

Ana Rita Paralta Samarra

Preparação de lipopolímeros por modificação química de fosfolípidos para estabilização de formulações lipossómicas

Projeto de Tese na área científica de Engenharia Química, orientada pelo Doutor Pedro Nuno Neves Lopes Simões e Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Rita Paralta Samarra

Preparação de lipopolímeros por modificação química de fosfolípidos para estabilização de formulações lipossómicas

Projeto de Tese na área científica de Engenharia Química, orientada pelo Doutor Pedro Nuno Neves Lopes Simões e Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Supervisores:

Dr. Pedro Nuno Neves Lopes Simões

Dr. Patrícia de Jesus Pinto Alves

Instituições:

Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Coimbra
2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Doutor Pedro Nuno Neves Lopes Simões e Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves, por todo o apoio, incentivo, confiança, compreensão, ensinamento e disponibilidade que sempre demonstraram, para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

A todos os professores, responsáveis de laboratórios, que me disponibilizaram todos os equipamentos e recursos, para que fosse possível a realização do trabalho laboratorial.

Ao Doutor Rui Fernandes, do Instituto de Investigação e Inovação da Universidade do Porto, que me permitiu a realização da análise de TEM.

À investigadora Mónica Patrícia Gaspar Simões, por toda a disponibilidade, ensinamento, confiança e incentivo que todos os dias me proporcionou no laboratório para que fosse possível a conclusão deste trabalho.

Ao meu ídolo, a minha mãe, pela força contagiante, apoio e incentivo que me proporcionou, não nestes últimos meses, mas em todos estes cinco anos, que sem ela não eram possíveis.

À minha irmã, Sara, pela cumplicidade, confiança e força e por mesmo mais nova, me ensinar tanto.

Ao Pedro, por estar comigo a cada minuto bom e mau, sempre com uma palavra de conforto, força e por nunca duvidar de mim e das minhas capacidades.

À minha família e amigos pelo incentivo, inspiração, paciência e confiança que sempre depositaram em mim.

Por fim, mas não menos importante, a todos os meus colegas de laboratório, alunos de mestrado, investigadores, alunos de doutoramento, funcionários, que me ajudaram a melhorar, acreditar e nunca desistir que fosse possível a realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu na síntese e caracterização de complexos polímero-lipossoma (CPL) para sistemas de libertação controlada, através da modificação química de fosfolípidos. O fosfolípido utilizado foi a lecitina de soja (LC) e os polímeros para a síntese dos lipopolímeros poli(etilenoglicol)bis(carboximetil)éter, COOH-PEG-COOH, e o poli(dimetilaminoetil-2-metacrilato), PDMAEMA.

A síntese dos lipopolímeros com COOH-PEG-COOH ocorreu através da reação entre o grupo amina protonado $[\text{NH}_3^+]$ do fosfolípido e o grupo carboxílico $[\text{COOH}]$ do polímero (*coupling* carbodiimidás). Esta síntese foi realizada por dois procedimentos alternativos, ambos bem sucedidos, de entre os quais se adotou o que requer menor tempo de reação.

Devido à dificuldade em sintetizar o PDMAEMA com um grupo carboxílico terminal tendo em vista a síntese posterior de lipopolímeros de base PDMAEMA, recorreu-se a outro método que consistiu na síntese de PDMAEMA com terminação colesterol (CHO-PDMAEMA), cuja natureza hidrofóbica tende a promover a sua ancoragem na formulação final (CPL de base lecitina-PEG-COOH e CHO-PDMAEMA). Este polímero modificado foi então incorporado em diferentes proporções (2,5%, 5% e 10%) em relação ao lipopolímero lecitina-PEG-COOH.

A caracterização dos CPL foi realizada em termos de tamanho, polidispersividade, potencial zeta, perfis de libertação e eficiência de encapsulação. Os resultados demonstraram que os CPL de lecitina-PEG-COOH são estáveis em condições fisiológicas ($\text{pH}=7$), com e sem a incorporação de CHO-PDMAEMA, e que, em meios com pH diferente de 7, se tornam instáveis, libertando todo o seu conteúdo (calceína).

De todas as formulações testadas, verificou-se que os melhores resultados de estabilidade ao longo do tempo e de eficiência de encapsulação foram obtidos para as formulações de lipopolímero lecitina-PEG-COOH e de lipopolímero lecitina-PEG-COOH com 5% de CHO-PDMAEMA. Verificou-se que as vesículas são estáveis e que a melhor forma de as conservar consiste em mantê-las à temperatura ambiente depois de liofilizadas.

Este trabalho mostra-se inovador face aos existentes na medida em que a ligação química do COOH-PEG-COOH aos fosfolípidos é promovida de forma mais expedita e rápida, podendo ser aplicada a diferentes polímeros com diferentes características de forma a obter sistemas de

controlo e libertação de fármacos, projetados de acordo com as necessidades da aplicação pretendida.

Palavras - chave: lipossomas, estruturas nanométricas, fosfolípidos, lipopolímeros, complexo polímero-lipossoma, sistemas de libertação.

Abstract

The objective of this study was to synthesize, formulate and characterize polymer-liposome complexes (PLC) for controlled drug delivery through the chemical modification of phospholipids. The selected phospholipid was soybean lecithin (LC) and poly(ethylene glycol)bis(carboxymethyl)ether, COOH-PEG-COOH, and the poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate), PDMAEMA, were the chosen polymeric systems.

The synthesis of COOH-PEG-COOH lipopolymers occurred through the reaction between the phospholipids $[\text{NH}_3^+]$ group and the polymer carboxylic group $[\text{COOH}]$ (*coupling carbodiimides*). This synthesis was carried out using two different successful procedures from which the selected one was the method with shorter reaction time.

Due to the difficulties encountered on the synthesis of the PDMAEMA polymer with a terminal carboxylic group in view of the subsequent synthesis of PDMAEMA based lipopolymers, PDMAEMA with a cholesterol end-group (CHO-PDMAEMA) was prepared, taking advantage of the hydrophobic nature of CHO to promote the anchoring process in the final formulation (lecithin-PEG-COOH and CHO-PDMAEMA CPL). Different proportions of the CHO-PDMAEMA component were used, viz. 2.5%, 5% e 10%.

The CPL characterization was carried out by determining the size, polydispersity, zeta potential, release profiles and encapsulation efficiency. The results showed that CPL of lecithin-PEG-COOH are stable in physiological conditions, with and without CHO-PDMAEMA, and unstable in environments with pH different from 7, releasing all their content (calcein).

For all tested formulations, the best results obtained for both stabilization over time and encapsulation efficiency were achieved for the lipopolymer formulation based on lecithin PEG-COOH and lecithin-PEG-COOH with 5% of CHO-PDMAEMA. It was verified that vesicles are stable and the best conservation method consists in keeping the samples at room temperature after being lyophilized.

This work is innovative when compared to those reported in the existing literature in the sense that the chemical bond established between the COOH-PEG-COOH and the phospholipids is obtained using a faster and more expedite procedure. Moreover, this approach can be applied to different polymers with different characteristics in order to modulate the drug delivery system according to the required application.

Keywords: liposomes, nanometric structures, phospholipids, lipopolymers, polymer-liposome complex, drug delivery systems.

ÍNDICE

I.	Introdução.....	1
1.	Motivação	1
2.	Objetivos e Estratégias Adotadas	3
II.	Revisão Bibliográfica	5
1.	Lipossomas e Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos	5
2.	Lipossomas	6
2.1.	Constituição dos Lipossomas	6
2.2.	Tipos de Lipossomas	8
2.3.	Tipos de lipossomas segundo as suas dimensões e número de bicamadas	13
2.4.	Caracterização de Lipossomas	14
3.	Produção de Lipossomas	18
3.1.	Formulação de Lipossomas	18
3.2.	Métodos de Fabricação de Complexos Polímero-Lipossoma	20
4.	Complexos Lipopolímero	20
4.1.	Formação de Lipopolímeros.....	20
5.	Sistema Lipídico	24
5.1.	Lecitina de Soja.....	24
6.	Sistema Polimérico	25
6.1.	Mecanismos de Polimerização	27
III.	Parte Experimental	31
1.	Materiais	31
2.	Equipamentos	32
3.	Técnicas	32
3.1.	Cromatografia de Permeação de Gel (GPC)	32

3.2.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	33
3.3.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR).....	33
3.4.	Dispersão de Luz Dinâmica (DLS).....	34
3.5.	Espectrofluorimetria.....	34
3.6.	Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)	35
4.	Procedimentos Experimentais	36
4.1.	Preparação de Lipopolímeros com COOH-PEG-COOH.....	37
4.2.	Preparação de Lipopolímeros com PDMAEMA	39
4.3.	Preparação de lipossomas.....	41
4.4.	Encapsulação dos calceína nos lipossomas.....	43
4.5.	Formulação de lipossomas para determinação da concentração de lípidos	43
4.6.	Preparação de CPL para avaliação da morfologia	43
4.7.	Preparação de CPL para testes de conservação.....	44
IV.	Resultados e Discussão.....	45
1.	Síntese de Lipopolímeros com COOH-PEG-COOH.....	45
1.1.	Lecitina-PEG-COOH: Alternativa I.....	45
1.2.	Lecitina-PEG-COOH: Alternativa II	47
2.	Síntese de Lipopolímeros com PDMAEMA	49
2.1.	Iniciador esterificado a partir de ácido glicólico.....	49
2.2.	Iniciador ácido 2-bromo-2-metilpropiónico.....	50
2.3.	Iniciador CHO-Br.....	51
3.	Preparação de lipossomas e CPLs	52
3.1.	Lipopolímero lecitina-PEG-COOH: Alternativa I.....	52
3.2.	Lipopolímero lecitina-PEG-COOH: Alternativa II.....	53
3.3.	Lipopolímero lecitina-PEG-COOH e CHO-PDMAEMA.....	53
3.4.	Lipopolímero lecitina-PEG-COOH e CHO	55

3.5. Lecitina.....	55
4. Perfis de Libertação	56
5. Eficiência de Encapsulação	58
6. Avaliação da Estabilidade dos CPLs a meios de pH diferentes	59
7. Morfologia dos complexos polímero-lipossoma finais	62
8. Testes de Conservação dos complexos polímero-lipossoma Finais.....	63
V. Apreciações Finais.....	66
Conclusão.....	66
Trabalhos Futuros	67
Bibliografia.....	68
Apêndices	79
Apêndice A	81
Apêndice B	98
Apêndice C	103
Apêndice D	104
Apêndice E.....	105
Apêndice F.....	106

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes tipos de fosfolípidos e suas estruturas moleculares [11], [41], [42].	23
Tabela 2 - Constituição da Lecitina de soja [41], [42].	24
Tabela 3 - Diferentes iniciadores utilizados na síntese de polímeros de PDMAEMA modificados.	39
Tabela 4 - Resultados do peso molecular e da dispersividade de COOH-PDMAEMA-Br.	50
Tabela 5 - Resultados do peso molecular e da dispersividade de COOH-PDMAEMA-Br.	50
Tabela 6 - Resultados do peso molecular e da dispersividade de CHO-PDMAEMA-Br.	51
Tabela 7 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de base Lecitina-PEG-COOH (alternativa I).	52
Tabela 8 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de base Lecitina-PEG-COOH (alternativa II).	53
Tabela 9 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de base lecitina-PEG-COOH e CHO-PDMAEMA.	54
Tabela 10 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de base lecitina-PEG-COOH e CHO.	55
Tabela 11 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de lecitina.	56
Tabela 12 - Resultados da concentração de calceína encapsulada, concentração de lípidos e eficiências de encapsulação (%).	59
Tabela 13 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas convencionais, lecitina-PEG-COOH e lecitina-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5% liofilizados e congelados.	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da encapsulação de fármacos hidrófilos e hidrofóbicos nos lipossomas [12].	2
Figura 2 - Representação esquemática de um lipossoma. Adaptado de [12].	6
Figura 3 - Representação esquemática de um fosfolípido. Adaptado de [25].	7
Figura 4 - Estrutura molecular de um fosfolípido [26].	8
Figura 5 - Representação esquemática de lipossoma de longa circulação. Adaptado de [12].	9
Figura 6 - Representação esquemática de lipossoma imunogénico. a) Lipossoma com ligação a anticorpo. b) Lipossoma com ligação a anticorpo, por intermédio de polímero. Adaptado de [12].	10
Figura 7 - Representação esquemática de lipossoma de penetração celular. Adaptado de [12].	11
Figura 8 - Representação esquemática de lipossoma modificado com DNA. Adaptado de [12].	12
Figura 9 - Representação esquemática de lipossoma com metais pesados. Adaptado de [12].	12
Figura 10 - Representação esquemática de lipossoma com partículas magnéticas. Adaptado de [12].	13
Figura 11 - Representação esquemática de vesículas. Adaptado de [34].	14
Figura 12 - a) Micela; b) Bicamada lípidica.	14
Figura 13 - Complexo Lípido-Polímero. Adaptado de [38].	20
Figura 14 - Estrutura molecular do PEG.	26
Figura 15 - Estrutura molecular do Poli(etilenoglicol)bis(carboximetil)éter.	26
Figura 16 - Estrutura molecular do PDMAEMA.	26
Figura 17 - Representação esquemática da polimerização radicalar livre. Adaptado de [49].	28
Figura 18 - Equilíbrio entre espécies dormentes e ativas. Adaptado de [49].	29
Figura 19 - Equilíbrio químico ATRP. Adaptado de [49].	30

Figura 20 - Representação esquemática da produção de lipossomas com o lipopolímero Lecitina-PEG-COOH.	36
Figura 21 - Representação esquemática da produção de lipossomas com Lecitina-PEG-COOH e CHO-PDMAEMA.	36
Figura 22 - Representação esquemática da síntese de Lecitina-PEG-COOH.	37
Figura 23 - Representação esquemática da esterificação do ácido glicólico.	39
Figura 24 - Representação esquemática da síntese de COOH-PDMAEMA-Br com o ácido glicólico-2-bromoisobutirato.	40
Figura 25 - Representação esquemática da síntese de COOH-PDMAEMA-Br com o ácido 2-bromo-2-metilpropiónico.	40
Figura 26 - Representação esquemática da síntese de COOH-PDMAEMA-Br com o CHO-Br.	41
Figura 27 - Espetro de RMN em CDCl ₃ da reação de Lecitina-PEG-COOH.	46
Figura 28 - Espetro FTIR de transmitância da reação Lecitina-PEG-COOH.	47
Figura 29 - Espetro de RMN em CDCl ₃ da reação de Lecitina-PEG-COOH.	48
Figura 30 - Espetro FTIR de transmitância da reação Lecitina-PEG-COOH.	48
Figura 31 - Espetro FTIR de transmitância para o iniciador sintetizado.	49
Figura 32 - Espetro FTIR de transmitância para a síntese da reação CHO-PDMAEMA.	52
Figura 33 - Perfis de liberação de calceína dos CPL: (a) - Reação 3/2,5%; (b) - Reação 4/2,5%; (c) - Reação 3/5%; (d) - Reação 4/5%; (e) - Reação 3/10%; (f) - Reação 4/10%.	57
Figura 34 - Perfis de liberação das reações de lecitina, lecitina-PEG-COOH e lecitina-PEG-COOH com concentrações de 2,5%, 5% e 10% de CHO-PDMAEMA, a diferentes meios de pH.	60
Figura 35 - Potenciais zeta dos lipossomas convencionais, lecitina-PEG-COOH e lecitina-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5% em função do pH.	61
Figura 36 - Morfologia dos CPL finais e lipossomas convencionais: (a) - Lecitina; (b) - Lecitina-PEG-COOH; (c) - Lecitina-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5%.	62
Figura 37 - Perfis de liberação de calceína dos CPL finais e lipossomas convencionais: (a) - Lecitina; (b) - Lecitina-PEG-COOH; (c) - Lecitina-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5%.	64
Figura 38 - Espetro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 1 (Alternativa I).	81

Figura 39 - Espectro de RMN em CDCl ₃ da reação 1 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).	82
Figura 40 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 2 (Alternativa I).	83
Figura 41 - Espectro de RMN em CDCl ₃ da reação 2 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).	84
Figura 42 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 3 (Alternativa I).	85
Figura 43 - Espectro de RMN em CDCl ₃ da reação 3 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).	86
Figura 44 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 4 (Alternativa I).	87
Figura 45 - Espectro de RMN em CDCl ₃ da reação 4 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).	88
Figura 46 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 5 (Alternativa I).	89
Figura 47 - Espectro de RMN em CDCl ₃ da reação 5 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).	90
Figura 48 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 6 (Alternativa I).	91
Figura 49 - Espectro de RMN em CDCl ₃ da reação 6 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).	92
Figura 50 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 7 (Alternativa I).	93
Figura 51 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 8 (Alternativa I).	94
Figura 52 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 9 (Alternativa I).	95
Figura 53 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 10 (Alternativa I).	96
Figura 54 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 11 (Alternativa I).	97

Figura 55 - Espectro de FTIR de transmitância da reação 1 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).....	98
Figura 56 - Espectro de RMN em CDCl ₃ da reação 1 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).....	99
Figura 57 - Espectro de FTIR de transmitância da reação 2 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).....	100
Figura 58 - Espectro de FTIR de transmitância da reação 3 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).....	101
Figura 59 - Espectro de FTIR de transmitância da reação 4 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).....	102
Figura 60 - Espectro FTIR de transmitância para COOH—Br.....	103
Figura 61 - Espectro FTIR de transmitância para a síntese da reação CHO-PDMAEMA.....	104
Figura 62 - Reta de calibração da concentração de calceína em função da fluorescência.....	106

NOMENCLATURA, SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS

Ac	Acetona
AFM	Microscopia de Força Atômica
ATRP	Polimerização Radicalar por Transferência Atômica
2- BiB	Brometo de 2-bromoisobutirilo
Br-MPA	Ácido 2-Bromo-2-metilpropiónico
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CF	Clorofórmio
CHO	Colesterol
CHO - Br	Brometo de Colesterol
CMC	Concentração Micelar Crítica
COOH - PEG - COOH	Poli(etilenoglicol)bis(carboximetil)éter
CPL	Complexo Polímero-Lipossoma
DCDI	N,N – Diciclohexilcarbodiimida
DCT	Transferência de Cadeia Degenerativa
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica
DMAEMA	2-(Dimetilaminoetil)metacrilato
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria de Varrimento Diferencial
DSPE	1,2 - Distearol-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina
DSPE-PCB	poli(2- <i>tert</i> -Butoxi- <i>N</i> -(2-(metacrililoiloxi)etil)- <i>N,N</i> -dimetil-2-oxoetanoamonio
Đ	Dispersividade
EDCI	N-(3-Dimetilaminopropil-N'etilcarbodiiminahidrocloreto)
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
ESR	Espectroscopia de Ressonância de Spin
FFF	Fracionamento em Escoamento
FRP	Polimerização Radicalar Livre

GA	Ácido Glicólico
GUV	Vesículas Unilamelares Gigantes
HDAS - PCH zwitteriônico	[N-(carboximetil)-2-(isobutiriloxi)-N,N-dimetiletanamônia]
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinoetanossulfônico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPSEC	Cromatografia de elevado desempenho de exclusão de tamanho
H – RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
LC	Lecitina de Soja
LDE	<i>Laser doppler electrophoresis</i>
LiBr	Brometo de Lítio
LRP	Polimerização Radicalar Viva
LUV	Vesículas Unilamelares Grandes
MEC	Concentração Mínima Eficaz
MHF	Plataforma de Focagem Hidrodinâmica de Microfluídos
MLV	Vesículas Multilamelares
MTC	Concentração Mínima Tóxica
MVV	Vesículas Multivesiculares
NaOH	Hidróxido de Sódio
OLV	Vesículas Oligolamelares
PCS	<i>Photon Correlation Spectroscopy</i>
PDMAEMA	Poli(dimetilaminoetil-2-metacrilato)
PEG	Poli(etilenoglicol)
PEOZ	Poli-(2-etil-2-oxazolina)
PGA	Ácido Glutâmico
PHEA	Poli(hidroxietyl-L-asparagina)
PHEG	Poli(hidroxietyl-L-glutamina)
PMDETA	n-Pentametildietilenetriamina
PMOZ	Poli-(2-metil-2-oxazolina)
PVA	Álcool poli(vinílico)
PVP	Poli(vinil pirrolidona)
RAFT	Transferência de Cadeia Adição-Fragmentação Reversível
RES	Sistema Reticuloendotelial Humano

RI	Índice de Refração
RMN	Espetroscopia por Ressonância Magnética Nuclear
SEC	Cromatografia de Exclusão de Tamanho
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento
SFRP	Polimerização Radicalar Livre Estável
SLC	Sistemas de Libertação Controlada
SUV	Vesículas Unilamelares Pequenas
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta

I. INTRODUÇÃO

1. MOTIVAÇÃO

A ciência e a medicina unem-se cada vez mais para encontrar novos tratamentos e diagnósticos eficazes e preventivos. Os avanços decorrentes do estudo e desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos (SLC) são um exemplo dessa união. Presentemente, inúmeros desenvolvimentos relacionados com esses SLC podem ser encontrados em áreas da medicina, como a oncologia, terapia genética, tratamentos diabéticos, tratamentos gastro intestinais, ortopedia, dermatologia (e.g. regeneração da pele), neurologia [1-7], mas também em outras áreas, como a cosmética e a alimentar.

Os SLC podem ser compostos por polímeros, materiais inorgânicos ou lípidos [8] sendo que estes possuem vantagens em relação aos outros materiais, pois têm a capacidade de formar estruturas nanométricas, como os lipossomas, isto é, vesículas esféricas nanométricas, formadas espontaneamente por uma ou mais camadas de fosfolípidos. Por possuírem essas dimensões, têm uma maior facilidade de circular em vasos sanguíneos, o que permite atingir apenas o tecido alvo onde há infecção ou inflamação, que se caracterizam por elevada permeabilidade e capilaridade (e.g. tumores: células tumorais possuem $\text{pH} < 7$, enquanto células normais possuem $\text{pH} \approx 7$ [9]), evitando danos de tecidos vizinhos. As suas vantagens acrescidas confirmam o seu uso benéfico em SLC e consistem na biodegradabilidade, biocompatibilidade, prolongamento da liberação de agentes farmacêuticos ativos, capacidade de retenção do fármaco, proteção de agentes encapsulados, aumento dos tempos de vida de circulação do fármaco, não-imunogenicidade [10], não-toxicidade e aumento da penetração do fármaco [11] e detêm uma semelhança com a membrana plasmática do corpo humano, revelando-se uma característica vantajosa para estas estruturas, pois a sua interação e eficácia com o organismo humano é facilitada. Outras vantagens notórias são a sua eficiência de encapsulação aceitável e a capacidade de atuar como cápsula, oferecendo proteção contra efeitos externos. Outras vantagens como a versatilidade e a aplicabilidade, são características chave nos lipossomas, pois

I. INTRODUÇÃO

permitem a incorporação tanto de fármacos hidrófilos no seu interior aquoso devido à “cabeça” hidrofílica dos fosfolípidos, como de hidrofóbicos na sua camada lipídica, devido à “cauda” hidrofóbica dos fosfolípidos (vd. figura 1).

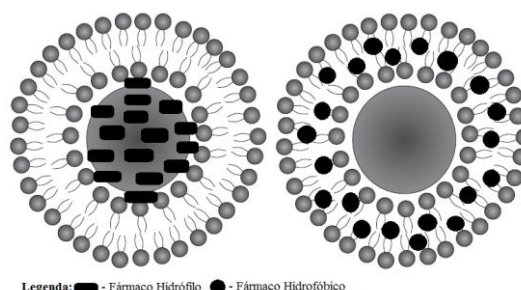


Figura 1 - Representação esquemática da encapsulação de fármacos hidrófilos e hidrofóbicos nos lipossomas [12].

Os lipossomas modificados são considerados sistemas de libertação de fármacos inteligentes, que possuem uma eficiência de encapsulação, que, dependendo do processo de formação e independente da solubilidade da substância a encapsular, evitam a degradação consequente de fatores como a luz, ação de enzimas ou pH. Dependendo dos fosfolípidos e dos revestimentos (e.g. polímeros) usados podem ser formulados lipossomas modificados que aumentam a sua taxa de libertação em meio ácido e meio básico (sensíveis ao pH), e, se ultrapassarem a temperatura característica da zona de infeção ou inflamação, a sua estrutura transita de uma fase tipo gel (onde há uma organização da cadeia hidrocarbonada do lípido), para uma fase cristalina (onde os radicais hidrófilos agrupados se tornam completamente hidratados e as moléculas com movimentos mais livres), libertando para o meio as substâncias (sensíveis à temperatura) [11], [13]. Assim, os lipossomas permitem cumprir os objetivos dos estudos e desenvolvimentos dos sistemas de libertação, armazenamento e transporte de fármacos (e.g. a administração do fármaco no alvo específico e a fácil aplicação deste, através da sua injeção na corrente sanguínea). Desta forma, reafirma-se que os lípidos são o material mais satisfatório e vantajoso quando comparados com outros materiais que compõem os SLC.

A inovação, aplicação e vantagens dos lipossomas com a superfície modificada por polímeros pode oferecer desenvolvimentos promissores, como tal, reforçando a pertinência deste estudo em que se propõe a preparação de lipopolímeros por modificação química de fosfolípidos para estabilização de formulações lipossômicas.

2. OBJETIVOS E ESTRATÉGIAS ADOTADAS

O desenvolvimento de complexos polímero-lipossoma (CPL) através da organização e formação espontânea de lipopolímeros (complexos polímero-fosfolípido) é uma abordagem recente e pouco investigada. Pretende-se que a incorporação dos polímeros nos fosfolípidos seja conseguida através ligação entre um grupo carboxílico dos polímeros, neste caso poli(etilenoglicol)bis(carboximetil)éter, COOH-PEG-COOH, e/ou poli(dimetilaminoetil-2-metacrilato) modificado, PDMAEMA, com a amina protonada do fosfolípido, neste caso lecitina de soja.

A síntese dos lipopolímeros com poli(etilenoglicol)bis(carboximetil)éter, (COOH-PEG-COOH), para posterior formação dos lipossomas, é promovida pela ligação entre um dos grupos carboxílicos [COOH] do polímero e o grupo $[NH_3^+]$ do fosfolípido (*coupling* carbodiimidás).

No caso dos lipopolímeros com PDMAEMA pretendia-se que a síntese fosse promovida pela ligação entre um grupo carboxílico do polímero e a amina protonada do fosfolípido, tal como nos lipopolímeros com COOH-PEG-COOH. No entanto, como não existe o PDMAEMA modificado com grupos carboxílicos terminais comercial, foram realizadas várias tentativas de síntese recorrendo a dois iniciadores diferentes: ácido glicólico-2-bromoisobutirato (obtido por esterificação do ácido glicólico) e o ácido 2-bromo-2-metilpropiónico (comercializado). Como não foi possível obter o polímero pretendido devido a dificuldades na síntese, como alternativa, e de forma a ser estudada a influência do PDMAEMA em CPL obtidos com lipopolímeros, utilizou-se o iniciador CHO-Br, obtido através da esterificação do colesterol (CHO). Optou-se por este iniciador, devido à natureza hidrofóbica do CHO (funciona como âncora) que é muito utilizado em formulações lipídicas, como comprovado em estudos precedentes [11], [14]. Com este iniciador e por polimerização radicalar por transferência atômica, ATRP, foi obtido o CHO-PDMAEMA que foi então incorporado em diferentes proporções (2,5%, 5% e 10%) em relação ao lipopolímero lecitina-PEG-COOH.

Os resultados obtidos foram analisados em termos de tamanho, potencial zeta, polidispersividade, libertação e eficiência de encapsulação de calceína. Foi também analisada a sua morfologia por TEM, a libertação de calceína em meios com diferentes pH e estudada a melhor forma da sua conservação.

Em resumo, as estratégias e procedimentos que constituíram estes estudos experimentais foram:

- Síntese do lipopolímero lecitina-PEG-COOH por diferentes procedimentos.
- Síntese do iniciador ácido glicólico-2-bromoisobutirato (COOH-X-Br).
- Síntese dos polímeros de PDMAEMA modificado (COOH-PDMAEMA e CHO-PDMAEMA).
- Preparação de complexos polímero-lipossoma com o lipopolímero lecitina-PEG-COOH, com o lipopolímero lecitina-PEG-COOH e CHO-PDMAEMA e de CPLs com o lipopolímero lecitina-PEG-COOH e CHO estáveis em condições fisiológicas (e.g. pH=7) e instáveis em meios com pH diferentes de 7, com diâmetro médio, polidispersividade, potencial zeta, perfis de libertação de calceína, capacidade de encapsulação de calceína e com concentração de lípidos que permitam ser usados como SLC.
- Estudo da melhor forma de armazenamento dos CPLs mais promissores.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. LIPOSSOMAS E SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Os sistemas de liberação controlada de fármacos são processos de administração de fármacos num alvo específico, órgão ou tecido, de modo a atingir um fim terapêutico em humanos ou animais [15]. Os avanços relacionados com a liberação controlada de fármacos revelam-se promissores e satisfatórios em alguns casos, mas prematuros noutros. Estes sistemas desempenham um papel fundamental no controlo do efeito farmacológico do fármaco - farmacocinética e farmacodinâmica - e ainda influenciam o local e a duração da sua ação, a sua taxa de liberação e o perfil de efeitos secundários. O ideal e pretendido é que o fármaco ativo atue no local exato, no tempo preciso e com a duração desejada, tomando-se especial atenção ao intervalo terapêutico, em que a concentração do fármaco deve estar acima da concentração mínima eficaz (MEC) e abaixo da concentração mínima tóxica (MTC). Esta concentração vai depender da frequência de dosagem, das taxas de eliminação do fármaco e da via de administração do sistema de fornecimento de fármaco utilizado [16]. Atualmente, as vias de administração dos sistemas de liberação controlada são muito variadas, sendo elas, tópica (e.g. pele), enteral (pelo trato digestivo) e parenteral (de outra forma sem ser pelo trato digestivo – e.g. injeção) [17], e podem apresentar-se de diversas formas, à base de lípidos [18], polímeros [19], [20] ou materiais inorgânicos [21], designadamente lipossomas, géis, microesferas, ciclodextrinas [15].

Quando um fármaco é administrado, uma grande fração deste é desperdiçada. Apenas uma pequena quantidade atinge o tecido alvo devido à distribuição para outros tecidos e à sua excreção antes de atingir o local efetivo. Assim, os lipossomas são um meio que se revela bastante atrativo para debelar alguns dos problemas associados à administração de fármacos, como o transporte, armazenamento e liberação destes. Estudos realizados comprovam que os lipossomas são uma mais-valia em áreas como imunologia, terapia de tumores, adjuvante de vacina, terapia antimicrobiana, terapia genética, entrega de radiofármacos para diagnóstico por

imagem, e ainda para entrega cosmética para a pele, entrega de corantes para têxteis, enzimas e suplementos nutricionais em alimentos, pesticidas nas plantas e como biossensores [11].

2. LIPOSSOMAS

Os lipossomas são nanopartículas em forma de vesículas esféricas [12], [22], constituídos por fosfolípidos, que se arranjam de forma concêntrica, através de interações hidrofóbicas, em uma ou várias bicamadas lipídicas (vd. figura 2). Estas bicamadas têm a característica de possuir um núcleo hidrófilo, devido à zona polar -“cabeça”- dos fosfolípidos que as constituem, possuindo a capacidade de impermeabilidade no meio interno e no meio envolvente aquoso [12].

O facto de os lipossomas terem uma constituição semelhante à membrana plasmática (estrutura que delimita todas as células vivas) confere-lhes uma vantagem relevante no seu uso em ensaios clínicos.

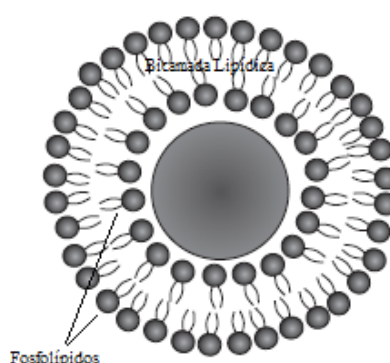


Figura 2 - Representação esquemática de um lipossoma. Adaptado de [12].

2.1. Constituição dos Lipossomas

2.1.1. Lípidos

Segundo Bloor [23], os lípidos são uma das principais classes de substâncias biológicas. Consistem em grupos de compostos orgânicos encontrados em todas as células (animais, plantas e microrganismos). Os lípidos podem ser classificados por composição, natureza e

origem. Possuem funções energéticas e metabólicas, e têm inúmeras aplicações nas áreas farmacêutica, alimentar e cosmética. Alguns lípidos são insolúveis em água do protoplasma, enquanto outros, com determinados grupos químicos ligados, estabelecem ligação com a água [23]. Ainda segundo Bloor [23], os lípidos têm diversas classes: simples (e.g. triglicerídeos e ceras), complexos (e.g. fosfolípidos, glicolípidos, sulfolípidos, esfingolípidos) e derivados (e.g. esteróides).

2.1.2. Fosfolípidos

Os fosfolípidos (vd. figura 3) podem ser sintéticos ou naturais, e consideram-se o principal constituinte dos lipossomas. Os fosfolípidos constituintes dos lipossomas são de natureza anfifílica [24]. Estes têm a capacidade de se orientar espontaneamente, formando os lipossomas (a sua estrutura esférica é uma vantagem significativa na sua aplicação).

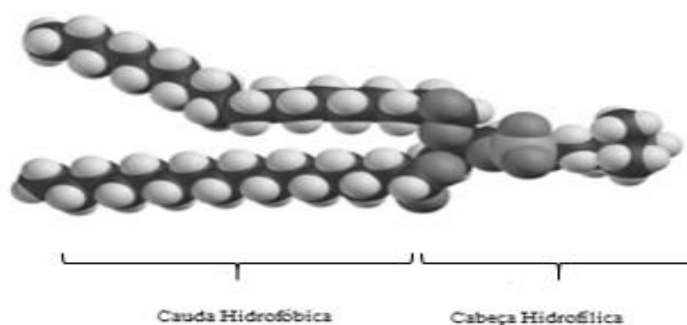


Figura 3 - Representação esquemática de um fosfolípido. Adaptado de [25].

Os fosfolípidos são constituídos por duas zonas (vd. figura 4) [26]:

Zona polar: possui uma “cabeça” hidrofílica, com elevada afinidade com a água. Esta zona é composta por uma molécula de glicerol, um grupo fosfato e um grupo -R, que varia consoante o tipo do fosfolípido em questão.

Zona apolar: possui uma “cauda” hidrofóbica com pouca afinidade com a água. Esta zona é composta por duas cadeias hidrocarbonadas de ácidos gordos, iguais ou diferentes.

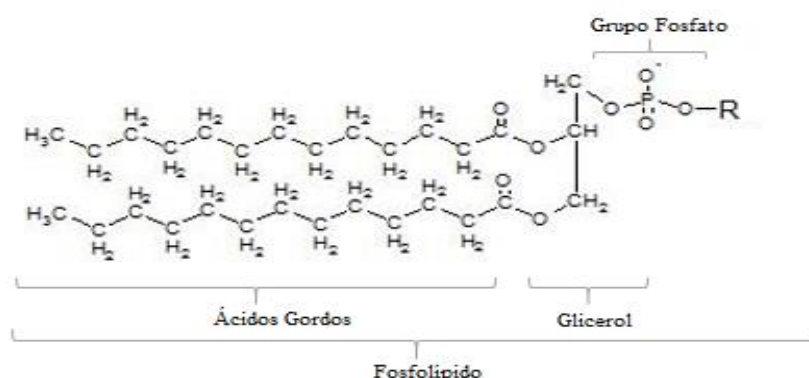


Figura 4 - Estrutura molecular de um fosfolípido [26].

2.2. Tipos de Lipossomas

2.2.1. Lipossomas Convencionais

Os lipossomas convencionais não têm modificação da superfície, tal como os descritos na seção 2 (cf. figura 2; cap. II). Estes lipossomas destinam-se a transportar fármacos diretamente no local de infecção ou inflamação. Contudo, possuem desvantagens, sendo a principal o curto tempo de circulação no fluxo sanguíneo. Tal facto pode ser explicado por estes se acumularem facilmente nas vesículas fagocitárias do sistema reticuloendotelial humano (RES), e posteriormente no baço e no fígado. Por este motivo, os SLC não conseguem atingir os outros órgãos a que se destinam [27].

2.2.2. Lipossomas Multifuncionais

Uma alternativa estudada aos lipossomas convencionais, são os lipossomas multifuncionais. Estes são modificados quimicamente, por modificação da superfície (e.g. modificação através de ligação a polímeros) ou por incorporação de moléculas (e.g. partículas magnéticas), e permitem contornar as desvantagens dos lipossomas convencionais, como o tempo no fluxo sanguíneo (longevidade) e a capacidade de atingir os órgãos que se pretende [27].

Lipossomas de longa circulação

Os lipossomas de longa duração resultam da modificação da superfície do lipossoma através da incorporação de polímeros hidrófilos [12]. Estes proporcionam um aumento da proteção dos lipossomas, diminuindo a sua interação com componentes do sangue. A natureza hidrófila aumenta, ocorrendo um fenómeno de repulsão entre estes e as vesículas fagocitárias, evitando que se acumulem nestas, permitindo um maior tempo de circulação na corrente sanguínea e consequentemente, atingem o alvo específico (vd. figura 5) [27].

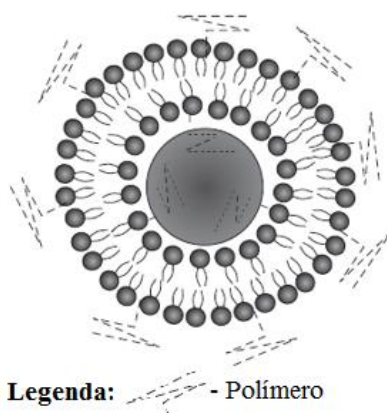


Figura 5 - Representação esquemática de lipossoma de longa circulação. Adaptado de [12].

Lipossomas imunogénicos ou imunolipossomas

Os lipossomas imunogénicos são conjugados com anticorpos monoclonais e dirigidos contra células local-alvo inflamadas ou infetadas, desde o momento da sua entrada na corrente sanguínea [12]. Neste procedimento podem ser usados anticorpos, folatos ou açúcares. Estes ligam-se covalentemente a um dos grupos da membrana lipídica ou por intermédio de um polímero o que os torna lipossomas de longa circulação. Por vezes, os anticorpos podem ser incorporados nas cadeias do polímero (vd. figura 6) [27], [28].

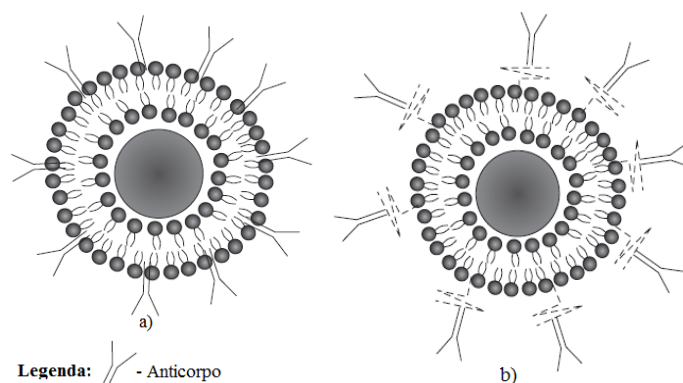


Figura 6 - Representação esquemática de lipossoma imunogênico. a) Lipossoma com ligação a anticorpo. b) Lipossoma com ligação a anticorpo, por intermédio de polímero. Adaptado de [12].

Lipossomas de penetração celular

Por vezes, é necessário chegar a organelos específicos do citoplasma e como tal os lipossomas descritos atrás não têm essa capacidade. Para isso são necessárias moléculas com poder de penetração celular que possam ser incluídas nos lipossomas, tais como proteínas ou péptidos (vd. figura 7) [29].

O procedimento deste lipossomas, consiste na seleção de proteínas encontradas nas membranas plasmáticas das células-alvo e incorporação de grupos hidrofóbicos nas mesmas, permitindo que ocorra a adsorção física à superfície dos lipossomas. Depois de ocorrer a penetração celular, as proteínas ligadas aos lipossomas inserem-se nas membranas plasmáticas e são funcionalizadas por fusão da membrana plasmática ou por endocitose, proporcionando a libertação intracelular [27]. Estes lipossomas também podem ser de longa circulação, ao terem incorporados polímeros. Apesar da proteção que estes oferecem aos lipossomas, a sua internalização pode ser dificultada, assim como a libertação do seu conteúdo, no local específico. Como tal, os polímeros incorporados devem ser sensíveis ao pH (degradam-se em meios ácidos ou básicos), ou à temperatura (desestabilizam-se em locais com uma temperatura acima da temperatura fisiológica) [30].

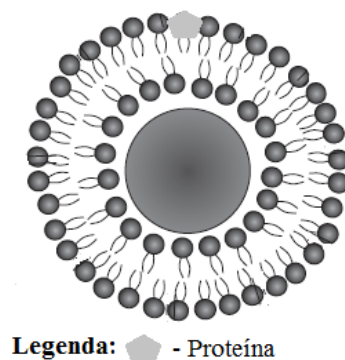


Figura 7 - Representação esquemática de lipossoma de penetração celular. Adaptado de [12].

Lipossomas catiónicos (baseados em genes)

Neste caso, os lipossomas formados baseiam-se no conceito de transfeção. Isto é, devem promover a inserção propositada de um bioativo aniônico, ácido desoxirribonucleico, DNA (vd. figura 8), em células afetadas para produção de proteínas de interesse ou introdução de genes para alterar algumas propriedades das mesmas, permitindo tratar ou retardar doenças [27-30]. Como as moléculas de DNA têm carga negativa, os lipossomas ligados a estas têm que possuir caráter positivo de modo a promover a sua ligação. Visto que o DNA é captado por endocitose e posteriormente é degradado por ação enzimática, usam-se estes lipossomas para evitar essa degradação. No entanto, estes lipossomas não possuem capacidade para evitar a degradação do DNA antes de chegar ao citoplasma das células, como tal são incorporadas cadeias de polímeros para prolongar o tempo de circulação na corrente sanguínea e por vezes anticorpos de forma a direcionar os lipossomas ao sítio-alvo.

Neste caso, existem três hipóteses para que a incorporação dos polímeros seja viável. Os lipossomas passam por endocitose com o polímero, pois dentro dos endossomas (meio ácido), os polímeros sofrem uma protonação, permitindo a entrada de água, causando a sua desintegração e libertação total do DNA no citoplasma. Outra hipótese consiste na formulação de lipossomas utilizando um fosfolípido sensível ao pH, aquando dentro do endossoma (meio ácido), a membrana lipídica desintegrar-se e ao reagir com a membrana do endossoma, acaba por a desestabilizar e libertar o DNA para o citoplasma. Por fim, existe uma terceira hipótese, que consiste na utilização de um polímero que consiga fundir na membrana plasmática ou na do endossoma, levando o conteúdo dos lipossomas diretamente ao citoplasma [30].



Figura 8 - Representação esquemática de lipossoma modificado com DNA. Adaptado de [12].

Lipossomas com a incorporação de metais pesados

Lipossomas com metais pesados (vd. figura 9) são usados em áreas de diagnóstico e monitorização e podem ter também incorporados polímeros hidrófilos ou anticorpos para permitir que atinjam a célula-alvo pretendida. São usados em ressonâncias magnéticas, tomografias, ultrassonografias e cintilografias [27]. São produzidos através de um quelante solúvel, promovendo a quelação dos metais, e posteriormente encapsulados nos lipossomas, ou por modificação química, de modo a possuírem grupos hidrofóbicos com a capacidade de se incorporar na superfície dos lipossomas (bicamada lipídica) [27]. [30].

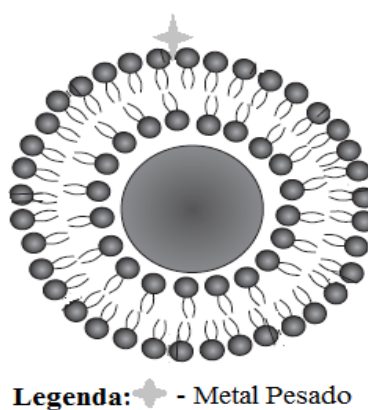
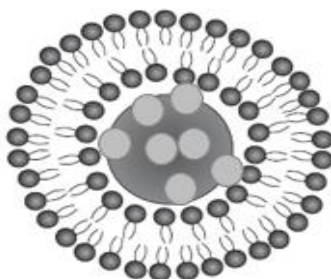


Figura 9 - Representação esquemática de lipossoma com metais pesados. Adaptado de [12].

Lipossomas com a incorporação de partículas magnéticas

Tal como os lipossomas descritos anteriormente, os lipossomas magnéticos (vd. figura 10) são utilizados em ressonâncias magnéticas por possuírem partículas magnéticas sensíveis a campos eletromagnéticos externos. Neste caso, também podem ter incorporados polímeros hidrófilos ou anticorpos para permitir que atinjam a célula-alvo pretendida [27].



Legenda: ● - Partícula Magnética

Figura 10 - Representação esquemática de lipossoma com partículas magnéticas. Adaptado de [12].

2.3. Tipos de lipossomas segundo as suas dimensões e número de bicamadas

Os lipossomas podem ser caracterizados consoante a sua forma, dimensão e orientação, como se descreve a seguir.

As **Vesículas Multilamelares, MLV** (500-5000 nm) [12], são lipossomas com multicamadas lipídicas, podendo atingir um máximo de catorze camadas. As **Vesículas Unilamelares; Pequenas, SUV** (25-100 nm), **Grandes, LUV** (200-800 nm) [12] e **Gigantes, GUV** (> 1000 nm) [31], são lipossomas que possuem apenas uma camada de lípido. As **Vesículas Oligolamelares, OLV** (100-500 nm), são lipossomas com um pequeno número de camadas [32]. As **Vesículas Multivesiculares, MVV** (> 1000 nm) [22], são lipossomas com pequenas vesículas não concêntricas, aprisionadas numa única bicamada lipídicas [33] (vd. figura 11).

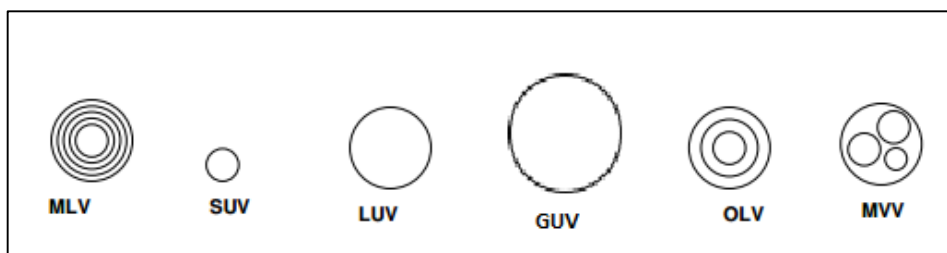


Figura 11 - Representação esquemática de vesículas. Adaptado de [34].

Existem ainda estruturas semelhantes aos lipossomas, como as micelas e as bicamadas lipídicas. As micelas (100-1 nm) são estruturas esféricas, constituídas por fosfolípidos que ocorrem de forma espontânea quando a concentração dos fosfolípidos em meio aquoso é igual ou superior à concentração micelar crítica (CMC). As micelas em meio aquoso possuem “cabeças” polares -hidrófilas- viradas para fora e “caudas” apolares -hidrofóbicas- viradas para dentro (figura 12 a) [35]. As bicamadas lipídicas são constituídas por lípidos, que se dispõem espontaneamente, dependendo das suas zonas de polaridade (figura 12 b).

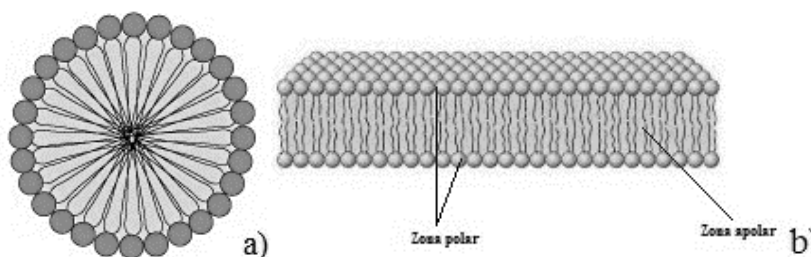


Figura 12 - a) Micela; b) Bicamada lipídica.

2.4. Caracterização de Lipossomas

Diâmetro Médio

Segundo Calvagno [36], o diâmetro médio dos lipossomas depende da composição lipídica e do seu método de preparação. Para partículas nanométricas, o diâmetro deve estar compreendido entre 100-400 nm [11] e as técnicas para sua determinação são a dispersão de luz dinâmica (*DLS*); microscopia eletrônica de transmissão (*TEM*); microscopia eletrônica de varrimento (*SEM*); microscopia de força atômica (*AFM*); cromatografia de exclusão de tamanho (*SEC*); *photon correlation spectroscopy* (*PCS*) e fracionamento em escoamento (*FFF*) [36].

Dispersividade

Ainda segundo Calvagno [36], a dispersividade (homogeneidade), tal como o tamanho (diâmetro médio), depende da composição lipídica e do método de preparação. Para partículas nanométricas, esta não deve ultrapassar os 0,5 [11] e as técnicas para sua determinação são a dispersão de luz dinâmica (*DLS*); microscopia eletrônica de transmissão (*TEM*); microscopia eletrônica de varrimento (*SEM*); microscopia de força atômica (*AFM*); cromatografia de exclusão de tamanho (*SEC*); *photon correlation spectroscopy* (*PCS*) e fracionamento em escoamento (FFF) [36].

Temperatura de Transição (T_c)

A temperatura de transição consiste na transição de fase termotrópica a temperaturas muito inferiores ao seu ponto de fusão, depende da natureza das cadeias de hidrocarbonetos, da região polar da molécula e da natureza iônica do meio e pode ser determinada pela técnica de calorimetria de varrimento diferencial (*DSC*) [36].

Potencial Zeta (zP)

O potencial zeta é um parâmetro físico determinado através da tensão superficial e da superfície dos lipossomas em meio aquoso. Os valores de zP devem ser > 30 mV ou < -30 mV [11] para assegurar a estabilidade dos lipossomas, visto que entre essa gama de valores as partículas tendem a interagir ou formar agregados, o que não é pretendido e as técnicas para sua determinação são a *electrophoretic light scattering e laser doppler electrophoresis* (*LDE*) e dispersão de luz dinâmica (*DLS*) [36].

Fluidez

A fluidez representa a ordem e dinâmica dos grupos alquilo dos fosfolípidos na bicamada lipídica e as técnicas para a sua determinação são a ressonância paramagnética eletrônica (EPR); espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) e despolarização de métodos de fluorescência [36].

Lamelaridade

A lamelaridade define-se como o número de bicamadas lipídicas que rodeiam o espaço aquoso interno das vesículas lipídicas e as técnicas para a sua determinação são a espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) e a ressonância paramagnética eletrônica (EPR) [36].

Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação permite inferir sobre a eficácia terapêutica dos fármacos, através da incorporação destes nas bicamadas lipídicas, por adsorção na superfície da membrana, por uma cauda hidrofóbica (“âncora”), por grupos polares ou a utilizada neste estudo, através do encapsulamento (neste caso, de calceína) no seu interior aquoso. As técnicas para sua determinação são a cromatografia de exclusão de tamanho (SEC); ultracentrifugação; diálise; ultrafiltração; espectroscopia de ressonância de spin (ESR); espectroscopia Ultravioleta/Vível (UV/VIS); espectrometria; cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e espectrofluorimetria [36], [11].

Perfil de Liberação

Para se obter os perfis de liberação, é necessário encapsular substâncias no interior dos lipossomas. Esta encapsulação é conseguida hidratando o filme de fosfolípidos com a solução (que ficará encapsulada) em tampão, antes da formação de lipossomas ou depois de formados. Assim a solução incorpora-se no espaço intersticial dos mesmos por difusão. No final da encapsulação é necessário a separação entre a solução de lipossomas e a solução encapsulada. Consoante as condições do meio, observa-se o perfil de liberação num determinado tempo (mínimo de 30 horas) [11]. Por fim os lipossomas são colapsados e é medida a quantidade total de solução encapsulada (neste caso, calceína). As técnicas para sua determinação são a cromatografia de exclusão de tamanho (SEC); ultracentrifugação; diálise; ultrafiltração; espectroscopia de ressonância de spin (ESR); espectroscopia Ultravioleta/Vível (UV/VIS); espectrometria; cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e espectrofluorimetria [36], [11].

Estabilidade

A estabilidade dos lipossomas depende do tamanho e da composição química das vesículas e de outros fatores (e.g. pH, armazenamento) e baseiam-se na formação de forças, as forças Van der Waals entre os fosfolípidos, forças repulsivas entre os grupos carregados das moléculas dos fosfolípidos, forças repulsivas dos grupos da cabeça dos fosfolípidos e forças eletrostáticas repulsivas entre vesículas. As técnicas para sua determinação baseiam-se na avaliação das suas propriedades depois de formados os lipossomas [36].

Concentração de Lípidos

A concentração de lípidos nos lipossomas é um parâmetro essencial que deve ser conhecido para a determinação da eficiência de encapsulação. A técnica para sua determinação é a espectrofotometria [11].

Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade revelam informação acerca da biocompatibilidade das formulações de lipossomas, através da análise da taxa de crescimento celular de células vivas, na presença dos lipossomas e a técnica para sua determinação é a espectrofotometria [11].

Conservação

O estudo de conservação dos lipossomas após o seu armazenamento é importante, porque permite avaliar a estabilidade das formulações, isto é, se depois de armazenados os lipossomas não mantiverem as suas propriedades físicas e químicas, é porque a sua formulação ou armazenamento não foram os mais adequados.

Durante o armazenamento, podem surgir problemas como a formação de aglomerados, libertação precoce ou a colonização de bactérias. Como tal, estes são fatores importantes a ter em conta na avaliação da estabilidade das formulações de lipossomas, depois de armazenadas [36], [11].

3. PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS

3.1. Formulação de Lipossomas

Existem várias técnicas de formulação de lipossomas, que se englobam em técnicas clássicas e novas técnicas a larga escala.

3.1.1. Técnicas clássicas

As técnicas clássicas são as mais utilizadas e serão enunciadas de seguida.

A **hidratação de película fina de lípidos ou Método de Bangham**, é um método que consiste na dispersão de fosfolípidos num solvente orgânico, posteriormente evaporado, permitindo a formação de um filme de lípidos. De seguida, hidrata-se o filme com uma solução tampão sob agitação e a uma temperatura adequada, formando-se os lipossomas [34].

A **evaporação de fase inversa (REV)**, consiste na preparação de um filme lipídico através da evaporação de um solvente orgânico sob pressão reduzida. O sistema é purificado com azoto e os lípidos são redissolvidos numa segunda fase orgânica. Quando o tampão aquoso é introduzido, ocorre a formação de principalmente vesículas unilamelares grandes (LUV) e oligolamelares (OLV) a que se segue a remoção do solvente orgânico com o sistema em atmosfera contínua de azoto [34], [37].

A **injeção de solvente**, é uma alternativa para a preparação de lipossomas de tamanhos reduzidos (SUV), sem recorrer à extrusão ou à sonicação. Consiste na dissolução de lípidos num solvente orgânico e posteriormente na injeção da solução de lípidos numa solução tampão, formando-se os lipossomas. O solvente orgânico pode ser evaporado no final ou à medida que a solução de lípidos é injetada na solução tampão [34], [37].

A técnica de **detergent dialysis**, permite formar lipossomas (40-180 nm) e ocorre através da solubilização de lípidos com *detergent*. Posteriormente, remove-se controladamente o *detergent* por diálise, formando-se vesículas unilamelares com grande volume intersticial [34], [37].

3.1.2. Técnicas a Larga Escala

São usadas novas técnicas a larga escala para produção de lipossomas industrialmente. Estas técnicas são enunciadas de seguida.

O **método de aquecimento**, consiste na hidratação dos fosfolípidos num meio aquoso, seguida do aquecimento destes, na presença do glicerol – permite a estabilidade do lípido [34].

A **secagem por atomização**, é uma secagem direta da mistura de lípido e fármaco por pulverização. É considerada a técnica mais rápida de produção de nanomateriais [34].

A **liofilização**, baseia-se na formação de uma dispersão homogénea de lípidos com materiais transportadores solúveis em água. De seguida, esteriliza-se por filtração e depois do congelamento promove-se a liofilização da mistura. Por fim, adiciona-se água e são formados lipossomas espontaneamente [34], [37].

A **evaporação supercrítica por fase reversa (SCRPE)**, ocorre por dispersões aquosas de lipossomas para ser obtida uma emulsão através da introdução de uma determinada quantidade de água numa mistura homogénea de dióxido de carbono, fosfolípidos e etanol, sob agitação e posteriormente, sujeita a uma redução de pressão [34].

A **modificação do método de injeção de etanol**, por fluxo cruzado ou microfluidização ou por contador de membrana. A modificação do método de injeção de etanol por fluxo cruzado, consiste na injeção contínua de um fluxo cruzado através de dois tubos em forma de cruz com um orifício no ponto de ligação, posteriormente, é adicionada uma solução tampão e por fim, quando o limite de pressão é excedido, as velocidades de injeção permanecem constantes e a quantidade de lipossomas é distribuída. A modificação do método de injeção de etanol por microfluidização, consiste na injeção da fase lipídica numa plataforma de focagem hidrodinâmica de microfluidos (MHF) e da fase aquosa num microcanal. Posteriormente, os lipossomas são obtidos por difusão interfacial quando múltiplas correntes de fluxo são injetadas no microcanal. A modificação do método de injeção de etanol por contador de membrana, consiste numa fase lipídica pressionada por meio de uma membrana com tamanhos de poros especificados, ao mesmo tempo que a fase aquosa passa tangencialmente à superfície da membrana, arrastando os lipossomas formados no seu interior [34].

3.2. Métodos de Fabricação de Complexos Polímero-Lipossoma

Existem várias técnicas de formação de CPL [10] que se resumem a seguir.

Pré-Inserção, em que o polímero é adicionado à fase lipídica antes de os lipossomas serem formados [10].

Pós-Inserção, em que o polímero é lentamente adicionado à suspensão diluída de lipossomas pré-formados, a temperaturas próximas da temperatura de fusão, T_m , dos lípidos constituintes [10].

Pós-Modificação por reação química, em que através de uma reação química se modifica a superfície de lipossomas [10].

No caso em estudo, a formulação de lipossomas foi realizada por pré-inserção e por hidratação da película fina de lípidos/polímero. Como o lipossoma só é formado depois da síntese entre o lípido e o polímero, este estender-se-á para o meio interno e externo do lipossoma (vd. figura 5).

4. COMPLEXOS LIPOPOLÍMERO

O objetivo deste trabalho é a modificação de fosfolípidos (sistema lipídico) com polímeros (sistema polimérico), de maneira a formar lipopolímeros (vd. figura 13).



Figura 13 - Complexo Lípido-Polímero. Adaptado de [38].

4.1. Formação de Lipopolímeros

Os lipopolímeros podem ser formados através de diferentes fosfolípidos e diferentes polímeros, como descrito de seguida.

4.1.1. Formação de lipopolímeros usando diferentes polímeros

Considera-se poli(etilenoglicol) (PEG), o polímero mais estudado e aplicado em aplicações biomédicas, em particular em complexos lipopolímero. No entanto, têm sido estudados diferentes polímeros para formação de complexos lipopolímero [10]. Alguns exemplos são descritos de seguida.

Os **lipopolímeros baseados em polímeros vinílicos**, como por exemplo, o poli(vinil pirrolidona) (PVP) que é um polímero solúvel em água, quimicamente estável, não tóxico e biocompatível, quando comparado com o PEG mostra melhor estabilidade sob UV e ultrassons, pode ser sintetizado por polimerização radicalar viva. Permite um maior tempo de circulação no sangue, uma diminuição de acumulação no fígado, uma eficácia protetora do polímero, que aumenta com o seu peso molecular. Outro exemplo é o poli(álcool vinílico) (PVA), a eficiência dos CPL com este polímero é cinco vezes maior do que a de lipossomas sem revestimento [10].

Os **lipopolímeros baseados em poli(2-oxazolina)** são de natureza anfifílica, solúveis em água, têm a capacidade de automontagem - materiais com a capacidade de se organizar espontaneamente, incluindo simultaneamente técnicas de *top-down* e *bottom-up* [39] - e podem ser sintetizadas por polimerização catiónica por abertura de anel. Exemplos de alguns desses polímeros são o poli-(2-metil-2-oxazolina) (PMOZ) e poli-(2-etil-2-oxazolina) (PEOZ) aquando ligados a 1,2 - Distearol-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina (DSPE) e quando comparados com PEG demonstram pouca acumulação no fígado e baço [10].

Os **Lipopolímeros baseados em poli(Aminoácidos)** são atraentes devido à sua natureza biodegradável, reduzindo o risco de acumulação do polímero em vários órgãos. Exemplos desses polímeros são o poli(ácido glutâmico) (PGA), o poli(hidroxietil-L-asparagina) (PHEA) e o poli(hidroxietil-L-glutamina) (PHEG). Quando comparados com PEG, os últimos possuem uma semi-vida prolongada na circulação sanguínea e uma baixa captação pelo fígado e baço, mas em contrapartida demonstram um aumento de ativação dos lipopolímeros, o que pode limitar a sua utilização [10].

Os **lipopolímeros zwitteriônicos** possuem *fouling* ultrabaixo, pois têm pouca tendência para adsorver proteínas. Estes polímeros são igualmente estudados como alternativa ao PEG, sendo disso exemplo a ligação poli(2-*tert*-Butoxi-*N*-(2-(metacrililoiloxi)etil)-*N,N*-dimetil-2-oxoetanoamónio (DSPE-PCB), que demonstra boa estabilidade, resistência à agregação, melhoramento da sua semi-vida de circulação. Outro exemplo é a ligação [N-(carboximetil)-2-

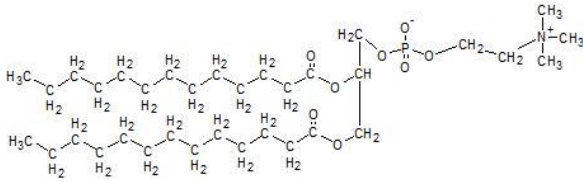
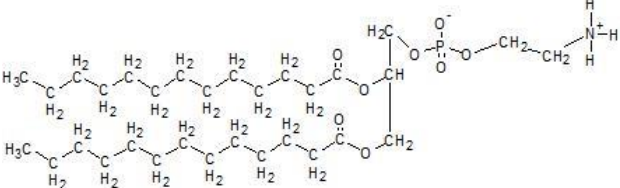
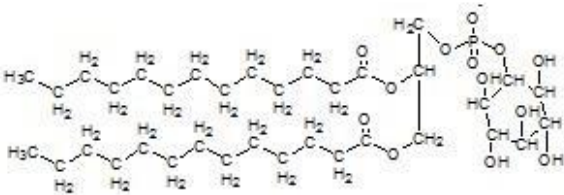
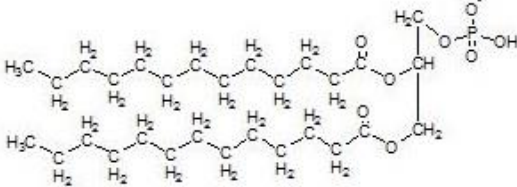
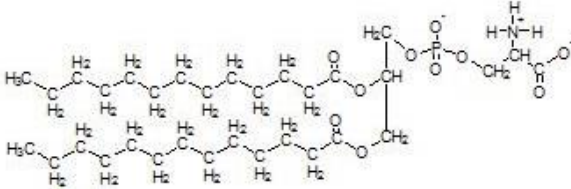
(isobutiriloxi)-N,N-dimetiletanamônio] zwitteriônico (HDAS-PCH), em que se comprovou a sua sobrehidrofilicidade, o potencial zeta negativo, a ativação do complemento reduzida e o melhoramento da persistência de circulação dos lipossomas [10].

4.1.2. Formação de lipopolímeros usando diferentes fosfolípidos

Como já foi referido, um fosfolípido é composto por diferentes grupos (cf. Figura 4; cap. II). Existem vários tipos de fosfolípidos (vd. tabela 1), naturais ou sintéticos, em que varia o seu grupo R, tais como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) e fosfatidilserina (PS) [40].

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Diferentes tipos de fosfolípidos e suas estruturas moleculares [11], [41], [42].

Fosfolípidos	Estrutura molecular
Fosfatidilcolina	
Fosfatidiletanolamina	
Fosfatidilinositol	
Ácido Fosfatídico	
Fosfatidilserina	

Como o grupo característico (grupo R) de cada fosfolípido é diferente, a ligação do lípido ao polímero também será diferente. Isto é, podem ser utilizados diferentes grupos para promover reações com outras espécies, no caso da fosfatidilcolina, a ligação pode ocorrer através do grupo $[N^+(\text{CH}_3)_3]$, na fosfatidiletanolamina através do grupo $[\text{NH}_3^+]$, na fosfatidilinositol através do grupo $[(\text{OH})_5]$, no ácido fosfatídico através do grupo $[\text{OH}]$ e na fosfatidilserina através do grupo $[\text{NH}_3^+\text{COO}^-]$. Contudo, a ligação entre o fosfolípido e o

polímero vai depender da densidade eletrônica do grupo pelo qual ocorre a ligação. Por exemplo, pode considerar-se que a fosfatidilcolina está mais protegida do que a fosfatidiletanolamina e como tal, no segundo a ligação é mais favorável de ocorrer, por possuir maior polaridade.

5. SISTEMA LIPÍDICO

Como foi referido na seção 2.1. (cf. cap II), o sistema lipídico de um complexo lípido-polímero, é constituído por fosfolípidos, mais precisamente lecitina de soja.

5.1. Lecitina de Soja

A lecitina é um constituinte maioritário da membrana celular, que permite o contato entre a fase aquosa e os lípidos no interior e exterior da membrana. Tem propriedades emulsionantes e é aplicável nas áreas farmacêutica, alimentar e cosmética [23]. É um lípido complexo de glicerol. Neste caso específico, é formado por uma mistura de vários compostos, entre os quais fosfolípidos, como se pode verificar na tabela 2.

Tabela 2 - Constituição da Lecitina de soja [41], [42].

Compostos	Quantidade (%)	Fórmula molecular
Fosfatidilcolina (PC)	19-21	-[CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃]
Fosfatidiletanolamina (PE)	8-20	-[CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺]
Fosfatidilinositol (PI)	20-21	-[HC ₆ H ₅ (OH) ₅]
Outros fosfolípidos (e.g. Fosfatídiácido – PA)	5-11	-[H]
Óleo de soja	33-35	-
Esteróis	2-5	-
Hidratos de Carbono	5	-
Humidade	1	-

Neste trabalho, foi utilizada a lecitina de soja (mistura de fosfolípidos) devido à sua biocompatibilidade, facilidade de interação com as moléculas das membranas celulares, para além dos lipossomas constituídos por este fosfolípido apresentarem dimensões reduzidas, como pretendido e maiores eficiências de encapsulação [43]. As quantidades de fosfatidilcolina,

fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol são muito semelhantes. Sendo assim, foi possível postular que a formação da ligação lípido-polímero pode ser promovida através da interação entre o grupo amina protonado $[\text{NH}_3^+]$ da fosfatidiletanolamina e o grupo carboxílico $[\text{COOH}]$ do polímero modificado.

6. SISTEMA POLIMÉRICO

Polímeros são macromoléculas constituídas pela repetição de unidades designados monómeros. Podem ser classificados em termos de origem (e.g. natural, artificial ou sintético), estrutura (e.g. linear, ramificada ou reticulada), composição (e.g. homopolímero ou copolímero aleatório, alternado, de bloco ou de enxerto), propriedades mecânicas, mecanismo de polimerização, técnicas preparativas ou comportamento térmico (e.g. Termoplásticos, Termoendurecíveis ou Elastómeros) [38].

Neste caso de estudo serão considerados vários polímeros (sistemas poliméricos), para diferentes cenários de complexos lípido-polímero. Pretende-se estudar o poli(dimetilaminoetil-2-metacrilato), PDMAEMA, como alternativa ao PEG. Esta decisão foi fundamentada em trabalhos [14], [44] realizados sobre o polímero referido, que apresenta características necessárias, referidas posteriormente, para se atingir a finalidade do estudo.

Poli(etilenoglicol), PEG

O PEG (vd. figura 14) tem sido utilizado em grandes avanços tecnológicos devido a inúmeras vantagens que este possui. Destaca-se o facto de ser não iónico e de possuir elevada solubilidade em meios aquosos e orgânicos. Possui excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade, imunogenicidade, antigenicidade baixa e boa cinética de excreção. Além disso, o PEG pode ser sintetizado com uma vasta gama de pesos moleculares e com um baixo índice de polidispersidade, PDI (inferior a 1,1) [10]. É considerado um dos melhores polímeros para complexos lípido-polímero, pois permite uma longa circulação de nanotransportadores, com uma circulação de meia-vida de 45 h em seres humanos. Acredita-se que inibe a interação não-específica e específica de proteínas na superfície dos lipossomas.

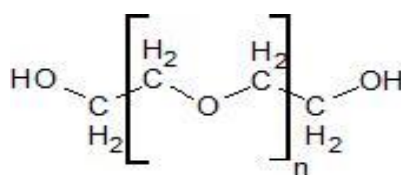


Figura 14 - Estrutura molecular do PEG.

Neste caso e como se pretende a existência de um grupo funcional [COOH] na cadeia polimérica do PEG, para que ocorra a ligação pretendida, o polímero modificado utilizado foi o poli(etilenoglicol)bis(carboximetil)éter (vd. figura 15), que contém um grupo carboxílico em cada terminal.

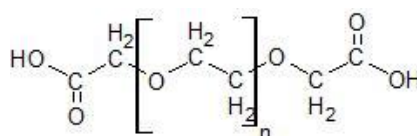


Figura 15 - Estrutura molecular do Poli(etilenoglicol)bis(carboximetil)éter.

Poli (N,N- dimetilaminoetil metacrilato), PDMAEMA

O PDMAEMA (vd. figura 16) é uma molécula anfifílica, composta por metacrilato, um substituinte que contém o poli(ácido 2-etilacrílico), que pode conduzir a uma desestabilização dos lipossomas consoante a temperatura ou a alterações do pH [14]. Devido à sua biodegradabilidade, o PDMAEMA é muito utilizado no transporte de fármacos [45].

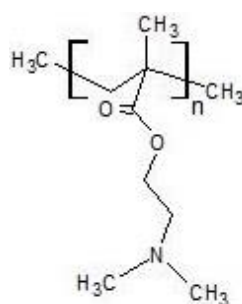


Figura 16 - Estrutura molecular do PDMAEMA.

6.1. Mecanismos de Polimerização

Os mecanismos de polimerização, podem ser divididos em reações de crescimento em cadeia ou reação gradual. As reações de crescimento em cadeia ocorrem quando o monómero é ativado e a reação se propaga através da ativação de outros monómeros. Esta reação caracteriza-se por ser rápida, alcançar pesos moleculares elevados, e por o monómero ativado poder ser uma espécie iônica (ânion ou cátion) ou um radical livre. Consiste em três passos, iniciação (formação de sítio reativo a partir de iniciador e monómero), propagação da reação a partir dos centros reativos e terminação [46-48]. A polimerização por reação gradual ocorre por etapas e geralmente, envolve a combinação de dois ou mais monómeros distintos. Alguns exemplos finais dessas combinações são: poliésteres, poliamidas, policarbonatos, poliimidas, polisiloxanos e polisulfonas.

6.1.1. Polimerização Radicalar Livre (FRP)

A polimerização radicalar livre consiste em três etapas (vd. figura 17): 1) Iniciação, subdividida em dissociação do iniciador (I-I) em duas espécies radicalares ($I\cdot$), seguida da associação de um monómero (M); 2) Propagação, em que o monómero é continuamente a ser adicionado aos radicais em crescimento; 3) Terminação, que pode ser de duas formas, por combinação ou dismutação; a primeira consiste na combinação de dois radicais ativos ($IM_n\cdot$ e $IM_m\cdot$) de cadeias em propagação e a segunda na transferência de elétrons de duas cadeias em propagação ($IM_n\cdot$ e $IM_m\cdot$) [49]. Esta polimerização ocorre nas cadeias reativas em crescimento e conseqüentemente, obtêm-se polímeros com altos pesos moleculares para baixas percentagens de conversão e existe sempre monómero em quantidades significativas durante todo o processo [46-49].

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

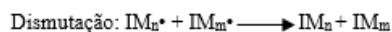
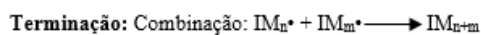
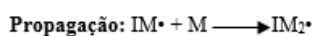
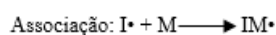
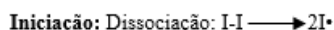


Figura 17 - Representação esquemática da polimerização radicalar livre. Adaptado de [49].

6.1.2. Polimerização Radicalar Viva (LRP)

A polimerização radicalar viva é definida como um processo de crescimento de cadeia onde não ocorrem reações de terminação, e permite a síntese de polímeros e copolímeros bem definidos e de baixa polidispersividade através de diversas técnicas de polimerização de radicais. Esta polimerização ocorre por reação de adição sequencial com grupos terminais de cadeia ativos, no entanto, de forma a garantir o controle da polimerização e a estreita distribuição do peso molecular do polímero, é necessário que o iniciador seja completamente consumido no início da reação e a velocidade da reação que conduz à formação de espécies ativas tem de ser igual à de formação de espécies dormentes, garantindo assim uma baixa concentração de radicais. Nesta técnica de polimerização radicalar todas as cadeias crescem ao mesmo tempo e a uma velocidade semelhante [46-49], uma vez que a vida de um radical ativo é pequena, a probabilidade de ocorrência de reações de terminação é baixa, o que leva ao aumento linear do peso molecular do polímero com a conversão e a uma baixa polidispersividade, características dos sistemas LRP.

Existem várias técnicas de LRP, mas todas elas necessitam da existência de equilíbrio entre espécies ativas e espécies dormentes (vd. figura 18), controlando o peso molecular do polímero. A diferença entre elas reside na estratégia usada para obter esse equilíbrio dinâmico: i) ativação/desativação reversível de radicais, onde existe o efeito de radical persistente (efeito de auto-regulação), em que, inicialmente existem algumas terminações radical-radical e, conseqüentemente, aumenta a quantidade da espécie desativadora em comparação com a quantidade de radicais em crescimento, deslocando o equilíbrio dinâmico no sentido das espécies dormentes, não necessitando de um iniciador de radical, visto que os radicais de propagação são produzidos na etapa de ativação. A Polimerização Radicalar por Transferência

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atômica (ATRP) e a Polimerização Radicalar Livre Estável (SFRP) são regidas por este princípio; ii) processo degenerativo de transferência reversível de cadeia, em que o equilíbrio é mantido por transferência de cadeia entre as cadeias poliméricas em crescimento e os agentes de transferência. Neste caso é necessário um iniciador que forme radicais como é o caso da polimerização por Transferência de Cadeia Adição-Fragmentação Reversível (RAFT) e por Transferência de Cadeia Degenerativa (DCT).



Figura 18 - Equilíbrio entre espécies dormentes e ativas. Adaptado de [49].

Neste trabalho foi selecionada a polimerização radicalar viva por ATRP uma vez que se trata de um método simples e versátil, pelo que será a única técnica de LRP descrita em maior pormenor.

6.1.2.1. ATRP

A técnica ATRP envolve um metal de transição (Mt^n), que pode aumentar o seu número de oxidação, um ligante (L) e um iniciador (haletos de alquila). O complexo de metal de transição (Mt^n/L) transfere um átomo halogenado (X) a um complexo de propagação macroradical. O ligante forma um complexo com o elemento metálico e dissolve o catalisador no solvente. A reação inicia-se pela ativação da cadeia halogenada (P_n-X), através da abstração do halogênio pelo centro metálico (Mt^n/L) formando uma espécie iniciadora de radical (P_n^{\bullet}) e um complexo metálico oxidado (Mt^{n+1}/L), desativador (vd. figura 19). Posteriormente, a espécie iniciadora de radical adiciona-se a um monómero ou reage com o complexo metálico de maior estado de oxidação, levando à formação de espécies dormentes [49]. Quanto mais rápido o equilíbrio termodinâmico, maior o controlo do peso molecular do polímero durante a reação. Através do equilíbrio redox a polimerização é controlada e este é deslocado para as espécies dormentes, o que consequentemente, impede que ocorram reações de terminação de radical, formando radicais ativos de baixa concentração. Devido às vantagens do cobre (barato, muito reativo e fácil de manusear), foi o material escolhido como catalisador neste estudo.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

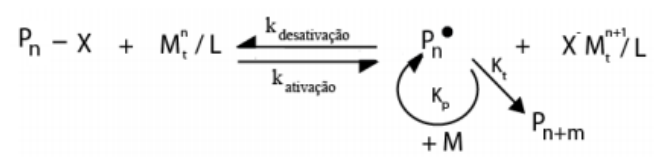


Figura 19 - Equilíbrio químico ATRP. Adaptado de [49].

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAIS

Os compostos utilizados para a realização deste estudo experimental resumem-se a seguir: N,N – diciclohexilcarbodiimida, DCDI (Sigma – Aldrich; Sintra, Portugal; 99%); clorofórmio, CF (VWR, Chemicals; France; 99,3%); poli(etilenoglicol)bis(carboximetil)éter, COOH-PEG-COOH (Sigma – Aldrich; Sintra, Portugal; Mn 600); lecitina, LC (Acros Organics; New Jersey, USA; granular; Mw 750); ácido glicólico, GA (Sigma – Aldrich; Sintra, Portugal; 98%); brometo de 2-bromoisobutirato, 2-BiB (Alfa Aesar; Karlsruhe, Germany; 97%); n-hexano (VWR, Chemicals; France; 96%); n-pentametildietilenetriamina, PMDETA (Alfa Aesar; Karlsruhe, Germany; 98%); tetrahidrofurano, THF (VWR Chemicals; France; 99,6%); N-(3 –dimetilaminopropil-N’-etilcarbodiiminahidrocloreto, EDCI (Sigma - Aldrich; Sintra, Portugal; 98%); ácido 2-bromo-2-metilpropiónico, Br-MPA (Sigma – Aldrich; Sintra, Portugal; 98%), dimetilformamida, DMF (Fisher Chemical; UK; 99,92%), Triton X-100 (Sigma – Aldrich; Sintra, Portugal) e clorofórmio deuterado, CDCl₃ (Sigma - Aldrich; Sintra, Portugal; 99,8%) foram utilizados como adquiridos. O CuBr (I) (Sigma - Aldrich; Sintra, Portugal) foi purificado com acetona, Ac (VWR, Chemicals; France; 100%) e ácido acético glacial (VWR, Chemicals; France; Mw 60,05) antes de ser usado para a polimerização. A trietilamina, TEA (Merck; Darmstadt, Germany; 99%) e o diclorometano (VWR, Chemicals; France; 100%) foram previamente destilados antes de utilizados. O 4-(dimetilamino)piridina, DMAP (Merck; Darmstadt, Germany; 99%) foi previamente recristalizado em tolueno antes de ser utilizado. O 2-(dimetilaminoetil)metacrilato, DMAEMA (Merck; Darmstadt, Germany; 99%) foi purificado em colunas de sílica-alumina antes de ser utilizado nas polimerizações, para remoção dos estabilizantes. A solução de ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazino)etanosulfónico, HEPES (Fisher Scientific; Fair Lawn, New Jersey) a 50 mM, em água MilliQ, foi previamente preparada e o seu pH foi neutralizado com hidróxido de sódio, NaOH (Chem-Lab NV; Zedelgem, Belgium) ou ácido clorídrico, HCl (AppliChem Panreac ITW Companies; Germany). A solução de *Fluorexon calcein* (Acros Organics; New Jersey, USA) a 60 mM em

HEPES foi previamente preparada e o seu pH foi neutralizado com hidróxido de sódio, NaOH ou ácido clorídrico, HCl. O colesterol-Br, CHO-Br foi sintetizado em laboratório através da esterificação do colesterol (Alfa Aesar; Karlsruhe, Germany; 95%).

2. EQUIPAMENTOS

A lista de equipamentos usados para a realização deste estudo resume-se a seguir: A balança de precisão (Sartorius – Entris), Vórtex (Barnstead – Thermolyne), evaporador rotativo (Büchi Rotavapor R-114 – Rotoquímica), incubadora (Laboshake – Gerhardt), centrífuga (Rotofix 32 A – Hettich, Zentrifugen), liofilizador (Snjders Scientific – Lilburg Holland), liofilizador (Alpha 1-2 LD plus – Christ), estufa de vácuo (Vacucell – MMM Group), estufa (Venticell – MMM Group), estufa (WTBbinder – Tuttlingen, Germany), incubadora (Orbital Incubator – Stuart), medidor de pH (inoLab – WTW), centrífuga (Universal 32 – Hettich – Zentrifugen), espectrofotómetro (Jasco V-550 – UV/VIS Spectrophotometer), GPC (Viscotek, GPC max – VE 2001 GPC Solvente/Sample module), espectrómetro RMN (Bruker Avance III de 400 MHz), espectroscópio FTIR (Jasco FT/IR – 4200), DLS (Zetasizer Nano ZS – Malvern Instruments), espectrofluorímetro (ScanSci, Ocean Optics, Quantum Northwest) e microscópio eletrónico de transmissão (JEOL JEM 1400).

3. TÉCNICAS

3.1. Cromatografia de Permeação de Gel (GPC)

A Cromatografia de Permeação de Gel (GPC) permite avaliar e quantificar a distribuição de pesos moleculares, tanto numéricos (M_n), como ponderais (M_w), assim como a polidispersividade dos polímeros. Esta técnica consiste na separação de moléculas com base no seu raio/volume hidrodinâmico [50], [51]. Neste trabalho recorreu-se a um equipamento Viscotek (GPCmax VE2001), em que foi utilizada a cromatografia de elevado desempenho de exclusão

de tamanho, HPSEC, com detecção do índice de refração, RI. A análise das amostras foi feita a 60 °C em DMF com 0,3% de brometo de lítio, LiBr. As amostras previamente purificadas e dissolvidas em DMF são injetadas e de seguida passam numa coluna porosa de material polimérico reticulado, onde são separadas de acordo com o seu volume. As partículas mais pequenas têm dificuldade em entrar nos poros da coluna, por isso são momentaneamente removidas do fluxo principal de solvente e necessitam de mais tempo para atravessar a coluna. As partículas passam por diferentes detetores, em que a dimensão da análise depende do tipo e número de detetores e das calibrações e cálculos utilizados para determinar os parâmetros pretendidos. O caudal de DMF é mantido a 1 mL/min por auxílio de uma bomba de cromatografia líquida de alta performance, HPLC. Os resultados são analisados através do *software OmniSEC* e de uma curva de calibração obtida por padrões de polímero (PMMA), de peso molecular conhecido e polidispersividade baixa [49], [52].

3.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) permite fazer estudos não destrutivos e quantitativos de moléculas em solução, em estado sólido e em fluidos biológicos [53]. No caso de soluções, são geralmente usados solventes deuterados, neste trabalho foi utilizado clorofórmio deuterado. Esta técnica permite determinar a estrutura e composição químicas das moléculas. Para se obter um espectro RMN, uma amostra é colocada num campo magnético de um espectrómetro, na qual incide um campo de radiofrequência, rf. Conforme se aumenta o campo magnético, deteta-se a excitação dos núcleos, resultando numa absorção de energia no campo de radiofrequências. O espectrómetro RMN ao detetar esses sinais apresenta-os como um gráfico de voltagem induzida *versus* varrimento do campo magnético [49]. Neste trabalho foi utilizado um Espetrómetro Bruker Avance III de 400 MHz e os espectros obtidos foram analisados com base no *software* MestRenova®.

3.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) é essencial para caraterizar e analisar diversos tipos de substâncias, tendo

a capacidade de obter espectros a partir de uma ampla diversidade de sólidos, líquidos e gases. Consequentemente, permite identificar materiais desconhecidos, determinar a qualidade ou a consistência de uma amostra e determinar os componentes de uma mistura. Os espectros são obtidos através da transmissão de radiação infravermelha diretamente na amostra. Uma parte da radiação é absorvida pela amostra, enquanto a outra é transmitida por esta, criando assim uma “impressão digital” da amostra, espectros de absorvância e/ou de transmitância. Posteriormente, a identificação dos picos dos espectros baseia-se na Lei de *Beer* e no método dos mínimos quadrados, por comparação de composições e concentrações conhecidas [54], [55]. Neste trabalho experimental foi utilizado o equipamento FT/IR-4200 da Jasco Analytical Instruments, com o auxílio do *software Spectra Manager*. Este tipo de análise torna-se vantajosa porque para além de só se precisar de cerca de 5-10 mg de amostra para se realizar a análise, esta pode ser recuperada no fim, visto não ser degradada durante a análise.

3.4. Dispersão de Luz Dinâmica (DLS)

A técnica DLS permite determinar o tamanho, a polidispersividade, o potencial zeta, a viscosidade e a viscoelasticidade, de partículas com diâmetros entre 0,3 nm e 10µm. Esta técnica utiliza o sistema *Non-Invasive Voltar Scatter* (NIBS) que maximiza a deteção da luz dispersa. Mede a difusão de partículas que se movem segundo o movimento browniano, e converte-a numa distribuição de tamanhos, recorrendo à relação de *Stokes-Einstein*. Para medir o potencial zeta, o equipamento recorre à técnica *Laser Doppler Micro-electrophoresis* (LDM), que mede pesos moleculares abaixo de 980 Da e ao método, *Phase Analysis Light Scattering* (M3-PALS), que mede a velocidade das partículas sob um campo elétrico, permitindo calcular a mobilidade eletroforética correspondente a um determinado valor de potencial zeta [56], [57]. Neste trabalho experimental foi utilizado um *Zetasizer Nano ZS* da Malvern Instruments, que permite analisar os parâmetros (tamanhos, potencial zeta e polidispersividade dos lipossomas) a diferentes temperaturas (neste caso, a 37°C).

3.5. Espectrofluorimetria

A Espectrofluorimetria ou Espectroscopia de Fluorescência tem vantagens que acentuam o seu uso, como a sensibilidade, a especificidade das características da fluorescência dado ao microambiente da molécula emissora e a capacidade de fornecer informação temporal e

espacial. A fluorescência de uma amostra é obtida através de espectros de absorção que representam a intensidade da luz emitida em função dos comprimentos de onda medidos, usando a Lei de *Beer-Lambert* [58], [59]. Através de uma fibra ótica, o feixe de luz incide na amostra, enquanto uma segunda fibra ótica leva a luz emitida pelo mesmo ao espectralfluorímetro [60]. Com base na seleção do comprimento de onda de excitação da substância a analisar, o equipamento fornece a intensidade de luz emitida em função do tempo e conseqüentemente, são traçados os perfis de libertação e calculada a eficiência de encapsulação dos fármacos. Neste trabalho, utilizou-se a espectralfluorimetria para se obter os perfis de libertação dos lipossomas e o equipamento utilizado é constituído por uma unidade ScanSpec Fluorescence – VIS da ScanSci, uma fonte de luz DH-2000 da Ocean Optics, um suporte de cuvetes com duas fibras óticas, numa configuração a 90°, e um controlador de temperatura da Quantum Northwest [61] e os espectros obtidos foram processados pelo *software SpectraScan*.

3.6. Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM)

A Microscopia Eletrónica de Transmissão, TEM, envolve um feixe de eletrões que interage com a amostra à medida que passa através da espessura da mesma. Produz uma imagem da totalidade do objeto, incluindo a superfície e a estrutura interna, permitindo a obtenção de uma imagem com maior resolução. As amostras são colocadas em grelhas com um revestimento de carbono para que a luz seja capaz de as atravessar. Numa coluna sob vácuo, um feixe de eletrões condensado por uma lente condensadora, incide sobre a amostra. Ao atravessar a amostra, os eletrões são desviados uns mais do que outros e o feixe com os desvios é dispersado pela lente. Seguidamente, a imagem é projetada sobre um ecrã fluorescente, emitindo fótons e conseqüentemente possibilitando a visualização da imagem das substâncias analisadas que posteriormente serão digitalizadas em computador [62]. Neste trabalho, utilizou-se o microscópio eletrónico de transmissão para se observar a morfologia dos lipossomas e o equipamento utilizado foi o JEOL JEM 1400, com uma câmara da Gatan SC1000 Orius™ CCD.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Numa primeira fase, foram preparados lipossomas apenas com os lipopolímeros sintetizados com COOH-PEG-COOH. Estes foram obtidos através da hidratação dos lipopolímeros lecitina-PEG-COOH pela adição de uma solução tampão de HEPES (vd. figura 20).

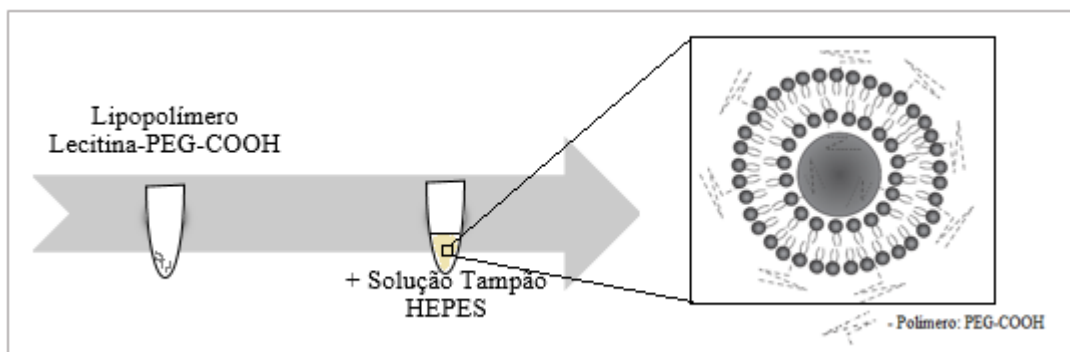


Figura 20 - Representação esquemática da produção de lipossomas com o lipopolímero Lecitina-PEG-COOH.

Numa segunda fase e devido às dificuldades que surgiram na síntese de polímeros de PDMAEMA modificados, os lipossomas foram obtidos através da hidratação pela adição de uma solução tampão de HEPES, aos lipopolímeros lecitina-PEG-COOH com CHO-PDMAEMA a diferentes concentrações (vd. figura 21).

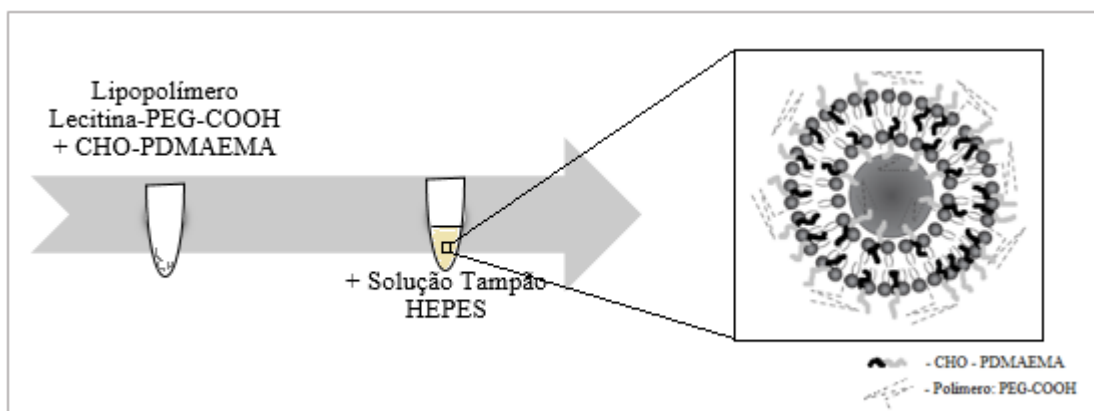


Figura 21 - Representação esquemática da produção de lipossomas com Lecitina-PEG-COOH e CHO-PDMAEMA.

4.1. Preparação de Lipopolímeros com COOH-PEG-COOH

A síntese de lecitina-PEG-COOH realizou-se através da reação entre o poli(etilenoglicol)bis(carboximetil)éter e a lecitina de soja – *coupling* carbodiimidas (vd. figura 22). Na figura 22, apenas se observa o mecanismo esquemático da reação, visto que esta foi realizada por dois procedimentos diferentes e as condições (e.g. tempo de reação, temperatura, carbodiimidas, solvente) não foram iguais em ambos, como será descrito de seguida [63-65].

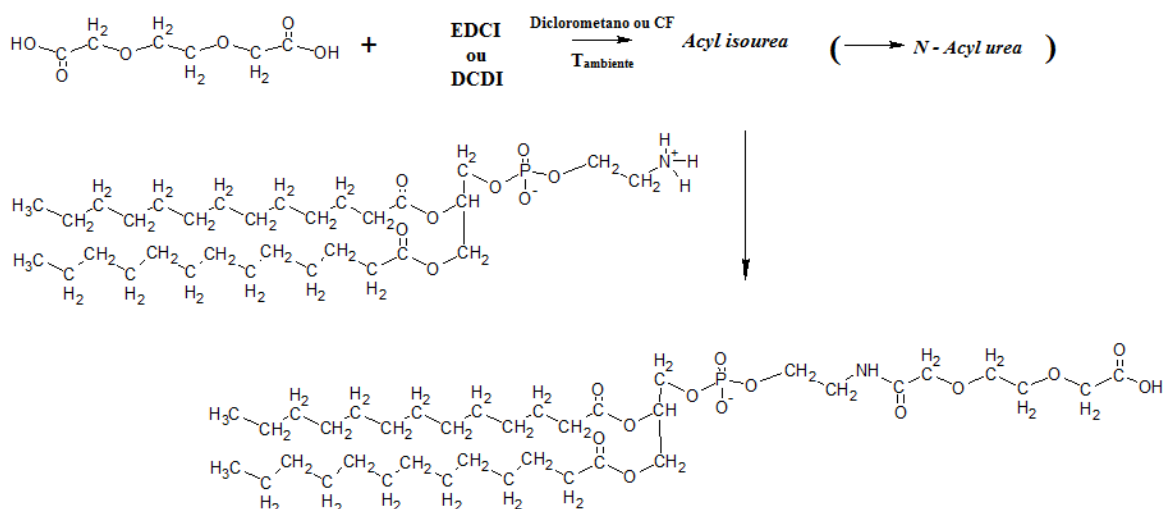


Figura 22 - Representação esquemática da síntese de Lecitina-PEG-COOH.

4.1.1. Síntese de Lecitina-PEG-COOH: Alternativa I

Recorrendo à literatura [20] e de forma a ser possível a análise e comparação de resultados, foram feitas duas reações em simultâneo, com diferentes quantidades de reagentes envolvidos. As reações basearam-se em quantidades estabelecidas na literatura [20], e as outras reações naquelas quantidades multiplicadas por um fator de 10. Foram ainda feitas reações com diferentes tempos de reação (com uma duração de 7 dias, de 3 dias e de um dia e meio). Inicialmente, foi pesada uma solução de DCDI (5,7 mM), à qual se juntaram 50 ml de clorofórmio. Num balão de fundo redondo de 100 ml foi introduzido um agitador magnético, ao qual se juntou a mistura referida no passo anterior, e, posteriormente, adicionada uma

solução de COOH-PEG-COOH (0,57 mM). De seguida, o balão foi colocado numa placa de aquecimento durante 4 horas, sob agitação.

Foi pesada uma solução de LC (0,3 mM), à qual se juntou 10 ml de clorofórmio. Posteriormente, foi introduzida uma solução de TEA (1 mM). Por fim, esta solução foi adicionada à descrita no parágrafo anterior e colocada na incubadora a 25°C, durante 7 dias/3dias/1 dia e meio. De forma a purificar a solução obtida, foram usadas colunas de sílica-alumina. Para ser possível a evaporação do clorofórmio ainda existente em solução, foi necessário a utilização do evaporador rotativo. O aspeto final do lipopolímero pode ser descrito como um sólido branco viscoso. Para comprovar que a síntese realmente ocorreu, o lipopolímero foi analisado por H-RMN e FTIR-ATR (cf. figuras 38-54; Apêndice A).

4.1.2. Síntese de Lecitina-PEG-COOH: Alternativa II

Como o procedimento anterior tinha um tempo de reação muito elevado (7 dias) foi realizada uma alternativa ao procedimento anteriormente descrito, com diferentes concentrações de reagentes e tempo de reação também diferente, adaptado de [66]. O procedimento da alternativa II descreve-se de seguida.

Num Erlenmyer de 50 ml, foi adicionada de LC (1 mM) com EDCI (1,5 mM), com TEA (1,35 mM), em 20 ml diclorometano e COOH-PEG-COOH (1 mM) a 0°C. De seguida, a solução foi agitada durante 3 horas, à temperatura ambiente. Por fim, foi dializada¹ durante 5 dias, foi congelada e posteriormente liofilizada², obtendo-se um sólido amarelo viscoso. Para comprovar que a síntese realmente ocorreu, o lipopolímero foi analisado por H-RMN e FTIR-ATR (cf. figuras 55-59; Apêndice B).

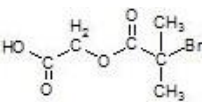
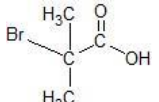
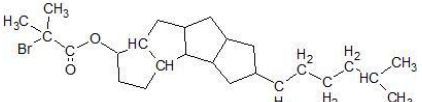
¹ A diálise por membrana é um processo em que as moléculas são separadas através de uma membrana semipermeável, seletiva ao peso molecular das partículas [83].

² A liofilização é uma técnica de secagem que promove a remoção da água por sublimação. Isto é, o material é congelado e submetido a baixas pressões. De seguida, em câmaras herméticas o ar é removido por bombas de alto vácuo, ocorrendo a sublimação [84].

4.2. Preparação de Lipopolímeros com PDMAEMA

Para a realização de sínteses de polímeros de PDMAEMA modificados, através da polimerização radicalar por transferência atômica, ATRP, utilizaram-se diferentes iniciadores (vd. tabela 3).

Tabela 3 - Diferentes iniciadores utilizados na síntese de polímeros de PDMAEMA modificados.

Iniciadores		
Ácido glicólico-2-bromoisobutirato	Ácido 2-bromo-2-metilpropiónico	CHO-Br
		

4.2.1. Síntese do iniciador ácido glicólico-2-bromoisobutirato

A síntese do iniciador ácido glicólico-2-bromoisobutirato foi feita por esterificação de ácido glicólico com etil α -bromoisobutirato (vd. figura 23).

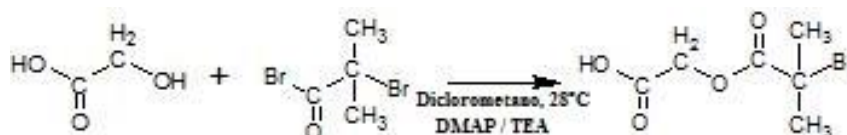


Figura 23 - Representação esquemática da esterificação do ácido glicólico.

Num balão de fundo redondo de 500 ml com três tubuladuras, condensador, agitador magnético, entrada e saída de azoto e uma ampola de adição, foi introduzido DMAP (7,5 mM) recristalizado em tolueno, TEA (5 mM), previamente destilada a vácuo e 10 ml de diclorometano destilado, num banho a 0°C. De seguida, foram adicionados novamente gota-a-gota 10 ml de diclorometano e também adicionado, gota-a-gota, 2-BiBB (12,5 mM), tornando a solução resultante amarela. Por fim, foram adicionados gota-a-gota e o mais lentamente possível, 50 ml de diclorometano com GA (2,5 mM) dissolvido. A reação decorreu sob agitação durante 24h, em atmosfera inerte e a 28°C, obtendo-se um líquido translúcido acastanhado.

III. PARTE EXPERIMENTAL

É necessário que a reação ocorra com uma entrada e saída contínua de azoto de forma a garantir uma atmosfera inerte, no interior do balão. No fim, a ampola foi retirada, o balão isolado e a entrada e saída de azoto removidas.

A solução obtida foi transferida para um balão de fundo redondo para evaporar (num evaporador rotativo) cerca de metade do diclorometano. De seguida, o iniciador foi purificado em colunas de sílica-alumina, precipitado gota-a-gota numa solução de n-hexano, filtrado e colocada na estufa a 30°C, durante 24h, sob vácuo, obtendo-se um sólido branco. Para comprovar que a síntese realmente ocorreu, o iniciador foi analisado por H-RMN e FTIR-ATR (cf. figura 60; Apêndice C).

4.2.2. Síntese de COOH-PDMAEMA e CHO-PDMAEMA

As sínteses dos polímeros de PDMAEMA modificados (vd. figuras 24 a 26) foram análogas e realizadas com os três iniciadores diferentes (vd. tabela 3) referidos anteriormente.

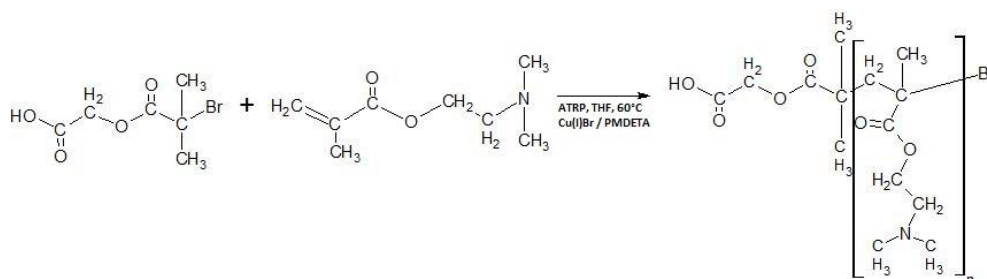


Figura 24 - Representação esquemática da síntese de COOH-PDMAEMA-Br com o ácido glicólico-2-bromoisobutirato.

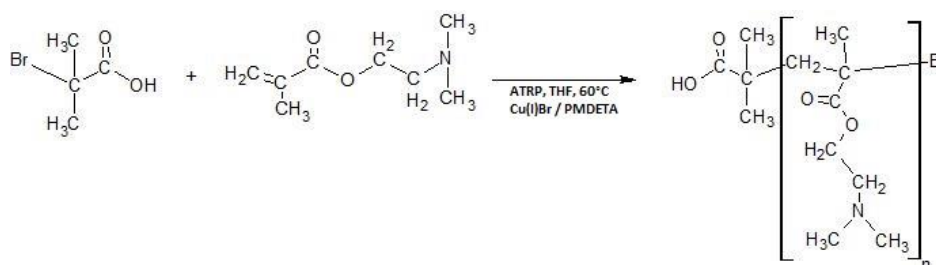


Figura 25 - Representação esquemática da síntese de COOH-PDMAEMA-Br com o ácido 2-bromo-2-metilpropiónico.

III. PARTE EXPERIMENTAL

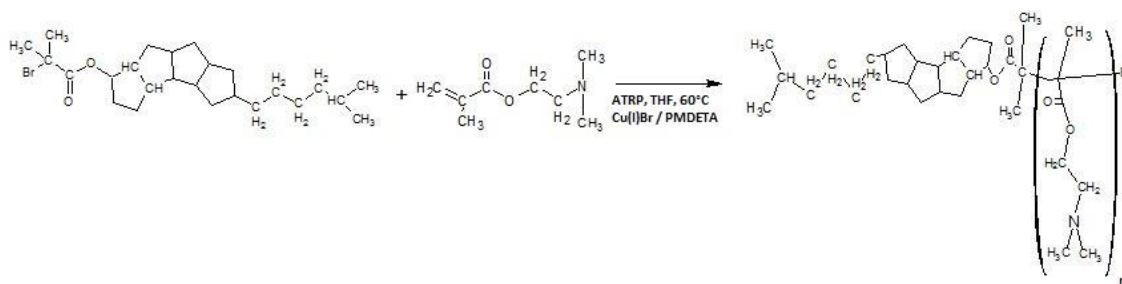


Figura 26 - Representação esquemática da síntese de COOH-PDMAEMA-Br com o CHO-Br.

Para a síntese dos polímeros de PDMAEMA modificados foram adicionados cada iniciador num reator *Schlenk* na proporção (0,41 mM) e o DMAEMA (12,7 mM).

Depois de congelar a mistura com recurso a azoto líquido foi adicionada ao reator o CuBr (I) (0,41 mM) e PMDETA (0,82 mM) em 2,14 ml de THF, homogeneizada com o auxílio de um vortex. O conteúdo do reator foi novamente congelado e posteriormente preenchido com azoto antes e depois da sua degaseificação. Posteriormente, o reator foi colocado numa placa de aquecimento a 60°C, durante 24 horas. No fim da polimerização, juntou-se à mistura reacional THF e foi purificada a solução obtida em colunas de sílica-alumina. Para comprovar que as sínteses realmente ocorreram, os parâmetros dos polímeros foram analisados por GPC (cf. tabelas 4 e 5; cap. IV). O polímero obtido com o iniciador CHO-Br, foi purificado através de diálise por membrana e posteriormente liofilizado. O produto obtido pode ser caracterizado como um pó branco. Para comprovar que a síntese realmente ocorreu, os parâmetros do polímero foram analisados por GPC (cf, tabela 6; cap. IV) e FTIR (cf. figura 61; Apêndice D).

4.3. Preparação de lipossomas

4.3.1. Preparação de lipossomas convencionais

Para preparar os lipossomas convencionais foi introduzida num tubo de ensaio com aproximadamente 1 cm de diâmetro, 100 μl uma solução de lecitina dissolvida em clorofórmio (4 mg/ml). De seguida, com o auxílio de ar comprimido, o clorofórmio foi evaporado obtendo-se um filme fino de lípido no fundo de cada tubo de ensaio. Posteriormente, os filmes foram hidratados com tampão HEPES (50 mM, pH=7) e 3 esferas de vidro ($D \approx 3\text{mm}$). Por fim, a mistura foi agitada com o auxílio de um vortex e colocada numa incubadora a 37°C durante 15 horas [34].

4.3.2. Preparação de lipossomas com o lipopolímero Lecitina-PEG-COOH

O procedimento de preparação dos lipossomas foi semelhante ao anterior, à exceção da solução a adicionar, solução do lipopolímero lecitina-PEG-COOH dissolvida em clorofórmio (8mg/ml), ao invés de lecitina dissolvida em clorofórmio [34].

4.3.3. Preparação de lipossomas com o lipopolímero Lecitina-PEG-COOH com incorporação de CHO-PDMAEMA

O procedimento de preparação dos lipossomas foi semelhante aos anteriores, à exceção de que para além de se adicionar uma solução do lipopolímero lecitina-PEG-COOH dissolvida em clorofórmio (8 mg/ml), também se adiciona em simultâneo a diferentes concentrações (nomeadamente 2,5%, 5% e 10%) uma solução de CHO-PDMAEMA dissolvida em clorofórmio (2 mg/ml) [34].

4.3.4. Preparação de lipossomas com o lipopolímero Lecitina-PEG-COOH com incorporação de CHO

O procedimento de preparação dos lipossomas foi semelhante aos anteriores, à exceção de que para além de se adicionar uma solução do lipopolímero lecitina-PEG-COOH dissolvida em clorofórmio (8 mg/ml), também se adiciona em simultâneo a diferentes concentrações (nomeadamente 2,5%, 5% e 10%) uma solução de CHO dissolvida em clorofórmio (0,125 mg/ml) [34].

Numa *cuvette* foi introduzido 1 ml de tampão HEPES (50 mM, pH=7) ao qual se adicionaram 200 µl de amostra, depois de homogeneizada com o auxílio do vortex. De seguida, foram analisadas todas as amostras no DLS, de modo a determinar o seu tamanho e polidispersividade. No caso da determinação do potencial zeta, as amostras utilizadas na determinação do tamanho e polidispersividade, foram homogeneizadas com o auxílio de uma pipeta e introduzidas em *capillary zeta cells*.

4.4. Encapsulação dos calceína nos lipossomas

Nos estudos de encapsulação e libertação dos lipossomas foi utilizada calceína ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$) como molécula fluorescente. Os filmes de lípido/lípolímero com e sem PDMAEMA foram preparados como anteriormente descrito e hidratados com uma solução de calceína a 60 mM e 3 esferas de vidro ($D \approx 3\text{mm}$). Depois de agitadas com o auxílio de um vortex, as amostras de lipossomas foram colocadas numa incubadora, protegidas da luz a 37°C , durante 15 horas.

Depois de retiradas da incubadora as amostras foram sujeitas a 3 ciclos de lavagem com tampão HEPES, por centrifugação, durante 20 minutos e a 8000 rpm, de forma a remover a calceína não encapsulada. No final, foram hidratados com tampão HEPES (50 mM, $\text{pH}=7$).

De seguida, numa *cuvette* foi introduzido 1 ml de tampão HEPES (50 mM, $\text{pH}=7$), ao qual se adicionou 10 μl de amostra. Com o auxílio de um espectrofluorímetro foram feitas leituras dos lipossomas e CPLs encapsulados com calceína ao longo do tempo e após o seu colapso através da adição de 20 μl de triton X-100.

4.5. Formulação de lipossomas para determinação da concentração de lípidos

Para determinar a concentração de lípidos, os lipossomas e os CPL foram preparados como anteriormente descrito (seção 4.3). Foi utilizado um espectrofotómetro e um *kit* de fosfolípidos CHO-POD, *Enzymatic colorimetric* da Spinreac. O procedimento seguido foi disponibilizado pelo próprio *kit* e encontra-se descrito no Apêndice E.

4.6. Preparação de CPL para avaliação da morfologia

Para determinar a estabilidade morfológica, os lipossomas e CPL foram preparados como anteriormente descrito (seção 4.3). Posteriormente, a amostra foi colocada numa grelha de carbono e o excesso da amostra foi retirado por um papel de filtro. Por fim, foi adicionada aos mesmos, uma solução de uranilo. Depois de retirado o excesso da solução de uranilo por um papel de filtro, as amostras foram analisadas por microscopia eletrónica de transmissão (TEM) [67].

4.7. Preparação de CPL para testes de conservação

Para determinar melhor forma de conservação, os lipossomas e CPL foram preparados como anteriormente descrito (seção 4.3) e armazenados durante 31 dias por duas formas diferentes: no congelador (-18°C) e à temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) depois de liofilizadas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. SÍNTESE DE LIPOPOLÍMEROS COM COOH-PEG-COOH

Para a síntese dos lipopolímeros com COOH-PEG-COOH seguiram-se os procedimentos descritos no capítulo anterior, mediante a reação entre um dos grupos carboxílicos [COOH] do polímero de PEG modificado e o grupo [NH₃⁺] da lecitina de soja (*coupling* carbodiimidas), resultando uma amida secundária [R-C(O)-NH-R] ^[63-65]. No entanto pode também ocorrer uma reação paralela com a formação de *N- Acyl urea* e como tal, são utilizados solventes com constantes dielétricas baixas, como o clorofórmio e o diclorometano, que retardam ou impedem esta mesma reação ^[63-65] (cf. figura 22; cap. III).

1.1. Lecitina-PEG-COOH: Alternativa I

Para a síntese do lipopolímero LC-PEG-COOH foram realizados vários ensaios com diferentes quantidades dos compostos e diferentes durações de reação, o que torna possível avaliar o efeito de escala nas reações em estudo e o efeito do tempo de reação.

A caracterização espectroscópica por FTIR de todas as reações descritas anteriormente e por RMN de reações com duração de 7 dias permitiu ajuizar sobre o sucesso das sínteses (vd. figuras 38-54; Apêndice A). Apesar de as reações 1-7 (com tempos de reação de 7 dias) partirem de quantidades diferentes de reagentes, foi possível confirmar pela análise dos espectros de RMN (vd. figura 27) resultados concordantes nos vários casos. Em todos eles se observam dois sinais de absorções de prótons do lipopolímero lecitina-PEG-COOH. Os sinais a $\delta=3,4$ ppm e $\delta=4,1$ ppm são referentes ao próton -H₂ do grupo -C(O)-NH-C-H₂ e CH₂-COOH, respetivamente, da cadeia do lipopolímero ^[68-73].

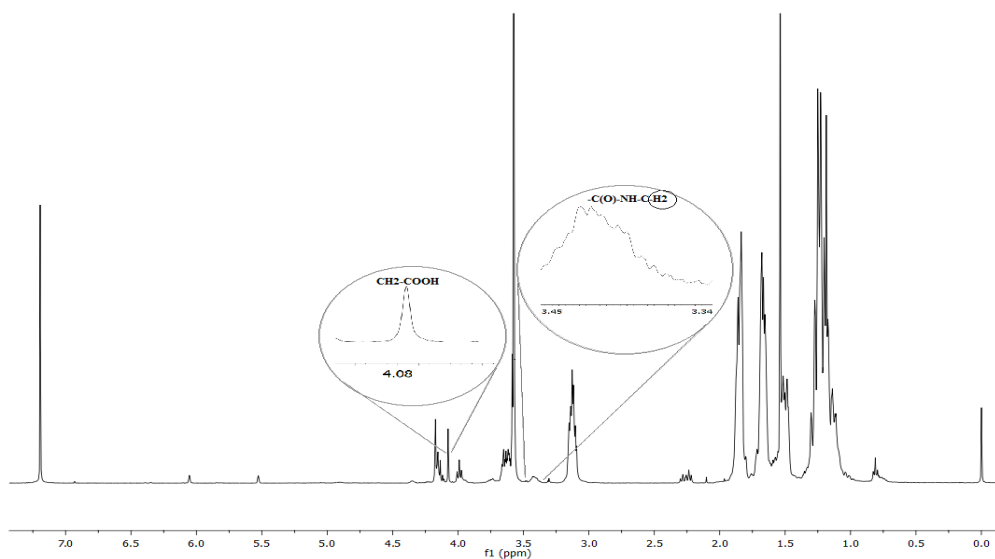


Figura 27 - Espectro de RMN em $CDCl_3$ da reação de Lecitina-PEG-COOH.

A análise dos espectros FTIR (vd. figura 28) conduz a conclusões semelhantes relativamente ao sucesso da síntese. Apesar de as reações não possuírem a mesma duração nem as mesmas quantidades de reagentes, todos os espectros exibem picos que comprovam a formação da ligação pretendida da lecitina-PEG-COOH. As atribuições mais relevantes são: C=N a 2150 cm^{-1} (devido à carbodiimida que não reagiu), de C=O a 1700 cm^{-1} , de C-N a 1500 cm^{-1} e o duplete NH a 1650 cm^{-1} , sendo este último considerado o pico de maior relevância para comprovar a ocorrência da síntese. Estes resultados são consistentes com o que é descrito na literatura ^[74-77]. No entanto, as reações com duração de 3 dias (reações 8 e 9) e 1 dia e meio (reações 10 e 11) não, revelaram-se incompletas visto que o aspeto do produto final se diferenciava dos restantes, caracterizadas por um sólido viscoso branco homogêneo. Nas reações 8, 9, 10 e 11 era visível um produto com duas fases não homogêneas, uma na forma de um líquido muito viscoso branco e a outra na de um líquido transparente. As reações envolvem espécies sensíveis - fosfolípidos – e tenderão a ser lentas, o que explica que o menor tempo de reação testado não tenha sido suficiente para que os compostos reagissem na totalidade.

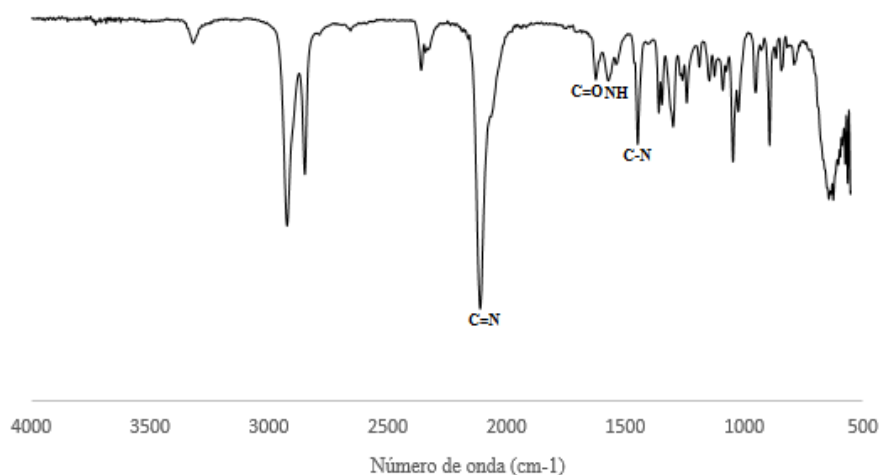


Figura 28 - Espectro FTIR de transmitância da reação Lecitina-PEG-COOH.

1.2. Lecitina-PEG-COOH: Alternativa II

De modo a conseguir analisar e verificar os resultados da síntese anterior com um tempo de reação menos extenso e um procedimento diferente, foi realizada uma alternativa a essa síntese, com base em quantidades estabelecidas na literatura [66].

À semelhança do caso anterior, a caracterização espectroscópica, por FTIR e por RMN permitiu ajuizar sobre o sucesso das sínteses (vd. figuras 55-59; Apêndice B). A análise do espectro de RMN (vd. figura 29) revela um sinal devido aos prótons do lipopolímero lecitina-PEG-COOH, especificamente o sinal a $\delta=3,4$ ppm referente ao $-H_2$ do grupo $-C(O)-NH-C-H_2$ da cadeia do lipopolímero. Esta atribuição encontra suporte na literatura [68-73].

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

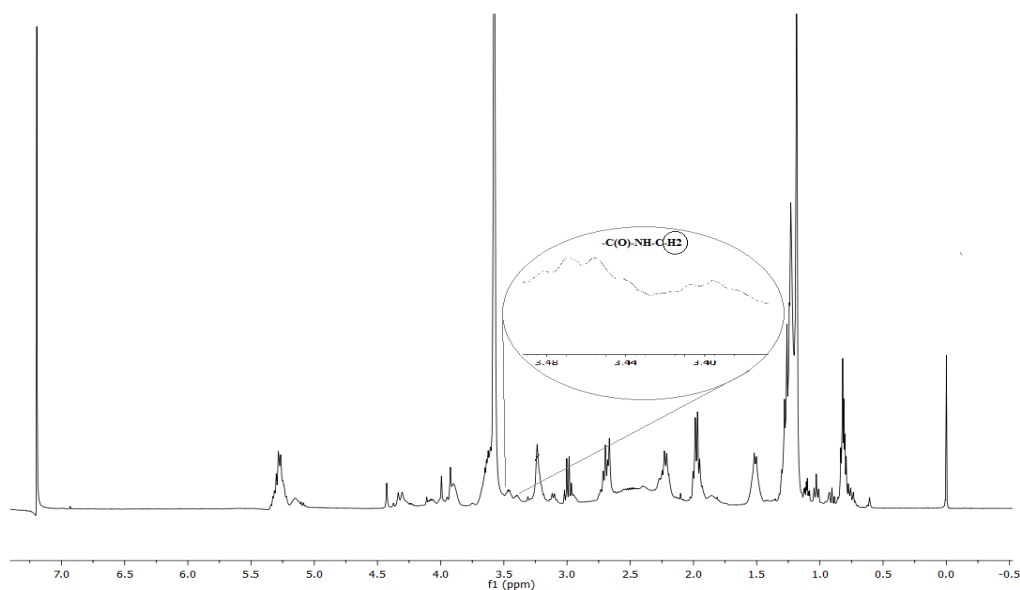


Figura 29 - Espectro de RMN em $CDCl_3$ da reação de Lecitina-PEG-COOH.

Os resultados de FTIR (vd. figura 30) exibem picos que comprovam a formação pretendida do lipopolímero lecitina-PEG-COOH, designadamente os que correspondem às seguintes atribuições: C=O a 1700 cm^{-1} , C-N a 1500 cm^{-1} e o duplete NH a 1650 cm^{-1} , sendo este último, como se disse, o pico de maior relevância para comprovar a ocorrência da síntese de lecitina-PEG-COOH ^[74-77]. Cabe no entanto dizer que os resultados FTIR correspondentes ao produto da reação 2 (réplica da reação) não se mostraram concordantes com os restantes, e que sugere que a síntese não terá sido bem sucedida.

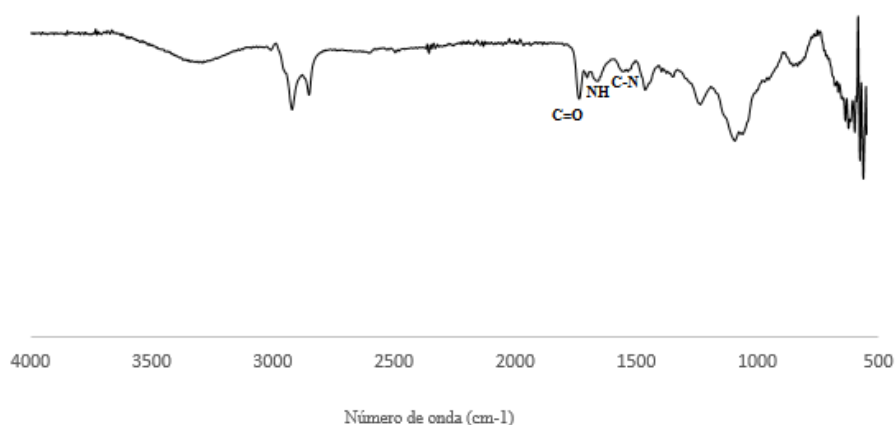


Figura 30 - Espectro FTIR de transmitância da reação Lecitina-PEG-COOH.

2. SÍNTESE DE LIPOPOLÍMEROS COM PDMAEMA

Para a síntese dos lipopolímeros com PDMAEMA seguiram-se os procedimentos descritos no capítulo anterior.

2.1. Iniciador esterificado a partir de ácido glicólico

De forma a obter o iniciador ácido glicólico-2-bromoisobutirato com os grupos funcionais pretendidos, [COOH] e [Br], foi realizada a esterificação de ácido glicólico com brometo de 2-bromoisobutirato ^[14] (cf. figura 23; cap. III). A caracterização espectroscópica, por FTIR (vd. figura 31) para a reação permitiu avaliar o sucesso da formação dos grupos funcionais [COOH] e [Br] no iniciador (vd. figura 60; Apêndice C). Pela análise do espectro FTIR foi possível observar o aparecimento de um pico a 1100 cm^{-1} (C-Br) que sustenta o sucesso da síntese do iniciador pretendido.

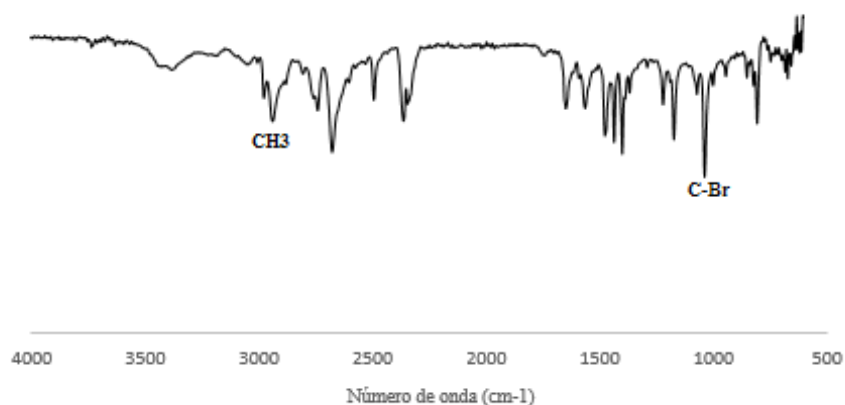


Figura 31 - Espectro FTIR de transmitância para o iniciador sintetizado.

O iniciador ácido glicólico-2-bromoisobutirato foi utilizado para realizar a síntese do PDMAEMA, cujos peso molecular e polidispersividade foram subsequentemente avaliados (vd. tabela 4).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4 - Resultados do peso molecular e da dispersividade de COOH-PDMAEMA-Br.

$M_{n,PDMAEMA-COOH,teórico}$ (Da)*	$M_{n,COOH-PDMAEMA-Br}$ (Da)	\mathcal{D}
5099	12510	1,278
* $M_{n,PDMAEMA-COOH,teórico} = M_{w,iniçador} + DP \cdot M_{w,DMAEMA}$ (DP=31 [14])		

Os valores afiguram-se relativamente elevados face ao desejável ($\mathcal{D} < 1,15$ [11] e $M_w \approx 5099$ Da). Estes resultados podem ser justificados pelo iniciador utilizado na síntese do polímero. Com efeito, no final da esterificação do iniciador a massa obtida era muito superior à prevista, levando a crer que o processo de purificação não terá sido eficiente. A reação foi repetida alterando a quantidade de iniciador (utilizou-se o dobro), com o objetivo de diminuir o peso molecular da mistura reacional. No entanto, a síntese não ocorreu, o que tornou injustificável qualquer caracterização bem como a síntese do complexo lipopolímero (lecitina-PDMAEMA).

2.2. Iniciador ácido 2-bromo-2-metilpropiónico

Para a síntese do PDMAEMA utilizou-se o iniciador ácido 2-bromo-2-metilpropiónico, Br-MPA, que contém na sua estrutura os grupos terminais pretendidos, [Br] e [COOH] (cf. tabela 3; cap. III). O peso molecular e polidispersividade do polímero obtido estão resumidos na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados do peso molecular e da dispersividade de COOH-PDMAEMA-Br.

$M_{n,PDMAEMA-COOH,teórico}$ (Da)*	$M_{n,COOH-PDMAEMA-Br}$ (Da)	\mathcal{D}
5041	47423	1,225
* $M_{n,PDMAEMA-COOH,teórico} = M_{w,iniçador} + DP \cdot M_{w,DMAEMA}$ (DP=31 [14])		

Uma vez mais, os valores encontrados ficaram além do pretendido ($\mathcal{D} < 1,15$ [11] e $M_w \approx 5041$ Da), sugerindo a baixa eficiência do iniciador Br-MPA ($M_{n,PDMAEMA-COOH,teórico}/M_{n,PDMAEMA-COOH} \approx 0,1$), o que pode ser justificado pelo facto de o halogéneo [Br] não estar suficientemente distanciado do grupo carboxílico [COOH], afetando o mecanismo de polimerização [78]. Foram realizadas duas réplicas da reação, mas igualmente sem sucesso, circunstância que impediu a realização da síntese do complexo lipopolímero (lecitina-PDMAEMA).

2.3. Iniciador CHO-Br

Para obter o CHO-PDMAEMA tendo em vista a ancoragem do polímero na bicamada lipídica (mediante o terminal hidrofóbico) foi usado como iniciador o CHO-Br (cf. tabela 3; cap. III), obtido através da esterificação do colesterol (CHO) com o 2-BiB. A estrutura do iniciador contém o grupo [Br], mas não o grupo [COOH] como se pretendia. No entanto, optou-se por esta alternativa visto que os resultados obtidos em trabalhos experimentais anteriores [14] para esta síntese foram positivos e conclusivos.

Pela análise da tabela 6, a polidispersividade obtida nas duas reações realizadas revelou-se dentro da gama pretendida ($\bar{D} < 1,15$ [11]). Contudo, o resultado obtido para o peso molecular da reação 1 revelou-se superior ao valor teórico ($M_w \approx 5409$ Da [14]), tendo sido significativamente mais elevado do que o valor teórico no caso da reação 2. Como esta síntese foi já várias vezes realizada no nosso laboratório com boa repetibilidade e valores e próximos do teórico, as discrepâncias entretanto encontradas poderão ter sido causadas por a utilização do catalisador CuBr (I), que poderia estar oxidado ou contaminado.

Tabela 6 - Resultados do peso molecular e da dispersividade de CHO-PDMAEMA-Br.

Reação	$M_n, \text{CHO-PDMAEMA, teórico (Da)}$ [14]	$M_n, \text{CHO-PDMAEMA-Br (Da)}$	\bar{D}
1	5409	8366	1,193
2	5409	14104	1,037

A caracterização por FTIR (vd. figura 32) permitiu avaliar o sucesso da reação CHO-PDMAEMA-Br (vd. figura 61; Apêndice D). Os picos de $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ a 1800 cm^{-1} e o pico C-Br a 1100 cm^{-1} , atestam-no à luz do que é descrito na literatura [11], [79], [80].

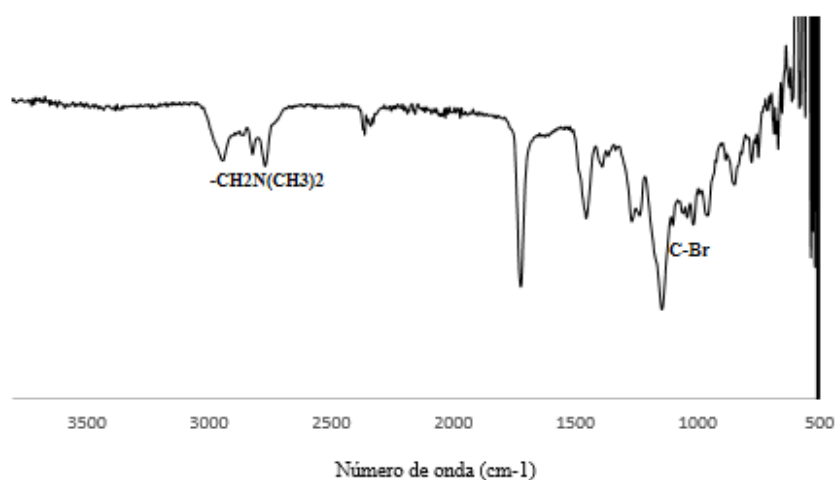


Figura 32 - Espectro FTIR de transmitância para a síntese da reação CHO-PDMAEMA.

3. PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS E CPLS

3.1. Lipopolímero lecitina-PEG-COOH: Alternativa I

De modo a confirmar a estabilidade dos CPL de lecitina-PEG-COOH para a alternativa I, foi feita a sua caracterização em termos de tamanho, polidispersividade e potenciais zeta (vd. tabela 7).

Tabela 7 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de base Lecitina-PEG-COOH (alternativa I).

Formulação	1*	2**	3*	4**	5*	6**	7*
Tamanho, Z-Ave (nm)	390,6±27,69	454,8±95,05	579,0±53,18	189,8±5,03	887,7±87,67	246,3±27,67	475,5±76,09
Potencial Zeta, zP (mV)	-24,5±1,17	-8,7±0,84	-20,9±1,66	-9,6±1,08	-27,7±1,61	-16,1±2,43	-19,6±0,79
PdI	0,444±0,08	0,439±0,06	0,495±0,04	0,198±0,02	0,687±0,03	0,254±0,09	0,452±0,04

*Reações com quantidades baseadas na literatura.

**Reações com quantidades multiplicadas por um fator de 10.

Para as formulações 1, 3, 5 e 7 verifica-se que os tamanhos, potenciais zeta e a polidispersividades dos lipossomas não possuem valores favoráveis. Os tamanhos dos lipossomas são relativamente mais elevados do que o aceitável (100-400nm) [11], os potenciais zeta não estão na gama de valores aceitáveis (> 30 mV e < -30 mV) [11], podendo formar agregados, e a polidispersividade é elevada ao contrário do desejável ($< 0,5$) [11]. Por seu lado, nas formulações 2, 4 e 6, os tamanhos e a polidispersividade estão dentro da gama aceitável, exceto na formulação 2. Todavia, o potencial zeta sugere a possibilidade de formação de agregados, que é um atributo indesejável.

3.2.Lipopolímero lecitina-PEG-COOH: Alternativa II

Os valores resultantes de idêntico procedimento incidindo sobre o caso designado por alternativa II encontram-se resumidos na tabela 8.

Tabela 8 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de base Lecitina-PEG-COOH (alternativa II).

Fomulação	1	2	3	4
Tamanho, Z-Ave (nm)	191,7±11,43	721,0±117,20	281,9±17,51	333,7±29,99
Potencial Zeta, zP (mV)	-40,2±3,30	-39,7±3,40	-36,1±3,47	-36,4±3,18
PdI	0,395±0,03	0,860±0,08	0,456±0,12	0,428±0,13

As formulações 1, 3 e 4 deram origem a formulações com tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades com valores aceitáveis, ao contrário da formulação 2, que poderá não ter sequer ocorrido, como referido anteriormente. Em face destes resultados decidiu-se utilizar as formulações 1, 3 e 4 da alternativa II para a realização de estudos posteriores.

3.3.Lipopolímero lecitina-PEG-COOH e CHO-PDMAEMA

Para avaliar a influência do CHO-PDMAEMA nos lipossomas das formulações 1, 3 e 4 da alternativa II, obtidos pelos lipopolímeros Lecitina-PEG-COOH, prepararam-se novas formulações incorporando diferentes concentrações (2,5%, 5% e 10%) daquele polímero. Os resultados das medições de tamanhos, potencial zeta e polidispersividade estão resumidos na tabela 9.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 9 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de base lecitina-PEG-COOH e CHO-PDMAEMA.

Formulação		Concentração		
		2,5%	5%	10%
1	Tamanho, Z-Ave (nm)	184,6±4,30	150,6±2,64	361,6±52,19
	Potencial Zeta, zP (mV)	-30,2±2,84	-20,8±3,20	-3,1±2,17
	PdI	0,540±0,04	0,324±0,05	0,777±0,14
3	Tamanho, Z-Ave (nm)	129,3±6,23	146,7±12,30	854,5±155,64
	Potencial Zeta, zP (mV)	-17,8±1,57	2,6±0,78	16,1±0,91
	PdI	0,374±0,03	0,566±0,08	0,658±0,11
4	Tamanho, Z-Ave (nm)	163,6±3,41	190,9±7,28	172,3±20,04
	Potencial Zeta, zP (mV)	-22,3±6,31	-11,8±1,49	10,0±5,08
	PdI	0,303±0,04	0,508±0,05	0,395±0,09

Os tamanhos dos lipossomas para as três composições estão dentro da gama de valores aceitáveis, 100-400 nm [11], salvo raras exceções (e.g. no caso da formulação 3 com 10% de CHO-PDMAEMA). Verifica-se que quanto maior a concentração de CHO-PDMAEMA nos lipossomas, menos negativos os resultados dos potenciais zeta, chegando mesmo a ser positivos em alguns casos. Este padrão era esperado, visto que o lipopolímero que constitui os lipossomas sem a incorporação de CHO-PDMAEMA (vd. tabela 8) tem um caráter negativo, efeito que é contrariado pela natureza positiva do CHO-PDMAEMA, originando vesículas globalmente menos negativas. Também no caso da polidispersividade os valores aceitáveis medidos estão na gama pretendida, salvo raras exceções (e.g. no caso da incorporação de 10% de CHO-PDMAEMA nas formulações 1 e 3). Conclui-se que, na gama de concentrações estudada, a incorporação de CHO-PDMAEMA nos CPL não influencia o seu tamanho nem a sua polidispersividade, permitindo manter os seus valores nos níveis desejáveis (100-400 nm e PdI < 0,5) [11]. É provável que o lipopolímero proporcione um “efeito barreira”, não impedindo mas limitando a incorporação de colesterol. Os valores que escapam ao pretendido podem ser justificados pelo facto de a lecitina ser um composto natural constituído por diferentes fosfolípidos, de composição mais ou menos aleatória. Apenas os que possuem o grupo NH₃⁺ são modificados com o COOH-PEG-COOH, implicando alguma variabilidade nos CPL, e, por consequência, nas suas características.

A maior consistência dos resultados das formulações 3 e 4 (vd. tabela 9) quando comparada com a da formulação 1 determinou a seleção daquelas para os estudos posteriores.

Apesar de algumas formulações com 10% de CHO-PDMAEMA apresentarem tamanhos elevados, ainda que sem um padrão definido, optou-se por continuar com a sua caracterização.

3.4.Lipopolímero lecitina-PEG-COOH e CHO

De modo, a analisar a influência do CHO nos CPLs de lipopolímeros lecitina-PEG-COOH, prepararam-se lipossomas incorporando na sua formulação, diferentes concentrações de CHO (2,5%, 5% e 10%) e determinaram-se os seus tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades (vd. tabela 10).

Tabela 10 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de base lecitina-PEG-COOH e CHO.

Reação		Concentração		
		2,5%	5%	10%
3	Tamanho, Z-Ave (nm)	254,3±2,35	236,6±14,52	253,1±3,39
	Potencial Zeta, zP (mV)	-46,9±6,45	-43,4±5,85	-42,3±5,91
	PdI	0,457±0,02	0,436±0,05	0,330±0,03
4	Tamanho, Z-Ave (nm)	271,8±3,60	282,8±8,62	472,8±50,95
	Potencial Zeta, zP (mV)	-44,7±5,45	-41,7±5,85	-37,3±3,61
	PdI	0,435±0,04	0,410±0,08	0,499±0,45

Os tamanhos dos lipossomas para as três concentrações estão dentro da gama de valores aceitáveis. A concentração de CHO nos lipossomas não influencia o potencial zeta. Como esperado, os valores são mais negativos que no caso dos lipossomas com a incorporação de CHO-PDMAEMA (vd. tabela 9) e semelhantes ao caso dos lipossomas constituídos por lecitina-PEG-COOH. A polidispersividade apresenta valores na gama pretendida, salvo raras exceções, e a concentração de CHO não se reflete nos tamanhos nem na polidispersividade dos CPL.

3.5.Lecitina

Foram também formulados lipossomas convencionais constituídos apenas por lecitina de soja (vd. tabela 11) de modo a comparar as suas características com as dos lipossomas constituídos pelo lipopolímero lecitina-PEG-COOH, com e sem a incorporação de CHO-PDMAEMA ou CHO atrás descritos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 11 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas de lecitina.

Lecitina	
Tamanho, Z-Ave (nm)	152,8±2,31
Potencial Zeta, zP (mV)	-55,3±3,48
PdI	0,317±0,03

Os resultados para o tamanho, potencial zeta e polidispersividade dos lipossomas convencionais foram os esperados e dentro da gama do aceitável [11]. Em relação ao potencial zeta, este é mais negativo do que os dos outros casos em confronto, e explica-se pela natureza negativa da molécula que constitui os lipossomas convencionais (cf. figura 4; cap. II).

4. PERFIS DE LIBERTAÇÃO

Com o auxílio de um espectrofluorímetro foram feitas leituras dos lipossomas encapsulados com calceína a um comprimento de onda de emissão de 515 nm, ao longo do tempo (48h [11]) e após o seu colapso por adição de Triton X-100.

Recorrendo à equação [14]

$$\% \text{ libertação} = \frac{\text{Fluorescência}_t - \text{Fluorescência}_{t_0}}{\text{Fluorescência}_{t_{\text{colapsado}}} - \text{Fluorescência}_{t_0}} \times 100 \quad (1)$$

com:

Fluorescência t_0 – Fluorescência medida no instante inicial;

Fluorescência t – Fluorescência medida em cada hora;

Fluorescência $t_{\text{colapsado}}$ – Fluorescência medida após rebentamento;

determinaram-se os perfis de libertação para cada amostra cujos resultados se apresentam na figura 33.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

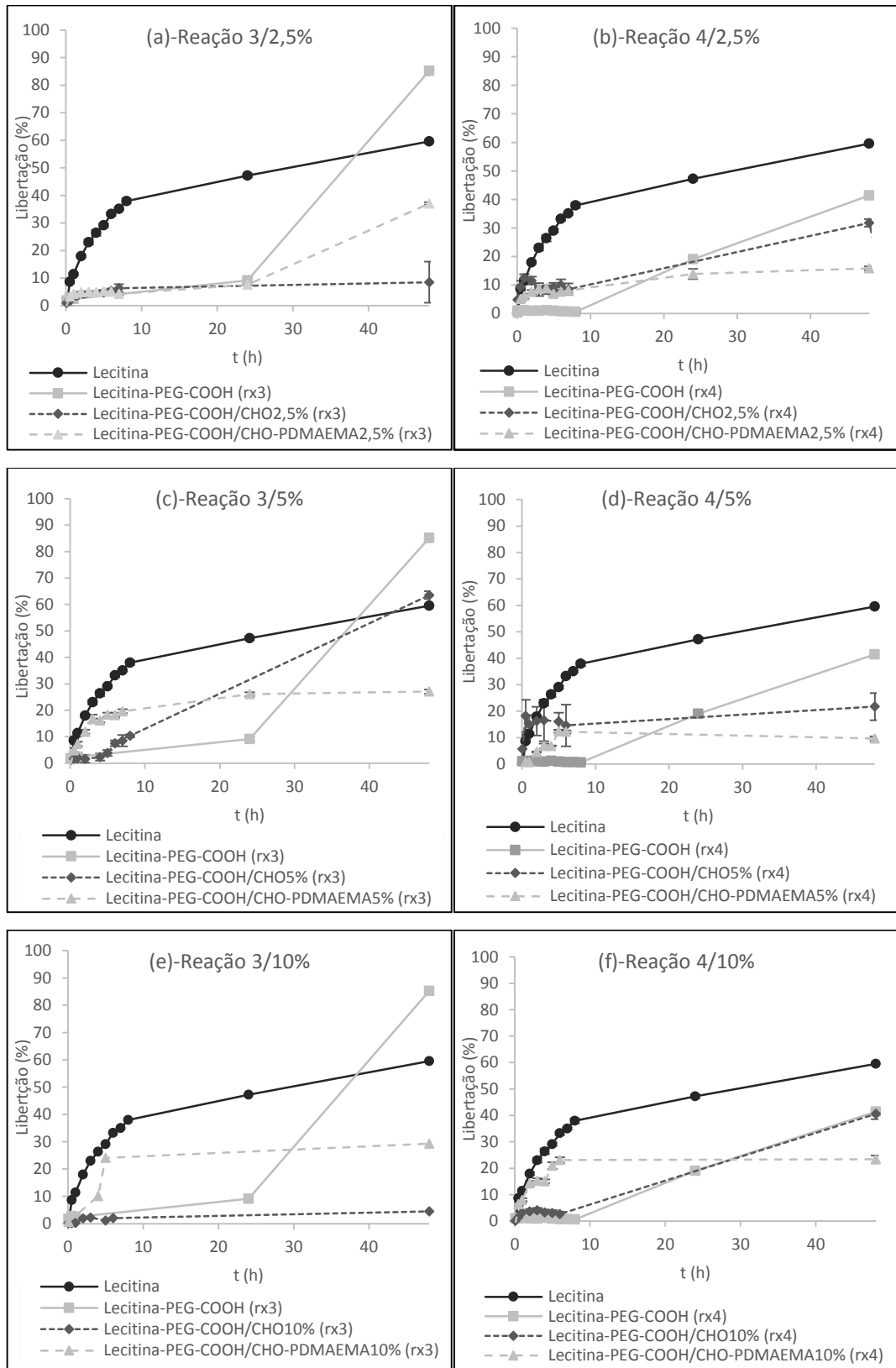


Figura 33 - Perfis de liberação de calceína dos CPL: (a) - Reação 3/2,5%; (b) - Reação 4/2,5%; (c) - Reação 3/5%; (d) - Reação 4/5%; (e) - Reação 3/10%; (f) - Reação 4/10%.

Verifica-se que os CPL da formulação 4 seguem um padrão mais estável do que os da formulação 3. Apesar dos lipossomas com 2,5% e 10% de CHO da formulação 3 apresentarem perfis aceitáveis, os lipossomas com 2,5%, 5% e 10% de CHO-PDMAEMA da formulação 4, traduzem-se no melhor resultado visto que possuem uma percentagem de libertação menor que qualquer outro CPL e do que os lipossomas convencionais. Em face disso, os estudos subsequentes (EE (%) e libertações a diferentes pH) basearam-se na formulação 4.

5. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

De forma a analisar a eficiência de encapsulação dos lipossomas (EE%) e posteriormente a concentração molar de calceína encapsulada em cada ensaio, construiu-se uma reta de calibração (vd. figura 62, Apêndice F) da concentração de calceína em função da fluorescência.

Recorrendo à equação 2 determinou-se a percentagem da eficiência de encapsulação, EE (%), através quantidade molar de calceína encapsulada por a concentração de lípidos (vd. tabela 12) [11].

$$EE(\%) = \frac{\text{Quantidade de calceína encapsulada}}{\text{Concentração de lípidos}} \times 100 \quad (2)$$

A concentração de lípidos de cada formulação foi determinada com o auxílio de um espectrofotómetro, através de um *kit* de fosfolípidos CHO-POD, *Enzymatic colorimetric* da Spinreac (vd. Apêndice E).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 12 - Resultados da concentração de calceína encapsulada, concentração de lípidos e eficiências de encapsulação (%).

Ensaio	Fluorescência (F _{final} – F _{inicial})	Calceína Encapsulada (mM)	Concentração Lípidos (mM)	EE (%)
LC	5996	0,161	0,928±0,005	17,4±0,101
LC-PEG-COOH	8824	0,246	0,890±0,003	27,7±0,088
LC-PEG-COOH + CHO-PDMAEMA	2,5%	3412	1,147±0,003	7,3±0,019
	5%	13200	1,243±0,002	30,4±0,045
	10%	3806	1,350±0,003	7,1±0,015
LC-PEG-COOH + CHO	2,5%	991	1,100±0,002	1,0±0,002
	5%	649	1,042±0,005	0,1±0,0004
	10%	5810	0,156	0,923±0,001

Os melhores resultados de EE (%) (com maiores percentagens de EE) correspondem aos resultados dos CPL constituídos por lecitina-PEG-COOH com e sem 5% de incorporação de CHO-PDMAEMA. Como tal, utilizaram-se nos estudos seguintes CPL constituídos por lecitina-PEG-COOH com a incorporação a diferentes concentrações (2,5%, 5% e 10%) de CHO-PDMAEMA e sem a incorporação deste. Optou-se por realizar as libertações a diferentes pH para as três concentrações referidas para fins comparativos.

6. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS CPLS A MEIOS DE PH DIFERENTES

A estabilidade dos CPL com CHO-PDMAEMA, tanto em meio ácido como em meio básico, foi avaliada a diferentes pH (vd. figura 34).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

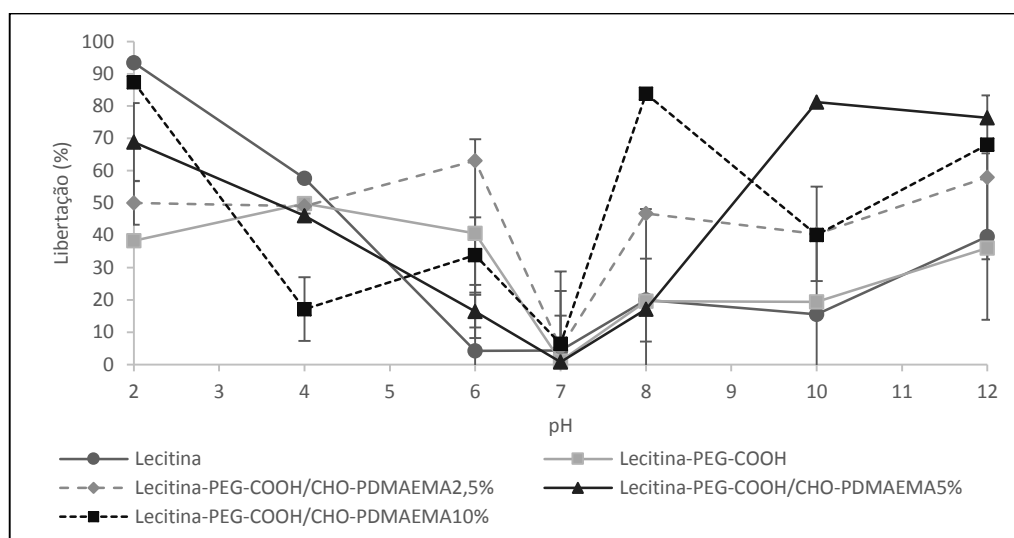


Figura 34 - Perfis de liberação das reações de lecitina, lecitina-PEG-COOH e lecitina-PEG-COOH com concentrações de 2,5%, 5% e 10% de CHO-PDMAEMA, a diferentes meios de pH.

Os lipossomas convencionais e os CPLs de lecitina-PEG-COOH e CHO-PDMAEMA (2,5, 5 e 10%) são instáveis a qualquer pH que não o fisiológico (pH=7), o que pode ser justificado por reações de hidrólise do grupo éster levando à formação de um produto intermediário e consequentemente, ao aumento da sua permeabilidade e diminuição da sua integridade, libertando o seu conteúdo (calceína) [13]. No caso dos CPL constituídos apenas por lecitina-PEG-COOH, verifica-se que possuem uma liberação de calceína maior em meio ácido do que em meio básico, mas inferior aos CPL com CHO-PDMAEMA. No entanto, a desestabilização a pH ácido pode ser explicada por estes serem constituídos por polímeros que incorporam o grupo funcional [COOH] (presente lipopolímero lecitina-PEG-COOH) que, a pH baixo, faz com que ocorra o colapso dos CPL e consequentemente, a liberação total do seu conteúdo (calceína) [81]. Para os CPL em que existe desestabilização a pH básico terão ser feitos testes adicionais. Apesar de no caso dos CPL com PDMAEMA (com $pka \approx 8$ [14]) poder levar também ao colapso das vesículas para pH superior a 8, é também possível que depois de ionizadas as vesículas aumentem o seu volume hidrodinâmico e a sua capacidade de *swelling* (mudando a sua conformação), o que pode levar a uma liberação total ou parcial de calceína pelo colapso dos CPL [46-48]. Esta hipótese carece, no entanto, de confirmação.

Visto que as liberações em meio ácido e básico quando incorporado CHO-PDMAEMA são próximas para as três concentrações, e de acordo com os resultados de EE (%), considera-se

que as melhores formulações corresponde aos CPL constituídos por lecitina-PEG-COOH com 5% de CHO-PDMAEMA. Como tal, os estudos posteriores foram feitos para esses CPL.

De modo, a confirmar a estabilidade dos CPL finais (lecitina-PEG-COOH com e sem 5% de CHO-PDMAEMA incorporado) e de lipossomas convencionais foi feita a sua caracterização em termos de potenciais zeta para diferentes pH: 2 a 12 (vd. figura 35).

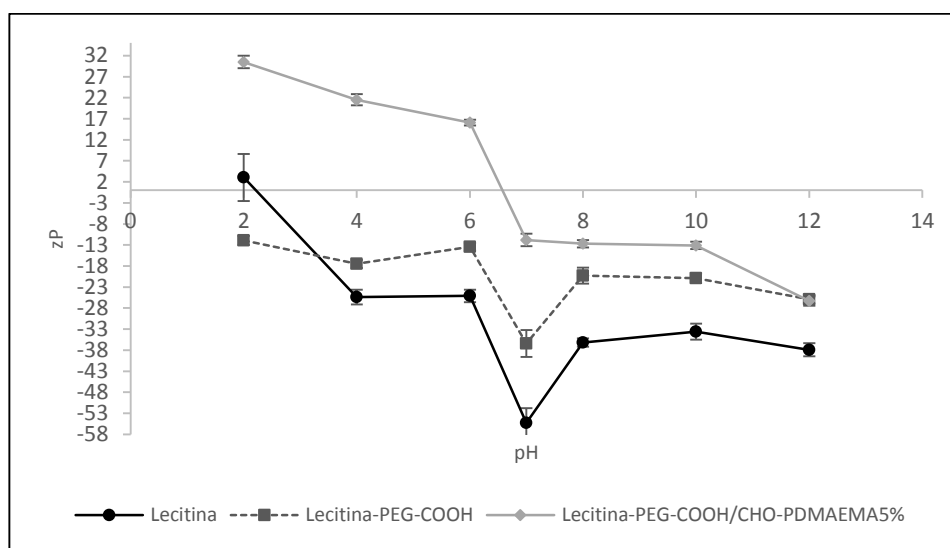


Figura 35 - Potenciais zeta dos lipossomas convencionais, lecitina-PEG-COOH e lecitina-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5% em função do pH.

Os resultados dos potenciais zeta revelam um padrão no caso dos lipossomas convencionais e CPL de lecitina-PEG-COOH quando sujeitos a pHs ácidos: quanto mais ácido o pH, menos negativo o potencial zeta, chegando mesmo a tomar valores positivos para o pH de 2 (no caso dos lipossomas convencionais). Para pH básicos os valores de potencial zeta são semelhantes aos valores do pH fisiológico (pH=7), embora ligeiramente menos negativos, o que leva a crer que os lipossomas são mais instáveis em meio ácido. Os resultados dos potenciais zeta para os CPL de lecitina-PEG-COOH com 5% de CHO-PDMAEMA para pH ácidos revelam que quanto mais baixo o pH, mais positivo o potencial zeta. Para pH básicos, quanto mais alto o pH, mais negativo o potencial zeta, sendo que o potencial zeta mais negativo é o de pH de 12. Neste caso, a desestabilização e libertação é semelhante tanto em meio ácido, como em meio básico. Quando comparadas as três formulações verificam-se os resultados esperados, i.e. os lipossomas convencionais possuem potenciais zeta mais negativos em meio ácido e em meio básico comparativamente com os CPLs constituídos por lecitina-PEG-COOH e estes mais negativos do que os que têm incorporado 5% de CHO-PDMAEMA. Como tal,

pode-se concluir que estes sistemas podem ser utilizados como sistemas de liberação controlada em casos onde se pretenda liberações em meio ácido (e.g. no estômago ou em tumores).

7. MORFOLOGIA DOS COMPLEXOS POLÍMERO-LIPOSSOMA FINAIS

A morfologia dos CPL finais (lecitina-PEG-COOH com e sem 5% de CHO-PDMAEMA) comparada com a dos lipossomas convencionais foi analisado por microscopia eletrônica de transmissão, TEM (vd. figura 36).

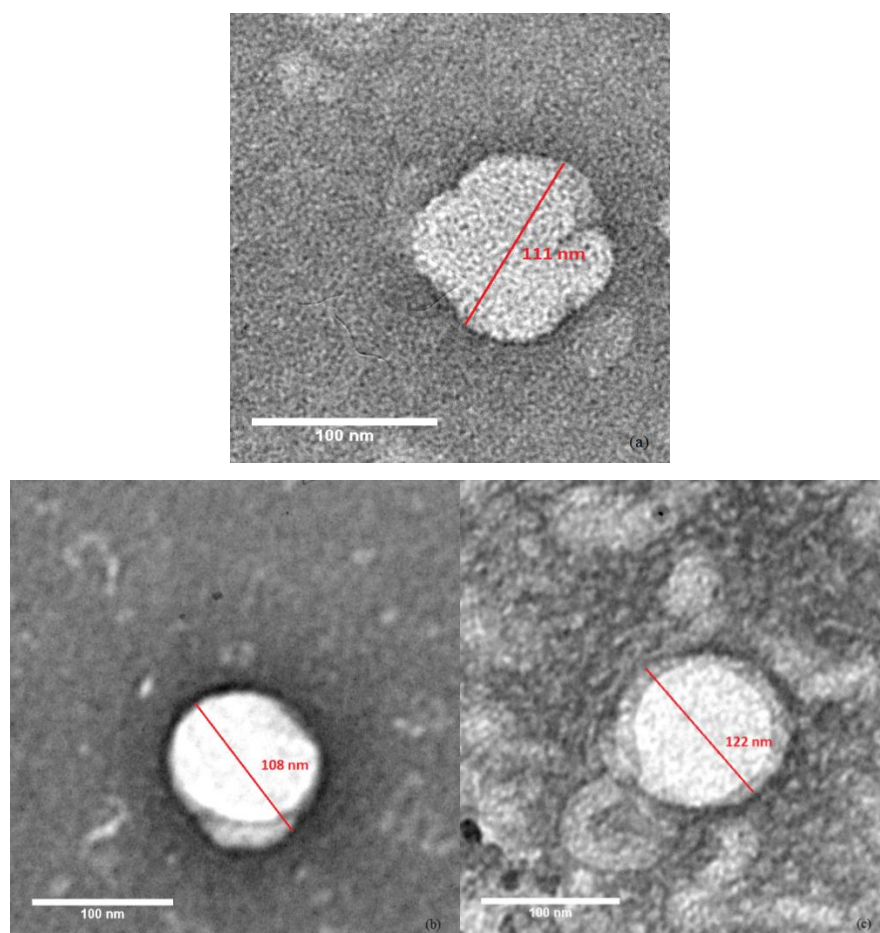


Figura 36 - Morfologia dos CPL finais e lipossomas convencionais: (a) - Lecitina; (b) - Lecitina-PEG-COOH; (c) - Lecitina-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5%.

Comparando os lipossomas convencionais (figura 36 (a)) com os CPL constituídos pelo lipopolímero lecitina-PEG-COOH sem (figura 36 (b)) e com a incorporação de 5% de CHO-PDMAEMA (figura 36 (c)) são visíveis as suas diferentes morfologias. As figuras 36 (b) e (c) mostram vesículas mais densas, sendo mesmo possível distinguir nas imagens a incorporação do polímero (contorno mais escuro), mais acentuada no caso da figura 36 (c). É notório um “efeito cápsula” nos CPL com a incorporação dos polímeros, verificando-se que este efeito se destaca com a incorporação do polímero CHO-PDMAEMA, visto que na superfície destas vesículas estão presentes dois polímeros (PEG-COOH e PDMAEMA), e não apenas um, como no caso da figura 36 (b).

Quando comparados os resultados dos diâmetros obtidos das imagens por TEM com os resultados obtidos dos diâmetros por DLS (vd. tabelas 8, 9 e 11), verifica-se que os últimos possuem dimensões maiores. Estes resultados devem-se ao facto de o diâmetro das partículas das imagens TEM ser medido diretamente na imagem microscópica real, enquanto a técnica de DLS utiliza várias aproximações para encontrar um valor médio final. No entanto, também pode ser devido ao excesso de amostra (gota) colocada na grelha (grelha de carbono) ser retirado antes da análise por TEM e no caso da amostra analisada por DLS estar hidratada em suspensão, interagindo com o meio, no momento de análise [82].

8. TESTES DE CONSERVAÇÃO DOS COMPLEXOS POLÍMERO-LIPOSSOMA FINAIS

Para os estudos de conservação foram utilizados os CPL finais selecionados (lecitina-PEG-COOH com e sem 5% de CHO-PDMAEMA) e lipossomas convencionais. Estes foram armazenados durante 31 dias em diferentes condições (no congelador e à temperatura ambiente, depois de liofilizadas). De modo a avaliar a sua estabilidade ao fim desse tempo foi feita a sua caracterização em termos de tamanhos, polidispersividade e potencial zeta (vd. tabela 13) e analisados os seus perfis de libertação (vd. figura 37).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 13 - Tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades dos lipossomas convencionais, lecitina-PEG-COOH e lecitina-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5% liofilizados e congelados.

	Amostras Liofilizadas			Amostras Congeladas		
	LC	LC-PEG-COOH	LC-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5%	LC	LC-PEG-COOH	LC-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5%
Tamanho, Z-Ave (nm)	613,1±40,59	262,5±36,40	637,3±34,65	2130,0±265,90	241,3±5,08	118,6±14,93
Potencial Zeta, zP (mV)	-62,1±7,25	-33,5±3,67	-1,0±0,60	-63,5±4,33	-45,8±2,83	-0,4±1,95
PdI	0,560±0,38	0,531±0,07	0,734±0,06	1,000±0,00	0,511±0,01	0,320±0,08

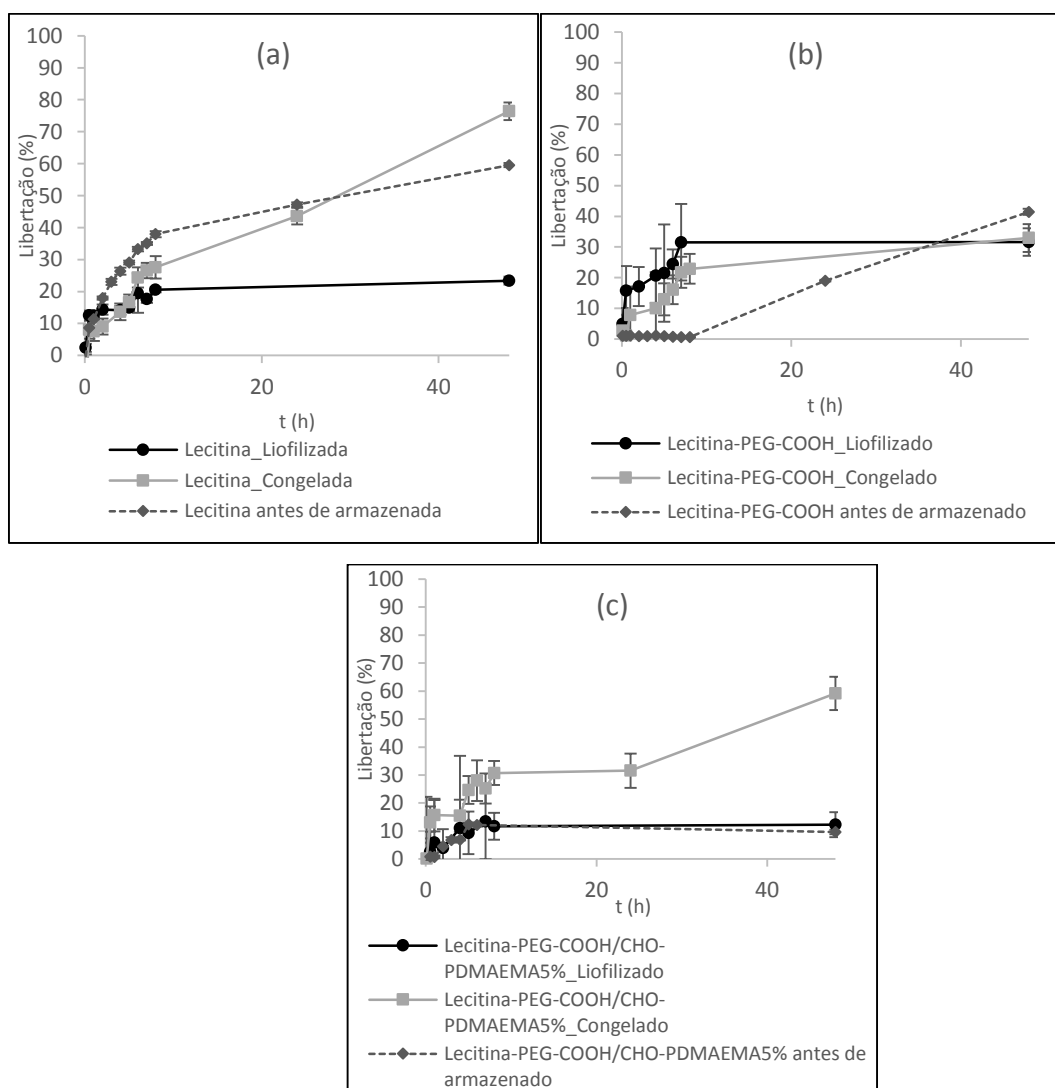


Figura 37 - Perfis de liberação de calceína dos CPL finais e lipossomas convencionais: (a) - Lecitina; (b) - Lecitina-PEG-COOH; (c) - Lecitina-PEG-COOH/CHO-PDMAEMA5%.

Ao analisar os perfis de liberação (vd. figura 37), verificou-se que os CPL liofilizados e mantidos à temperatura ambiente possuem um padrão mais estável e semelhante aos CPL antes de armazenados (verifica-se que os CPL constituídos por o lipopolímero lecitina-PEG-COOH com 5% de CHO-PDMAEMA possui uma percentagem de liberação menor), em comparação com os perfis de liberação dos CPL armazenados no congelador. Contudo, ao analisar a tabela 13 verifica-se que os tamanhos, os potenciais zeta e as polidispersividades dos CPL possuem alguns valores fora da gama aceitável. Apesar de os valores dos CPL liofilizados e congelados constituídos pelos lipopolímeros lecitina-PEG-COOH estarem dentro da gama desejável e próximos dos da tabela 8, nota-se que para os lipossomas convencionais e os lipossomas constituídos pelos lipopolímeros lecitina-PEG-COOH com 5% de CHO-PDMAEMA não acontece o mesmo. No caso dos lipossomas convencionais os potenciais zeta das amostras liofilizadas e congeladas estão dentro da gama aceitável e próximos dos da tabela 11, mas os tamanhos e as polidispersividades possuem valores muito superiores aos desejáveis. No caso os lipossomas constituídos pelos lipopolímeros lecitina-PEG-COOH com a incorporação de 5% de CHO-PDMAEMA, os valores dos tamanhos e polidispersividades das amostras congeladas estão dentro da gama aceitável e próximos aos da tabela 9. O mesmo não acontece com potencial zeta, que exibe valores muito menos negativos do que o desejável quando comparados com os valores da tabela 9 (este comportamento é semelhante à incorporação de 10% de CHO-PDMAEMA e não 5%). Para os mesmos CPL, mas com as amostras liofilizadas, verifica-se que os valores de tamanhos, potenciais zeta e polidispersividades são muitos superiores aos desejáveis.

Supõe-se que a discrepância e incoerência nos valores obtidos e destes quando comparados com os valores pré-armazenamento seja consequência da inexistência de um conservante específico (e.g. açúcares, dissacarídeo: trealose) incorporado nas amostras antes de serem armazenadas. Provavelmente, a incorporação desse componente melhoraria a conservação das amostras.

V. APRECIÇÕES FINAIS

CONCLUSÃO

A síntese dos lipopolímeros com COOH-PEG-COOH através da ligação entre o grupo funcional carboxílico [COOH] do polímero PEG modificado e o grupo amina protonado [NH₃⁺] do fosfolípido (*coupling* carbodiimidás) foi alcançada com sucesso, por dois procedimentos alternativos, adotando-se aquele que requer menor tempo de reação.

A síntese dos lipopolímeros com PDMAEMA não foi bem sucedida devido à dificuldade em obter um polímero de PDMAEMA modificado com o grupo [COOH] na sua constituição. Como alternativa, sintetizou-se um polímero de PDMAEMA com terminação colesterol (CHO-PDMAEMA) de modo a aproveitar a natureza hidrofóbica do colesterol (CHO) na ancoragem e incorporação do polímero modificado, o qual foi usado em diferentes proporções (2,5%, 5% e 10%) na formulação.

Os CPL lecitina-PEG-COOH com e sem a incorporação de CHO-PDMAEMA produzidos, exibiram as características pretendidas, em termos de tamanho, polidispersividade, potencial zeta, capacidade de libertação e eficiência de encapsulação de calceína, mantendo-se estáveis em condições fisiológicas e com capacidade de libertação de calceína em meios de pH ácidos.

Considerando todos os resultados obtidos, os CPL com lecitina-PEG-COOH com e sem 5% de CHO-PDMAEMA revelaram melhores eficiências de encapsulação de calceína e estabilidade ao longo do tempo. Morfologicamente adequados, estáveis e com capacidade de manter as suas características quando armazenados à temperatura ambiente, depois de liofilizados, pode afirmar-se os CPL desenvolvidos possuem potencial para serem aplicados como sistemas de libertação controlada de fármacos, objetivo essencial do trabalho.

TRABALHOS FUTUROS

- Realização de testes de conservação dos lipossomas com a incorporação de um conservante específico.
- Analisar a viabilidade celular dos lipossomas através de testes de citotoxicidade.
- Realização de mais sínteses de polímeros de PDMAEMA modificados com os grupos funcionais pretendidos [COOH] através dos iniciadores descritos neste trabalho experimental e com outros iniciadores ainda não estudados.
- Promover a formulação de um lipocopolímero através dos grupos funcionais específicos [COOH] do copolímero e o grupo [NH₃⁺] do fosfolípido (e.g. Br-PEG-PDMAEMA-LC).
- Análise e caracterização dos lipopolímeros sintetizados através de química computacional e modelação e simulação molecular.
- Formulação de lipossomas imunogénicos, de penetração celular e catiónicos.
- Realização de testes *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Liu, H., & Augello, C. *Surface modification of magnesium and its alloys for Biomedical Applications*. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. 2: pp 335-353. (2015).
- [2] J.-Matthias Löhr, J.-M., Saller, R., Salmons, B., & H Günzburg, W. *Microencapsulation of genetically engineered cells for cancer therapy*. Methods in Enzymology. 346: pp 603-618. (2002).
- [3] Sonia, T. A., & Sharma, C. P. *In vitro evaluation of N-(2-hydroxy) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan for oral insulin delivery*. Carbohydrate Polymers. 84: pp 103-109. (2011).
- [4] Maroni, A., Zema, L., Cerea, M., Foppoli, A., Palugan, L., & Gazzaniga, A. *Erodible drug delivery systems for time-controlled release into the gastrointestinal tract*. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 32: pp 229-235. (2015).
- [5] Yang, L. *Nanotechnology-Enhanced Orthopedic Materials: Fabrications, Applications and Future Trends*. Woodhead Publishing, China. (2015).
- [6] Gainza, G., Villullas, S., Pedraz, J. L., Hernandez, R. M., & Igartua, M. *Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 11: pp 1551-1573. (2015).
- [7] Rodríguez-Nogalesa, C., Garbayoa, E., Carmona-Abellán, M. M., Luquin, M. R., & Blanco-Prieto, M. J. *Brain aging and Parkinson's disease: New therapeutic approaches using drug delivery systems*. Maturitas. 84: pp 25-31. (2016).

- [8] Coimbra, P. M. A. *Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural*. PhD Thesis. Universidade de Coimbra, Coimbra. (2010).
- [9] Timpat, H. V. *Saúde - Tratamentos Alternativos, Alguns Milenares, Quase Esquecidos de A a Z*. Biblioteca24horas Seven System International. (2014).
- [10] Nag, O. K., & Awasthi, V. *Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior*. *Pharmaceutics*. 5(4): pp 542–569. (2013).
- [11] Simões, M. P. G. *Desenvolvimento e caracterização de sistemas inteligentes para de libertação controlada: complexos polímero-lipossoma (CPL)*. MSc Thesis. Universidade de Coimbra, Coimbra. (2015).
- [12] Spuch, C., & Navarro, C. *Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents*. *Journal of Drug Delivery*. pp 1-12. (2011).
- [13] Batista, C., Carvalho, C. M. B. & Magalhães, N. S. S. *Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 43: pp 167-179. (2007).
- [14] Alves, P., Hugo, A. A., Tymczyszynb, E. E., Ferreira, A. F., Fausto, R., Pérez, P. F., Gómez-Zavagliab, A. *Effect of cholesterol-poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) on the properties of stimuli-responsive polymer liposome complexes*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 104: pp 254-261. (2013).
- [15] Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & K Bannerjee, S. *Drug delivery systems: An updated review*. *International Journal oh Pharmaceutical Investigation*. 2: pp 1-11. (2012).
- [16] Perrie, Y., & Rades, T. *Pharmaceutics – Drug Delivery and Targeting, chapter 1 - Controlling drug delivery, Second Edition: FASTtrack series*. (2009).
- [17] Jain, K. K. *Drug Delivery Systems - An Overview*. *Drug Delivery Systems*. pp 1-50. (2008).

- [18] Müller, R. H., Mäder, K., & Gohla, S. *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 50 (1): pp 161-177. (2000).
- [19] Pillai, O., & Panchagnula, R. *Polymers in drug delivery*. Current Opinion in Chemical Biology. 5: pp 447-451. (2001).
- [20] Blume, G., & Cevc, G. *Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity in vivo*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 1146: pp 157-168. (1993).
- [21] Gultepe, E., Nagesha, D., Sridhar, S., & Amiji, M. *Nanoporous inorganic membranes or coatings for sustained drug delivery in implantable devices*. Advanced Drug Delivery Reviews. 62: pp 305-315. (2010).
- [22] Kulkarni, P. R., Yadav, J. D., & Vai, K. A. *Liposomes: a novel drug delivery system*. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 3 (2): pp 10-18. (2011).
- [23] Alvarez, A. M. R., & Rodríguez, M. L. G. *Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations*. Grasas y Aceites. 51: pp 74-96. (2000).
- [24] Sousa, I. C. d. S. C. *Estudo, caracterização e desenvolvimento de sistemas de libertação controlada para as quinolonas e seus derivados*. PhD Thesis. Universidade do Porto, Porto. (2013).
- [25] Averill, B., & Eldredge, P. *General Chemistry: Principles, Patterns, and Application*. Flat World. (2011).
- [26] Chaurio, R. A., Janko, C., Muñoz, L. E., Frey, B., Herrmann, M., & Gaip U. S. *Phospholipids: Key Players in Apoptosis and Immune Regulation*. Molecules. 14: pp 4892-4914. (2009).
- [27] Storm, G., & Crommelin, D. *Liposomes: quo vadis?*, Pharmaceutical Science and Technology Today. 1(1): pp 19-31. (1998).

- [28] Irma, A. J. M., & B.-W. *Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci*. International Journal of Antimicrobial Agents. 19: pp 299-311. (2002).
- [29] Munyendo, W. L., Lv, H., Benza-Ingoula, H., Baraza, L. D., & Zhou, J. *Cell Penetrating Peptides in the Delivery of Biopharmaceuticals*. Biomolecules. 2: pp 187-202. (2012).
- [30] Torchilin, V. P. *Multifunctional nanocarriers*. Advanced Drug Delivery Reviews. 64: pp 302-315. (2006).
- [31] Moghimipour, E., & Handali, S. *Liposomes as Drug Delivery Systems: Properties and Applications*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 4 (1): pp 159-185. (2013).
- [32] Iglic, A. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. London: Academic Press. 22: pp 2-210. (2006).
- [33] Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Blouza, I. L., & Fessi, H. *Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art*. Advanced Cell Diagnostics. 1: pp 147-168. (2012).
- [34] Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., & Charcosset, C. *Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art*. Journal of Colloid Science and Biotechnology. 1: pp 147-168. (2012).
- [35] Lee, R. W., Shenoy, D. B., & Sheel, R. *Micellar Nanoparticles: Applications for topical and passive transdermal drug delivery: Chapter 2 - Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, Elsevier. pp 37-58. (2010).
- [36] Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Mozafari R. M., Gaiani, C., & Linder, M. *Liposomes: A Review of Manufacturing*. Current nanoscience. 7(3): pp 436-452 (June 2011).

- [37] Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Woo Joo, S., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K. *Liposome: classification, preparation, and applications*. Nanoscale Research Letters. 8. (2013).
- [38] Ebewele, R. O. *Polymer science and technology*: CRC Press. (2000).
- [39] Whitesides, G. M., Kriebel, J. K., & Mayers, B. T. *Nanoscale Assembly: Self-Assembly and nanostructured Materials*: Springer US. pp 217-239. (2005).
- [40] Website: Clark nutrition, <http://www.clarksnutrition.com/promog/featuredarticle.asp?id=61&storeID=2691B1FE187D41ACB869A85CA5957A0A>, consultado em 24 de Fevereiro de 2016.
- [41] Scholfield, C. R. *Composition of Soybean Lecithin*. Journal of the American Oil Chemists' Society. 58 (10): pp 889-892. (1981).
- [42] Nasir, P. I., Bernards, M. A., & Charpentier, P. A. *Acetylation of Soybean Lecithin and Identification of Components for Solubility in Supercritical Carbon Dioxide*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55: pp 1961-1969. (2007).
- [43] Takahashi, M., Inafuku, K.-i., Miyagi, T., Oku, H., Wada, K., Imura, T., & Kitamoto, D. *Efficient Preparation of Liposomes Encapsulating Food Materials Using Lecithins by a Mechanochemical Method*. Journal of Oleo Science. 56 (1): pp 35-42. (2007).
- [44] Alves, P., Hugo, A., Szymanowski, F., Pérez, E. T. P., Coelho, J., Simões, P., Gómez-Zavaglia, A. *Stabilization of polymer lipid complexes prepared with lipids of lactic acid bacteria upon preservation and internalization into eukaryotic cells*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. (2014).
- [45] Agarwal, S., Zhang, Y., Maji, S., & Greiner, A. *PDMAEMA based gene delivery materials, Review*. Materialstoday. 24 (8): pp 1590-1598. (2012).

- [46] Stevens, M. P. *Polymer Chemistry – An Introduction*: Oxford University Press. (1999).
- [47] Fried, J. R. *Polymer Science and Technology, 2nd edition*: Prentice Hall PTR. (2007).
- [48] Cowie, J. M. G., & Arrighi, V. *Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials 3rd edition*: CRC Press, Taylor & Francis Group. (2008).
- [49] Mendes, J. S. e. M. P. *Síntese de hidrogéis de base acrílica recorrendo a técnicas de polimerização radicalar viva. Potencial aplicação como fármacos poliméricos*. MSc Thesis. Universidade de Coimbra, Coimbra. (2011).
- [50] Park, J.-I., Al-Mutairi, A., Marafie, A. M. J., Yoon, S.-H., Mochida, I., & Ma, X. *The characterization of metal complexes in typical Kuwait atmospheric residues using both GPC coupled with ICP–MS and HT GC–AED*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 34: pp 204-212. (2016).
- [51] Guo, T., Liu, Y., Wei, Y., Ma, X., Ni, J., Yin, Z., Tan, T. *Simultaneous qualitation and quantitation of natural trans-1,4-polyisoprene from *Eucommia ulmoides* Oliver by gel permeation chromatography (GPC)*. *Journal of Chromatography B*. 1004: pp 17-22. (2015).
- [52] Website: Malvern, <http://www.malvern.com/en/products/product-range/viscotek-range/viscotek-systems/viscotek-rimax/accessories/viscotek-gpcmax/>, consultado em 14 de Junho de 2016.
- [53] Website: Bruker, <https://www.bruker.com/pt/products/mr/nmr.html>, consultado em 1 de Março de 2016.
- [54] *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*. Thermo Nicolet Corporation. (2001).
- [55] Sciences, P. L. a. A. *FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR)*: Technical Note. (2005).

- [56] Website: Wyatt, <http://www.wyatt.com/solutions/techniques/dynamic-light-scattering-nanoparticle-size.html>, consultado em 29 de Fevereiro de 2016.
- [57] Website: Malvern, <http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/default.aspx>, consultado em 3 de Março de 2016.
- [58] Sousa, I. C. d. S. C. *Interação da Enrofloxacina com modelos biomembranares: Influência das suas propriedades físico-químicas*. MSc Thesis. Universidade do Porto, Porto. (2007).
- [59] Corgozinho, C. N. C. *Utilização de técnicas espectrofluorimétricas e quimiométricas na análise de biodiesel e de suas misturas com óleo diesel*. PhD Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. (2009).
- [60] Pina, F. *Espectrofluorimetria*. Química. 54: pp 88-91. (1994).
- [61] ScanSci. *Reinventing UV/VIS/NIR spectroscopy*. ScanSci spectroscopic solutions. (2010).
- [62] Website: Nobel Prize, <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/tem/>, consultado a 3 de Julho de 2016.
- [63] Bachem: Pioneering Partner for Peptides. *Coupling Reagents*. Global Marketing, Bachem Group. (2015).
- [64] Mojarradi, H. *Coupling of substances containing a primary amine to hyaluronan via carbodiimide-mediated amidation*. Uppsala Universitet. (2011).
- [65] Maryanoff, B. E, Maryanoff, C. A., Joullié, M. M. & Lassen, K. M. *Evolution of amide bond formation*. ARKAT USA, Inc. (viii): pp 189-250. (2010).
- [66] Maehara, T., Kanno, R., Yokoshima, S., & Fukuyama, T. *Experimental Procedure and Characterization Data: A Practical Preparation of Highly Versatile N-Acylpyrroles from 2,4,4-Trimethoxybutan-1-amine*. Tokyo, Japan. (2012).

- [67] Zhou, Q., Liu, L., Zhang, D. & Fan, X. *Preparation and characterization of gemcitabine liposome injections*. Pharmazie. pp 844-847. (2012).
- [68] Foradada, M., Pujol, M. D., Bermudez, J., & Estelrich, J. *Chemical degradation of liposomes by serum components detected by NMR*. Chemistry and Physics of Lipids. 104: pp 133-148. (2000).
- [69] Karal-Yilmaz, O., Baysal, K., Sirvanci, S., Ercan, F., Porjazoska, A., & Cvetkovska, M. *Synthesis and characterization of poly(ethyleneglycol)-poly(D,L-lactide-co-glycolide) poly(ethyleneglycol)tri-block co-polymers modified with collagen*. Journal of Biomaterials Science Polymer Edition. 17 (3): pp 323-340. (2006).
- [70] Mikos, A. G. G., & Jo S. Wm. Marsh Rice University, Houston, TX (US). *S. Functionalized poly(propylene fumarate) and poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol)*. US 6,306,821 B1. (2001).
- [71] Reddy, J. R. C., Rao, B. V. S. K., Karuna, M. S., Raju, K. V. S. N., Krishna, A. V. R., & Prasad, R. B. N. *Lipase-Mediated Preparation of Epoxy Lecithin and Its Evaluation as Plasticizer in Polyester Laminates*. Journal of Applied Polymer Science. (2012).
- [72] Winkler, M., & Meier, M. A. R. *Olefin cross-metathesis as a valuable tool for the preparation of renewable polyesters and polyamides from unsaturated fatty acid esters and carbamates*. Green Chemistry. 16: pp 3335–3340. (2014).
- [73] Abraham, R. J., Griffiths, L., & Perez, M. *¹H NMR spectra. Part 30†: ¹H chemical shifts in amides and the magnetic anisotropy, electric field and steric effects of the amide group*. Magnetic Resonance in Chemistry. 51: pp 143-155 (2013).
- [74] Wojasinski, M., Ciach, T., & Duszynska, E. *Lecithin-based wet chemical precipitation of hydroxyapatite nanoparticles*. Colloid and Polymer Science. 293: pp 1561–1568. (2015).

-
- [75] Kumar, M., Ahuja, M., & Sharma, S. K. *Hepatoprotective Study of Curcumin-Soya Lecithin Complex*. *Scientia Pharmaceutica*. 76: pp 761–774. (2008).
- [76] Huang, J., Gou, G., Xue, B., Yan, Q., Sun, Y., & Dong, L.-E. *Pharmaceutical nanotechnology: Preparation and characterization of “dextran-magnetic layered double hydroxide-fluorouracil” targeted liposomes*. *International Journal of Pharmaceutics*. 450: pp 323-330. (2013).
- [77] Yu, D.-G., Yang, J.-H., Wang, X., & Tian, F. *Liposomes self-assembled from electrosprayed composite microparticles*. *Nanotechnology*. 23. (2012).
- [78] Zhang X., Matyjaszewski K. *Synthesis of Functional Polystyrenes by Atom Transfer Radical Polymerization Using Protected and Unprotected Carboxylic Acid Initiators*. *Macromolecules*. 32: pp 7349-7353. (1999).
- [79] Gao, J., Zhai, G., Song, Y., & Jiang, B. *Multidimensionally Stimuli-Responsive Phase Transition of Aqueous Solutions of Poly((N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate) and Poly(N,Ndimethyl-N-(methacryloyl)ethyl ammonium butane sulfonate)*. *InterScience*. (2007).
- [80] Qiu, F., Zhu, Q., Tong, G., Zhu, L., Wang, D., Yan, D., & Zhu, X. *Highly Fluorescent Core-shell Hybrid Nanoparticles from Unimolecular Star Conjugated Polymer for Biological Tool*. *The Royal Society of Chemistry*. 48: pp 11954–11956. (2012).
- [81] Lee, S., Chen, H., Dettmer, C., O’Halloran, T., & Nguyen, S. *Polymer-Caged Liposomes: A pH-Responsive Delivery System with High Stability*. *Jacs Communications*. 129: 15096-15097. (2007).
- [82] Domingos, R. F., Baalousha, M. A., Ju-Nam, Y., Reid, M., Tufenkji, N., Lead, J. R., Leppard, G. G., & Wilkinson, K. J. *Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes*. *Environmental Science & Technology*. 43 (19): pp 7277-7284. (2009).
-

BIBLIOGRAFIA

- [83] Website: Uniscience, <http://www.uniscience.com/dialise>, consultado em 22 de Junho de 2016.
- [84] Damy-Benedetti, P. d. C., Terroni, H. C., de Jesus, J. M., Artuzo, L. T., Ventura, L. V., & Santos, R. F. *Liofilização*. Unilago. pp 271-284. (2013).

APÊNDICES

Apêndice A

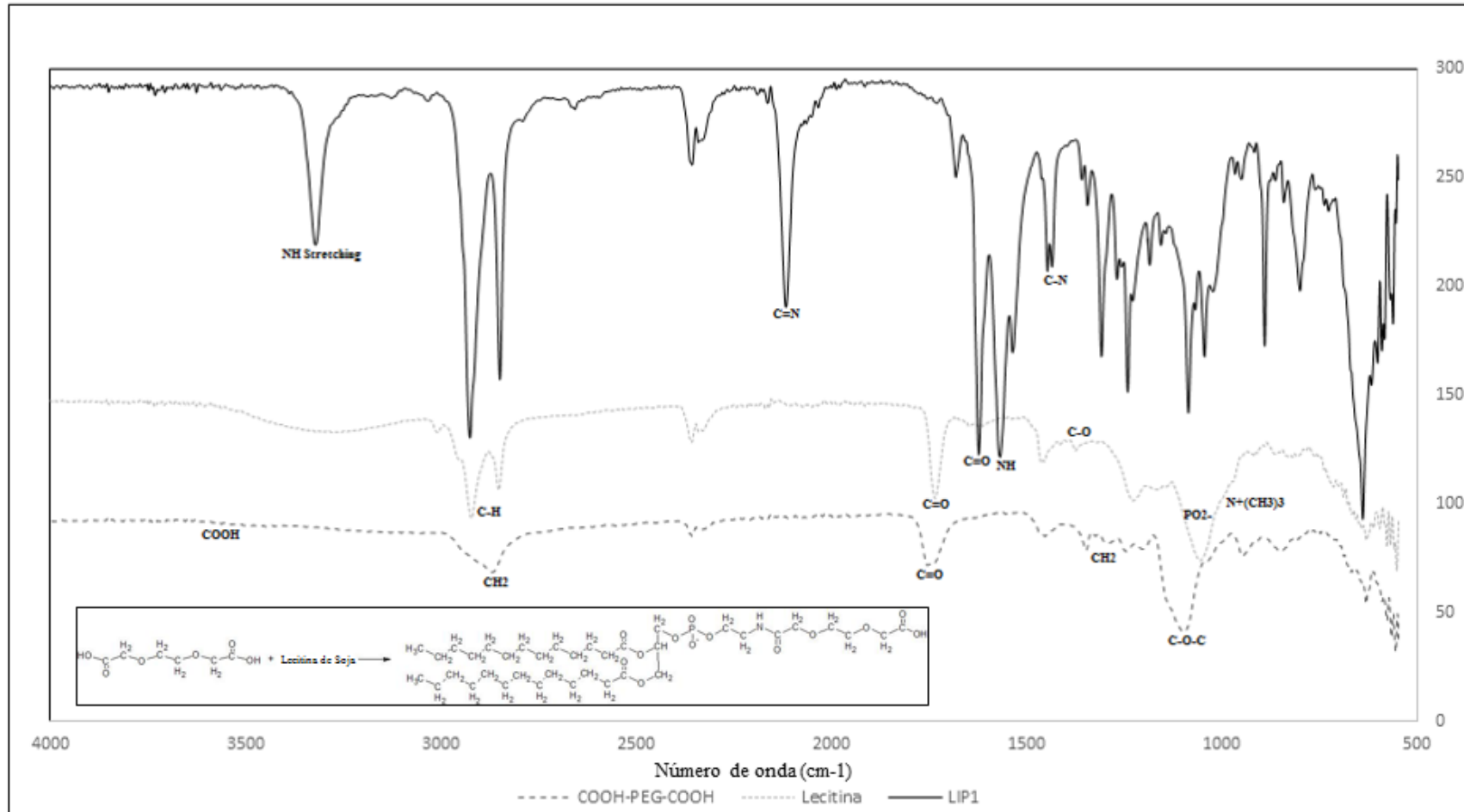


Figura 38 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 1 (Alternativa 1).

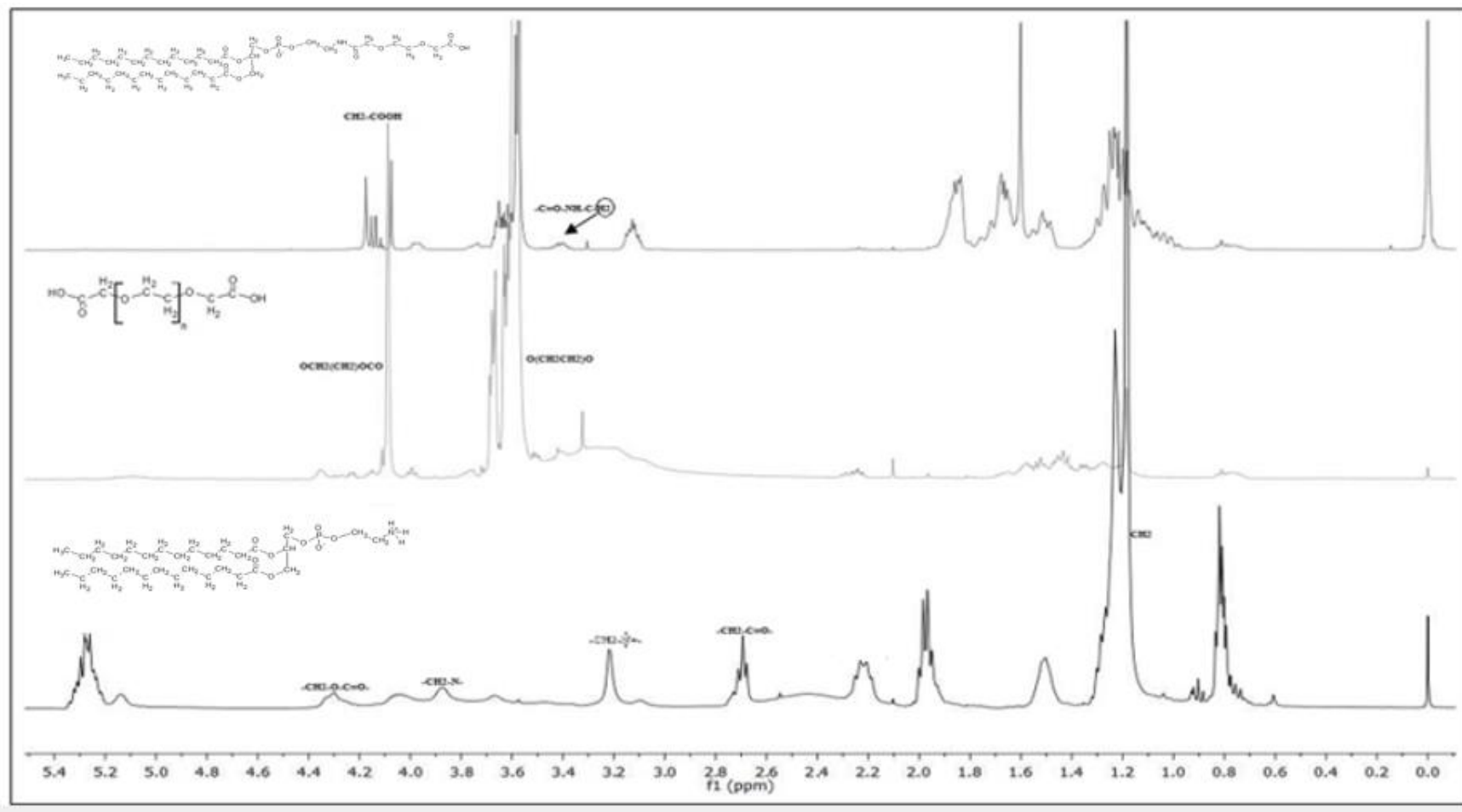


Figura 39 - Espectro de RMN em CDCl₃ da reação 1 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).

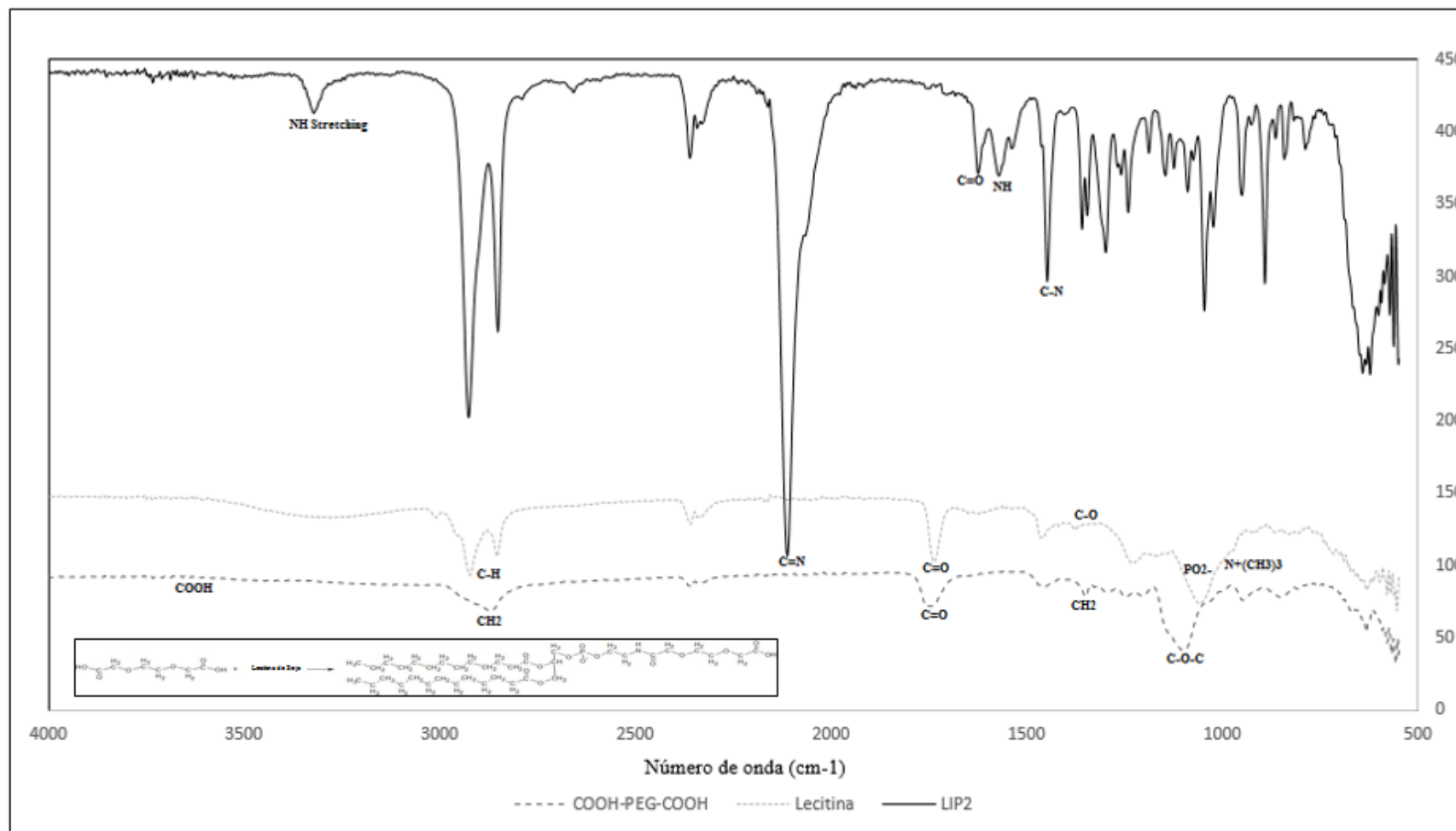


Figura 40 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 2 (Alternativa I).

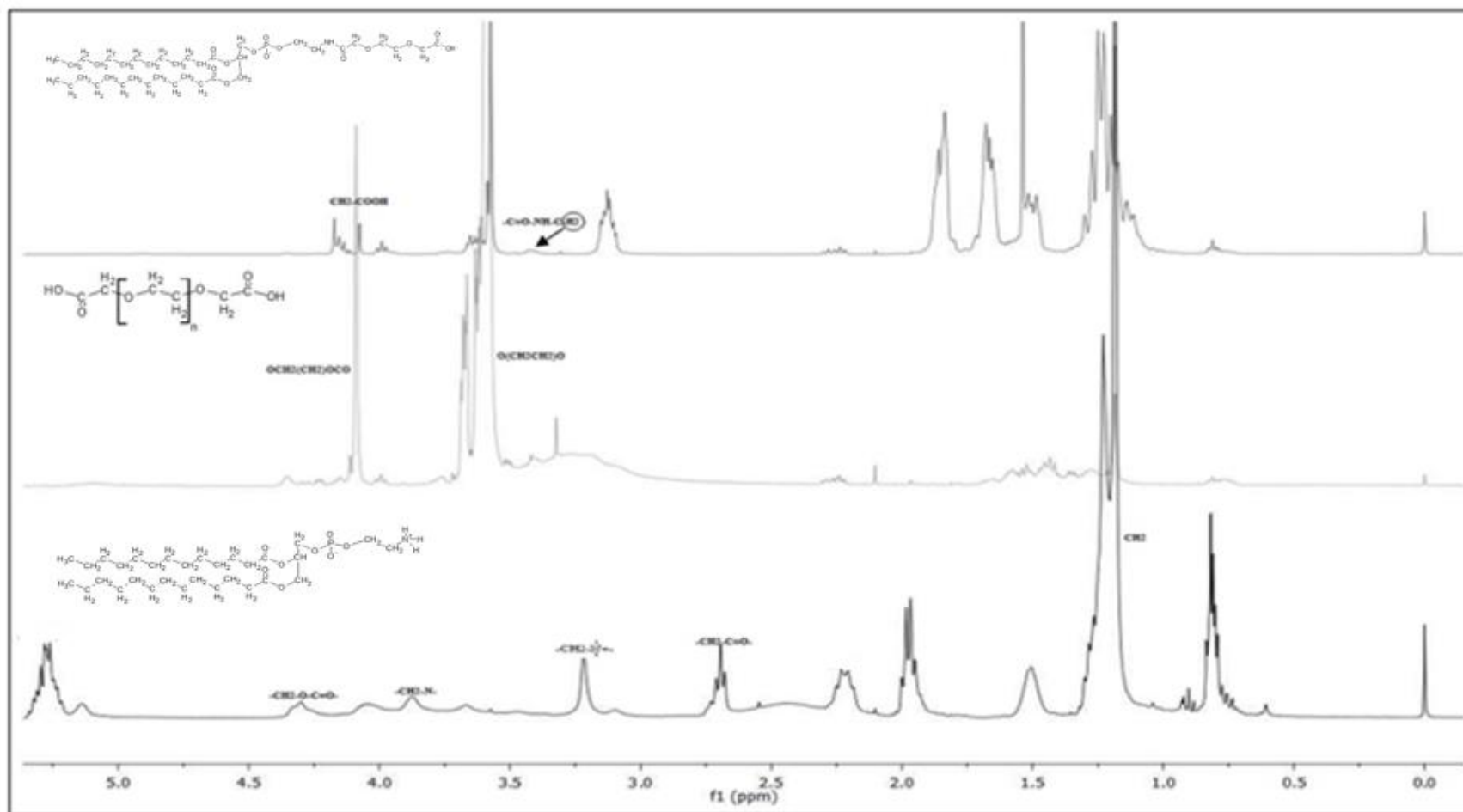


Figura 41 - Espetro de RMN em CDCl₃ da reação 2 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).

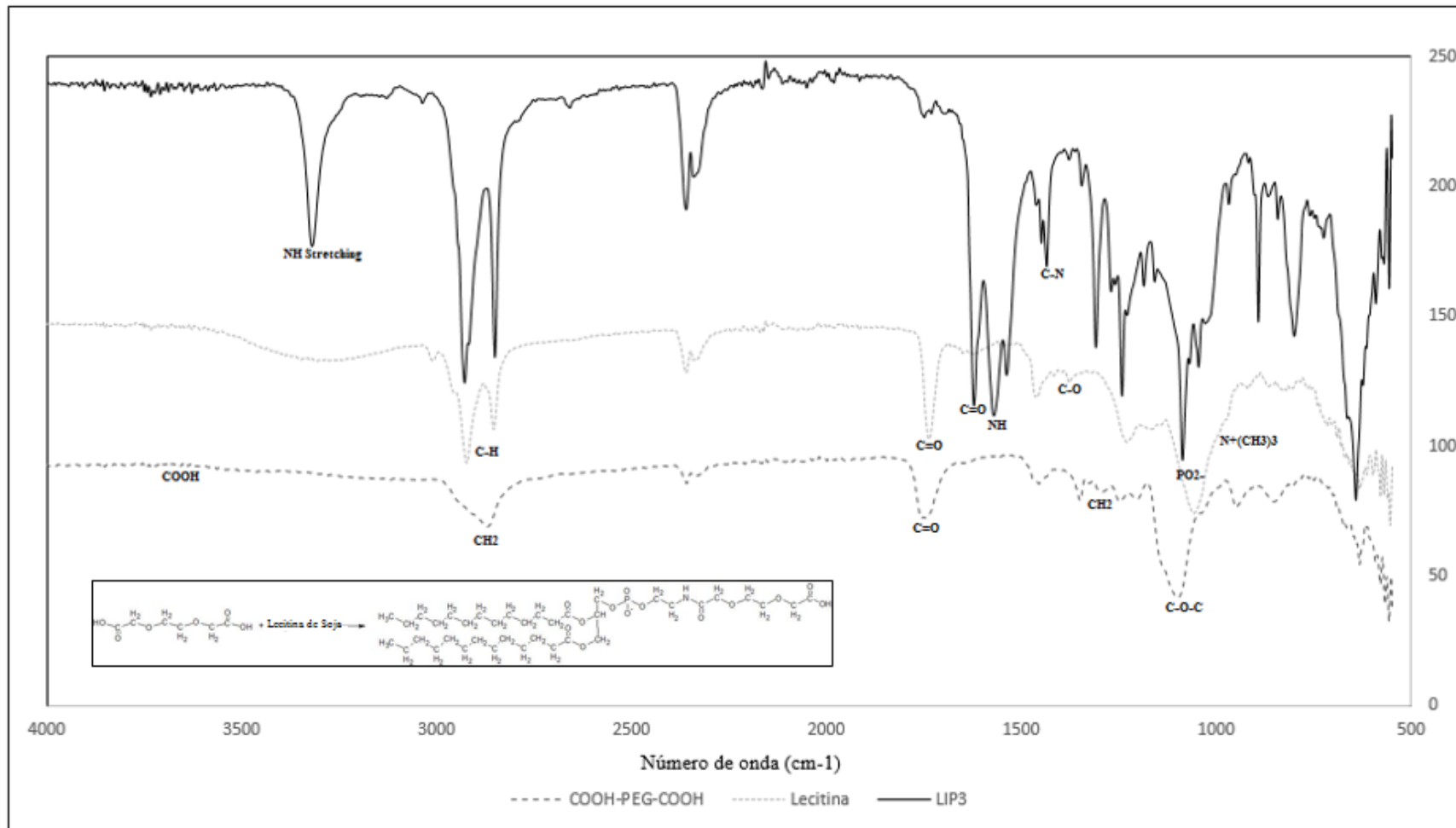


Figura 42 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 3 (Alternativa I).

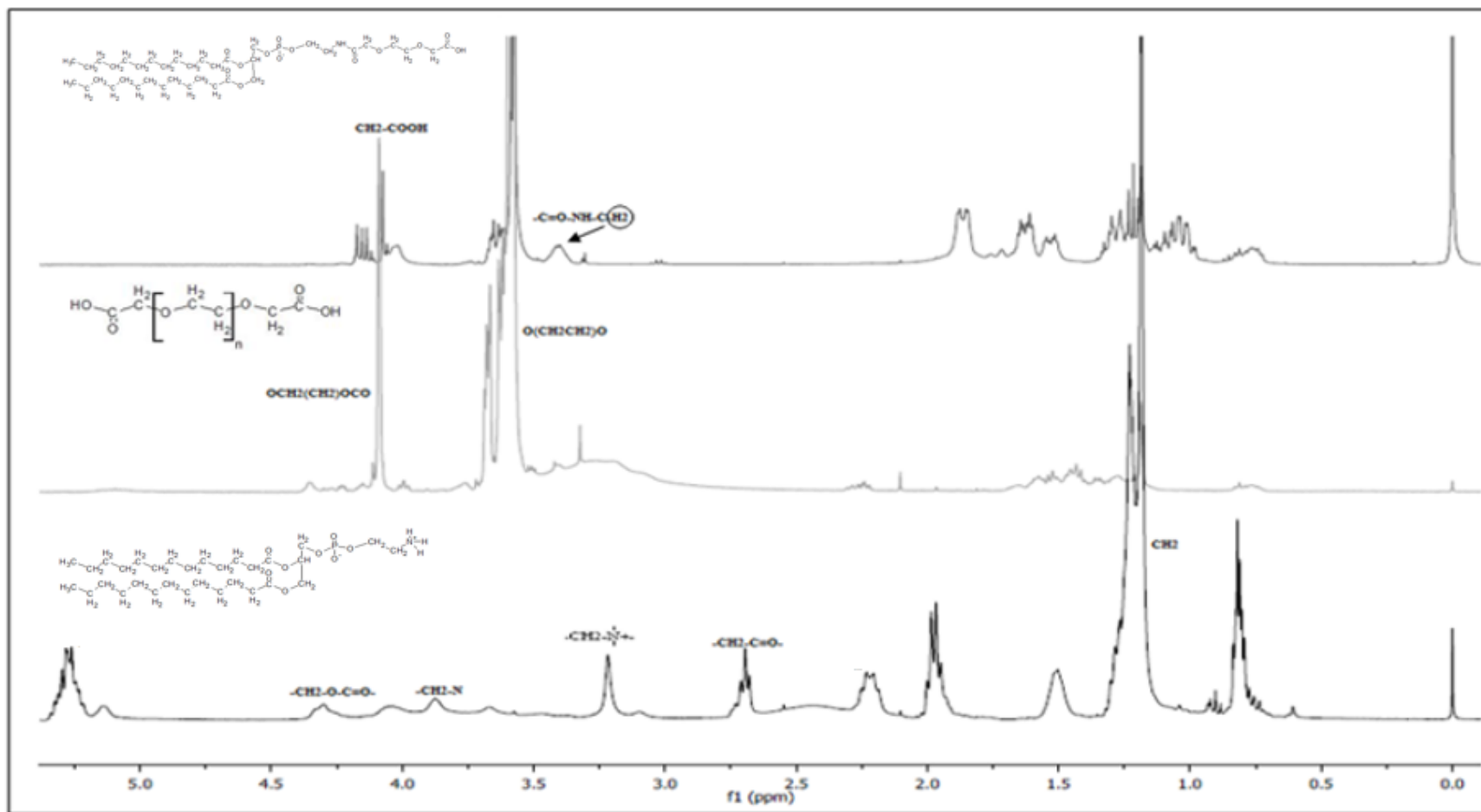


Figura 43 - Espectro de RMN em CDCl₃ da reação 3 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).

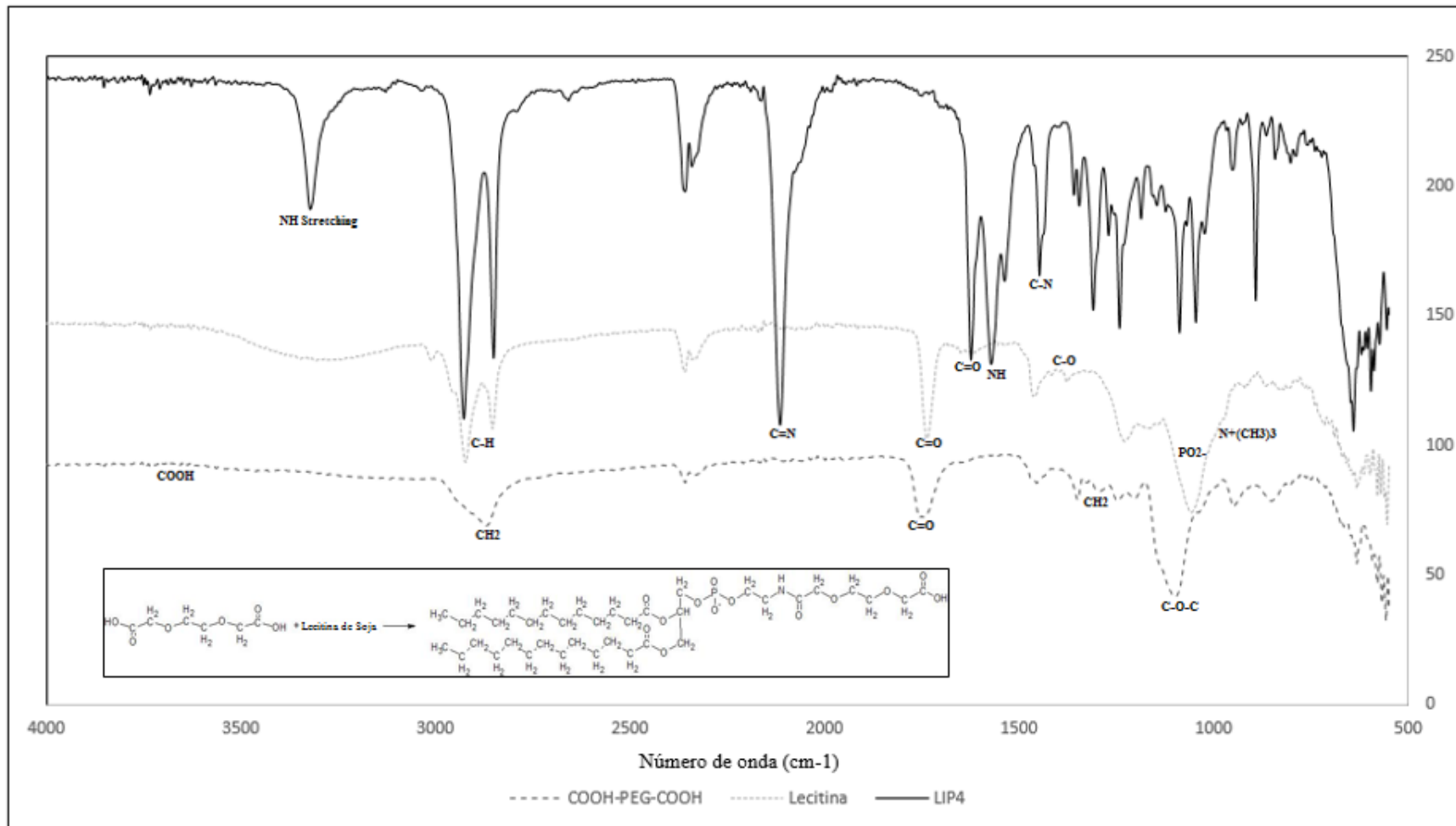


Figura 44 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 4 (Alternativa I).

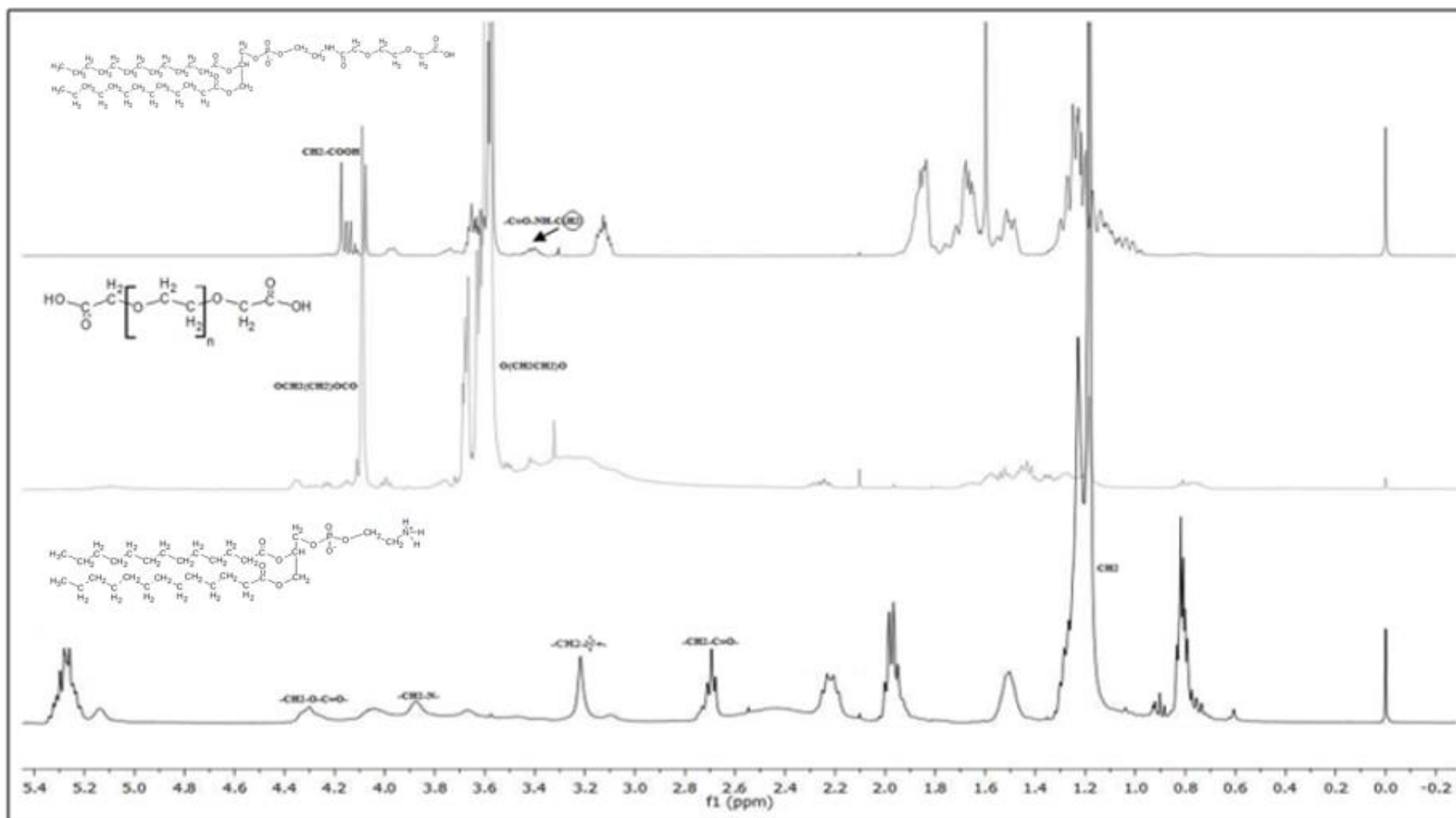


Figura 45 - Espectro de RMN em CDCl₃ da reação 4 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).

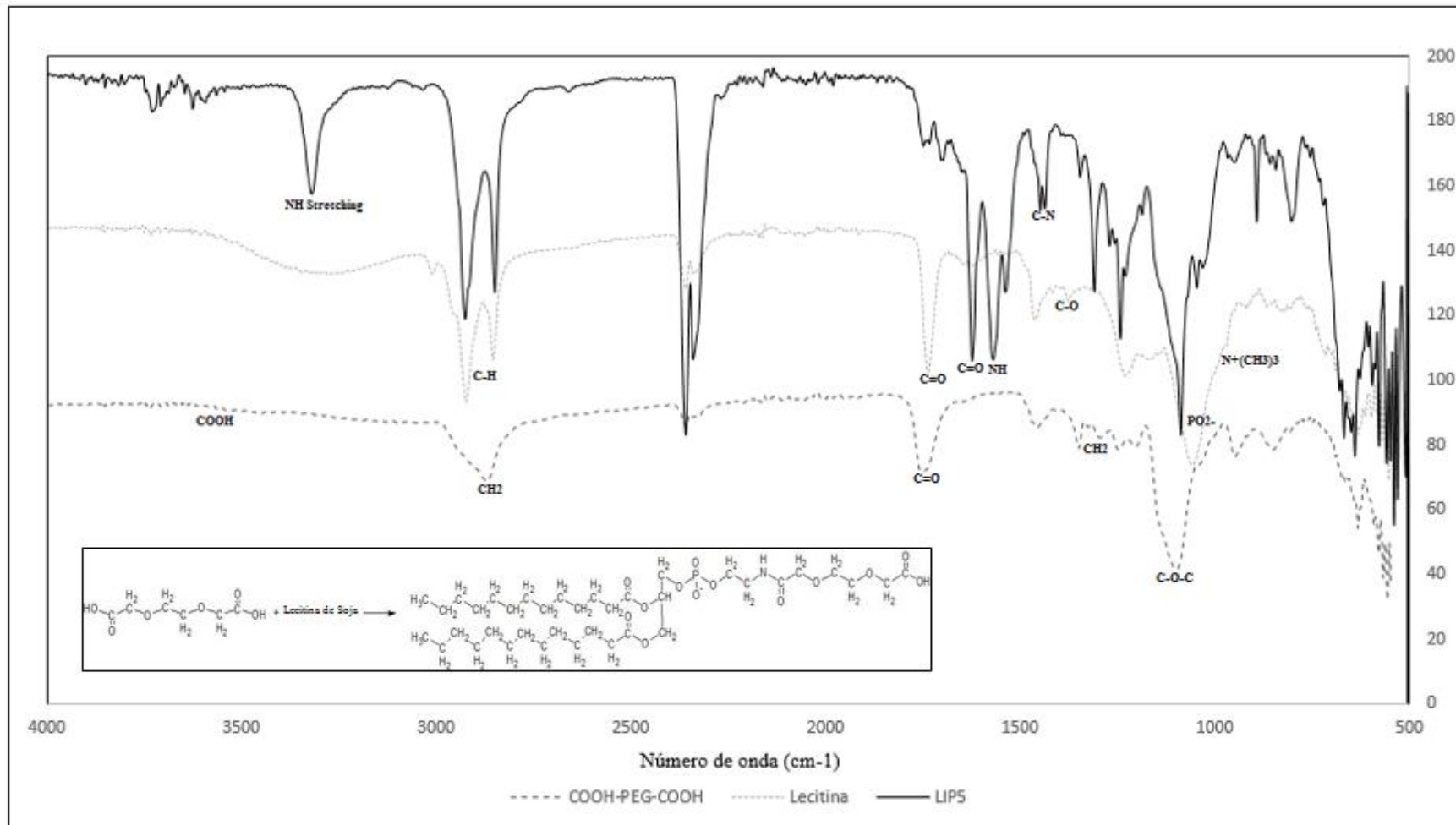


Figura 46 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 5 (Alternativa I).

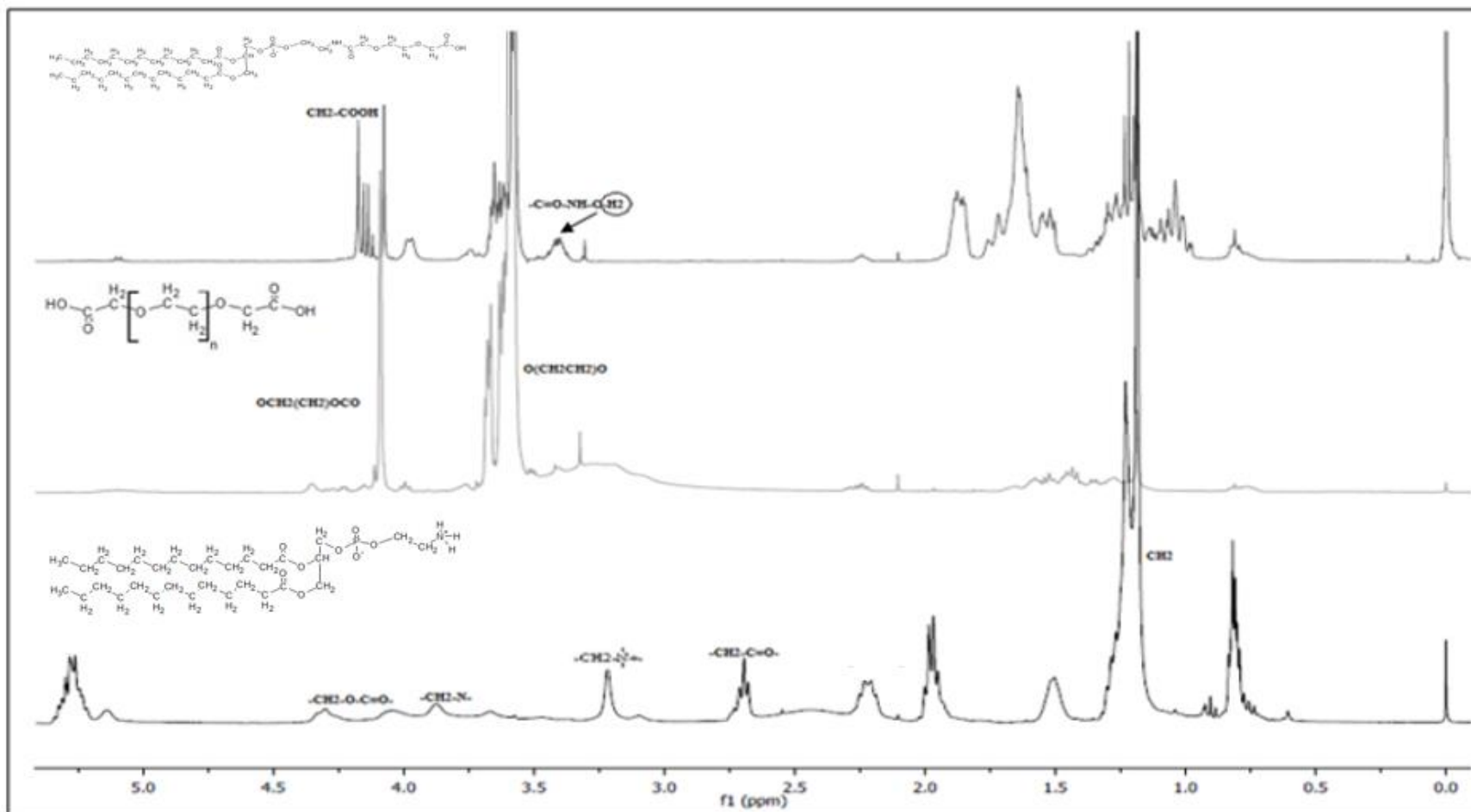


Figura 47 - Espectro de RMN em CDCl₃ da reação 5 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).

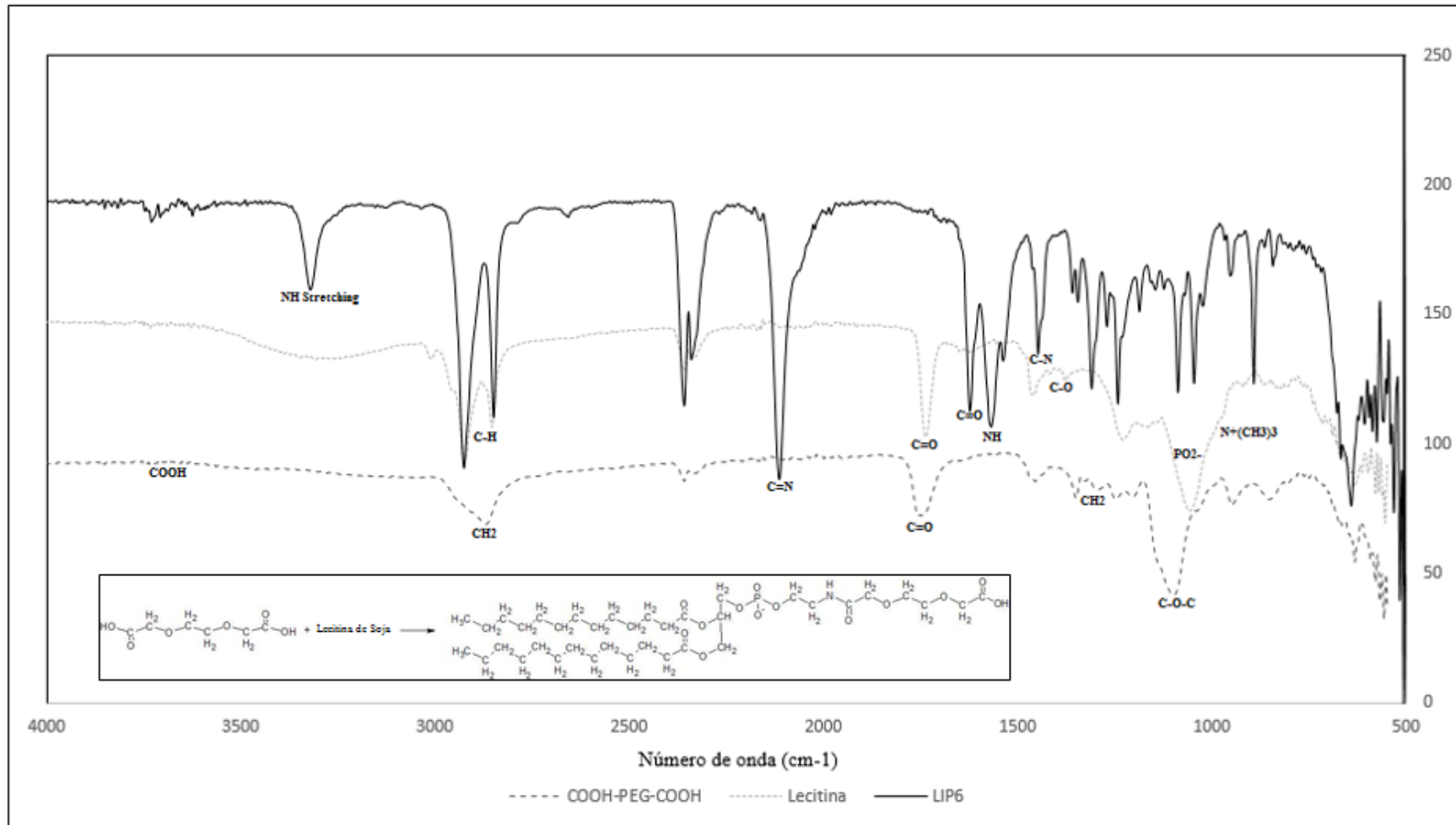


Figura 48 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 6 (Alternativa I).

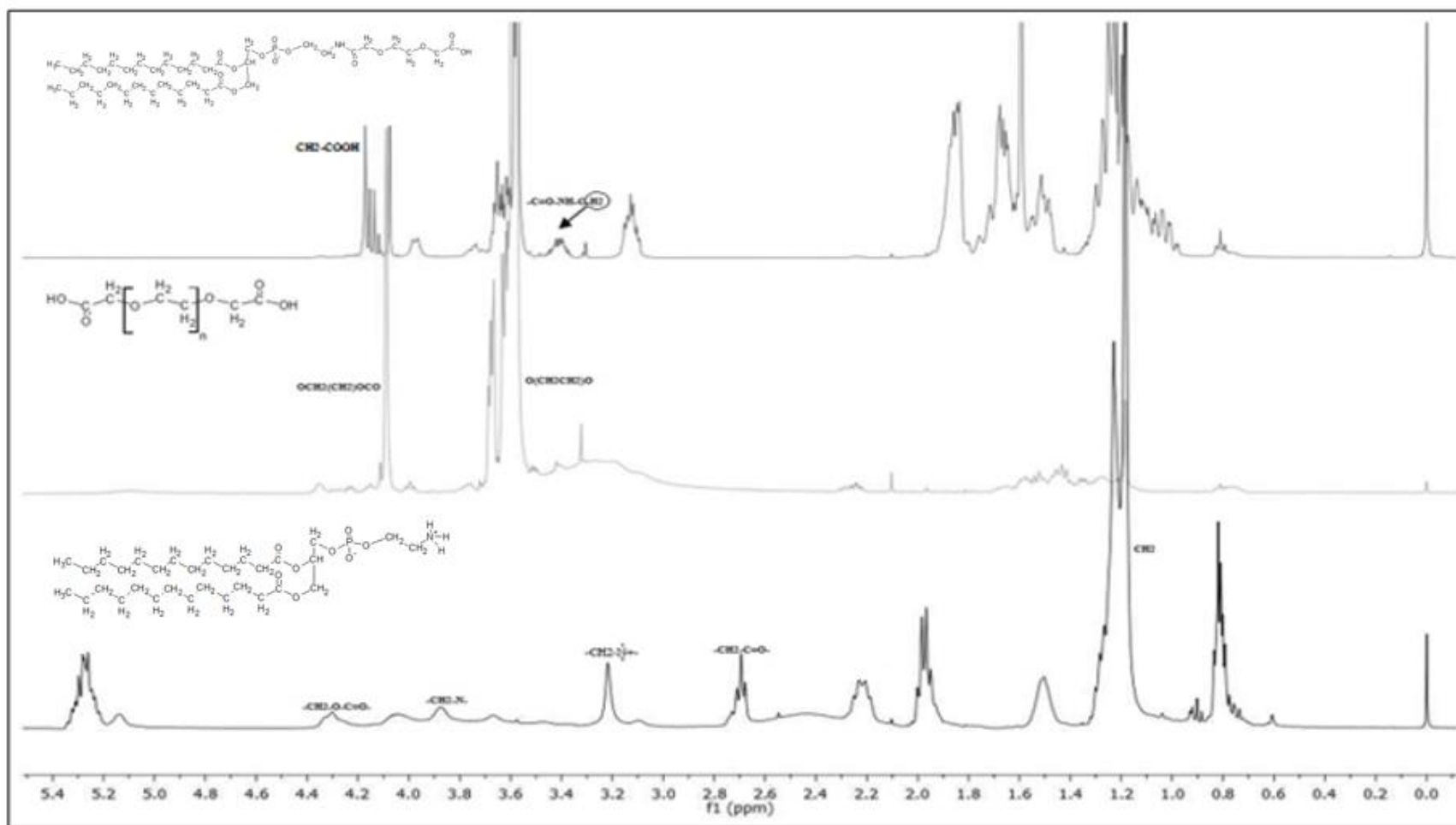


Figura 49 - Espectro de RMN em CDCl_3 da reação 6 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa I).

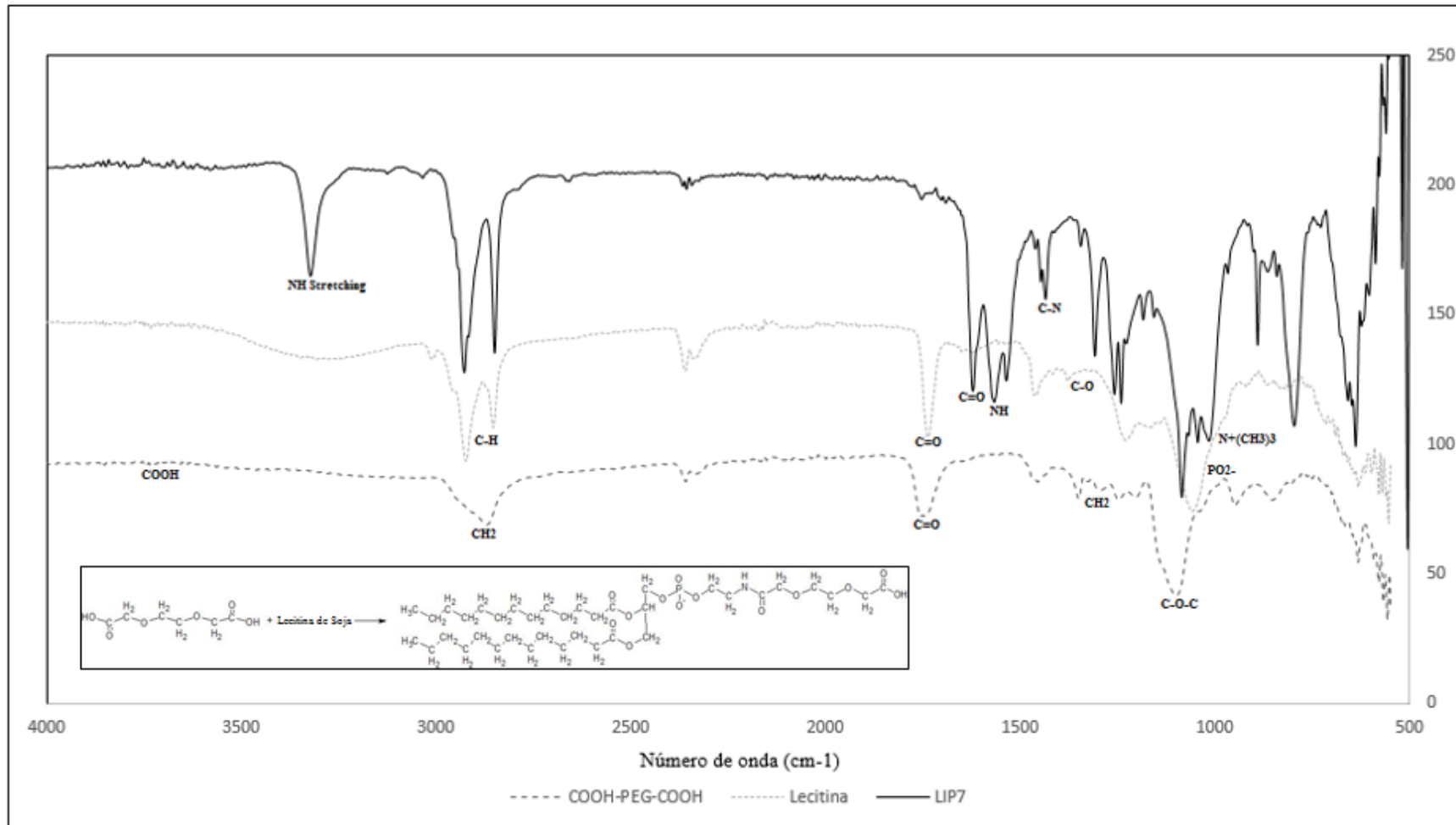


Figura 50 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 7 (Alternativa I).

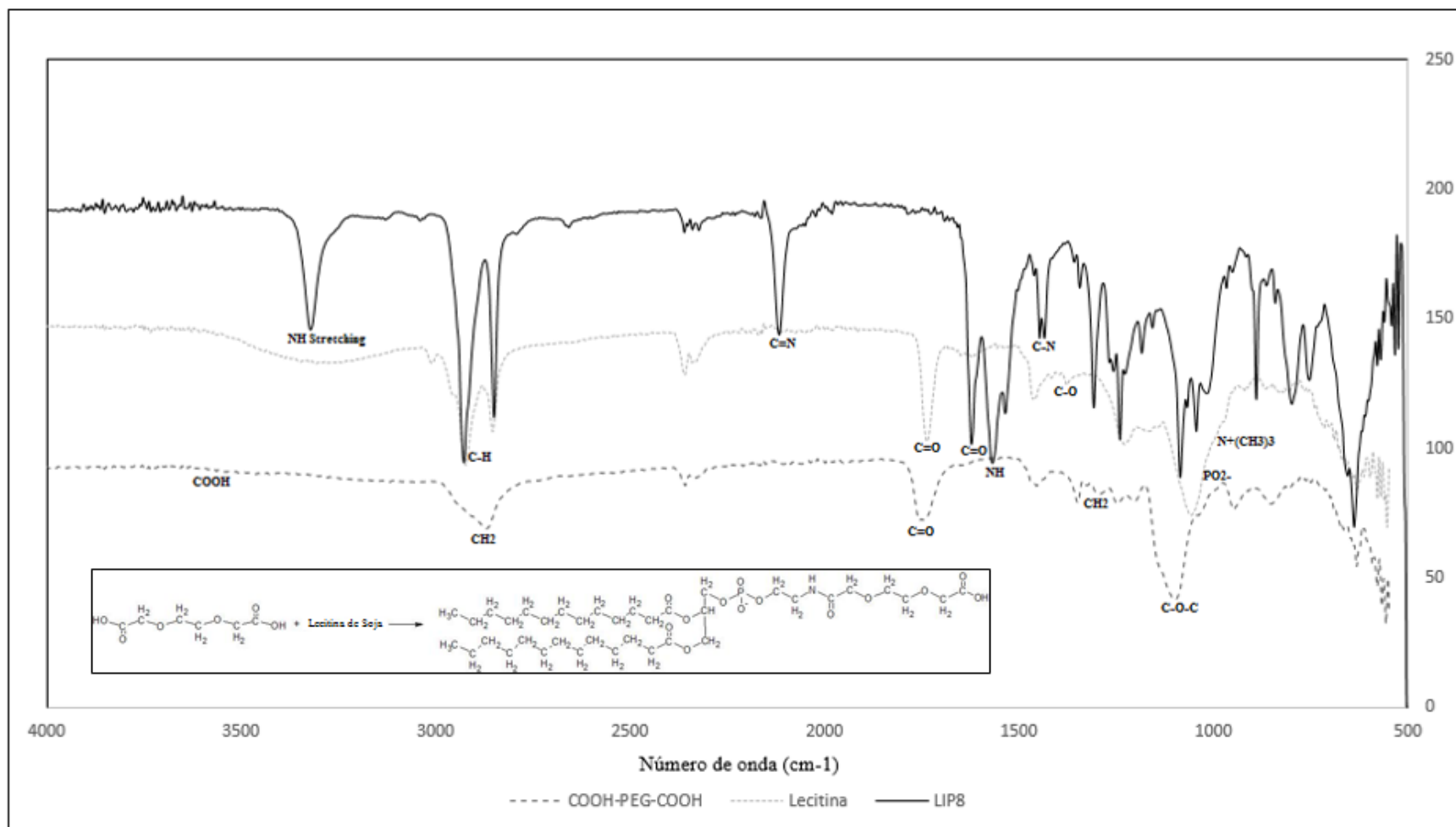


Figura 51 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 8 (Alternativa I).

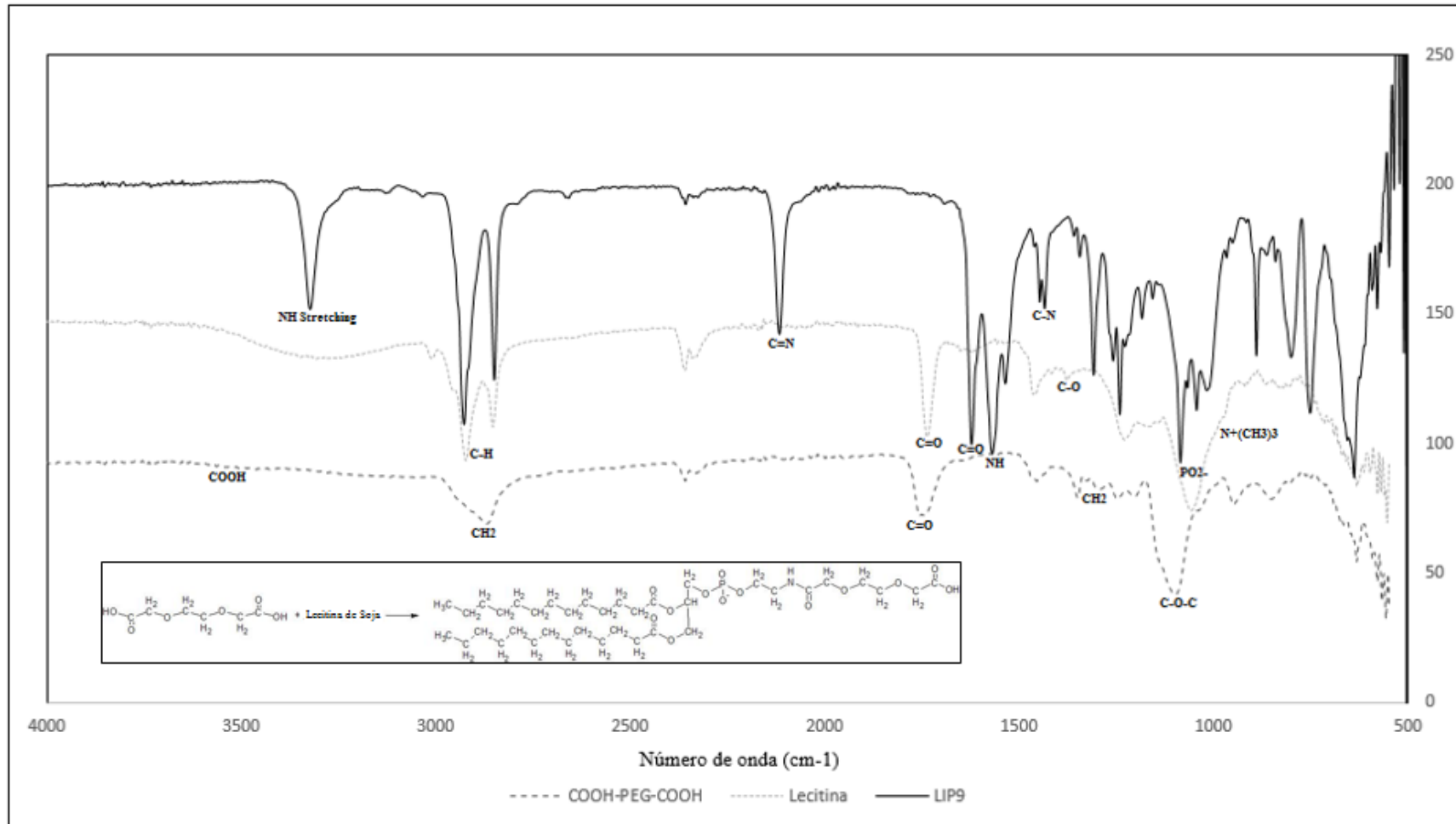


Figura 52 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 9 (Alternativa I).

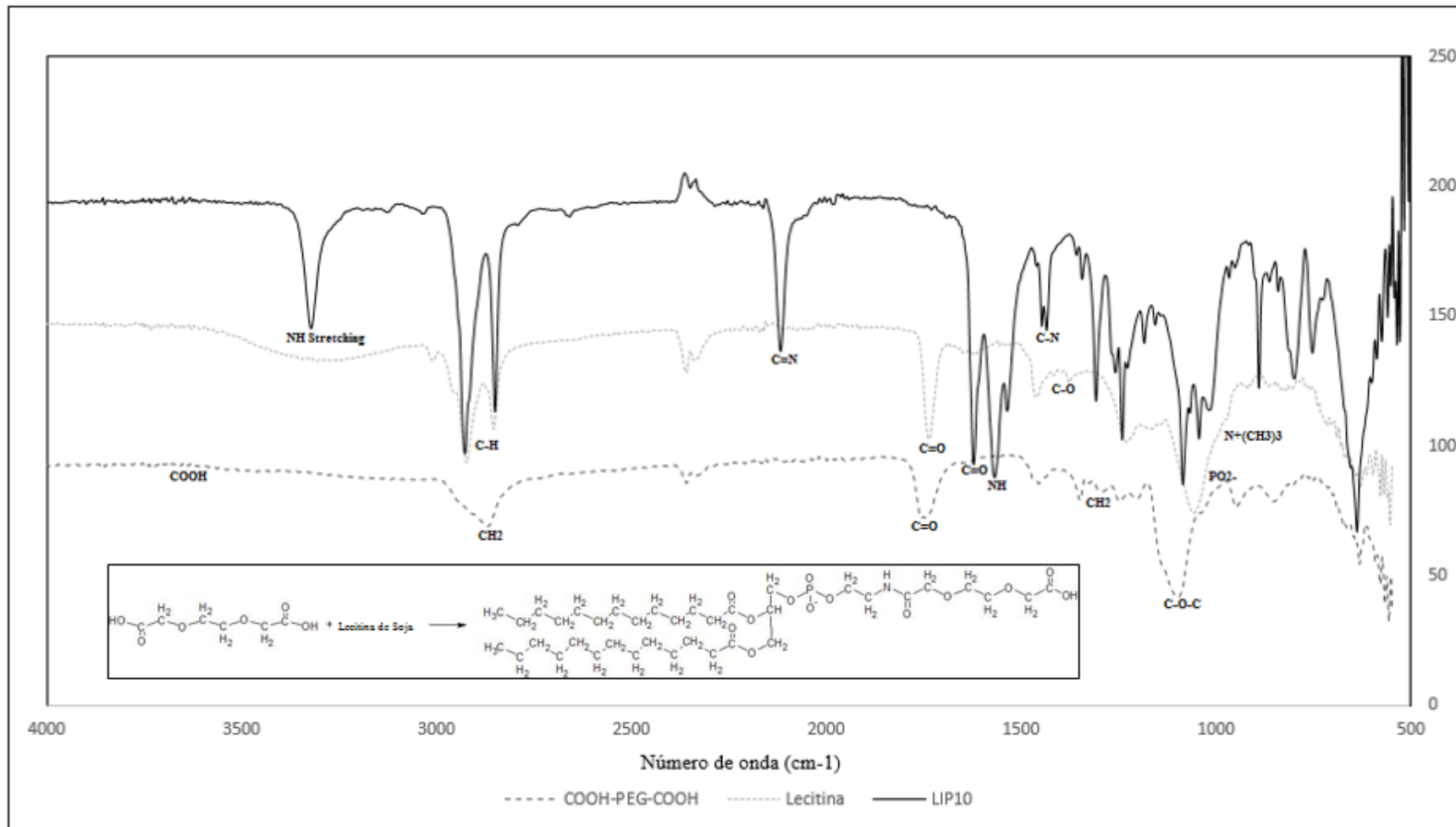


Figura 53 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 10 (Alternativa I).

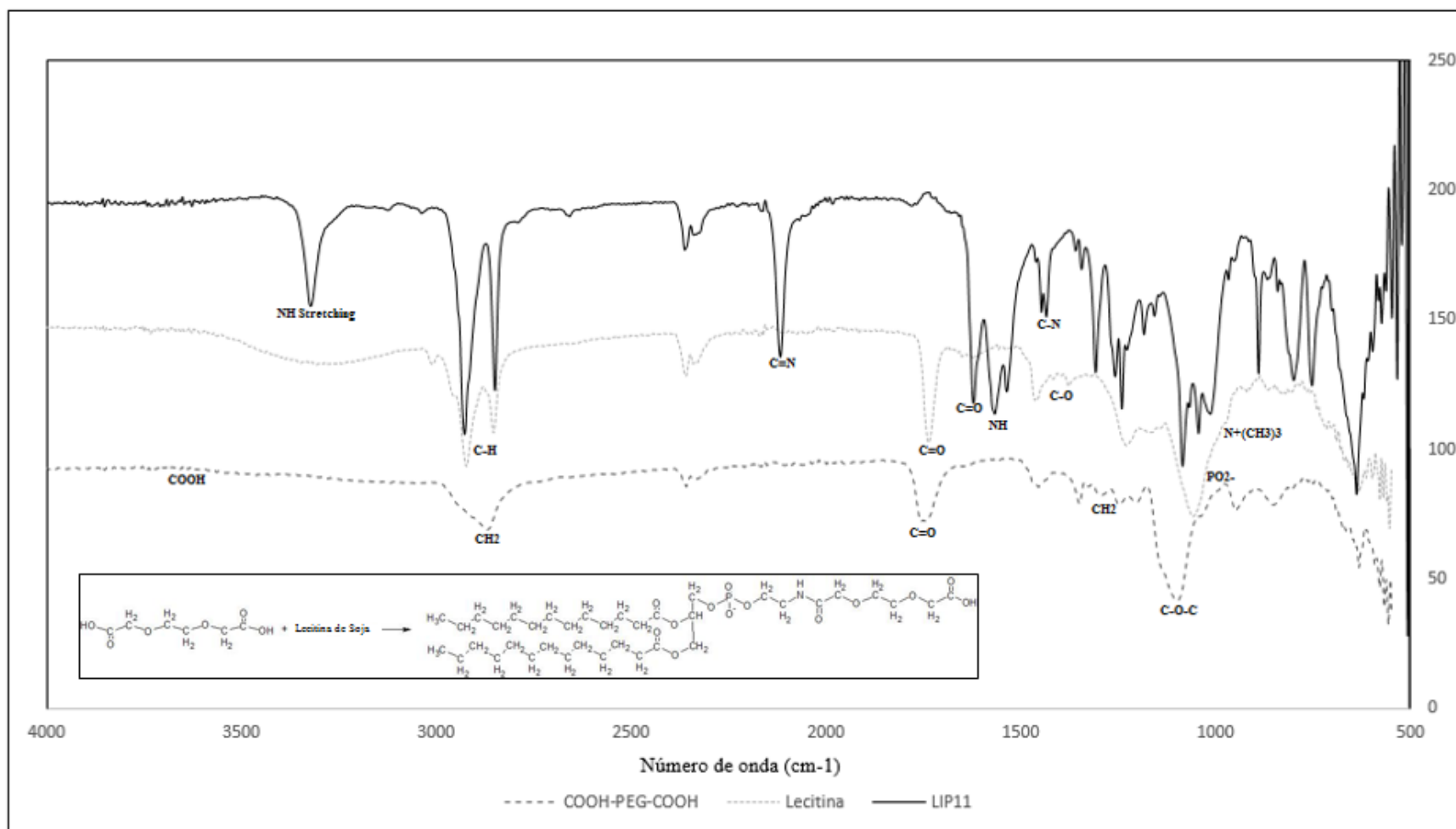


Figura 54 - Espectro FTIR de transmitância da Lecitina-PEG-COOH para a reação 11 (Alternativa I).

APÊNDICE B

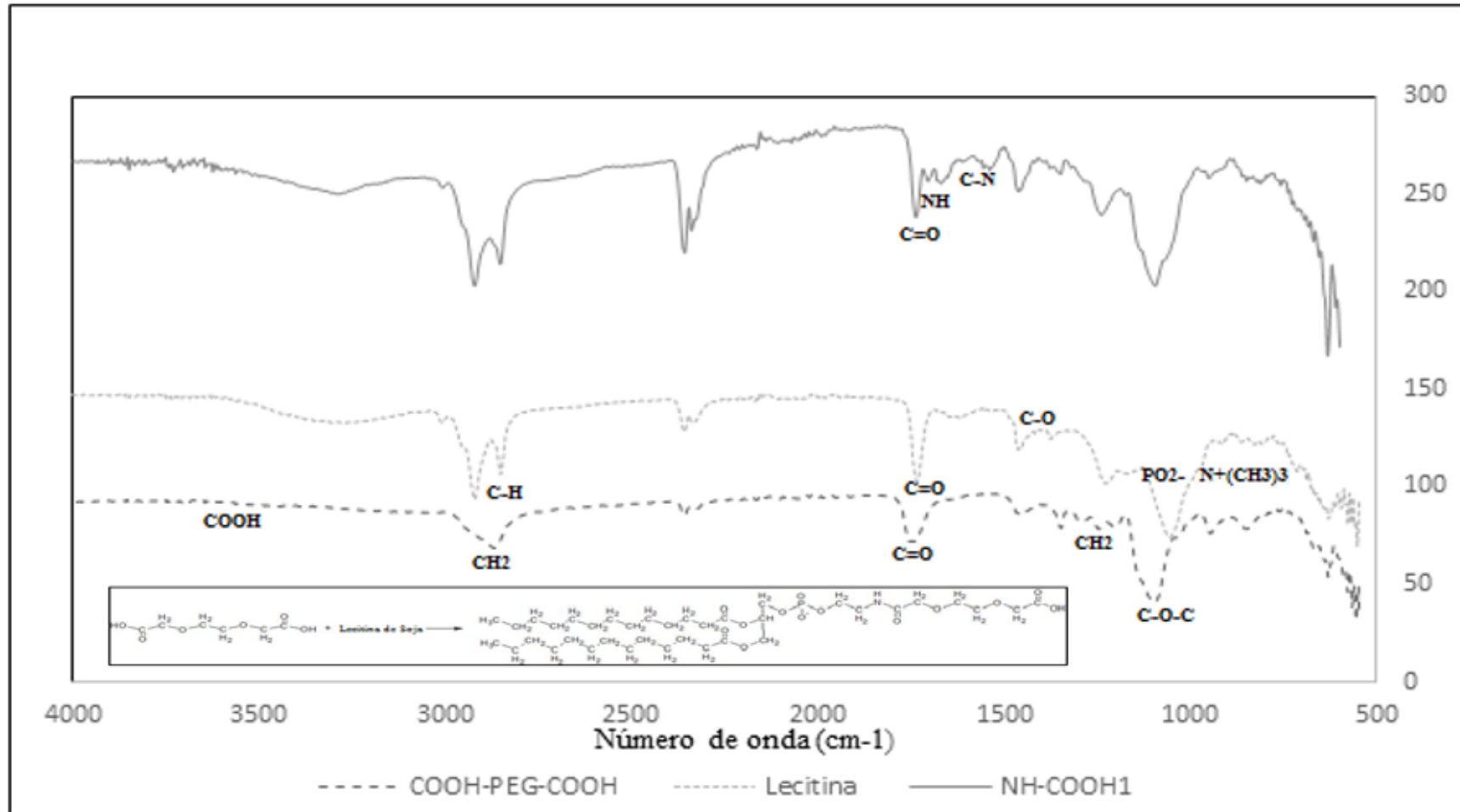


Figura 55 - Espectro de FTIR de transmitância da reação 1 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).

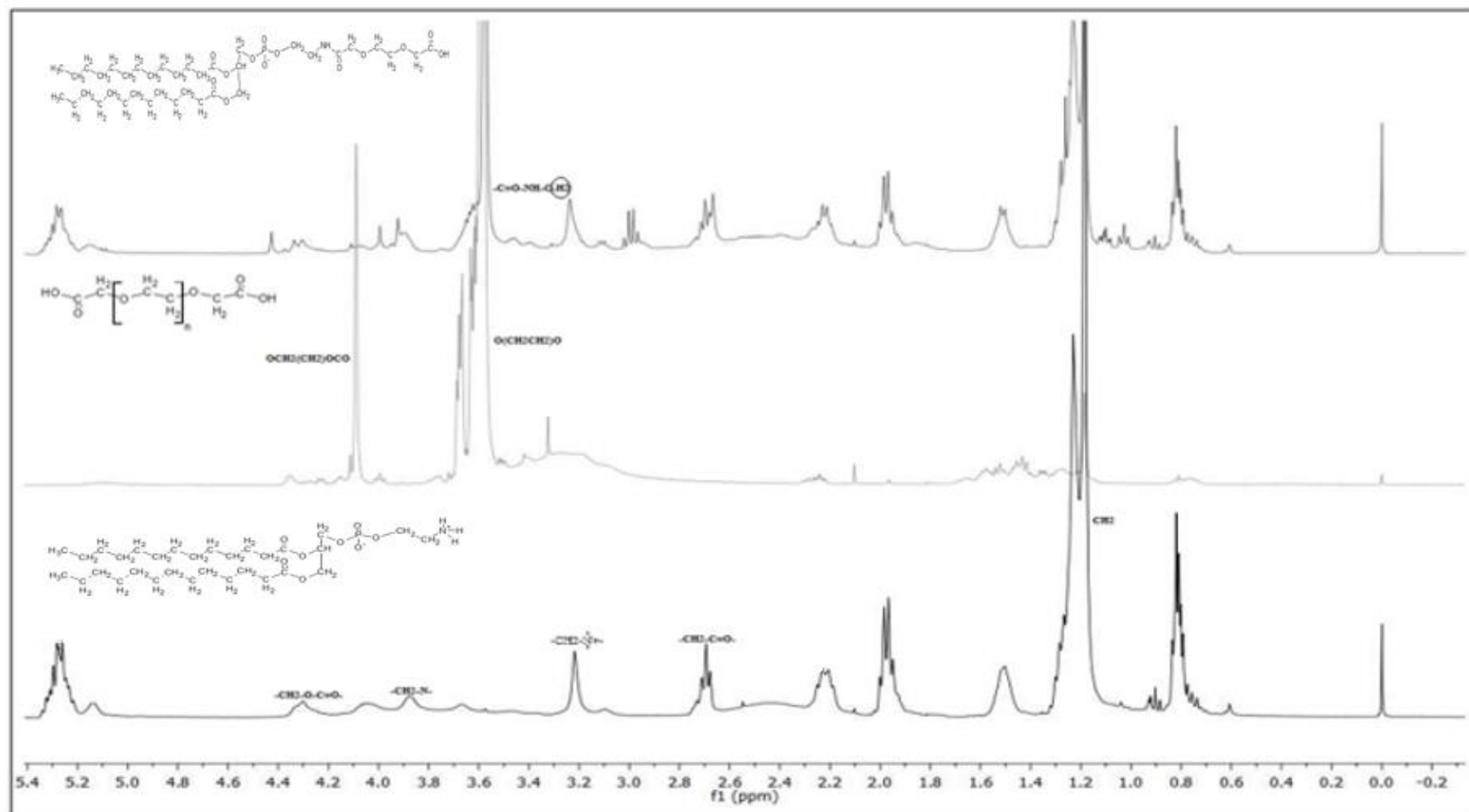


Figura 56 - Espetro de RMN em CDCl₃ da reação 1 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).

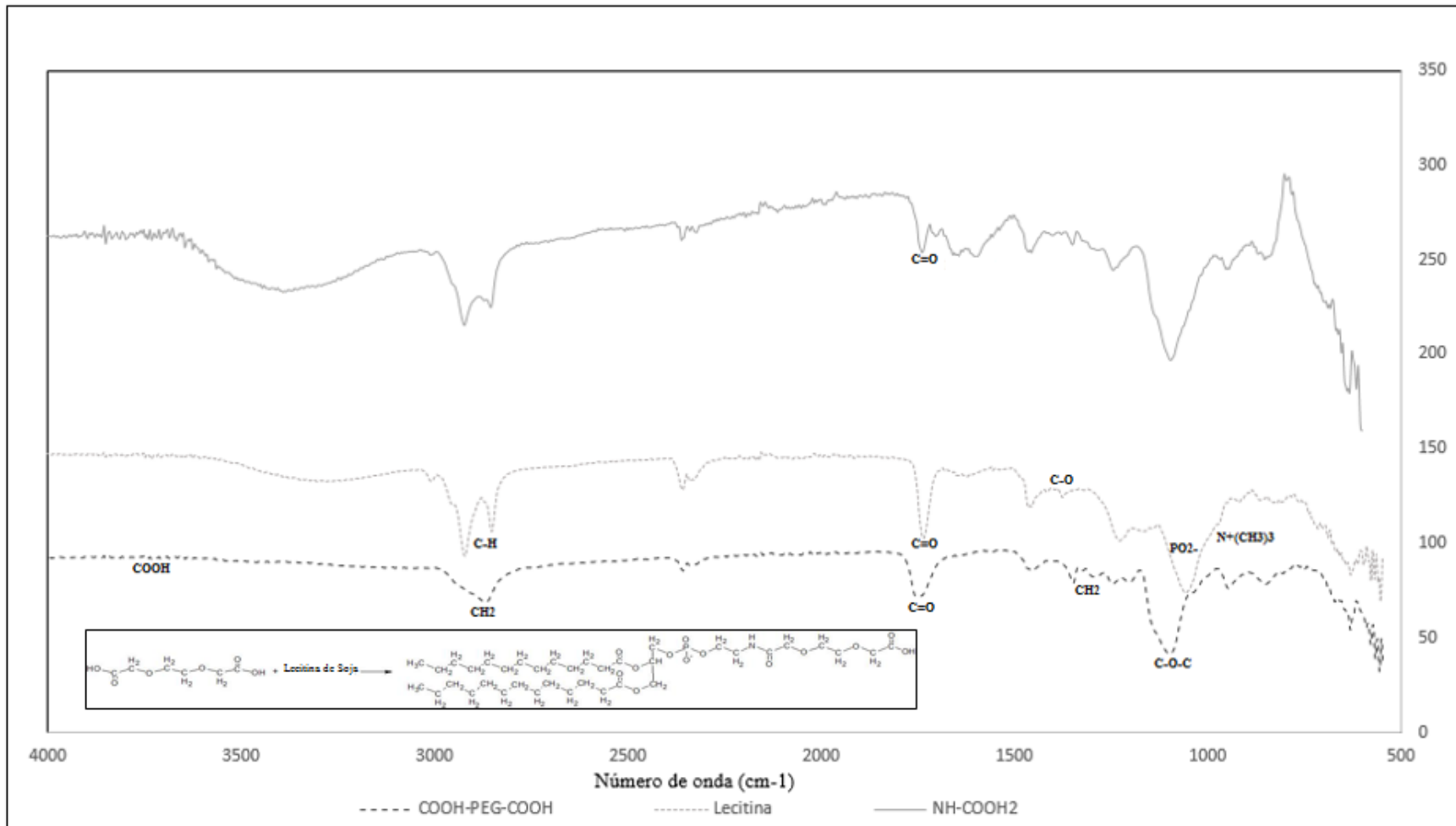


Figura 57 - Espectro de FTIR de transmitância da reação 2 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).

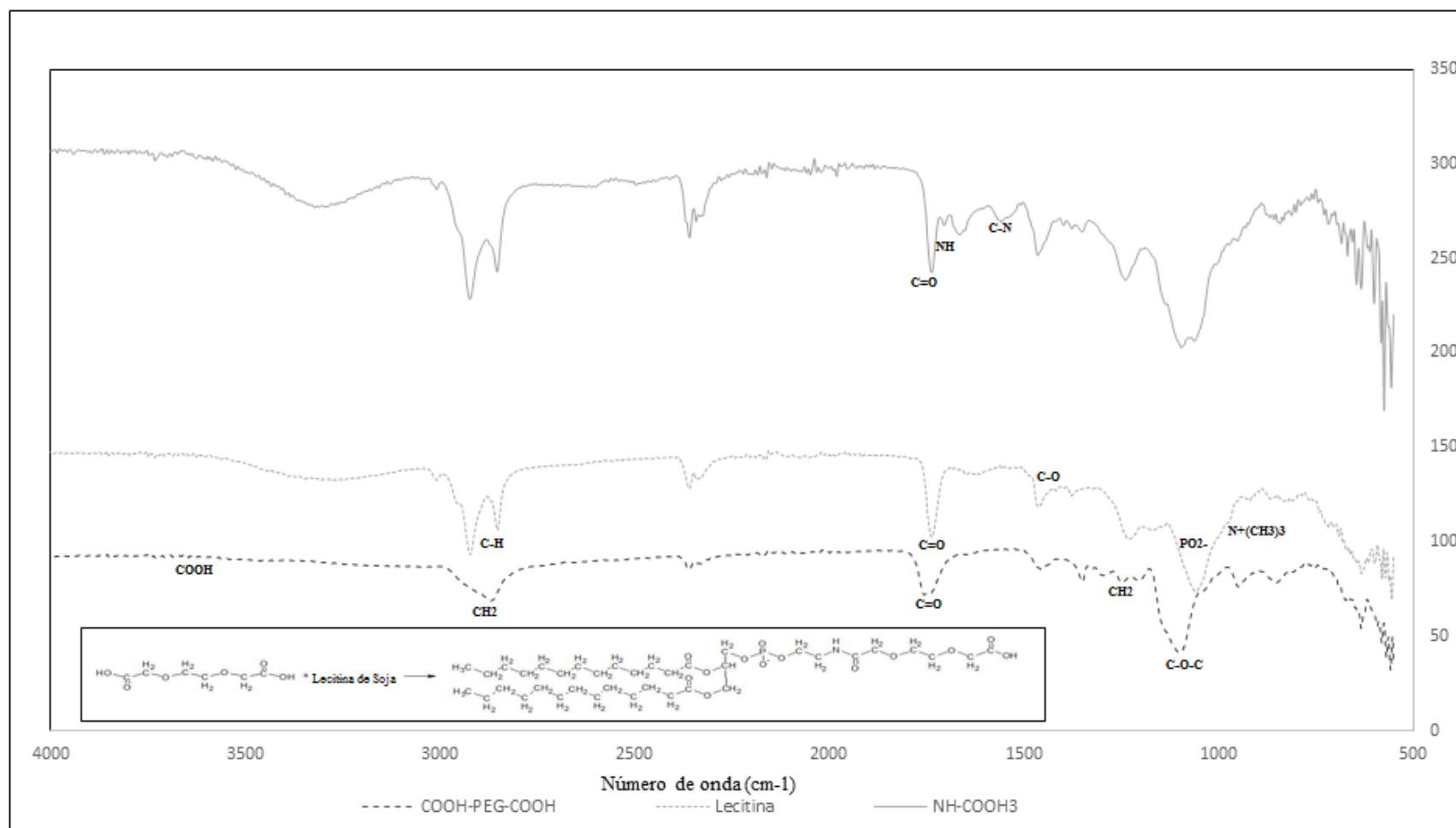


Figura 58 - Espectro de FTIR de transmitância da reação 3 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).

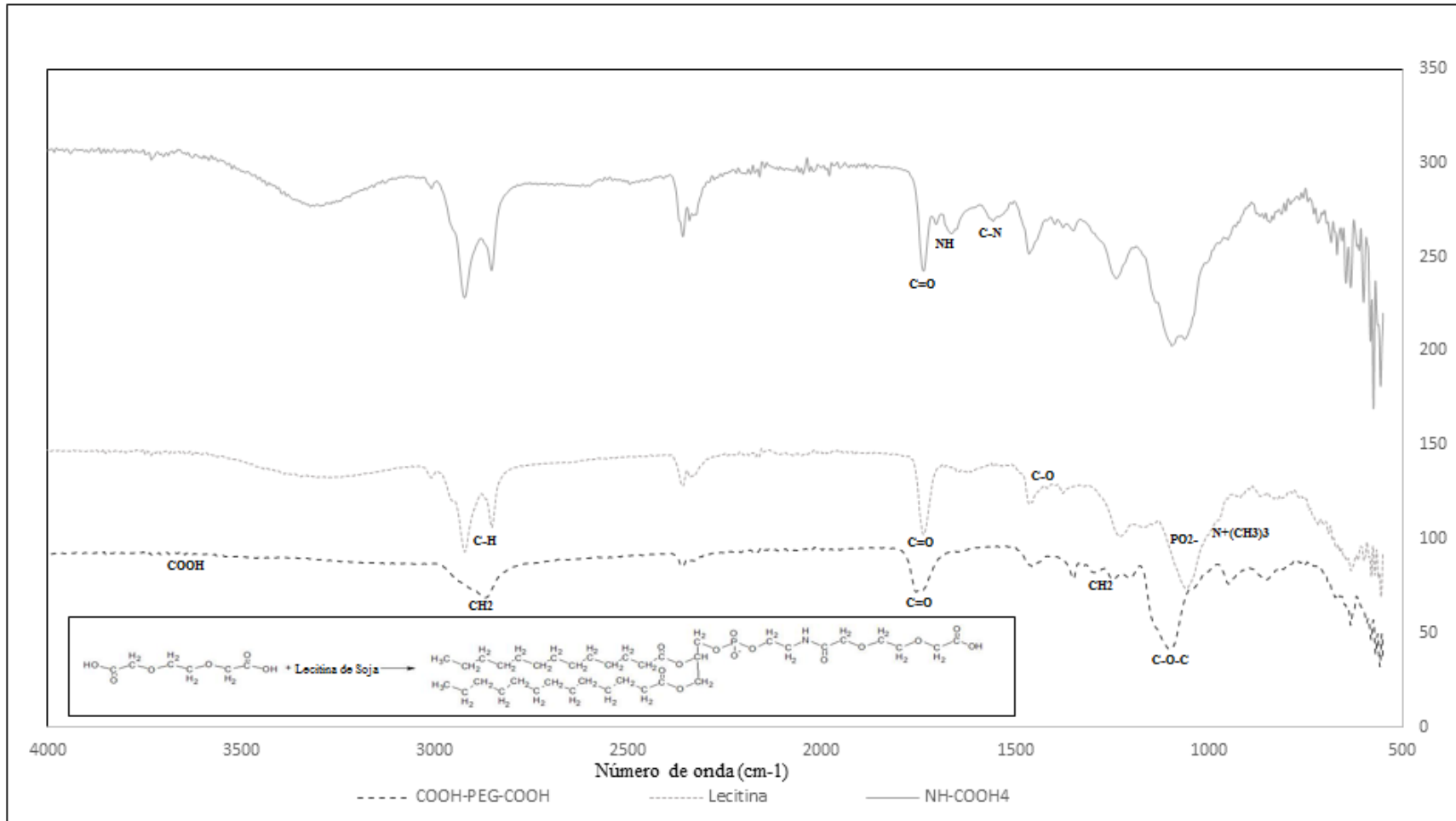


Figura 59 - Espectro de FTIR de transmitância da reação 4 de Lecitina-PEG-COOH (Alternativa II).

APÊNDICE C

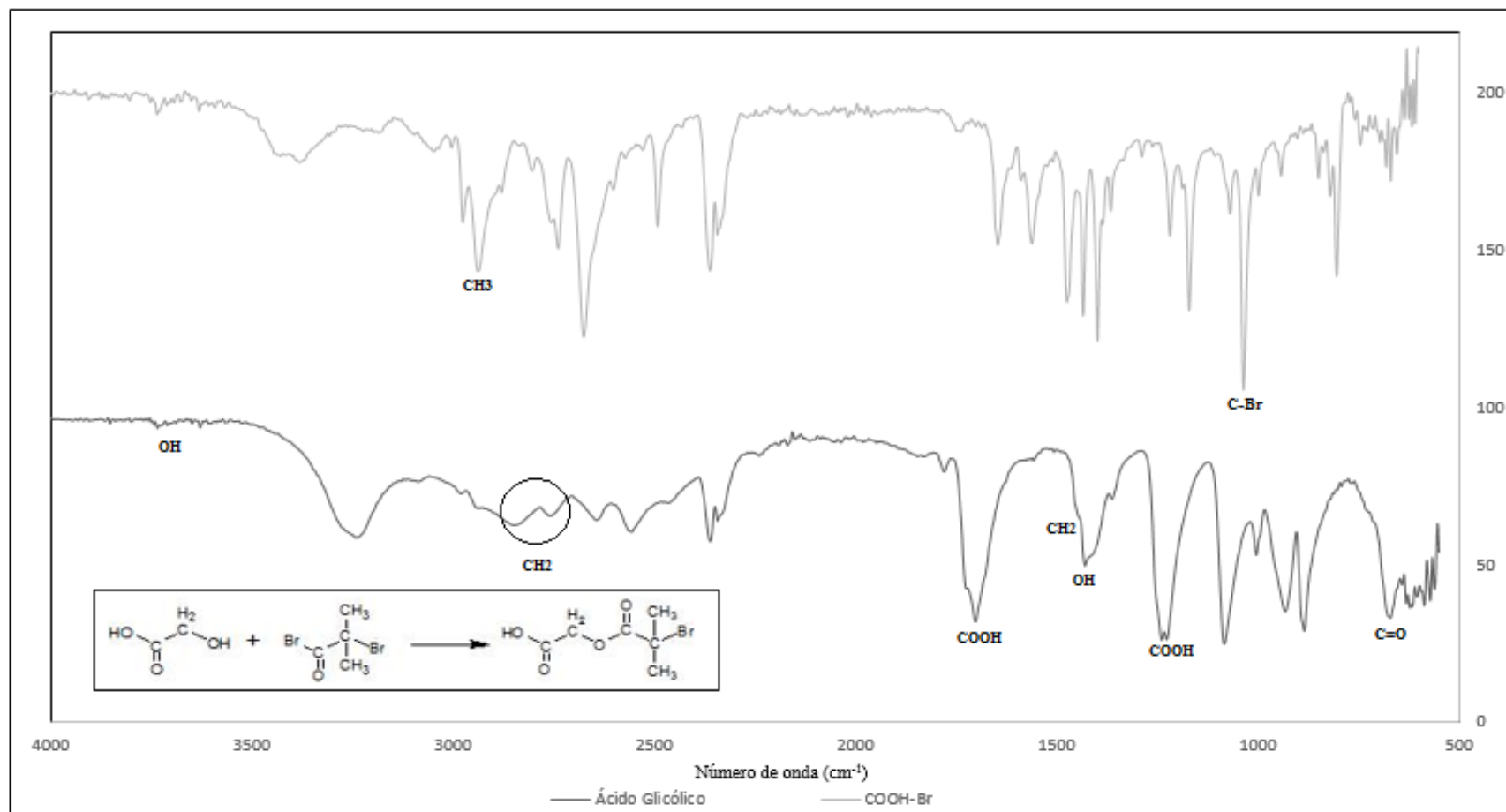


Figura 60 - Espectro FTIR de transmitância para COOH—Br.

APÊNDICE D

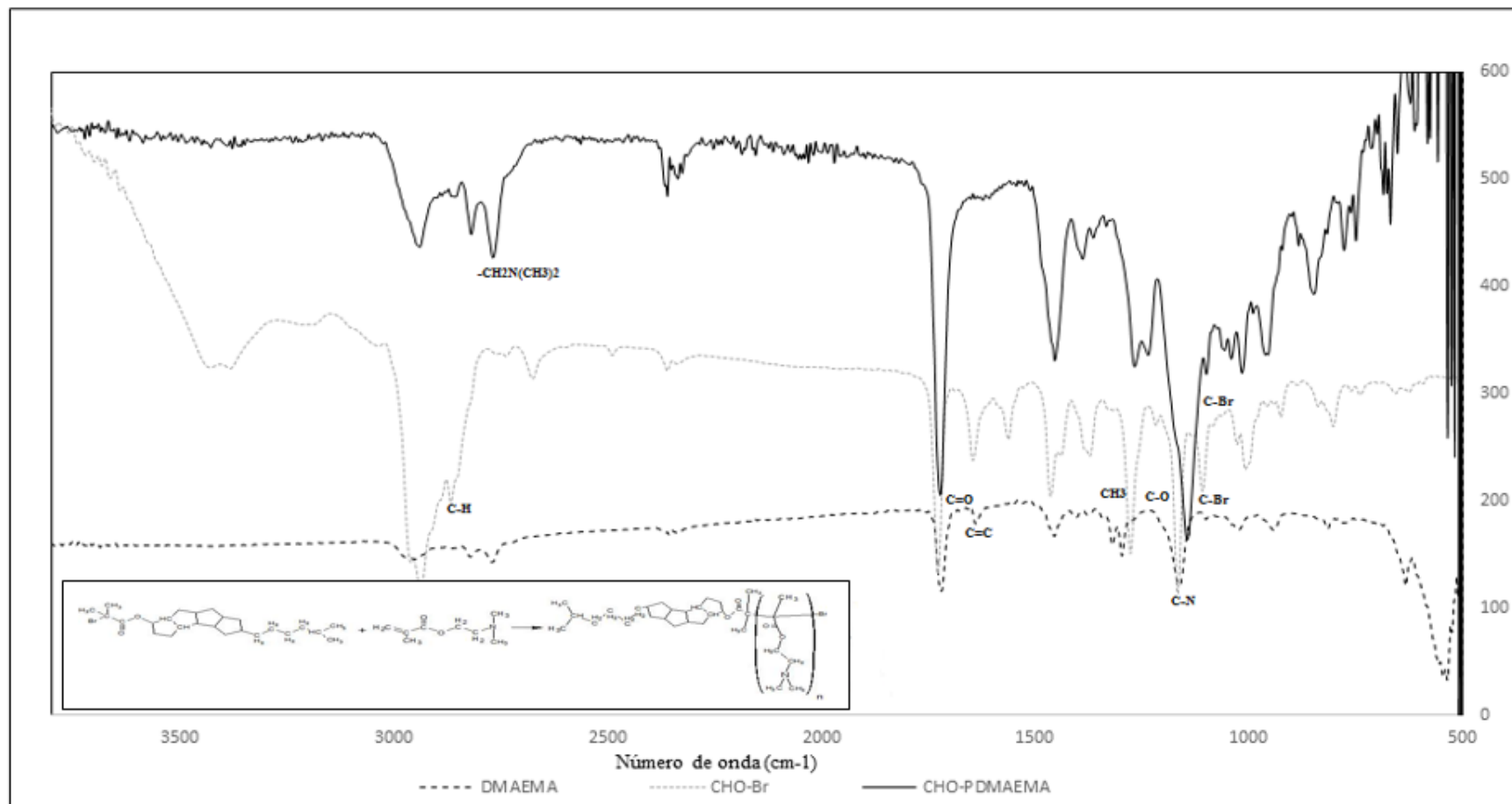
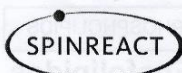


Figura 61 - Espectro FTIR de transmitância para a síntese da reação CHO-PDMAEMA.

APÉNDICE E



PHOSPHOLIPIDS

Phospholipids

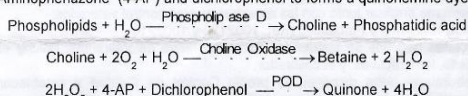
CHO-POD. Enzymatic colorimetric

Quantitative determination of phospholipids IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Phospholipids are hydrolysed by phospholipase D and the liberated choline is subsequently oxidized by choline oxidase (CHO) to betaine with the simultaneous production of hydrogen peroxide. In the presence of peroxidase (POD) the hydrogen peroxide couples oxidatively the 4-Aminophenazone (4-AP) and dichlorophenol to form a quinonimine dye:



The intensity of the colour formed is proportional to the phospholipids concentration^{1,2}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Phospholipids are a complex lipid containing phosphorus. Their function as the principal components of cell membranes makes phospholipids essential for all vital cell processes. The determination of serum phospholipids is an important clinical test in diagnosis of liver diseases, especially obstructive jaundice^{1,2}. Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

REAGENTS

R 1	TRIS pH 7.55	50 mM
Buffer	Dichlorophenol	2.1 mM
R 2	Phospholipase D	400 U/L
Enzymes	Choline oxidase (CHO)	2200 U/L
	Peroxidase (POD)	3600 U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	1 mmol/L
PHOSPHOLIPIDS CAL	Phospholipids aqueous primary standard 300 mg/dL	

PREPARATION

Working reagent (WR): Dissolve (→) the contents of 1 vial R 2 Enzymes in 10 mL of R 1 Buffer. Cap and mix gently to dissolve contents. The reagent is stable after reconstitution 3 weeks in the refrigerator (2-8°C) or 7 days at 15-25°C. Protect from the sunlight.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 505 nm ≥ 0.16.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 505 nm.
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or plasma. Stability of the sample: 3 days at 2-8°C.

PROCEDURE

- Assay conditions:
 - Wavelength: 505 nm. (490-550)
 - Cuvette: 1 cm. light path
 - Temperature: 37°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette:

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard ^(Note 1,2) (µL)	--	10	--
Sample (µL)	--	--	10

- Mix and incubate for 5 min. at 37°C.
- Read the absorbance (A) of the samples and Standard, against the Blank. The colour is stable for at least 30 minutes.

CALCULATIONS

$$\frac{(A)\text{Sample}}{(A)\text{Standard}} \times 300 \text{ (Standard conc.)} = \text{mg/dL phospholipids in the sample}$$

Conversion factor: mg/dL x 0.0129 = mmol/L.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210). If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems. Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES

The serum phospholipids concentration in normal healthy individuals is in about the same concentration range as total cholesterol. The ratio of phospholipids to cholesterol remains 1/1. Any change in cholesterol concentration results in a corresponding change in phospholipids in similar direction. Adult: 125-275 mg/dL^{1,6}. These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 2.54 mg/dL to linearity limit of 600 mg/dL. If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
Mean (mg/dL)	121	221	126	225
SD	2.12	2.03	2.92	4.61
CV (%)	1.74	0.91	2.31	2.05

Sensitivity: 1 mg/dL = 0.0014 A.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents did not show systematic differences when compared with other commercial reagents.

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r): 0.998

Regression equation: y=9979x + 1.2518

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

No influence of ascorbic acid, glucose, bilirubin, uric acid or hemoglobin was found within the range of physiological concentration².

A list of drugs and other interfering substances with phospholipids determination has been reported by Young et al.^{3,4}.

NOTES

- PHOSPHOLIPIDS CAL: Proceed carefully with this product because due its nature it can get contaminated easily.
- Calibration with the aqueous standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

BIBLIOGRAPHY

- Naito K N. Lipids. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 918-919 and 570-572.
- Takeyama M., et al. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. Clin Chem 1977; Acta 79; 93-98.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACC 1995.

PACKAGING

Ref:1001140 Cont. 5 x 10 mL

BSIS14-I Ed.02/2007



SPINREACT, S.A.U. Ctra Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN
Tel +34 972 69 08 00 Fax +34 972 69 00 99 e-mail: spinreact@spinreact.com

APÊNDICE F

Reta de calibração da concentração de calceína em função da fluorescência:

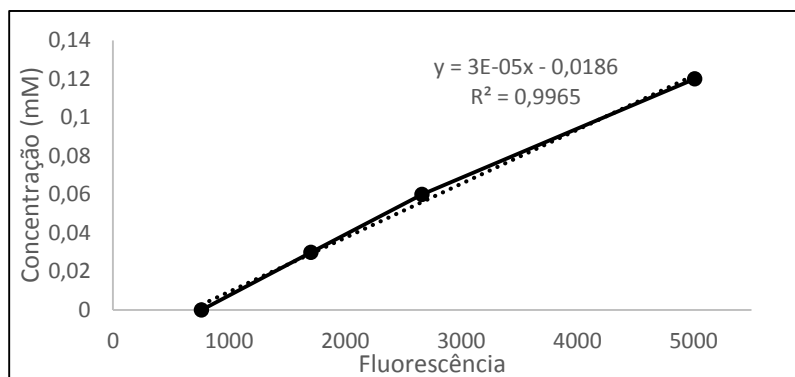


Figura 62 - Reta de calibração da concentração de calceína em função da fluorescência.