



Mónica Patrícia Gaspar Simões

Desenvolvimento e caracterização de sistemas inteligentes para de libertação controlada: complexos polímero- lipossomas (CPLs)

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

MÓNICA PATRÍCIA GASPAR SIMÕES

Desenvolvimento e caracterização de sistemas inteligentes para de libertação controlada: complexos polímero-lipossoma (CPL)

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, orientada pelo Doutor Pedro Nuno Neves Lopes Simões e pela Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves, para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

Coimbra, 2015

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Doutor Pedro Nuno Neves Lopes Simões e à Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves, os meus orientadores, por toda a confiança, disponibilidade, competência, compreensão e apoio imprescindíveis, que ao longo destes meses de trabalho, me concederam.

Ao Doutor Jorge Fernando Jordão Coelho e ao Grupo de Polímeros pela disponibilização de todos os recursos e equipamentos essenciais à realização deste trabalho.

À Doutora Manuela Carvalheiro, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pela execução dos testes de viabilidade celular e ao Doutor Francisco Figueiredo, do Instituto de Biologia Celular e Molecular da Universidade do Porto, que agradavelmente me recebeu e auxiliou na análise com o TEM.

Manifesto um agradecimento especial a todos os alunos de mestrado, investigadores, doutoramento, pós-doutoramento, colegas de laboratório e funcionários, não só pela sua prestabilidade, mas também pela boa disposição e incentivo que diariamente me transmitiram.

Quero também agradecer a todos os meus amigos pelo carinho e generosidade, que nunca se esqueceram de mim, apesar da minha consciente e constante ausência durante quase toda a elaboração deste trabalho.

Ao Rogério, companheiro e amor da minha vida, comigo quase desde sempre, que me deu a força necessária e todas as razões para nunca desistir ou duvidar de nada na minha vida.

À minha irmã Beatriz, pela inspiração a cada dia, pelas palavras doces e pela magia que só mesmo uma criança consegue transmitir a um adulto. Ainda não me aconteceu nada melhor do que tu Princesa.

Por fim, mas não menos importante, aos meus pais, por tudo aquilo que sou, pelo amor, apoio incondicional, atenção e dedicação, pois sem eles nada disto teria sido possível. Sou-vos eternamente grata.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de sistemas inteligentes para liberação controlada, baseados em complexos polímero-lipossoma (CPLs). O polímero hidrófilo selecionado foi o poli(ácido acrílico) (PAA), a sua incorporação nos lipossomas foi obtida por modificação do mesmo com colesterol (CHO), que possui uma grande afinidade com as bicamadas lipídicas.

A síntese de CHO-PAA foi realizada por hidrólise do poli(acrilato de terc-butilo) (PtBA), com um peso molecular reduzido e uma baixa dispersividade, mediante a técnica de polimerização radicalar por transferência de cadeia (ATRP). O iniciador utilizado nas polimerizações foi o colesterol-2-bromoisobutirato (CHO-Br), obtido através da esterificação do CHO com o Brometo de 2-bromoisobutirilo (2-BiB).

Os polímeros selecionados foram incorporados nos lipossomas (LIP), de lecitina e estearilamina (LIP/ST), em momentos distintos e em diferentes razões polímero/fosfolípido (0, 5, 10 e 20 %).

Os CPLs formulados foram caracterizados em termos de diâmetro, polidispersividade, potencial zeta, perfil de liberação a 37 °C e pH 7, e eficiência de encapsulação. Os resultados obtidos demonstraram que a incorporação de 10% de polímero contribui positivamente para a sua estabilização. Os CPLs com 10% de CHO-PAA foram ainda reticulados (CPL/R) e avaliados através dos mesmos parâmetros, mostrando-se ainda mais estáveis. A encapsulação dos mesmos foi estudada de diferentes formas e depois de uma seleção criteriosa os CPLs finais foram ainda estudados quanto à sua capacidade de liberação em diferentes meios de pH (2-12), viabilidade celular em células de leucemia humana aguda monocítica, e conservação.

Os resultados revelaram que os CPLs e CPL/Rs possuem uma capacidade significativa de liberação em pH ácidos e básicos, não são tóxicos até uma concentração de 10 µM, e a melhor forma de conservação envolve a liofilização dos mesmos com a presença de uma molécula protetora durante o armazenamento.

Os aspectos inovadores deste trabalho em relação ao que se pode encontrar na literatura residem no tipo de fosfolípido empregado, no iniciador, na forma de um dos catalisadores utilizados na síntese dos polímeros, e no método de reticulação do CHO-PAA.

Abstract

The goal of this work was the development and characterization of intelligent systems for controlled release, based on polymer-liposome complexes (CPLs). The selected hydrophilic polymer was poly(acrylic acid) (PAA) and its incorporation into liposomes was achieved by modification with cholesterol (CHO), which has a high affinity with lipid bilayers.

The synthesis of CHO-PAA was achieved by hydrolysis of poly(tert-butyl acrylate) (PTBA) with low molecular weight and low dispersivity, within the radical polymerization by chain transfer (ATRP) framework. The initiator used in the polymerization was then cholesterol-2-bromoisobutyrate (CHO-Br), obtained by esterification of the CHO with 2-bromoisobutyryl bromide (BiB-2).

The selected polymers were incorporated into liposomes (LIP), formed by lecithin and stearylamine (LIP/ST), at different times and in different polymer/phospholipid ratios (5, 10 and 20%).

The developed CPLs were characterized in terms of diameter, polydispersity, Zeta potential, release profile at 37 °C and pH 7, and encapsulation efficiency. The results showed that the incorporation of 10% polymer positively contribute to the CPLs stabilization. The stable CPLs with 10% CHO-PAA were further crosslinked (CPL / R) and assessed using the same parameters. The encapsulation was studied in different ways and after a careful selection, a final set of CPLs were further studied in terms of release profiles at different pH media (2-12), cell viability in human acute monocytic leukemia cells, and conservation.

The results revealed that the CPLs and CPL/Rs have a significant capacity to release at both acidic and basic pH, are non-toxic up to a concentration of 10 µM, and the best form for their storage involves lyophilization in the presence of a protective molecule.

The innovative aspects of this work with respect to what can be found in the literature are related to the type of phospholipid employed, the initiator, the method of using the catalyst in the synthesis of the polymers, and the crosslinking method of CHO-PAA.

Índice

Introdução	- 1 -
1. Motivação.....	- 2 -
2. Objetivos e estratégias adotadas.....	- 4 -
Capítulo I - Revisão Bibliográfica	- 11 -
1. Lípidos.....	- 12 -
2. Fosfolípidos.....	- 12 -
2.1. Bicamadas lipídicas.....	- 14 -
2.2. Micelas	- 15 -
2.3. Lipossomas.....	- 15 -
3. Lipossomas multifuncionais.....	- 16 -
3.1. Lipossomas de longa circulação (LLC).....	- 19 -
3.2. Lipossomas imunogénicos	- 20 -
3.3. Lipossomas de penetração celular	- 21 -
3.4. Lipossomas catiónicos.....	- 23 -
3.5. Lipossomas magnéticos e lipossomas com metais pesados	- 24 -
4. Produção de lipossomas	- 25 -
5. Caracterização de lipossomas.....	- 26 -
5.1. Tamanho e homogeneidade.....	- 26 -
5.2. Potencial Zeta.....	- 27 -
5.3. Eficiência de encapsulação e Perfis de Libertação.....	- 27 -
5.4. Concentração de lípidos	- 28 -
5.5. Citotoxicidade	- 28 -
5.6. Conservação	- 28 -
6. Polímeros.....	- 29 -
6.1. Mecanismos de Polimerização	- 29 -
6.2. Polimerização radicalar livre.....	- 30 -
6.3. Polimerização radicalar viva	- 31 -
6.4. Mecanismos de LRP.....	- 32 -
6.4.1. ATRP.....	- 32 -
Capítulo II - Parte Experimental	- 35 -
1. Materiais.....	- 36 -
2. Equipamentos	- 37 -
3. Técnicas.....	- 37 -
3.1. GPC	- 37 -

3.2.	RMN.....	- 38 -
3.3.	FTIR-ATR.....	- 38 -
3.4.	DLS e LDM.....	- 39 -
3.5.	Espectrofluorimetria.....	- 39 -
3.6.	TEM	- 40 -
3.7.	Testes de citotoxicidade	- 40 -
4.	Métodos.....	- 41 -
4.1.	Síntese do colesterol-2-bromoisobutirato (CHO-Br)	- 41 -
4.2.	Síntese do tris[2-(dimethylamino)ethyl]amine (Me ₆ TREN)	- 42 -
4.3.	Síntese do PtBA	- 42 -
4.4.	Síntese do PAA (Hidrólise do PtBA).....	- 43 -
4.5.	Preparação dos lipossomas e CPL.....	- 43 -
4.5.1.	Com esferas de vidro (LIP/H)	- 43 -
4.5.2.	Sem esferas de vidro (LIP/N).....	- 44 -
4.5.3.	Com estearilamina (LIP/ST)	- 44 -
4.5.4.	Incorporação do CHO-PAA aquando da formação das vesículas (CPL/A)....	- 44 -
4.5.5.	Incorporação do CHO-PAA depois da formação dos lipossomas (CPL/D)....	- 44 -
4.6.	Encapsulação dos CPLs	- 45 -
4.7.	Reticulação dos CPLs (CPL/A/R e CPL/D/R).....	- 45 -
4.8.	Encapsulação dos CPLs reticulados	- 45 -
4.9.	Determinação da Concentração de Lípidos.....	- 46 -
4.10.	Preparação dos CPL reticulados para estudo de conservação	- 46 -
4.11.	Testes de citotoxicidade dos CPLs finais	- 46 -
	Capítulo III – Resultados e Discussão.....	- 49 -
1.	CHO-PtBA e CHO-PAA.....	- 50 -
2.	LIP/H e LIP/N	- 52 -
3.	LIP/ST	- 52 -
4.	CPL	- 53 -
4.1.	Diâmetros, PDI e potencial zeta.....	- 53 -
4.2.	Perfis de libertação e EE (%)	- 54 -
5.	CPL reticulados	- 57 -
5.1.	Diâmetro, PDI e potencial zeta	- 57 -
5.2.	Perfis de libertação e EE (%)	- 57 -
6.	CPL finais.....	- 59 -
7.	Morfologia dos CPL finais.....	- 60 -

8. Libertação em diferentes meios de pH	- 61 -
9. Viabilidade celular dos CPLs finais	- 62 -
10. Estudo de conservação	- 63 -
<i>Apreciações Finais</i>	- 67 -
<i>Conclusões</i>	- 68 -
<i>Trabalho Futuro</i>	- 68 -
<i>Bibliografia e Netografia</i>	- 69 -
<i>Apêndice A</i>	- 66 -
<i>Apêndice B</i>	- 68 -
<i>Apêndice C</i>	- 69 -
<i>Apêndice D</i>	- 71 -
<i>Apêndice E</i>	Erro! Marcador não definido.

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática de um lipossoma.	2 -
Figura 2 - Representação esquemática da encapsulação de moléculas hidrófilas e hidrofóbicas em lipossomas.....	3 -
Figura 3 - Representação esquemática de um complexo polímero-lipossoma.....	5 -
Figura 4 - Representação esquemática da sensibilidade do poli(ácido acrílico) diferentes meios de pH, devido ao grupo carboxílico que possui [15].	5 -
Figura 5 - Representação esquemática da esterificação do colesterol.....	6 -
Figura 6 - Representação esquemática da síntese do CHO-PtBA.....	6 -
Figura 7 - Representação esquemática da síntese do CHO-PAA.....	6 -
Figura 8 - Representação esquemática da reticulação de CPL com CHO-PAA [14]. -	7 -
Figura 9 - Representação esquemática da formação dos CPLs com momentos de adição de polímeros distintos.....	9 -
Figura 10 - Representação esquemática de um fosfolípido.....	12 -
Figura 11 - Esquema representativo da estrutura de um fosfolípido, com um grupo característico (x) [20,21].....	13 -
Figura 12 - Representação esquemática de uma bicamada lipídica, de uma micela e de um lipossoma.....	14 -
Figura 13 - Representação esquemática de uma membrana plasmática de uma célula eucariota.....	14 -
Figura 14 - Representação esquemática de um lipossoma convencional.....	17 -
Figura 15 - Representação esquemática de Imunolipossomas de longa circulação. -	21 -
Figura 16 - Representação esquemáticas dos diferentes tipos de Imunolipossomas de longa circulação com capacidade de penetração celular.	22 -
Figura 17 - Representação esquemática das diferentes etapas do mecanismo de polimerização radicalar [35-38].....	30 -
Figura 18 - Representação esquemática do equilíbrio dinâmico, de ativação/desativação de espécies presente em LRP [34,35].....	31 -
Figura 19 - Representa esquemática do equilíbrio dinâmico alcançado entre espécies ativas e dormentes em ATRP [35-37].	33 -
Figura 20 - Representação esquemática do processo de reticulação dos CPL desenvolvidos, baseada noutro esquema da literatura [14].	45 -

Figura 21 - Perfis de liberação de calceína dos CPL: (A) - CPL/A(PAA14), (B) - CPL/D(PAA14), (C) - CPL/A(PAA18) e (D) - CPL/D(PAA18);.....	55 -
Figura 22 - Reta de Calibração da concentração de calceína em função da fluorescência.....	56 -
Figura 23 - Perfis de Liberação dos CPL reticulados com 5% de ST e 10% de PAA, antes e depois da encapsulação de calceína.....	57 -
Figura 24 - Perfis de liberação do conjunto final de CPL.....	59 -
Figura 25 - Imagens obtidas através do TEM: (A) - LIP; (B) - LIP/ST; (C) - CPL/D(PAA14); (D) - CPL/D(PAA18); (E) - CPL/D(PAA14)/DR; (F) - CPL/D(PAA18)/DR.....	61 -
Figura 26 - Percentagens de liberação dos CPL finais em diferentes meios de pH: (A) – com PAA proveniente da reação 14 de PtBA; (B) – com PAAA proveniente da reação 18 de PtBA.....	62 -
Figura 27 - Percentagem de células viáveis em função da concentração das amostras do conjunto de CPL finais.....	62 -
Figura 28 - Diâmetros dos CPL finais: (A) com PAA14 sem conservante; (B) com PAA14 com conservante; (C) com PAA18 sem conservante; (D) PAA18 com conservante.....	64 -
Figura 29 - PDI médias dos CPL finais: (A) com PAA14 sem conservante; (B) com PAA14 com conservante; (C) com PAA18 sem conservante; (D) PAA18 com conservante.....	64 -
Figura 30 – Potencial zeta dos CPL finais: (A) com PAA14 sem conservante; (B) com PAA14 com conservante; (C) com PAA18 sem conservante; (D) PAA18 com conservante.....	65 -

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação da família dos lípidos, segundo Bloor [20].	- 12 -
Tabela 2 - Exemplos de alguns fosfolípidos, suas abreviaturas e grupos substituintes (X) [20,21].	- 13 -
Tabela 3 - Classificação dos lipossomas segundo as suas dimensões e números de bicamadas [8-10].	- 16 -
Tabela 4 – Características principais e aparência dos diferentes tipos de lipossomas modificados.	- 18 -
Tabela 5 - Peso molecular e dispersividade (\bar{M}_w) dos polímeros de CHO-PtBA sintetizados, com diferentes proporções, neste trabalho.....	- 50 -
Tabela 6 - Pesos moleculares dos polímeros utilizados nas formulações dos CPL....	- 51 -
Tabela 7 - Diâmetros, PDI e potencial zeta dos lipossomas formados com e sem esferas de vidro.	- 52 -
Tabela 8 - Diâmetros, polidispersividade e potencial zeta e respectivos desvios padrão obtidos para os lipossomas obtidos com diferentes percentagens de ST.	- 52 -
Tabela 9 - Diâmetro, PDI e potencial zeta dos lipossomas formados com ST, CHO-PAA, em diferentes proporções, e com esferas de vidro.....	- 53 -
Tabela 10 - Concentração de calceína encapsulada, lípidos e percentagens de eficiência encapsulação dos ensaios elaborados.	- 56 -
Tabela 11 - Diâmetros, PDI e potencial zeta médios dos CPL reticulados com 5 % de ST e 10 % de CHO-PAA.....	- 57 -
Tabela 12 - Percentagens de eficiência de encapsulação dos CPL reticulados.	- 58 -
Tabela 13 - Diâmetro, PDI e potencial zeta médios do conjunto final de CPL.....	- 59 -

Lista de Abreviaturas

2-BiB	Brometo de 2-bromoisobutirilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopia de força atômica
ATRP	Polimerização Radicalar por transferência atômica
C	Armazenamento no congelador a -18 °C
CDCl ₃	CLF deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHO	Colesterol
CHO-Br	Cholesteril-2-bromoisobutirato
CHO-PAA	Poli (ácido acrílico) com CHO-Br
CHO-PtBA	Poli (terc-butil acrilato) com CHO-Br
CMC	Concentração micelar crítica
CME-CDI	N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodimidameto-p-toluenossulfonato
CPL	Complexo polímero-lipossoma
Cu(0)	Cobre de valência zero
CuBr ₂	Brometo de cobre (II)
D	Diâmetro
Đ	Dispersividade
D ₂ O	Água deuterada
d ₆ DMSO	DMSO deuterado
d ₈ THF	THF deuterado
DCT	Polimerização de transferência de cadeia degenerativa
DLS	Dispersão de luz dinâmica
DMAP	4-(dimetil amino)piridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDA	Etilenodiamina
EE	Eficiência de Encapsulação
EPR	Elevada Capilaridade e Permeabilidade
F	Armazenamento no frigorífico a 8 °C
FBS	Soro bovino fetal
FFF	Fracionamento em escoamento
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com

	reflectância total atenuada
GPC	Cromatografia de permeação em gel
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinoetanossulfônico
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
H-RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
I	Iniciador
Lg	Ligante
L	Armazenamento à temperatura ambiente depois da liofilização
LC	Lecitina
LLC	Lipossomas de longa circulação
LMD	<i>Laser Doppler Micro-electrophoresis</i>
LRP	Polimerização Radicalar Viva
LUV	Vesículas unilamelares grandes
M	Monómero
M3-PALS	<i>Phase analysis Light Scattering</i>
Me6TREN	<i>Tris[2-(dimethylamino)ethyl]amine</i>
MLV	Vesículas Multilamelares
Mn	Peso molecular numérico
Mt ⁿ /L	Complexo de metal de transição
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazólio
MVV	Vesículas Multivesiculares
Mw	Peso molecular ponderal
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NIBS	<i>Non-Invasive Back Scatter technology</i>
OLV	Vesícula Oligolamelares
PAA	Poli (ácido acrílico)
PA	Fosfatídico
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Fosfatídicolina
PDI	Polidispersividade
PE	Fosfatídiletanolamina
PEG	Poli (etileno glicol)

PG	Fosfatídilglicerol
PI	Fosfatídilinositol
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PMS	Fenazina metosulfato
PRE	Efeito de Radical Persistente
PS	Fosfatídilserina
PC	Penicilina/streptomycin
PtBA	Poli (terc-butyl acrilato)
RAFT	Polimerização de transferência de cadeia por fragmentação reversível de adição
RES	Sistema Reticuloendotelial humano
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Meio de cultura
SEC	Cromatografia de exclusão
SFRP	Polimerização Radicalar Livre Estável
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SLC	Sistema de libertação controlada
ST	Estearilamina
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
TEA	Trietilamina
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetraidrofurano
THP-1	Linha celular da leucemia humana aguda monocítica
TR	Trealose
TREN	Tris (2-aminoetil) amina
X	Átomo Halogenado
zP	Potencial Zeta

Introdução

1. Motivação

Atualmente existem centenas de publicações relacionadas com sistemas de libertação controlada (SLC) para aplicações nas mais diversas áreas, como o tratamento e/ou diagnóstico de doenças cancerígenas, neurológicas, dermatológicas, ortopédicas e oftalmológicas, terapia genética, tratamentos cosméticos e engenharia alimentar [1-7]. A importância destes estudos decorre da necessidade emergente que existe nos dias de hoje em encontrar métodos de libertação mais previsíveis, eficazes e seletivos. Os sistemas de libertação inteligentes têm como objetivo fazer chegar um determinado composto a um local específico, sem comprometer a sua eficácia. Compostos ativos, agentes de contraste, proteínas, enzimas, antioxidantes e vitaminas, no organismo humano ou em soluções, são exemplos do vasto leque de possíveis substâncias que podem ser encapsuladas ou quimicamente ligadas a outras moléculas ou estruturas, para formar sistemas dessa natureza. A acumulação e libertação do agente ativo deve ocorrer e durar conforme o tipo de aplicação a que se destina. Nesse sentido, deve satisfazer os requisitos pré-estabelecidos para cada situação específica, assegurando uma taxa de libertação adequada, quer no caso de serem administrados diretamente no local afetado/desejado, e/ou a capacidade de se dirigem a esse local, na circunstância de, por exemplo, serem injetados na corrente sanguínea [1-7].

Os SLC podem ter como base compostos poliméricos, inorgânicos ou lipídicos [6]. Os lípidos, em particular, apresentam propriedades únicas que permitem a formação de estruturas nanométricas ideais, como os lipossomas (Figura 1) para o armazenamento, transporte e libertação de substâncias.

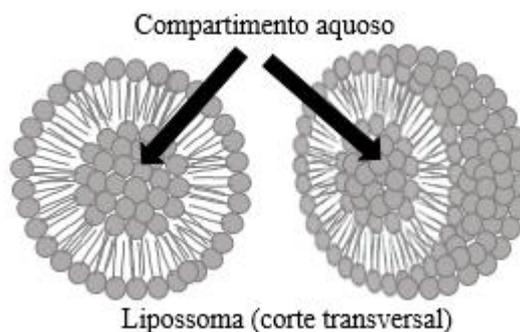


Figura 1 - Representação esquemática de um lipossoma.

Os lipossomas definem-se como vesículas esféricas, com apenas algumas centenas de nanómetros, com uma ou várias camadas de fosfolípidos, que se formam

espontaneamente, depois de devidamente hidratados e condicionados, com o intuito de reduzir as interações desfavoráveis entre as suas cadeias hidrofóbicas de ácidos gordos e o meio aquoso envolvente [8].

Estas estruturas têm sido amplamente estudadas como SLC inteligentes em aplicações farmacêuticas, na libertação de drogas (medicamentos, agentes quimioterapêuticos, material genético, compostos quelantes, moléculas fluorescentes), cosméticas, em formulações de cremes, pomadas ou loções e alimentares, para libertação de proteínas, antioxidantes, sabores e conservantes [1-8].

O interesse em usar lipossomas advém da sua versatilidade, pois são capazes de encapsular moléculas tanto hidrófilas, no seu espaço intersticial aquoso, como hidrofóbicas, na camada lipídica (Figura 2).

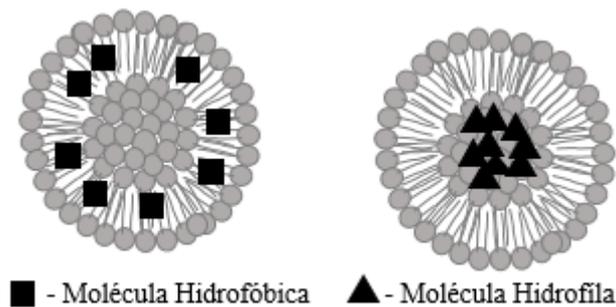


Figura 2 - Representação esquemática da encapsulação de moléculas hidrófilas e hidrofóbicas em lipossomas.

Acresce que os lipossomas são biocompatíveis, biodegradáveis, não-imunogénicos e não-tóxicos, um grupo de características essenciais para a sua utilização como nano-transportadores [11].

Os lipossomas exibem uma eficiência de encapsulação considerável, que depende do processo de formação selecionado mas independente da solubilidade da substância encapsulada em causa, e, como funcionam como uma cápsula, oferecem proteção contra possíveis degradações causadas pela luz, enzimas e/ou pH.

As dimensões reduzidas dos lipossomas são vistas como mais um benefício, uma vez que podem facilmente circular e acumular-se nos vasos sanguíneos mais estreitos das áreas afetadas, como os tumores sólidos e locais de inflamação ou infeção, que se caracterizam por apresentarem uma elevada permeabilidade e capilaridade.

Para além disto, o facto de os lipossomas se assemelharem, em termos de constituição, à membrana plasmática, mostra-se como mais uma enorme vantagem, visto que são capazes de interagir de uma forma mais próxima e eficaz com as células e tecidos do organismo, característica esta que outros SLC dificilmente podem oferecer.

Por último, usando tipos específicos de fosfolípidos e/ou revestimentos, podem ainda ser criados lipossomas sensíveis ao pH e/ou à temperatura. Estes complexos aumentam a sua taxa de libertação quando inseridos num meio ácido, presente por exemplo nos endossomas das células. Alternativamente, se sujeitos a uma temperatura acima da temperatura fisiológica, característico das zonas de infeção ou inflamação, a sua estrutura passa de uma fase tipo gel para uma fase cristalina que promove a saída das substâncias encapsuladas do espaço intersticial do nano-transportador para o meio envolvente.

As vantagens evidentes e a grande aplicabilidade nas mais diversas áreas de lipossomas funcionalizados com polímeros, bem como margem de progressão que o tema oferece são a motivação deste trabalho, que se baseia no desenvolvimento e caracterização de sistemas inteligentes para libertação controlada: complexos polímero-lipossoma (CPL) [8-9].

2. Objetivos e estratégias adotadas

O desenvolvimento de complexos polímero-lipossoma (CPLs) representa uma abordagem relativamente recente na formulação de lipossomas sensíveis ao pH. Estes lipossomas incorporam na sua superfície polímeros sensíveis a meios não neutros [9-10]. Uma forma de integrar as cadeias poliméricas na estrutura dos lipossomas consiste em ligá-las covalentemente a determinadas biomoléculas que possuam uma afinidade relevante com a membrana lipídica, como por exemplo o colesterol (CHO) (Figura 3) [11, 12]. O CHO é uma molécula hidrofóbica muito utilizada em formulações lipídicas porque oferece uma proteção acrescida face a possíveis degradações causadas por enzimas e/ou péptidos e altera a fluidez dos lipossomas aumentando a sua capacidade de retenção de substâncias [13].

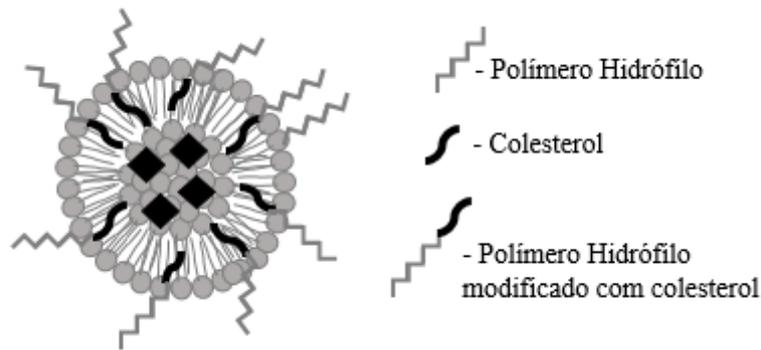


Figura 3 - Representação esquemática de um complexo polímero-lipossoma.

Nessa linha, o objetivo estabelecido para este trabalho residiu no desenvolvimento de um SLC baseado num CPL estável, com um revestimento polimérico específico, de poli(ácido acrílico) (PAA), modificado com colesterol (CHO-PAA), para aplicação em qualquer uma das áreas já anteriormente descritas.

O PAA é um polímero biocompatível, amplamente utilizado em formulações farmacêuticas e cosméticas, que responde de diferentes formas consoante o pH do meio em que está inserido (Figura 4) devido ao grupo carboxílico que possui [15].

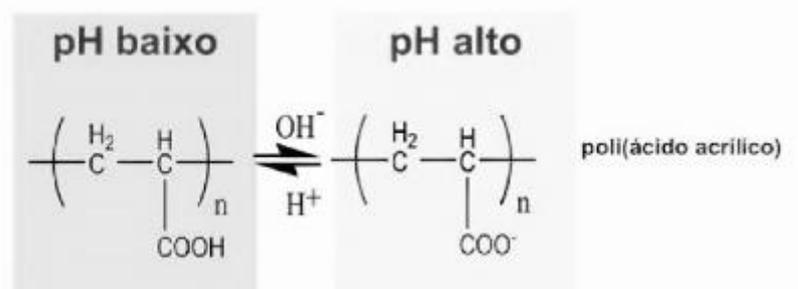


Figura 4 - Representação esquemática da sensibilidade do poli(ácido acrílico) diferentes meios de pH, devido ao grupo carboxílico que possui [15].

A síntese do CHO-PAA foi realizada a partir da hidrólise do poli(acrilato de terc-butilo) (PtBA). Em primeiro lugar, o grupo hidroxilo (-OH) terminal do CHO foi modificado por esterificação (Figura 5) de modo a obter um iniciador com terminal Br, [11], essencial ao método de síntese utilizado para a produção do CHO-PtBA (Figura 6). Por último, o CHO-PAA foi conseguido por hidrólise (Figura 7) [14].

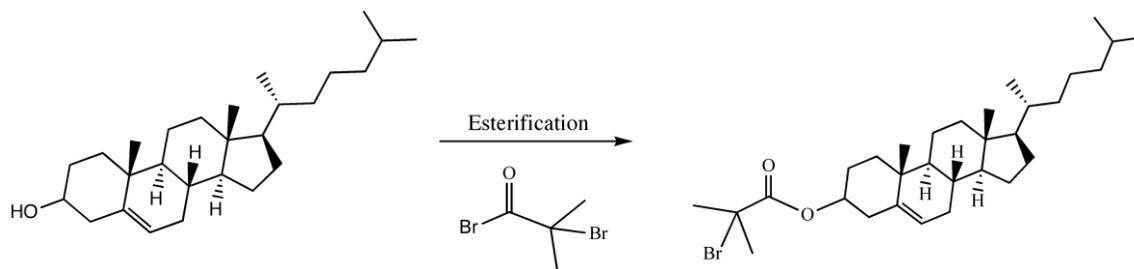


Figura 5 - Representação esquemática da esterificação do colesterol.

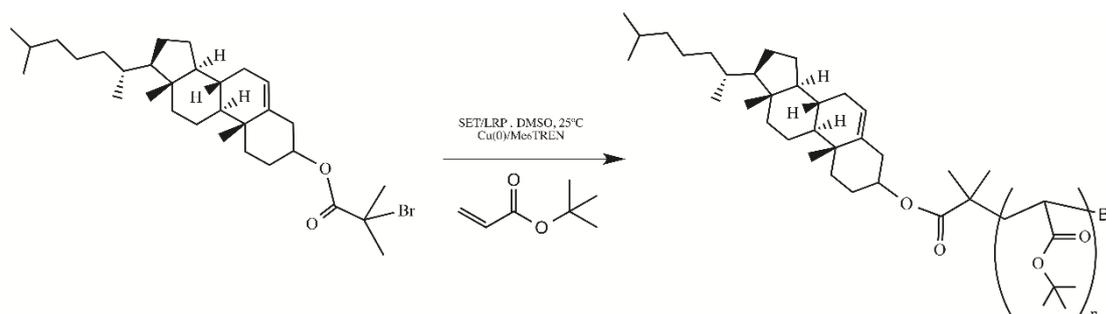


Figura 6 - Representação esquemática da síntese do CHO-PtBA.

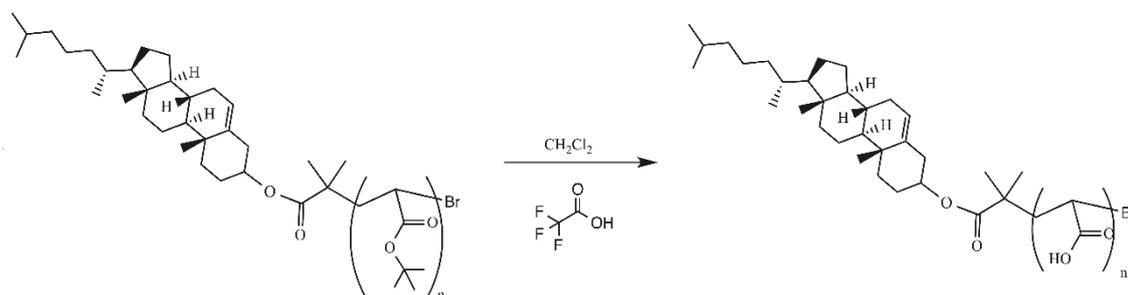


Figura 7 - Representação esquemática da síntese do CHO-PAA.

Os lipossomas com CHO-PAA integrado apresentam todas as características fundamentais para serem utilizados como SLC, principalmente porque com o PAA existe a possibilidade de reticulação (Figura 8) [14]. Devido à rede/gaiola que se forma ao seu redor, a reticulação das cadeias poliméricas aumenta o grau de retenção das moléculas encapsuladas e permite alcançar CPL ainda mais estáveis [14]. Para além disso, quando reticulados e inseridos num pH ácido, os CPL encolhem e acabam por colapsar libertando todo o seu conteúdo de um só vez [14]. Desta forma, consoante a aplicação pretendida é possível optar por uma libertação mais lenta sem a reticulação ou

uma libertação instantânea reticulando os CPL, aumentando desse modo a sua versatilidade.

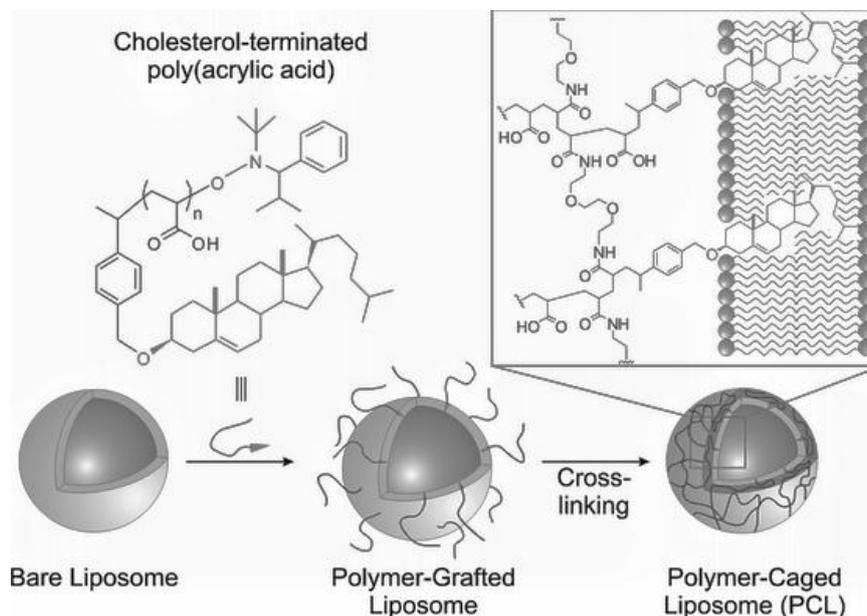


Figura 8 - Representação esquemática da reticulação de CPL com CHO-PAA [14].

Existem diferentes métodos de síntese de PAA, e nomeadamente CHO-PAA [14]. Contudo, tratam-se de métodos consideravelmente complexos e demorados [14], pelo que ao longo deste trabalho, se optou por uma via alternativa, capaz de oferecer um procedimento mais rápido e expedito. Assim sendo, e tendo em conta que neste tipo de aplicações são exigidos polímeros com baixo peso molecular e baixa dispersividade (abaixo de 1,3), escolheu-se o método de polimerização radicalar por transferência de cadeia (ATRP) para a síntese do CHO-PAA. [16,17]. Este método oferece um controlo apertado das propriedades dos polímeros resultantes, em condições moderadas, com cinéticas rápidas [16,17].

A análise de outros parâmetros, como a cinética de reação ou conversão, dos polímeros sintetizados não se realizou porque, apesar da obtenção do CHO-PAA ter sido essencial à realização deste trabalho, o principal foco manteve-se na exploração dos CPL como SLC caracterizando-os o mais e melhor possível.

Para a formulação dos lipossomas escolheu-se a lecitina (LC) devido à sua biocompatibilidade e eficaz interação com as membranas celulares do organismo, onde também pode ser encontrada [11, 12]. Lipossomas constituídos por lecitina apresentam maiores eficiências de encapsulação e tamanhos mais reduzidos em comparação com

outros tipos de fosfolípidos [18]. A lecitina por sua vez é constituída maioritariamente por fosfatídicolína, um fosfolípido de carga negativa [12-14]. Consequentemente, os lipossomas constituídos por lecitina apresentam também carga de superfície negativa, o que representa uma dificuldade, uma vez que o CHO-PAA também é um composto negativo. Ou seja, a ligação entre ambos é dificultada por fenómenos de repulsão, comprometendo assim a formação dos CPL [14]. Para ultrapassar este problema, e proporcionar a integração do CHO-PAA nos lipossomas, neutralizou-se parcialmente a carga dos mesmos através da adição de Estearilamina (ST), um surfactante de carácter positivo capaz de se alojar na bicamada das membranas lipídicas [19].

No presente trabalho, procurou-se ainda otimizar as condições de formulação dos lipossomas, isto incluiu um estudo que visou perceber o efeito da presença de esferas de vidro, durante a incubação, nas características físicas finais dos mesmos.

Analisou-se também o momento mais indicado para a adição do polímero no procedimento dos CPLs. Normalmente este é colocado em contato com os lipossomas (LIP), para incorporação, apenas depois (D) da formação dos lipossomas [14], mas existe também a possibilidade da introdução do polímero acontecer antes (A) da sua formação, hidratando os lípidos com uma solução de CHO-PAA em tampão (Figura 9). Com a primeira hipótese obtêm-se os CPLs usuais, em dois passos, com polímero incorporado apenas à superfície dos LIP [14]. Contudo, com a segunda abordagem foi previsto que as cadeias de polímero dos CPLs criados, com um único passo, podem ser encontradas, tanto à superfície como, no espaço intersticial dos LIP, “viradas para dentro”.

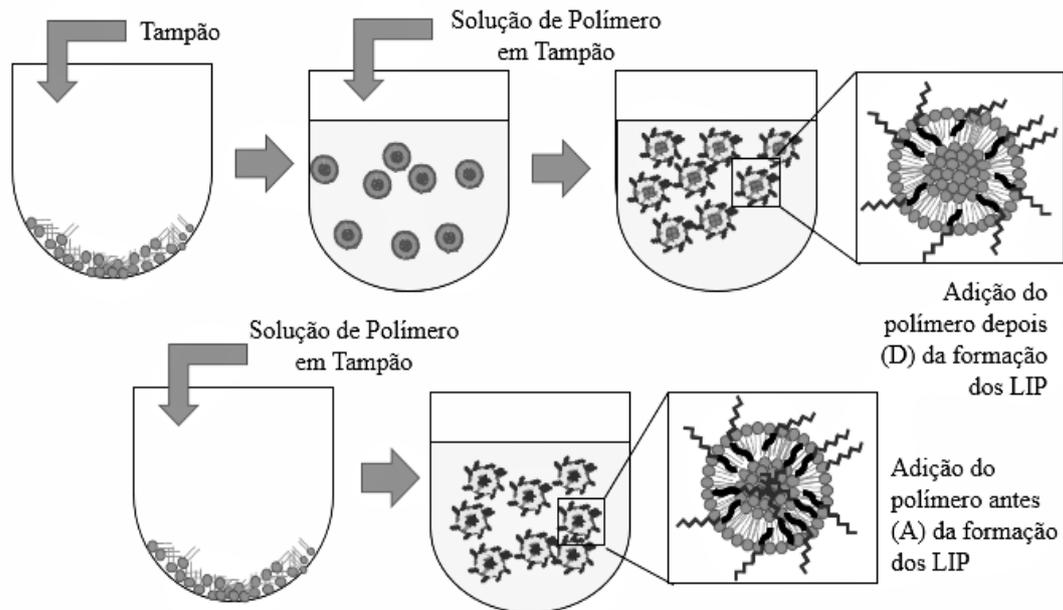


Figura 9 - Representação esquemática da formação dos CPLs com momentos de adição de polímeros distintos.

As duas hipóteses foram avaliadas em termos de tamanho, polidispersividade, potencial zeta, eficiência de encapsulação e capacidade de liberação dos CPLs.

Os mesmos parâmetros foram analisados com os CPLs reticulados e em relação a sua encapsulação, estudou-se também duas abordagens distintas, visto que os CPLs podem ser reticulados depois da encapsulação (DR), ou antes (AR), com os CPL vazios, sendo posteriormente expostos à solução de encapsulante.

Depois de uma seleção criteriosa, averiguou-se ainda o potencial do conjunto de CPLs finais através da análise da sua capacidade de liberação em diferentes meios de pH, morfologia e viabilidade celular, com células THP-1 (linha celular da leucemia humana aguda monocítica).

Por fim, com os CPLs reticulados finais, realizou-se um estudo de estabilidade em diferentes condições de armazenamento (liofilizados a 20 °C, num frigorífico a 8 °C e num congelador a -18 °C), com e sem conservante, durante 75 dias, de modo a encontrar a melhor forma de conservação, analisando o diâmetro, polidispersividade e potencial zeta dos mesmos ao longo do tempo.

Resumidamente, a estratégia delineada para este trabalho consistiu nas seguintes etapas:

- Sintetizar o iniciador Cholesteril-2-bromoisobutirato (CHO-Br);

- Sintetizar o ligante Tris[2-(dimethylamino)ethyl]amine (Me₆TREN);
- Sintetizar o polímero CHO-PtBA, com baixo peso molecular e polidispersividade próxima de 1, recorrendo ao iniciador CHO-Br;
- Sintetizar o polímero CHO-PAA (hidrólise do CHO-PtBA);
- Preparar formulações de lipossomas estáveis com diâmetro médio, dispersividade, potencial zeta, eficiência de encapsulação, perfis de libertação, concentração lipídica e citotoxicidade aceitáveis para poderem ser usados como SLC;
- Estudar o efeito das esferas de vidro na preparação dos lipossomas e nas suas propriedades;
- Estudar o efeito da adição de diferentes proporções de Estearilamina nas características dos lipossomas;
- Introduzir o polímero, em diferentes percentagens, nas formulações antes e depois da formação dos lipossomas e verificar qual a melhor abordagem;
- Reticular os CPLs mais promissores e analisar possíveis vantagens associadas;
- Estudar a influência do pH do meio nos CPLs desenvolvidos no que toca a capacidade de libertação de calceína;
- Estudar a melhor forma de armazenamento dos CPLs durante 75 dias, com e sem adição de uma molécula protetora;

Capitulo I - Revisão Bibliográfica

1. Lípidos

Os lípidos são uma família de biomoléculas, particularmente heterogénea, conhecida há mais de 100 anos. Este tipo de substâncias distingue-se principalmente pela sua insolubilidade em água e grande solubilidade em solventes orgânicos apolares, como a acetona ou o clorofórmio. Apresentam como funções biológicas o fornecimento e armazenamento de energia no organismo, a sinalização celular e o provisionamento de vitaminas lipossolúveis. Atuam ainda como componentes estruturais nas membranas biológicas e como isolante térmico, contribuindo assim para manutenção da temperatura corporal [20, 21]. Podem ser classificados, segundo Bloor [20], como simples, complexos ou derivados (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação da família dos lípidos, segundo Bloor [20].

Classe de Lípidos	Composição
Simple	Óleos e Ceras
Complexos	Fosfolípidos, Glicolípidos, Sulfolípidos, Aminolípidos e Lipoproteínas
Derivados	Ácidos gordos, hormonas, vitaminas, ácidos biliares, esteróis, esteroides, álcoois e hidrocarbonetos

2. Fosfolípidos

Os fosfolípidos fazem parte da classe dos lípidos complexos, como supramencionado. As principais características que os tornam tão importantes e únicos são a sua estrutura e composição. Em cada fosfolípido é possível encontrar sempre uma “cabeça” hidrófila, polar, com uma afinidade significativa para com a água, e uma “cauda” hidrofóbica, apolar, com muita pouca afinidade com a mesma (Figura 10) [20, 21].

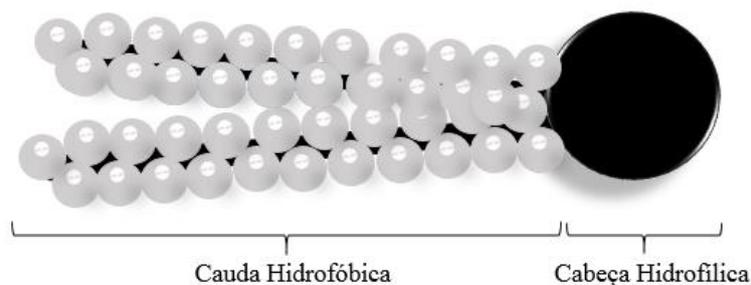


Figura 10 - Representação esquemática de um fosfolípido.

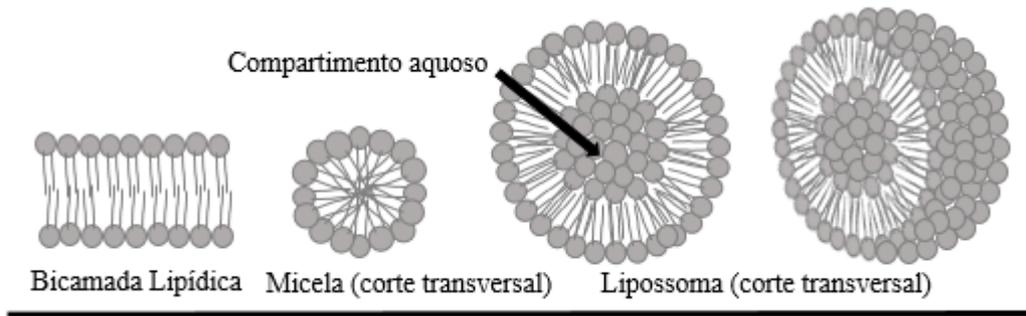


Figura 12 - Representação esquemática de uma bicamada lipídica, de uma micela e de um lipossoma.

2.1. Bicamadas lipídicas

As bicamadas lipídicas podem ser encontradas em todas as membranas celulares e desempenham um importante papel nas mesmas, visto que, juntamente com as proteínas e o colesterol formam as membranas plasmáticas (Figura 13) presentes em todas as células eucariotas e procariotas [20].

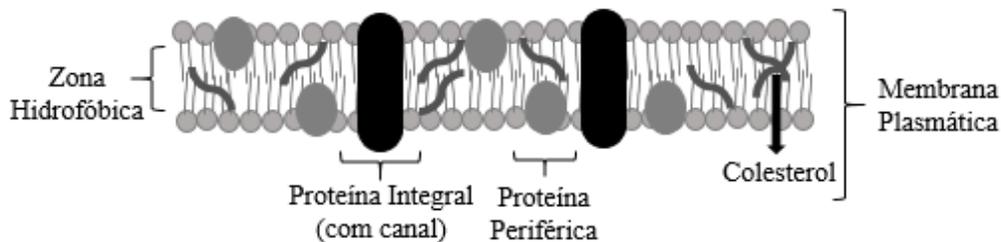


Figura 13 - Representação esquemática de uma membrana plasmática de uma célula eucariota.

Como as bicamadas lipídicas são impermeáveis, a incorporação das proteínas na membrana plasmática assegura o transporte das mais diversas substâncias, atuando como canais, em qualquer sentido, entre meios e células, um mecanismo essencial ao seu normal funcionamento [20,21].

Em relação ao colesterol, como este é insolúvel em água e no sangue, é transportado através da sua associação a proteínas e, uma vez na membrana plasmática, aloja-se na parte hidrofóbica da bicamada lipídica, que confere à mesma uma maior resistência e menor fluidez, o que contribui significativamente para a sua estabilidade [20,21].

2.2. Micelas

Quando a concentração dos fosfolípidos em meio aquoso iguala ou ultrapassa a concentração micelar crítica (CMC), dá-se a formação espontânea de micelas. As micelas são estruturas que resultam da organização dos fosfolípidos em esferas, com as “cabeças” hidrófilas viradas para fora, em contacto com o meio aquoso, e as “caudas” hidrofóbicas voltadas para dentro, protegidas da água (figura 12) [22,23].

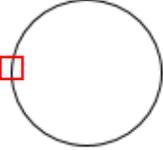
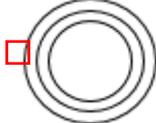
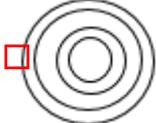
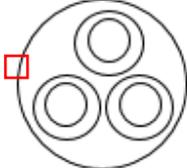
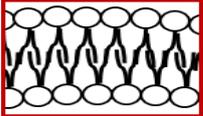
Normalmente as micelas estão associadas aos surfactantes, que são maioritariamente compostos por fosfolípidos [22]. Este tipo de substâncias é especialmente conhecido pela sua presença nos mais variados produtos de limpeza, como detergentes e sabonetes, e na indústria cosmética onde são usadas em formulações de cremes e loções [23].

2.3. Lipossomas

Os lipossomas são constituídos por fosfolípidos, como anteriormente mencionado, naturais ou sintéticos, que depois de hidratados em determinadas condições, formam espontaneamente vesículas esféricas, nanométricas, com uma ou várias camadas, com o intuito de anular as interações desfavoráveis entre as cadeias hidrofóbicas de ácidos gordos e o meio aquoso envolvente, tal como as micelas [8-10]. Porém, os lipossomas distinguem-se das micelas por conterem um compartimento intersticial, rodeado por uma camada concêntrica de fosfolípidos (Figura 12) exatamente como se uma extensa bicamada lipídica “se tivesse enrolado sobre si própria” para formar uma esfera.

Descobertos pelo cientista inglês Alec Bangham em 1960, os lipossomas podem ser classificados quanto ao seu tamanho, número de bicamadas e organização das mesmas (Tabela 3) [8-10].

Tabela 3 - Classificação dos lipossomas segundo as suas dimensões e números de bicamadas [8-10].

Designação	Diâmetro (nm)	Representação esquemática
SUV (Vesículas Unilamelares pequenas)	20-100	
LUV (Vesículas Unilamelares grandes)	>100	
GUV (Vesículas Unilamelares gigantes)	>1000	
OLV (Vesículas Oligolamelares)	100-500	
MLV (Vesículas Multilamelares)	>500	
MVV (Vesículas Multivesiculares)	>1000	
Bicamada Lipídica (espessura de 3-4 nm)		

A formação de lipossomas em meio aquoso, no lugar de, por exemplo, micelas, depende fundamentalmente da concentração e género de fosfolípido, e método de produção usados.

3. Lipossomas multifuncionais

Como foi já referido, o colesterol tem uma propensão natural para se hospedar na bicamada lipídica das membranas plasmáticas das células, conferindo-lhes uma maior resistência mecânica e uma menor fluidez, essenciais à sua solidez. Assim sendo, e tendo em conta que os lipossomas são formados por uma ou mais bicamadas lipídicas, a

integração do colesterol nos mesmos permite, a partir do mesmo princípio, aumentar a sua estabilidade [11].

As vesículas formadas por fosfolípidos com colesterol designam-se por lipossomas convencionais (Figura 14). Estes lipossomas são ideais para transportar drogas destinadas à vacinação ou quando existe a possibilidade de serem administrados diretamente no local da infecção ou inflamação [24].

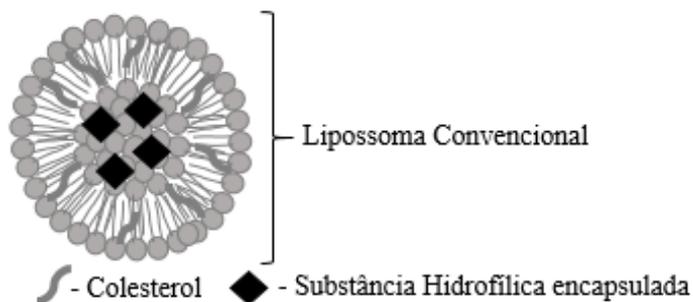
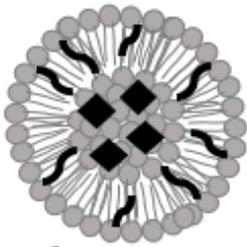
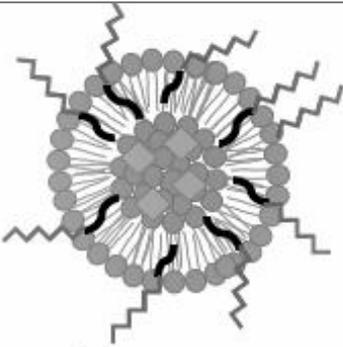
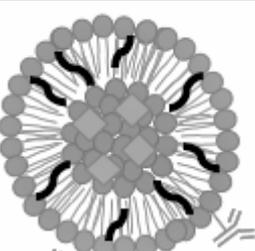
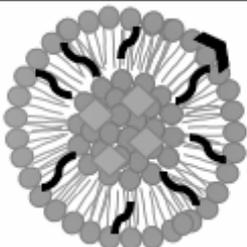


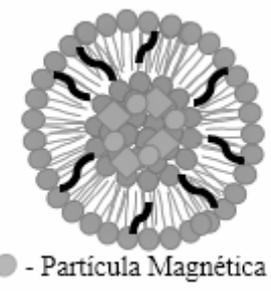
Figura 14 - Representação esquemática de um lipossoma convencional.

Porém, os lipossomas convencionais detêm um tempo de circulação no fluxo sanguíneo relativamente curto. Isto deve-se à sua forte tendência para se acumularem, muito rapidamente nas células fagocitárias do sistema reticuloendotelial humano (RES), depositando-se em seguida, no fígado e/ou no baço, comprometendo o emprego de lipossomas convencionais para o transporte de drogas destinadas a outros órgãos [24].

Os lipossomas modificados quimicamente são uma das vias preconizadas para contornar as desvantagens dos homónimos convencionais. As modificações podem ser aplicadas na superfície dos lipossomas e/ou através de incorporação de moléculas que permitam aumentar as funções básicas dos mesmos (Tabela 4) [24]. Estas alterações têm como principal objetivo desenvolver sistemas multifuncionais de libertação controlada, que não sejam atacados pelas células fagocitárias, permanecendo na corrente sanguínea, até se acumularem no local do organismo a que se destinam, quer se trate de um tratamento, diagnóstico ou monitorização.

Tabela 4 – Características principais e aparência dos diferentes tipos de lipossomas modificados.

Lipossoma	Características	Aspetto
Convencional	Sem modificação de superfície.	 <p data-bbox="991 544 1174 584">- Colesterol</p>
A - Longa circulação	Cadeias de um polímero hidrofílico ligadas à superfície, que conferem proteção ao lipossoma, aumentando o seu tempo de circulação na corrente sanguínea.	 <p data-bbox="991 969 1249 1010">- Polímero Hidrofílico</p>
B - Imunogénico	Anticorpo ligado à superfície, direcionando o lipossoma a um local específico do organismo.	 <p data-bbox="991 1283 1174 1323">- Anticorpo</p>
C - Penetração Celular	Proteínas ou Péptidos ligados à superfície dos transportadores, desta forma adquirem a capacidade de penetrarem as células, o que permite a libertação intracelular de substâncias.	 <p data-bbox="946 1597 1233 1637">- Proteína ou Peptídeo</p>
D - Catiónicos	Lipossomas com carga positiva que se ligam a moléculas negativas, como ADN, para transfeção.	 <p data-bbox="994 1955 1174 1995">- DNA</p>

<p>E - Magnético</p>	<p>Partículas magnéticas contidas no interior do lipossoma, que tornam o transportador sensível quando sujeito a um campo magnético externo. Podem ser usados como agente de contraste numa imagem de ressonância magnética.</p>	
<p>F - Metal Pesado</p>	<p>Metal pesado quelado ligado ao lipossoma que funciona como agente de contraste para ressonâncias magnéticas, tomografias, ultrassonografias e cintilografias.</p>	

3.1. Lipossomas de longa circulação (LLC)

O principal objetivo da criação de lipossomas multifuncionais e a propriedade mais importante de qualquer nano-transportador é a sua longevidade. Para tal, foi necessário criar uma nova abordagem para ultrapassar o problema da captação destas estruturas pelas células fagocitárias, que permitisse manter os lipossomas no organismo, por um determinado período de tempo, sem sofrerem qualquer tipo de ataque [8-10, 24]. Nessa linha, surgiram os lipossomas de longa circulação (LLC), que se caracterizam por possuírem na sua bicamada lipídica cadeias de polímero hidrófilo [10]. O polímero incorporado confere uma proteção extra aos lipossomas, diminuindo a interação dos mesmos com os diferentes componentes do sangue [24].

Através desta estratégia a natureza hidrófila da superfície dos LLC sofre um aumento significativo que, conseqüentemente, resulta num fenómeno de repulsão entre os mesmos e as células fagocitárias, evitando desta forma a sua retenção pelas mesmas, proporcionando assim um tempo de circulação na corrente sanguínea mais prolongado, essencial para que os lipossomas encontrem o local de acumulação desejado.

A integração das cadeias de polímero na superfície dos LLC é feita a partir da absorção física das mesmas ou através de ligações químicas [20-21]. O polímero selecionado deve ser biocompatível, solúvel em meios aquosos, flexível, imunogénico,

antigénico, pouco tóxico, com pouca tendência para se acumular no RES e não pode interagir ou alterar as propriedades do composto a ser transportado [24,25].

Apesar de existirem inúmeros polímeros que podem ser usados em LLC o mais comuns é o poli(etileno glicol) (PEG). O PEG é comercialmente viável e apresenta todas as condições necessárias, inclusive com diferentes pesos moleculares, para ser aplicado em sistemas de libertação controlada, em particular em LLC, proporcionando-lhes uma maior longevidade, *in vitro* e *in vivo*. O PEG não é biodegradável, sendo assim excretado do organismo humano através do sistema renal. Atualmente já existem formulações de LLC com PEG no mercado para o tratamento de doenças cancerígenas [24,25].

3.2. Lipossomas imunogénicos

O direcionamento de nano-transportadores para um local específico do organismo não é um conceito novo. Se o objetivo for, por exemplo, a libertação de um fármaco a partir de lipossomas num local onde se situa um tumor, para que o fármaco seja libertado apenas naquela zona, o pretendido é que a formulação seja encaminhada para a área afetada e aí se acumule, imediatamente após a sua entrada na corrente sanguínea [24-26]. Para tal são usados anticorpos, folatos ou açúcares, que apresentem uma afinidade especial com as células características do local-alvo. Desta forma, surgiram os lipossomas com anticorpos, designados por lipossomas imunogénicos ou imunolipossomas [24-26]. Proporcionar a ligação entre os lipossomas e os anticorpos é um procedimento simples, visto que habitualmente o anticorpo se liga covalentemente a um dos grupos da membrana lipídica, sem afetar a integridade do lipossoma ou a seletividade do anticorpo.

Os imunolipossomas podem também conter polímero, tornando-se assim imunolipossomas de longa circulação, que conseguem dirigir-se ao sítio desejado do organismo sem serem atacados pelo sistema reticuloendotelial, devido à sua seletividade e longevidade. Nestes casos a proporção anticorpo/polímero deve ser selecionada cuidadosamente e existe ainda a possibilidade de incorporar o anticorpo nas cadeias de polímero (Figura 15) [24].

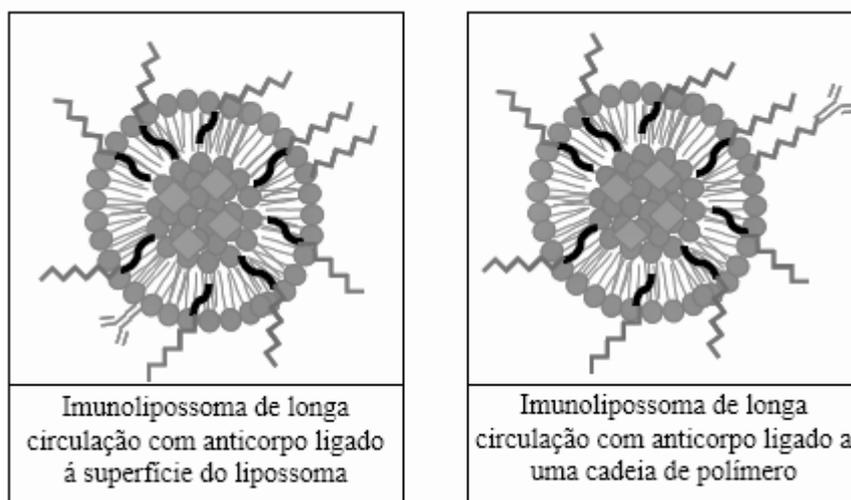


Figura 15 - Representação esquemática de Imunolipossomas de longa circulação.

3.3. Lipossomas de penetração celular

Apesar de os imunolipossomas de longa circulação conseguirem chegar intactos aos locais desejados, em certos casos isso não é suficiente porque existem situações em que a libertação deve ocorrer no citoplasma das células ou em determinados organelos específicos. Para isso, existe a possibilidade de incluir nos lipossomas moléculas com capacidade de penetração celular, como uma proteína ou um peptídeo. O procedimento consiste usualmente na seleção de proteínas, que podem ser encontradas nas membranas plasmáticas das células alvo, e incorporar nas mesmas grupos hidrofóbicos que permitam a sua absorção física na superfície dos lipossomas [27].

Desta forma, depois de os lipossomas de penetração celular chegarem à zona de interesse, as proteínas ligadas aos mesmos vão alojar-se nas membranas plasmáticas das células e posteriormente são internalizadas por fusão com a membrana plasmática ou endocitose (processo de absorção de material pelas células vivas), tornando exequível a libertação intracelular [24,25].

Existem lipossomas de longa circulação com anticorpos e/ou proteínas (Figura 16). Este lipossomas circulam na corrente sanguínea pelo tempo necessário, encontram o sítio específico onde se devem acumular e são internalizados. Este tipo de sistemas de libertação controlada exigem uma coordenação apropriada para que no sangue a capacidade de penetração se mantenha inativada [24].

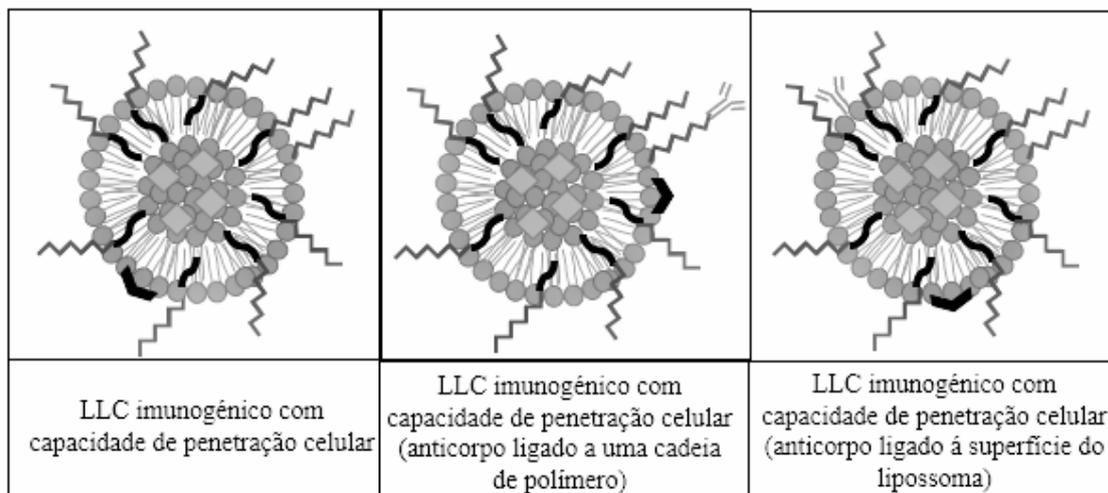


Figura 16 - Representação esquemáticas dos diferentes tipos de Imunolipossomas de longa circulação com capacidade de penetração celular.

Como mencionado anteriormente, a proteção conferida pelos polímeros é essencial para os LLC se manterem por mais tempo no organismo. Contudo, quando estes se reúnem no local desejado a sua presença pode representar um problema, sobretudo quando se pretende que os LLC sejam internalizados pelas células. Mesmo com a capacidade de penetração celular proporcionada por uma proteína ou péptido, a internalização do lipossoma torna-se mais complicada com a presença do revestimento polimérico, e uma vez dentro da célula, pode dificultar a libertação do seu conteúdo. Como consequência, a libertação pode ser ineficiente ou dar-se fora do local pretendido, causando a perda do composto encapsulado, comprometendo assim o seu propósito [28].

Tendo em conta os aspetos apresentados, o ideal nestas situações será manter a proteção facultada pelo polímero apenas até alcançar o sítio-alvo, ou seja, depois da acumulação no lugar adequado o lipossoma deverá desfazer-se das cadeias de polímero. Para isso existem algumas abordagens possíveis, uma delas é a utilização de polímeros com grupos sensíveis à variação do pH, que se degradam em meios ácidos, ou à temperatura, que se destabilizam em locais com uma temperatura acima da temperatura fisiológica [28]. Depois de perda do polímero, a internalização celular deve ser o mais rápida possível, de forma a evitar uma libertação precoce da substância encapsulada antes de encontrarem o local apropriado para o efeito [28].

3.4. Lipossomas catiónicos

Os métodos de tratamento não virais para doenças como o cancro ou a SIDA sustentados pela técnica de transfeção, denominados vulgarmente como terapia genética, encontram-se em crescimento [29,30]. A transfeção consiste basicamente na inserção propositada de ADN em células afetadas, para produção de proteínas de interesse ou introdução de genes para alterar algumas propriedades das mesmas, com o intuito de tratar ou retardar determinadas doenças [31].

O ADN é uma macromolécula constituída por uma série de ácidos nucleicos que, para efeitos de transfeção, deve chegar ao citoplasma das células. Porém, devido ao seu tamanho, o ADN é normalmente captado por endocitose, transferido em endossomas seguindo para os lisossomas onde é degradado pela ação enzimática, sem nunca chegar ao citoplasma. Este problema é recorrente nos métodos não virais e impossibilita completamente a sua aplicação [24,28-30].

O uso de lipossomas como sistemas de libertação controlada de ADN é uma das opções para contornar a questão da degradação. Tendo em conta que as moléculas de ADN possuem uma carga negativa, os lipossomas usados neste tipo de formulações, têm de ter um carácter positivo, de forma proporcionar a ligação entre ambos. Devido à sua carga de superfície positiva este tipo de lipossomas são designados como catiónicos [24,28-30].

Todavia, os lipossomas catiónicos por si sós não são o suficiente para impedir a degradação do ADN antes da sua libertação no citoplasma das células. Normalmente este tipo de sistemas possui também cadeias de polímero para promover um maior tempo de circulação na corrente sanguínea e em alguns casos também anticorpos de forma a direccionar os lipossomas ao sítio-alvo [24]. Para esta aplicação, interessa que os lipossomas passem pela endocitose com o polímero, pois dentro dos endossomas, onde o meio é ácido, as cadeias poliméricas sofrem uma forte protonação, que resulta numa entrada de água para o interior do endossoma, causando a sua desintegração e consequente libertação do ADN no citoplasma, como pretendido [28].

Por outro lado, se na formulação dos lipossomas um tipo de fosfolípido sensível ao pH, uma vez dentro do endossoma, devido ao ambiente ácido, a membrana lipídica vai desintegrar-se e, ao interagir com a membrana do endossoma, acaba por destabilizá-la também, promovendo a libertação desejada do ADN no citoplasma [28].

Existe ainda uma terceira hipótese que consiste em usar um polímero que seja capaz de se fundir na membrana do endossoma ou na membrana plasmática levando os lipossomas diretamente para o citoplasma [28-30].

Devido à existência de várias opções de tratamento por transfeção com recurso a lipossomas, há já formulações desta natureza aprovadas e disponíveis no mercado, uma delas é o Lipofectin[®] [28].

3.5. Lipossomas magnéticos e lipossomas com metais pesados

Para as áreas de diagnóstico e monitorização existem os lipossomas magnéticos e os lipossomas com metais pesados. Mais uma vez, este tipo de lipossomas também pode possuir polímeros hidrófilos e/ou anticorpos para promover a acumulação das vesículas no local-alvo do organismo [24,28].

Nos diagnósticos baseados em imagem é necessária uma intensidade de sinal suficiente para poder existir uma distinção clara entre zonas sãs e zonas afetadas. Para isso, são injetados na corrente sanguínea agentes de contraste, com a capacidade de interação com as possíveis células afetadas, de modo a que pequenas zonas e/ou lesões menores sejam diferenciáveis [28]. A seleção do agente de contraste é feita de acordo com a especificidade da técnica de diagnóstico ou monitorização empregue e consoante o local do organismo onde este se deve concentrar. Para que os agentes de contraste cheguem íntegros ao sítio-alvo podem ser facilmente encapsulados em lipossomas [24].

Os lipossomas magnéticos em particular possuem partículas magnéticas que, pela sua sensibilidade a campos eletromagnéticos externos, podem ser usados em ressonâncias magnéticas. Este tipo de lipossomas, com partículas de óxido de ferro, são muito usados no diagnóstico e tratamento de tumores linfáticos devido à facilidade que possuem em entrar no sistema linfático [28-32].

Por outro lado, existem os lipossomas com metais pesados que podem ser utilizados em ressonâncias magnéticas, tomografias, ultrassonografias e cintilografias.

O procedimento de produção dos mesmos inclui a quelação dos metais a partir de um quelante solúvel, sendo posteriormente encapsulados nos lipossomas. Podem também ser modificados quimicamente para possuírem grupos hidrofóbicos capazes de se alojarem na bicamada lipídica permanecendo assim na superfície dos lipossomas [28-32].

4. Produção de lipossomas

A mais conhecida, antiga e expedita técnica de produção de lipossomas é a de hidratação do filme lipídico, ou Método de Bangham. Consiste essencialmente na dissolução de fosfolípidos num solvente orgânico, posteriormente evaporado, de forma a dar origem a um fino filme de lípidos, que depois de hidratado com um tampão e devidamente condicionado, com agitação e temperatura adequadas, dá origem a populações uniformes de vesículas lipídicas [33,34].

Outros métodos foram surgindo ao longo das décadas, como a técnica de evaporação de fase reversa. Esta também conta com a dispersão dos fosfolípidos num solvente orgânico, mas depois da evaporação desse primeiro solvente e formação do filme lipídico, são novamente dissolvidos num segundo solvente orgânico. A esta solução na presença de um fluxo contínuo de azoto permitindo assim a formação dos lipossomas, principalmente LUV e OLV. No final, o solvente orgânico é removido por evaporação a partir da injeção contínua de azoto [33,34].

Para a preparação de lipossomas de tamanhos mais reduzidos, SUV, sem recorrer a extrusão ou sonicação, o método mais indicado é o de injeção de solvente. Neste método a solução de fosfolípidos, num solvente orgânico, é injetada no tampão, promovendo assim a formação dos lipossomas. Se o solvente orgânico for imiscível com o tampão, os lipossomas só se formam depois da evaporação do mesmo. O solvente orgânico pode ser evaporado no final do processo ou pode evaporar à medida que a solução de fosfolípidos é injetada no tampão, desde que este último se encontre à temperatura de evaporação do solvente em questão. A segunda opção de evaporação do solvente orgânico é preferível porque é mais rápida, permite uma menor contaminação do produto final e menos gastos energéticos [33,34].

Por outro lado, se o objetivo for a produção de lipossomas com um grande volume intersticial, o método de diálise é o mais apropriado. Os fosfolípidos são solubilizados numa solução de detergente, e só depois da remoção controlada do detergente por diálise é que se dá a formação dos lipossomas. Esta técnica é raramente usada por ser extremamente dispendiosa [33,34].

Todos os métodos apresentados destinam-se à produção descontínua de lipossomas em pequena escala, para laboratório por exemplo. À escala industrial são usadas técnicas diferentes, muitas delas baseadas nos métodos anteriormente descritos,

enquanto outras utilizam, por exemplo, *spray-drying*, *freeze drying* ou microfluidização [33,34].

Uma das maiores desvantagens do uso de lipossomas, e também o seu maior entrave, é a produção em grande escala, num volume considerável, porque quanto maior o lote menor é a uniformidade dos lipossomas produzidos, devido à sensibilidade dos fosfolípidos a pequenas variações das condições externas como a temperatura, agitação ou tempo de incubação [28,29]. Assim, não têm cessado os esforços para encontrar um método capaz de produzir lipossomas, continuamente, com o máximo de controlo possível, em termos de tamanho e número de camadas lipídicas. Algumas técnicas mostram-se uma mais-valia em relação à eficiência de encapsulação dos lipossomas, outras no controlo da homogeneidade dimensional ou concentração de lípidos, enquanto outras são menos dispendiosas, mais simples e menos demoradas [33,34].

5. Caracterização de lipossomas

Para que uma formulação de lipossomas seja clinicamente aprovada necessita de uma caracterização completa que dê a conhecer a sua qualidade e potencial como futuro SLC.

5.1. Tamanho e homogeneidade

Como visto anteriormente, o tamanho e homogeneidade dos lipossomas é extremamente importante para poderem vir a ser usados como nano-transportadores. Assim, os primeiros parâmetros a serem avaliados são o diâmetro médio e dispersividade. O diâmetro médio dos lipossomas deve encontrar-se entre os 100-400 nm e a dispersividade não deve ultrapassar os 0,400 (numa escala de 0-1).

Existem diversas técnicas que podem ser usadas para a medição destas variáveis, entre elas tem-se a microscopia eletrónica de transmissão (TEM), a microscopia de força atómica (AFM), o fracionamento em escoamento (FFF), e a dispersão de luz dinâmica (DLS) [33]. Outro parâmetro muito utilizado para prever a estabilidade das formulações, é o potencial zeta (zP).

5.2. Potencial Zeta

O zP é medido através do movimento das partículas, encontrando a diferença entre a tensão elétrica e, neste caso, a superfície dos lipossomas em meio aquoso. Se a carga for muito baixa ou quase neutra, vai existir uma tendência para a formação de agregados. Por outro lado, se a carga for suficientemente positiva, $> +30\text{mV}$, os lipossomas vão manter-se em suspensão sem interações ou criação de aglomerados, o que também se verifica se a carga for consideravelmente negativa, $< -30\text{mV}$, porque os mesmos vão sofrer um fenómeno de repulsão que os irá manter afastados uns dos outros, assegurando a estabilidade [33].

5.3. Eficiência de encapsulação e Perfis de Libertação

A avaliação da capacidade de encapsulação e libertação das formulações é outro parâmetro a avaliar. Para tal é necessário determinar percentagens de eficiência de encapsulação (EE) e perfis de libertação.

A EE define-se como a percentagem de encapsulante encontrada na solução final de lipossomas em relação à quantidade inicial de solução encapsulada colocada em contato com os mesmos. Este parâmetro depende essencialmente do tipo de fosfolípido e tampão usados nas formulações e do método de produção usado. Quanto mais elevada for a EE, maior é o potencial dos lipossomas como SLC.

A encapsulação de substâncias por lipossomas pode ser alcançada hidratando o filme de fosfolípidos com uma solução de encapsulante em tampão, antes da sua formação, ou introduzindo uma solução concentrada de encapsulante depois de formados. Neste caso o encapsulante vai migrar para o espaço intersticial dos mesmos por difusão provocada pelo gradiente de concentração.

De uma forma ou de outra, no final da encapsulação, para conhecer a EE e os perfis de libertação, é necessário proceder à separação entre a solução de lipossomas encapsulados e a solução de encapsulante livre, através de centrifugação, ultracentrifugação ou diálise [32]. Em seguida, as amostras são colocadas num ambiente propício à libertação e a quantidade de solução libertada é medida ao longo do tempo (mínimo 24 horas) para gerar os perfis de libertação. Por fim, o terceiro passo compreende o colapso dos lipossomas e medição da quantidade total de solução encapsulada. As medições podem ser feitas através de espectrofotometria,

espectroscopia de fluorescência ou por métodos baseados em enzimas ou eletroquímica, consoante a natureza do encapsulante.

A EE pode também ser expressa como a quantidade molar de encapsulante por mole de lípido (concentração molar da solução encapsulada final/concentração molar de lípidos), ou em mg de solução encapsulada por mM de lípidos, ou ainda em μL de solução encapsulada por μmol de lípidos [33].

5.4. Concentração de lípidos

Independentemente da forma como se expresse a EE, é essencial conhecer a concentração de lípidos nos lipossomas. Para tal, os mesmos podem ser analisados por técnicas cromatográficas ou utilizando reagentes, ácidos ou enzimas, que desencadeiam reações, que por sua vez, levam à formação de produtos específicos. Estes podem ser medidos com recurso a espectrofotometria, tornando possível chegar aos valores de concentração de lípidos com expressões matemáticas que relacionem ambos [33].

5.5. Citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade dão informação acerca da biocompatibilidade das formulações de lipossomas, para isso é analisada a taxa de crescimento celular na presença dos mesmos.

Depois da cultura de células vivas ser devidamente marcada com corante, é exposta às amostras de lipossomas, em diferentes concentrações, sendo posteriormente, medida a sua absorvância, ao longo do tempo, com recurso a espectrometria.

5.6. Conservação

A estabilidade dos lipossomas durante o armazenamento é um fator crucial que, caso não se verifique, pode por em causa a utilização dos mesmos como SLC. Quando armazenados, os lipossomas devem ser capazes de preservar as suas propriedades físicas e químicas e ao mesmo tempo manter a substância que contém encapsulada. Desta forma, para que a caracterização de uma formulação de lipossomas seja completa é essencial que passe por um estudo de conservação.

Durante o armazenamento os lipossomas procuram formas de encontrar o menor estado de energia possível, pelo que tendem a formar aglomerados que dão origem a

vesículas de maiores dimensões, além do que é pretendido. A alteração do tamanho médio dos lipossomas pode assim alterar o desempenho das formulações no momento da administração. Tendo isto em conta, o controlo dos tamanhos médios dos lipossomas é um bom indicador da sua estabilidade durante o período de armazenamento.

Contudo, para analisar a estabilidade dos lipossomas é necessário ter outros aspetos em conta, como, por exemplo, a libertação precoce do composto encapsulado, sem alterações perceptíveis dos diâmetros médios dos mesmos. Este problema encontra-se relacionado com os ácidos gordos presentes nos fosfolípidos, que podem desencadear reações de oxidação, que por sua vez resultam numa libertação indesejada. Assim sendo, um controlo, ao longo do tempo, da quantidade de encapsulante na solução de lipossomas armazenados pode revelar a sua capacidade/incapacidade de retenção da mesma.

Por último, pode ainda ocorrer outro fenómeno que coloque entrave ao emprego dos lipossomas como SLC depois de armazenados: o aparecimento de bactérias. Com isto, para que o estudo de conservação dos lipossomas seja completo, devem ainda passar por um controlo de estabilidade microbiana [33].

6. Polímeros

Um polímero define-se como uma macromolécula que resulta da ligação de moléculas menores, os monómeros. A reação química envolvida na síntese deste tipo de moléculas designa-se por polimerização. A complexidade e a estrutura dos polímeros encontram-se diretamente relacionadas com o tipo de monómero, ou monómeros, empregues na sua síntese [35,36].

Os polímeros podem ser classificados com base na sua estrutura (grupos funcionais), forma (linear, ramificado, reticulado), composição (homopolímero ou copolímero aleatório, de bloco, de gradiente ou enxerto), método de polimerização e/ou processamento ou quanto à sua capacidade de deformação (termoplásticos ou termofixos) [35,36].

6.1. Mecanismos de Polimerização

O mais conhecido e simples mecanismo de polimerização é designado por reação gradual e caracteriza-se principalmente por dar origem a oligómeros, homopolímeros e

copolímeros aleatórios, de longa ou curta cadeia, como poliésteres, poliamidas e poliuretanos [35,36].

Outro tipo de polimerização, igualmente importante, é a polimerização em cadeia, ou simplesmente, crescimento em cadeia. Este mecanismo baseia-se na utilização de compostos ativos, que atuam como iniciadores e que, por decomposição formam, por exemplo, radicais livres (polimerização radicalar), ou espécies iônicas (polimerização iônica), que atacam um monómero e desencadeiam o crescimento das cadeias poliméricas por ligações sucessivas [35,36].

6.2. Polimerização radicalar livre

A polimerização radicalar livre é um processo que permite atingir altos pesos moleculares para baixas percentagens de conversão.

Contempla três fases distintas: iniciação, propagação e terminação (Figura 17). Na iniciação dá-se a dissociação do iniciador (I) em duas espécies radicalares e, em seguida, um desses radicais associa-se a um dos monómeros (M) disponíveis. No final da iniciação ocorre a propagação, etapa em que são adicionados monómeros à cadeia através dos radicais e que cessa quando deixa de existir monómero. Por fim, sucede a terminação, por combinação, duas cadeias em propagação com radicais livres que se combinam, ou dismutação, transferência de eletrões entre duas cadeias em propagação com radicais livres [35-38].

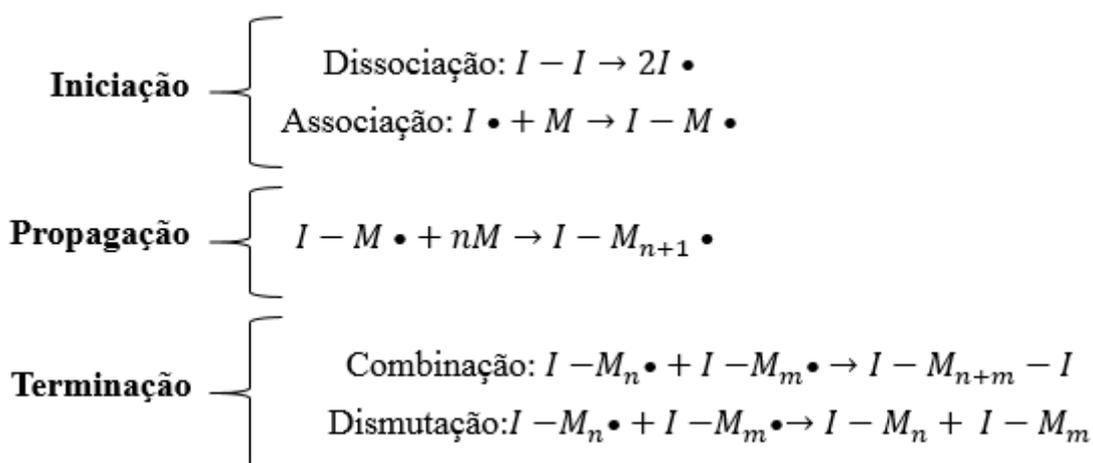


Figura 17 - Representação esquemática das diferentes etapas do mecanismo de polimerização radicalar [35-38].

A polimerização radicalar livre, para além de permitir a produção de polímeros de elevado peso molecular, suporta também utilização de diferentes condições de reação, em amplos intervalos de temperatura e funciona com uma vasta lista de grupos funcionais. Contudo, apresenta também desvantagens, como reduzido controlo sobre algumas características dos polímeros, entre elas, o peso molecular, a polidispersividade (\mathcal{D}), a funcionalidade, a forma e constituição da cadeia [35,36].

6.3. Polimerização radicalar viva

A polimerização viva distingue-se da polimerização radicalar livre porque não possui reações de terminação. A utilização deste tipo particular de polimerização não é muito frequente porque em termos de custo/benefício é pouco vantajosa.

As limitações da polimerização viva têm suscitado o estudo e desenvolvimento de mecanismos de polimerização alternativos, baseados nas mesmas linhas mas que permitam de alguma forma controlar as propriedades finais dos polímeros. Assim surgiu a polimerização radicalar Viva (LRP), um caso paradigmático.

O sucesso da LRP encontra-se relacionado com duas exigências extra, que não se verificam na polimerização radicalar livre. Primeiro, o iniciador que origina os radicais tem de ser totalmente consumido e, segundo, a velocidade de ativação das espécies dormentes tem de ser superior à velocidade de desativação das espécies ativas (Figura 18). Desta forma, todas as cadeias poliméricas iniciam o seu crescimento ao mesmo tempo, a uma velocidade muito próxima, o que reduz substancialmente a probabilidade de terminação.

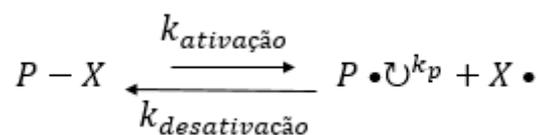


Figura 18 - Representação esquemática do equilíbrio dinâmico, de ativação/desativação de espécies presente em LRP [34,35].

Independentemente das técnicas e monómeros empregues existem considerações que descrevem uma LRP: cadeias continua a crescer sempre que for acrescentado mais monómero, crescimento linear do grau de polimerização com a conversão e cinética da reação de primeira ordem em relação ao monómero, controlo de pesos moleculares e baixa dispersividade [35-38].

6.4. Mecanismos de LRP

Manter o equilíbrio, entre as espécies ativas e dormentes presentes nas reações de polimerização, é essencial para o êxito da mesma. Assim sendo, existem diferentes técnicas de LRP que se distinguem entre si através do método que adotam nesse sentido. As estratégias praticadas baseiam-se no género de equilíbrio dinâmico exercido, se se trata de uma ativação/desativação reversível de radicais ou de um processo degenerativo de transferência reversível de cadeia.

No primeiro caso, durante a polimerização, dão-se terminações entre radicais. Desta forma, existem mais espécies desativadoras do que radicais em crescimento, o que resulta num deslocamento do equilíbrio no sentido inverso, o que, conseqüentemente, se faz notar nas propriedades finais do polímero, porque havendo menos radicais a probabilidade de terminação diminui e o controlo sobre a polimerização aumenta. Este fenómeno é conhecido como o efeito de radical persistente (PRE). As mais reconhecidas técnicas de PRE são a ATRP e a Polimerização Radicalar Livre Estável (SFRP) [35-38].

Por outro lado, se o equilíbrio é afetado pelo mecanismo reversível de transferência de cadeia, a quantidade de radicais não sofre alterações, o que torna indispensável o uso de um iniciador de radicais e o equilíbrio é sustentado a partir de agentes de transferência de cadeias durante o crescimento das mesmas. Neste caso as técnicas de LRP mais usadas são a Polimerização de transferência de cadeia por fragmentação reversível de adição (RAFT) e a Polimerização de transferência de cadeia degenerativa (DCT) [35-38].

Neste estudo, o mecanismo selecionado, para a síntese de polímeros por LRP, foi o ATRP.

6.4.1. ATRP

Para um maior controlo do peso molecular dos polímeros durante toda a reação de polimerização é necessário atingir o equilíbrio dinâmico o mais rapidamente possível. Para tal, na grande parte dos casos, recorre-se ao ATRP, método que, com os catalisadores certos, permite controlar polimerizações de monómeros como estirenos, metacrilatos, acrilatos e acrilamidas [35-38].

Para empregar a ATRP é necessário um metal de transição (Mt^n), um ligante (Lg) e um haleto de alquilo (iniciador). O elemento responsável pela transferência de um átomo halogenado (X) a um complexo de propagação macroradical é o complexo de metal de transição (Mt^n/L) (Figura 19) [35-38].



Figura 19 - Representa esquemática do equilíbrio dinâmico alcançado entre espécies ativas e dormentes em ATRP [35-37].

O ligante atua como controlador da reatividade dos catalisadores selecionados, que são dissolvidos no solvente, a partir do complexo formado entre o mesmo e o composto metálico [35-38]. Como o elemento metálico sofre redução, existe na reação uma quantidade muito maior de espécies dormentes do que espécies ativas (equilíbrio redox), que resulta numa concentração de radicais ativos muito reduzida, tornando a ocorrência de terminações muito pouco provável [35-38].

Usualmente a reação inicia-se quando se formam os radicais (cadeia halogenada ativa) e um complexo metálico oxidado (espécie desativadora). Posteriormente, dá-se a formação de espécies dormentes, através do ataque dos radicais às unidades de monómeros ou aos complexos metálicos com um maior estado de oxidação, estabelecendo-se assim o equilíbrio dinâmico procurado [35-38].

Metais de transição como o rutênio, cobre, ferro e níquel são os catalisadores mais utilizados em ATRP [30-32]. Como o cobre é barato, muito reativo e fácil de manusear, é um dos metais mais empregues como catalisador neste tipo de mecanismos [30-32] e foi também o selecionado para este estudo. Assim, o Cu(0)/ligante foi o complexo de menor estado de oxidação eleito, que gera um outro complexo com maior estado de oxidação, o Cu(II)Br₂/ligante, ao libertar o átomo halogenado terminal do iniciador ou da cadeia polimérica [35-38].

Capitulo II - Parte Experimental

1. Materiais

Os compostos/materiais seguintes foram utilizados conforme adquiridos: Colesterol (CHO) (Sigma-Aldrich; 95%), Brometo de 2-bromoisobutirilo (2-BiB) (Alfa Aesar, 97%), Tris (2-aminoetil) amina (TREN) (Aldrich, 96%), solução de Formaldeído (Sigma-Aldrich; reagente ACS, 37% em peso em H₂O), Ácido fórmico (Sigma-Aldrich; ACS reagente; ≥88,0%), Brometo de cobre (II) (CuBr₂) (Acros Organics, 99+% +extra puro; anidro), Cobre de valência zero (Cu(0)) (Aldrich, 99,9%, em fio), Ácido trifluoroacético (TFA) (VWR Chemicals, 99%), Lecitina (LC) (Acros Organics, granular), Estearilamina (ST) (Acros Organics, 90%), Tetraidrofurano (THF) (VWR Chemicals, 99,6%), Tolueno (Fisher Scientific, 99,9%), Etanol (Panreac, 96%), Hexano (VWR Chemicals), Acetato de etilo (Fisher Scientific, 99,9%), Metanol (Sigma-Aldrich; 99,8%, anidro), Éter dietílico (Panreac, 99,7%), Clorofórmio (VWR Chemicals, 99,4%), Sulfato de sódio (Sigma-Aldrich; reagente ACS, ≥99,0%, pó anidro) e a Trehalose Dihydrate (TR) (Acros Organics, 99%).

A Trietilamina (TEA) (Merck, 99%), o Diclorometano (CH₂Cl₂) (VWR Chemicals) e o Dimetilsulfóxido (DMSO) (VWR Chemicals, 99,7%) foram destilados antes de serem utilizados previamente destiladas para a sua utilização nas sínteses.

O Terc-butil acrilato (tBA) (Alfa Aesar, 99%) foi purificado em colunas de sílica-alumina antes do seu emprego nas polimerizações, para remoção dos estabilizantes.

O 4-(dimetil amino)piridina (DMAP) (Merck, 99%) foi previamente recristalizado em tolueno.

As soluções tampão de fosfato salino (PBS) e de Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES) (Fisher Scientific) a 50 mM, em água MilliQ, foram também previamente preparadas.

O N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)carbodimidameto-p-toluenossulfonato (CME-CDI) (Fluka, 97%), a Etilenodiamina (EDA) (Merck, 99%), o Cloreto de sódio (NaCl) (Sigma Aldrich, 99%), o Hidróxido de sódio (NaOH) (Panreac; pellets), o Ácido clorídrico (HCl) (José M. Vaz Pereira, LDA, 37%), o hidrogenofosfato de sódio (Na₂HPO₄) (Sigma), o hidrogenossulfato de potássio (KH₂PO₄) (Merck), o Triton X-100 (Sigma Aldrich) e a Calceína (Acros Organics), foram utilizados como adquiridos para o preparo das soluções de CME-CDI e EDA, ambas em HEPES e a 100 mM, na

solução saturada de NaCl, nas soluções de NaOH e HCl a 0.01 M, na preparação do PBS a 0.01 M, a solução de Triton X-100 a 10 % (v/v) e na solução de calceína em HEPES a 60 mM.

O THF deutorado (d_8 THF) (Euriso-Top, 99,5%) e o CLF deutorado ($CDCl_3$) (aldrich, 99,8%) foram utilizados como adquiridos na preparação de amostras.

2. Equipamentos

Lista de equipamentos utilizados neste trabalho:

- Balança de precisão: Sartorius da Entris;
- Vórtex: Speed da VWR Internacional;
- Centrifuga: Universal 32 da Hettich;
- Liofilizador: Alpha 1-2 LD Plus da CHRIST;
- Medidor de pH: Inolab da WTW;
- Incubadora: Laboshake da Gerhardt;

3. Técnicas

3.1. GPC

Para avaliar a distribuição de pesos moleculares e dispersividade dos polímeros sintetizados foi utilizando um Viscotek (GPCmax VE2007). Este equipamento usa a técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) determinar o peso molecular médio numérico (M_n) e peso molecular médio ponderal (M_w) através da separação de moléculas com base no seu raio/volume hidrodinâmico [39].

As amostras, dissolvidas em THF, foram injetadas e passaram por diferentes detetores, depois de separadas por tamanhos, em várias colunas de material polimérico reticulado. O caudal de THF, a 30 °C, foi mantido a 1 mL/min com o auxílio de uma bomba de HPLC. Os parâmetros dos polímeros foram analisados com o auxílio de uma curva de calibração obtida através de padrões de poliestireno, de peso molecular e polidispersividade conhecidos, e o *software OmniSEC*.

3.2. RMN

Para determinar a estrutura química dos polímeros sintetizados neste trabalho usou-se um Espectrômetro (400 Hz) de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), técnica corrente no estudo da estrutura e composição dos mais variados compostos [40].

A técnica de RMN pode ser empregada em sólidos, soluções ou líquidos. No caso das soluções, os solventes são habitualmente deuterados (D_2O , $CDCl_3$, d_8THF ou d_6DMSO) para que o risco de interação com as amostras seja mínimo [41].

Os espectros de RMN, gráficos de voltagem induzida em função do varrimento de campo magnético, resultam da aplicação num campo magnético sobre as amostras, seguido da incidência de campo de radiofrequência. A excitação dos núcleos é detetada aumentando o campo magnético que se faz sentir no campo de radiofrequências, pela absorção de uma determinada quantidade de energia [41].

Os pesos moleculares foram determinados por integração de dois picos dos espectros medidos, um característico do monómero e outro polímero, no *software MestRenova*[®].

3.3. FTIR-ATR

Os espectros de infravermelho do CHO, CHO-Br, CHO-PtBA e CHO-PAA, outra forma de análise qualitativa dos polímeros obtidos, foram coligidos num equipamento FT/IR-4200 da Jasco Analytical Instruments, através da técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR), com o auxílio do *software Spectra Manager*.

A técnica de FTIR-ATR usa uma base de dados com espectros de absorvância de compostos padrão, com concentrações e composição conhecidas, a partir dos quais, através do método dos mínimos quadrados e da Lei de Beer, identifica os espectros de absorvância das amostras analisadas, por comparação da área/altura dos picos do gráfico [42-44].

Esta técnica é correntemente utilizada para analisar pós devido à sua simplicidade e eficácia. Para além disso, para obter resultados, necessita apenas de uma pequena quantidade de amostra (5-10 mg), que pode ser recuperada no final da análise, visto que não é degradada durante a realização da mesma [42-44].

3.4. DLS e LDM

Para avaliar o tamanho, polidispersividade e potencial zeta dos lipossomas formulados foi utilizado um *Zetasizer Nano ZS* da Malvern Instruments, que permite analisar os parâmetros indicados sob a influência de diferentes temperaturas, até 120 °C [44]. Este equipamento baseia-se na técnica de DLS para examinar partículas com diâmetros entre 0.3-10 000 nm. A técnica referida mede a dispersão das partículas, que se movem segundo o movimento browniano e, recorrendo à relação de Stokes-Einstein, converte essa grandeza numa distribuição de tamanhos. A sensibilidade da técnica deve-se à presença do sistema NIBS (*Non-Invasive Back Scatter technology*), que maximiza a detecção da luz dispersa [45].

Por outro lado, para medir o potencial zeta de suspensões das formulações de lipossomas, o instrumento usa a técnica de LDM (*Laser Doppler Microelectrophoresis*). Esta mede a velocidade das partículas sob um campo elétrico, através de um método patenteado, denominado por M3-PALS (*Phase analysis Light Scattering*), que permite o cálculo da mobilidade eletroforética, que corresponde a um determinado valor de potencial zeta [45].

3.5. Espectrofluorimetria

Para traçar os perfis de libertação e calcular as EE (%) das formulações de lipossomas testadas, foi utilizado um espectrómetro com módulo de Fluorescência. Este equipamento é formado 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 da ScanSci, numa configuração a 90°, e um controlador de temperatura da Quantum Northwest [46].

A técnica de Espectroscopia de Fluorescência, ou simplesmente Espectrofluorimetria, permite obter espectros de absorção que representam a intensidade da luz emitida em função dos comprimentos de onda medidos, usando para tal a Lei de Beer-Lambert [47].

A fonte de luz passa pela primeira fibra ótica, incide na amostra, e a luz emitida pela mesma é levada pela segunda fibra ótica até ao espectrofluorímetro, onde é lida. As informações recolhidas pelo espectrofluorímetro dão origem aos espectros de absorção, processadas em computador pelo *software SpectraScan*. Selecionando o comprimento

de onda de excitação da substância de interesse o *software* fornece a intensidade de luz emitida em função do tempo [47].

3.6. TEM

Para conhecer a morfologia dos lipossomas desenvolvidos utilizou-se a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), através de um equipamento JEOL JEM 1400, com uma câmara da Gatan SC1000 Orius™ CCD.

As amostras são colocadas em grelhas com um revestimento de carbono para que a luz seja capaz de as trespassar.

Esta técnica usa como fonte de luz um feixe de elétrons que apresenta um comprimento de onda muito inferior ao da luz normal, o que permite uma resolução também muito superior [48, 49].

O processo dá-se no interior de uma coluna de vácuo onde um feixe de elétrons muito fino incide na amostra, passando em seguida por um conjunto de lentes eletromagnéticas antes de atingir um ecrã fluorescente que se encontra na base da mesma coluna. Nesse ecrã surgem as imagens das substâncias (células, partículas, lipossomas) analisadas. Normalmente, para um maior contraste nas imagens finais, as amostras são colocadas em contacto com substâncias radioativas antes das análises em si. O equipamento contém ainda uma câmara que permite tirar fotografias microscópicas a partir das quais, posteriormente, é possível fazer medições mais exatas das partículas [48, 49].

3.7. Testes de citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade dos CLP foi utilizado um método colorimétrico com o corante MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio), que permite medir quantitativamente a viabilidade celular [49, 50]. Este corante é usado com o PMS (fenazina metosulfato), e é reduzido apenas pelas células vivas através da atividade enzimática das desidrogenases mitocondriais, associadas ao NADPH e ao NADH, dando origem a cristais de formazano [50, 51].

Os cristais coloridos, de cor púrpura, que se formam no interior das células podem ser quantificados a partir de espectrofotometria, visto que a intensidade da coloração é proporcional à quantidade de cristais formados [50, 51].

Este método é vantajoso em relação a outros do género porque os cristais formados são solúveis em água, não sendo assim necessária a utilização de solventes orgânicos [50, 51].

4. Métodos

4.1. Síntese do cholesterol-2-bromoisobutirato (CHO-Br)

A síntese do iniciador, CHO-Br, consistiu na esterificação do CHO com Brometo de 2-bromoisobutirilo (2-BiB), com base em informação da literatura [11].

Resumidamente, num balão de fundo redondo, de 500 mL, com três tubuladuras, condensador, agitador magnético, entrada e saída de azoto e uma ampola de adição, foram introduzidos 50 mL de CH_2Cl_2 destilado, com 4,6 g de DMAP recristalizado em tolueno, e 3,5 mL de trietilamina (TEA), previamente destilada a vácuo, num banho a 0 °C. De seguida, foram adicionados gota-a-gota mais 50 mL de CH_2Cl_2 destilado e 7,7 mL de 2-BiB, gota-a-gota, tornando amarela a solução resultante. Por fim, foram inseridos, também gota-a-gota, e o mais lentamente possível, 250 mL de CH_2Cl_2 seco com 4,8 g de CHO dissolvido. A reação deu-se em atmosfera inerte, a 27 °C por 20 horas, tendo sido obtido um líquido translucido acastanhado.

Todos os passos descritos anteriormente necessitaram de uma entrada e saída contínua de azoto de forma a proporcionar uma atmosfera inerte, essencial, no interior do balão. Quando a ampola ficou vazia, foi devidamente removida, o balão foi isolado e a entrada e saída de azoto dispensadas. A reação deu-se a 26 °C por 20 horas. A solução conseguida tratou-se de um líquido translucido acastanhado.

De forma a remover os resíduos de TEA e 2-BiB, procedeu-se à lavagem da mistura reacional resultante com uma solução saturada de NaCl. Em seguida, num evaporador rotativo, cerca de metade do solvente presente foi evaporado. Depois disto, o iniciador foi precipitado em etanol, filtrado e colocado a secar, numa estufa a 40 °C, com vácuo. Por último, o produto obtido foi recristalizado em etanol/acetato de etilo (0,5:9,5), e foi novamente filtrado e seco, nas mesmas condições.

Por último, foi ainda feita uma recristalização em etanol/acetato de etilo (0,5:9,5), e uma nova filtração e secagem, nas mesmas condições. O aspeto do iniciador após secagem pode ser descrito como um pó branco de baixa densidade. Para verificar que a

síntese correu da forma esperada, o iniciador foi ainda analisado por H-RMN e FTIR-ATR (Apêndice A).

4.2. Síntese do tris[2-(dimethylamino)ethyl]amine (Me₆TREN)

A síntese do Me₆TREN foi feita com base em informação da literatura [17].

A uma mistura equimolar, de TREN e água destilada, de 20 mL, num banho a 0 °C, foi adicionada gota-a-gota uma solução formada por 50 mL de formaldeído e 50 mL de ácido fórmico a um balão de 250 mL, com agitação. O passo seguinte consistiu em manter a solução resultante em refluxo, por 12 horas, a uma temperatura de 95 °C e atmosfera inerte, do qual se obteve um líquido acastanhado. De forma a remover as frações mais voláteis da mistura, esta passou por uma destilação convencional a 70 °C por, aproximadamente, 1 hora. Em seguida, para que a solução conseguida atingisse um pH básico, superior a 10, adicionou-se uma quantidade suficiente, de uma solução saturada, de NaOH.

Com o intuito de extrair todos os contaminantes, não voláteis, do composto, este foi lavado, por duas vezes, com cloreto de metilo. A seguir acrescentou-se sulfato de sódio e depois o Me₆TREN foi colocado num evaporador rotativo, a 40 °C, para aumentar a sua pureza. Este foi ainda, por fim, caracterizado por H-RMN (Apêndice B).

4.3. Síntese do PtBA

A síntese do PtBA foi realizada com base em informação baseada na literatura [52] apenas], mas com alteração do iniciador.

Para a polimerização radical viva do PtBA, um fio de cobre foi ativado numa solução de HCl a 30 % (v/v) em MeOH, envolto num agitador magnético e incorporado num reator do tipo Schlenk, onde de seguida foi introduzida a proporção respetiva de CHO-Br para a reação em causa e ainda 5,9 mL de tBA, recentemente purificado em colunas de sílica-alumina. Depois de congelar a mistura contida no reator com recurso a azoto líquido, adicionou-se uma solução de CuBr₂ e Me₆TREN em 3 mL de DMSO seco, borbulhado em azoto, em diferentes proporções em relação à quantidade de iniciador. O conteúdo do reator foi novamente congelado e posteriormente preenchido com azoto antes e depois da sua desgaseificação. Posteriormente foi colocado num

banho a 30 °C, pelo tempo necessário até a viscosidade da mistura reacional aumentar consideravelmente, dificultando o movimento do agitador magnético.

No final da polimerização o polímero resultante, sólido, foi dissolvido em THF, purificado em colunas de sílica-alumina, precipitado numa solução de água/metanol (1:5), filtrado e seco sob vácuo, a uma temperatura de 30 °C durante, aproximadamente, 2 dias. O PtBA foi obtido ao fim desta etapa tratou-se sob a forma de um sólido cristalino quebradiço, e analisado por GPC e FTIR-ATR (Apêndice C).

4.4. Síntese do PAA (Hidrólise do PtBA)

A síntese do PAA, através da hidrólise do PtBA, foi feita com base em informação da literatura [53].

Num balão de fundo redondo com duas tubuladuras, equipado com uma entrada e saída contínua de azoto, condensador, agitador magnético e uma ampola de adição, foi colocada a totalidade do colocado o PtBA sintetizado anteriormente, juntamente com 10 mL de CH₂Cl₂, num banho a 0 °C. A partir da ampola de adição, 10 mL de TFA, foram adicionados em excesso, gota-a-gota, o mais lentamente possível, ao balão. Depois disto a ampola foi removida e, após verificar que o balão já se encontrava em atmosfera inerte, também a entrada e saída de azoto. A hidrólise ocorreu a 30 °C, com agitação, por 48 horas.

O polímero contido na mistura reacional foi em seguida precipitado em hexano, filtrado e vácuo, lavado com éter dietílico e colocado a secar, com vácuo, numa estufa a 30 °C por, sensivelmente, 36 horas. O produto obtido pode ser caracterizado como um pó muito fino, ligeiramente acastanhado, avaliado por e FTIR e H-RMN (Apêndice D).

4.5. Preparação dos lipossomas e CPL

4.5.1. Com esferas de vidro (LIP/H)

Num balão de fundo redondo foram introduzidos 100 µL de uma solução de LC em CLF (4 mg/mL). Em seguida o CLF foi evaporado a partir de um evaporador rotativo, o que permitiu criar um fino filme lipídico no fundo do balão. Depois de garantir apenas a presença de fosfolípidos no interior do tubo e que todo o CLF foi evaporado, foram adicionados ao mesmo 200 µL de tampão e 5 esferas de vidro

(D~2mm). Por fim, a formulação foi vigorosamente agitada e colocada numa incubadora a 37 °C por 24 horas.

4.5.2. Sem esferas de vidro (LIP/N)

Procedimento em tudo semelhante ao de LIP/H, à exceção da introdução das esferas de vidro no tudo de ensaio.

4.5.3. Com estearilamina (LIP/ST)

O procedimento foi semelhante aos anteriores com a exceção da adição da solução de ST em CLF (4 mg/mL) em diferentes proporções aquando da adição da solução de LC em CLF (4 mg/mL).

4.5.4. Incorporação do CHO-PAA aquando da formação das vesículas (CPL/A)

Num recipiente de vidro foram inseridos 100 µL LC em CLF (4 mg/mL) e ST em CLF (4 mg/mL). Todo o CLF contido no tubo foi posteriormente removido através de um evaporador rotativo. Ao filme de lípidos e ST resultante foi adicionado PAA em tampão (2 mg/mL) em diferentes proporções, tampão necessário para perfazer o volume essencial à hidratação e 5 esferas de vidro. Por último, a formulação foi vigorosamente agitada e incubada a 37 °C por 24 horas.

4.5.5. Incorporação do CHO-PAA depois da formação dos lipossomas (CPL/D)

Num balão de fundo redondo foram introduzidos 100 µL LC em CLF (4 mg/mL) e ST em CLF (4 mg/mL). O CLF foi em seguida completamente evaporado com recurso a um evaporador rotativo. Ao filme lipídico formado foi adicionado tampão 200 µL de tampão e 5 esferas de vidro. Depois de vigorosamente agitada, a suspensão foi incubação durante 24 horas. Findo este período, a suspensão foi removida da incubadora e à mesma, foi adicionada uma solução de CHO-PAA em tampão (2 mg/mL) em diferentes proporções. Para finalizar, depois de vigorosamente agitada, a formulação foi deixada na incubadora por mais 24 horas.

4.6. Encapsulação dos CPLs

A molécula fluorescente escolhida para os estudos de encapsulação e libertação dos lipossomas a molécula foi a calceína ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$).

À saída da incubadora os CPLs foram lavados com tampão por centrifugação, 3 ciclos de 20 minutos a 8500 rpm, de forma a remover toda a calceína não encapsulada. No final da lavagem estes foram novamente suspensos com 200 μ L de tampão.

Após leitura da fluorescência das amostras ao longo do tempo, os lipossomas foram ainda colapsados através da adição de 20 μ L de Triton X-100.

4.7. Reticulação dos CPLs (CPL/A/R e CPL/D/R)

A reticulação dos CPLs foi realizada por adição de CME-CDI, ativador dos grupos carboxilo, e EDA (Figura 20) em diferentes proporções, consoante a quantidade e o peso molecular do polímero empregue nas formulações, depois de devidamente lavados com tampão, 2 ciclos a 8500 rpm durante 15 minutos. Em seguida os CPLs foram deixados numa incubadora, a 37 °C, por 24 horas.

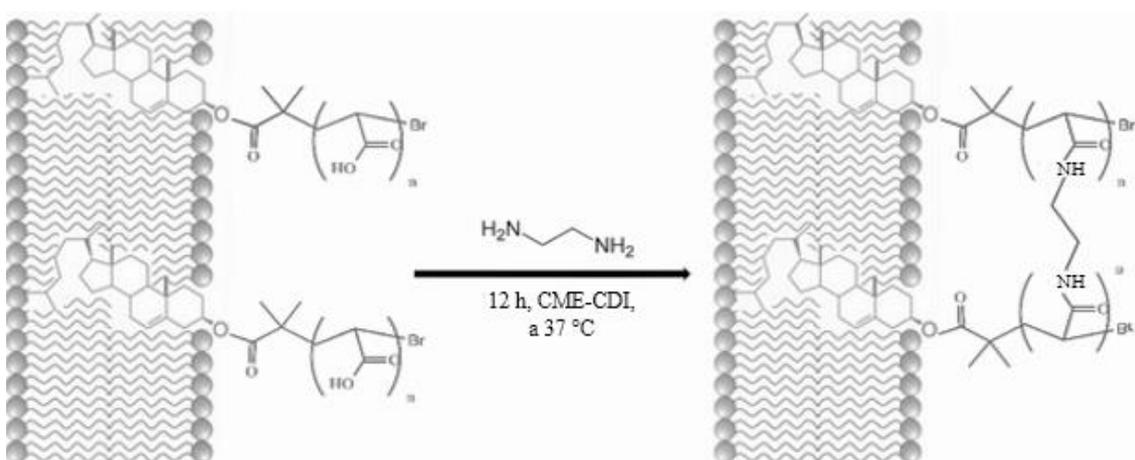


Figura 20 - Representação esquemática do processo de reticulação dos CPL desenvolvidos, baseada noutro esquema da literatura [14].

4.8. Encapsulação dos CPLs reticulados

Como referido, foram testadas duas formas de encapsulação. Na primeira o CPL foi formado já com a calceína na solução hidratante, ou seja, a encapsulação da calceína ocorre antes da reticulação (CPL/AR), e, na segunda, foi formado vazio, reticulado e só depois encapsulado, exposto à solução concentrada de calceína encapsulada a calceína (CPL/DR)).

4.9. Determinação da Concentração de Lípidos

Para determinar a concentração de lípidos nos lipossomas e CPLs foi utilizado um *kit* de fosfolípidos CHO-POD, *Enzymatic colorimetric* da Spinreac. O procedimento utilizado foi o fornecido no próprio *kit* (Apêndice E).

4.10. Preparação dos CPL reticulados para estudo de conservação

Os CPLs reticulados para o estudo de conservação foram preparados conforme os procedimentos descritos, vazios e encapsulados, com e sem conservante. A adição do conservante, 19 mg de a trealose (TR.), foi o último passo antes do armazenamento. Estes foram armazenados de três diferentes formas: no frigorífico (F) a 8 °C, no congelador (C) a -18 °C e em forma de pó à temperatura ambiente depois de liofilizados (L).

4.11. Testes de citotoxicidade dos CPLs finais

Estes testes foram elaborados em colaboração com colegas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Inicialmente foram preparadas, em condições estéreis, diluições em série (estéreis) das amostras a testar em meio de crescimento completo (RPMI com FBS e PS). Posteriormente foram recolhidas células THP-1 na fase exponencial de crescimento a partir de uma cultura de células com quatro dias de idade, com concentração inferior a 1×10^6 células/mL). Contaram-se as células reunidas num hemacitómetro depois de centrifugadas, a 1000 rpm durante 15 minutos, e de novo suspensas em 20 mL de meio RPMI completo.

Em seguida, uma suspensão celular de THP-1 a uma concentração de 3×10^5 células/mL foi preparada em meio RPMI completo contendo 50 ng/mL de PMA para promover a diferenciação das células. Foram considerados 15 mL de suspensão celular para cada placa de 96 poços (200 µL/poço nos 60 poços internos). Foram inseridos 200 µL desta suspensão em cada um dos 60 poços internos de uma placa de 96 poços. Os poços externos foram preenchidos com 200 µL de PBS estéril para evitar evaporação.

O passo seguinte consistiu na incubação das placas a 37 °C, com 5 % CO₂ durante 24 horas para permitir a diferenciação das THP-1. No final da incubação, o meio com o

PMA foi removido e os poços foram lavados com meio RPMI incompleto (sem FBS e PS).

Aos poços contendo apenas as células aderentes no fundo foram adicionados 200 µL/poço das amostras a testar começando pela diluição mais baixa. As placas foram incubadas novamente por 24 horas a 37 °C com 5% CO₂.

Após o tempo de incubação, em ambiente estéril, foi preparada uma quantidade de solução de MTS+PMS necessária considerando um volume de 20 µL por poço (por cada placa de 96 poços combinou-se 1.5 mL da solução de MTS com 75 µL da solução de PMS). Foram ainda introduzidos 20 µL da solução de MTS preparada em cada poço com a ajuda de uma pipeta multicanal, sem luz, e as placas voltaram para a câmara a 37 °C durante 2 h. Por fim, retiraram-se as placas da incubadora, deixou-se que atingissem a temperatura ambiente e foram lidas a 490 nm e a 630 nm no espectrofotômetro.

Capítulo III – Resultados e Discussão

Considerações:

- Os polímeros selecionados para o desenvolvimento dos CPLs foram alvo de pelo menos uma réplica;
- As médias e respetivos desvios padrão do diâmetro, PDI e potencial zeta dos lipossomas e CPLs apresentados neste capítulo são provenientes de conjunto de amostras de n=6.

1. CHO-PtBA e CHO-PAA

O trabalho de laboratório associado à realização deste trabalho começou pela síntese do iniciador CHO-Br, através da esterificação do CHO com 2-BiB, para a síntese do CHO-PtBA, a partir do procedimento descrito no capítulo anterior. As sínteses de CHO-PtBA testadas, com diferentes proporções, foram desenvolvidas também conforme o processo mencionado (Tabela 5).

Tabela 5 - Peso molecular e dispersividade (\bar{D}) dos polímeros de CHO-PtBA sintetizados, com diferentes proporções, neste trabalho.

Reação	T (°C)	t (min)	DMSO/tBA (v/v)	[tBA]/[CHO-Br]/[Cu(0)] /[Cu(II)Br ₂]/[Me6TREN]	M _{n, GPC}	\bar{D}
1	30	30	½	80/1/1/0,6/1,2	7 398	1,301
2	25	35	½	80/1/1/0,6/1,2	8 300	1,482
3	30	35	½	80/1/1/0,6/1,2	8 344	1,546
4	30	35	½	80/1/1/0,6/1,2	8 460	1,320
5	30	40	½	80/1/1/0,6/1,2	8 627	1,327
6	30	55	½	80/1/1/0,6/1,2	10 818	1,754
7	30	45	½	80/1/1/1,2	4 607	1,060
8	30	70	½	80/1/1/1,2	5 140	1,257
9	30	80	½	80/1/1/1,2	8 501	1,344
10	30	90	½	80/1/1/1,2	9 200	1,572
11	30	25	½	131/1/0.6/1/1.2	3 161	1,036
12	30	30	½	131/1/0.6/1/1.2	3 852	1,088
13	30	60	½	131/1/0.6/1/1.2	4 789	1,087
14	30	40	½	131/1/0.6/1/1.2	5 352	1,049
15	30	40	½	131/1/0.6/1/1.2	5 357	1,054
16	30	70	½	131/1/0.6/1/1.2	6 430	1,100
17	30	60	½	131/1/0.6/1/1.2	9 887	1,103
18	30	80	½	131/1/0.6/1/1.2	12 714	1,126
19	30	80	½	131/1/0.6/1/1.2	12 191	1,119
20	30	90	½	131/1/0.6/1/1.2	13 741	1,260
21	30	90	½	131/1/0.6/1/1.2	13 948	1,255
22	30	120	½	131/1/0.6/1/1.2	15 844	1,230

A partir das características dos polímeros sintetizados é possível verificar que o tempo de reação foi um dos parâmetros mais críticos das mesmas, pois à medida que este aumenta o peso molecular e a dispersividade também aumentam. Assim sendo, e tendo em conta que para os ensaios com os lipossomas era pretendido usar polímeros com baixos pesos moleculares e uma dispersividade até 1,3 no máximo, foram testadas várias proporções de iniciador/catalisadores.

Os resultados (Tabela 5) mostram que, com as duas primeiras proporções de reagentes (reações 1 a 10), mesmo com pesos moleculares mais baixos, as dispersividades dos polímeros são demasiado elevadas para a aplicação pretendida.

Para contornar a situação, e obter pesos moleculares mais altos com dispersividades mais próximas de 1, foi necessário alterar novamente as proporções entre reagentes de modo a diminuir a quantidade de iniciador presente na reação, porque com menos iniciador existem consequentemente menos radicais e por sua vez menos cadeias em crescimento mas, desde modo essas cadeias vão ser maiores e mais semelhantes entre si. Portanto, tendo em consideração a estratégia apresentada, com a terceira combinação (reações 11 a 22) todos os polímeros obtiveram uma dispersividade abaixo dos 1.30, e em muitos casos abaixo dos 1.3, como procurado.

Desse último conjunto foram escolhidos dois polímeros CHO-PtBA para incorporar nos CPL, um com um peso molecular mais baixo, proveniente da reação 14, e outro com um mais alto, da reação 18, de modo a perceber a importância deste parâmetro nas propriedades finais dos CPL.

Os polímeros de CHO-PtBA selecionados foram assim hidrolisados a partir do método apresentado anteriormente. Os CHO-PAA resultantes exibiram um peso molecular de, aproximadamente, 3000 e 7000, respetivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Pesos moleculares dos polímeros utilizados nas formulações dos CPL.

Reação	$M_{n,GPC}$ do CHO-PtBA (Da)	$M_{n,Teórico}$ do CHO-PAA (Da)	$M_{n,RMN}$ do CHO-PAA (Da)	\bar{D}
14	5352	3219	3065	1,049
18	12714	7608	7191	1,126

2. LIP/H e LIP/N

Tendo em vista a otimização das condições para a formação dos CPLs foram testados lipossomas com (LIP/H) e sem (LIP/N) esferas de vidro, durante o período de incubação. Analisando atentamente os resultados obtidos (Tabela 7) constatou-se que o diâmetro, PDI e potencial zeta dos lipossomas variam razoavelmente consoante a presença ou não das esferas de vidro durante a sua preparação.

Tabela 7 - Diâmetros, PDI e potencial zeta dos lipossomas formados com e sem esferas de vidro.

Ensaio	D (nm)	PDI	-zP (mV)
LIP/H	179,27 ± 4,97	0,346 ± 0,052	26,10 ± 1,47
LIP/N	319,07 ± 12,76	0,509 ± 0,109	29,33 ± 1,37

Devido às forças de cisalhamento e maior turbulência que provocam durante a formação dos lipossomas na incubação, a utilização de esferas de vidro promove melhorias significativas quer em termos de diâmetros, mais reduzidos, como em termos de PDI, mais baixa, permitindo alcançar distribuições de tamanhos mais uniformes, em comparação com os lipossomas formados sem as mesmas. Com isto, todos os ensaios subsequentes aqui apresentados contaram com a presença de esferas de vidro.

3. LIP/ST

Como supramencionado, para as formulações de CPLs com CHO-PAA é necessária a presença de ST. Assim, tendo em conta os requisitos pré-estabelecidos, foram adicionadas às formulações percentagens de ST de 5, 10 e 20%, de modo a compreender qual a mais adequada (Tabela 8).

Tabela 8 - Diâmetros, polidispersividade e potencial zeta e respetivos desvios padrão obtidos para os lipossomas obtidos com diferentes percentagens de ST.

Ensaio	D (nm)	PDI	-zP (mV)
LIP/ST 5%	148,33 ± 3,10	0,369 ± 0,047	25,03 ± 2,15
LIP/ST 10%	552,97 ± 6,93	0,635 ± 0,299	20,17 ± 0,47
LIP/ST 20%	8474,67 ± 1684,27	0,559 ± 0,314	30,70 ± 2,65

Estes resultados mostram claramente que os lipossomas com 10 e 20% de ST apresentam um diâmetro muito acima (> 400 nm) da gama-alvo, e valores de PDI (> 0,4) longe do considerado aceitável.

Desta forma entendeu-se que, devido a forças de atração/repulsão entre espécies que levam à formação de aglomerados indesejáveis em vez de vesículas unilamelares, se existir muita ST na suspensão a formação de lipossomas estáveis é posta em causa. Inclusivamente, os lipossomas com 20% de ST que, possuindo mais ST disponível, teoricamente deveriam apresentar um potencial zeta mais positivo, visto possuírem mais ST disponível, mostram um potencial ainda muito negativo (Tabela 8).

Por outro lado, com 5%, como existe uma quantidade menor de ST as vesículas formam-se espontaneamente sem perturbações, os lipossomas obtidos apresentam diâmetros abaixo dos 150 nm, ainda mais pequenos do que sem ST, e uma boa polidispersividade. Deste modo, em todos os ensaios subsequentes usou-se uma percentagem de 5% de ST.

4. CPL

4.1. Diâmetros, PDI e potencial zeta

Depois do estudo das condições mais favoráveis à formação dos lipossomas passou-se à formulação de CPLs. Os CHO-PAA usados nessas preparações foram os conseguidos a partir das reações 14 e 18 de CHO-PtBA (Tabela 6), como supramencionado. Os testes desenvolvidos contaram então com as esferas de vidro, 5% de ST, diferentes percentagens de polímero (5, 10 e 20%), e momentos distintos de introdução do mesmo: antes (CPL/A), ou depois (CPL/D), da formação do LIP (Tabela 9).

Tabela 9 - Diâmetro, PDI e potencial zeta dos lipossomas formados com ST, CHO-PAA, em diferentes proporções, e com esferas de vidro.

Ensaio		D (nm)	PDI	-zP (mV)	
5%	A	PAA14	227,50 ± 37,59	0,413 ± 0,010	39,9 ± 2,86
		PAA18	226,87 ± 14,28	0,384 ± 0,044	37,7 ± 2,05
	D	PAA14	290,08 ± 29,64	0,452 ± 0,073	36,7 ± 4,49
		PAA18	224,98 ± 29,84	0,354 ± 0,056	35,7 ± 0,95
10%	A	PAA14	221,63 ± 7,67	0,419 ± 0,059	38,2 ± 2,22
		PAA18	193,08 ± 5,89	0,314 ± 0,050	35,4 ± 1,95
	D	PAA14	266,87 ± 36,69	0,555 ± 0,114	37,6 ± 3,30
		PAA18	214,97 ± 33,99	0,343 ± 0,074	33,5 ± 1,71
20%	A	PAA14	170,98 ± 24,00	0,393 ± 0,015	34,1 ± 1,07
		PAA18	155,20 ± 27,28	0,471 ± 0,085	44,1 ± 3,41

D	PAA14	258,55 ± 51,24	0,525 ± 0,111	37,8 ± 1,24
	PAA18	184,53 ± 8,45	0,457 ± 0,033	47,2 ± 2,14

Os resultados obtidos (Tabela 9) mostram que diâmetro médio dos lipossomas aumenta quando lhes é incorporado polímero e a carga de superfície ficou mais negativa devido ao caráter também negativo do PAA, como previsto.

Todavia, na gama considerada, a percentagem de CHO-PAA usada tem pouca influência nas características medidas, não sendo visíveis desigualdades suficientemente relevantes entre os CPLs obtidos para selecionar ou excluir algum conjunto dos mesmos, tendo apenas por base os seus diâmetro, PDI e potencial zeta. Assim sendo, na fase seguinte, foi analisado o mesmo conjunto de CPLs.

4.2. Perfis de libertação e EE (%)

A partir dos CPL/A e CPL/D encapsulados com calceína e das suas leituras no espectrofluorímetro com comprimento de onda de emissão de 515 nm, ao longo do tempo e após o colapsar dos mesmos por adição de Triton X-100, foram determinadas a percentagens de libertação (Equação 1) que permitiram a construção dos gráficos com os perfis de libertação correspondentes a cada um dos ensaios (Figura 21).

$$\%libertação = \frac{Fluorescência - Fluorescência_{inicial}}{Fluorescência_{final} - Fluorescência_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

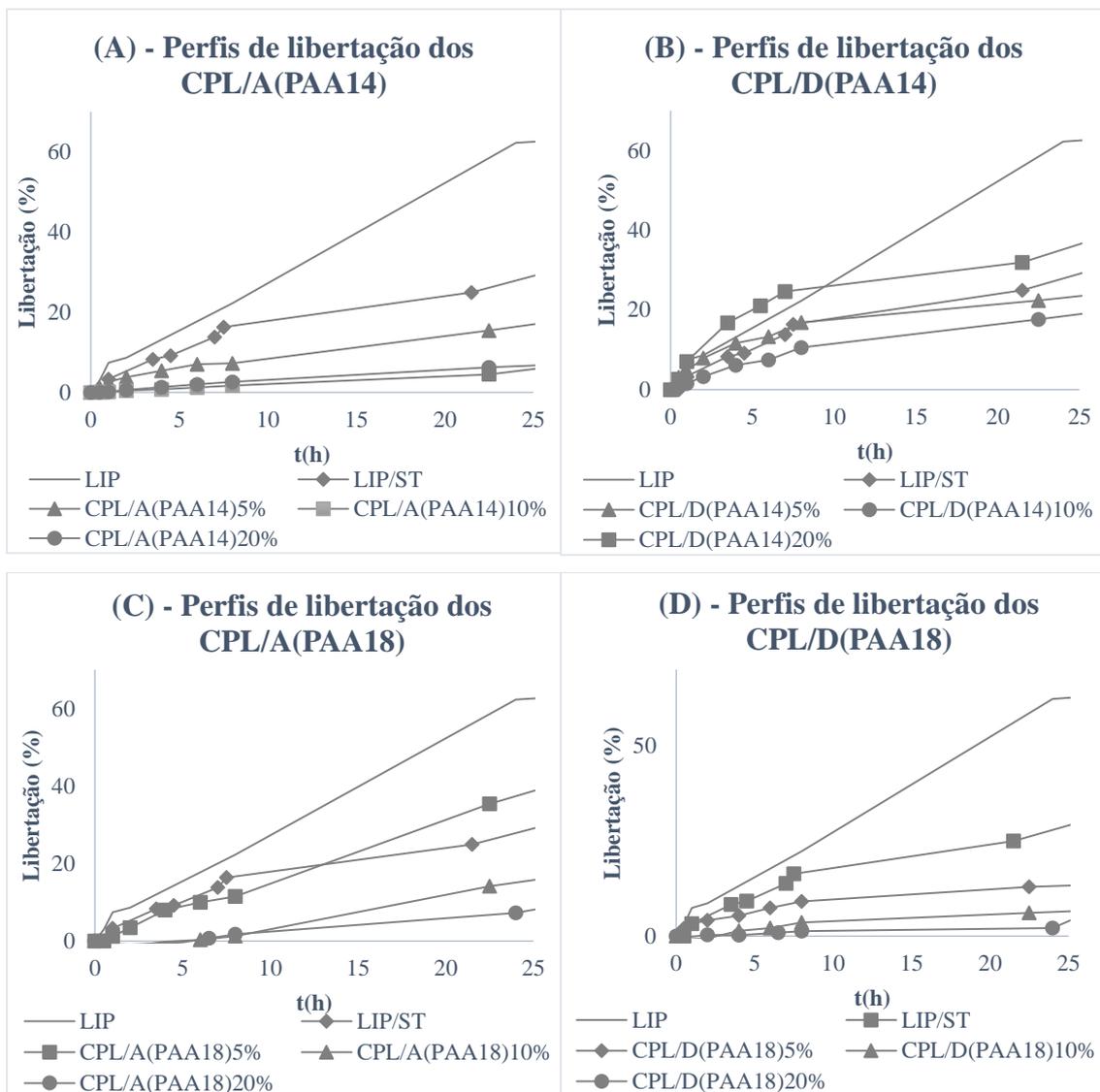


Figura 21 - Perfis de liberação de calceína dos CPL: (A) - CPL/A(PAA14), (B) - CPL/D(PAA14), (C) - CPL/A(PAA18) e (D) - CPL/D(PAA18);

Os perfis de liberação revelaram que os CPLs mais estáveis são aqueles que possuem 10 e 20% de polímero na sua formulação.

Contudo, foi necessário ter também em conta as EE (%) para perceber o verdadeiro potencial dos CPLs como SLC. Para tal, em seguida, encontrou-se a concentração molar da solução encapsulada final de cada ensaio com base na elaboração de uma reta de calibração (Figura 22).

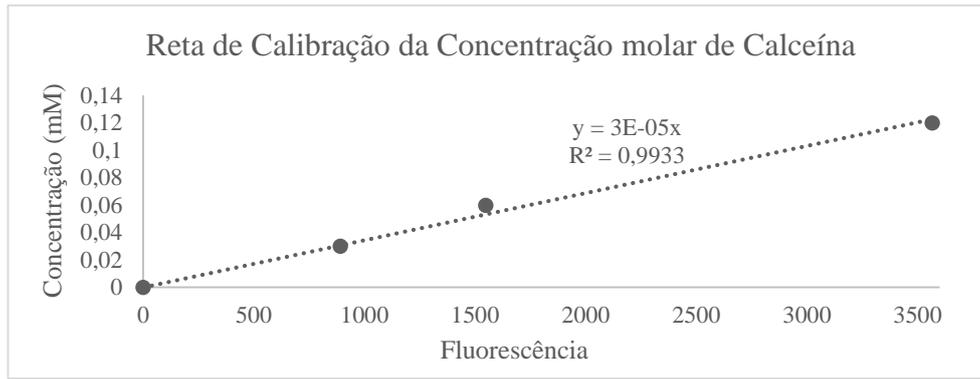


Figura 22 - Reta de Calibração da concentração de calceína em função da fluorescência.

A EE (%) de cada ensaio (i) foi expressa em quantidade molar de encapsulante por mole de lípido (Equação 2). A concentração de lípidos, como mencionado anteriormente, foi obtida através do *kit* da SpinReact.

$$EE(\%) = \frac{[Calceína Encapsulada]_i}{[Lípidos]_i} \times 100 \quad (2)$$

Os resultados obtidos (Tabela 10) revelam que os CPLs com melhores EE (%) são aqueles que possuem 10 % de polímero. Deste modo, e tendo também em conta a informação retirada dos perfis de libertação, foram esses os selecionados para as etapas seguintes.

Tabela 10 - Concentração de calceína encapsulada, lípidos e percentagens de eficiência encapsulação dos ensaios elaborados.

Ensaio	Fluorescência (F _{final} -F _{inicial})	[Calceína Encapsulada] (mM)	[Lípidos] (mM)	EE (%)
LIP	4130	0,124	0,801	15,46
LIP/ST	3897	0,117	1,180	9,91
5%	PAA14 A	11741	0,352	42,55
	PAA14 D	9487	0,285	34,38
	PAA18 A	9450	0,284	31,58
	PAA18 D	9472	0,284	29,57
10%	PAA14 A	15234	0,457	56,57
	PAA14 D	13832	0,415	49,53
	PAA18 A	13720	0,412	47,43
	PAA18 D	14572	0,437	46,14
20%	PAA14 A	12821	0,385	48,40
	PAA14 D	13102	0,393	45,82
	PAA18 A	10152	0,305	33,68
	PAA18 D	9547	0,286	28,81

5. CPL reticulados

5.1. Diâmetro, PDI e potencial zeta

As características dos CPLs com 5% de ST e 10% de CHO-PAA reticulados mostrarem ser viáveis e melhores do que os não reticulados (Tabela 11).

Tabela 11 - Diâmetros, PDI e potencial zeta médios dos CPL reticulados com 5 % de ST e 10 % de CHO-PAA.

Ensaio		D (nm)	PDI	-zP (mV)
A	PAA14	161,08 ± 6,54	0,334 ± 0,036	34,18 ± 6,56
	PAA18	141,75 ± 3,77	0,314 ± 0,043	34,08 ± 5,96
D	PAA14	155,33 ± 8,98	0,348 ± 0,070	30,12 ± 4,87
	PAA18	149,28 ± 13,09	0,280 ± 0,012	33,42 ± 3,06

Apresentam diâmetros e PDI mais baixos devido à contração das cadeias de CHO-PAA decorrente da reticulação, e um potencial zeta menos negativo, o que faz todo o sentido porque as diaminas, responsáveis pela reticulação, são moléculas de caráter positivo que se mantêm à superfície dos CPL tornando-os desse modo também mais positivos.

5.2. Perfis de liberação e EE (%)

Os perfis de liberação dos CPLs reticulados (Figura 23) mostraram que estes são estáveis porque ao fim de 25 horas exibem uma percentagem de liberação de calceína abaixo dos 15 %, menor do que os seus homónimos não reticulados, cumprindo assim o seu propósito.

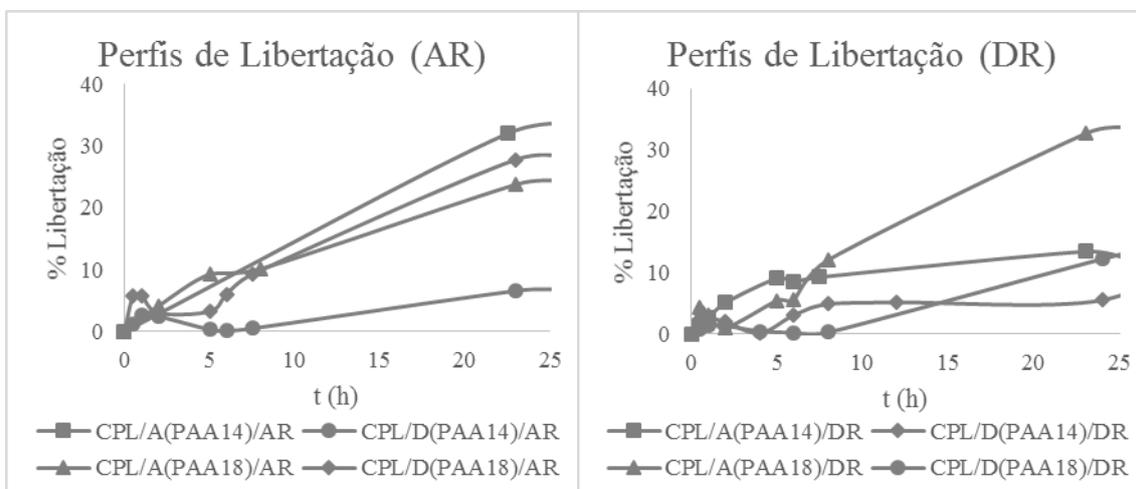


Figura 23 - Perfis de Liberação dos CPL reticulados com 5% de ST e 10% de PAA, antes e depois da encapsulação de calceína.

As EE (%) (tabela 12) dos CPL reticulados mostram sem dúvidas que os CPL encapsulados depois da reticulação (DR) com a introdução do polímero depois da formação dos lipossomas (D) são os mais estáveis. Deste modo, foram esses os CPL selecionados.

Porém, para a seleção de mais parâmetros, as EE (%) também foram tidas em consideração (Tabela 12).

Tabela 12 - Percentagens de eficiência de encapsulação dos CPL reticulados.

Ensaio	Fluorescência (F _{final} -F _{inicial})	[Calceína Encapsulada] (mM)	[Lípidos] (mM)	EE (%)	
DR	A(PAA14)	3154	0,095	0,0186	15,30
	A(PAA18)	1349	0,040	0,0109	11,17
	D(PAA14)	1763	0,053	0,0174	18,45
	D(PAA18)	1175	0,035	0,0072	24,73
AR	A(PAA14)	3257	0,098	0,0186	8,55
	A(PAA18)	1973	0,059	0,0109	9,73
	D(PAA14)	2488	0,075	0,0174	12,90
	D(PAA18)	1093	0,033	0,0072	13,70

As EE (%) indicam que os melhores CPLs são os que compreendem a introdução de CHO-PAA depois da formação dos lipossomas (D) e que são reticulados depois da reticulação (DR) das cadeias poliméricas.

Os resultados fazem todo o sentido porque, tendo em conta que o excesso de calceína é removido dos CPLs antes da reticulação (presença da solução concentrada de calceína perturba a reticulação devido ao seu carácter muito negativo) e durante a mesma são incubados, se a encapsulação é feita previamente então a libertação começa antes do previsto e conseqüente, no fim da reticulação os CPLs já libertaram grande parte do que encapsularam.

Por outro lado, os CPL/D são melhores do que os CPL/A porque como não contêm polímero no seu espaço intersticial, apresentam um maior volume disponível para a encapsulação de calceína, logo a sua EE (%) é muito superior.

Deste modo, os CPL/D e os CPL/D/DR foram os CPLs apurados para os estudos que se seguiram.

6. CPL finais

Resumindo (Tabela 13), as características dos CPLs selecionados revelam que o diâmetro dos mesmos aumenta com a incorporação do CHO-PAA e decresce quando o polímero é reticulado porque sofrem contração. A PDI não sofreu grandes alterações com a introdução do polímero nem com a sua reticulação. Pelo contrário, no potencial zeta existem diferenças significativas. Quando se adicionou o polímero aos LIP/ST a carga de superfície ficou mais negativa devido ao caráter também negativo do PAA, mas quando estes foram reticulados tornaram-se menos negativos mas ainda assim estáveis, como pretendido.

Tabela 13 - Diâmetro, PDI e potencial zeta médios do conjunto final de CPL.

Ensaio	D (nm)	PDI	-zP (mV)
LIPH	179,27 ± 4,97	0,346 ± 0,052	26,10 ± 1,47
LIP/ST	148,33 ± 3,10	0,369 ± 0,047	25,03 ± 2,15
CPL/D(PAA14)	266,87 ± 36,69	0,555 ± 0,114	37,55 ± 3,30
CPL/D(PAA18)	214,97 ± 33,99	0,343 ± 0,074	35,70 ± 0,95
CPL/D(PAA14)/DR	155,33 ± 8,98	0,348 ± 0,070	30,12 ± 4,87
CPL/D(PAA18)/DR	149,28 ± 13,09	0,280 ± 0,012	33,42 ± 3,06

Em relação aos perfis de libertação (Figura 24) verifica-se que os CPLs reticulados são mais estáveis do que os CPLs, que por sua vez são mais estáveis do que os LIP.

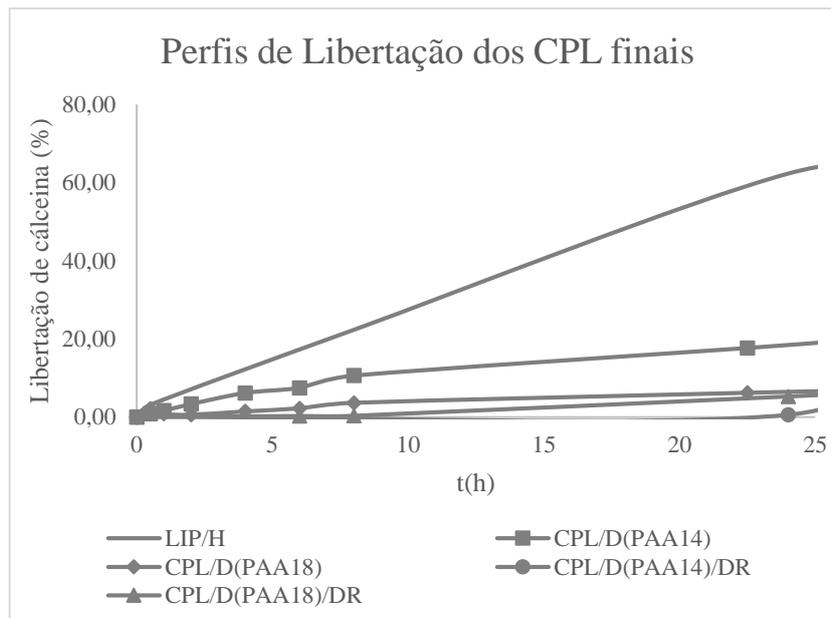


Figura 24 - Perfis de libertação do conjunto final de CPL.

7. Morfologia dos CPL finais

A partir das imagens obtidas por TEM (Figura 25) do conjunto de CPLs finais mostram diferentes morfologias consoante o tipo de modificações de superfície aplicada.

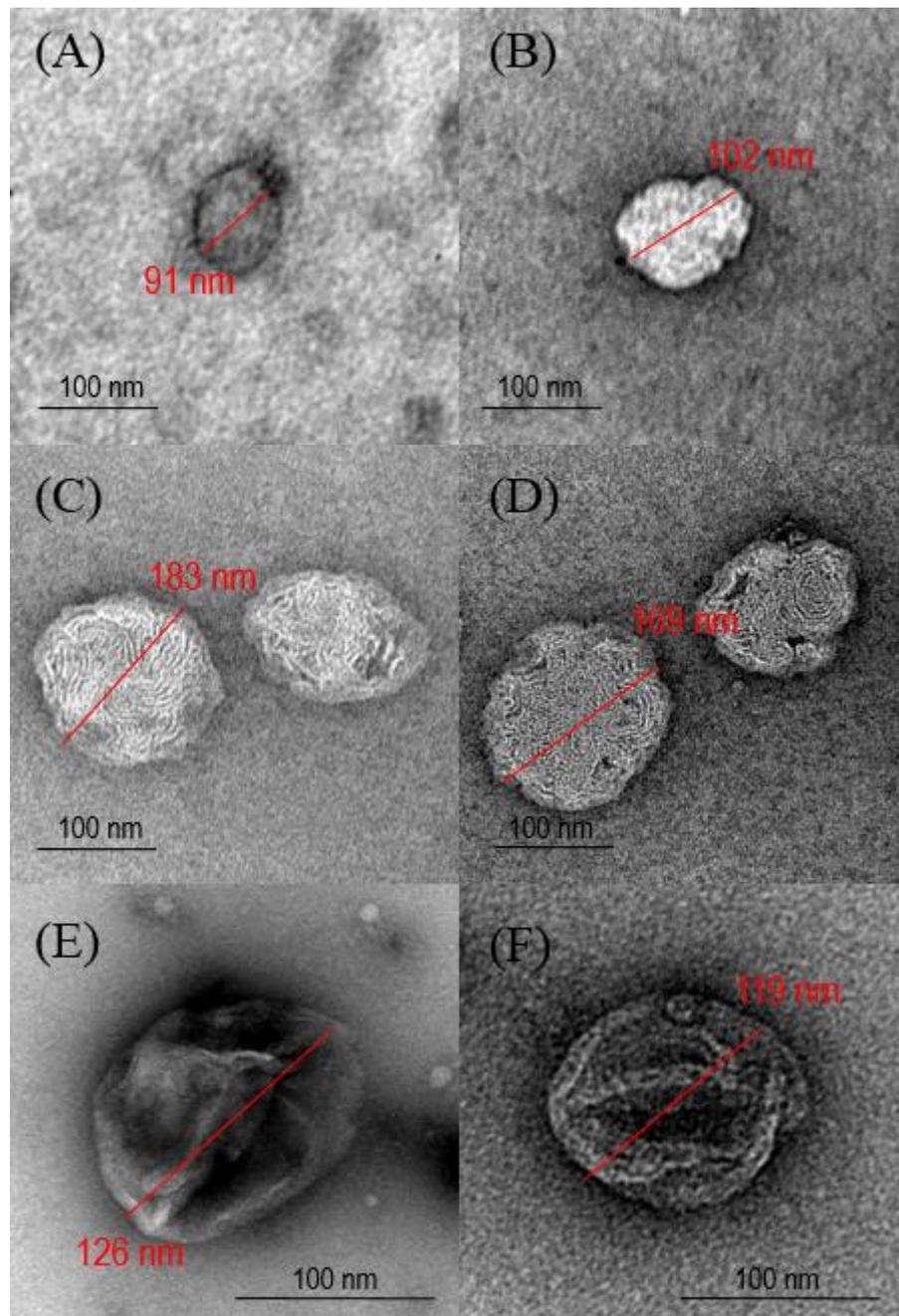


Figura 25 - Imagens obtidas através do TEM: (A) - LIP; (B) - LIP/ST; (C) - CPL/D(PAA14); (D) - CPL/D(PAA18); (E) - CPL/D(PAA14)/DR; (F) - CPL/D(PAA18)/DR.

Comparando os LIP (Figura 25 (A)) com os CPL/D (Figura 25 (C) e (D)) é visível que as partículas tornam-se mais densas com a incorporação do CHO-PAA e é mesmo possível distinguir nas imagens uma espécie de estrias que representam o revestimento polimérico. Por outro lado, confrontando estes últimos com os CPL/D/DR (Figura 25 (E) e (F)) observa-se que os reticulados são ainda mais compactos devido à união das cadeias poliméricas entre si.

Por outro lado, os tamanhos dos LIP e CPL obtidos a partir das imagens obtidas por TEM mostram, em comparação com os obtidos através de DLS, diâmetros mais reduzidos com as mesmas variações entre si. Estes resultados são provenientes das várias aproximações que a técnica de DLS utiliza para chegar a um valor médio final, o que não se verifica ao utilizar as imagens de TEM visto que a medição do diâmetro das partículas é feita diretamente sob a imagem microscópica real.

8. Libertação em diferentes meios de pH

O estudo de capacidade de libertação dos LIP e CPL/R finais em diferentes meios de pH, (Figura 26) mostra que, à exceção dos LIP, todos os CPLs são menos estáveis noutros valores de pH que não o fisiológico, o que sugere que podem ser empregados em situações em que o objetivo seja a libertação em locais mais ácidos ou básicos do organismo, por exemplo. Durante este trabalho não se conseguiu explicar o facto de a libertação das estruturas analisadas aumentar em meio mais básico, visto que em meio básico as cadeias de PAA deveriam manter-se estáveis. Para compreender este fenómeno teriam de ser feitos outros testes.

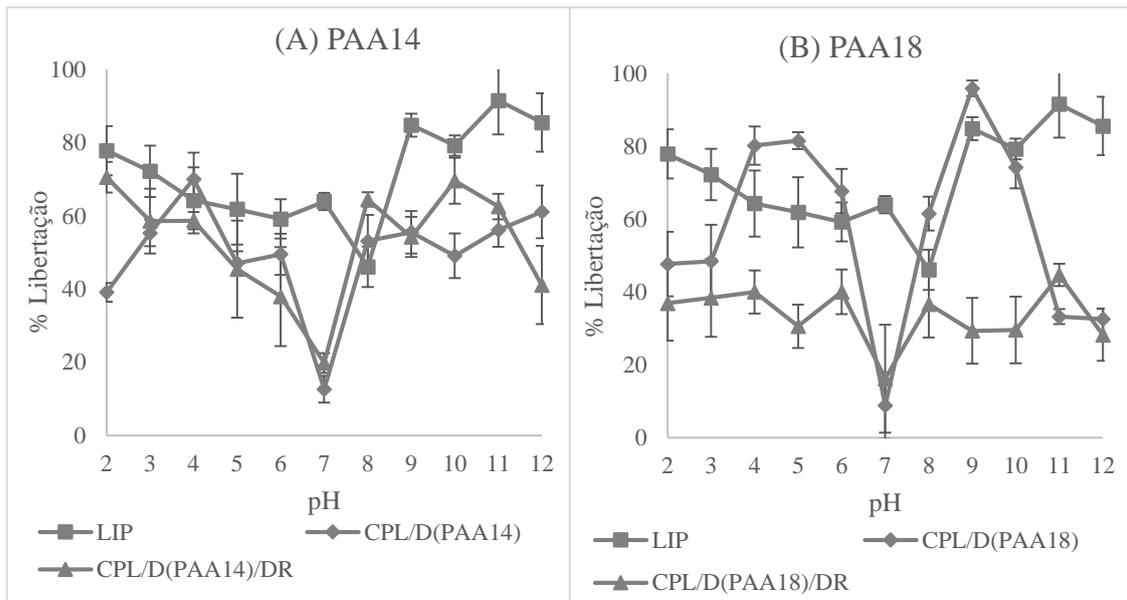


Figura 26 - Percentagens de libertação dos CPL finais em diferentes meios de pH: (A) – com PAA proveniente da reação 14 de PtBA; (B) – com PAAA proveniente da reação 18 de PtBA.

9. Viabilidade celular dos CPLs finais

Os testes de viabilidade celular indicam que todos os CPLs selecionados são não tóxicos até uma concentração de, sensivelmente, 10 μ L. Em concentrações mais altas verificou-se que a percentagem de células viáveis começa a descer (Figura 27). As percentagens de células viáveis mostram ainda que para além da viabilidade, a presença dos CPLs em baixas concentrações promove o crescimento celular.

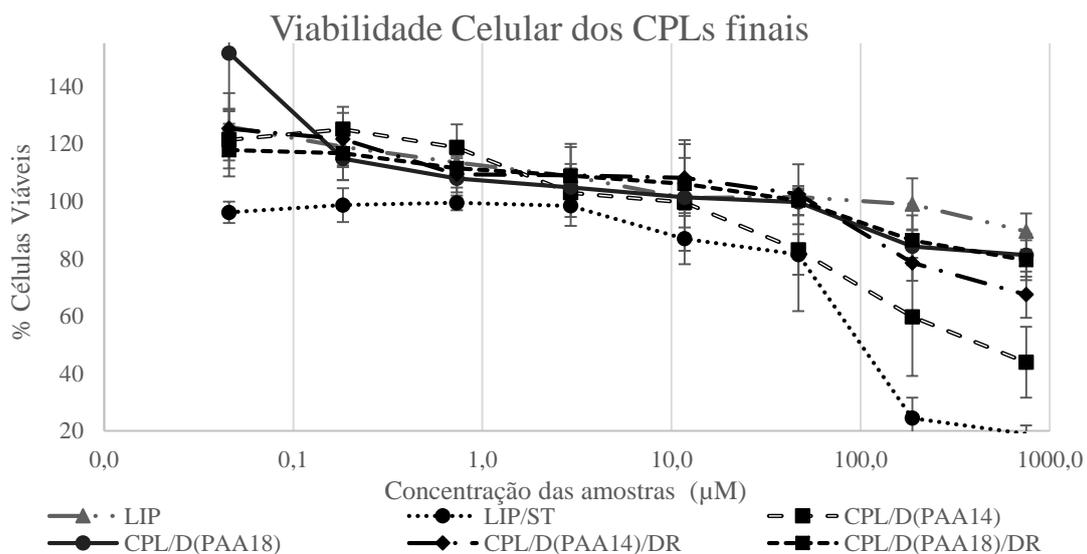


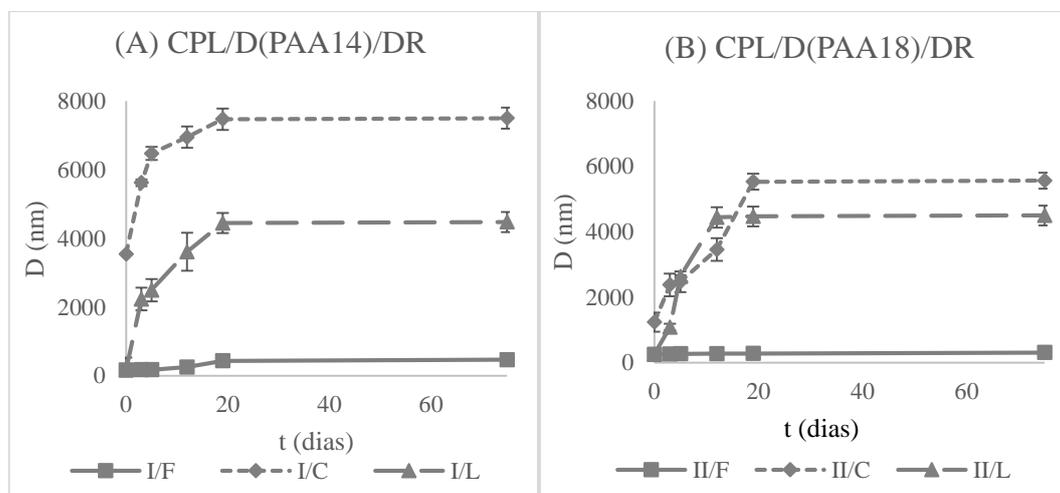
Figura 27 - Percentagem de células viáveis em função da concentração das amostras do conjunto de CPL finais.

10. Estudo de conservação

Para o estudo de conservação foram usados apenas os CPLs reticulados finais. Estes foram armazenados, por 75 dias, em diferentes condições, no frigorífico (F), no congelador (C) e liofilizados (L), com e sem molécula protetora (TR). Ao longo do tempo, foram medidos os seus diâmetros, polidispersividade e potencial zeta.

Os resultados dos diâmetros (figura 28) mostraram que é possível armazenar os CPL no frigorífico com e sem trealose e liofilizados com a presença da trealose. Contudo, observando as PDI e os valores do potencial zeta médios obtidos (Figuras 29 e 30), os únicos CPL estáveis são os CPL/D(PAA18)/DR-TR, armazenados na forma de pó, após liofilização, com conservante.

A análise deste estudo, para além de ter mostrado que a melhor forma de conservação dos CPLs desenvolvidos é a liofilização, revelou também que os CPLs baseados em CHO-PAA com um baixo peso molecular (~3000 Da) perdem estabilidade durante o armazenamento.



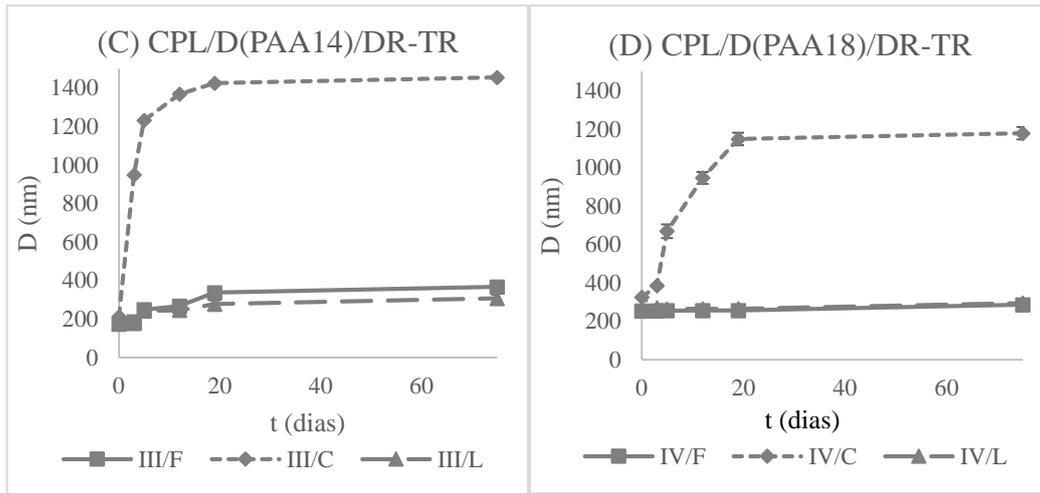


Figura 28 - Diâmetros dos CPL finais: (A) com PAA14 sem conservante; (B) com PAA14 com conservante; (C) com PAA18 sem conservante; (D) PAA18 com conservante.

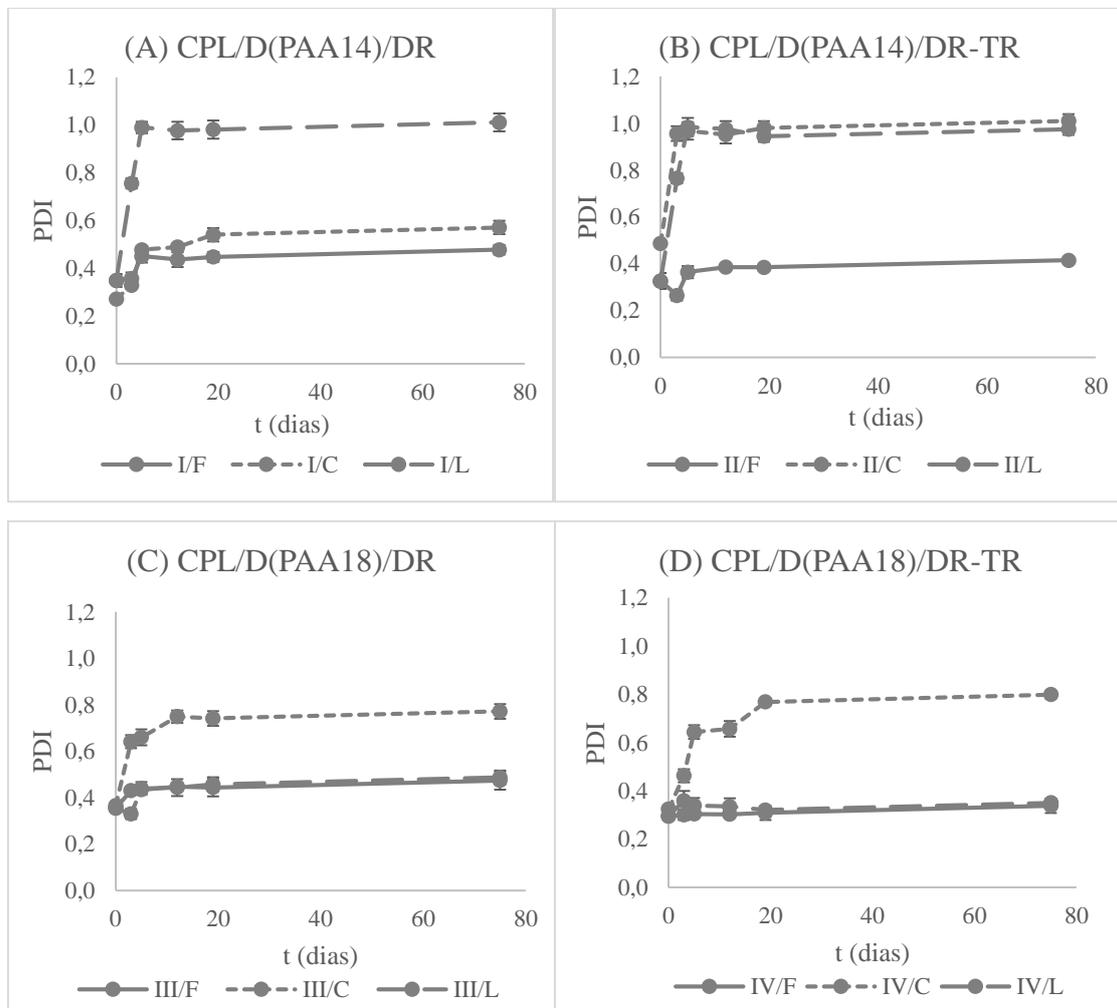


Figura 29 - PDI médias dos CPL finais: (A) com PAA14 sem conservante; (B) com PAA14 com conservante; (C) com PAA18 sem conservante; (D) PAA18 com conservante.

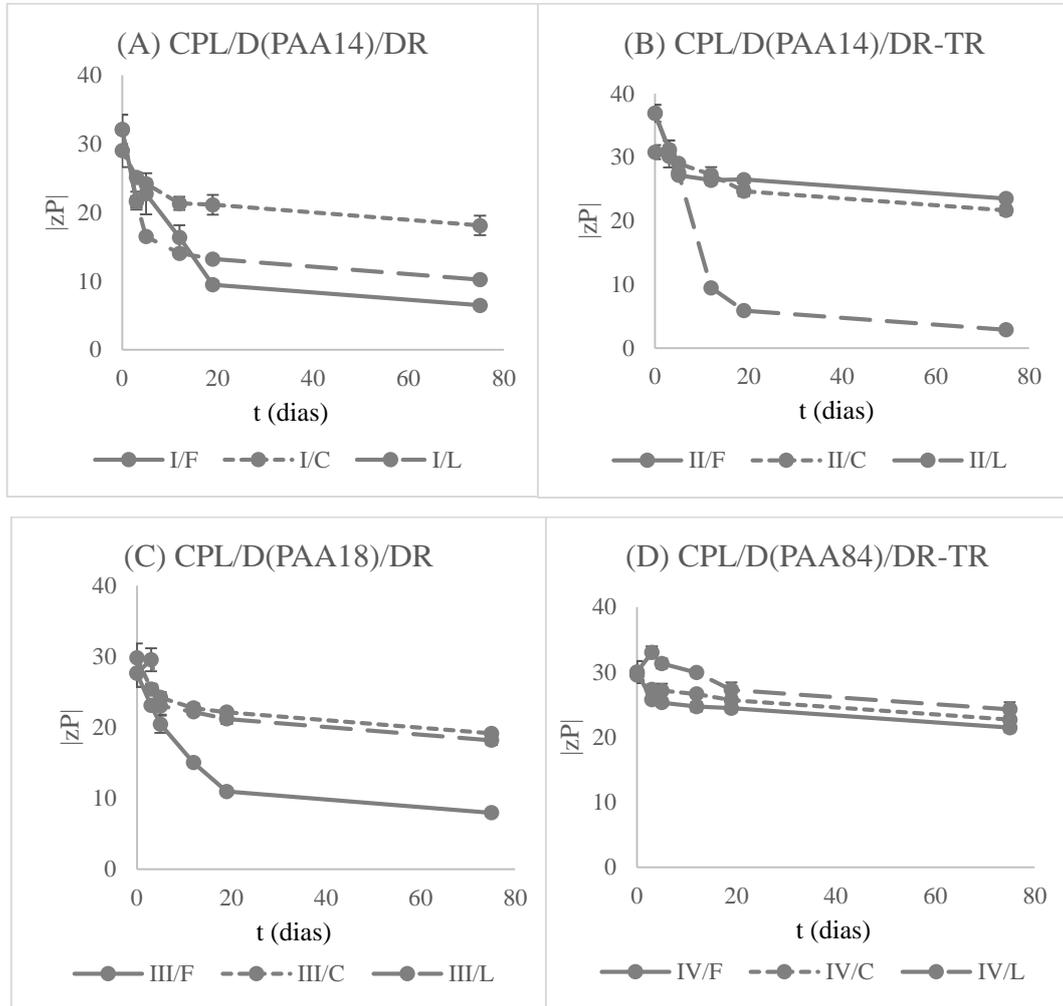


Figura 30 – Potencial zeta dos CPL finais: (A) com PAA14 sem conservante; (B) com PAA14 com conservante; (C) com PAA18 sem conservante; (D) PAA18 com conservante.

Apreciações Finais

Conclusões

No que diz respeito às sínteses de CHO-Br, CHO-PtBA e CHO-PAA foi possível preparar o iniciador e os polímeros pretendidos com as características desejadas.

Os CPLs formulados, reticulados e não reticulados, mostraram características promissoras em termos de tamanho, polidispersividade, potencial zeta, capacidade libertação e eficiência de encapsulação. São ainda morfologicamente aceitáveis, não tóxicos, capazes de ser armazenados durante um período relativamente longo sem alterações relevantes das suas propriedades, depois de liofilizados e protegidos, e possuem uma capacidade de libertação considerável em meios mais ácidos.

Deste modo, todos os resultados alcançados permitiram concluir que os complexos polímero-lipossoma com CHO-PAA desenvolvidos neste trabalho podem ser vistos como potenciais sistemas de libertação controlada nas mais diversas áreas.

Trabalho Futuro

A determinação da quantidade de polímero incorporado nos lipossomas, a integração de moléculas funcionalizadoras, como proteínas e/ou anticorpos, mais testes de viabilidade celular como a internalização, encapsulação de agentes ativos e testes *in vivo* são possíveis trabalhos futuros para dar continuidade a este estudo.

Bibliografia e Netografia

- [1] - Sousa I., Estudo, caracterização e desenvolvimento de sistemas de libertação controlada para as quinolonas e seus derivados. 2013, Universidade do Porto, Porto;
- [2] - Conceição, Ana Isabel F. S., Matos, Carla M., Moutinho, Carla G., Encapsulação de dois fármacos anticancerígenos (5-fluorouracilo e metotrexato) em lipossomas unilamelares. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, ISSN 1646-080, 6 (2009) 50-59;
- [3] - Freire J., Preparação de um sistema de libertação controlada e localizada de um antibiótico de largo espectro para aplicação em cirurgias ortopédicas reconstrutivas. 2012, Universidade de Coimbra, Coimbra;
- [4] - Carlos Spuch and Carmen Navarro, Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against neurodegenerative Diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease), *Journal of Drug Delivery*, Volume 2011 (2011), Article ID 469679, 12 pages;
- [5] - Rouxinol F., Preparação de nanopartículas para sistemas de libertação controlada de substâncias activas usadas no tratamento de doenças oftalmológicas 2009, Universidade De Coimbra, Coimbra;
- [6] - Coimbra P., Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural. 2010, Universidade de Coimbra, Coimbra;
- [7] - João C., Encapsulação e Libertação Controlada de Fármacos, 2013, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança;
- [8] - Samad A., Sultana Y. and Aqil M., Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review, *Current Drug Delivery*, 2007, 4, 297-305;
- [9] - Priyanka R. Kulkarni, Jaydeep D. Yadav, Kumar A. Vaidya, *Liposomes: a novel drug delivery system*, ISSN- 0975-7066, Vol 3, Issue 2, 2011;
- [10] - Okhil K. Nag and Vibhudutta Awasthi, Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior, *Pharmaceutics* 2013, 5(4), 542-569;
- [11] - P. Alves, A.A. Hugo, E.E. Tymczyszyn, A.F. Ferreira, R. Fausto, P.F. Pérez, J.F.J. Coelho, P.N. Simões, A. Gómez-Zavaglia, Effect of cholesterol-poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrilate) on the properties of stimu-responsive polymer liposome complexes, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 104 (2013) 254– 261;
- [12] - Alvarez A., Rodríguez M., Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations, *Grasas y Aceites*, Vol. 51. Fasc. 1-2 (2000), 74-96;
- [13] - Sipai Altaf Bhai. M, Vandana Yadav, Mamatha. Y, Prasanth V.V, *Liposomes: an overview*, *JPSI* 1 (1), Jan-Feb 2012, 13-21;
- [14] – Sang-Min Lee, Haimei Chen, Christine M. Dettmer, Thomas V. O'Halloran, and SonBinh T. Nguyen, Polymer-Caged Liposomes: A pH-responsive delivery system with high stability, *J. AM. CHEM. SOC.* 2007, 129, 15096-15097;

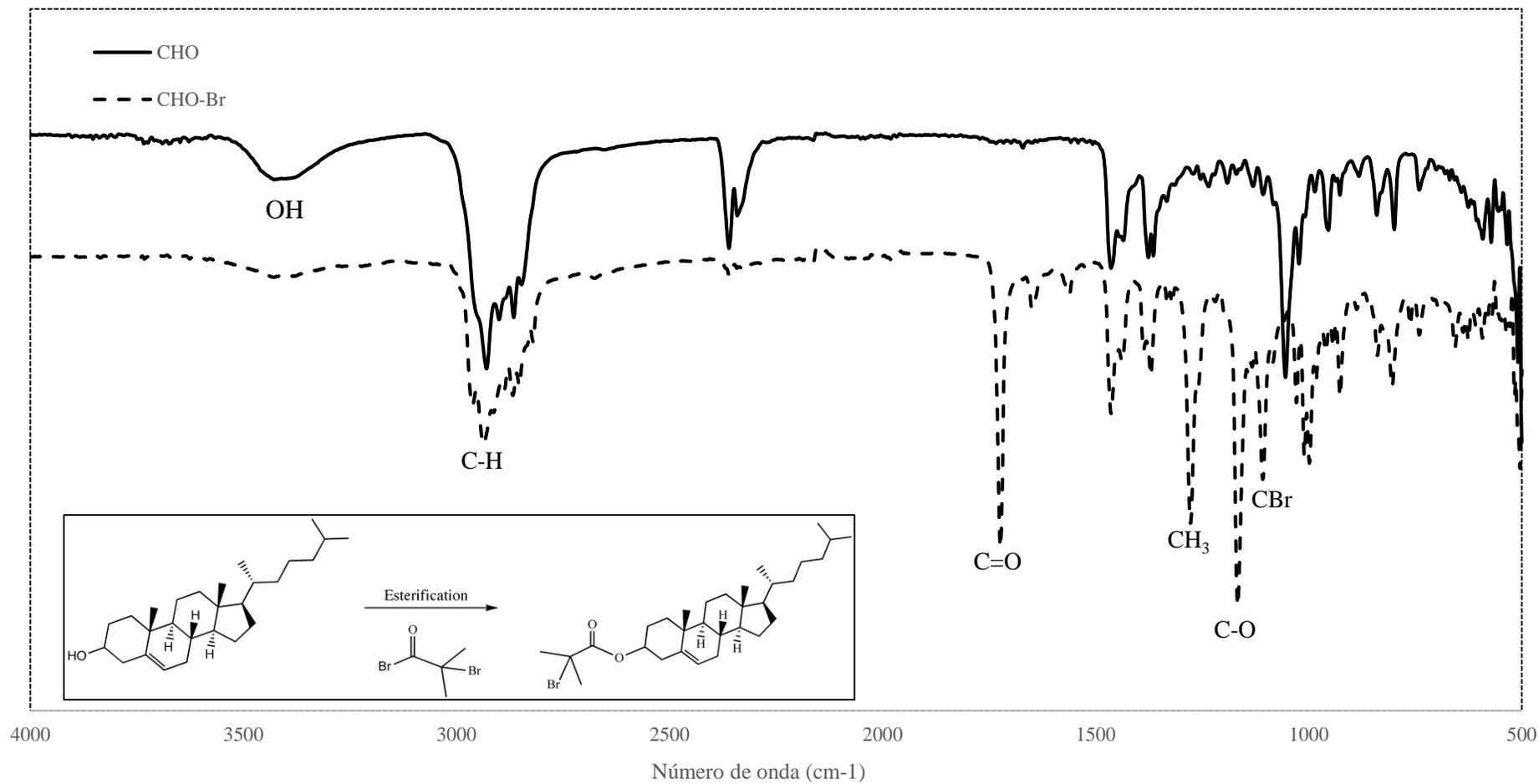
-
- [15] – João F. Mano, Polímeros Inteligentes em aplicações biomédicas, Química 126, Jul/Set 12, 27-31;
- [16] – Veerle Coessens, Tomislav Pintauer, Krzysztof Matyjaszewski, Functional polymers by atom transfer radical polymerization, Progress in Polymer Science, Volume 26, Issue 3, April 2001, Pages 337–377;
- [17] - Jerome Queffelec, Scott G. Gaynor,† and Krzysztof Matyjaszewski, Optimization of Atom Transfer Radical Polymerization Using Cu(I)/Tris(2-(dimethylamino)ethyl)amine as a Catalyst, *Macromolecules* 2000, 33, 8629-8639;
- [18] - Takahashi M1, Inafuku K, Miyagi T, Oku H, Wada K, Imura T, Kitamoto D., Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method, *J Oleo Sci.* 2006;56(1):35-42;
- [19] – A. Hollmann, L. Delfederico, G. Glikmann, G. De Antoni, L. Semorile, E.A. Disalvo, Characterization of liposomes coated with S-layer proteins from lactobacilli, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1768, Issue 3, March 2007, Pages 393–400;
- [20] - Gerrit van Meer, Dennis R. Voelker and Gerald W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nature reviews, Molecular cell biology*, volume 9, February 2008 112-124;
- [21] - Ricardo A. Chaurio, Christina Janko, Luis E. Muñoz, Benjamin Frey, Martin Herrmann and Udo S. Gaipl., Phospholipids: Key Players in Apoptosis and Immune Regulation, *Molecules* 2009, 14(12), 4892-4914;
- [22] - Vijender Singh, Poonam Khullar, Pragnesh N Dave and Navjot Kaur, Micelles, mixed micelles, and applications of polyoxypropylene (PPO)-polyoxyethylene (PEO)-polyoxypropylene (PPO) triblock polymers, *International Journal of Industrial Chemistry* 2013, 4:12;
- [23] - Robert W. Lee, Dinesh B. Shenoy and Rajiv Sheel, Micellar Nanoparticles: Applications for topical and passive transdermal drug delivery, 2010, Chapter 2 of *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*, Elsevier;
- [24] - Storm G. and Crommelin D., Liposomes: quo vadis?, *PSTT Vol. 1, No. 1 April 1998*;
- [25] - Irma A.J.M and Bakker-Woudenberg, Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci, *International Journal of Antimicrobial Agents* 19 (2002) 299_/311;
- [26] - B. Maherani1, E. Arab-Tehrany, M. R. Mozafari, C. Gaiani1 and M. Linder, Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies, *Current Nanoscience*, 2011, 7, 436-452;
- [27] - Were LL Munyendo, Huixia Lv, Habiba Benza-Ingoula, Lilechi D. Baraza and Jianping Zhou, Cell Penetrating Peptides in the Delivery of Biopharmaceuticals, *Biomolecules* 2012, 2, 187-202;
- [28] – Vladimir P. Torchilin, Multifunctional nanocarriers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (2006) 1532–1555;
-

- [29] - Allen T. e Cullis P., Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Jan; 65(1):36-48;
- [30] - Erdal Cevher, Ali Demir Sezer and Emre Şefik Çağlar, Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy, 2012, Chapter 16, Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems 437-470;
- [31] - <http://www.ff.ul.pt/~mjgama/transfection%20-%20PROMEGA.pdf> (12-07-2015);
- [32] - Andri Hardiansyah, Li-Ying Huang, Ming-Chien Yang, Ting-Yu Liu, Sung-Chen Tsai, Chih-Yung Yang, Chih-Yu Kuo, Tzu-Yi Chan, Hui-Ming Zou, Wei-Nan Lian³ and Chi-Hung Lin, Magnetic liposomes for colorectal cancer cells therapy by high-frequency magnetic field treatment, *Nanoscale Research Letters* 2014, 9:497;
- [33] - Abolfazl Akbarzadeh, Rogaie Rezaei-Sadabady, Soodabeh Davaran, Sang Woo Joo, Nosratollah Zarghami, Younes Hanifehpour, Mohammad Samiei, Mohammad Kouhi and Kazem Nejati-Koshki, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Research Letters* 2013, 8:102;
- [34] – A.Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset and H. Fessi, Preparation, characterization and applications of Liposomes: state of the art, *Journal of colloid science and biotechnology*, Vol. 1, 147-168, 2012;
- [35] - Mendes J., *Síntese de hidrogéis de base acrílica recorrendo a técnicas de polimerização radicalar viva. Potencial aplicação como fármacos poliméricos.*, 2011, Universidade de Coimbra, Coimbra;
- [36] - Mendonça P., *Metal-catalyzed living radical polymerization technique, in department of chemical engineering faculty of sciences and technology.*, 2010, Universidade de Coimbra, Coimbra;
- [37] – Joost A. Opsteen, Jan C. M. Van Hest., Modular Synthesis of ABC Type Block Copolymers by “Click” Chemistry, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 45, 2913–2924 (2007);
- [38] - Daniel J. Siegwarta,b, Jung Kwon Ohc, and Krzysztof Matyjaszewskid, ATRP in the design of functional materials for biomedical Applications, 2012, *Prog Polym Sci.* 2012 January 1; 37(1): 18–37;
- [39]– Malvern Instruments - <http://www.malvern.com/br/products/technology/gel-permeation-chromatography/>; (15-07-2015)
- [40] – Departamento de Química da Universidade de Coimbra - <http://www.uc.pt/ftuc/dquimica/nmrccc/>; (15-08-2015)
- [41] - http://www.chem.ucla.edu/harding/notes/notes_14C_nmr02.pdf; (15-08-2015)
- [42] – Jasco Analytical Instruments - <http://www.jascoinc.com/spectroscopy/ftir-spectrometers/>; (15-08-2015);
- [43] - Jasco Analytical Instruments - http://www.jascoinc.com/docs/application-notes/IR_02_03.pdf; (15-08-2015)

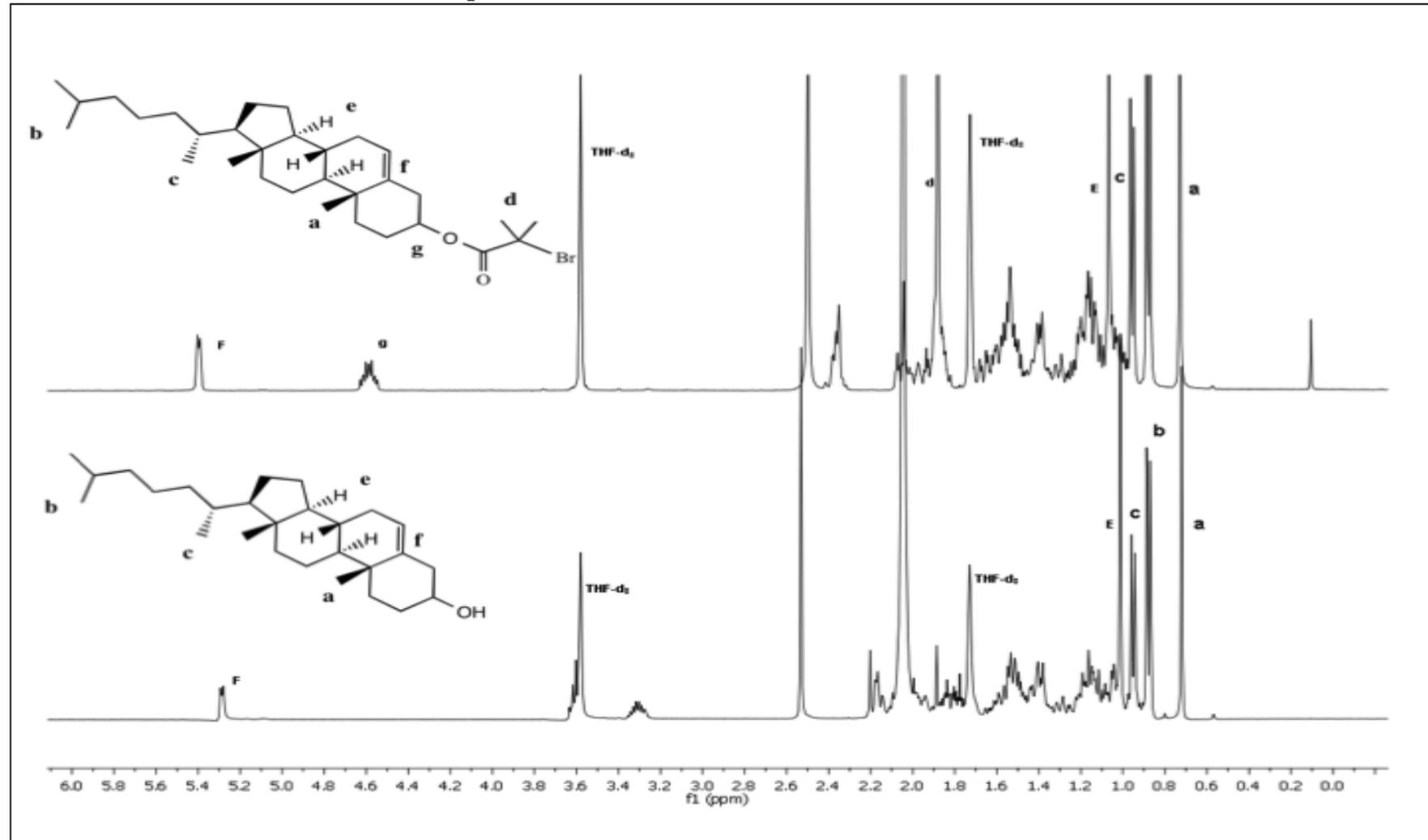
- [44] – Perkin Elmer - http://www.uts.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf; (15-08-2015)
- [45] – Malvern Instruments - <http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/>; (15-07-2015)
- [46] – ScanSci, Spectroscopic Solutions - <http://www.m-r-c.co.il/media/Uploads/SCAN-Spec-applications.pdf>; (15-08-2015)
- [47] - Pina F., *Espectrofluorimetria - o fenómeno da absorção e emissão de luz pelas moléculas*, Setembro de 1994, nº54 do Boletim da Sociedade Portuguesa de Química;
- [48] – The official web site of Nobel Prize - <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/tem/>; (15-08-2015)
- [49] – Open Wet Ware - http://openwetware.org/wiki/20.109%28F07%29:_Transmission_electron_microscopy; (15-08-2015)
- [50] - Nelson Monteiro, Albino Martins, Diana Ribeiro, Susana Faria, Nuno A. Fonseca, João N. Moreira, Rui L. Reis and Nuno M. Neves, On the use of dexamethasone-loaded liposomes to induce the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *J Tissue Eng Regen Med* (2013) DOI:10.1002/term.1817;
- [51] - Application Note, Cell Proliferation and Cell Viability Analysis in in vitro Systems, 2009, Tecan;
- [52] - Wuyang Ren, Long Jiang, Weiwei Wang and Yi Dan, The Application of Copper(II) Deactivator on the Single-Electron Transfer Living Radical Polymerization of tert-Butyl Acrylate, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, Volume 48, Issue 13, pages 2793–2797, 1 July 2010;
- [53] - Olivier Bertrand, Jean-Marc Schumers, Chandrasekar Kuppan, Jacqueline Marchand-Brynaert, Charles-André Fustin and Jean-François Gohy, Photoinduced micellization of block copolymers bearing 4,5 - dimethoxy-2-nitrobenzyl side groups, *Soft Matter*, 2011,7, 6891-6896;

Apêndice A

Espectro de FTIR-ATR do CHO-Br.

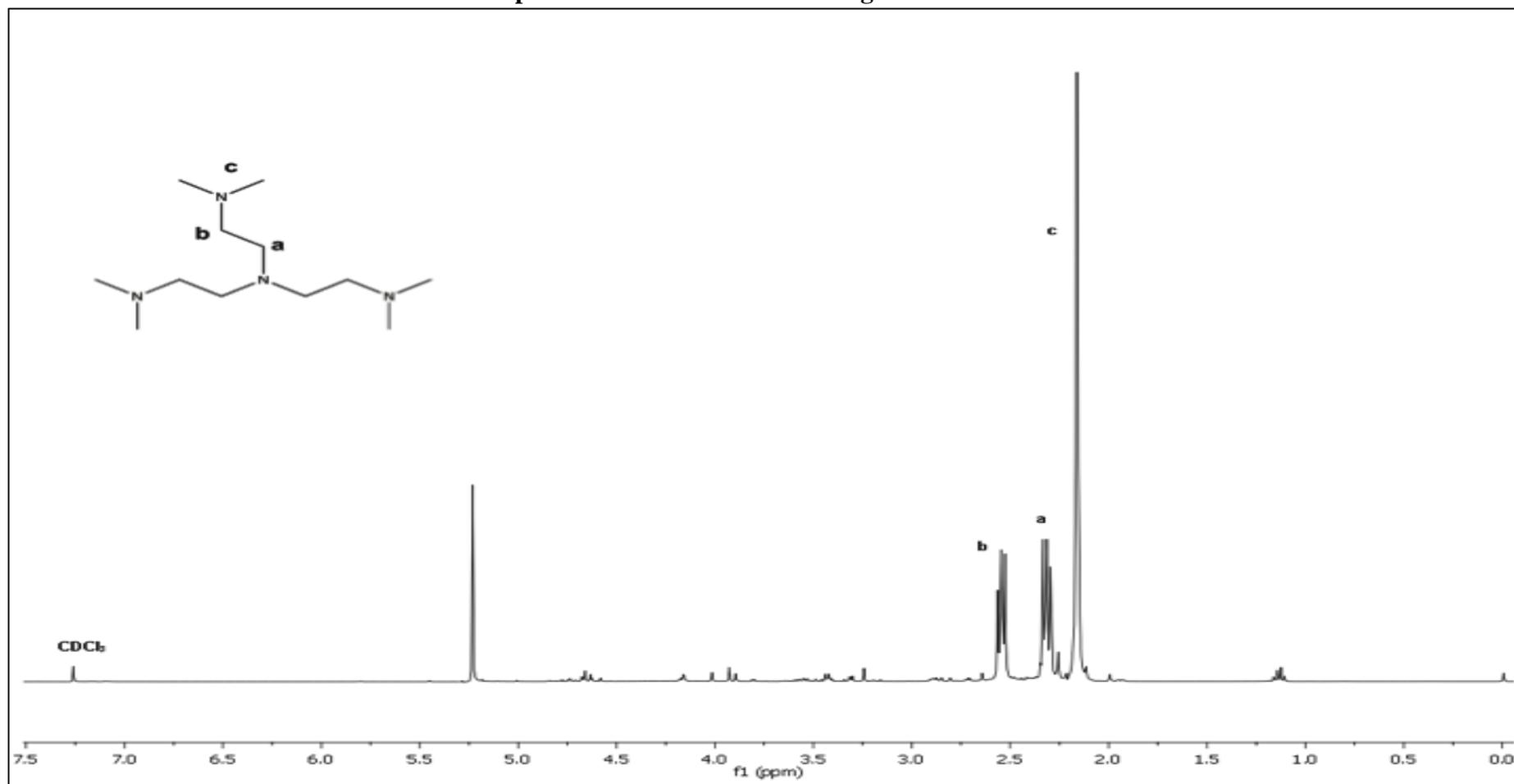


Espectro de RMN em CDCl₃ do iniciador CHO-Br.



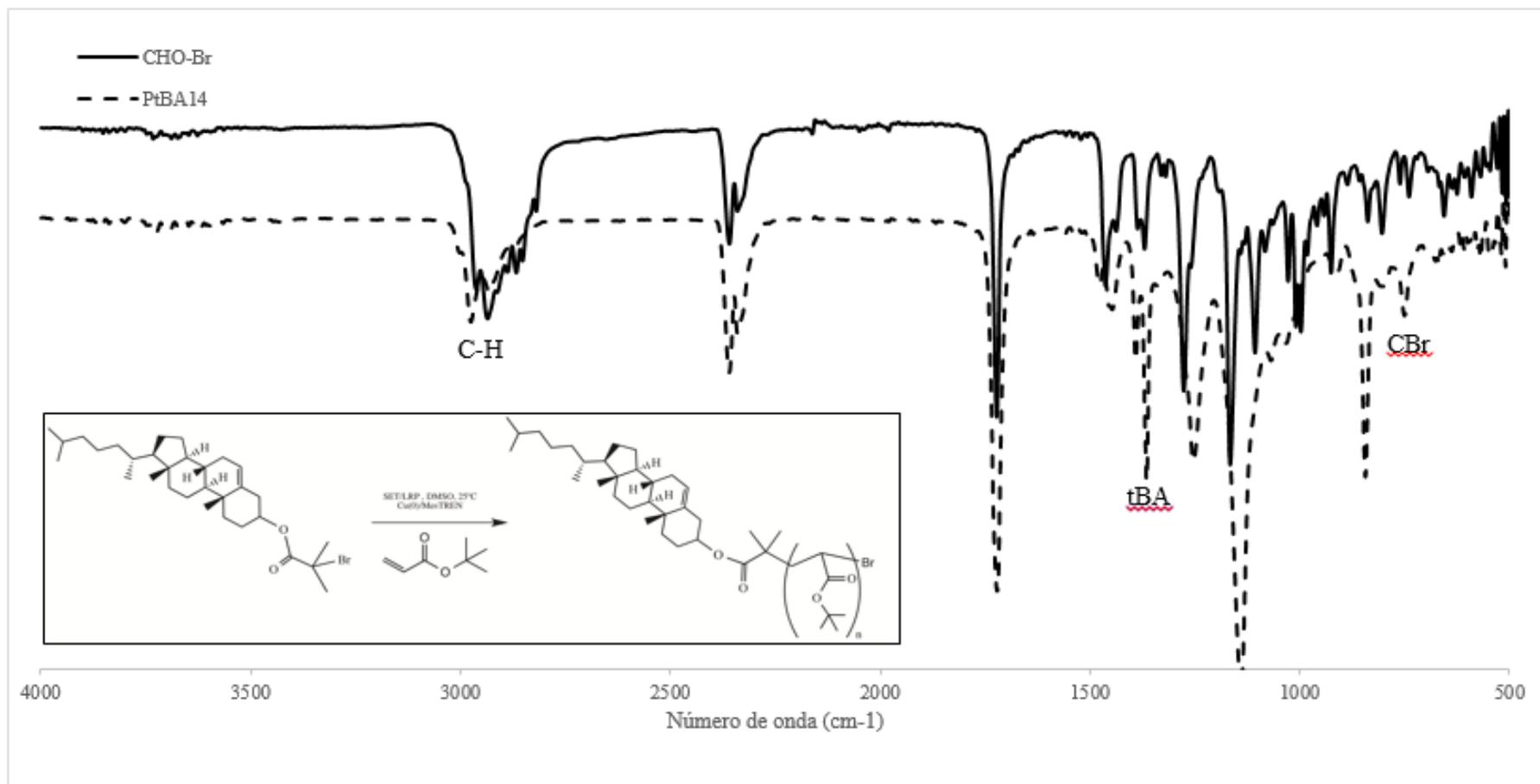
Apêndice B

Espectro de RMN em CDCl₃ do ligante Me₆TREN.

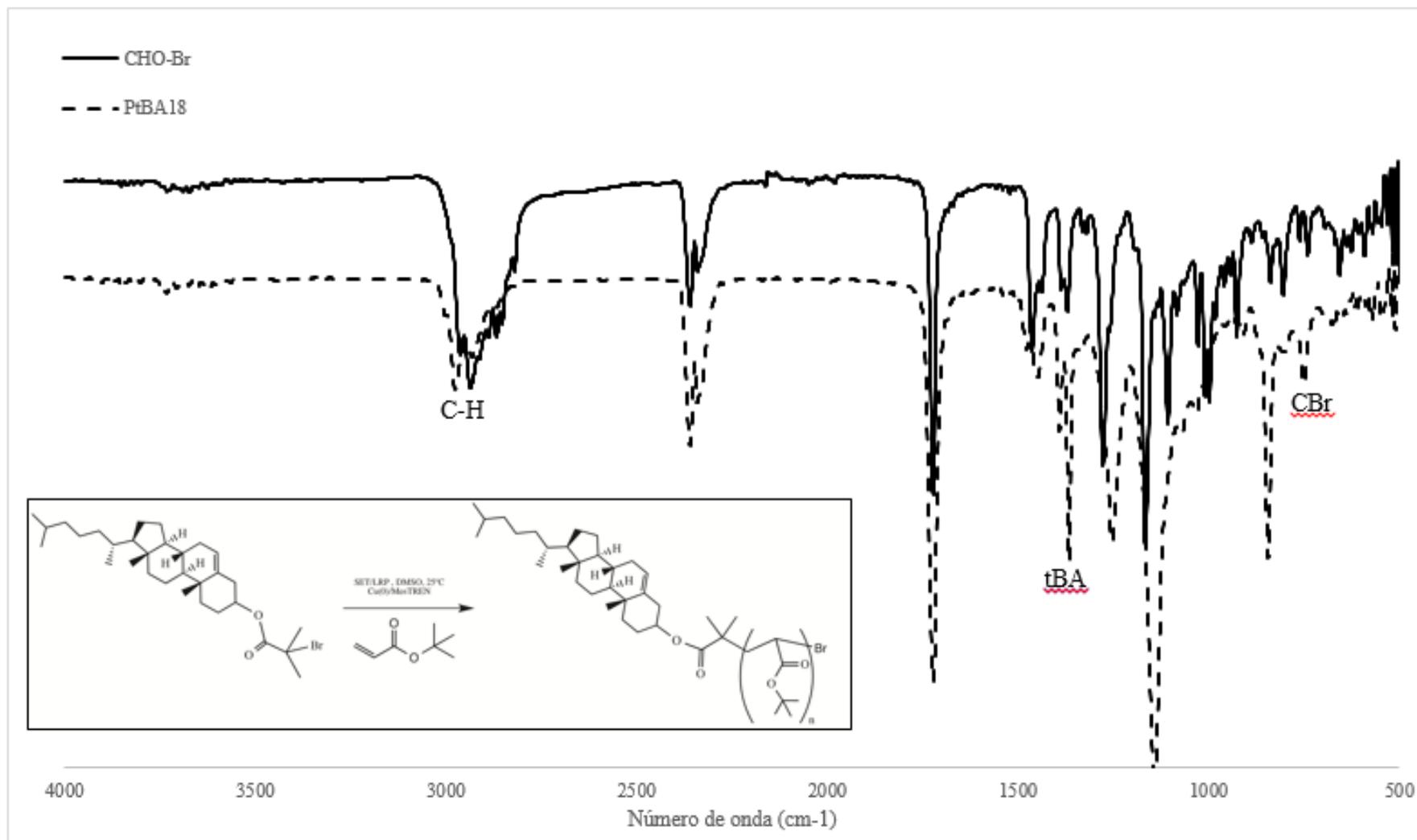


Apêndice C

Espectro de FTIR-ATR do PtBA14.

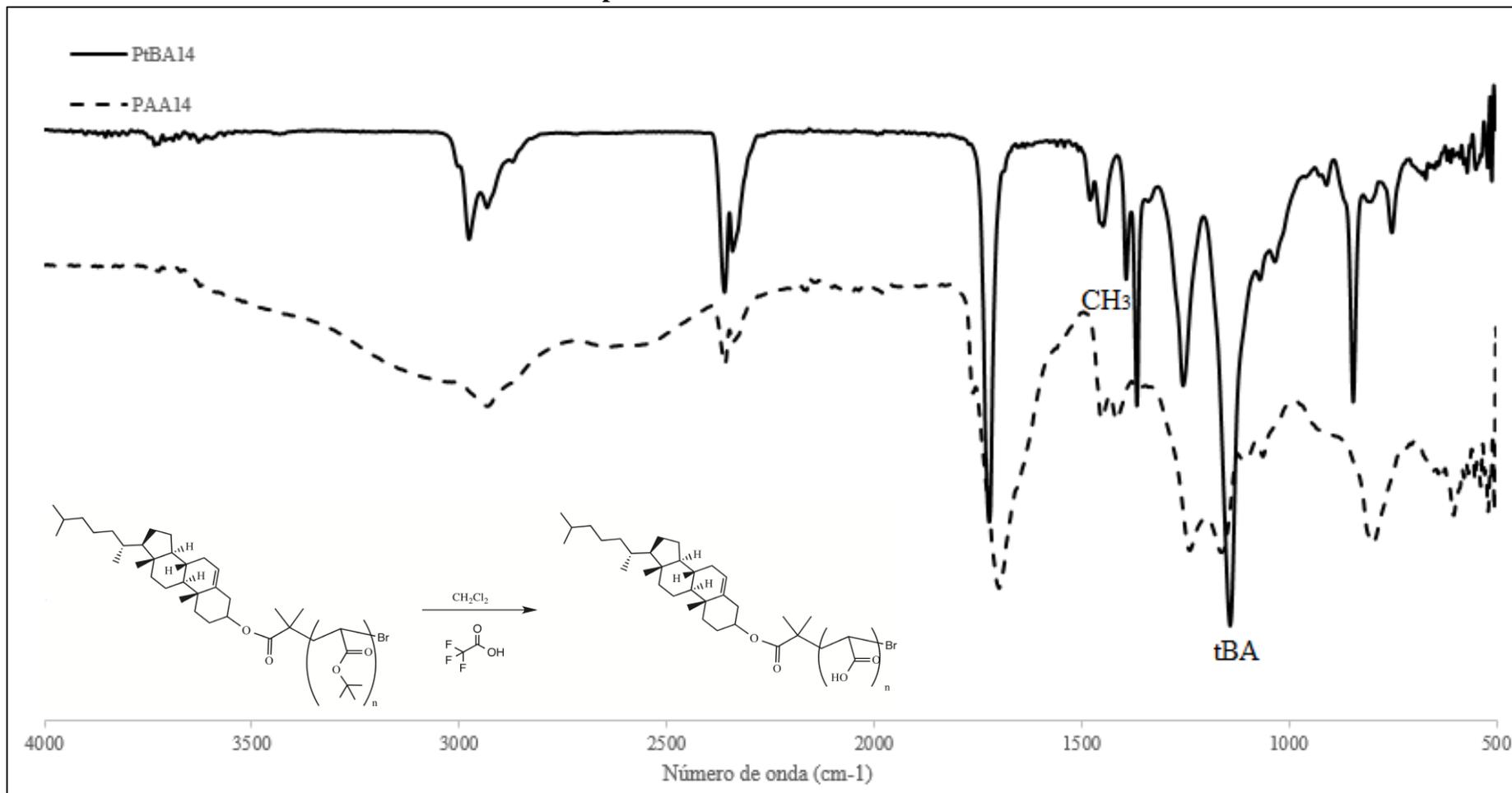


Espectro de FTIR-ATR do PtBA18.

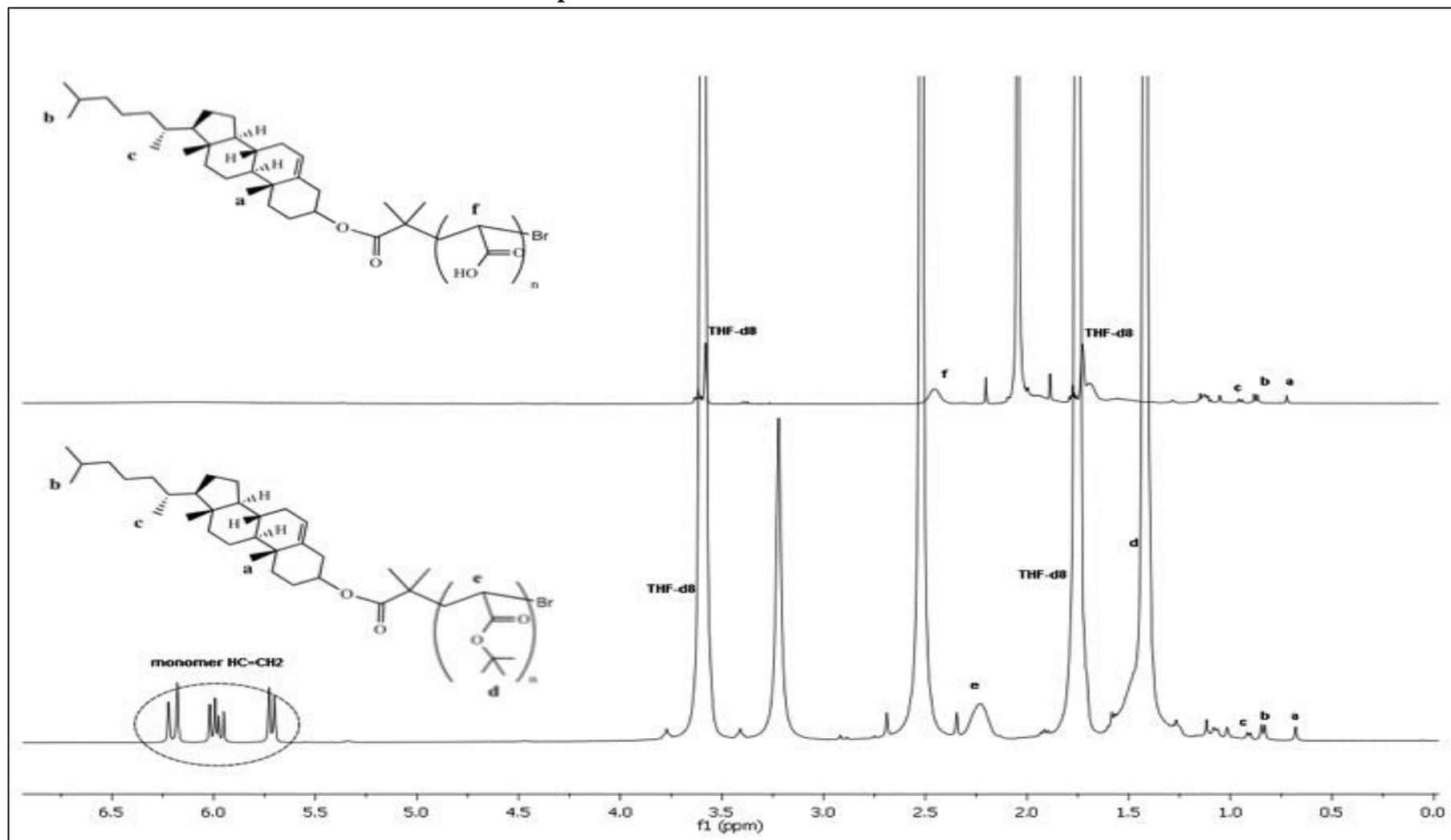


Apêndice D

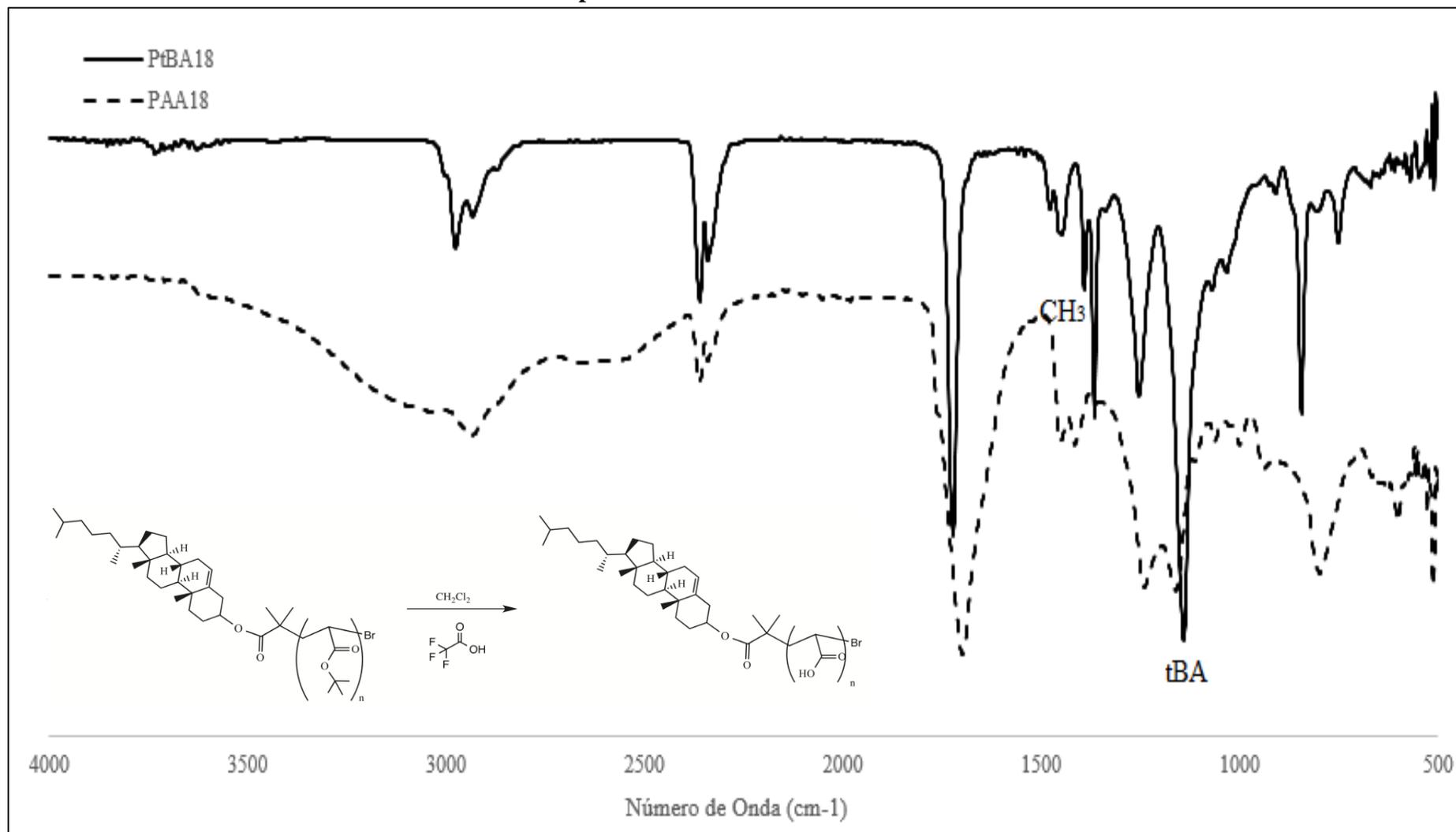
Espectro de FTIR-ATR do PAA14.



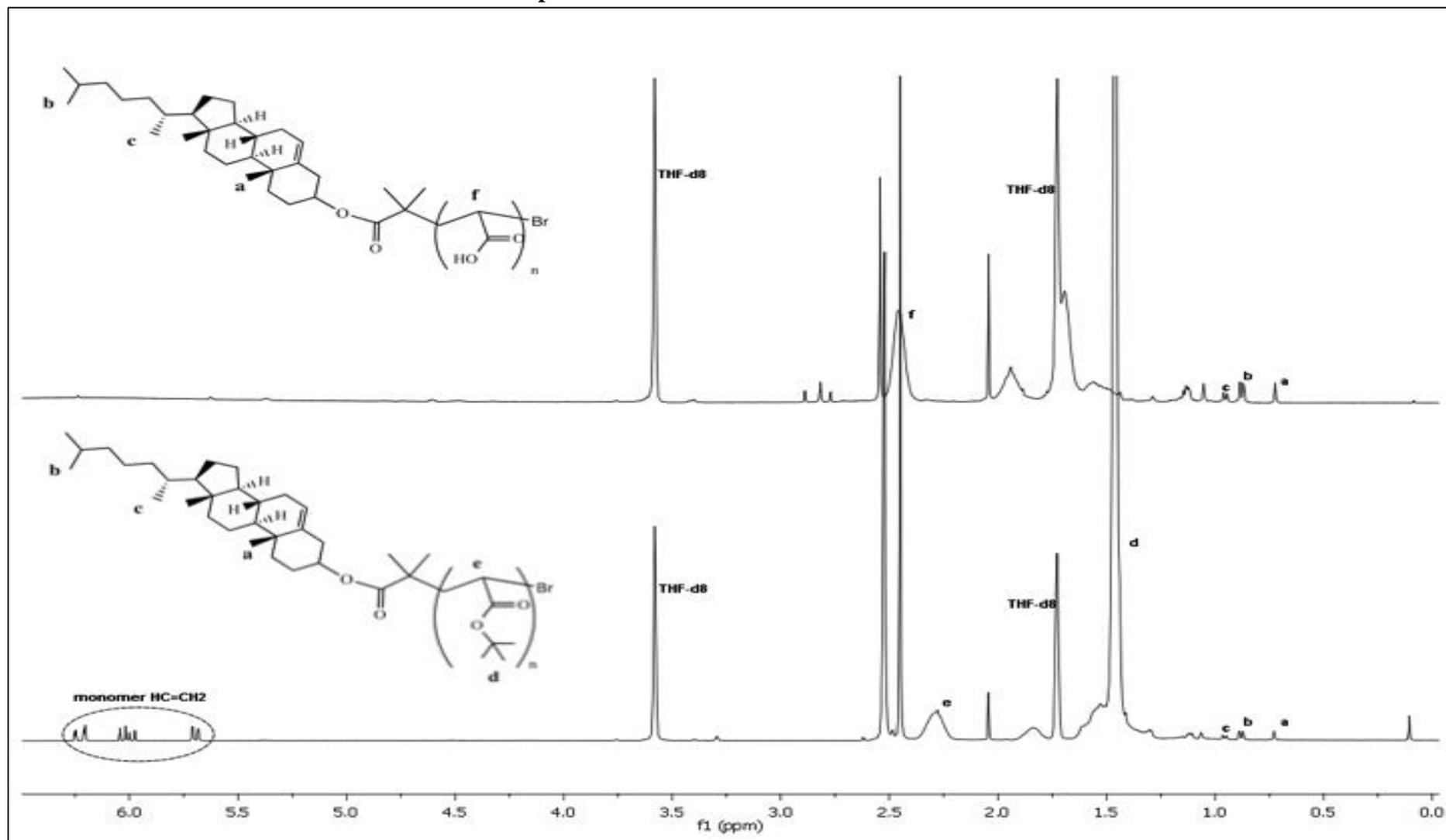
Espectro de RMN em d8THF do PAA14.



Espectro de FTIR-ATR do PAA18.



Espectro de RMN em d8THF do PAA18.



Apêndice E



PHOSPHOLIPIDS

Phospholipids

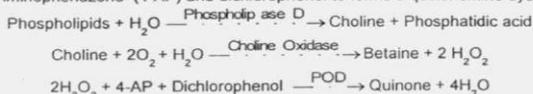
CHO-POD. Enzymatic colorimetric

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 quinonemine 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 Buffer	TRIS pH 7.55	50 mM
	Dichlorophenol	2.1 mM
R 2 Enzymes	Phospholipase D	400 U/L
	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: SPINCONTROL 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:

Mean (mg/dL)	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	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

BSIS14-1 Ed.02/2007



SPINREACT,S.A.U. C/ra 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