

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Marcelo Jung Eberhardt

**Incorporação espacialmente controlada de polímero em microdomínios de  
cubossomas de fitantriol**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Profa. Dra. Fernanda Poletto

Orientadora

Porto Alegre, junho de 2023.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre março de 2018 e junho de 2023, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da Professora Doutora Fernanda Poletto. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

Prof. Dr. Leandro Ramos Souza  
Barbosa  
Departamento de Física Geral/  
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Aloir Antonio Merlo  
Programa de Pós-Graduação em  
Química / Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul

Prof. Dr Cesar Liberato Petzhold  
Programa de Pós-Graduação em  
Química/ Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul

Profª. Dra. Fernanda Poletto  
Programa de Pós-Graduação em  
Química / Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul

Marcelo Jung Eberhardt

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a minha noiva Anelise, aos meus pais Jorge e Janice, ao meu irmão Lucas e aos meus amigos, Leonardo, César, Jessé e Gabriel.

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Poletto pela oportunidade, pelos ensinamentos e paciência ao corrigir esse trabalho e também as/aos colegas de laboratório em especial a Denise R Bohn Kobelinski e a Francielli O. Lobato.

A Profa Dra. Sílvia Guterres (Faculdade de Farmácia – UFRGS) pela disponibilização do equipamento para determinação de diâmetro por Análise de rastreamento de nanopartículas. Ao Prof. Dr. João Henrique Zimoch dos Santos (IQ – UFRGS) pela disponibilização do equipamento para as medidas de espalhamento de luz eletroforético. Ao Prof. Dr. Fabiano Rodembusch (IQ – UFRGS) pela disponibilização do equipamento para as medidas de espectroscopia UV/Vis utilizando uma esfera integradora.

Ao Centro de Nanociência e Nanotecnologia (CNANO) da UFRGS pelo acesso ao equipamento de SAXS. À Central Analítica do IQ-UFRGS pelo acesso aos equipamentos necessários para a caracterização estrutural dos produtos de síntese deste trabalho. Ao LNNano pelo acesso ao Cryo-TEM e ao CMM da UFRGS pelo acesso ao TEM e à CAPES pelo acesso aos periódicos nacionais e internacionais.

## Resumo

Neste estudo, propôs-se uma estratégia para controlar a localização de polímero biorresponsivo nos diferentes microdomínios de cubossomas lipídicos. Para esta finalidade, empregou-se fitantriol como lipídio polar e um poli-dissulfeto obtido a partir da polimerização térmica do ácido  $\alpha$ -lipóico como polímero biorresponsivo. Levantou-se a hipótese de que a escolha do estabilizante teria um papel-chave neste processo, assim como a escolha de um método de obtenção do tipo *bottom-up*, por permitir a autoassociação dos componentes da formulação com participação de um hidrótopo. Os estabilizantes escolhidos foram o poloxamer 407 (que interage fracamente com fitantriol) e polissorbato 80 (que intercala-se nas bicamadas do lipídio). As formulações foram preparadas na ausência e presença do polímero. Todas apresentaram diâmetros na faixa de 250 a 300 nm, com distribuição monomodal. A caracterização por espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) indicou que as formulações preparadas com poloxamer 407 apresentaram estrutura de fase cúbica bicontínua reversa com simetria Pn3m, enquanto que aquelas preparadas com polissorbato 80 apresentaram simetria Im3m. O interior dos cubossomas foi modificado pela presença de polímero apenas quando polissorbato 80 foi utilizado como estabilizante. A partir de medidas de criomicroscopia eletrônica de transmissão, observou-se que a morfologia dos cubossomas contendo polímero e poloxamer 407 apresentou aspecto homogêneo, sugerindo que o polímero estaria recobrando o sistema. Por outro lado, o polímero não só manteve-se intercalado nas bicamadas, como também acumulou-se na forma de esfera no interior dos cubossomas estabilizados com polissorbato 80. A investigação do microambiente químico dos cubossomas foi realizada com uma sonda de ambiente especialmente planejada para este estudo. Porém, este conjunto de resultados não foi conclusivo. A partir de medidas de SAXS simulando o processo de remoção do solvente durante a preparação das formulações, concluiu-se que tanto o grau de afinidade entre os componentes quanto a forma pela qual ocorreu a dinâmica da estruturação causada pelo gradiente de solvente variável no tempo foram decisivos para a obtenção das morfologias observadas.

Palavras-chave: Polímero biorresponsivo; Cubossomas; Estabilizante; Controle da morfologia; Espalhamento de raios X a baixos ângulos

## Abstract

This study proposes a strategy to control the localization of a bioresponsive polymer within different microdomains of lipid cubosomes. To achieve this, fitantriol was employed as the polar lipid, and a polydisulfide obtained from the thermal polymerization of  $\alpha$ -lipoic acid served as the bioresponsive polymer. It was hypothesized that the choice of stabilizer would play a crucial role in this process, along with a *bottom-up* preparation method that enables the self-assembly of the compounds using a hydrotrope. The selected stabilizers were poloxamer 407, which weakly interacts with fitantriol, and polysorbate 80, which intercalates within the lipid bilayers. Formulations were prepared with and without the polymer, and all of them exhibited diameters ranging from 250 to 300 nm with monomodal distribution. Characterization using small-angle X-ray scattering indicated that formulations prepared with poloxamer 407 exhibited a reverse cubic bicontinuous phase structure with Pn3m symmetry, whereas those prepared with polysorbate 80 displayed Im3m symmetry. Furthermore, these measurements suggested that the presence of the polymer modified the inner structure of cubosomes only when polysorbate 80 was used as the stabilizer. Cryo-transmission electron microscopy revealed that the morphology of cubosomes containing the polymer and poloxamer 407 exhibited a homogeneous appearance, indicating that the polymer covered the system. On the other hand, the polymer not only remained intercalated within all the bilayers but also accumulated as a sphere within cubosomes stabilized with polysorbate 80. Investigation of the chemical microenvironment of cubosomes was performed using a specifically designed photophysical probe for this study. However, this set of results was inconclusive. On the other hand, small-angle X-ray scattering measurements mimicking the solvent removal process during formulation preparation helped to understand that two main factors were crucial in determining the morphologies of the cubosomes: the affinity among the components and the way these components were self-assembled as the solvent gradient changed during the cubosome preparation.

Keywords: Bioresponsive polymer; Cubosomes; Stabilizer; Morphology control; Small Angle X-ray scattering.

## Lista de Figuras

- Figura 1. Esquema de formação de nanopartículas pelo efeito Ouzo, com base em estudos realizados por Sitnikova e colaboradores <sup>7</sup>. A fase orgânica corresponde à mistura do composto hidrofóbico e do solvente hidrófilo. As linhas binodal e espinodal mencionadas na figura referem-se a regiões particulares do diagrama de fase ternário da mistura (água/hidrófilo/composto hidrofóbico). ..... 1
- Figura 2. Representação de um cubossoma e suas potencialidades de incorporação de diferentes tipos de moléculas por variados mecanismos. Reproduzido de Barriga et al. <sup>8</sup> com autorização para reprodução. Direitos autoriais da American Chemical Society .... 2
- Figura 3. (a) Representações esquemáticas de diferentes fases líquido-cristalinas liotrópicas (normais e reversas), organizadas de acordo com a curvatura média de suas membranas. Reproduzido de Salim e colaboradores<sup>18</sup> com autorização para reprodução. Direitos autoriais da Royal Society of Chemistry; (b) representação esquemática da curvatura de membranas lipídicas em água. .... 5
- Figura 4. Superfícies mínimas periódicas de simetria cúbica (a) primitiva Im3m, (b) duplo diamante Pn3m e (c) giroide Ia3d. Reproduzido de Assenza e colaboradores <sup>20</sup> com autorização para reprodução. Direitos autoriais da AIP Publishing..... 6
- Figura 5. Estruturas químicas de (a) fitantriol, (b) poloxamer 407 e (c) polissorbato 80. 8
- Figura 6. Representação genérica de um diagrama de fase ternário (pressão e temperatura constantes) indicando a região entre as curvas binodal e espinodal onde ocorre o efeito Ouzo. Reproduzido de Vitale e Katz <sup>2</sup> com autorização para reprodução. Direitos autoriais da American Chemical Society..... 10
- Figura 7. Estruturas químicas de (a) ácido  $\alpha$ -lipóico (destaque para o anel ditiolano, que contém a ligação dissulfeto), (b) ácido di-hidrolipóico, e (c) poli-dissulfeto do ácido  $\alpha$ -lipóico. .... 14
- Figura 8. (a) Representação esquemática demonstrando os dois planos ortogonais dos espiropiranos, onde as duas porções heterocíclicas da molécula são unidas pela ligação espiro; (b) Estrutura da porção 2H-cromeno obrigatoriamente presente em espiropiranos; (c) Estrutura do 2H-pirano, que dá nome à classe de compostos

conhecidos como espiropiranos (cujo nome literalmente significa “um anel pirano que estabelece uma ligação espiro”). .....	18
Figura 9. (a) Isomerização de um indolinobenzospiropirano (cujo acrônimo na literatura é BIPS), demonstrando o equilíbrio entre suas formas fechada (espiropirano) e aberta (merocianina); (b) numeração das posições na estrutura de um composto BIPS genérico; (c) estrutura química do 6'-nitro-BIPS.....	19
Figura 10. Diferentes formas isoméricas abertas possíveis decorrentes da abertura de uma espécie espiropirano (C = cisóide, T = transóide). Reproduzido de Kozlenko e colaboradores <sup>65</sup> com autorização da fonte. Direitos autorais de Springer Nature. ....	20
Figura 11. Contribuintes zwitteriônico e quinoidal do híbrido de ressonância merocianina. ....	21
Figura 12. Estrutura química do derivado 6'-nitro-BIPS (na sua forma aberta merocianina) proposto como sensor de microambiente químico pra cubossomas (denominado de C <sub>10</sub> SP no presente estudo). ....	23
Figura 13. Fotografia do sistema empregado para manter as amostras fechadas a 40 °C e sob circulação constante no equipamento de SAXS, com auxílio de bomba peristáltica. ....	41
Figura 14. Distribuição de diâmetro hidrodinâmico (por concentração de partículas) das amostras: (a) Phyt-PX, (b) Phyt-PS, (c) PhytPLi-PX e (d) PhytPLi-PS. Estes resultados foram obtidos empregando-se a técnica de rastreamento do movimento de nanopartículas (NTA). Os gráficos são referentes a um lote representativo de cada tipo de amostra.....	43
Figura 15. Curvas de SAXS das formulações estabilizadas com (a) poloxamer 407 e (b) polissorbato 80 (medidas realizadas a 40°C). A escala do eixo das ordenadas foi propositalmente deslocada em cada gráfico para facilitar a visualização. O sinal referente ao porta-amostra e ao solvente foi previamente subtraído. ....	45
Figura 16. Imagens de criomicroscopia eletrônica de transmissão de: (a) formulação equivalente à Phyt-PX , (b) Phyt-PS, (c) PhytPLi-PX e (d) PhytPLi-PS (escala de 200 nm). A imagem (a) foi obtida da literatura <sup>5</sup> com mesma composição e método de preparação da formulação Phyt-PX do presente estudo. Reproduzido e adaptado com autorização da fonte. Direitos autorais de Elsevier. ....	48



Figura 17. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das formulações (a, c) PhytPLi-PX e (b, d) PhytPLi-PS, empregando-se citrato de chumbo como agente de contraste (escalas = 200 nm para (a) e (b) e 100 nm para (c) e (d)).	50
Figura 18. Rota sintética realizada para a obtenção do surfactante sensor de microambiente químico C <sub>10</sub> SP.	53
Figura 19. Mecanismo de formação do cátion nitrosônio a partir de ânion nitrito em meio ácido <sup>104</sup> .	54
Figura 20. Espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H (solvente: DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de (a) anilina comercial e (b) cloridrato de fenil-hidrazina.	56
Figura 21. Estruturas químicas dos núcleos (a) 1H-indol e (b) 3H-indolenina.	56
Figura 22. Mecanismos propostos para obtenção de 1H-indol e 3H-indoleina a partir da síntese de Fischer, conforme descrito na literatura <sup>108</sup> .	57
Figura 23. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H (solvente: DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) do produto 2,3,3-trimetil-indolenina.	58
Figura 24. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H (solvente: DMSO-d <sub>6</sub> ) (a) de 2,3,3-trimetil-5-nitro-indolenina, e (b) de 2,3,3- trimetil-5-amino-indolenina.	60
Figura 25. Espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H (solvente: DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de (a) 2,3,3- trimetil-5-indolenilamida do ácido decanóico e (b) iodeto de 5-decanoilamino-1,2,3,3-tetrametil-indolenínio.	63
Figura 26. Espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H (solvente: DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de (a) 2-hidroxi-3-metoxi-benzaldeído e (b) 2-hidroxi-3-metoxi-5-nitro-benzaldeído.	66
Figura 27. Mecanismo proposto na literatura para a formação de espiropirano a partir de um composto heterocíclico com grupo imínio e de salicilaldeído (ou, alternativamente, um derivado do mesmo), na presença de base <sup>111</sup> .	68
Figura 28. Espectro de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H de (8-metoxi-1',3',3'-trimetil-6-nitrospiro-[cromeno-2,2'-indolina]-5'-il)amida do ácido decanóico, cuja sigla C <sub>10</sub> SP foi adotada para fins de simplificação (solvente: CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).	69

Figura 29. Espectros de ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ de (8-metoxi-1',3',3'-trimetil-6-nitrospiro-[cromeno-2,2'-indolina]-5'-il)amida do ácido decanóico, cuja sigla $\text{C}_{10}\text{SP}$ foi adotada para fins de simplificação (solvente: DMSO- $\text{d}_6$ , 100 MHz). .....	71
Figura 30. Espectro de absorção molecular na região do infravermelho do composto (8-metoxi-1',3',3'-trimetil-6-nitrospiro-[cromeno-2,2'-indolina]-5'-il)amida do ácido decanóico, cuja sigla $\text{C}_{10}\text{SP}$ foi adotada para fins de simplificação.....	73
Figura 31. Espectros de absorção molecular na região do ultravioleta-visível do composto $\text{C}_{10}\text{SP}$ em acetonitrila, em concentrações entre $8,16 \times 10^{-7}$ e $3,35 \times 10^{-4}$ M. 74	74
Figura 32. Espectros (não-normalizados) de absorção molecular na região do ultravioleta-visível do composto $\text{C}_{10}\text{SP}$ na concentração de $1,00 \times 10^{-4}$ M em diferentes solventes: n-hexano (HEX), 1,4-dioxano (DIO), diclorometano (DCM), acetonitrila (ACN), dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MET). Em destaque, observa-se ampliação da região no visível com os espectros normalizados, excluindo-se aquele obtido em hexano por não apresentar banda nesta região. ....	75
Figura 33. Representação esquemática do efeito da polaridade do solvente no solvatocromismo de merocianinas, do ponto de vista dos níveis de energia dos estados fundamental e excitado, cujas estruturas estão representadas ao lado. Reproduzido de Tian e colaboradores <sup>69</sup> , com modificações e com autorização da fonte. Direitos autorais de Elsevier. ....	76
Figura 34. Correlação entre o máximo de absorção da banda da porção merocianina de $\text{C}_{10}\text{SP}$ ( $\lambda_{\text{max}}$ ) em função do parâmetro $\delta_{\text{new}}$ , o qual é derivado do parâmetro de solubilidade de Hansen porém sem o termo referente às forças de dispersão.....	78
Figura 35. Espectros (não-normalizados) de absorção molecular na região do ultravioleta-visível do composto $\text{C}_{10}\text{SP}$ na concentração de $1,00 \times 10^{-4}$ M em acetonitrila pura e nas misturas de acetonitrila:água 75:25 e 50:50 (v/v). ....	79
Figura 36. Correlação entre o máximo de absorção da banda da porção merocianina de $\text{C}_{10}\text{SP}$ ( $\lambda_{\text{max}}$ ) em função do parâmetro $\delta_{\text{new}}$ , derivado do parâmetro de solubilidade de Hansen, incluindo-se os dados obtidos a partir de misturas de acetonitrila e água como solventes. ....	80

Figura 37. (a) Espectros (não-normalizados) de absorção por refletância difusa na região de ultravioleta-visível (DRUV) das formulações de cubossomas estabilizadas com poloxamer 407 ou polissorbato 80; (b) deconvolução (Gauss) do sinal observado para C <sub>10</sub> SP-Phyt-PS na faixa de 480 a 660 nm. ....	83
Figura 38. Espectros (não-normalizados) de absorção por refletância difusa na região de ultravioleta-visível (DRUV) das seguintes formulações após adição de concentrações crescentes de etanol (mL de etanol:10 mL de formulação): (a) C <sub>10</sub> SP-Phyt-PX, (b) C <sub>10</sub> SP-Phyt-PS, (c) C <sub>10</sub> SP-PhytPLi-PX, (d) C <sub>10</sub> SP-PhytPLi-PS. ....	84
Figura 39. Evolução dos perfis de SAXS das formulações (a) Phyt-PX e (b) PhytPLi-PX em função da proporção etanol:água (v/v), após adição de volumes crescentes de etanol a estas formulações. As medidas foram realizadas a 40 °C (os sinais referentes ao porta-amostra e ao meio foram previamente subtraídos). ....	88
Figura 40. (a) Variação da posição de $q$ (nm <sup>-1</sup> ) referente à intensidade máxima do pico (110) das formulações Phyt-PX e PhytPLi-PX em função da proporção etanol:água (v/v); (b) Variação da largura à meia altura (nm <sup>-1</sup> ) do pico (110) das formulações Phyt-PX e PhytPLi-PX em função da proporção etanol:água (v/v). Os valores de $q$ e de largura à meia altura foram obtidos a partir do ajuste dos picos (110) de cada amostra à função Lorentziana. ....	89
Figura 41. Evolução dos perfis de SAXS das formulações (a) Phyt-PS e (b) PhytPLi-PS em função da proporção etanol:água (v/v), após adição de volumes crescentes de etanol a estas formulações. As medidas foram realizadas a 40 °C (os sinais referentes ao porta-amostra e ao meio foram previamente subtraídos). ....	91
Figura 42. (a) Variação da posição em $q$ (nm <sup>-1</sup> ) do pico (110) das formulações Phyt-PS e PhytPLi-PS em função da proporção etanol:água (v/v); (b) Variação da largura à meia altura (nm <sup>-1</sup> ) do pico (110) das formulações Phyt-PS e PhytPLi-PS em função da proporção etanol:água (v/v). Os valores de $q$ e de largura à meia altura foram obtidos a partir do ajuste dos picos (110) de cada amostra à função Lorentziana. ....	93

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Posição relativa dos picos de difração de fases de ocorrência mais comum em cristais líquidos liotrópicos e índices de Miller ( <i>hkl</i> ) correspondentes. ....	7
Tabela 2. Composição das fases orgânica e aquosa das formulações. ....	38
Tabela 3. Resultados de caracterização fisicoquímica das formulações por técnicas de espalhamento de luz.....	44
Tabela 4. Termos referentes ao parâmetro de solubilidade de Hansen $\delta_T$ e ao parâmetro $\delta_{new}$ (conforme Tian e colaboradores <sup>69</sup> ) para solventes com diferentes naturezas químicas e respectivos máximos de absorção da banda da porção merocianina ( $\lambda_{max}$ ) da molécula C <sub>10</sub> SP nestes solventes. ....	77

## Símbolos e Abreviaturas

ATR - Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho

BIPS - Indolinobenzospiropiranos

$\text{CDCl}_3$  - Clorofórmio deuterado

Cryo-TEM - Crio-microscopia eletrônica de transmissão

DMSO-d6 – Dimetilsulfóxido deuterado

DRUV – refletância difusa na região de ultravioleta-visível

ELS - Espalhamento de luz eletroforético

NTA - Análise de rastreamento de nanopartículas

PLipA - Polímero de ácido lipóico obtido por via térmica

$Q_{II}$  - Fases cúbicas bicontínuas reversas

RMN  $^{13}\text{C}$  - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN  $^1\text{H}$  - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SAXS - Espalhamento de raios X a baixos ângulos

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão

TGA - Análise termogravimétrica

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão bibliográfica.....</b>	<b>4</b>
2.1. Nanopartículas de cristais líquidos liotrópicos com fases reversas não-lamelares .	4
2.1.1. Fases cúbicas bicontínuas reversas em misturas lipídio/água.....	4
2.1.2. Efeito Ouzo e processos de nano-segregação .....	10
2.2. Propriedades químicas e potenciais aplicações do poli(ácido lipóico) na terapêutica.....	12
2.2.1. Ligações covalentes dinâmicas .....	12
2.2.2. Química da polimerização do ácido lipóico.....	14
2.2.3. Nanopartículas híbridas do tipo polímero-lipídio como antivirais .....	16
2.3. Espiropiranos/merocianinas como sensores de microambiente químico.....	17
2.3.1. Espiropiranos: aspectos estruturais gerais.....	17
2.3.2. Solvatocromismo de espiropiranos .....	20
2.4. Hipótese de trabalho.....	23
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>25</b>
3.1. Objetivo geral.....	25
3.2. Objetivos específicos .....	25
<b>4. Parte experimental.....</b>	<b>26</b>
4.1. Materiais e equipamentos.....	26
4.1.1. Reagentes, solventes e outros materiais de consumo.....	26
4.1.2. Equipamentos.....	27
4.2. Métodos.....	29
4.2.1. Síntese do polímero de ácido lipóico (PLipA) pela via térmica .....	29
4.2.2. Descrição da rota de síntese do surfactante sensor de microambiente químico ...	29

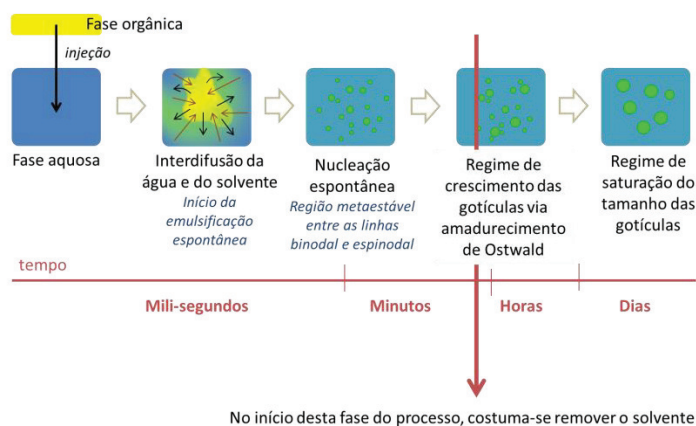
4.2.3. Caracterização do surfactante sensor de microambiente químico .....	36
4.2.4. Preparação das nanoestruturas pelo método de deslocamento de solvente.....	37
4.2.5. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) .....	38
4.2.6. Crio-microscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM).....	39
4.2.7. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) .....	39
4.2.8. Espalhamento de luz eletroforético (ELS) .....	40
4.2.9. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS).....	40
4.2.10. Investigação do microambiente químico das nanopartículas por refletância difusa na região de ultravioleta-visível (DRUV).....	41
<b>5. Resultados e discussão .....</b>	<b>42</b>
5.1. Caracterização estrutural e morfológica das nanopartículas.....	42
5.2. Síntese e caracterização do surfactante sensor de microambiente químico.....	52
5.3. Investigação do processo de formação das pseudofases das nanopartículas .....	80
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>95</b>
<b>Referências .....</b>	<b>98</b>

(propositalmente em branco na versão impressa)



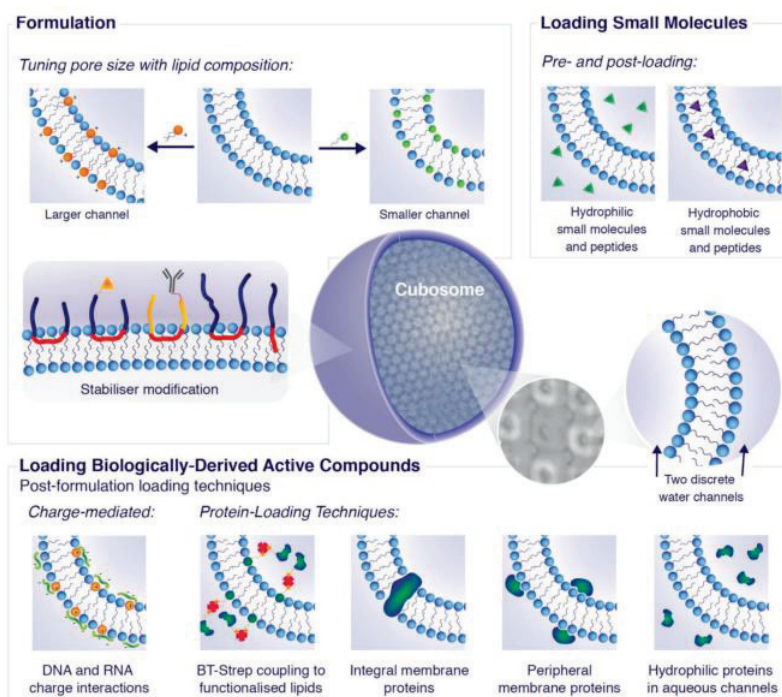
# 1. Introdução

Efeito Ouzo é um fenômeno em que um composto hidrofóbico, dissolvido em um solvente orgânico que é totalmente miscível em água (denominado de hidrótropo), passa por um processo de nucleação ao ser adicionado em excesso de água, resultando em uma mistura coloidal estável <sup>1</sup>. A preparação de nanopartículas orgânicas através de métodos baseados no efeito Ouzo não é algo novo na literatura. Desde a publicação seminal de Vitale e Katz <sup>2</sup>, os princípios fisicoquímicos que regem a nanoestruturação de sistemas lipídicos e poliméricos através da utilização de um hidrótropo em meio aquoso vem sendo cada vez mais investigados <sup>3-5</sup>. Inclusive, é importante ressaltar que, embora a formação espontânea das nanopartículas decorra dessa mistura (Figura 1), a posterior remoção do solvente orgânico é importante para determinadas aplicações, tais como na terapêutica. Apesar disso, uma grande ênfase é dada para estudos que investigam a etapa de deslocamento de solvente (que caracteriza o efeito Ouzo), enquanto que pouco se sabe ainda sobre a influência da etapa de remoção do solvente hidrótropo nas características da partícula final <sup>5,6</sup>. Isto é particularmente relevante quando se trata de partículas com estrutura dependente da concentração de solvente no meio, como no caso de cubossomas lipídicos.



**Figura 1.** Esquema de formação de nanopartículas pelo efeito Ouzo, com base em estudos realizados por Sitnikova e colaboradores <sup>7</sup>. A fase orgânica corresponde à mistura do composto hidrofóbico e do solvente hidrótropo. As linhas binodal e espinodal mencionadas na figura referem-se a regiões particulares do diagrama de fase ternário da mistura (água/hidrótropo/composto hidrofóbico).

Cubossomas lipídicos são nanopartículas cuja estrutura interna é formada pela autoassociação de lipídios polares em bicamadas retorcidas. Essa organização permite a formação espontânea de canais aquosos espacialmente ordenados em seu interior. Sua estabilização em meio aquoso é realizada com auxílio de surfactantes, que podem ou não ser poliméricos (Figura 2) <sup>8</sup>. Cubossomas são particularmente interessantes por apresentarem diferentes microdomínios em sua estrutura. Isto torna-os versáteis para incorporar moléculas bioativas com diferentes graus de lipofilicidade e tamanho <sup>9</sup>. Além disso, é possível incorporar aditivos que conferem responsividade ao meio. Nesse sentido, o controle da morfologia destes sistemas pode, em última instância, abrir caminhos originais e vantajosos para problemas ainda desafiadores no âmbito da medicina personalizada.



**Figura 2.** Representação de um cubossoma e suas potencialidades de incorporação de diferentes tipos de moléculas por variados mecanismos. Reproduzido de Barriga et al. <sup>8</sup> com autorização para reprodução. Direitos autoriais da American Chemical Society

Embora alguns estudos mais recentes <sup>10,11</sup> tenham proposto preparar cubossomas lipídicos com polímeros funcionais como aditivos, ainda não havia, até o advento do presente estudo <sup>12</sup> uma proposta de preparação de cubossomas lipídicos com controle espacial da localização de polímero pré-formado nos seus microdomínios. Este controle

refinado da morfologia pode ter impactos concretos na resposta biológica promovida por tais sistemas, pois a capacidade de exposição do polímero a sítios biológicos específicos deve diferir se o mesmo encontra-se na superfície ou camuflado em microdomínios mais internos. Ambas as situações podem ser desejadas, a depender da resposta biológica de interesse. Um polímero mais próximo à superfície pode atuar favorecendo uma interação partícula-receptor ou pode dificultar o acesso de determinadas moléculas biológicas ao interior do sistema, como uma barreira. Por sua vez, um polímero camuflado no interior do sistema pode atuar de forma a favorecer a liberação de moléculas bioativas no cubossoma em resposta a gatilhos externos (por ex., por meio da indução de transição de fase) ou pode aprisionar uma molécula bioativa no interior do cubossoma que, de outra forma, ficaria exposta à superfície.

O presente estudo demonstrou que é possível obter cubossomas de fitantriol (um lipídio polar bastante empregado para esta finalidade) com um poli(dissulfeto) potencialmente responsivo a ambiente redox, com controle espacial de sua localização na estrutura do sistema. O polímero pode decorar a superfície do cubossoma ou intercalar-se na rede interna líquido-cristalina, com a coexistência (neste último caso) de uma nanoesfera polimérica encapsulada em seu interior. Estas duas morfologias tão distintas foram obtidas apenas modificando-se o estabilizante. Descobriu-se que a afinidade entre a tríade lipídio-polímero-estabilizante é a chave para este controle. Esta afinidade acaba influenciando a maneira como ocorre a estruturação do cubossoma desde os momentos iniciais de remoção do solvente. Esta investigação, que culminou na presente Dissertação de Mestrado, contribuiu para preencher uma lacuna importante do ponto de vista da ciência fundamental, relacionada ao mecanismo de formação de cubossomas lipídicos e seus híbridos com polímero. Porém, este estudo não se restringe à ciência básica, pois apresenta uma nova classe inédita de sistemas híbridos do tipo polímero-lipídio nos quais diferentes morfologias podem ser controladas de maneira fácil e conveniente, com potenciais impactos no tratamento de doenças de forma personalizada de acordo com as necessidades do paciente.

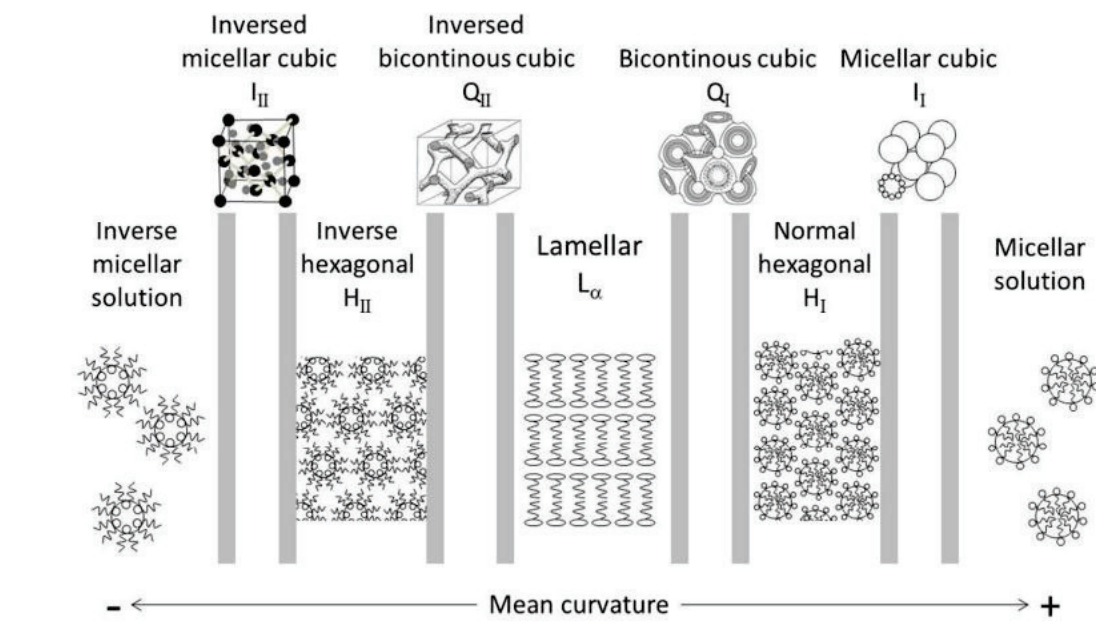
## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Nanopartículas de cristais líquidos liotrópicos com fases reversas não-lamelares

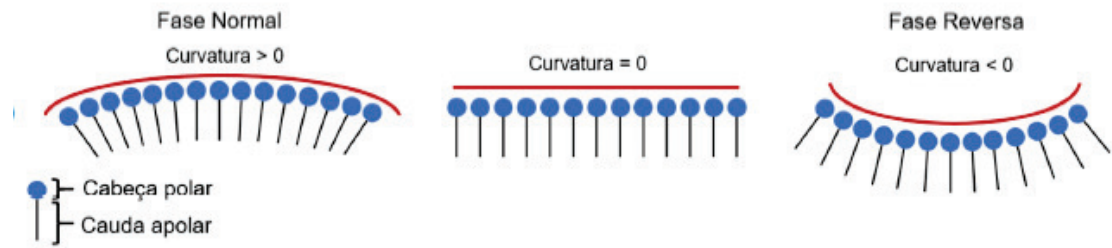
#### 2.1.1. Fases cúbicas bicontínuas reversas em misturas lipídio/água

Cristais líquidos liotrópicos são compostos por moléculas anfifílicas que tendem a se autoassociar na presença de um determinado líquido. Em sistemas que envolvem lipídios polares e água, a autoassociação ocorre com o objetivo de minimizar o contato entre as regiões hidrofóbicas dos lipídios e a fase aquosa. Esse fenômeno, combinado com as interações repulsivas entre as cabeças polares dos lipídios e as restrições de empacotamento de suas cadeias alquílicas, conduz à formação de estruturas supramoleculares com diferentes arquiteturas (Figura 3) <sup>13,14</sup>. Geralmente, os lipídios tendem a se agregar na forma de micelas e estas, quando empacotadas com certo grau de ordenamento, são as unidades estruturais de muitos tipos de cristais líquidos liotrópicos. Quando as cabeças polares dos lipídios estão voltadas à face externa da micela, trata-se de uma fase normal. Do contrário, quando as cabeças polares voltam-se para a face interna da micela, tem-se uma fase reversa <sup>15</sup>. Cabe ressaltar que as micelas podem ser esféricas ou cilíndricas, formando fases cúbicas e hexagonais, respectivamente.

Também é possível observar outros tipos de arquiteturas que não envolvem micelas, como a fase lamelar, onde os lipídios se associam na forma de bicamadas planas sobrepostas <sup>16</sup>. Por fim, fases bicontínuas também podem ser apontadas como um terceiro conjunto de arquiteturas. Nestes casos, bicamadas de lipídios encontram-se retorcidas de tal maneira que é possível identificar periodicidade topológica no material <sup>17</sup>. As fases bicontínuas são consideradas reversas quando as cadeias apolares do lipídio voltam-se para as faces externas da bicamada retercida. Como consequência disto, formam-se canais aquosos no interior dessas estruturas.



(a)



(b)

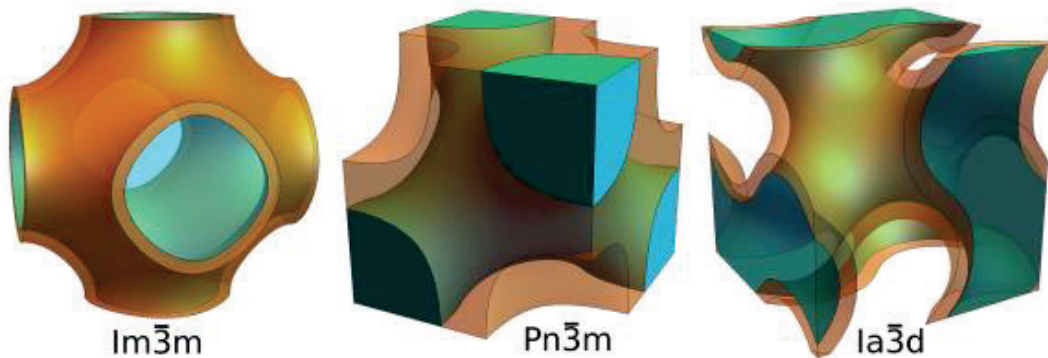
**Figura 3.** (a) Representações esquemáticas de diferentes fases líquido-cristalinas liotrópicas (normais e reversas), organizadas de acordo com a curvatura média de suas membranas. Reproduzido de Salim e colaboradores<sup>18</sup> com autorização para reprodução. Direitos autorais da Royal Society of Chemistry; (b) representação esquemática da curvatura de membranas lipídicas em água.

Três fases cúbicas bicontínuas reversas (Figura 4) costumam ser relatadas na literatura para misturas de água e alguns tipos de lipídios, a saber: Ia3d (giróide), Pn3m (diamante) e Im3m (primitiva). Nestas fases líquido-cristalinas, formam-se dois canais aquosos não-interconectados ao longo de toda a estrutura. Uma das técnicas mais importantes para sua caracterização é o espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS). Nesta técnica, um feixe monocromático de raios X (a partir de fonte de luz convencional ou síncrotron) incide sobre a amostra e é transmitido, sendo então

detectado. No feixe transmitido, são detectados raios X que sofreram espalhamento *quasi*-elástico, em ângulos próximos a zero (tipicamente  $< 5^\circ$ ) em relação à direção do feixe incidente. Os dados obtidos a partir deste experimento referem-se à intensidade de fótons detectados  $I$  em função do vetor de espalhamento  $\vec{q}$ . Este vetor é a diferença entre os vetores de onda dos raios X espalhados ( $\vec{k}'$ ) e dos incidentes ( $\vec{k}$ ), conforme Equação 1<sup>19</sup>:

$$|\vec{q}| = |\vec{k}' - \vec{k}| = \frac{4 \cdot \pi \cdot \sin \theta}{\lambda} \quad (1)$$

sendo  $\lambda$  o comprimento de onda dos raios X incidentes e  $2\theta$  o ângulo entre os vetores  $k'$  e  $k$ . Estes dados (bidimensionais) são subsequentemente reduzidos a curvas (unidimensionais) de intensidade de espalhamento  $I(q)$  em função de  $q$ . Cada cela unitária que caracteriza uma fase líquido-cristalina apresenta planos cristalográficos determinados. Portanto, é possível associar índices de Miller (hkl) a cada pico observado nas curvas de SAXS de uma amostra. A partir da indexação destes picos, é possível determinar a simetria que caracteriza a fase da amostra analisada (Tabela 1).



**Figura 4.** Superfícies mínimas periódicas de simetria cúbica (a) primitiva  $Im\bar{3}m$ , (b) duplo diamante  $Pn\bar{3}m$  e (c) giroide  $Ia\bar{3}d$ . Reproduzido de Assenza e colaboradores<sup>20</sup> com autorização para reprodução. Direitos autorais da AIP Publishing

Fases cúbicas bicontínuas reversas são altamente viscosas, o que dificulta sua aplicação na terapêutica, em especial para uso interno. Nesse sentido, sua dispersão na forma de nanopartículas estabilizadas por um composto tensoativo abre muitas possibilidades. Estas nanopartículas são denominadas de cubossomas e a literatura

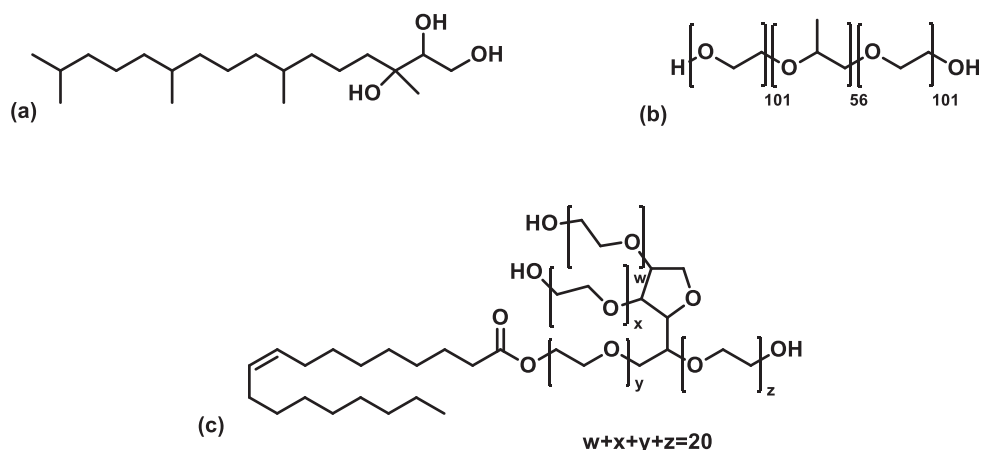
descreve variados métodos para sua obtenção e diversas aplicações, em particular para cubossomas preparados com lipídios polares. Nanopartículas de fases cúbicas bicontínuas reversas possuem alta resistência à ruptura osmótica ou mecânica, mantendo sua estrutura em meios aquosos extremamente diluídos <sup>8</sup>.

**Tabela 1.** Posição relativa dos picos de difração de fases de ocorrência mais comum em cristais líquidos liotrópicos e índices de Miller ( $hkl$ ) correspondentes.

Estrutura de Fase	1	$\sqrt{2}$	$\sqrt{3}$	2	$\sqrt{5}$	$\sqrt{6}$	$\sqrt{7}$	$\sqrt{8}$	3
$L_\alpha$	(100)	-	-	(200)	-	-	-	-	(300)
$Q_2$	Pn3m	-	(110)	(111)	(200)	-	(211)	-	(220) (221)
	Im3m	-	(110)	-	(200)	-	(211)	-	(220) -
	Ia3d	-	-	-	-	-	(211)	-	(220) -
$H_{1/2}$	(100)	-	(110)	(200)	-	-	(210)	-	(300)
$I_2$	Pm3n	-	(110)	-	(200)	(210)	(211)	-	(220) -
	Fd3m	-	-	(111)	-	-	-	-	(220) -

Há um número limitado de lipídios polares capazes de formar fases cúbicas bicontínuas reversas em excesso de água, sob condições fisiológicas de temperatura <sup>8,13,14</sup>. Um deles é o fitantriol (3,7,11,15-tetrametil-hexadecantriol), que possui como vantagem não apresentar ligações éster em sua estrutura (Figura 5), tornando o sistema resistente ao efeito de esterases em meio fisiológico. Chong e colaboradores<sup>21</sup> classificaram estes estabilizantes em quatro grupos principais: (i) copolímeros em bloco anfifílicos, (ii) lipídios PEGilados, (iii) séries de copolímeros lipídicos projetadas/personalizadas e (iv) estabilizantes estéreos alternativos (por exemplo, sais biliares, proteínas, polímeros de polissacarídeos, vitaminas e nanopartículas inorgânicas). Um estabilizante bastante comum que é utilizado para preparar cubossomas é o copolímero em bloco poloxamer 407, embora mais recentemente o lipídio PEGilado polissorbato 80 também venha sendo utilizado em decorrência de sua capacidade de vetorizar as nanopartículas ao cérebro <sup>22,23</sup>. O primeiro é um copolímero tribloco composto por uma porção central hidrofóbica (cujo monômero é o

propilenoglicol) ligada a duas extremidades hidrofílicas de poli(etilenoglicol). O segundo, por sua vez, é um éster de ácido oleico (porção lipídica) e sorbitano polietoxilado (porção polimérica). Embora outras possibilidades de lipídios e estabilizantes estejam disponíveis, optou-se por utilizar fitantriol como lipídio polar neste estudo em virtude de suas vantagens elencadas acima. Já a escolha dos estabilizantes foi baseada no tipo de interação que cada um estabelece com o lipídio, conforme detalhado posteriormente neste manuscrito.



**Figura 5.** Estruturas químicas de (a) fitantriol, (b) poloxamer 407 e (c) polissorbato 80.

Diagramas de fase de misturas massivas lipídio-água costumam ser o ponto de partida para compreender a estruturação de cubossomas. No entanto, é importante ressaltar que a adição de estabilizantes (ou mesmo de fármacos) pode alterar o diagrama de fase em função do grau de interação destes componentes com as bicamadas lipídicas. Essas alterações não são necessariamente indesejáveis, pois podem promover liberação controlada de moléculas carregadas no interior do sistema <sup>8</sup>. A escolha adequada do estabilizante leva em consideração o seu efeito na estrutura de fase da mistura lipídica. Assume-se que a maioria dos estabilizantes residam na superfície do cubossoma, com apenas uma intercalação mínima na bicamada lipídica (como no caso de cubossomas de fitantriol estabilizados por poloxamer 407) <sup>24</sup>. Porém, mudanças na estrutura de fase, como aquela observada quando cubossomas de fitantriol são estabilizados por polissorbato 80, indicam que é plenamente possível ocorrer intercalação considerável do estabilizante nas bicamadas a depender da natureza destes componentes <sup>23</sup>.

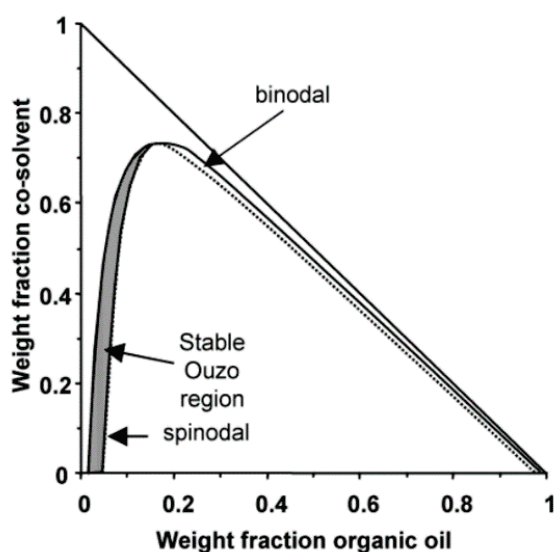


Além dos estabilizantes e dos fármacos, é possível incorporar aditivos que causem responsividade do sistema de forma a atender princípios da medicina personalizada. Estes aditivos podem ser surfactantes <sup>25</sup>, pequenas moléculas <sup>26,27</sup>, polímeros <sup>28-30</sup>, biomoléculas <sup>31,32</sup>, entre outros. Essa responsividade pode ocorrer por mudanças de fase induzidas pela resposta dos aditivos a gatilhos no meio, o que poderia impactar na taxa de liberação do fármaco. Também é possível ocorrer vetorização ativa dos cubossomas se estes tiverem sua superfície decorada com ligantes específicos (por ex., anticorpos). Há relatos de aplicações de cubossomas, muitos deles com características responsivas, para terapias diversificadas. Uma discussão aprofundada sobre o estado-da-arte da aplicação de cubossomas para entrega controlada de fármacos no organismo pode ser encontrada em um artigo de revisão recentemente publicado por Abourehab e colaboradores <sup>9</sup>.

Os métodos de preparação de cubossomas costumam ser classificados dentro de duas abordagens amplas: *top-down* e *bottom-up*. A primeira é caracterizada pelo cisalhamento de uma mistura líquido-cristalina massiva até a escala nanométrica com auxílio de um equipamento que confira energia ao sistema. Este equipamento pode ser baseado em cavitação (ultrassom), cisalhamento mecânico (agitador do tipo estator-rotor), entre outros. É importante ressaltar que, devido à geração de calor durante o processamento mecânico, fármacos incorporados à formulação podem sofrer degradação térmica. Portanto, é necessário um cuidado especial durante o processo para garantir a preservação da atividade do fármaco. <sup>14</sup> Mais recentemente, métodos *bottom-up* foram propostos para obter cubossomas. Nesse caso, o sistema nanoparticulado é formado a partir da agregação controlada de espécies moleculares que se encontram inicialmente dissolvidas em um meio. Um hidrótropo (que consiste em um solvente completamente miscível em água) é utilizado para obter-se uma solução orgânica do lipídio polar (e, eventualmente, de fármaco e de aditivos). Esta solução é vertida em uma fase aquosa contendo estabilizante. A formação das nanopartículas é espontânea, seguindo princípios físicoquímicos bastante conhecidos e que, modernamente, são descritos no chamado “efeito Ouzo”. Por causa disso, não há necessidade de fornecer energia mecânica ao sistema, como nos processos *top-down*. O solvente orgânico deve ser posteriormente removido (por diálise ou sob pressão reduzida) para reduzir a possibilidade de coalescência das partículas <sup>33</sup>.

### 2.1.2. Efeito Ouzo e processos de nano-segregação

Efeito Ouzo é um fenômeno no qual um composto hidrofóbico dissolvido em um solvente orgânico completamente miscível em água sofre nucleação, mantendo-se como uma mistura coloidal após adição de excesso de água. Estudos prévios demonstraram que este sistema se mantém nanodisperso porque compreende uma região do diagrama de fase (Figura 6) entre as curvas binodal e espinodal <sup>1</sup>. Uma descrição físicoquímica do processo envolvido no efeito Ouzo foi inicialmente proposta em um artigo seminal de autoria de Vitale e Katz <sup>2</sup>. Quando a solubilidade dos solutos diminui com o aumento da concentração local de água, a solução pode se tornar supersaturada. É neste ponto do processo que núcleos se formam espontaneamente a partir de flutuações locais na concentração de moléculas do soluto. A nucleação termina quando não restam regiões com supersaturação. O resultado final desse processo (da ordem de milissegundos) é uma dispersão de pequenas gotículas líquidas em uma fase líquida contínua.



**Figura 6.** Representação genérica de um diagrama de fase ternário (pressão e temperatura constantes) indicando a região entre as curvas binodal e espinodal onde ocorre o efeito Ouzo. Reproduzido de Vitale e Katz <sup>2</sup> com autorização para reprodução. Direitos autorais da American Chemical Society.

Quando óleo foi utilizado para preparar uma emulsão por esta estratégia, observou-se através de estudos envolvendo espalhamento de luz que o crescimento das

gotículas após esta primeira etapa muito rápida mencionada acima acontece através de amadurecimento de Ostwald <sup>34</sup>. O amadurecimento de Ostwald é um processo de caráter difusional, no qual partículas maiores crescem em detrimento da diminuição/desaparecimento de partículas menores. Posteriormente, ocorre um regime de saturação do tamanho das partículas. No entanto, salienta-se que nanopartículas formadas através do efeito Ouzo são ditas “cineticamente estabilizadas”. Esse termo é empregado porque, ao contrário de soluções micelares termodinamicamente estabilizadas, as nanopartículas formadas através de efeito Ouzo podem evoluir até completa separação de fase se um tempo suficientemente longo for aguardado <sup>3</sup>.

Demonstrou-se que polímeros, no caso de partículas poliméricas preparadas por método que envolve efeito Ouzo, tornam-se vítreos conforme ocorre interdifusão do solvente e da água na fase de mistura. Isto dificulta o crescimento das partículas via amadurecimento de Ostwald e define a estrutura formada do ponto de vista morfológico <sup>4</sup>. O mesmo provavelmente não ocorreria para cubossomas, pois sua estrutura de fase é sensível à presença de solventes. A formação de nanopartículas no efeito Ouzo ocorre a partir de uma certa concentração local de hidrófobo durante o processo de interdifusão solvente-água <sup>2</sup>. Porém, para estruturas morfológicamente complexas e sensíveis ao meio como cubossomas <sup>35,36</sup>, não basta ater-se a esta etapa do processo. A segunda etapa, que consiste na remoção do solvente, também é relevante e pode ser até mesmo mais importante para definir o tipo de morfologia resultante no caso da incorporação de outros aditivos além do lipídio polar. Isto se sustenta porque é fundamental remover o solvente até pelo menos uma certa concentração para que a estrutura de fase se forme. A nanoprecipitação de aditivos antes ou depois da formação da estrutura de fase, que dependeria de uma combinação de fatores (entre eles, forças de coesão e adesão com os demais componentes, incluindo-se o solvente, bem como velocidade de remoção do solvente), poderia definir a morfologia da partícula.

É curioso observar que ainda há muito a se explorar cientificamente com relação à incorporação de polímeros em cubossomas lipídicos. O uso de polímeros para preparar nanopartículas com fases cúbicas bicontínuas, sem participação de lipídios na sua composição, é uma tendência observada nos últimos anos <sup>10,11</sup>. Relatos de cubossomas lipídicos preparados via efeito Ouzo também vêm ganhando destaque <sup>5,6</sup>. Porém, a combinação de lipídios polares e de polímeros que não tenham papel principal como estabilizantes na composição de partículas preparadas via efeito Ouzo ainda não

foi suficientemente investigada. Pode-se mencionar estudos nos quais o polímero acaba atuando como um revestimento, como no caso de cubossomas lipídicos com quitosana em sua superfície <sup>37,38</sup>. Porém, tentativas de internalizar, em cubossomas lipídicos, polímeros que originalmente não seriam capazes de se estruturar em fases cúbicas bicontínuas ainda constituem uma lacuna nesta área de pesquisa. Dentro desta perspectiva, buscou-se combinar fitantriol e um polímero potencialmente resposivo ao ambiente em uma mesma plataforma do tipo cubossoma, através do uso do próprio estabilizante como agente de incorporação empregando-se um método de preparação baseado no efeito Ouzo. Por atender os quesitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial, foi encaminhado pedido de depósito de patente destes sistemas <sup>12</sup>, [vide Anexo III]. A discussão científica que embasa tanto a caracterização quanto o mecanismo de formação destes sistemas é foco da presente Dissertação de Mestrado.

## **2.2. Propriedades químicas e potenciais aplicações do poli(ácido lipóico) na terapêutica**

### *2.2.1. Ligações covalentes dinâmicas*

Ligações covalentes dinâmicas são únicas no sentido de que combinam características de interações não-covalentes e ligações covalentes <sup>39-41</sup>. Sob certas condições, elas podem formar-se e quebrar-se reversivelmente, de forma relativamente rápida e com baixa barreira energética, tal como determinadas interações não-covalentes, em um processo regido por controle termodinâmico. Ao alterarem-se as condições, a barreira energética deste processo eleva-se consideravelmente. A introdução de ligações covalentes dinâmicas em estruturas poliméricas resulta em materiais com propriedades inéditas, tais como maleabilidade, autorregeneração, memória de forma, adaptabilidade, relaxamento de tensões e responsividade a estímulos do meio <sup>42</sup>.

A interconversão tiol-dissulfeto é uma das primeiras ligações químicas nas quais se demonstrou propriedades dinâmicas, existindo grande volume de informações a seu respeito na literatura. Sua reversibilidade depende essencialmente do ambiente redutor do meio <sup>43,44</sup>. Sabe-se que o ambiente redox em compartimentos biológicos varia do ponto de vista não só espacial, mas também temporal. Isto é particularmente

interessante quando se pensa em sistemas biorresponsivos. Além disso, cabe destacar que, no organismo, há um número negligenciável de reações de competição com outros nucleófilos além do tiol em uma eventual clivagem de dissulfeto. Aminas, por exemplo, reagem pelo menos uma ordem de magnitude mais lentamente com dissulfeto que tióis em pH fisiológico <sup>45</sup>.

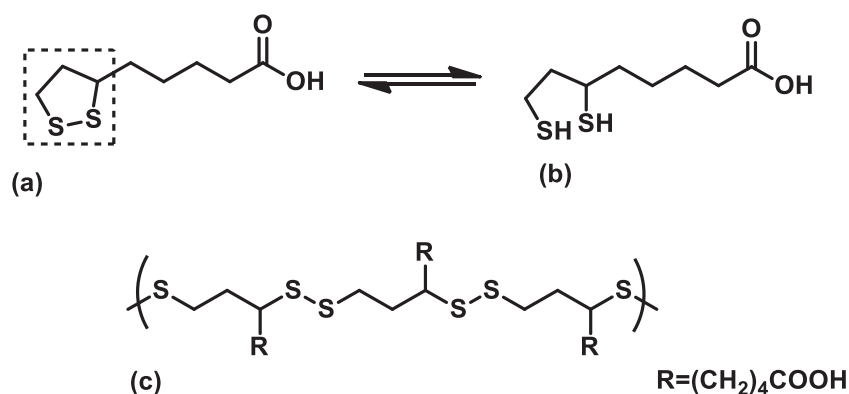
Sistemas de liberação controlada baseados no caráter dinâmico de reações de interconversão tiol-dissulfeto vêm sendo cada vez mais explorados na literatura, particularmente empregando-se polímeros com esta propriedade <sup>46</sup>. Tais sistemas podem constituir uma matriz que sofre despolimerização sob condições controladas liberando a molécula bioativa por difusão exclusivamente no sítio-alvo, em resposta ao ambiente. Por outro lado, combinações de polímeros capazes de interconversão tiol-dissulfeto e compostos lipídicos em uma mesma partícula não são tão facilmente encontrados.

É curioso notar que um exemplo marcante de manipulação do estado redox intracelular é feito por vários tipos de vírus após a infecção. É comum que vírus causem depleção de glutathione e estimulem o aumento de espécies reativas de oxigênio no interior de células infectadas <sup>47</sup>. Nesse sentido, trabalhar com polímeros que apresentem ligações dissulfeto também pode ser uma janela de oportunidade que vai além da química de interconversão tiol-dissulfeto típica, onde tiolato atua como nucleófilo em um mecanismo de substituição. Este tipo de interconversão também acontece por outros mecanismos com múltiplas etapas, que podem ser inclusive radicalares <sup>48</sup>. Em particular, mecanismos radicalares com participação de radicais tiila ocorrem muito comumente em reações de metátese dissulfeto-dissulfeto, também conhecidas como reações de interconversão dissulfeto-dissulfeto <sup>49</sup>. Espera-se que um meio rico em espécies reativas de oxigênio seja capaz de promover a formação de radicais tiila, resultando em modificações químicas de polímeros do tipo poli-dissulfeto que podem ser úteis do ponto de vista nanobiotecnológico. Dentro deste contexto, buscou-se propor um sistema nanotecnológico que combinasse as características de cubossomas e a responsividade de um poli-dissulfeto, com o surgimento de propriedades novas que não fossem um simples somatório daquelas de seus componentes individuais. A vantagem mais evidente a médio prazo para este sistema, dentro do contexto apresentado acima, é sua aplicação na terapia antiviral. Porém, por não ser um desafio trivial obter esse tipo de sistema, foi necessário neste primeiro momento delinear as nanopartículas a partir de

bases racionais, investigando-se sua estrutura e mecanismo de formação com um olhar voltado à ciência fundamental e, por isso, a avaliação desta aplicação manteve-se como perspectiva para futuros estudos.

### 2.2.2. Química da polimerização do ácido lipóico

O poli-dissulfeto proposto neste estudo foi aquele derivado de ácido  $\alpha$ -lipóico polimerizado por via térmica. Esta escolha foi baseada tanto na conveniência sintética quanto nas propriedades estruturais da molécula, como explicitado a seguir. O ácido  $\alpha$ -lipóico é um composto orgânico constituído por uma cadeia de oito carbonos, com uma carboxila em uma das extremidades e um anel ditiolano na outra. Esse anel é um heterociclo de cinco membros, onde dois átomos de enxofre estão unidos por uma ligação dissulfeto (Figura 7a). A ligação dissulfeto presente no ácido lipóico pode ser reduzida, resultando em dois grupos tiol. Essa redução é um processo comum em ambientes fisiológicos. Essa forma reduzida, conhecida como ácido di-hidrolipóico (Figura 7b), demonstra potencial farmacológico interessante devido ao seu envolvimento em processos anti-inflamatórios no organismo <sup>50</sup>.



**Figura 7.** Estruturas químicas de (a) ácido  $\alpha$ -lipóico (destaque para o anel ditiolano, que contém a ligação dissulfeto), (b) ácido di-hidrolipóico, e (c) poli-dissulfeto do ácido  $\alpha$ -lipóico.

Cabe notar que estudos vêm sendo publicados utilizando polímeros do ácido lipóico para constituir nanopartículas poliméricas como plataformas para a entrega controlada de fármacos <sup>51,52</sup>. Essa viabilidade de aplicação na terapêutica, já

demonstrada previamente, reforça a conveniência da escolha deste polímero para constituir as formulações propostas no presente estudo. A existência de grupos carboxila ao longo de toda sua estrutura abre a possibilidade de funcionalização com moléculas bioativas, que poderiam ser liberadas tanto via hidrólise pela ação de estereases quanto pela despolimerização via quebra das ligações dissulfeto que unem os monômeros. Neste último caso, seria liberado na verdade um pró-fármaco que necessitaria ser metabolizado. Ambos os tipos de clivagens poderiam ocorrer de forma ortogonal ou concomitante, a depender do ambiente biológico.

A incorporação de um polímero de ácido lipóico (denominado PLipA neste manuscrito) em cubossomas poderia tornar a cinética de liberação de fármacos finamente ajustável por uma combinação de fatores que incluem a taxa de quebra destas ligações dissulfeto no microambiente químico do cubossoma (que poderia ser diferente daquele em meio aquoso livre), a difusividade dos monômeros para o meio externo e a capacidade de enzimas hidrolíticas acessarem os microambientes onde o polímero ligado covalentemente ao fármaco estaria inserido no cubossoma. Cabe ressaltar que a presente Dissertação não trata deste aspecto em particular, mas sim de uma etapa anterior do desenvolvimento, que consiste em planejar, compreender e regular a estrutura da partícula sem fármaco, como uma plataforma geral para aplicações futuras diversas.

O ácido lipóico polimerizado resulta em um material biocompatível e biodegradável, o que é uma vantagem interessante tanto do ponto de vista ambiental quanto toxicológico. A polimerização do ácido lipóico pode ser realizada termicamente ou na presença de agentes oxidantes/redutores. No caso da polimerização térmica, a reação ocorre a temperaturas ligeiramente superiores à temperatura de fusão do ácido lipóico, sem a necessidade de adição de iniciadores ou solventes. O produto resultante é predominantemente uma estrutura linear, com os monômeros ligados por ligações dissulfeto (Figura 7c). Estudos prévios indicaram que a massa molar obtida na polimerização térmica pode ser bastante elevada, possivelmente superior a  $4 \times 10^5$  g/mol. Acredita-se que o mecanismo de polimerização seja radicalar, envolvendo a abertura fotocítica do anel ditiolano e a formação de di-radical, seguida por uma etapa de propagação através da formação de ligações dissulfeto intermoleculares<sup>53,54</sup>.

### 2.2.3. *Nanopartículas híbridas do tipo polímero-lipídio como antivirais*

Nanopartículas híbridas são materiais na escala manométrica constituídos por pelo menos duas diferentes classes químicas de compostos, onde novas propriedades emergem. Portanto, em nanopartículas híbridas não se observam propriedades que são simplesmente a soma daquelas de seus componentes individuais, mas novas propriedades que surgem em decorrência da existência de uma grande interface entre esses diferentes componentes <sup>55</sup>. Se os diferentes componentes interagem por ligações não-covalentes, são classificados como sendo de Classe I. Por outro lado, são classificados como de Classe II os híbridos formados por diferentes componentes ligados covalentemente entre si <sup>56</sup>. A combinação de PLipA e fitantriol poderia resultar em sistemas com microdomínios reguláveis, com respostas finamente ajustáveis ao meio. Isso é particularmente importante quando se pensa em efeitos adversos, que estão intrinsecamente ligados ao perfil farmacocinético de um fármaco.

As nanopartículas desenvolvidas na presente Dissertação de Mestrado podem ser classificadas como nanopartículas híbridas Classe I do tipo polímero-lipídio, visto que são constituídas por fitantriol (lipídio) e por um ou mais polímeros (poloxamer 407, PLipA). No caso das formulações contendo polissorbato 80, a classificação (Classe I ou II) fica um pouco dúbia, pois é possível considerar tanto interações não-covalentes (entre fitantriol e a porção polimérica do polissorbato 80) quanto covalentes (o polissorbato 80 possui uma porção lipídica covalentemente ligada a uma porção polimérica) na sua constituição. As principais propriedades emergentes dessas nanopartículas híbridas do tipo polímero-lipídio são maior estabilização cinética, capacidade de atuar de forma diferenciada quanto à difusão de fármacos e quanto à interação com membranas biológicas, além de pontencialmente responder a gatilhos redox no caso das formulações que contêm PLipA.

Embora o presente estudo de Mestrado seja caracterizado por seu caráter fundamental, é inegável que há várias perspectivas de aplicação bastante concretas para sistemas nanoparticulados híbridos de polímero-lipídio. Estas perspectivas englobam áreas tão diversas quanto terapêutica e diagnóstico para humanos e animais, fertilizantes para agricultura, catálise, estabilização de proteínas para diversas finalidades, tecnologia de vacinas, estabilização de insumos da indústria alimentícia, entre outros. Embora não seja o objetivo direto deste estudo, o potencial das nanopartículas desenvolvidas para a terapia antiviral é bastante promissor. Um artigo de revisão sobre terapias antivirais e



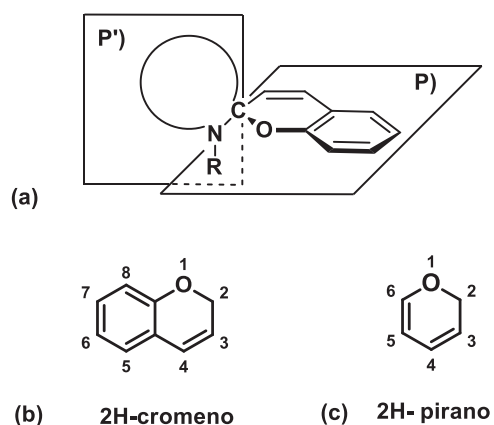
nanopartículas híbridas foi publicado por nosso grupo e colaboradores <sup>57</sup> e encontra-se no Anexo II. Convida-se o leitor a consultá-lo para maior detalhamento do assunto dentro de uma perspectiva mais ampla quanto a estruturas de nanopartículas híbridas em geral e suas aplicações nesta linha da terapêutica.

### **2.3. Espiropiranos/merocianinas como sensores de microambiente químico**

No decorrer do presente estudo, fez-se necessário buscar ferramentas para investigar o microambiente químico das formulações desenvolvidas, bem como a maneira pela qual este microambiente foi modificado conforme etanol foi sendo removido das formulações durante seu processo de preparação. Um detalhamento maior desta questão foi construído ao longo da sessão de Resultados e Discussão, pois surgiu como uma demanda durante o processo de investigação. Como fica explicitado mais adiante no texto, considerou-se que uma molécula fotocromica capaz de atuar como sensor de microambiente poderia fornecer estas respostas. A justificativa para a escolha de um derivado de espiropirano como sensor do microambiente químico dos cubossomas e aspectos fisicoquímicos relacionados ao seu solvatocromismo são discutidos abaixo, de forma a embasar a compreensão das evidências experimentais obtidas nesta Dissertação e discutidas em mais detalhes posteriormente.

#### *2.3.1. Espiropiranos: aspectos estruturais gerais*

Espiropiranos são compostos fotocromicos constituídos de duas porções heterocíclicas unidas por um carbono com hibridização  $sp^3$ , o que obriga as duas porções a se manterem em planos ortogonais (P e P') (Figura 8a). Esta união de duas porções cíclicas através de um único carbono é denominada de 'ligação espiro' <sup>58</sup>. Uma destas porções é o 2H-1-benzopirano (também chamado de 2H-cromeno) (Figura 8b), a qual é comum a todos os espiropiranos. A outra porção é variável, sendo muito comum encontrar anéis indólicos na literatura.

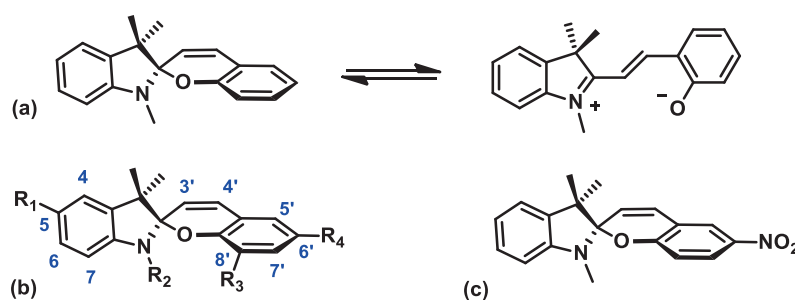


**Figura 8.** (a) Representação esquemática demonstrando os dois planos ortogonais dos espiropiranos, onde as duas porções heterocíclicas da molécula são unidas pela ligação espiro; (b) Estrutura da porção 2H-cromeno obrigatoriamente presente em espiropiranos; (c) Estrutura do 2H-pirano, que dá nome à classe de compostos conhecidos como espiropiranos (cujo nome literalmente significa “um anel pirano que estabelece uma ligação espiro”).

Os espiropiranos são capazes de passar por transformações estruturais reversíveis, mudando entre as formas espiropirano (fechada) e merocianina (aberta), que se mantêm em equilíbrio devido à baixa energia de interconversão entre elas <sup>59,60</sup> (Figura 9a). Este equilíbrio pode estar deslocado no sentido de uma destas formas em consequência das características do meio, que incluem sua polaridade, acidez, temperatura, presença de sais, potencial redox e até mesmo a frequência da radiação eletromagnética a qual estas espécies são expostas <sup>61,62</sup>. É justamente esta responsividade ao meio que torna esta classe de moléculas tão interessante do ponto de vista do solvatocromismo, como discutido mais adiante (sessão 2.3.2).

Os diferentes isômeros em equilíbrio apresentam propriedades muito diferentes entre si. A forma merocianina (aberta) apresenta uma considerável separação de carga, resultando em um momento de dipolo elétrico significativamente maior quando comparado ao isômero espiropirano (fechado) <sup>63</sup>. Além disso, o isômero espiropirano é transparente na região visível do espectro, ao passo que a forma merocianina apresenta uma forte absorção nesta faixa de comprimentos de onda, devido à maior conjugação de elétrons  $\pi$  em sua estrutura.

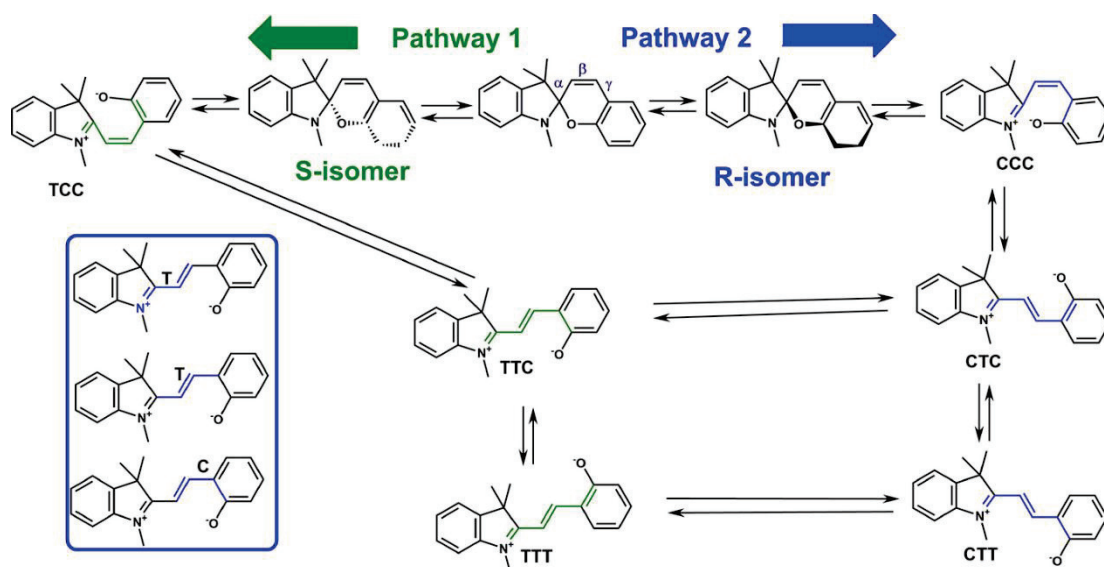
Dentro da grande classe de espiropiranos, cabe destacar os indolinobenzoespiropiranos (Figura 9b) (cujo acrônimo BIPS é recorrente na literatura para se referir a eles). O grande número de estudos dedicados a BIPS em relação a outros tipos de espiropiranos se deve provavelmente a facilidades sintéticas, com rotas já bastante estudadas e existência de ampla variedade de precursores com diferentes substituintes disponíveis comercialmente <sup>58</sup>. Além disso, este grupo de moléculas possui colorações bastante variadas em resposta ao ambiente, o que é interessante quando se pensa em sensores que forneçam respostas detectáveis a olho nu <sup>59,64</sup>. BIPS com substituinte nitro na posição 6' (Figura 9c) são particularmente sensíveis à interconversão espiropirano-merocianina em resposta ao ambiente químico <sup>59</sup>. Devido a isso, e também à conveniência sintética e diferenças marcantes de coloração em função de pequenas alterações no microambiente, uma estrutura do tipo 6'-nitro-BIPS foi escolhida como sensor no estudo desenvolvido na presente Dissertação.



**Figura 9.** (a) Isomerização de um indolinobenzoespiropirano (cujo acrônimo na literatura é BIPS), demonstrando o equilíbrio entre suas formas fechada (espiropirano) e aberta (merocianina); (b) numeração das posições na estrutura de um composto BIPS genérico; (c) estrutura química do 6'-nitro-BIPS.

A maior sensibilidade de 6'-nitro-BIPS ao meio, como mencionado acima, é decorrente da maior facilidade de interconversão entre seus isômeros em equilíbrio. O processo de isomerização de espiropiranos inicia-se com uma clivagem heterolítica da ligação C<sub>espiro</sub>-O, seguida por mudanças de configuração de tal maneira que múltiplas formas (cisóides e transóides) coexistam (Figura 10) além das duas que se costuma mencionar (Figura 9a) por questões de simplificação. A energia da ligação C<sub>espiro</sub>-O é determinante para a facilidade de interconversão entre as formas fechadas e abertas. Em geral, substituintes doadores de elétrons na porção indolina e substituintes que retiram elétrons na porção 2H-cromeno promovem uma diminuição na barreira de energia para

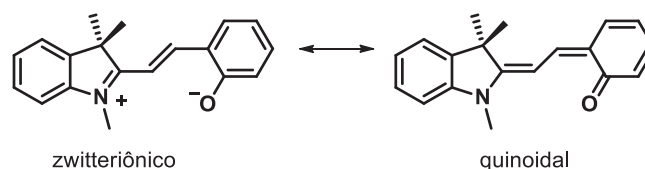
a abertura do anel, em particular nas posições 5 e 6'. A compensação das cargas parciais geradas por estes substituintes pelas correspondentes cargas formais de sinais opostos na forma merocianina é considerada a principal causa desse efeito<sup>58,65,66</sup>.



**Figura 10.** Diferentes formas isoméricas abertas possíveis decorrentes da abertura de uma espécie espíropirano (C = cisóide, T = transóide). Reproduzido de Kozlenko e colaboradores<sup>65</sup> com autorização da fonte. Direitos autorais de Spinger Nature.

### 2.3.2. Solvatocromismo de espíropiranos

As formas abertas merocianina podem ser mais adequadamente descritas como híbridos de ressonância a partir de contribuintes do tipo zwitteriônico e quinoidal (Figura 11). O peso de cada contribuinte na constituição do híbrido dependerá das propriedades do meio, visto que no contribuinte zwitteriônico há maior concentração de carga (que precisa ser estabilizada) que naquele quinoidal. Inclusive, o grau de deslocalização da densidade eletrônica na forma merocianina foi previamente correlacionado com o comprimento médio da ligação  $C_{\text{espiro}}-O$  da forma fechada e, consequentemente, com sua força<sup>60,67</sup>.



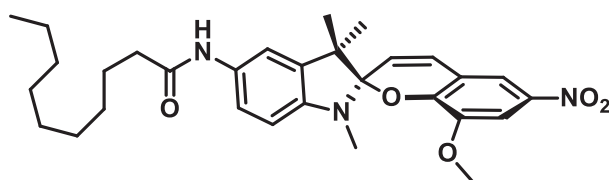
**Figura 11.** Contribuintes zwitteriônico e quinoidal do híbrido de ressonância merocianina.

Solvatocromismo é o potencial de uma molécula em sofrer isomerização em resposta i) à polaridade do solvente e ii) à sua capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio com o solvente <sup>68</sup>. Para espiropiranos, o aumento da polaridade do solvente resulta na estabilização da forma merocianina, bem como na formação de um híbrido de merocianina muito mais parecido com o contribuinte zwitteriônico que com o contribuinte quinoidal. Inclusive, mudanças não só na polaridade como também na natureza do solvente (prótico versus aprótico) resultam em deslocamento do máximo da banda de absorção da forma merocianina. Esse deslocamento é causado por interações intermoleculares soluto-solvente que modificam a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado da merocianina <sup>61</sup>. A forma merocianina de 6'-nitro-BIPS é particularmente interessante no contexto do presente estudo, porque sua distribuição de densidade eletrônica é bastante afetada pela natureza do solvente. Com isso, possivelmente, pequenas modificações no ambiente já seriam percebidas pelo sensor.

A literatura aponta os conceitos de fotocromismos positivo e negativo de forma recorrente para BIPS, em particular no que se refere a efeitos da natureza do solvente. Fotocromismo positivo ocorre quando a irradiação de uma espécie com luz na faixa do UV-visível induz conversão entre dois estados distintos de uma espécie, de forma que o estado termodinamicamente mais estável apresenta máximo da banda de absorção em valor de comprimento de onda maior que aquele menos estável. No fotocromismo negativo, a espécie termodinamicamente mais estável apresenta máximo de absorção em comprimento de onda menor <sup>69-71</sup>. Para as moléculas BIPS, o estado fundamental da forma merocianina se assemelha mais ao contribuinte zwitteriônico, enquanto que o estado excitado possui maior semelhança com o contribuinte quinoidal. Desta maneira, o aumento da polaridade do solvente desestabiliza o estado excitado e estabiliza o estado fundamental, aumentando a diferença de energia entre eles, manifestada em um deslocamento hipsocrômico (ou seja, tem-se um fotocromismo negativo) <sup>66,72</sup>.

A acidez do meio também causa influência no máximo de absorção da banda de merocianina. Esta característica é denominada de acidocromismo. No caso de moléculas BIPS, ela é decorrente da protonação da forma merocianina, que passa de um híbrido zwitteriônico/quinoidal para uma espécie catiônica. Esta espécie é protonada no oxigênio que fica negativamente carregado após clivagem da ligação C<sub>espiro</sub>-O. A banda de absorção desta espécie ocorre na faixa do verde-amarelo<sup>73</sup>. Devido ao acidocromismo, esta classe de moléculas pode servir como sensor de pH em diversas circunstâncias<sup>65,74</sup>. Embora a natureza ácida da merocianina protonada provenha da porção 2-hidroxi-4-nitrofenil, seu pKa (aproximadamente igual a 2,25) é muito menor em comparação com a molécula que possui a porção 4-nitrofenil original (pKa = 7,15). O baixo valor de pKa é influenciado pelo efeito retirador de elétrons do grupo nitro na posição *para* em relação à hidroxila fenólica nos compostos 6'-nitro-BIPS<sup>75</sup>.

No caso do interior de cubossomas, esperava-se identificar a polaridade nos microdomínios através de deslocamentos nos máximos de absorção da banda de merocianina. O máximo desta banda de absorção deveria ser impactado pela presença de polímero (tanto pelas mudanças de polaridade impostas por ele quanto pela eventual mudança na acidez causada por suas carboxilas) e pelo teor de etanol (neste caso, no contexto da investigação do mecanismo de formação dos cubossomas). Para garantir a intercalação do sensor nas bicamadas de fitantriol, optou-se pela ligação de uma cauda alifática. Esta cauda foi inserida covalentemente na posição 5. Apesar de ser uma posição importante quanto à barreira de energia de interconversão entre as espécies aberta e fechada, julgou-se que a cauda em 5 causaria menor impacto na intercalação da molécula com as cadeias de fitantriol. Por estar na posição 5, a cadeia necessariamente promoveria a intercalação da cabeça 6'-nitro-BIPS alinhada paralelamente às monocamadas de fitantriol. Uma cadeia diretamente ligada ao nitrogênio (como seria o mais simples em termos sintéticos) resultaria em uma intercalação com a cabeça 6'-nitro-BIPS perpendicular às monocamadas de fitantriol, reduzindo muito a chance de sucesso da sua incorporação nos cubossomas. A substituição de hidrogênio por grupo metóxi na posição 8' foi devido à conveniência do ponto de vista sintético, bem como por incrementar a estabilização da forma aberta, como previamente relatado<sup>76</sup>. O derivado 6'-nitro-BIPS sintetizado e empregado como sensor neste estudo foi denominado de C<sub>10</sub>SP (Figura 12).



**Figura 12.** Estrutura química do derivado 6'-nitro-BIPS (na sua forma aberta merocianina) proposto como sensor de microambiente químico pra cubossomas (denominado de C<sub>10</sub>SP no presente estudo).

#### 2.4. Hipótese de trabalho

Cubossomas clássicos vêm sendo descritos na literatura desde 1996<sup>77</sup>, a partir da fragmentação de lipídios massivos que, em água, estruturam-se como fases cúbicas bicontínuas reversas (Q<sub>II</sub>). O processo de fragmentação exige fornecimento de energia mecânica considerável ao sistema, a qual tipicamente provém de alto cisalhamento com estator-rotor, homogeneização em alta pressão com equipamento apropriado ou via cavitação induzida por ultrassom<sup>78,79</sup>. Subsequentemente, surgiu na literatura a proposta de preparação de cubossomas que emprega baixa energia através do auxílio de um agente hidrótopo (ex.: etanol, acetona)<sup>33</sup>, que deve ser posteriormente removido do meio<sup>5</sup>. Fases cúbicas bicontínuas reversas nanoparticuladas apresentam uma importante porção de sua área de superfície com caráter hidrofóbico, pela maior proporção de cadeias carbônicas longas expostas ao meio externo em relação ao material massivo correspondente. Por isso, é essencial empregar-se um estabilizante capaz de revestir a superfície do cubossoma. O estabilizante atua dificultando interações interfaciais partícula-partícula em meio aquoso que, na sua ausência, resultariam rapidamente em coalescência decorrente de efeito hidrofóbico.

O estabilizante pode ser um copolímero ou um surfactante não-polimérico com uma ou mais caudas, tendo ou não carga formal em sua cabeça hidrofílica. Estabilizantes com carga formal igual a zero (ditos não-iônicos) são bastante comuns para estabilizar cubossomas devido à sua biocompatibilidade<sup>14</sup>. Nesse sentido, cubossomas de fitantriol (um lipídio resistente à hidrólise e capaz de formar fases Q<sub>II</sub> em excesso de água) estabilizados com os compostos não-iônicos poloxamer 407<sup>80-82</sup> e polissorbato 80<sup>23,83,84</sup> são bastante descritos na literatura. Sabe-se que poloxamer 407 interage fracamente com fitantriol, não alterando a sua estrutura de fase em água<sup>21,85</sup>. Por outro lado, polissorbato 80 intercala-se nas bicamadas retorcidas de fitantriol,

resultando em alteração da estrutura de fase original que seria esperada para uma mistura binária com proporção fitantriol-água equivalente <sup>85</sup>. Portanto, o grau de afinidade destes dois estabilizantes com fitantriol é claramente diferente. Esta diferença poderia atuar como força-motriz na incorporação de um polímero apenas na superfície ou no interior da estrutura do cubossoma de fitantriol. A incorporação de um polímero em diferentes microdomínios nos cubossomas poderia resultar em propriedades emergentes reguláveis do sistema, como já discutido anteriormente. Cabe ressaltar que estes mesmos dois estabilizantes (poloxamer 407 e polissorbato 80) são amplamente empregados na preparação de nanopartículas poliméricas <sup>86-89</sup>, demonstrando sua capacidade de interagir também com polímeros, e não apenas com lipídios. Inclusive, nanopartículas poliméricas podem ser preparadas utilizando-se a mesma estratégia *bottom-up* que se vale do uso de um hidrótopo, tal qual é feito na preparação de cubossomas. Isto é muito conveniente, pois abre a possibilidade de estruturação de um sistema híbrido polímero-lipídio através de uma estratégia de preparação simples de se executar.

De acordo com estas premissas, levantaram-se as hipóteses: i) de que seria possível obter sistemas híbridos nanoparticulados do tipo polímero-lipídio com regiões ricas em um tipo de componente ou outro (nano-segregação), de forma controlada, empregando-se uma estratégia de preparação *bottom-up*; ii) a nano-segregação e, portanto, a morfologia destes sistemas seria uma consequência das forças de coesão e adesão entre o lipídio, o estabilizante empregado, o polímero e o hidrótopo; e iii) as diferenças de solubilidade de cada componente no meio solvente durante a fase de remoção do hidrótopo determinariam a ordem de nanoprecipitação de cada um, influenciando na estruturação final da partícula. O polímero escolhido para compor estes sistemas foi o PLipA, pela facilidade de sua obtenção por via térmica sem geração de resíduos, por sua razoável solubilidade no hidrótopo, por sua potencial responsividade ao ambiente decorrente de ligações covalentes dinâmicas que unem seus monômeros e, por fim, pelo potencial do sistema de forma global na terapia antiviral, visando aplicação futura na área biomédica. Um sensor de microambiente químico derivado de 6'-nitro-BIPS foi proposto como ferramenta para auxiliar na investigação das hipóteses (ii) e (iii), cujas bases para sua escolha foram descritas acima nesta Revisão da Literatura.



## Referências

- (1) Grillo, I. Small-Angle Neutron Scattering Study of a World-Wide Known Emulsion: Le Pastic. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *225* (1–3), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00331-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00331-5).
- (2) Vitale, S. A.; Katz, J. L. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid-Liquid Nucleation: “The Ouzo Effect.” *Langmuir* **2003**, *19* (10), 4105–4110. <https://doi.org/10.1021/la026842o>.
- (3) Ganachaud, F.; Katz, J. L. Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (2), 209–216. <https://doi.org/10.1002/cphc.200400527>.
- (4) Zhao, C.; Melis, S.; Hughes, E. P.; Li, T.; Zhang, X.; Olmsted, P. D.; Van Keuren, E. Particle Formation Mechanisms in the Nanoprecipitation of Polystyrene. *Langmuir* **2020**, *36* (44), 13210–13217. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02071>.
- (5) Akhlaghi, S. P.; Ribeiro, I. R.; Boyd, B. J.; Loh, W. Impact of Preparation Method and Variables on the Internal Structure, Morphology, and Presence of Liposomes in Phytantriol-Pluronic® F127 Cubosomes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *145*, 845–853. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.091>.
- (6) Chountoulesi, M.; Pippa, N.; Pispas, S.; Chrysina, E. D.; Forys, A.; Trzebicka, B.; Demetzos, C. Cubic Lyotropic Liquid Crystals as Drug Delivery Carriers: Physicochemical and Morphological Studies. *Int. J. Pharm.* **2018**, *550* (1–2), 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.003>.
- (7) Sitnikova, N. L.; Sprik, R.; Wegdam, G.; Eiser, E. Spontaneously Formed Trans - Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir* **2005**, *21* (16), 7083–7089. <https://doi.org/10.1021/la046816l>.
- (8) Barriga, H. M. G.; Holme, M. N.; Stevens, M. M. Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles? *Angew. Chemie Int. Ed.* **2019**, *58* (10), 2958–2978. <https://doi.org/10.1002/anie.201804067>.

- (9) Abourehab, M. A. S.; Ansari, M. J.; Singh, A.; Hassan, A.; Abdelgawad, M. A.; Shrivastav, P.; Abualsoud, B. M.; Amaral, L. S.; Pramanik, S. Cubosomes as an Emerging Platform for Drug Delivery: A Review of the State of the Art. *J. Mater. Chem. B* **2022**, *10* (15), 2781–2819. <https://doi.org/10.1039/D2TB00031H>.
- (10) Kumar, M.; Patil, N. G.; Choudhury, C. K.; Roy, S.; Ambade, A. V.; Kumaraswamy, G. Compact Polar Moieties Induce Lipid-Water Systems to Form Discontinuous Reverse Micellar Phase. *Soft Matter* **2015**, *11* (27), 5417–5424. <https://doi.org/10.1039/c5sm00854a>.
- (11) Ha, S.; La, Y.; Kim, K. T. Polymer Cubosomes: Infinite Cubic Mazes and Possibilities. *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53* (3), 620–631. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00563>.
- (12) Poletto, F. .; Kobelinski, D. R. B. .; Zimmermann, G. W. ; Eberhardt, M. J. .; Bernardi, F. Cubossoma, Seu Processo de Obtenção e Seus Usos., 2020.
- (13) van ‘t Hag, L.; Gras, S. L.; Conn, C. E.; Drummond, C. J. Lyotropic Liquid Crystal Engineering Moving beyond Binary Compositional Space – Ordered Nanostructured Amphiphile Self-Assembly Materials by Design. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (10), 2705–2731. <https://doi.org/10.1039/C6CS00663A>.
- (14) Zhai, J.; Fong, C.; Tran, N.; Drummond, C. J. Non-Lamellar Lyotropic Liquid Crystalline. *ACS Nano* **2019**, *13* (6), 6178–6206. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07961>.
- (15) Mezzenga, R.; Seddon, J. M.; Drummond, C. J.; Boyd, B. J.; Schröder-Turk, G. E.; Sagalowicz, L. Nature-Inspired Design and Application of Lipidic Lyotropic Liquid Crystals. *Adv. Mater.* **2019**, *31* (35), 1–19. <https://doi.org/10.1002/adma.201900818>.
- (16) Huang, Y.; Gui, S. Factors Affecting the Structure of Lyotropic Liquid Crystals and the Correlation between Structure and Drug Diffusion. *RSC Adv.* **2018**, *8* (13), 6978–6987. <https://doi.org/10.1039/c7ra12008g>.
- (17) Fong, C.; Le, T.; Drummond, C. J. Lyotropic Liquid Crystal Engineering– Ordered Nanostructured Small Molecule Amphiphile Self-Assembly Materials by Design. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (3), 1297–1322.

<https://doi.org/10.1039/c1cs15148g>.

- (18) Salim, M.; Minamikawa, H.; Sugimura, A.; Hashim, R. Amphiphilic Designer Nano-Carriers for Controlled Release: From Drug Delivery to Diagnostics. *Medchemcomm* **2014**, *5* (11), 1602–1618. <https://doi.org/10.1039/c4md00085d>.
- (19) Glatter, O.; Kratky, O. *Small-Angle x-Ray Scattering*; Glatter, O., Kratky, O., Eds.; Academic Press: Londres, 1982.
- (20) Assenza, S.; Mezzenga, R. Curvature and Bottlenecks Control Molecular Transport in Inverse Bicontinuous Cubic Phases. *J. Chem. Phys.* **2018**, *148* (5). <https://doi.org/10.1063/1.5019224>.
- (21) Chong, J. Y. T.; Mulet, X.; Boyd, B. J.; Drummond, C. J. Steric Stabilizers for Cubic Phase Lyotropic Liquid Crystal Nanodispersions (Cubosomes). In *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*; Elsevier Inc., 2015; Vol. 21, pp 131–187. <https://doi.org/10.1016/bs.adplan.2014.11.001>.
- (22) Garg, G.; Saraf, S.; Saraf, S. Cubosomes: An Overview. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30* (2), 350–353. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.350>.
- (23) Azhari, H.; Strauss, M.; Hook, S.; Boyd, B. J.; Rizwan, S. B. Stabilising Cubosomes with Tween 80 as a Step towards Targeting Lipid Nanocarriers to the Blood-Brain Barrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *104*, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.05.001>.
- (24) Chong, J. Y. T.; Mulet, X.; Waddington, L. J.; Boyd, B. J.; Drummond, C. J. Steric Stabilisation of Self-Assembled Cubic Lyotropic Liquid Crystalline Nanoparticles: High Throughput Evaluation of Triblock Polyethylene Oxide-Polypropylene Oxide-Polyethylene Oxide Copolymers. *Soft Matter* **2011**, *7* (10), 4768. <https://doi.org/10.1039/c1sm05181d>.
- (25) Ribeiro, I. R.; Immich, M. F.; Lundberg, D.; Poletto, F.; Loh, W. Physiological Neutral PH Drives a Gradual Lamellar-to-Reverse Cubic-to-Reverse Hexagonal Phase Transition in Phytantriol-Based Nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2019**, *177* (October 2018), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.055>.
- (26) Yaghmur, A.; Rappolt, M.; Oøstergaard, J.; Larsen, C.; Larsen, S. W. Characterization of Bupivacaine-Loaded Formulations Based on Liquid

- Crystalline Phases and Microemulsions: The Effect of Lipid Composition. *Langmuir* **2012**, *28* (5), 2881–2889. <https://doi.org/10.1021/la203577v>.
- (27) Nazaruk, E.; Górecka, E.; Osornio, Y. M.; Landau, E. M.; Bilewicz, R. Charged Additives Modify Drug Release Rates from Lipidic Cubic Phase Carriers by Modulating Electrostatic Interactions. *J. Electroanal. Chem.* **2018**, *819* (November 2017), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.10.057>.
- (28) Balestri, A.; Lonetti, B.; Harrisson, S.; Farias-Mancilla, B.; Zhang, J.; Amenitsch, H.; Schubert, U. S.; Guerrero-Sanchez, C.; Montis, C.; Berti, D. Thermo-Responsive Lipophilic NIPAM-Based Block Copolymers as Stabilizers for Lipid-Based Cubic Nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2022**, *220* (June), 112884. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112884>.
- (29) Jones, B. E.; Kelly, E. A.; Cowieson, N.; Divitini, G.; Evans, R. C. Light-Responsive Molecular Release from Cubosomes Using Swell-Squeeze Lattice Control. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (42), 19532–19541. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c08583>.
- (30) Chountoulesi, M.; Pippa, N.; Chrysostomou, V.; Pispas, S.; Chrysinia, E. D.; Forsys, A.; Otulakowski, L.; Trzebicka, B.; Demetzos, C. Stimuli-Responsive Lyotropic Liquid Crystalline Nanosystems with Incorporated Poly(2-Dimethylamino Ethyl Methacrylate)-b-Poly(Lauryl Methacrylate) Amphiphilic Block Copolymer. *Polymers (Basel)*. **2019**, *11* (9). <https://doi.org/10.3390/polym11091400>.
- (31) Seo, H. J.; Kim, J. C. Controlled Release from Monoolein Cubic Phase by Complexation between Acidic Proteinoid and Basic Proteinoid. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2012**, *33* (4), 605–610. <https://doi.org/10.1080/02726351.2011.574891>.
- (32) Leal, C.; Bouxsein, N. F.; Ewert, K. K.; Safinya, C. R. Highly Efficient Gene Silencing Activity of SiRNA Embedded in a Nanostructured Gyroid Cubic Lipid Matrix. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (47), 16841–16847. <https://doi.org/10.1021/ja1059763>.
- (33) Spicer, P. T.; Hayden, K. L.; Lynch, M. L.; Ofori-Boateng, A.; Burns, J. L. Novel Process for Producing Cubic Liquid Crystalline Nanoparticles (Cubosomes). *Langmuir* **2001**, *17* (19), 5748–5756. <https://doi.org/10.1021/la010161w>.

- (34) Sitnikova, N. L.; Sprik, R.; Wegdam, G.; Eiser, E. Spontaneously Formed Trans-Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir* **2005**, *21* (16), 7083–7089. <https://doi.org/10.1021/la046816l>.
- (35) Poletto, F. S.; Lima, F. S.; Lundberg, D.; Nylander, T.; Loh, W. Tailoring the Internal Structure of Liquid Crystalline Nanoparticles Responsive to Fungal Lipases: A Potential Platform for Sustained Drug Release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *147*, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.003>.
- (36) Lotierzo, M. C. G.; Casadei, B. R.; de Castro, R. D.; Malheiros, B.; Barbosa, L. R. S. Cubic-to-Inverted Micellar and the Cubic-to-Hexagonal-to-Micellar Transitions on Phytantriol-Based Cubosomes Induced by Solvents. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10* (6), 1571–1583. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00828-y>.
- (37) Pimenta, B. V.; Madrid, R. R. M.; Mathews, P. D.; Riske, K. A.; Loh, W.; Angelov, B.; Angelova, A.; Mertins, O. Interaction of Polyelectrolyte-Shell Cubosomes with Serum Albumin for Triggering Drug Release in Gastrointestinal Cancer. *J. Mater. Chem. B* **2023**, *11* (11), 2490–2503. <https://doi.org/10.1039/D2TB02670H>.
- (38) Wei, Y.; Zhang, J.; Zheng, Y.; Gong, Y.; Fu, M.; Liu, C.; Xu, L.; Sun, C. C.; Gao, Y.; Qian, S. Cubosomes with Surface Cross-Linked Chitosan Exhibit Sustained Release and Bioavailability Enhancement for Vinpocetine. *RSC Adv.* **2019**, *9* (11), 6287–6298. <https://doi.org/10.1039/c8ra10302j>.
- (39) Li, J.; Nowak, P.; Otto, S. Dynamic Combinatorial Libraries: From Exploring Molecular Recognition to Systems Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (25), 9222–9239. <https://doi.org/10.1021/ja402586c>.
- (40) Cougnon, F. B. L.; Sanders, J. K. M. Evolution of Dynamic Combinatorial Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (12), 2211–2221. <https://doi.org/10.1021/ar200240m>.
- (41) Lehn, J.-M. Constitutional Dynamic Chemistry: Bridge from Supramolecular Chemistry to Adaptive Chemistry. In *Topics in current chemistry*; 2011; Vol. 312, pp 1–32. [https://doi.org/10.1007/128\\_2011\\_256](https://doi.org/10.1007/128_2011_256).

- (42) Chakma, P.; Konkolewicz, D. Dynamic Covalent Bonds in Polymeric Materials. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2019**, *58* (29), 9682–9695. <https://doi.org/10.1021/cr020452p>.
- (43) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (9), 3652–3711. <https://doi.org/10.1021/cr020452p>.
- (44) Black, S. P.; Sanders, J. K. M.; Stefankiewicz, A. R. Disulfide Exchange: Exposing Supramolecular Reactivity through Dynamic Covalent Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (6), 1861–1872. <https://doi.org/10.1039/C3CS60326A>.
- (45) Friedman, M.; Cavins, J. F.; Wall, J. S. Relative Nucleophilic Reactivities of Amino Groups and Mercaptide Ions in Addition Reactions with  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Compounds<sup>1,2</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (16), 3672–3682. <https://doi.org/10.1021/ja01094a025>.
- (46) Zhang, X.; Han, L.; Liu, M.; Wang, K.; Tao, L.; Wan, Q.; Wei, Y. Recent Progress and Advances in Redox-Responsive Polymers as Controlled Delivery Nanoplatfoms. *Mater. Chem. Front.* **2017**, *1* (5), 807–822. <https://doi.org/10.1039/C6QM00135A>.
- (47) Checconi, P.; De Angelis, M.; Marcocci, M. E.; Fraternali, A.; Magnani, M.; Palamara, A. T.; Nencioni, L. Redox-Modulating Agents in the Treatment of Viral Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (11), 4084. <https://doi.org/10.3390/ijms21114084>.
- (48) Amamoto, Y.; Otsuka, H.; Takahara, A.; Matyjaszewski, K. Self-Healing of Covalently Cross-Linked Polymers by Reshuffling Thiuram Disulfide Moieties in Air under Visible Light. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (29), 3975–3980. <https://doi.org/10.1002/adma.201201928>.
- (49) Gupta, D.; Knight, A. R. Reactions of Thiyl Radicals. XIII. Photochemically Induced Exchange Reactions of Liquid Alkyl Disulfides. *Can. J. Chem.* **1980**, *58* (13), 1350–1354. <https://doi.org/10.1139/v80-212>.
- (50) Zhou, K.; Enkhjargal, B.; Xie, Z.; Sun, C.; Wu, L.; Malaguit, J.; Chen, S.; Tang, J.; Zhang, J.; Zhang, J. H. Dihydrolipoic Acid Inhibits Lysosomal Rupture and NLRP3 Through Lysosome-Associated Membrane Protein-

- 1/Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II/TAK1 Pathways After Subarachnoid Hemorrhage in Rat. *Stroke* **2018**, *49* (1), 175–183. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018593>.
- (51) Castellani, C.; Radu, C. M.; Morillas-Becerril, L.; Barison, I.; Menato, F.; Do Nascimento, T. M.; Fedrigo, M.; Giarraputo, A.; Virzi, G. M.; Simioni, P.; Basso, C.; Papini, E.; Tavano, R.; Mancin, F.; Vescovo, G.; Angelini, A. Poly(Lipoic Acid)-Based Nanoparticles as a New Therapeutic Tool for Delivering Active Molecules. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2022**, *45*. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102593>.
- (52) Banik, S.; Yamada, K.; Sato, H.; Onoue, S. Development of Poly(Lipoic Acid) Nanoparticles with Improved Oral Bioavailability and Hepatoprotective Effects of Quercetin. *Mol. Pharm.* **2022**, *19* (5), 1468–1476. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00009>.
- (53) Rosenthal-Kim, E. Q. Green Polymer Chemistry: Synthesis of Poly(Disulfide) Polymers and Networks, University of Akron, 2013.
- (54) Kisanuki, A.; Kimpara, Y.; Oikado, Y.; Kado, N.; Matsumoto, M.; Endo, K. Ring-Opening Polymerization of Lipoic Acid and Characterization of the Polymer. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2010**, *48* (22), 5247–5253. <https://doi.org/10.1002/pola.24325>.
- (55) Ferreira Soares, D. C.; Domingues, S. C.; Viana, D. B.; Tebaldi, M. L. Polymer-Hybrid Nanoparticles: Current Advances in Biomedical Applications. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131* (August), 110695. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110695>.
- (56) Judeinstein, P.; Sanchez, C. Hybrid Organic–Inorganic Materials: A Land of Multidisciplinarity. *J. Mater. Chem.* **1996**, *6* (4), 511–525. <https://doi.org/10.1039/JM9960600511>.
- (57) Soares, D. C. F.; Poletto, F.; Eberhardt, M. J.; Domingues, S. C.; De Sousa, F. B.; Tebaldi, M. L. Polymer-Hybrid Nanosystems for Antiviral Applications: Current Advances. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *146* (August 2021), 112249. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112249>.
- (58) Guglielmetti, R.  $4n+2$  Systems: Spiropyrans. In *Photochromism*; Elsevier, 2003;

pp 314–466. <https://doi.org/10.1016/B978-044451322-9/50012-9>.

- (59) Zerbetto, F.; Monti, S.; Orlandi, G. Thermal and Photochemical Interconversion of Spiropyrans and Merocyanines. A Semi-Empirical All-Valence-Electron Study. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **1984**, *80* (12), 1513–1527. <https://doi.org/10.1039/F29848001513>.
- (60) Sheng, Y.; Leszczynski, J.; Garcia, A. A.; Rosario, R.; Gust, D.; Springer, J. Comprehensive Theoretical Study of the Conversion Reactions of Spiropyrans: Substituent and Solvent Effects. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (41), 16233–16243. <https://doi.org/10.1021/jp0488867>.
- (61) Kortekaas, L.; Browne, W. R. The Evolution of Spiropyran: Fundamentals and Progress of an Extraordinarily Versatile Photochrome. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (12), 3406–3424. <https://doi.org/10.1039/c9cs00203k>.
- (62) Klajn, R. Spiropyran-Based Dynamic Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (1), 148–184. <https://doi.org/10.1039/c3cs60181a>.
- (63) Bletz, M.; Pfeifer-Fukumura, U.; Kolb, U.; Baumann, W. Ground-and First-Excited-Singlet-State Electric Dipole Moments of Some Photochromic Spirobenzopyrans in Their Spiropyran and Merocyanine Form. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106* (10), 2232–2236. <https://doi.org/10.1021/jp012562q>.
- (64) Görner, H. Photochromism of Nitrospiropyrans: Effects of Structure, Solvent and Temperature. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3* (3), 416–423. <https://doi.org/10.1039/b007708i>.
- (65) Keyvan Rad, J.; Balzade, Z.; Mahdavian, A. R. Spiropyran-Based Advanced Photoswitchable Materials: A Fascinating Pathway to the Future Stimuli-Responsive Devices. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2022**, *51* (October 2021), 100487. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2022.100487>.
- (66) Kozlenko, A. S.; Ozhogin, I. V.; Pugachev, A. D.; Lukyanova, M. B.; El-Sewify, I. M.; Lukyanov, B. S. A Modern Look at Spiropyrans: From Single Molecules to Smart Materials. *Top. Curr. Chem.* **2023**, *381* (1), 8. <https://doi.org/10.1007/s41061-022-00417-2>.
- (67) Wang, P.-X.; Bai, F.-Q.; Zhang, Z.-X.; Wang, Y.-P.; Wang, J.; Zhang, H.-X. The Theoretical Study of Substituent and Charge Effects in the Conformational



- Transformation Process of Molecular Machine Unit Spiropyran. *Org. Electron.* **2017**, *45*, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.orgel.2017.02.031>.
- (68) Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 2nd ed.; Weinheim, 1988. <https://doi.org/10.1002/9783527632220>.
- (69) Tian, W.; Tian, J. An Insight into the Solvent Effect on Photo-, Solvato-Chromism of Spiropyran through the Perspective of Intermolecular Interactions. *Dye. Pigment.* **2014**, *105*, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2014.01.020>.
- (70) Piard, J. Influence of the Solvent on the Thermal Back Reaction of One Spiropyran. *J. Chem. Educ.* **2014**, *91* (12), 2105–2111. <https://doi.org/10.1021/ed4005003>.
- (71) Yusong, W.; Sasaki, T.; Kazushi, K.; Seo, T.; Sakurai, K. Interactions between Spiropyran and Room-Temperature Ionic Liquids: Photochromism and Solvatochromism. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (25), 7530–7536. <https://doi.org/10.1021/jp800957c>.
- (72) Swansburg, S.; Buncl, E.; Lemieux, R. P. Thermal Racemization of Substituted Indolinobenzospiropyrans: Evidence of Competing Polar and Nonpolar Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (28), 6594–6600. <https://doi.org/10.1021/ja0001613>.
- (73) Keum, S.-R.; Lee, K.-B.; Kazmaier, P. M.; Buncl, E. A Novel Method for Measurement of the Merocyanine-Spiropyran Interconversion in Non-Activated 1, 3, 3-Trimethylspiro- (2H-1-Benzopyran-2, 2'-Indoline) Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* (7), 1015–1018. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79953-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79953-9).
- (74) Wojtyk, J. T. C.; Wasey, A.; Xiao, N. N.; Kazmaier, P. M.; Hoz, S.; Yu, C.; Lemieux, R. P.; Buncl, E. Elucidating the Mechanisms of Acidochromic Spiropyran-Merocyanine Interconversion. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111* (13), 2511–2516. <https://doi.org/10.1021/jp068575r>.
- (75) García, A. A.; Cherian, S.; Park, J.; Gust, D.; Jahnke, F.; Rosario, R. Photon-Controlled Phase Partitioning of Spiropyran. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104* (26), 6103–6107. <https://doi.org/10.1021/jp0003757>.
- (76) Brügnier, O.; Reichenbach, T.; Sommer, M.; Walter, M. Substituent Correlations

- Characterized by Hammett Constants in the Spiropyran-Merocyanine Transition. *J. Phys. Chem. A* **2017**, *121* (13), 2683–2687. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b01248>.
- (77) Landh, T.; Larsson, K. Particles, Method of Preparing Said Particles and Uses Thereof., 1996.
- (78) Gustafsson, J.; Ljusberg-Wahren, H.; Almgren, M.; Larsson, K. Cubic Lipid–Water Phase Dispersed into Submicron Particles. *Langmuir* **1996**, *12* (20), 4611–4613. <https://doi.org/10.1021/la960318y>.
- (79) Kim, H.; Leal, C. Cuboplexes: Topologically Active siRNA Delivery. *ACS Nano* **2015**, *9* (10), 10214–10226. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b03902>.
- (80) Rattanapak, T.; Birchall, J.; Young, K.; Ishii, M.; Meglinski, I.; Rades, T.; Hook, S. Transcutaneous Immunization Using Microneedles and Cubosomes: Mechanistic Investigations Using Optical Coherence Tomography and Two-Photon Microscopy. *J. Control. Release* **2013**, *172* (3), 894–903. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.08.018>.
- (81) Rizwan, S. B.; McBurney, W. T.; Young, K.; Hanley, T.; Boyd, B. J.; Rades, T.; Hook, S. Cubosomes Containing the Adjuvants Imiquimod and Monophosphoryl Lipid A Stimulate Robust Cellular and Humoral Immune Responses. *J. Control. Release* **2013**, *165* (1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.10.020>.
- (82) Liu, Z.; Luo, L.; Zheng, S.; Niu, Y.; Bo, R.; Huang, Y.; Xing, J.; Li, Z.; Wang, D. Cubosome Nanoparticles Potentiate Immune Properties of Immunostimulants. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 3571–3583. <https://doi.org/10.2147/IJN.S110406>.
- (83) Wu, H.; Li, J.; Zhang, Q.; Yan, X.; Guo, L.; Gao, X.; Qiu, M.; Jiang, X.; Lai, R.; Chen, H. A Novel Small Odorranalectin-Bearing Cubosomes: Preparation, Brain Delivery and Pharmacodynamic Study on Amyloid- $\beta$  25-35-Treated Rats Following Intranasal Administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80* (2), 368–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.10.012>.
- (84) Younus, M.; Prentice, R. N.; Clarkson, A. N.; Boyd, B. J.; Rizwan, S. B. Incorporation of an Endogenous Neuromodulatory Lipid, Oleoylethanolamide, into Cubosomes: Nanostructural Characterization. *Langmuir* **2016**, *32* (35), 8942–8950. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b02395>.

- (85) Younus, M.; Hawley, A.; Boyd, B. J.; Rizwan, S. B. Bulk and Dispersed Aqueous Behaviour of an Endogenous Lipid, Selachyl Alcohol: Effect of Tween 80 and Pluronic F127 on Nanostructure. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *169*, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.013>.
- (86) Zhang, Z.; Feng, S. S. In Vitro Investigation on Poly(Lactide)-Tween 80 Copolymer Nanoparticles Fabricated by Dialysis Method for Chemotherapy. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (4), 1139–1146. <https://doi.org/10.1021/bm050953v>.
- (87) Ma, Y.; Zheng, Y.; Zeng, X.; Jiang, L.; Chen, H.; Liu, R.; Huang, L.; Mei, L. Novel Docetaxel-Loaded Nanoparticles Based on PCL-Tween 80 Copolymer for Cancer Treatment. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 2679–2688.
- (88) Ge, Y.-S.; Tai, S.-X.; Xu, Z.-Q.; Lai, L.; Tian, F.-F.; Li, D.-W.; Jiang, F.-L.; Liu, Y.; Gao, Z.-N. Synthesis of Three Novel Anionic Gemini Surfactants and Comparative Studies of Their Assemble Behavior in the Presence of Bovine Serum Albumin. *Langmuir* **2012**, *28* (14), 5913–5920. <https://doi.org/10.1021/la204212s>.
- (89) Cortés, H.; Hernández-Parra, H.; Bernal-Chávez, S. A.; Del Prado-Audelo, M. L.; Caballero-Florán, I. H.; Borbolla-Jiménez, F. V.; González-Torres, M.; Magaña, J. J.; Leyva-Gómez, G. Non-Ionic Surfactants for Stabilization of Polymeric Nanoparticles for Biomedical Uses. *Materials (Basel)*. **2021**, *14* (12). <https://doi.org/10.3390/ma14123197>.
- (90) Armarego, W. L. F. .; Chai, C. *Purification of Laboratory Chemicals*; Science, E., Ed.; Países Baixo, 2013.
- (91) Wang, X.; Chen, Y.-F.; Yan, W.; Cao, L.-L.; Ye, Y.-H. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Phenylhydrazone Derivatives as Antifungal Agents against Phytopathogenic Fungi. *Molecules* **2016**, *21* (11), 1574. <https://doi.org/10.3390/molecules21111574>.
- (92) Wu, L.; Li, X.; Huang, C.; Jia, N. Dual-Modal Colorimetric/Fluorescence Molecular Probe for Ratiometric Sensing of PH and Its Application. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (16), 8332–8338. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02398>.
- (93) Demeter, O.; Kormos, A.; Koehler, C.; Mező, G.; Németh, K.; Kozma, E.; Takács, L. B.; Lemke, E. A.; Kele, P. Bisazide Cyanine Dyes as Fluorogenic

- Probes for Bis-Cyclooctynylated Peptide Tags and as Fluorogenic Cross-Linkers of Cyclooctynylated Proteins. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (5), 1552–1559. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00178>.
- (94) Kaberov, L. I.; Verbraeken, B.; Riabtseva, A.; Brus, J.; Radulescu, A.; Talmon, Y.; Stepanek, P.; Hoogenboom, R.; Filippov, S. K. Fluorophilic–Lipophilic–Hydrophilic Poly(2-Oxazoline) Block Copolymers as MRI Contrast Agents: From Synthesis to Self-Assembly. *Macromolecules* **2018**, *51* (15), 6047–6056. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.8b00957>.
- (95) Barman, S.; Das, J.; Biswas, S.; Maiti, T. K.; Pradeep Singh, N. D. A Spiropyran–Coumarin Platform: An Environment Sensitive Photoresponsive Drug Delivery System for Efficient Cancer Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (21), 3940–3944. <https://doi.org/10.1039/C7TB00379J>.
- (96) Darwish, N.; Aragonès, A. C.; Darwish, T.; Ciampi, S.; Díez-Pérez, I. Multi-Responsive Photo- and Chemo-Electrical Single-Molecule Switches. *Nano Lett.* **2014**, *14* (12), 7064–7070. <https://doi.org/10.1021/nl5034599>.
- (97) Breslin, V. M.; Garcia-Garibay, M. A. Transmission Spectroscopy and Kinetics in Crystalline Solids Using Aqueous Nanocrystalline Suspensions: The Spiropyran-Merocyanine Photochromic System. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17* (2), 637–642. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b01476>.
- (98) Barauskas, J.; Landh, T. Phase Behavior of the Phytantriol / Water System. **2003**, No. 17, 9562–9565. <https://doi.org/10.1021/la0350812>.
- (99) Rakotoarisoa, M.; Angelov, B.; Espinoza, S.; Khakurel, K.; Bizien, T.; Angelova, A. Cubic Liquid Crystalline Nanostructures Involving Catalase and Curcumin: BioSAXS Study and Catalase Peroxidatic Function after Cubosomal Nanoparticle Treatment of Differentiated SH-SY5Y Cells. *Molecules* **2019**, *24* (17), 3058. <https://doi.org/10.3390/molecules24173058>.
- (100) Chen, H.; Fan, Y.; Zhang, N.; Trépout, S.; Ptissam, B.; Brûlet, A.; Tang, B. Z.; Li, M. H. Fluorescent Polymer Cubosomes and Hexosomes with Aggregation-Induced Emission. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (15), 5495–5504. <https://doi.org/10.1039/d1sc00270h>.
- (101) Corbett, J. C.; McNeil-Watson, F. Electrophoretic Light Scattering. *Encycl.*

- Biophys.* **2018**, 1–10. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-35943-9\\_288-1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-35943-9_288-1).
- (102) Wang, Z. Fischer Phenylhydrazine Synthesis. *Compr. Org. Name React. Reagents* **2010**, 1875–1877. <https://doi.org/10.1002/9780470638859.conrr235>.
- (103) Maas, G. Benzenediazonium Chloride. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2001; pp 1–4. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rb007>.
- (104) Greeves, N. .; Warren, S. .; Clayden, J. *Organic Chemistry*; Oxford, 2012.
- (105) Fischer, E.; Jourdan, F. Ueber Die Hydrazine Der Brenztraubensäure. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1883**, 16 (2), 2241–2245. <https://doi.org/10.1002/cber.188301602141>.
- (106) Robinson, B. Studies on the Fischer Indole Synthesis. *Chem. Rev.* **1969**, 69 (2), 227–250. <https://doi.org/10.1021/cr60258a004>.
- (107) Miller, F. M.; Schinske, W. N. Direction of Cyclization in the Fischer Indole Synthesis. Mechanistic Considerations. *J. Org. Chem.* **1978**, 43 (17), 3384–3388. <https://doi.org/10.1021/jo00411a026>.
- (108) Allen, C. F. H.; Wilson, C. V. The Use of N 15 as a Tracer Element in Chemical Reactions. The Mechanism of the Fischer Indole Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1943**, 65 (4), 611–612. <https://doi.org/10.1021/ja01244a033>.
- (109) Sajjadifar, S.; Vahedi, H.; Massoudi, A.; Louie, O. New 3H-Indole Synthesis by Fischer's Method. Part I. *Molecules* **2010**, 15 (4), 2491–2498. <https://doi.org/10.3390/molecules15042491>.
- (110) Orlandi, M.; Brenna, D.; Harms, R.; Jost, S.; Benaglia, M. Recent Developments in the Reduction of Aromatic and Aliphatic Nitro Compounds to Amines. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, 22 (4), 430–445. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00205>.
- (111) Keum, S. R.; Ku, B. S.; Lee, M. H.; Chi, G. Y.; Lim, S. S. Deuterated Dicondensed Indolinobenzospiropyran Formed from the Reaction of Fischer Base-D2 and Salicylaldehyde: Mechanism Involving a Carbinol Intermediate. *Dye. Pigment.* **2009**, 80 (1), 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2008.04.004>.
- (112) Delgado-Macuil, R.; Rojas-López, M.; Gayou, V. L.; Orduña-Díaz, A.; Díaz-

- Reyes, J. ATR Spectroscopy Applied to Photochromic Polymer Analysis. *Mater. Charact.* **2007**, *58* (8-9 SPEC. ISS.), 771–775. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2006.12.003>.
- (113) McCoy, C. P.; Donnelly, L.; Jones, D. S.; Gorman, S. P. Synthesis and Characterisation of Polymerisable Photochromic Spiroyrans: Towards Photomechanical Biomaterials. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (4), 657–661. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.11.110>.
- (114) Raitman, O. A.; Raitman, E. V.; Zaichenko, N. L.; Lyubimova, G. V.; Scherbina, A. A.; Lyubimov, A. V. Controlling the Aggregation of Amphiphilic Spiroyrans in Langmuir Monolayers. *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* **2021**, *85* (8), 868–872. <https://doi.org/10.3103/S1062873821080232>.
- (115) Eckhardt, H.; Bose, A.; Krongauz, V. A. Formation of Molecular H- and J-Stacks by the Spiropyran-Merocyanine Transformation in a Polymer Matrix. *Polymer (Guildf)*. **1987**, *28* (11), 1959–1964. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(87\)90306-5](https://doi.org/10.1016/0032-3861(87)90306-5).
- (116) Knott, E. B. 673. The Colour of Organic Compounds. Part V. Thermochromic Spirans. *J. Chem. Soc.* **1951**, No. c, 3038. <https://doi.org/10.1039/jr9510003038>.
- (117) J.H. Hildebrand. *The Solubility of Non-Electrolytes*, second ed.; Reinhold Publishing: London, UK., 1936.
- (118) Hansen, C. *The Three Dimensional Solubility Parameter and Solvent Diffusion Coefficient and Their Importance in Surface Coating Formulation*. Copenhagen: Danish Technical Press; Danish Technical Press: Copenhagen, Denmark, 1976.
- (119) Hansen, C. M. *Hansen Solubility Parameters*; CRC Press, 2007. <https://doi.org/10.1201/9781420006834>.
- (120) Miller, C. C. The Stokes-Einstein Law for Diffusion in Solution. *Proc. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. Phys. Character* **1924**, *106* (740), 724–749. <https://doi.org/10.1098/rspa.1924.0100>.