

NANOESTRUTURAS OBTIDAS DA AUTO-ASSOCIAÇÃO DE MISTURAS DE LIPOSSOMAS
COMPÓSITOS DE FOSFATIDILCOLINA DA LECITINA DE SOJA E ANFIFÍLICOS
GLICOCONJUGADOS

Yasmine M. S. Micheletto¹, Doyle Barboza¹, Mariana Kanaan¹, Nády P. da Silveira¹, Tamires Bernardes da Rosa², Fernando C. Giacomelli³ e Alexandre G. Dal Bó^{1,2*}

¹Instituto de Química - grupo de Bio & Macromoleculas- UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil ²Unidade Acadêmica de Ciências, Engenharias e Tecnologias, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma/SC. ³Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André/SP.

Resumo

No presente trabalho, nanoestruturas obtidas da auto-associação de misturas de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina, purificada da lecitina de soja (PC), e do anfifílico glicoconjugado C₂₂PEOGlcNAc (C₂₂) foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão (MET), potencial zeta (PZ), espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Os resultados obtidos por TEM e DLS revelam valores de diâmetros de aproximadamente 100 nm para as amostras de lipossomas contendo somente PC e C₂₂, bem como para a amostra de lipossomas contendo ambos PC e C₂₂ (C₂₂PC). O potencial elétrico superficial das três amostras analisadas foi negativo, indicando relativa estabilidade coloidal em relação aos processos de agregação. A determinação da temperatura de transição de fase (T_f) por SLS mostrou que o sistema lipossômico C₂₂PC apresenta uma T_f de 47 °C, estando na fase gel em temperatura ambiente. Além disso, os perfis de SAXS sugerem que os lipossomas compostos de C₂₂PC são unilamelares em suspensão.

Palavras-chave: Nanoestruturas supramoleculares, anfifílicos glicoconjugados, lipossomas, espalhamento de luz.

Introdução

Lipossomas são estruturas coloidais contendo um núcleo interno aquoso e uma membrana formada pela auto-associação de moléculas fosfolipídicas em solução aquosa.¹ Lipossomas têm sido muito aplicados como modelos de membranas biológicas, pois são constituídos por bicamadas lipídicas.² A composição lipídica da membrana lipossômica varia muito, dependendo dos fosfolipídios que a constituem. Dessa forma, são possíveis alterações estruturais, o que permite a modificação de suas características físico-químicas.^{3,4} A estabilidade lipossômica é a chave para a sua aplicação na indústria farmacêutica e na pesquisa como um importante modelo de membrana celular.² Sendo assim, é possível o estudo da interação de lipossomas com moléculas biológicas de interesse.

Anfifílicos glicosilados têm sido muito estudados, devido à possibilidade de se auto-organizarem em diversas nanoestruturas e servirem como uma função bioativa, dando a essas nanoestruturas diversas aplicações desde o transporte de fármacos à sítios de reconhecimento específicos por receptores, tais como as lectinas.⁶ Entretanto, existem poucos estudos de anfifílicos glicosilados constituídos em sua estrutura de poli(óxido etileno) (PEO) e nenhum estudo sobre misturas desses anfifílicos com compósitos de fosfatidilcolina. Neste trabalho, lipossomas glicoconjugados foram preparados a partir do anfifílico glicoconjugado C₂₂PEOGlcNAc e fosfatidilcolina (PC) (Fig. 1).

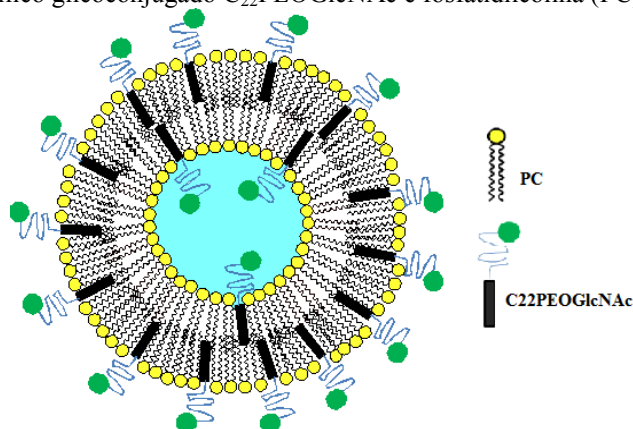


Figura 1. Representação esquemática de um lipossoma constituído de fosfatidilcolina purificada da lecitina de soja (PC) e do anfifílico glicoconjugado C₂₂PEOGlcNAc (C₂₂).

Parte Experimental

Preparação dos lipossomas

Os Lipossomas foram preparados pelo método de evaporação em fase reversa.^{5,4} Para tanto, amostras de lecitina de soja bruta foram purificadas por meio de processo de purificação por extração.⁶ Para a preparação dos lipossomas, a fosfatidilcolina purificada foi dissolvida em clorofórmio e dispersa em água ultra-pura por meio de ultrassom. Em seguida, o clorofórmio foi evaporado em rotaevaporador e um organogel foi formado. Após a adição de água ultra-pura, sob agitação, obtém-se a suspensão de lipossomas. Foram preparados lipossomas contendo somente a fosfatidilcolina purificada (PC), lipossomas de fosfatidilcolina purificada contendo o anfifílico glicoconjugado C₂₂PEOglcNAc (C₂₂PC, 5:5) e lipossomas contendo somente o anfifílico C₂₂PEOglcNAc (C₂₂).

Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas na linha SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). O comprimento de onda da radiação incidente foi de 1,55 Å e a radiação espalhada foi detectada utilizando-se um detector 2D Pilatus 300 K. Todas as imagens 2D se mostraram isotrópicas e foram normalizadas pela transmissão de cada amostra. Os perfis $I(q)$ vs. q foram corrigidos subtraindo-se o espalhamento de radiação proveniente do solvente (água).

Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático(SLS)

Todas as amostras foram filtradas com filtro de 0,45 µm de porosidade para dentro de cubetas óticas. As amostras foram então analisadas em um espectrômetro do espalhamento de luz Brookhaven Instruments (goniômetro BI-200, correlator digital AT BI-900), com laser de He-Ne ($\lambda_0 = 632,8$ nm) como fonte de radiação. Para os experimentos de DLS, o volume de espalhamento detectado pelo detector foi minimizado com uma abertura de 0,4 mm, e também utilizou-se um filtro de interferência entre o porta-amostras e a detecção do sinal na fotomultiplicadora. A luz espalhada foi coletada a um ângulo de 90° entre a radiação incidente na amostra e a radiação espalhada detectada (luz espalhada pelas partículas). As funções de correlação temporal foram obtidas em um modo denominado multi- τ , usando-se 224 canais e analisadas utilizando-se o método dos cumulantes, disponibilizado pelo fabricante do equipamento (*software* Brookhaven Instruments). As medidas de intensidade de luz espalhada (I_s) em função da temperatura foram realizadas utilizando-se um banho externo acoplado, o qual permite variar a temperatura numa faixa de 15 a 75 °C. Dessa forma, as amostras de lipossomas foram aquecidas de 15 a 75 °C seguindo uma rampa de 1° C/min com intervalos de 10 minutos a cada 2° C. As medidas foram obtidas no ângulo de 135°, para maximizar a contribuição da bicamada lipídica na luz espalhada.

Potencial zeta (PZ)

As medidas de potencial zeta foram realizadas no equipamento ZetaPALS, Zeta Potential Analyzer, (Brookhaven Instruments). A temperatura de análise foi mantida constante (25 °C).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens MET foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS. O tamanho e a estrutura da morfologia dos anfifílicos foram gravados em filmes Kodak SO163 utilizando um microscópio eletrônico (Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200ExII) operando em 80 kV. Os negativos foram digitalizados usando uma câmera CCD Kodak Mega plus. Para preparar as amostras MET, 4µL de uma solução aquosa de micelas formadas foi espalhado sobre uma grade de cobre revestido com fino filme de carbono. Excesso de solução micelar foi delicadamente removida com papel absorvente. As amostras foram então marcadas negativamente pela adição de uma gota aproximadamente 4µL de 2% acetato de uranila, e o excesso de solução foi novamente removido antes da secagem em condições ambiente.

Resultados e Discussão

Caracterização dos lipossomas por MET, DLS e PZ.

A caracterização dos lipossomas foi, primeiramente, feita por TEM, DLS e PZ. Os valores de diâmetros obtidos por meio das técnicas de DLS e MET (Fig. 2) foram de aproximadamente 100 nm para todas as amostras (tabela 1). O índice de polidispersão (I.P), obtido por DLS, apresentou um valor em torno de 0,3 para todas as amostras. O I.P está diretamente relacionado com a variação de diâmetro, representando a distribuição de tamanhos das vesículas em suspensão.⁴

O potencial zeta é um importante indicador de carga na superfície coloidal e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de sistemas coloidais. Valores elevados de potencial zeta indicam vesículas estáveis em suspensão devido a repulsão entre as partículas causada pela carga superficial, o que evita a agregação entre as

vesículas.⁷ De acordo com a tabela 1, os valores obtidos de potencial zeta para as nanoestruturas são negativos, indicando relativa estabilidade coloidal em relação aos processos de agregação.⁴

Tabela 1. Valores de diâmetro, índice de polidispersão (I.P) e potencial zeta (PZ) para as amostras de lipossomas PC, C₂₂ e C₂₂PC.

Amostra	Diâmetro (nm)	I.P	PZ (mV)
PC	99,1	0,30	-51,3 ± 0,7
C ₂₂	93,2	0,32	-16,9 ± 0,5
C ₂₂ PC	100,0	0,36	-25,3 ± 0,9

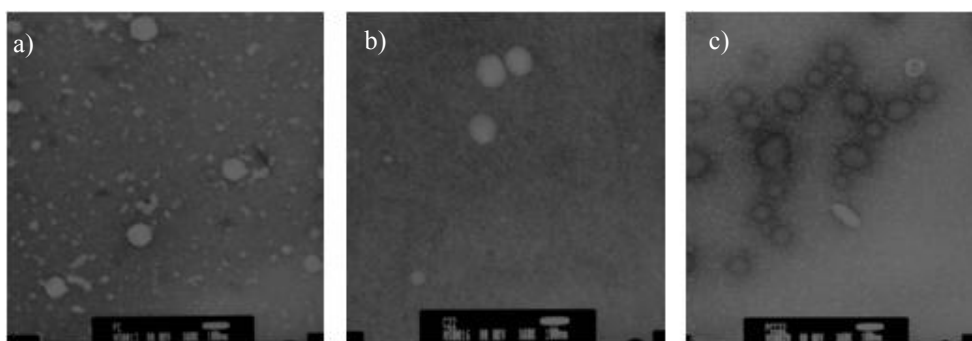


Figura 2. Imagens de MET para as amostras de PC (a), C₂₂ (b) e C₂₂PC (c). Barra de escala corresponde a 100nm.

Temperatura de transição de fase (T_f)

A importância do estudo de transições de fases em lipossomas está no fato que, em lipídios termotrópicos, as transições de fases estão relacionadas com descontinuidades ou anomalias nas propriedades físicas macroscópicas tais como: estabilidade, fluidez ou permeabilidade de membranas.⁸ Os lipossomas tornam-se altamente permeáveis em temperaturas próximas da temperatura de transição de fase gel para líquido-cristalino.⁹ As transições de fases induzem modificações nas propriedades ópticas do sistema que refletem em mudanças de intensidade de luz espalhada (I_s) pelo sistema. Na temperatura de transição de fase (pré-transição ou temperatura da transição principal) podem ocorrer na membrana lipossômica modificações de difusão lateral, espessura da bicamada, permeabilidade, etc.¹⁰ Essas alterações são produzidas ou correlacionadas com modificações conformacionais de compostos anfífilicos. Assim, as fases podem ser relacionadas com a intensidade de luz espalhada em função da temperatura, na qual o ponto a meia altura da curva corresponde à temperatura de transição de fase do sistema em estudo. Na Fig. 3 pode-se observar a existência de pelo menos uma temperatura de transição de fase (T_f) nas amostras de C₂₂ ($T_f = 32$ °C) e C₂₂PC ($T_f = 47$ °C). Esta transição provavelmente refere-se à transição de fase principal que é a transição de gel ondulado ($P\beta'$) para líquido-cristalino ($L\alpha$) (Fig. 4). Portanto, na temperatura ambiente os lipossomas se encontram na fase gel.

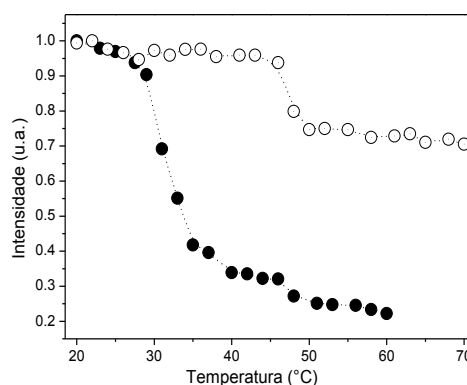


Figura 3. Intensidade de luz espalhada em função da temperatura para as amostras ●C₂₂ e ○C₂₂PC.

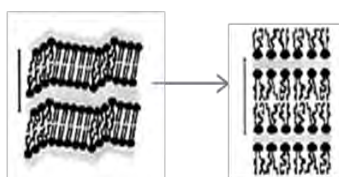


Figura 4. Representação esquemática da transição de fase principal $P\beta' \rightarrow L\alpha$.

A Fig. 5 mostra os perfis de SAXS obtidos para a amostra C₂₂PC em diferentes temperaturas. Pode-se observar a ausência de picos de Bragg, sugerindo apenas a existência de lipossomas unilamelares em suspensão. Este fato pode ser explicado pela presença da molécula C₂₂ na membrana lipossômica, impedindo a formação de uma segunda bicamada devido ao seu volume e, assim, formando apenas estruturas unilamelares. A diferença de intensidade observada na temperatura de 45 °C pode ser relacionada com a temperatura de transição desses lipossomas, que foi determinada por SLS para ser de 47 °C. Dessa forma, algumas características importantes podem ser atribuídas às fases Pβ' e La. Comparada com a fase La, a fase Pβ' é caracterizada por um tempo de difusão menor e baixa mobilidade das cadeias.¹¹

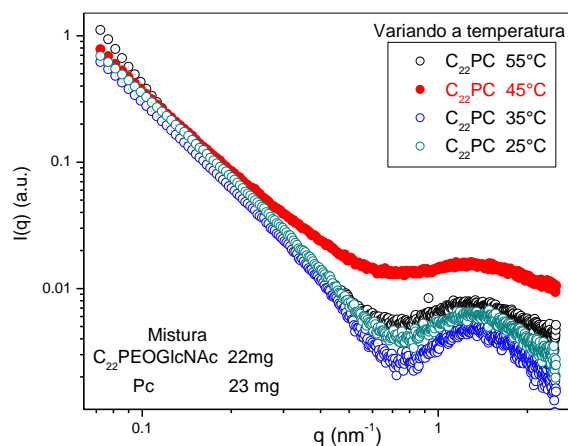


Figura 5. Curvas de SAXS em diferentes temperaturas para a amostra C₂₂PC.

Conclusão

Os lipossomas obtidos neste trabalho, por meio da auto-associação de fosfatidilcolina e do anfílico glicoconjugado C₂₂PEOGlcNAc apresentaram um diâmetro médio de 100 nm e valores de PZ que sugerem relativa estabilidade coloidal em suspensão. A técnica de DLS revelou que os lipossomas compostos de fosfatidilcolina e de C₂₂PEOGlcNAc encontram-se na fase gel na temperatura corporal e os perfis de SAXS sugerem a presença de lipossomas unilamelares em suspensão. Sendo assim, os resultados obtidos até momento, do estudo físico-químico das nanoestruturas lipossômicas de fosfatidilcolina e C₂₂PEOGlcNAc, serão importantes para estudos futuros com a aplicação desses lipossomas como carreadores de fármacos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro proveniente da FAPESC projeto FAPESC 3805/2012 TR 2012000333, bem como CNPq e o LNLS proposta de Pesquisa SAXS1-12536/12.

Referências

- ¹ A. Polozova; A. Yamazaki; J.L. Brash; F.M. Winnik *Colloids and surfaces A*. 1999, 147, 17.
- ² E. Casal; A.M. Galan; G. Escolar; M. Gallardo; J. Estelrich *Chemistry and Physics of Lipids*. 2003, 125, 139.
- ³ S.K. Soppimath; T.M. Aminabhavi; A.R. Kulkarni; W.E. Rudzinski *Journal of Controlled Release* 2001, 70, 1.
- ⁴ O. Mertins, Ph.D. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- ⁵ F.C. Szoka; D. Papahadjopoulos *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 1978, 140, 4194.
- ⁶ O. Mertins; M. Sebben; P.H. Schneider; A.R. Pohlmann; N.P. Silveira *Química Nova*. 2008, 31, 1856.
- ⁷ C. Guo; S. Liu; Z. Dai; C. Jiang; W. Li *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010, 76, 362.
- ⁸ O.G. Mouritsen; K. Jorgensen *Molecular Membrane Biology* 1995, 12, 15.
- ⁹ D. Papahadjopoulos; K. Jacobson; S. Nir; T. Isaac *Biochim. Biophys. Acta* 1973, 311, 330.
- ¹⁰ A. Jutila, Academic Dissertation, University of Helsinki, 2001.
- ¹¹ R.L. Knorr, Academic Dissertation, Max Plank Institute of Colloids and Interfaces, University Potsdam, 2010.