)	DT (nm)
DC _{8,9} PC (p)	183 (78%)	323 (81%)
	2395 (22%)	7171 (19%)
DC _{2,15} PC (p)	486 (24%)	158 (83%)
	2101 (76%)	762 (7%)
		5038(10%)

DT: Distribuição de Tamanho; (p): lipossomas poliméricos

Analisando-se esses resultados, pode-se atribuir a ausência de encapsulação tanto às possíveis alterações estruturais quanto à elevada permeabilidade das bicamadas de fosfolípidios diacetilênicos já observadas por Johnston et al. (1983) relativamente àquelas obtidas com o fosfolípido DMPC, e também quando se empregam lipossomas unilamelares pequenos (SUV) de DC_{8,11}PC, conforme apresentado no item 3.1.4. Além disso, a isoniazida é uma molécula relativamente pequena que contém tanto um grupo de caráter apolar (anel aromático) quanto um grupo hidrofílico (grupo amida). Tais características podem proporcionar uma razoável facilidade de permeação da isoniazida através da bicamada lipídica.

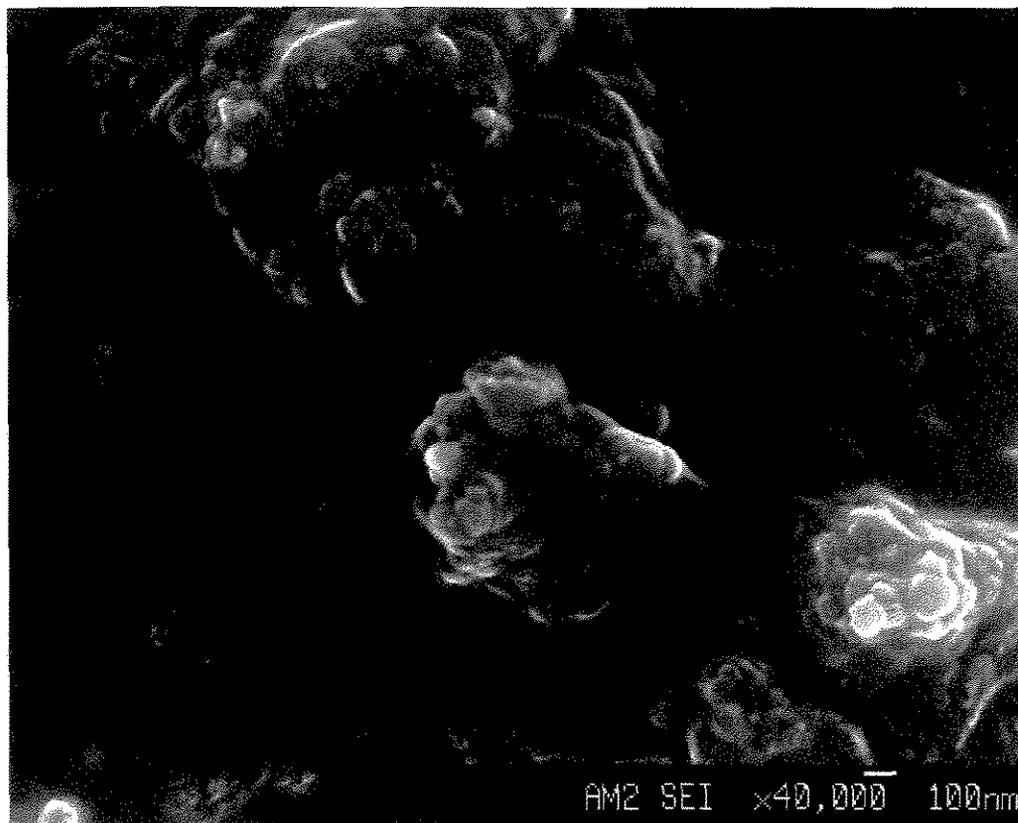


Figura 5.29: Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (“field emission scanning electron microscopy” - FESEM) de lipossomas de DC_{2,15}PC polimerizados por irradiação com luz UV durante 2 horas, liofilizados e reidratados, com $[D/L]_0=0$.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

A síntese, purificação e caracterização dos fosfolipídios diacetilênicos DC_{8,3}PC (*1a*), DC_{8,9}PC (*1b*) e DC_{2,15}PC (*1c*) foi alcançado com sucesso, obtendo-se rendimentos razoáveis para a sua preparação.

A substituição do grupo protetor metoximetila (MOM) pelo grupo tetraidropirano (THP) na etapa de proteção da hidroxila do reagente ω-bromo-1-alcanol foi bem sucedida. Entretanto, os rendimentos finais da síntese dos ácidos diacetilênicos foram inferiores quando do emprego do grupo THP como protetor em relação ao emprego do grupo MOM. Desta forma a utilização do grupo MOM como protetor é ainda a mais vantajosa para a síntese dos fosfolipídios diacetilênicos.

O reagente DMPU mostrou ser uma boa alternativa no sentido de se minimizar os riscos de contaminação química, pessoal e ambiental por HMPA (reagente extremamente tóxico, com comprovada ação cancerígena e mutagênica) durante a síntese química dos ácidos diacetilênicos, já que o uso do DMPU não alterou significativamente os rendimentos das reações.

A monocamada de DC_{8,3}PC (*1a*) é a mais fluida entre as três estudadas, sendo que a monocamada de DC_{2,15}PC (*1c*) demonstrou ser a mais rígida, com as moléculas mais densamente empacotadas no filme monomolecular. Para as moléculas de fosfatidilcolina diacetilênica em que as triplas insaturações estavam posicionadas nos átomos de carbono 10 e 12 das cadeias acila esterificadas ao glicerol (DC_{8,9}PC (*1b*) e DC_{8,3}PC (*1a*)), verificou-se que a monocamada torna-se mais fluida ao se diminuir o tamanho da parte distal das cadeias acila. Com o grupo diacetilênico posicionado mais próximo da cabeça polar das moléculas de fosfatidilcolina diacetilênica (insaturações nos átomos de carbono 4 e 6 da DC_{2,15}PC (*1c*)) em cadeias acila com mesmo número de átomos de carbono (23), verificou-se um aumento na rigidez da monocamada monomérica. Estes comportamentos foram similares no caso de bicamadas lamelares (lipossomas),

conforme se verificou nos ensaios de estabilidade frente aos tensoativos, principalmente no caso do $C_{12}E_5$.

Os lipossomas preparados com os três fosfolípidios diacetilênicos e irradiados com luz UV sofreram polimerização, o que ficou evidente através da espectroscopia UV/visível nos casos do $DC_{8,9}PC$ (*1b*) e do $DC_{2,15}PC$ (*1c*). A diferença da estabilidade dos lipossomas de $DC_{8,3}PC$ (*1a*) em presença de tensoativos permitiu inferir a ocorrência da polimerização para aqueles submetidos à radiação UV.

As taxas de reação de polimerização foram semelhantes para os lipossomas preparados com os fosfolípidios diacetilênicos $DC_{8,9}PC$ (*1b*) e $DC_{2,15}PC$ (*1c*), sendo muito maiores que aquelas verificadas para lipossomas preparados com $DC_{8,3}PC$ (*1a*). As maiores velocidades de reação são observadas para períodos de irradiação de até 2 horas, para os lipossomas preparados com $DC_{8,9}PC$ e para os lipossomas preparados com $DC_{2,15}PC$. Para lipossomas com esta última composição, verificou-se que a reação é interrompida a partir de 4 horas de irradiação, enquanto que para os lipossomas de $DC_{8,9}PC$ ela continua ocorrendo até 5,5 horas de irradiação, embora sob velocidades bem menores que nas primeiras 2 horas de irradiação).

Os resultados obtidos para os lipossomas polimerizados através de microDSC demonstraram que a reação de polimerização, embora sendo suficiente para produzir os efeitos colorimétricos e de estabilização esperados nos lipossomas, parece ocorrer em baixa extensão.

Os fosfolípidios diacetilênicos $DC_{8,3}PC$, $DC_{8,9}PC$ e $DC_{2,15}PC$, produziram lipossomas com diferentes graus de agregação, produzindo bicamadas com fluidez variadas, refletindo-se diretamente na extensão da polimerização. A caracterização do empacotamento dos fosfolípidios em monocamada e bicamada mostrou uma boa correlação entre as propriedades físico-químicas dos agregados, no que diz respeito à área ocupada por molécula, polimerização e estabilidade das bicamadas em presença de tensoativo. Esses resultados são muito promissores para a aplicação dos lipossomas polimerizados na encapsulação e liberação controlada de

drogas, uma vez que os processos desenvolvidos produziram lipossomas com características adequadas para as aplicações pretendidas.

O estudo do tamanho dos lipossomas preparados com DC_{8,3}PC demonstrou que os lipossomas monoméricos e poliméricos não sofreram alterações significativas durante sua estocagem, mesmo quando submetidos à variações de temperatura (4°C a temperatura ambiente). Os lipossomas preparados com os fosfolipídios DC_{8,9}PC e DC_{2,15}PC mostraram-se bastante susceptíveis a alterações quando submetidos a baixas temperaturas, indicando a provável ocorrência de alterações morfológicas importantes das bicamadas lipídicas.

O processo de liofilização provocou pequenas alterações na distribuição de tamanho dos lipossomas de DC_{8,3}PC e DC_{8,9}PC, que aparentemente não chegaram a comprometer a maior parte dos lipossomas inicialmente presentes. A distribuição de tamanhos dos lipossomas polimerizados de DC_{2,15}PC foi mais afetada pelo processo de liofilização e reidratação, com indicação da ocorrência de alterações morfológicas e/ou agregação das vesículas. Desta forma foi possível evitar-se a exposição do composto terapêutico à radiação UV, que certamente provocaria reações indesejadas de degradação, e afetaria negativamente a extensão da polimerização dos fosfolipídios diacetilênicos nas bicamadas dos lipossomas.

Para a encapsulação de isoniazida em lipossomas polimerizados de DC_{8,9}PC e de DC_{2,15}PC o processo utilizado neste trabalho não promoveu a retenção da droga nas vesículas após a separação por ultra-filtração.

A reação de redução das insaturações do polímero obtido pela irradiação de lipossomas de DC_{8,9}PC foi bem sucedida ao se empregar cloreto de cobre e peróxido de hidrogênio juntamente com a hidrazina.

Para a sequência desta linha de pesquisa são sugeridos os seguintes temas para próximos trabalhos:

1. Estudo do aumento de escala da síntese química.
2. Estudo da preparação de fosfatidilcolinas diacetilênicas via enzimática (utilizando-se fosfolipases) a partir de ácidos diacetilênicos naturais ou sintéticos.

3. Uso de crioprotetor (trealose) para a liofilização dos lipossomas para minimizar efeitos de agregação das vesículas.

4. Estudo de compostos diacetilênicos (ácidos, fosfolipídios e outros derivados) com diferentes comprimentos de cadeia e posicionamento das insaturações não somente para aplicações na liberação controlada, mas também visando outras aplicações tecnológicas (p. ex. biosensores, recobrimento de superfícies de implantes, suporte para separação por afinidade e litografia de alta definição)

5. Estudo da polimerização dos compostos diacetilênicos pela irradiação com fontes de luz UV mais potentes ou com outras radiações de alta energia (p.ex. raios-X e radiação γ), objetivando a polimerização sob temperatura ambiente.

6. Desenvolvimento de metodologia para quantificação direta da extensão da polimerização, relacionando com a determinação indireta (espectroscopia UV/vis).

7. Estudo da encapsulação em vesículas compostas por DC_{m,n}PC em mistura com lipídios não polimerizáveis e com inclusão de marcadores para o estudo do comportamento da membrana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUGHAM, R. H., YEE, K. C. Solid-state polymerization of linear and cyclic acetylenes. Macromol. Rev., v.13, p.219-239, 1978.
- BLECHNER, S. L., SKITA, V., RHODES, D. G. Structure of polymerizable lipid bilayers: water profile of a diacetylenic bilayer using elastic neutron scattering. Biochim. Biophys. Acta, v.1022, n.3, p.291-295, Mar.1990.
- BLUME, A., Phase transition of polymerizable phospholipids. Chem. Phys. Lipids, v.57, n.2-3, p.253-273, Mar. 1991.
- BURKE, T. G., RUDOLPH, A. S., PRICE, R. R., SHERIDAN, J. P., DALZIEL, A. W., SINGH, A.,SCHOEN, P. E. Differential scanning calorimetric study of the thermotropic phase behavior of a polymerizable, tubule-forming lipid. Chem. Phys. Lipids, v.48, n.3-4, p.215-230, Oct.1988.
- CABRAL, E. C. M. C. Reconhecimento molecular de autoanticorpos e desenvolvimento de sinal colorimétrico utilizando lipossomas polimerizados. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 2000. 118 p. (Dissertação de Mestrado).
- CAREY, M. C., SMALL, D. M. Physical-chemistry of cholesterol solubility in bile – relationship to gallstone formation and dissolution in man. J. Clin. Invest., v.61, n.4, p.998-1026, 1978
- CHAN, K. C., KIM, T., SCHOER, J. K., CROOKS, R. M. Polymeric self-assembly monolayers. 3. Pattern transfer by use of photolithography, eletrochemical methods, and na ultrathin, self-assembled diacetylenic resist. J. Am. Chem. Soc., v.117, n.21, p.5875-5876, 1995.
- CHAPMAN, D., CHARLES, S. A. A coat of many lipids-in the clinic. Chem. Brit., v.28, n.3, p.253-257, Mar., 1992.
- CHARYCH, D., NAGY, J. O. Artificial cell membranes for diagnostics and therapeutics. Chemtech, v.26, n.9, p.24-28, Sep. 1996.

- CHEN, P. S., TORIBARA, T. Y., WARNER, H. Microdetermination of phosphorous. Anal. Chem., v. 28, n.11, p. 1756-1758, 1956.
- CHEN, H., TORCHILIN, V., LANGER, R. Lectin-bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers. Pharmaceut. Res., v.13, n.9, p.1378-1383, Sep. 1996 (a).
- CHEN, H., TORCHILIN, V., LANGER, R. Polymerized liposomes as potential oral vaccine: stability and bioavailability. J. Control. Release, v.42, n.3, p.263-272, Dec. 1996 (b).
- CHODKIEWICZ, W., CADIOT, P. Nouvelle synthese de composes polyacetyleniques conjugues symetriques et dissymetriques. C. R. Hebd. Acad. Sci., v.241, n.16, p.1055-1057, 1955.
- DAY, D., HUB, H. H., RINGSDORF, H. Polymerization of mono- and bi-functional diacetylene derivatives in monolayers at the gas-water interface. Israel J. Chem., v.18, n.3-4, p.325-329, 1979.
- FORD, N. C. Jr.. In: Dynamic light scattering. PECORA, R. (ed.); Plenum, p. 7-57, 1985.
- FREEMAN, F. J., HAYWARD, J. A., CHAPMAN, D. Permeability studies on liposomes formed from polymerisable diacetylenic phospholipids and their potential applications as drug delivery systems. Biochim. Biophys. Acta, v.924, n.2, p.341-351, May 1987.
- GEORGER, J. H., SINGH, A., PRICE, R. R., SCHNUR, J. M., YAGER, P., SCHOEN, P. E. Helical and tubular microstructures formed by polymerizable phosphatidylcholines. J. Am. Chem. Soc., v.109, n.20, p.6169-6175, Sep. 1987.
- GUPTA, C. M., RADHAKRISHNAN, R., KHORANA, H. G. Glycerophospholipid synthesis – improved general method and new analogs containing photo-activable groups. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v.74, n.10, p.4315-4319, 1977

- HALL, B., BIRD, R. R., KOJIMA, M., CHAPMAN, D. Biomembranes as models for polymer surfaces. Biomaterials, v.10, n.4, p.219-224, May 1989.
- HAUMANN, B. F. Liposomes offer hope as medical tools. Inform, v.6, n.7, p.793-802, Jul., 1995.
- HAYWARD, J. A., CHAPMAN, D. Biomembrane surfaces as models for polymer design: the potential for haemocompatibility. Biomaterials, v.5, n.3, p.135-142, May 1984
- HAYWARD, J. A., LEVINE, D. M., NEUFELD, L., SIMON, S. R., JOHSTON, D. S., CHAPMAN, D. Polymerized liposomes as stable oxygen-carriers. FEBS Letters, v.187, n.2, p.261-266, Aug. 1985.
- HINZE, W. L., PRAMAURO, E. A critical-review of surfactant-mediated phase separations (cloud-point extraction): theory and applications. Crit. Rev. Anal. Chem., v.24, n.2, p. 133-177, 1993.
- HUB, H. H., HUPFER, B., KOCH, H., RINGSDORF, H. Polymerizable phospholipid analogues - new stable biomembrane and cell models. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., v.19, n.11, p.938-940, 1980.
- HUI, S.W., YU, H., XU, Z. BITTMAN, R. Microdomain structures in polymerizable and nonpolymerizable diacetylenic phosphatidylcholine monolayers. Langmuir, v.8, n.11, p.2724-2729, Nov. 1992.
- HUO, Q., RUSSELL, K. C., LEBLANC, R. M. Chromatic studies of a polymerizable diacetylene hydrogen bonding self-assembly: a "self-folding" process to explain the chromatic changes of polydiacetylenes. Langmuir, v.15, n.11, p.3972-3980, 1999.
- HUPFER, B., RINGSDORF, H., SCHUPP, H. Liposomes from polymerizable phospholipids. Chem. Phys. Lipids, v. 33, n.4, p.355-374, 1983.
- JOHNSTON, D. S., SANGHERA, S., PONS, M., CHAPMAN, D. Phospholipid polymers – synthesis and spectral characteristics. Biochim. Biophys. Acta, v.602, n.1, p. 57-69, March 1980.

- JOHNSTON, D. S., MCLEAN, L. R., WHITTAM, M. A., CLARK, A. D., CHAPMAN, D. Spectra and physical properties of liposomes and monolayers of polymerizable phospholipids containing diacetylene groups in one or both acyl chains. Biochemistry, v.22, n.13, p. 3194-3202, 1983.
- KIRBY, C., GREGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. Bio-Technol., v.2, n.11, p.979-984, Nov. 1984.
- KUNITAKE, T., NAKASHIMA, N., TAKARABE, K., NAGAI, M., TSUGE, A., YANAGI, H. Vesicles of polymeric bilayer and monolayer membrane. J. Am. Chem. Soc., v.103, n.19, p.5945-5947, 1981.
- LANGER, R. New methods of drug delivery. Science, v.249, p.1527-1533, Sep. 1990.
- LASIC, D. D. Liposomes. Am. Sci., v.80, p.20-31, Jan.-Feb., 1992.
- LASIC, D. D. Liposomes: from physics to applications. Amsterdam: Elsevier, 1993. 575 p.
- LASIC, D. D., MARTIN, F. Stealth Liposomes. Boca Raton: CRC Press Inc., 1995.
- LEAVER, J., ALONSO, A., DURRANI, A. A., CHAPMAN, D. The biosynthetic incorporation of diacetylenic fatty acids into the membrane of *Acholeplasma laidlawii* A cells and polymerization of the biomembranes by irradiation with ultraviolet light. Biochim. Biophys. Acta, v.727, n.2, p.327-335, Jan. 1982.
- LEAVER, J., ALONSO, A., DURRANI, A. A., CHAPMAN, D. The physical properties and photopolymerization of diacetylene-containing phospholipid liposomes. Biochim. Biophys. Acta, v. 732, n. 1, p.210-218, 1983.
- LIO, A., REICHERT, A., AHN, D. J., NAGY, J. O., SALMERON, M., CHARYCH, D. H. Molecular imaging of thermochromic carbohydrate-modified polydiacetylene thin films. Langmuir, v.13, n.24, p.6524-6532, Nov. 1997.

- LOPEZ, E.; O'BRIEN, D. F.; WHITESIDES, T. H. Structural effects on the photopolymerization of bilayer membranes. J. Am. Chem. Soc., v.104, n.1, p.305-307, 1982 (i).
- LOPEZ, E.; O'BRIEN, D. F.; WHITESIDES, T. H. Effects of membrane composition and lipid structure on the photopolymerization of lipid diacetylenes in bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta, v.693, p. 437-443, 1982(ii).
- MADDEN, T. D., HARRIGAN, P. R., TAI, L. C. L., BALLY, M. B., MAYER, L. D., REDELMEIER, T. E., LOUGHREY, H. C., TILCOCK, C. P. S., REINISH, L. W., CULLIS, P. R. The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey. Chem. Phys. Lipids, v. 53, n.1, p. 37-46, Mar 1990.
- MATUO, H., RICE, D. K., BALTHASAR, D. M., CADENHEAD, D. A. Mixed monolayer studies of 12-hydroxyoctadecanoic acid and its esters. Chem. Phys. Lipids, v. 30, n.4, p. 367-380, 1982.
- MAYER, L. D.; BALLY, M. B.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. Chem. Phys. Lipids, v. 40, n.2-4, p. 333-345, Jun.-Jul. 1986.
- MILLER, P., PETERS, R., RINGSDORF, H. Polymer science – microstructure and lateral diffusion in monolayers of polymerizable amphiphiles. Colloid Polym. Sci., v.267, n.2, p.97-107, Feb., 1989.
- MINO, N., TAMURA, H., OGAWA, K. Analysis of color transitions and changes on Langmuir-Blodgett films of a polydiacetylene derivative. Langmuir, v.7, n. 10, p.2336-2341, Oct. 1991.
- NEW, R. C. C. Preparation of liposomes. In: Liposomes: a practical approach. New, R. C. C. (ed.), p.33-104, 1990.

- O'BRIEN, D. F., WHITESIDES, T. H., KLINGBIEL, R. T. The photopolymerization of lipid-diacetylenes in bimolecular-layer membranes. J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed., v.19, n.3, p.95-101, 1981.
- OKADA, J., COHEN, S., LANGER, R. In vitro evaluation of polymerized liposomes as an oral drug delivery system. Pharmaceut. Res., v.12, n.4, p.576-582, Apr. 1995.
- OKADA, S., PENG, S., SPEVAK, W., CHARYCH, D. Color and chromism of polydiacetylene vesicles. Acc. Chem. Res., v.31, n.5, p.229-239, 1998.
- OSTRO, M. J. Liposomes. Sci. Am., v. 256, n. 1, p. 90-99, 1987 (a)
- OSTRO, M. J. (ed.) Liposomes - from biophysics to therapeutics. New York: Marcel Dekker, 1987. 393 p. (b)
- PAPAHADJOPOULUS, D., VAIL, W. J., JACOBSON, K., POSTE, G. Cocholate lipid cylinders – formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. Biochim. Biophys. Acta, v.394, n.3, p.483-491, 1975.
- PATEL, G.N., CHANCE, R. R., WITT, J. D. Visual conformational transition in a polymer solution. J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed., v.16, n.11, p.607-614, 1978.
- PATEL, G.N., CHANCE, R. R., WITT, J. D. Planar-nonplanar conformational transition in conjugated polymer-solutions. J. Chem. Phys., v.70, n.9, p.4387-4392, May 1979.
- PEEK, B. M., CALLAHAN, J. H., NAMBOODIRI, K., SINGH, A., GABER, B. P. Effect of vesicle size on the polymerization of a diacetylene lipid. Macromolecules, v.27, n.1, p.292-297, Jan. 1994.
- RANADE, V. V. Drug delivery systems. 1. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. J. Clin. Pharmacol., v.29, p.685-694, 1989.
- RATNA, B. R., BARAL-TOSCH, S., KAHN, B., SCHNUR, J. M., RUDOLPH, A. S. Effect of alcohol chain length on tubule formation in 1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine. Chem. Phys. Lipids, v.63, n.1-2, p.47-53, Nov., 1992.

- REGEN, S. L. Polimerized liposomes. In: OSTRO, M. J. (ed.) Liposomes - from biophysics to therapeutics. New York: Marcel Dekker, 1987. Cap. 3, p.73-107.
- RHODES, D. G., BLECHNER, S. L., YAGER, P., SCHOEN, P. E. Structure of polymerizable lipid bilayers. I-1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine, a tubule-forming phosphatidylcholine. Chem. Phys. Lipids, v.49, n.1-2, p.39-47, Nov. 1988.
- RHODES, D. G., SINGH, A. Structure of polymerizable lipid bilayers IV: mixtures of long chain diacetylenic and short chain saturated phosphatidylcholines and analogous asymmetric isomers. Chem. Phys. Lipids, v.59, n.3, p.215-224, Oct. 1991.
- RHODES, D. G., XU, Z., BITTMAN, R. Structure of polymerizable lipid bilayers. V: synthesis, bilayer structure and properties of diacetylenic ether and ester lipids. Biochim. Biophys. Acta, v.1128, n.1, p.93-104, Sep. 1992.
- RIBAS, A. M. Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. Campinas/SP: Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, 1997. 92 p. Dissertação (Mestrado).
- RINGSDORF, H., SCHLARB, B., VENZMER, J. Molecular architecture and function of polymeric oriented systems: models for the study of organization, surface recognition and dynamics of biomembranes. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., v.27, n.1, p.113-158, Jan. 1988.
- RUDOLPH, A. S., BURKE, T. G. A Fourier-transform infrared spectroscopic study of the polymorphic phase behavior of 1,2-bis(tricosa-10,12-diynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine; a polymerizable lipid which forms novel microstructures. Biochim. Biophys. Acta, v.902, n.3, p.349-359, Sep. 1987.
- RUDOLPH, A. S., SINGH, B. P., SINGH, A., BURKE, T. G. Phase characteristics of positional isomers of 1,2-di(heptacosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine; tubule-forming phosphatidylcholines. Biochim. Biophys. Acta, v.943, n.3, p.454-462, Sep. 1988.

- SANTOS, L. A., CAVALHEIRO, A. J. New conjugated acetylenes: unusual compounds obtained from seed oil of *Porcelia macrocarpa* (*Annonaceae*). 22nd IUPAC-International Symposium of the Chemistry of Natural Products (Abstract), PPA-189, September 3-8, 2000, UFSCar, São Carlos/SP, Brazil
- SCHOEN, P. E., YAGER, P. J. Spectroscopic studies of polymerized surfactants - 1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed., v.23, n. 10, p.2203-2216, 1985.
- SINGH, A., THOMPSON, R. B., SCHNUR, J. M. Reversible thermochromism in photopolymerized phosphatidylcholine vesicles. J. Am. Chem. Soc., v.108, n.10, p.2785-2787, May 1986.
- SINGH, A., BURKE, T. G., CALVERT, J. M., GEORGER, J. H., HERENDEEN, B., PRICE, R. R., SCHOEN, P. E., YAGER, P. Lateral phase separation based on chirality in a polymerizable lipid and its influence on formation of tubular microstructures. Chem. Phys. Lipids, v.47, p.135-148, 1988.
- SINGH, A. An efficient synthesis of phosphatidylcholines. J. Lipid Res., v.31, n.8, p.1522-1525, Aug. 1990.
- SINGH, A., MARKOWITZ, M., CHOW, G. M. Materials fabrication via polymerizable self-organized membranes: an overview. Nanostruct. Mater., v.5, n.2, p.141-153, Feb. 1995.
- SPECTOR, M. S., SELINGER, J. V., SINGH, A., RODRIGUEZ, J. M., PRICE, R. R., SCHNUR, J. M. Controlling the morphology of chiral lipid tubules. Langmuir, v.14, n.13, p.3493-3500, 1998.
- STILL, W. C., KAHN, M., ABHIJIT, M. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. J. Org. Chem., v.43, n.14, p.2923-2925, 1978.
- TALSMA, H., CROMMELIN, D. J. A. Liposomes as drug delivery systems - part III: stabilization. Pharm. Technol., p.48-59, Jan. 1993.
- THUREN, T., VIRTANEN, J. A., VAINIO, P., KINNUNEN, P. K. J. Hydrolysis of 1-tricontanoyl-2-(pyren-1-yl)hexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by

- human pancreatic phospholipase-A2. Chem. Phys. Lipids, v.33, n.3, p.283-292, 1983.
- VON SEGESSER, L. K., TONZ, M., LESKOSEK, B., TURINA, M. Evaluation of phospholipidic surface coatings *ex-vivo*. Int. J. Artif. Organs, v.17, n.5, p.294-300, May 1994.
- VON SEGESSER, L. K., TKEBUCHAVA, T., MARTY, B., LESKOSEK, B., TEVAEARAI, H., MUELLER, X. Biomembrane mimicry provides improved thromboresistance for total artificial hearts. ASAIO J., v.45, n.3, p.211-214, May-Jun. 1999
- WATSON, S. C., EASTMAN, J. F. Colored indicators for simple direct titration of magnesium and lithium reagents. J. Organometal. Chem., v.9, n.1, p.165, 1967.
- WEGNER, G. Solid-state polymerization mechanisms. Pure Appl. Chem., v.49, n.4, p.443-454, 1977.
- WOODLE, M. C., LASIC, D. D. Sterically stabilized liposomes. Biochim. Biophys. Acta, v.1113, n.2, p.171-199, Aug. 1992.
- WOODLE, M. C., MATTHAY, K. K., NEWMAN, M. S., HIDAYAT, J. E., COLLINS, L. R., REDEMANN, C., MARTIN, F. J., PAPAHDADJOPOULOS, D. Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. Biochem. Biophys. Acta, v.1105, n.2, p.193-200, Apr. 1992.
- WOODLE, M. C., ENGBERS, C. M., ZALIPSKY, S. New amphipatic polymer-lipid conjugated forming long-circulating reticuloendothelial system-evading liposomes. Bioconjugate Chem., v.5, n.6, p.493-496, Nov./Dec. 1994.
- XU, Z., BYUN, H.-S., BITTMAN, R. Synthesis of photopolymerizable long-chain conjugated diacetylenic acids and alcohols from butadiyne synthons. J. Org. Chem., v.56, n.25, p.7183-7186, Dec. 1991.
- XU, Q., SHAFFER, E. A. The influence of bile salts on small intestinal motility in the guinea pig in vitro. Gastroenterology, v.103, n.1, p.29-35, Jul. 1992.

YAGER, P., PRICE, R. R., SCHNUR, J. M. , SCHOEN, P. E., SINGH, A., RHODES, D. G. The mechanism of formation of lipid tubules from liposomes. Chem. Phys. Lipids, v.46, p.171-179, 1988.

ANEXO 1

Espectro de Emissão da Lâmpada UV.

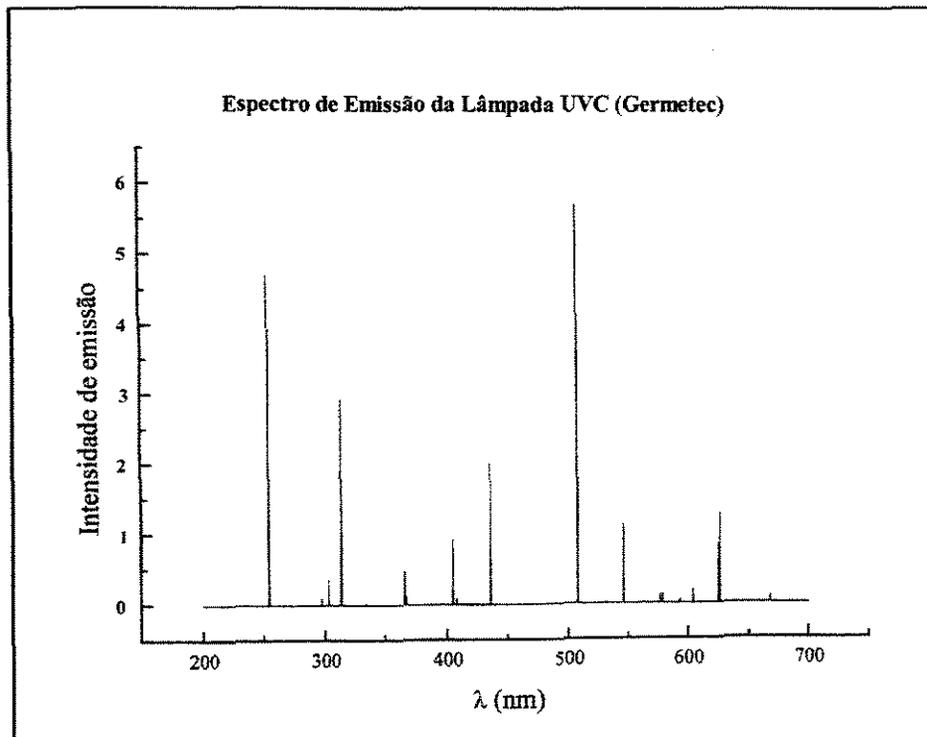


Figura A1: Espectro de emissão da lâmpada UVC Germetec mod. LTD-64-S, 220V/60Hz/64W.

ANEXO 2

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (^1H -RMN e ^{13}C -RMN) e Espectros de Infravermelho (I.V.) dos Fosfolipídios Diacetilênicos Sintetizados.

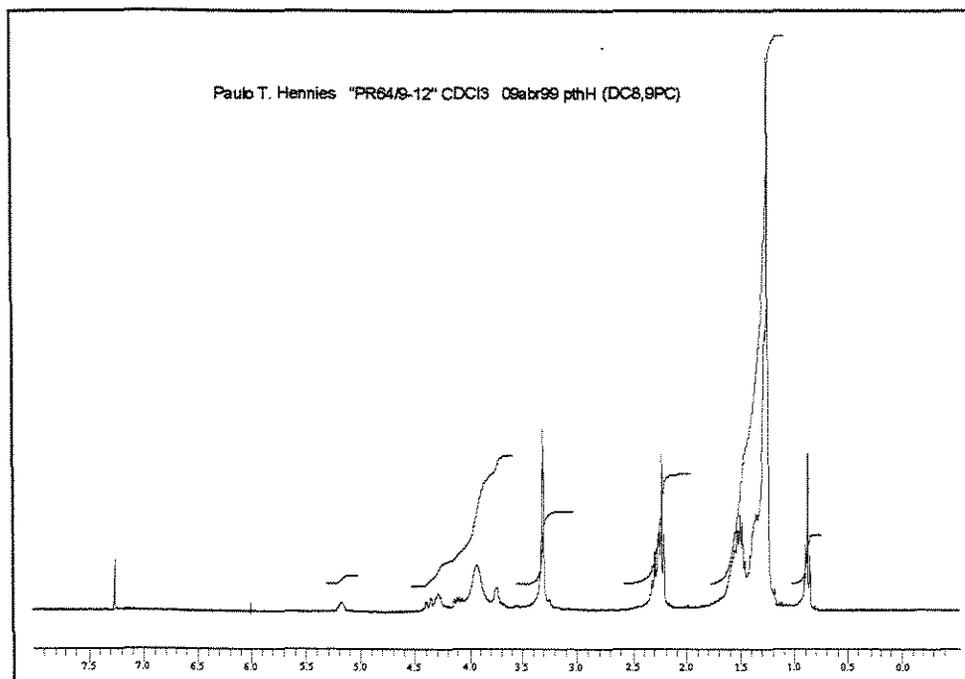


Figura A2.1: Espectro de ¹H-RMN do fosfolípido diacetilênico DC_{8,9}PC (*1b*) sintetizado.

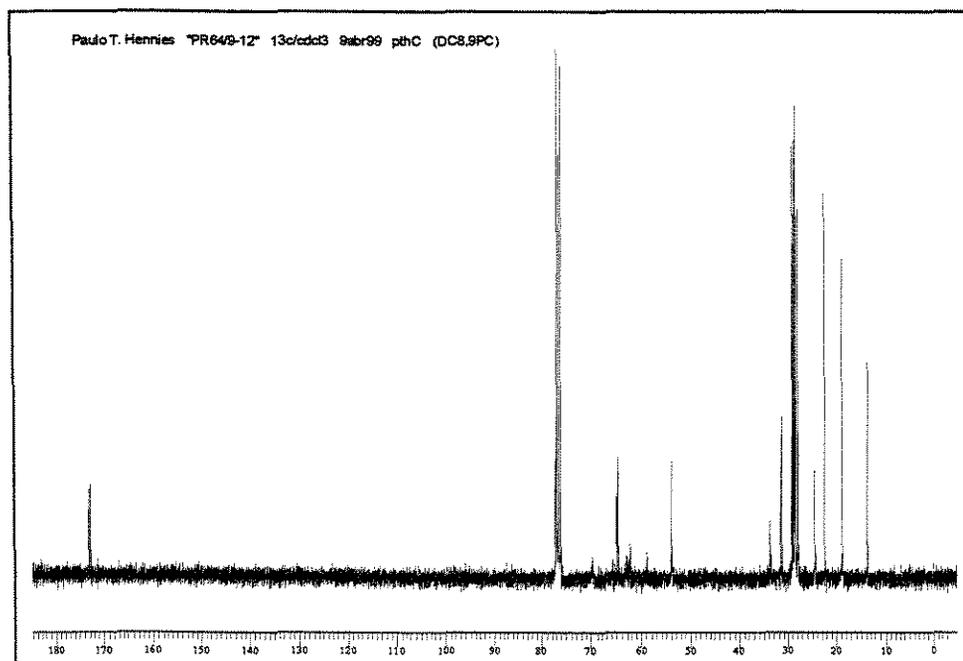


Figura A2.2: Espectro de ¹³C-RMN do fosfolípido diacetilênico DC_{8,9}PC (*1b*) sintetizado.

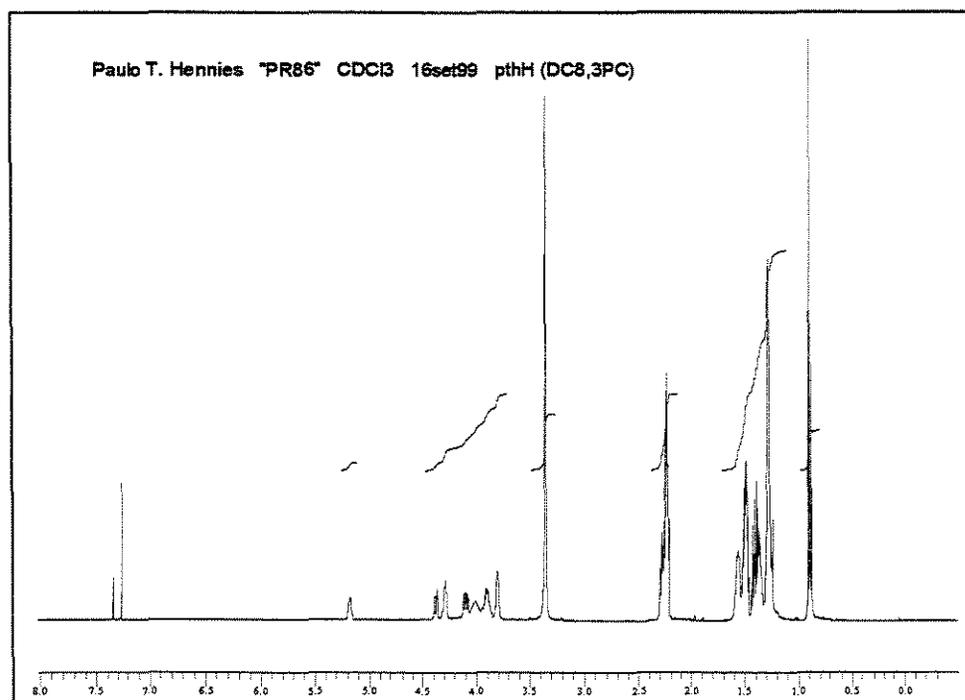


Figura A2.3: Espectro de ^1H -RMN do fosfolípido diacetilênico $\text{DC}_{8,3}\text{PC}$ (1a) sintetizado.

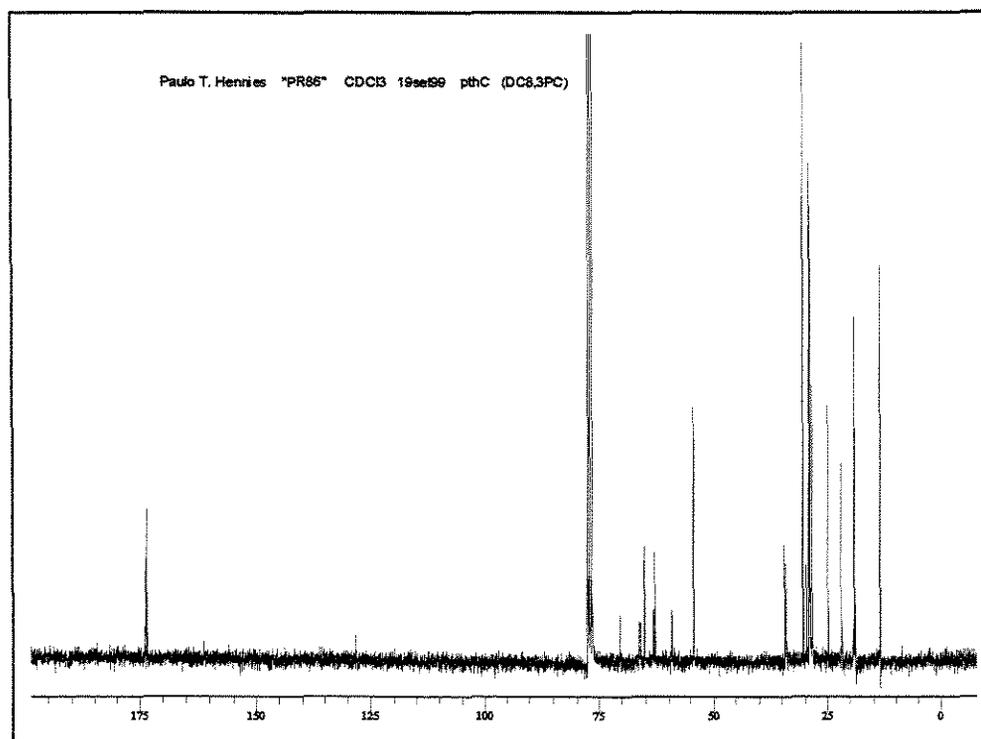
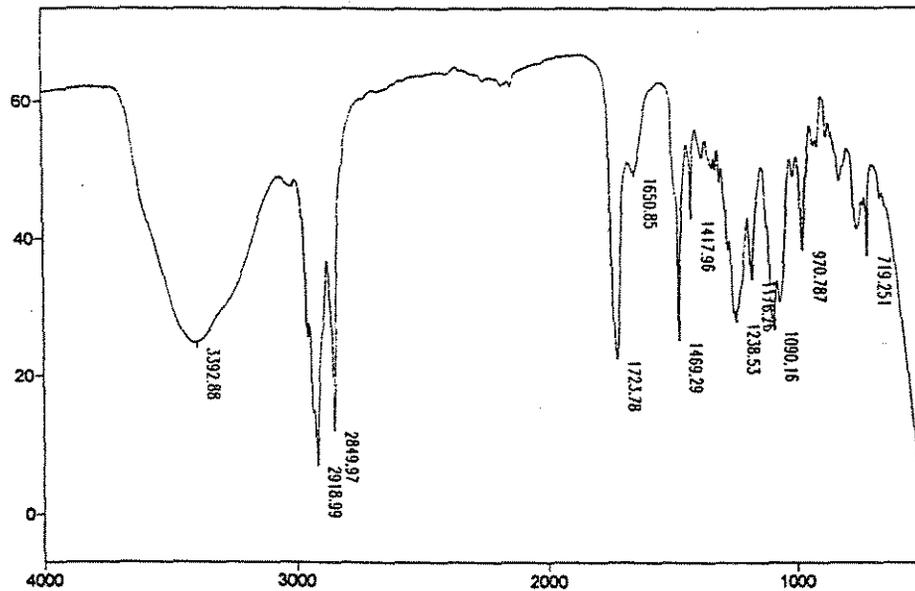
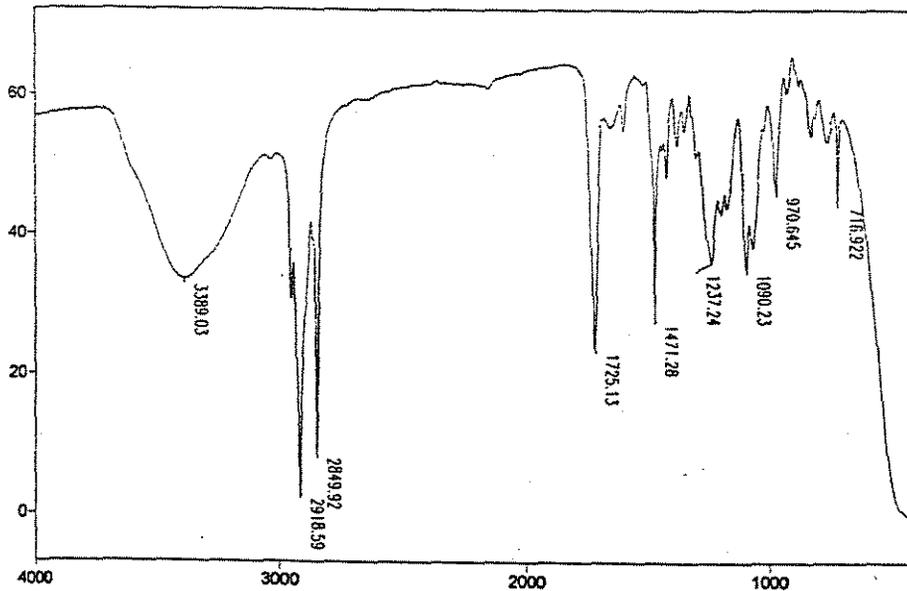


Figura A2.4: Espectro de ^{13}C -RMN do fosfolípido diacetilênico $\text{DC}_{8,3}\text{PC}$ (1a) sintetizado.



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Figura A2.7: Espectro de I.V. do fosfolípido diacetilênico DC_{8,9}PC (1b) sintetizado.



Transmittance / Wavenumber (cm-1)

Figura A2.8: Espectro de I.V. do fosfolípido diacetilênico DC_{2,15}PC (1c) sintetizado.

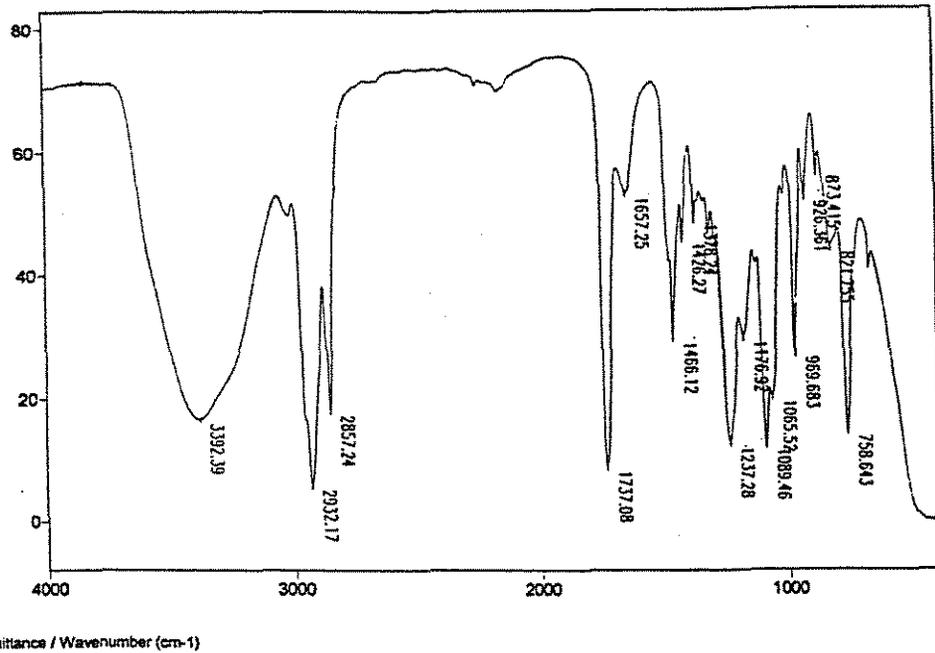


Figura A2.9: Espectro de I.V. do fosfolípido diacetilênico DC_{8,3}PC (*1a*) sintetizado.

ANEXO 3

Termogramas Obtidos para as Suspensões de Lipossomas Preparadas com Fosfolipídios Diacetilênicos.

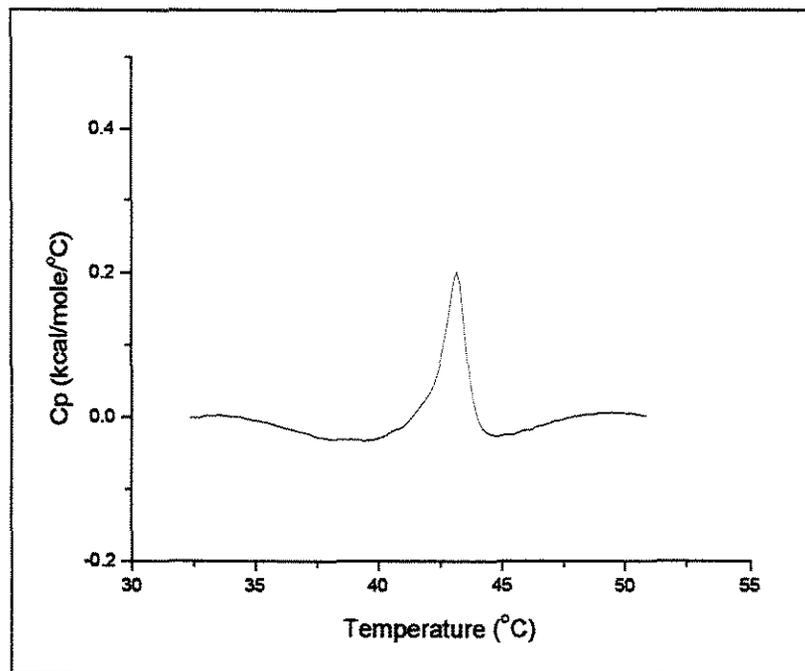


Figura A3.1: Termograma de aquecimento (microDSC) obtido para suspensão monomérica de DC_{8,9}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.

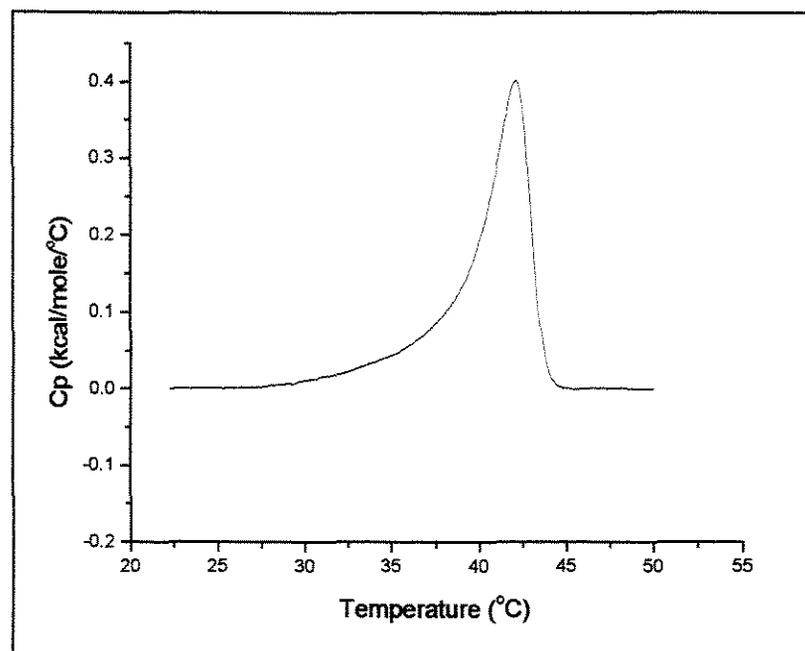


Figura A3.2: Termograma de aquecimento (microDSC) obtido para suspensão polimérica de DC_{8,9}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.

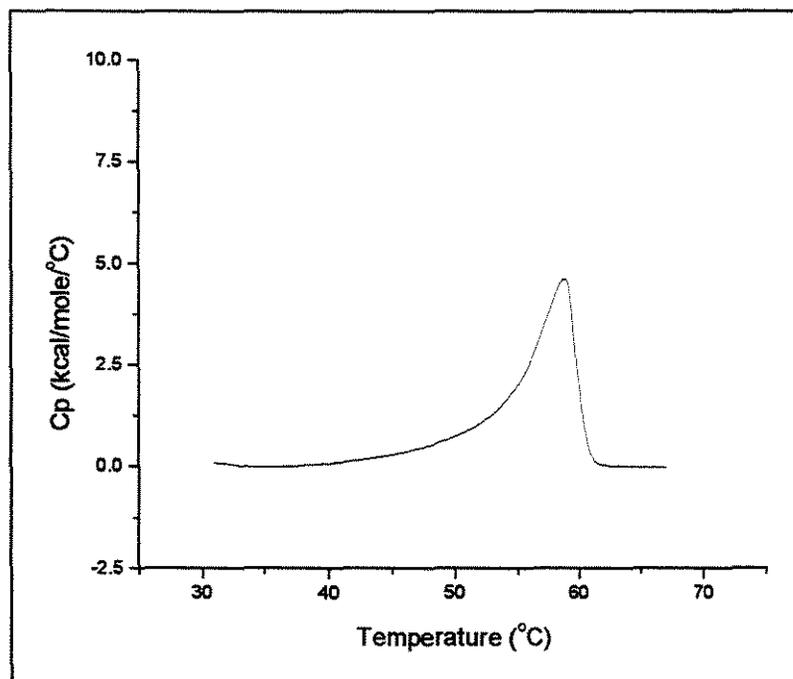


Figura A3.3: Termograma de aquecimento (microDSC) obtido para suspensão polimérica de DC_{2,15}PC em tampão Hapes 10mM pH7,4.

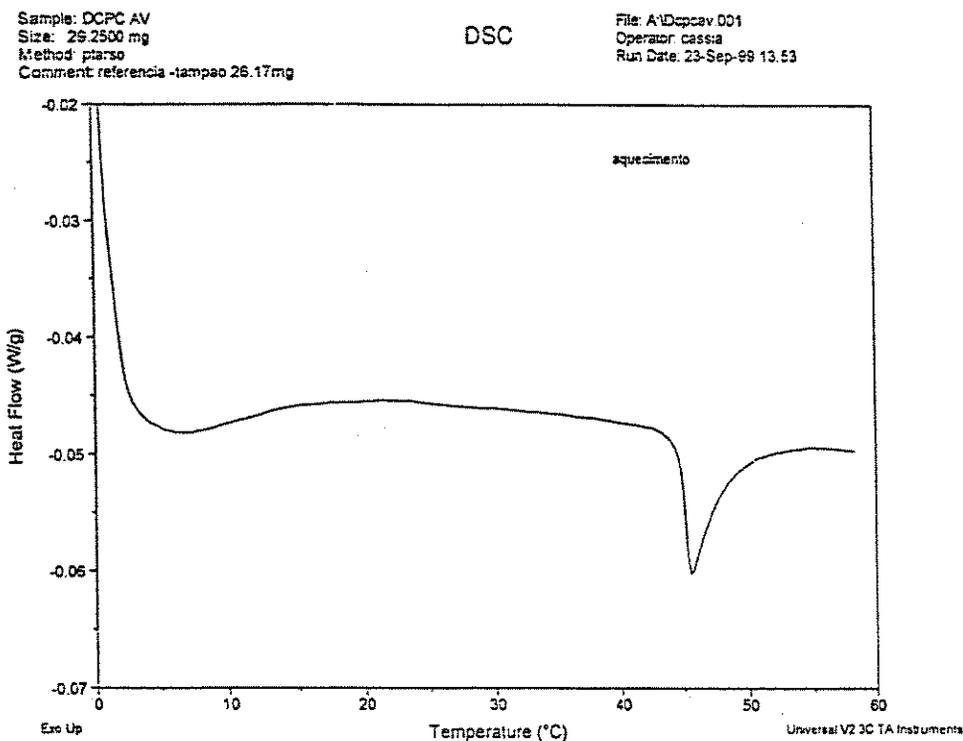


Figura A3.4: Termograma de aquecimento (DSC) obtido para suspensão monomérica de DC_{8,9}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.

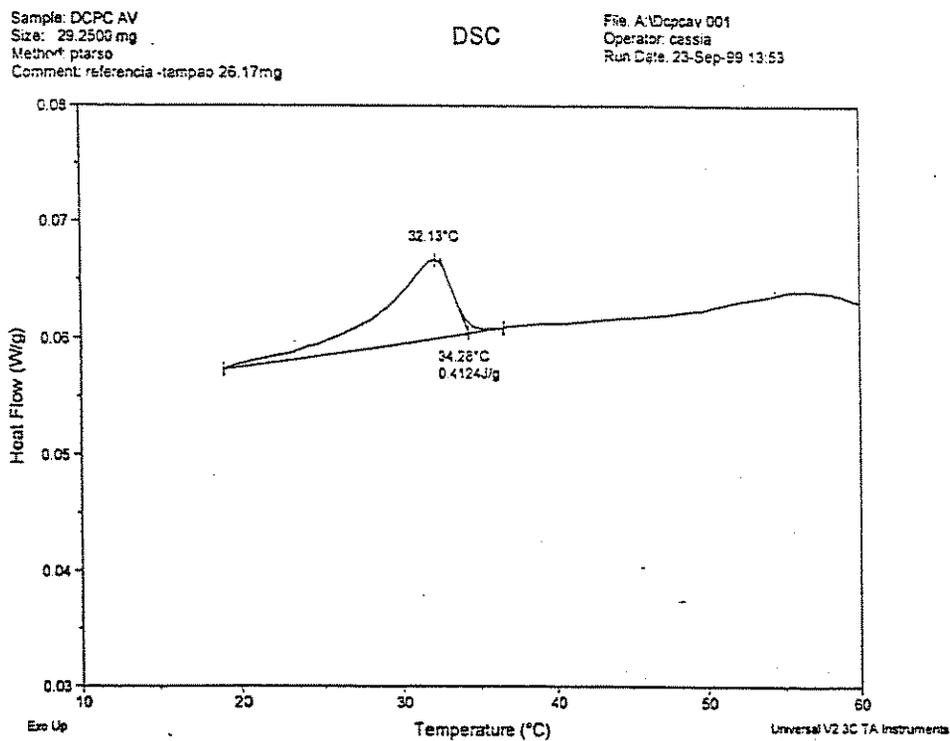


Figura A3.5: Termograma de resfriamento (DSC) obtido para suspensão monomérica de DC_{8,9}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.

Sample: DC215PC
 Size: 28.8900 mg
 Method: ptarso
 Comment: referencia -tampao 26.17mg

DSC

File: A:\Dc215pc001
 Operator: cassia
 Run Date: 23-Sep-99 15:08

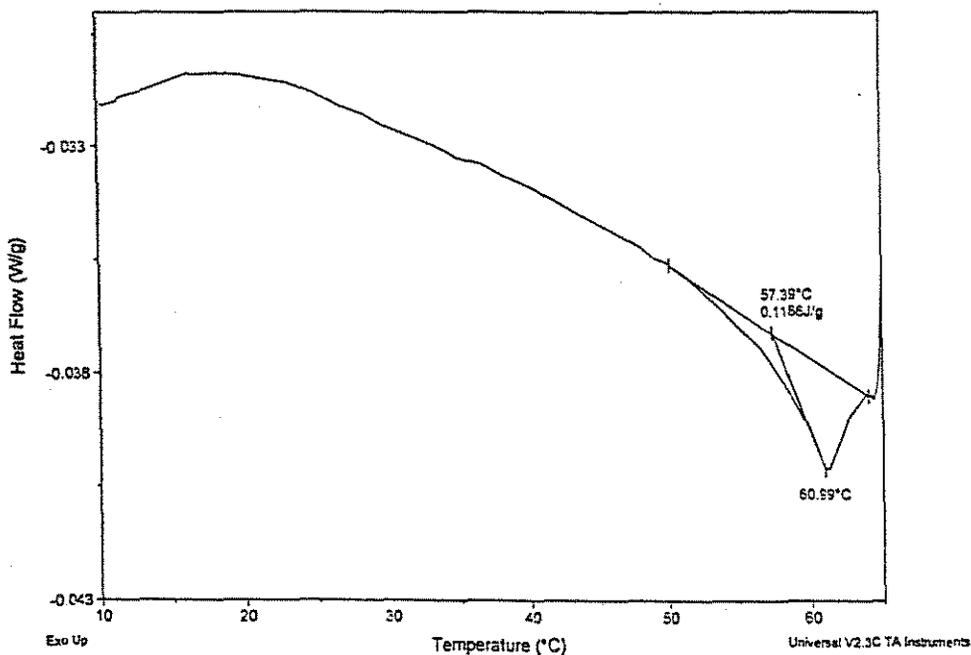


Figura A3.6: Termograma de aquecimento (DSC) obtido para suspensão monomérica de DC_{2,15}PC em tampão HEPES 10mM pH7,4.

Sample: DC215PC
 Size: 28.8900 mg
 Method: ptarso
 Comment: referencia -tampao 26.17mg

DSC

File: A:\Dc215pc 001
 Operator: cassia
 Run Date: 23-Sep-99 15:08

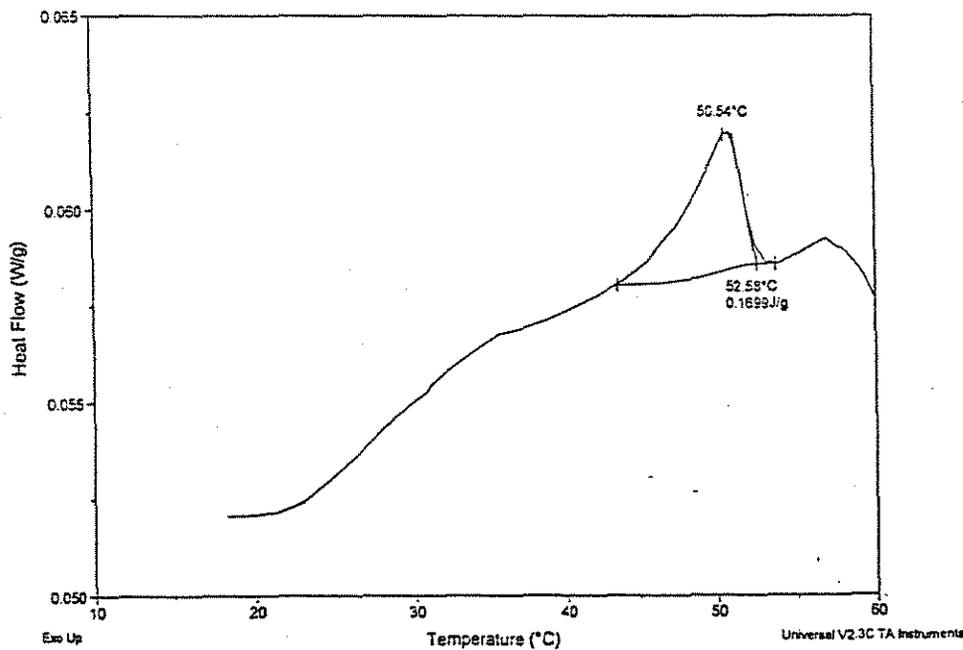


Figura A3.7: Termograma de resfriamento (DSC) obtido para suspensão monomérica de DC_{2,15}PC em tampão HEPES 10mM pH7,4.

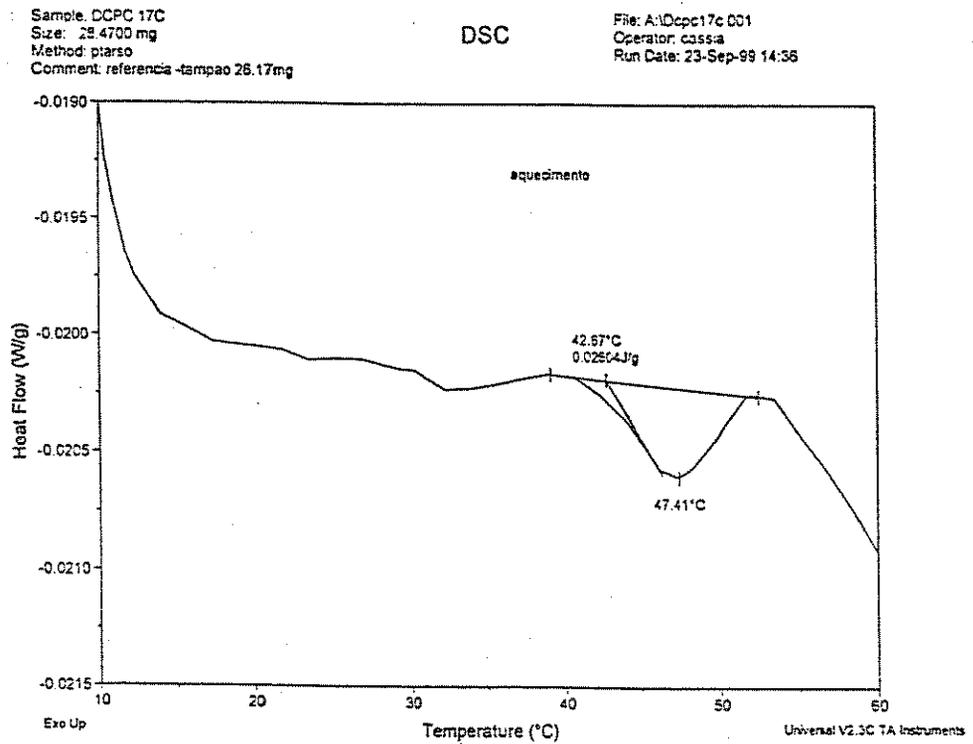


Figura A3.8: Termograma de aquecimento (DSC) obtido para suspensão monomérica de DC_{8,3}PC em tampão Hepes 10mM pH7,4.