

Beatriz Vilaranda Rodrigues

Desenvolvimento e Caracterização de Complexos Polímero-Lipossoma para Sistemas Inteligentes de Libertação Controlada

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

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Beatriz Vilaranda Rodrigues

Desenvolvimento e Caracterização de Complexos Polímero-Lipossoma para Sistemas Inteligentes de Libertação Controlada

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

Supervisores:

Pedro Nuno Neves Lopes Simões

Patrícia de Jesus Pinto Alves

Instituições:

Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

Para começar, quero agradecer aos meus orientadores, Doutor Pedro Nuno Simões e Doutora Patrícia de Jesus Pinto Alves, por me acompanharem durante estes meses de trabalho, pelo apoio, pela disponibilidade, pelo conhecimento e por toda a atenção que tiveram comigo. Agradeço por me incentivarem a dar o melhor de mim.

À investigadora Mónica Simões, por todo o apoio, paciência e ajuda no laboratório. Agradeço pela presença constante, mesmo estando na Argentina, e por todos os conhecimentos proporcionados. Não existem palavras que possam expressar o quanto eu agradeço.

Quero também agradecer a todos os investigadores que me ajudaram na realização da tese, por terem a disponibilidade de realizarem os testes e técnicas essenciais para esta.

Às minhas colegas de laboratório, por tornarem os dias mais longos em mais curtos, através da sua boa disposição e animação constante. Com colegas assim, trabalha-se melhor.

Quero ainda agradecer aos meus amigos por perguntarem pela tese, por me incentivarem e por dizerem que tudo é possível.

Por fim, agradeço a duas pessoas muito importantes da minha vida, os meus pais. O apoio incondicional, o carinho, o animo, por tudo e muito mais. Sem vocês, não seria a pessoa que sou, nem conseguiria alcançar o possível e o que cremos como impossível.

Resumo

Neste trabalho, pretendeu-se desenvolver e caracterizar Complexos Polímero-Lipossoma (CPL) para sistemas inteligentes de libertação controlada. Para tal, foram utilizados polímeros com a capacidade de reagirem ao pH e à temperatura, para a formação dos CPL. O Pluronic® F68 (PLU) foi um dos polímeros utilizados devido às suas propriedades anfífilas. Estas propriedades permitem que este polímero seja o elemento ideal para a ancoragem dos polímeros Poli(ácido acrílico) (PAA) e Poli[2-(N,N-Dimetilamina) etilmetacrilato] PDMAEMA aos lipossomas. Assim, os polímeros PLU-PAA (PP) e PLU-PDMAEMA (PPD) foram sintetizados através de polimerizações ATRP, para garantir o controlo do peso molecular e da polidispersividade. Para as polimerizações, foi necessária a síntese do iniciador PLU-Br, a partir da esterificação do PLU com o Brometo de 2-Bromoisobutil (2-BiB).

Os polímeros foram incorporados em lipossomas de lecitina de soja (LC) com diferentes razões polímero/fosfolípidos (2,5 %, 5 %, e 10 %), para a criação dos CPL. Para além dos polímeros, também foi adicionada estearilamina (SA) e colesterol (CHO), para perceber o impacto destes compostos nas características dos CPL. Os CPL obtidos foram caracterizados a nível do tamanho, da polidispersividade, do potencial zeta e dos perfis de libertação a 37 °C e pH 7, da libertação a 42 °C e com diferentes pH e da eficiência de encapsulação, após o encapsulamento com calceína.

Os resultados revelaram que os CPL possuíam um tamanho adequado para a sua utilização *in vivo*. Os CPL formulados por apenas LC e com os polímeros PLU, PP e PPD apresentam os tamanhos mais pequenos, à exceção dos CPL com 10% de PP. Os resultados também demonstraram que os CPL com 10 % de polímero incorporado tinham uma taxa de libertação de calceína inferior a 37 °C e a pH 7, em relação aos CPL de 2,5 % e 5 % e aos lipossomas de LC. Os CPL com 10 % de PPD são os que apresentam os valores mais baixos de libertação nestas condições. O estudo da libertação a diferentes pH e com uma temperatura mais alta (42 °C), da eficiência de encapsulação e da viabilidade celular foi efetuado com os CPL de 10 % de PLU, PP e PPD, uma vez que foram estes que mostraram os melhores resultados a pH 7 e 37 °C. Apesar dos testes demonstrarem a biocompatibilidade dos CPL, verifica-se que a eficiência de encapsulação é baixa.

Portanto, os CPL formulados apresentam características ideais para a sua utilização *in vivo*, como a sensibilidade à temperatura, a biocompatibilidade e tamanho reduzido. O tamanho reduzido favorece a estabilidade dos CPL *in vivo*, uma vez que quanto menor for o tamanho destas vesículas, menor o ataque do sistema imunitário e maior será a sua longevidade. A sensibilidade à temperatura permite que o conteúdo encapsulado nos CPL seja libertado nas

condições alvo desejadas. A biocompatibilidade indica que estes sistemas não apresentam efeitos tóxicos para as células saudáveis. Assim, o seu potencial reside não só nestas características, mas também pelos polímeros utilizados e pela forma como foram sintetizados.

Abstract

The aim of this work was the development and characterization of Polymer-Liposome Complexes (PLC) as intelligent systems for controlled release. For the PLC formulation, it was selected polymers with the ability to react to stimuli, particularly to the pH and temperature. Due to its amphiphilic properties, Pluronic[®] F68 (PLU) was chosen as polymer for PLC, but also, for polyacrylic acid (PAA) and poly(dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA) anchor to liposomes. In this way, it was synthesized by ATRP the polymers PLU-PAA (PP) e PLU-PDMAEMA (PPD), to guarantee that the molecular weight and polydispersity were controlled. For the polymerizations, it was necessary to synthesize the initiator. The initiator was obtained by esterification of the PLU with 2-bromoisobutryl bromide (2-BiB)

To create the PLC, polymers were incorporated in soy lecithin liposomes in different polymer/phospholipid ratios (2,5 %, 5 %, e 10 %). Also Stearylamine (SA) and Cholesterol (CHO) were added to understand the impact of these compounds in the formulation. The PLC were characterized by their size, polydispersity, zeta potential and release profiles at 37 °C and pH 7, release at 42 °C and with different pH and encapsulation efficiency, after encapsulated with calcein.

The results revealed that the PLC had an adequate size for their use *in vivo*, and that the smallest ones were constituted by LC and polymer. The PLC with 10 % of PP are the exception to this statement. It was demonstrated that the PLC with 10 % PLU, PP and PPD incorporated had the best calcein release profiles for pH 7 and 37 °C. PLC with 10 % PPD had the lowest release values, compared to the ones with 2,5 % and 5 %, and lecithin liposomes. Release studies at a higher temperature (42 °C) and with different pH, were only made to the PLC with 10 % of polymer incorporated, as these demonstrated the best results in the previous release study. Even though the PLC proven to be biocompatible, it was verified that they had a low encapsulation efficiency.

So, the PLC formulated have good characteristics for their utilization *in vivo*, like their biocompatibility, reduced size and temperature sensitiveness. The reduced size favors the PLC stability *in vivo*, since smaller vesicles are less attacked from the immune system than bigger ones. In this way, they have a bigger longevity *in vivo*. The sensitiveness to temperature allows the release of the PLC encapsulated content with the desired conditions. Also the biocompatibility indicates that these systems do not have a toxic effect in healthy cells. In addition, it was showed their potential by the chosen polymers and the way they were synthesized.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Motivação.....	1
1.2 Objetivos	3
2. Revisão Bibliográfica	7
2.1 Os fosfolípidos.....	7
2.2 A bicamada lipídica	9
2.3 As micelas.....	10
2.4 Os lipossomas	11
2.4.1 A composição dos lipossomas e suas características	13
Os lipossomas convencionais	13
Lipossomas de longa circulação.....	13
Lipossomas sensíveis a estímulos	14
Imunolipossomas	22
Lipossomas catiónicos	23
2.4.2 Caracterização dos lipossomas	23
Tamanho e Polidispersividade	23
Potencial Zeta	24
Eficiência de Encapsulação	24
Lamelaridade	25
Concentração de lípidos	25
Libertação <i>in vitro</i>	25
Citotoxicidade	26
2.4.3 Métodos de Produção.....	26
2.4.4 Esterilização dos lipossomas.....	28
2.4.5 Conservação.....	29
2.5 Polímeros	30
2.5.1 Reações de polimerização	30
2.5.2 Polimerização Radicalar Viva	31
3. Materiais e métodos	35
3.1 Materiais	35
3.2 Técnicas.....	35
3.2.1 Dispersão dinâmica da luz (DLS) e Eletroforese de Laser Doppler (LDM)	35
3.2.2 Cromatografia de permeação de gel (GPC)	36
3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	36
3.2.4 Espectroscopia de Infravermelho (ATR-FTIR)	37

3.2.5 Espectrofluorimetria	37
3.3 Métodos	38
3.3.1 Síntese do Pluronic® -2-bromoisobutiril.....	38
3.3.2 Síntese do polímero Pluronic® - Poli(N,N-dimetilaminoetil metacrilato).....	39
3.3.2 Síntese do polímero Pluronic® - Poli (acrilato de <i>tert</i> -butilo).....	40
3.3.3 Síntese do polímero Pluronic® - Poli(ácido acrílico)	40
3.3.4 Formulação de lipossomas	41
3.3.5 Formação de CPL	41
3.3.6 Encapsulação dos CPL.....	41
3.3.7 Determinação da quantidade de lípidos.....	42
3.3.8 Perfis de libertação e eficiência de encapsulação	42
3.3.9 Testes de viabilidade celular	43
4. Resultados e Discussão	45
4.1 Caracterização do iniciador e polímeros.....	45
4.2 Caracterização de Lipossomas Convencionais e de CPL	50
4.3. Perfis de libertação	53
4.4 Determinação da concentração de lípidos e da eficiência de encapsulação	59
4.5 Viabilidade Celular	61
5. Conclusões.....	62
6. Trabalhos Futuros.....	63
6. Bibliografia	64

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura química dos polímeros selecionados.....	3
Figura 2 - Representação esquemática dos lipossomas com Pluronic® incorporado: A – Lipossoma, B – Lipossoma com Pluronic® incrustado, C – Lipossoma com Pluronic® adsorvido ¹⁹	3
Figura 3 - Estrutura de um glicerofosfolípido.....	7
Figura 4 - Estrutura da bicamada lipídica.....	9
Figura 5 - Estrutura química do colesterol.....	10
Figura 6 - Estrutura de uma: A-Micela, B-Micela Reversa.....	10
Figura 7 - Estrutura de um lipossoma.....	11
Figura 8 - Formação de poros pela incorporação de lisolípidos ⁴⁶	16
Figura 9 - Ilustração de um lipossoma com a incorporação de um polímero sensível à temperatura ⁴⁷	16
Figura 10 - Conjugados de PEG sensíveis à redução ⁴⁹	18
Figura 11 - Lípidos mais estudados devido à sua sensibilidade à luz ⁵⁴	20
Figura 12 - Mecanismo de libertação de lipossomas sujeitos a LFUS: (A) Formação de poros hidrofóbicos, através da rutura da bicamada (B) Formação de poros hidrofílicos pela alteração da conformação da bicamada ⁵⁵	21
Figura 13 – Imunolipossomas ⁵⁷	22
Figura 14 - Esquema da polimerização radicalar viva.....	32
Figura 15 - Esquema da síntese do iniciador Plu-Br.....	38
Figura 16 - Representação esquemática da reação de síntese do PPD (Apesar de as cadeias de PDMAEMA crescerem em ambos os lados da cadeia de PLU, devido à presença de dois grupos funcionais, a figura ilustra o que ocorre num dos terminais).....	39
Figura 17 - Representação esquemática da reação de hidrólise do PPtBA.....	40
Figura 18 - Espetro de ATR-FTIR dos polímeros sintetizados.....	48
Figura 19 - Espetro de ¹ H RMN dos polímeros sintetizados: (A) PLU e (B) PLU-Br.....	48
Figura 20 - Espetro de ¹ H RMN dos polímeros sintetizados: (A) PPtBA e (B) PP.....	49
Figura 21 - Espetro de ¹ H RMN do PPD.....	49
Figura 22 - Perfil de libertação dos CPL com LC/PLU.....	55
Figura 23 - Perfil de libertação dos CPL com LC/PP.....	55
Figura 24 - Perfil de libertação dos CPL com LC/SA/PP.....	56
Figura 25 - Perfis de libertação dos CPL com LC/PPD.....	57
Figura 26 - Perfis de Libertação dos CPL com 10 % de polímero.....	57
Figura 27 - Libertação dos CPL a 42 °C.....	58
Figura 28 - Perfil de libertação dos CPL com pH diferentes.....	59
Figura 29 - Quantidade de células viáveis e função da concentração das amostras.....	61

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Os diferentes grupos "R" e respectivos fosfolípidos.....	8
Tabela 2 - Classificação dos lipossomas em relação ao tamanho e número de bicamadas.....	12
Tabela 3 - Formulações aprovadas para o tratamento de algumas doenças ^{13,37}	13
Tabela 4 - Polímeros utilizados na síntese de lipossomas sensíveis à temperatura.....	17
Tabela 5 – Condições e resultados de GPC das sínteses do polímero PP	45
Tabela 6 – Condições e resultados das sínteses do polímero PPD.....	46
Tabela 7 - Tamanho e potencial zeta (média e desvio padrão) dos lipossomas convencionais.....	50
Tabela 8 - Tamanho, polidispersividade e potencial zeta dos CPL.....	51
Tabela 9 - Valores totais de calceína encapsulada nos CPL e lipossomas de LC	54
Tabela 10 - Eficiência de encapsulação e dados necessários ao seu cálculo.....	60

Lista de Abreviaturas

- 2-BiB - Brometo de 2-bromoisobutiril
- AFM - Microscopia de Força Atômica
- ATRP - Polimerização radicalar por transferência atômica
- CHO - Colesterol
- CMC - Concentração Micelar Crítica
- CPL - Complexos Polímero-Lipossoma
- Đ - Polidispersividade
- DLS - Dispersão Dinâmica da Luz
- DMAEMA - 2-Dimetilaminoetil metacrilato
- DSC - Calorimetria Diferencial de Varrimento
- DOPE - Dioleilfosfatidiletanolamina
- GALA - Ácido-Glutâmico-Alanina-Leucina-Alanina
- GC - Cromatografia Gasosa
- GPC - Cromatografia de permeação de gel
- GUV - Vesículas Unilamelares Gigantes
- HCl - Ácido Clorídrico
- HEPES - Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico
- HFMF - Campos magnéticos de elevada frequência
- HFUS - Ultrassons de alta frequência
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
- LC - Lecitina de soja
- LCST - Temperatura crítica inferior de solução
- LFUS - Ultrassons de baixa frequência
- LUV - Vesículas Unilamelares Grandes
- M_n - Peso Molecular numérico
- M_w - Peso Molecular ponderal
- MLV - Vesículas Multilamelares
- MMP - Metaloproteinases de matriz
- MMV - Vesículas Multivesiculares
- MPS - Sistema mononuclear fagocítico

MSPC - Monopalmitoilfosfatidilcolina
NMP - Óxidos de Azoto
OLV - Vesículas Oligolamelares
PA - Ácido Fosfatídico
PAA - Poli(ácido Acrílico)
PC - Fosfatidilcolina
PDT – Terapia Fotodinâmica
PDMAEMA - Poli[2-(N,N-Dimetilamina)etilmecrilato]
PMDETA - 1,1,4,7,7-Pentametildietilenotriamina
PE - Fosfatidiletanolamina
PEG/PEO - Polietileno Glicol/Poli(óxido de etileno)
PEI - Polietilenimina
PI - Fosfatidilinositol
PG - Fosfatidilglicerol
PLU - Polímero Pluronic[®]
PP - Polímero Pluronic[®]-Poli(ácido Acrílico)
PPD - Polímero Pluronic[®]-PDMAEMA
PPO - Poli(óxido de propileno)
PPtBA - Pluronic[®]-Poli(acrilato de *tert*-butilo)
PS - Fosfatidilserina
PVA - Álcool polivinílico
RAFT - Polimerização de transferência de cadeia por fragmentação reversível de adição
RMN - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
ROS - Espécies de oxigênio reativas
SA - Estearilamina
SEC - Cromatografia de Exclusão de Tamanhos
SFRP - Polimerização radicalar livre estável
SUV - Vesículas Unilamelares Pequenas
tBA - Acrilato de *tert*-butilo
T_M - Temperatura de Transição
TEM - Microscopia de Transmissão Eletrônica
TEMPO - 2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidinol

TLC - Cromatografia de Camada Fina

1. Introdução

1.1 Motivação

Os sistemas de liberação controlada têm atraído muita atenção em vários campos da medicina, mais precisamente na engenharia de tecidos ¹, no tratamento do cancro ^{2,3}, de doenças oftalmológicas e pulmonares ⁴⁻⁶, e na terapia gênica ⁷. Devido às limitações associadas aos fármacos convencionais, como a baixa eficácia e os efeitos secundários, têm-se desenvolvido sistemas capazes de aumentar a exposição ao fármaco no local alvo, facilitar o transporte nas barreiras fisiológicas, proteger e minimizar a eliminação prematura do fármaco e prevenir os efeitos adversos nos tecidos saudáveis ⁸⁻¹⁰. Os sistemas de liberação controlada podem ser administrados por via tópica, enteral ou parenteral, dependendo do seu objetivo. Deste modo, têm sido estudados como sistemas de liberação controlada os hidrogéis, as nanopartículas metálicas e poliméricas, as micelas e os lipossomas ^{4,11,12}.

Os lipossomas são vesículas esféricas compostas por moléculas anfifílicas, os fosfolípidos. Estas moléculas possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, atributo que permite a formação de micelas, acima da CMC, e de uma ou mais bicamadas. A formação da bicamada permite que os lipossomas possuam um núcleo aquoso, possibilitando o armazenamento de moléculas no núcleo e também na bicamada, dependendo da sua afinidade ¹³. Ou seja, se a molécula for lipofílica ficará na bicamada, e se for hidrofílica, ficará no núcleo. Como os lipossomas são biocompatíveis, não imunogênicos, biodegradáveis e não tóxicos podem ser utilizados para incorporar fármacos que serão posteriormente libertados em locais alvo, *in vivo* ^{5,14}. Deste modo, os lipossomas têm sido amplamente estudados como sistemas de liberação controlada de fármacos.

O encapsulamento de fármacos no interior dos lipossomas previne a sua degradação devido às ações biológicas do corpo antes de chegarem ao local alvo, e ao mesmo tempo, reduz o aparecimento de efeitos secundários, como por exemplo os que podem decorrer da toxicidade do fármaco, aumentando assim a sua eficácia terapêutica ¹³. No entanto, apesar das vantagens que estas vesículas apresentam, existe uma série de obstáculos que devem ser ultrapassados para assegurar a eficácia destas vesículas. Os lipossomas convencionais são instáveis no corpo, o que reduz o êxito na entrega do fármaco. Portanto, para que seja possível a liberação do fármaco no local desejado e sua estabilidade no corpo é necessário modificar os lipossomas, designadamente através da introdução de moléculas, como por exemplo polímeros, na bicamada ⁵.

A incorporação de polímeros na bicamada forma Complexos Polímero-Lipossoma

(CPL). Estes complexos tornam-se bastante estáveis pois o polímero fornece uma proteção adicional ao lipossoma, baixando a interação deste com os componentes do sistema circulatório⁵. Para além disto, o polímero deve ter a capacidade de induzir o colapso do lipossoma e a consequente libertação do fármaco no local alvo. Assim, são usados polímeros denominados de inteligentes por reagirem a estímulos, como por exemplo ao pH, temperatura, luz, entre outros ^{11,15,16}. A capacidade de resposta aos estímulos provoca alterações das propriedades mecânicas e estruturais dos polímeros (densidade, volume, transparência,...) ⁷. É a variação das propriedades do polímero que provocam a destabilização dos CPL e, consequentemente, a libertação do seu conteúdo.

A escolha do polímero é crucial para a formulação de CPL com as características desejadas. A quantidade de polímero incorporado tem influência na capacidade de encapsulamento e também na libertação das moléculas encapsuladas. A percentagem de polímero incorporado não deve comprometer a libertação, nem dificultar o encapsulamento das moléculas no interior dos CPL. Não só os CPL devem ter uma elevada eficiência de encapsulação, como também devem permitir a libertação do fármaco encapsulado na taxa desejada. Além disso, os polímeros devem ser biocompatíveis e não apresentar imunogenicidade *in vivo*. Os polímeros utilizados nos CPL precisam de ser estáveis nas condições denominadas de fisiológicas (temperatura de 37 °C e pH de 7,4), e apenas devem sofrer modificações quando sujeitos a estímulos.

Para além das propriedades dos polímeros, os CPL têm de cumprir uma série de parâmetros para serem aplicados *in vivo*. Para começar, os CPL devem ter um tamanho inferior a 400 nm para serem adequados à sua administração e ao seu transporte dentro do sistema circulatório. De facto, o tamanho reduzido destas vesículas facilita a interação com as células e a passagem de barreiras fisiológicas, como as membranas celulares e a barreira hematoencefálica. A carga destes sistemas é outro dos fatores que tem influência na estabilidade *in vivo*, e também no armazenamento prévio à sua administração.

Portanto, a inovação presente na formulação de sistemas de libertação controlada, a aplicabilidade nas diversas áreas e a complexidade inerente à síntese destes sistemas, constituem a motivação deste trabalho, cujo objetivo é o desenvolvimento e caracterização de complexos polímero-lipossoma para sistemas inteligentes de libertação controlada.

1.2 Objetivos

Neste trabalho, cujo objetivo é o desenvolvimento dos CPL como sistemas de libertação controlada, estudou-se a formulação de CPL com polímeros com sensibilidade ao pH e à temperatura. Os polímeros selecionados para este fim foram o Pluronic[®] F68, o Poli(ácido acrílico) (PAA) e o Poli[2-(N,N-Dimetilamina) etilmetacrilato] (PDMAEMA) (Figura 1).

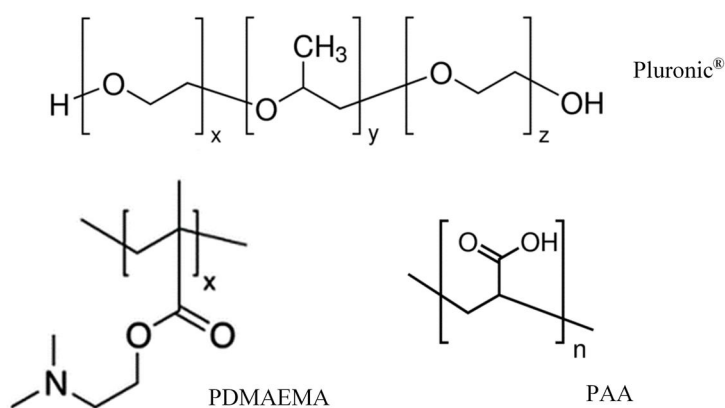


Figura 1 - Estrutura química dos polímeros selecionados

O Pluronic[®], também denominado de poloxamero, é constituído por 3 copolímeros em bloco, mais precisamente por uma cadeia de poli(óxido de propileno) (PPO) e duas de poli(óxido de etileno) (PEO). Como o PPO é hidrofóbico e o PEO hidrofílico, o Pluronic[®] possui características anfifílicas que permitem que a incorporação do polímero em lipossomas possa ser efetuada por adsorção ou por incrustação (Figura 2). Em ambas as configurações, a cadeia de PPO fica posicionada na bicamada lipídica devido à sua hidrofobicidade. Em relação às cadeias de PEO, no caso da incrustação, uma das cadeias fica no exterior do lipossoma e a outra no núcleo. Na adsorção, ambas as cadeias de PEO ficam no exterior do lipossoma^{17,18}.

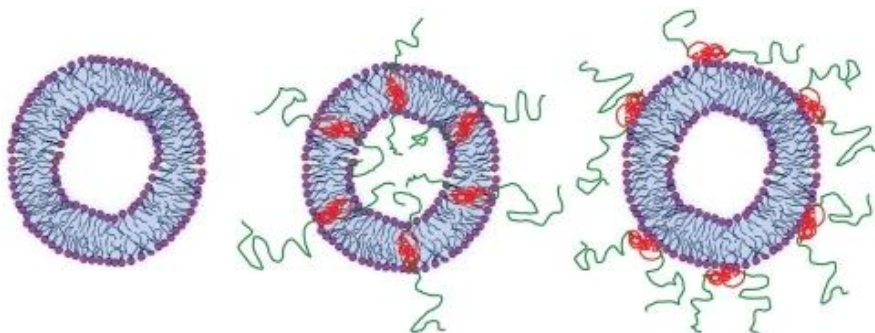


Figura 2 - Representação esquemática dos lipossomas com Pluronic[®] incorporado: A – Lipossoma, B – Lipossoma com Pluronic[®] incrustado, C – Lipossoma com Pluronic[®] adsorvido¹⁹

O Pluronic[®] tem demonstrado o seu potencial para sistemas de libertação controlada devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade, e também devido à sua sensibilidade à temperatura ^{11,18,20}. O polímero tem a capacidade de aumentar a permeação de um fármaco na Barreira hematoencefálica ^{18,21}, de se acumular em células cancerosas resistentes a múltiplos fármacos ^{22,23} e de alterar a microviscosidade das células ²². Portanto, este polímero tem propriedades físicas e biológicas, que o tornam vantajoso como elemento de ancoragem do PAA e do PDMAEMA aos lipossomas.

O PAA é um polímero com bastante potencial para sistemas de libertação controlada. Para além de ser biocompatível e de possuir propriedades mucoadesivas, este é sensível ao pH graças aos grupos carboxílicos presentes na sua estrutura ^{5,6}. A diminuição do pH altera a conformação do polímero para uma estrutura compacta, devido à protonação que este sofre. Por sua vez, o aumento provoca a expansão do PAA graças à perda de prótons da sua estrutura²⁴. Quando o PAA é incorporado nos lipossomas, pode ser reticulado através dos grupos carboxílicos, e, portanto, forma uma estrutura com a forma de uma jaula em redor dos mesmos, que fornece estabilidade e resistência mecânica ^{5,7}.

O PDMAEMA tem sido investigado para materiais de entrega de genes, para entrega de fármacos por micelas e revestimento de nanopartículas magnéticas no tratamento de cancro, e recentemente, para a formação de CPL ^{14,25-27}. O interesse neste polímero reside na sua biocompatibilidade, hidrofiliçidade e sensibilidade ao pH e à temperatura, mais precisamente numa gama de 38 - 40 °C ^{27,28}. Deste modo, o PDMAEMA é adequado para aplicações farmacêuticas e biomédicas.

O PAA e o PDMAEMA foram ancorados ao Pluronic[®] através de reações de polimerização radicalar viva (ATRP). Para sintetizar os polímeros para incorporar nos CPL, formou-se previamente o iniciador da polimerização pela esterificação do Pluronic[®] e do Brometo de 2-bromoisobutiril. Além disso, o PAA formou-se pela hidrólise do poli(acrilato de *tert*-butilo).

Com os polímeros escolhidos e sintetizados, e uma vez que se pretende descobrir a melhor formulação, formaram-se CPL com diferentes quantidades de polímero. A quantidade de polímero incorporado influencia a capacidade dos CPL responderem aos estímulos, e também a capacidade de encapsular e libertar moléculas. Deste modo, o estudo da razão lípido-polímero, dos perfis de libertação e da eficiência de encapsulação tem de ser efetuado para atingir a melhor formulação. Visto que foram escolhidos polímeros sensíveis à temperatura e ao pH, o estudo da estabilidade com a variação destes parâmetros é crucial para obter a melhor formulação.

Para a formulação dos CPL, escolheu-se como componente base a Lecitina de soja. Devido ao seu baixo custo, disponibilidade e segurança, a lecitina é um composto muito atrativo para aplicações farmacêuticas. A Lecitina tem carga negativa e é constituída por uma mistura de fosfolípidos, maioritariamente por fosfatidilcolina ²⁹. Uma vez que o polímero sintetizado com PAA, o PP, possui carga negativa, é necessário adicionar um composto positivo à bicamada, para não existirem repulsões eletrostáticas entre o polímero e a superfície dos lipossomas e neutralizar parcialmente a carga destes, de modo a que ocorra a incorporação do polímero ⁵. Para tal, estudou-se a influência da adição da Estearialamina ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2$), cuja carga é positiva, na caracterização dos CPL. Em relação, aos co-polímeros de Pluronic[®] e PDMAEMA, não é necessária a adição deste composto, uma vez que o Pluronic[®] é um surfactante não iónico e o PDMAEMA possui carga positiva ^{14,30}.

A identificação da melhor formulação também é efetuada por testes de caracterização (tamanho, polidispersividade, potencial zeta) e pelo teste da viabilidade celular. Os CPL devem ser biocompatíveis e devem ter um tamanho adequado para serem utilizados *in vivo*. Além disso, o potencial zeta deve ser elevada (em valor absoluto), para garantir que os CPL não se agregam ¹³. A agregação é indesejada, tanto pelo facto de se pretender que os CPL possuam um tamanho inferior a 400 nm, e por provocar a libertação precoce do conteúdo encapsulado no caso de estes serem armazenados.

Em suma, os objetivos deste trabalho residem na identificação da melhor formulação com sensibilidade aos estímulos escolhidos, com uma elevada eficiência de encapsulação de calceína (no caso deste trabalho), com uma taxa de libertação baixa em condições fisiológicas, com um tamanho adequado para os CPL serem aplicados *in vivo*, com um potencial zeta elevado, próximo dos 30 mV (em valor absoluto) ³¹ e que sejam biocompatíveis com as células.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Os fosfolípidos

Os fosfolípidos são moléculas que pertencem à família dos lípidos. Estas biomoléculas destacam-se dos restantes lípidos devido à sua natureza anfifílica, decorrente da sua composição característica. A sua natureza deve-se à presença de uma cabeça polar e de duas caudas apolares, que conferem à molécula uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. No entanto, os fosfolípidos podem dividir-se em duas classes de acordo com os álcoois que contenham. As classes a que os fosfolípidos pertencem são os glicerofosfolípidos e as esfingomielinas ³².

Os glicerofosfolípidos são os compostos maioritários das membranas plasmáticas das células eucarióticas. A sua estrutura apresenta uma cabeça constituída por um grupo fosfato, por glicerol e também por um grupo “R” (Tabela 1), e por duas caudas compostas por ácidos gordos (Figura 3). A classificação da estrutura química dos glicerofosfolípidos reside no grupo “R”, mas também no tamanho e saturação das cadeias que compõem as caudas, no número de cadeias alifáticas e na ligação entre grupos alifáticos e a cadeia que contém o glicerol ³².

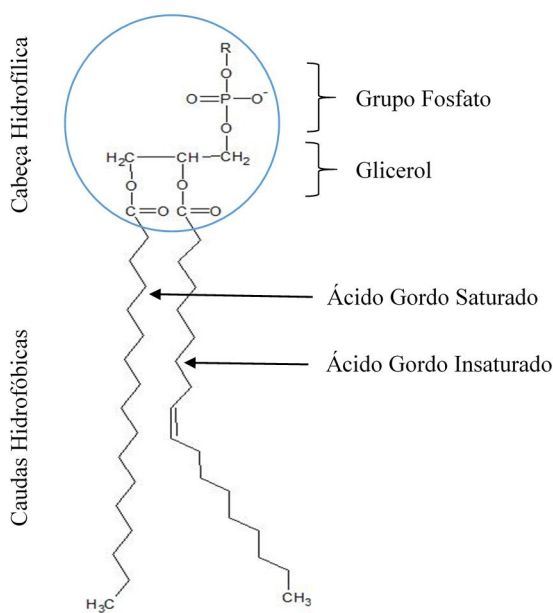


Figura 3 - Estrutura de um glicerofosfolípido

O grupo “R” permite a diferenciação de alguns glicerofosfolípidos, sendo os mais conhecidos a fosfatidilcolina (PC), a fosfatidiletanolamina (PE) e a fosfatidilserina (PS). Estes são também alguns dos fosfolípidos mais usados para a formulação de lipossomas ^{13,32}.

Tabela 1 - Os diferentes grupos "R" e respectivos fosfolípidos

Nome	Grupo	Abreviatura	Carga a pH neutro
Fosfatidilcolina	-CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	PC	0
Fosfatidiletanolamina	-CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	PE	0
Fosfatidilserina	-CH ₂ CHNH ₃ ⁺ COO ⁻	PS	-1
Ácido Fosfatídico	-H	PA	-1
Fosfatidilinositol	-HC ₆ H ₅ (OH) ₅	PI	-1
Fosfatidilglicerol	-CH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	PG	-1

Como já foi dito, outra forma de identificar os glicerofosfolípidos baseia-se na ligação entre as cadeias alifáticas e o glicerol. Esta ligação pode ser do tipo éter ou éster, sendo os fosfolípidos com a ligação éter denominados de plasmogénios. O número de cadeias alifáticas, também pode ser um elemento diferenciador. Deste modo, é possível identificar os lisofosfolípidos, pois estes apenas possuem uma cadeia alifática, ou seja, uma cauda ³².

As esfingomielinas têm uma estrutura semelhante à fosfatidilcolina. A sua distinção provém da esfingosina presente na cabeça do fosfolípido, em substituição do glicerol, da capacidade de formação de ligações intramoleculares e intermoleculares (pontes de hidrogénio), que permite que a bicamada de esfingomielina possua características macroscópicas diferentes da bicamada de PC, e da gama da temperatura de transição (T_M)¹, que é superior à da Lecitina natural ³².

Os fosfolípidos podem ser de origem natural ou sintética. As principais fontes dos fosfolípidos de origem natural são os óleos vegetais, como o óleo de soja e de girassol, e os tecidos animais. Dentro dos tecidos animais, a gema de ovo, é o tecido animal que possui a maior importância para a obtenção de fosfolípidos. Apesar de ambas as fontes serem utilizadas, o conteúdo de fosfolípidos é diferente para os tecidos animais e os óleos vegetais. No caso da gema de ovo, o conteúdo de PC maior comparativamente com os óleos vegetais. Outra distinção reside nas esfingomielinas presentes nos tecidos animais, sendo algo característico desta fonte ³².

Os fosfolípidos de origem sintética podem ser obtidos por síntese total e semi-síntese. No caso da semi-síntese, os compostos são de origem natural, sendo apenas efetuadas algumas alterações da estrutura química, como por exemplo a substituição da cabeça do fosfolípido. Comparando a síntese total com a semi-síntese, a primeira envolve mais passos de reação. A síntese total envolve mais passos de reação; são estabelecidas ligações éter ou éster entre os grupos apolares e o glicerol, e também se dá a ligação da cabeça polar ³².

¹ T_M – Temperatura ao qual ocorre a transição dos fosfolípidos da fase de gel para a fase fluida

Como já foi dito, os fosfolípidos possuem propriedades únicas graças à sua composição característica. Uma vez que estes têm uma parte polar e outra apolar, é possível que estes se organizem de várias formas, dependendo do meio em que se encontram. Assim, estas moléculas são capazes de formar micelas, mas também bicamadas lipídicas, que permite, por sua vez, a formação de lipossomas.

2.2 A bicamada lipídica

A bicamada lipídica é composta por duas camadas adjacentes de fosfolípidos, orientadas de uma forma específica (Figura 4). Esta possui a região apolar voltada para o interior, e a polar para o exterior.

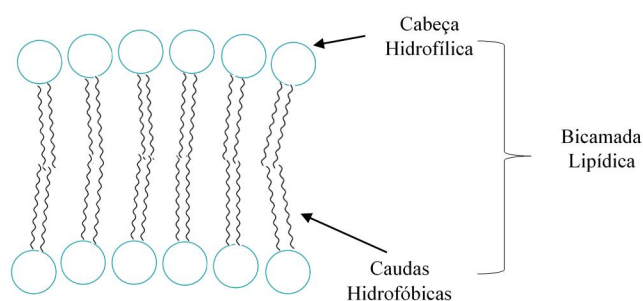


Figura 4 - Estrutura da bicamada lipídica

A bicamada é a estrutura que compõe a membrana plasmática das células eucarióticas. Devido às características físicas e químicas dos fosfolípidos, a bicamada torna-se uma membrana semipermeável, que apenas permite a passagem de solutos lipofílicos e impede a passagem de iões e de moléculas hidrofílicas³³. Para que ocorra a passagem destes, é necessário que a membrana possua proteínas especializadas no transporte. No caso de os solutos possuírem um tamanho elevado, é possível que o transporte ocorra por via de vesículas formadas pelo processo de endocitose e exocitose. Além das proteínas, a bicamada incorpora colesterol (Figura 5) como elemento essencial à fluidez, à espessura e à compressibilidade desta³⁴.

O colesterol é sintetizado no retículo endoplasmático presente nas células e transportado para a membrana plasmática pelo complexo de Golgi. Este também é armazenado sob a forma de lipoproteínas na corrente sanguínea³⁴. Ao introduzir colesterol na bicamada, a sua estabilidade aumenta, uma vez que este composto reduz o movimento *flip-flop* natural dos fosfolípidos¹³. Isto deve-se à estrutura rígida deste composto e à sua interação com os fosfolípidos, que permite assim a redução da fluidez da membrana.

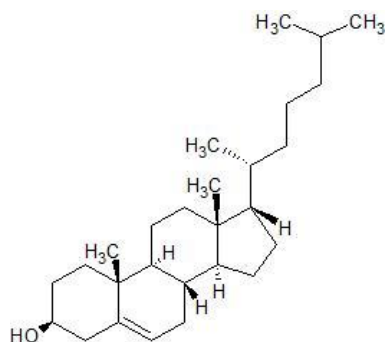


Figura 5 - Estrutura química do colesterol

2.3 As micelas

As micelas são estruturas esféricas resultantes da agregação de fosfolípidos. Esta agregação ocorre quando a concentração destas moléculas no meio é superior ou igual à concentração micelar crítica (CMC). Dependendo do meio, os fosfolípidos podem orientar-se de forma diferente, condicionando assim o tipo de micelas que criam.

Os fosfolípidos em meio aquoso formam micelas com a parte hidrofílica exposta ao meio, ou seja, a região polar das moléculas fica em contacto com o meio (Figura 6-A). Quanto à região hidrofóbica, esta fica protegida, não havendo assim interações com o meio. No caso do meio ser constituído por um solvente orgânico, os fosfolípidos formam micelas reversas (Figura 6-B). Estas micelas possuem a região hidrofóbica exposta ao meio e a hidrofílica voltada para o interior. Portanto, a diferença entre estas e as descritas anteriormente reside na orientação dos fosfolípidos.

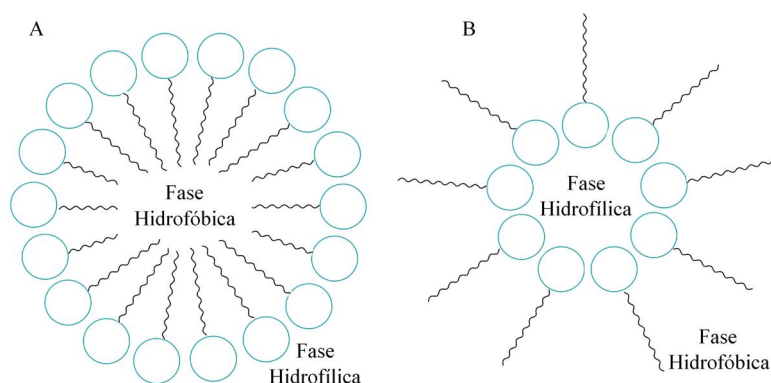


Figura 6 - Estrutura de uma: A-Micela, B-Micela Reversa

Devido a estas particularidades, mas também à sua biocompatibilidade e imunogenicidade, as micelas compostas por fosfolípidos têm sido estudadas para a entrega de fármacos pouco solúveis em água³⁵. Através da incorporação de polímeros, são formuladas

micelas poliméricas com características adequadas para serem utilizadas *in vivo*. Estas características são a sua biodegradabilidade, a liberação controlada do fármaco e um tempo de vida longo no sistema circulatório ³. A combinação com o poli(etileno glicol) (PEG) provou ser bastante eficaz e adequada para a entrega de agentes terapêuticos e de diagnóstico no tratamento do enfarte do miocárdio ³⁵. Contudo, apesar da incorporação do PEG em micelas exibir um elevado potencial como sistema de liberação controlada, a sua seletividade no reconhecimento de células cancerosas continua a ser um desafio ³⁵. Para ultrapassar esse desafio, têm sido estudadas outras soluções, como a incorporação de outros polímeros ou compostos, que reajam a estímulos e que identifiquem o alvo *in vivo*.

2.4 Os lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas constituídas por fosfolípidos (Figura 7). Devido às suas características anfifílicas, os fosfolípidos permitem a formação de uma bicamada ou de múltiplas, formando assim vesículas unilamelares ou multilamelares. Dependendo do número de bicamadas, os lipossomas podem possuir vários tamanhos (Tabela 2) ^{13,31}. A presença da bicamada permite que estas estruturas possuam um núcleo aquoso, com a capacidade de armazenar moléculas hidrofílicas, e também permite que sejam armazenadas moléculas hidrofóbicas na mesma ^{5,13}.

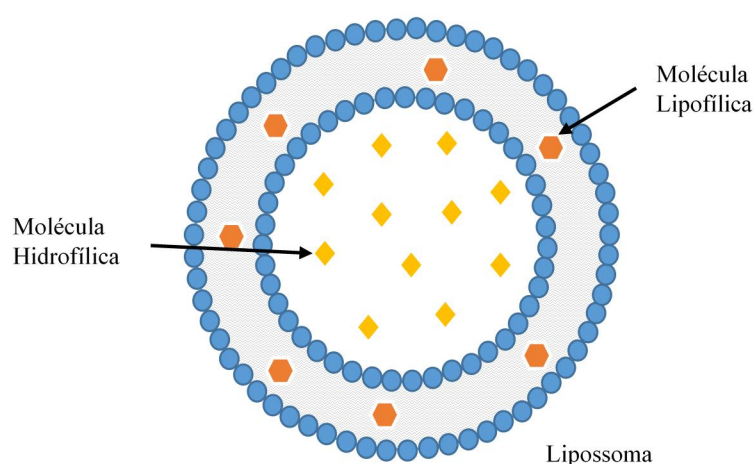


Figura 7 - Estrutura de um lipossoma

Tabela 2 - Classificação dos lipossomas em relação ao tamanho e número de bicamadas

Classificação	Diâmetro (nm)
Vesículas Unilamelares Pequenas (SUV)	20-100
Vesículas Unilamelares Grandes (LUV)	>100
Vesículas Unilamelares Gigantes (GUV)	>1000
Vesículas Oligolamelares (OLV)	100-1000
Vesículas Multilamelares (MLV)	>500
Vesículas Multivesiculares (MMV)	>1000

A capacidade de armazenamento de moléculas, a biodegradabilidade, a biocompatibilidade e a não imunogenicidade torna estas estruturas adequadas para sistemas de libertação controlada de fármacos ³¹. Para além disto, estas estruturas permitem que haja um aumento da solubilidade e da estabilidade de fármacos, prevenindo a degradação destes antes de chegarem ao local alvo *in vivo* ¹³. Desta forma, a eficácia dos fármacos é aumentada, reduzindo os efeitos secundários e a sua toxicidade. No entanto, ainda existem desafios a ultrapassar nas formulações de lipossomas para a entrega de fármacos, sendo o maior a estabilidade destas vesículas *in vivo*.

A estabilidade dos lipossomas é fulcral para a entrega do fármaco no local alvo. Para começar, é necessário assegurar que a bicamada é estabilizada, pois o facto de os fosfolípidos possuírem um movimento natural intrínseco aumenta a possibilidade do fármaco evadir-se do seu interior. Usualmente, é adicionado colesterol para estabilizar a bicamada. No entanto, a quantidade de colesterol que é adicionada terá efeito na eficiência de encapsulamento e de libertação do fármaco pelos lipossomas. O facto de o sistema imunitário atacar estas vesículas quando são administradas, é causa da instabilidade destas *in vivo* ⁵. Assim, são adicionados polímeros e outros compostos, como açúcares ³⁶, para aumentar a estabilidade e fornecer funcionalidades adicionais. Portanto, os lipossomas também podem ser classificados segundo a sua composição, dividindo-se em cinco tipos ¹³: convencionais; de longa circulação; catiónicos; sensíveis a estímulos e imunolipossomas.

Os lipossomas possuem várias aplicações: na cosmética, na indústria alimentar e na medicina, sendo a última a que assume maior importância é a medicina. O tratamento do cancro é o campo que tem sido mais estudado, no entanto, também existem formulações aprovadas para o tratamento de infeções e meningite neoplásica, para anestésias, entre outras (Tabela 3)³⁷.

Tabela 3 - Formulações aprovadas para o tratamento de algumas doenças ^{13,37}

Medicamento	Fármaco	Terapia	Ano de aprovação
Doxil/Caelyx (Johnson & Johnson)	Doxorrubicina	Sarcoma de Kaposi	1995
		Cancro do ovário	1999
		Cancro da mama	2003
		Mieloma Múltiplo	2007
Amphotec (Intermune)	Anfotericina B	Aspergilose Invasiva	1996
Diprivan (AstraZeneca)	Propofol	Anestésico	1986
Marqibo (Talon)	Vincristina	Leucemia Limfoblástica Aguda	2012

2.4.1 A composição dos lipossomas e suas características

Os lipossomas convencionais

Os lipossomas convencionais são constituídos por fosfolípidos, podendo também conter colesterol. Estes possuem carga negativa ou neutra devido à carga dos fosfolípidos que os constituem. Os lipossomas convencionais são caracterizados por um curto tempo de vida no sistema circulatório, uma vez que são fortemente atacados pelo sistema imunitário ⁵. Apesar destes obstáculos, os lipossomas convencionais possuem algumas aplicações. Estes são administrados por via parenteral através de vacinas, para o tratamento de infeções virais, bacterianas e parasíticas ³⁸. A entrega de antigénios também é outra das aplicações destas vesículas, assim como a entrega de imunomoduladores para aumentar a capacidade de destruição de células neoplásicas por parte dos macrófagos, e para aumentar a resistência a microrganismos infecciosos ³⁸.

Lipossomas de longa circulação

O tempo de vida dos lipossomas convencionais corresponde a um obstáculo no uso destas vesículas para entrega de fármacos. Como tal, devido à necessidade de ter sistemas com maior longevidade, cuja eficácia da entrega não fosse comprometida, surgiram os lipossomas

de longa circulação, constituídos pela composição base dos lipossomas convencionais, mas diferenciando-se destes pela inclusão de polímeros na sua bicamada lipídica ³⁹.

Os polímeros incorporados são inertes e biocompatíveis, não devendo possuir toxicidade e imunogenicidade. Como tal, alguns dos polímeros estudados para a integração em lipossomas de longa circulação foram o Poli(etileno glicol) PEG, o Poli N-(2-hidroxipropil) metacrilamida e o poli(álcool vinílico) (PVA) ⁴⁰. Deste conjunto de polímeros, o que tem sido mais estudado e utilizado para a criação de lipossomas de longa circulação é o PEG. Para além de ser inerte e biocompatível, o PEG é também hidrofílico e possui uma flexibilidade elevada ⁶. A sua inclusão nos lipossomas forma uma camada protetora sobre a superfície, que evita que os lipossomas sejam atacados pelas células do sistema mononuclear fagocítico (MPS) ³⁹. Assim, existe um aumento da longevidade dos lipossomas *in vivo*, que permite a acumulação destes no local alvo e, por sua vez, a libertação do fármaco de uma forma eficaz. Deste modo, os lipossomas com PEG têm sido aplicados não só em estudos para o tratamento de cancro ^{13,41,42}, mas também no tratamento da esclerose múltipla ⁴³. Contudo, os lipossomas de longa-circulação apresentam alguns inconvenientes, como a taxa de libertação da substância ativa baixa, ou a incapacidade de fundirem com o endossoma (formado pelo processo de endocitose) após a sua internalização ³⁹. Deste modo, é necessário que os lipossomas sejam modificados de forma a terem longevidade, mas também a ultrapassarem estes obstáculos.

Lipossomas sensíveis a estímulos

Nos últimos anos, o desenvolvimento de lipossomas sensíveis a estímulos para sistemas de libertação controlada tem sido substancial. A capacidade de resposta a estímulos permite a libertação do fármaco no local alvo, através do colapso/destabilização dos lipossomas. A sua destabilização ocorre devido a alterações do meio em que estão inseridos. Estas alterações podem ser relativas ao pH, ao potencial redox, à temperatura, ao campo magnético ou à luz. Portanto, para reagirem a estas variações, os lipossomas têm integrar substâncias específicas na sua composição, com a capacidade de responder aos estímulos referidos. As substâncias adicionadas na sua formulação podem ser polímeros, péptidos, nanopartículas, agentes fotossensíveis, entre outros ^{13,37,44}.

- **Lipossomas sensíveis ao pH**

Os lipossomas sensíveis ao pH são sistemas de libertação que reagem à acidificação que ocorre em tecidos inflamados e em células tumorais. Estes são criados para serem estáveis

a um pH de 7,4 (pH normal do sangue) e degradarem a um pH menor que 6^{13,45}. A mudança do pH provoca a modificação da permeabilidade da bicamada lipídica através da protonação/desprotonação dos grupos funcionais, que por sua vez, induz alterações morfológicas na mesma⁴⁴. Para a formulação dos lipossomas sensíveis ao pH, podem ser utilizados péptidos fusogénicos, como GALA (Ácido-Glutâmico-Alanina-Leucina-Alanina), que garantem a integridade dos lipossomas a pH normal, mas que se tornam hidrofóbicos a pH ácidos, facilitando a fusão com as membranas celulares, e a libertação do fármaco no local alvo^{13,44}. Também pode ser utilizado o PEG combinado com grupos funcionais, como éster e hidrazona, para criar lipossomas com longo tempo de circulação e que respondem as diferenças de pH. Os polímeros sensíveis ao pH são compostos que podem ser incorporados na bicamada dos lipossomas. A libertação das moléculas encapsuladas em lipossomas deste tipo pode ocorrer através da hidrólise ou dissolução do polímero, e também pela protonação dos grupos sensíveis ao pH, que provoca um inchaço do mesmo²⁶. Alguns dos polímeros que têm sido estudados para a produção de lipossomas sensíveis ao pH são o poli(ácido acrílico) (PAA), o poli[2-(N,N-Dimetilamina)etilmetacrilato] (PDMAEMA) e poli(etilenimina) (PEI)^{14,16}.

- Lipossomas sensíveis à temperatura

Os fosfolípidos são moléculas que possuem dois estados: o estado de gel e o estado de fluido. A temperatura que marca a passagem de um estado para outro denomina-se temperatura de transição de fases (T_M). Abaixo desta, os fosfolípidos encontram-se no estado gel, e acima, em estado fluido. Devido a esta característica, os lipossomas são inerentemente sensíveis à temperatura, o que torna a escolha do tipo de fosfolípido essencial para a estabilidade do lipossoma e do fármaco encapsulado¹³. Para aplicações *in vivo*, os lipossomas devem ser compostos por fosfolípidos que estejam em fase de gel à temperatura fisiológica (37 °C) e passem para uma fase fluida acima desta temperatura. Esta transição torna a libertação possível em áreas patológicas, como tumores e zonas inflamadas, que são caracterizadas pela sua hipertermia¹⁵. Também ocorre libertação quando é aplicado calor externamente na área desejada, através de banhos e pulsos eletromagnéticos¹³. Deste modo, a temperatura é considerada um estímulo para a formulação de sistemas de libertação controlada.

Os lipossomas respondem à temperatura naturalmente devido aos lípidos que os constituem. Contudo, para a formulação de sistemas sensíveis à temperatura, podem ser incorporados também lisolípidos e polímeros com a capacidade de responderem à temperatura¹⁷. Os lisolípidos diferenciam-se dos fosfolípidos pela presença de apenas uma cauda hidrofóbica. Quando incorporados em lipossomas, durante a transição de fases, acumulam-se

em locais específicos na bicamada formando “poros” através da sua inversão para uma estrutura micelar (Figura 8). A formação destes poros causa a destabilização dos lipossomas e a libertação do fármaco encapsulado ¹³. O uso do lisolípido Monopalmitoilfosfatidilcolina (MSPC) incorporado em lipossomas para a entrega de Doxorrubina (ThermoDox), já provou a eficácia destes sistemas de libertação em testes com ratos ¹⁵. De facto, o ThermoDox tem sido aplicado em ensaios clínicos para o tratamento de vários tipos de cancro. No entanto, foi observado que os lisolípidos dissociavam-se rapidamente dos lipossomas em meio fisiológico, após a sua administração, devido às interações com as proteínas presentes no plasma. Estas interações provocavam a destabilização dos lipossomas e a libertação da Doxorubina antes de chegar ao local alvo ^{13,17}.

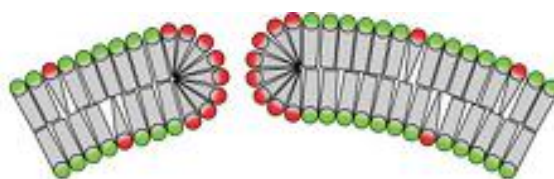


Figura 8 - Formação de poros pela incorporação de lisolípidos ⁴⁶

Como foi dito, os polímeros também podem ser utilizados para a formulação de sistemas sensíveis à temperatura. Para a sua formulação, são utilizados polímeros solúveis em água à temperatura fisiológica (37 °C), e que se tornam hidrofóbicos ao serem submetidos a calor ^{13,17}. Esta característica deve-se à alteração do estado das pontes de hidrogénio formadas entre o polímero e as moléculas de água adjacentes. A transição entre os estados está associada à transição da temperatura crítica inferior de solução (LCST) (Figura 9). Para serem incorporados nos lipossomas, os polímeros devem ser miscíveis no solvente (água) abaixo desta temperatura. A transição da LCST provoca a quebra da membrana dos lipossomas, devido à mudança de estado do polímero, permitindo assim a libertação dos compostos encapsulados ^{13,17}. Para a produção destes sistemas, podem ser utilizados polímeros naturais, como quitosano e celulose, e sintéticos, como poli(N-isopropilacrilamida) e poloxameros (Tabela 4) ^{13,17}.

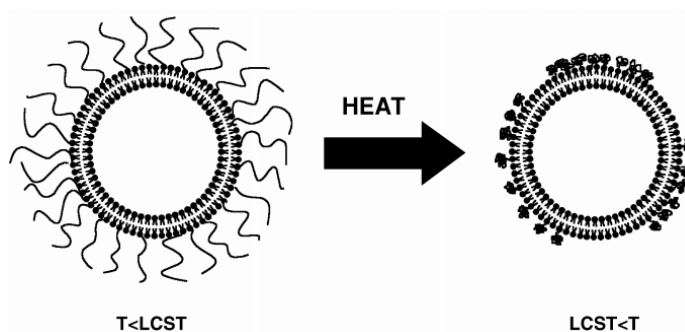


Figura 9 - Ilustração de um lipossoma com a incorporação de um polímero sensível à temperatura ⁴⁷

Tabela 4 - Polímeros utilizados na síntese de lipossomas sensíveis à temperatura

Naturais	Sintéticos
Quitosano	Poli(N-isopropilacrilamida)
Celulose	Poli(N-viniléteres)
Gelatina	Poloxameros (Pluronic [®])
	Poli(N-alquilaminas)
	Poli(N-aminoetil metacrilatos)
	Polietileno glicol e Metacrilatos de
	Polietileno Glicol
	Poli(N-alquilo oxazolinás)

- Lipossomas sensíveis a enzimas

As enzimas são fundamentais para a regulação da atividade celular *in vivo*. Estas são afetadas pela presença de uma doença, provocando a sua desregulação. O cancro e a artrite inflamatória são doenças que provocam uma sobre-expressão de enzimas, como a fosfolipase A₂, as metaloproteinases de matriz (MMP) e lisozimas, entre outras^{13,16,48}. Assim, é possível usar a desregulação da atividade enzimática como um alvo para os lipossomas.

A composição dos lipossomas sensíveis às enzimas depende do seu alvo, ou seja, da enzima que detetam. No caso da sobre-expressão em células tumorais da fosfolipase A₂, verifica-se que esta enzima é mais ativa a lipossomas com PEG, do que sem este polímero. Isto deve-se à carga negativa dos lípidos com PEG incorporados nos lipossomas, como por exemplo o 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(poli(etileno glicol))-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀). A libertação do conteúdo dos lipossomas é consequência da atividade da enzima sobre os lipossomas, que induz uma mudança morfológica da bicamada para uma estrutura micelar, por formação de lisolípidos. Deste modo, foi estudada a relação entre a composição dos lipossomas e a atividade da fosfolipase A₂, no qual obtiveram-se formulações que permitem a libertação rápida de Doxorubicina, através da modificação da membrana dos lipossomas⁴⁸. Quanto às MMP, podem ser utilizados substratos, como péptidos, proteínas e polímeros, para o reconhecimento destas enzimas na formulação de lipossomas¹⁶.

- Lipossomas sensíveis ao potencial redox

A diferença de potencial entre os tecidos saudáveis e os tecidos tumorais, ou entre o meio extracelular (potencial oxidante) e intracelular (potencial redutor) pode ser considerada

um estímulo para a formulação de sistemas de libertação controlada ^{15,49}. A formulação de lipossomas baseia-se na utilização de agentes redox, como as ligações dissulfureto, que são anexadas a lípidos e incorporadas na bicamada. Estas ligações são fortemente destabilizadas no meio intracelular pela glutatona (antioxidante). A glutatona está presente no interior das células, designadamente nas mitocôndrias, no citosol e no núcleo, numa concentração de 2-20 μM . No entanto, na presença de tumores, esta é 100 vezes superior, o que torna esta diferença um alvo para lipossomas sensíveis ao potencial redox ¹⁶. Assim, na presença deste oxidante, as ligações dissulfureto são oxidadas, provocando a libertação do conteúdo encapsulado nos lipossomas ⁴⁹.

Para além das ligações dissulfureto, também é utilizado PEG combinado com outros compostos, que originam conjugados de PEG (Figura 10). O PEG forma uma camada protetora à volta dos lipossomas. A camada é removível através da sua sensibilidade à redução, o que permite que sejam desenvolvidos lipossomas com a sensibilidade ao potencial redox e a outros estímulos, como o pH ⁴⁹. No entanto, o uso de polímeros sensíveis à redução tem desvantagens. Para os lipossomas serem sensíveis ao potencial redox, é preciso uma concentração elevada de agentes redutores presentes no local alvo. Como a maioria dos lipossomas entra nas células pelo processo de endocitose, verifica-se que a reação de redução do dissulfureto é muito lenta devido à ligeira acidez do meio ⁴⁹. Além disto, se os lipossomas forem degradados nos endossomas, não chegarão ao citosol, onde a atividade redutora é maior.

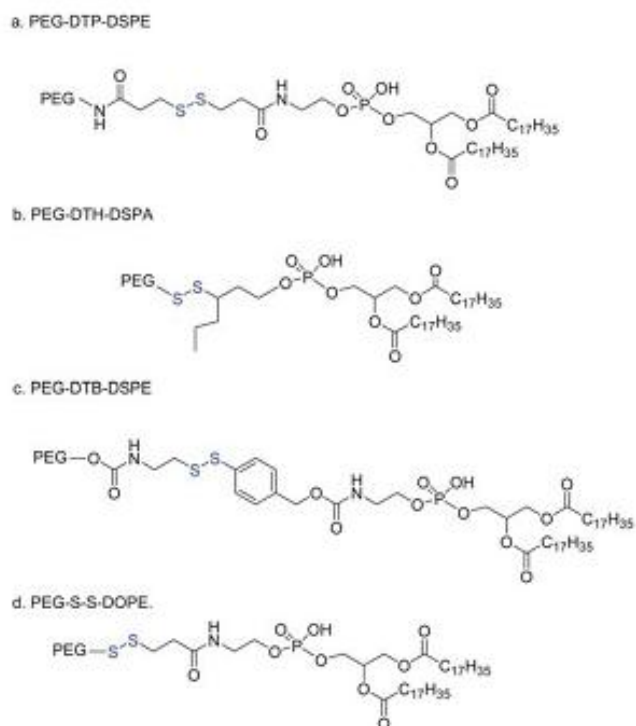


Figura 10 - Conjugados de PEG sensíveis à redução ⁴⁹

- Lipossomas sensíveis ao campo magnético

As nanopartículas magnéticas têm sido bastante estudadas devido às suas propriedades físicas e natureza biocompatível⁵⁰. Uma das propriedades físicas de maior relevância é a capacidade de responderem ao campo magnético. Esta capacidade permite que estas partículas sejam aplicadas em sistemas de libertação controlada sensíveis a estímulos, como por exemplo, em lipossomas^{50,51}.

Os lipossomas sensíveis ao campo magnético incorporam nanopartículas magnéticas na bicamada lipídica⁵². A capacidade destas responderem fortemente ao campo magnético, permite que os lipossomas possam acumular-se no local alvo pela aplicação externa do estímulo. Deste modo, estes sistemas de libertação podem ser usados em tratamentos de quimioterapia, e também como agentes de contraste em ressonâncias magnéticas⁵¹. A aplicação de campos magnéticos de elevada frequência (HFMF) na quimioterapia provoca hipertermia nas células tumorais. Como as células tumorais são mais sensíveis à temperatura, isto permite a sua destruição e a preservação das células saudáveis em volta^{13,51,52}. Assim, a interação das nanopartículas presentes nos lipossomas com o campo magnético permite que o fármaco seja libertado rapidamente após a exposição, e induz um aumento de temperatura benéfico no tratamento do cancro⁵⁰. As nanopartículas mais utilizadas nos lipossomas sensíveis ao campo magnético são de óxido de ferro (Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)^{13,50,52}. A incorporação destas nanopartículas em lipossomas com PEG cria lipossomas bastante estáveis e com longevidade *in vivo*¹³.

- Lipossomas sensíveis à luz

Os lipossomas sensíveis à luz apresentam um grande potencial para sistemas de libertação controlada. A sensibilidade à luz deve-se à incorporação de agentes fotossensíveis, que podem ser lípidos ou moléculas¹³. Além destes, a integração de nanopartículas, como nanopartículas de ouro, também tem sido considerada para a formulação destes sistemas. Estas partículas exibem propriedades condutoras fotoquímicas que são úteis a várias áreas da medicina, salientando-se as ressonâncias e o tratamento de cancro⁵³.

A utilização de lípidos como agente fotossensível implica a modificação química de fosfolípidos. Esta pode ocorrer em três regiões da molécula: no grupo presente na cabeça, na cadeia de glicerol ou nas caudas de ácidos gordos⁵⁴. As caudas têm sido a área mais focada, uma vez que o tamanho e a saturação da cadeia condicionam o empacotamento dos fosfolípidos nos lipossomas (Figura 11). A modificação dos lípidos introduz defeitos que

tornam a bicamada lipídica instável e suscetível à luz ⁵⁴. Assim, esta sensibilidade permite a libertação das moléculas encapsuladas nos lipossomas.

Para além da utilização dos fosfolípidos modificados, também podem ser incorporadas, simultaneamente, moléculas fotossensíveis. Derivados de porfirina, ftalocianinas e compostos clorados são exemplos de moléculas usadas para este fim ¹³. A sua incorporação em lipossomas é de particular importância no combate ao cancro pela terapia fotodinâmica (PDT). A PDT ativa os agentes fotossensíveis presentes nos lipossomas, e gera espécies de oxigénio reativas (ROS) que destroem as células tumorais alvo luz ⁵⁴. Até agora, devido às características hidrofóbicas e à limitação das moléculas alcançarem o local alvo na forma ativa, existe apenas uma formulação utilizada na PDT denominada de *Visudyne*.

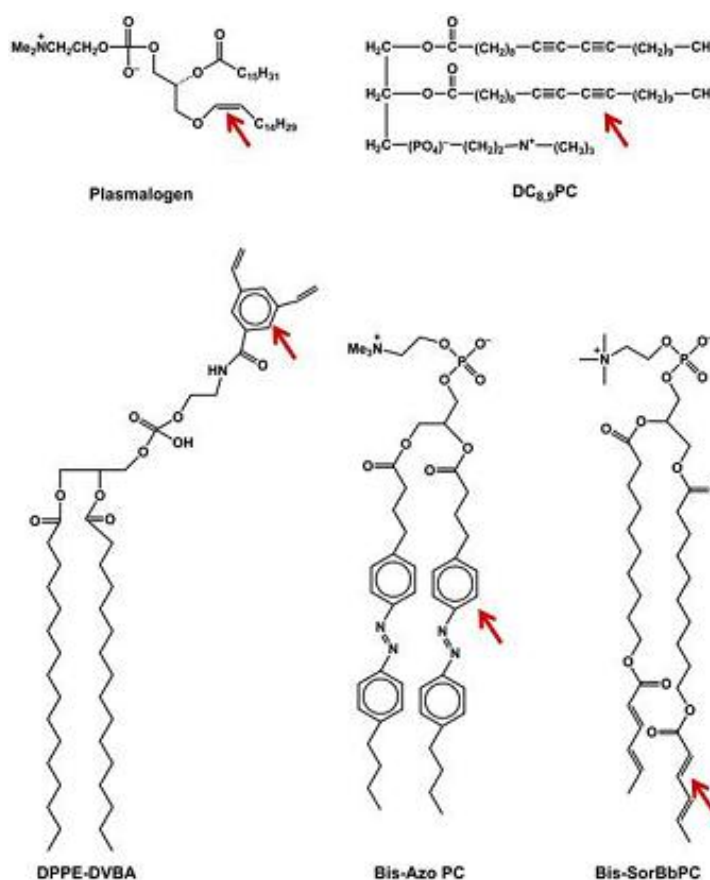


Figura 11 - Lípidos mais estudados devido à sua sensibilidade à luz ⁵⁴

- Lipossomas sensíveis a ultrassons

A aplicação de ultrassons na medicina abrange várias áreas, como a imagiologia, a ablação de tecidos tumorais e a fisioterapia. Para além destas áreas, foi demonstrado que os ultrassons podem induzir a libertação controlada de fármacos em lipossomas. A libertação pode

ser provocada por efeitos térmicos usando ultrassons de alta frequência (HFUS), ou por efeitos mecânicos com ultrassons de baixa frequência (LFUS) ⁵⁵.

A utilização de LFUS provoca a cavitação acústica dos lipossomas, isto é, induz a formação e crescimento de bolhas de gás dentro da bicamada ou núcleo. O seu crescimento provoca a formação de poros transientes, através dos quais o fármaco encapsulado é libertado (Figura 12) ^{55,56}. Foi provado que lipossomas compostos por fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol e PEG 2000-DSPE e com cisplatina (molécula utilizada no tratamento do cancro) encapsulada, libertavam 80 % do conteúdo passados 3 min após a sua exposição a LFUS ¹⁶.

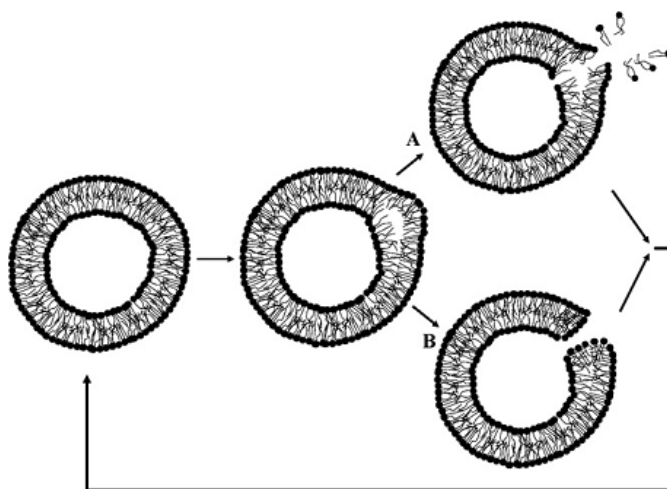


Figura 12 - Mecanismo de libertação de lipossomas sujeitos a LFUS: (A) Formação de poros hidrofóbicos, através da rutura da bicamada (B) Formação de poros hidrofílicos pela alteração da conformação da bicamada ⁵⁵

Quanto à exposição dos lipossomas a HFUS, os ultrassons provocam um efeito térmico na área em que são aplicados. Neste caso, são utilizados lipossomas sensíveis à temperatura, que sofrem uma transição de fase dos fosfolípidos constituintes, a uma temperatura ligeiramente superior à fisiológica. A transição provoca a libertação das moléculas encapsuladas ⁵⁵.

A libertação induzida por ultrassons é afetada pela composição dos lipossomas, pela presença de PEG e pelo estado físico da bicamada. A conjugação do PEG com lípidos aumenta a libertação, devido à focalização da energia ultrassónica na superfície do lipossoma. Também a incorporação de moléculas nas membranas como surfactantes e fosfolípidos com cadeias insaturadas, provoca a destabilização do empacotamento dos fosfolípidos, tornando assim os lipossomas mais sensíveis aos ultrassons. Quando a bicamada sofre a transição de fase, existe um aumento da absorção da energia ultrassónica ⁵⁵.

Portanto, os lipossomas sensíveis a ultrassons apresentam bastante potencial como sistemas de libertação controlada. De facto, já foram reportados estudos efetuados em animais com bons resultados ¹⁶.

Imunolipossomas

Os imunolipossomas são lipossomas que possuem anticorpos na sua superfície (Figura 13). A presença dos anticorpos favorece a ligação do lipossomas ao local alvo. No entanto, estes sistemas possuem alguma dificuldade em sair da corrente sanguínea para outros locais que não o fígado e o baço. Assim, a imunogenicidade e a instabilidade tornam-se obstáculos na utilização destas vesículas como sistemas de libertação controlada ⁵⁷. Para resolver os problemas associados aos imunolipossomas foi incorporado PEG na sua superfície ³⁸. As cadeias de PEG são ligadas à superfície dos imunolipossomas e os anticorpos podem ser ligados a estas, ou diretamente à bicamada lipídica. Uma vez que a presença do PEG, dependendo da quantidade, provoca a diminuição da ligação dos antígenos aos anticorpos integrados diretamente à bicamada lipídica, tem-se desenvolvido imunolipossomas com os anticorpos ligados às cadeias de PEG. Neste caso, não ocorre a diminuição da ligação dos antígenos ⁵⁷.

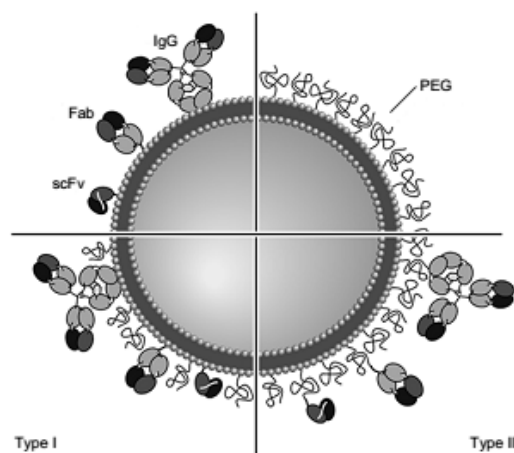


Figura 13 – Imunolipossomas ⁵⁷

A utilização de anticorpos integrais também induz a imunogenicidade dos imunolipossomas, e, por sua vez, a sua rápida eliminação por fagocitose. Para evitar a sua eliminação, são incorporados fragmentos de anticorpos, como os fragmentos Fab' e scFv ³⁸. Os imunolipossomas com fragmentos Fab' podem aumentar farmacocinética e exibem uma atividade anti tumoral bastante potente. Por sua vez, os fragmentos scFv são os fragmentos mais pequenos, mas com elevada eficiência na ligação com os antígenos. Como tal, são poucos os fragmentos necessários à formação destes imunolipossomas. A sua eficácia *in vivo* e *in vitro* para a entrega de fármacos em locais alvo também já foi demonstrada ⁵⁷.

Lipossomas catiónicos

Os lipossomas catiónicos são vesículas de carga positiva graças à sua composição lipídica. Estas vesículas são constituídas por fosfolípidos de carga neutra e lípidos de carga positiva⁵⁸. Os lipossomas catiónicos são utilizados como sistemas de entrega de ácidos nucleicos e de ADN, e também de ARN interferente (Shim, et al., 2013). Como estas moléculas possuem uma carga negativa elevada, os lípidos catiónicos conseguem neutralizá-las e condensá-las numa estrutura mais compacta³⁸. De facto, foi demonstrado que lipossomas catiónicos constituídos por Cloreto de N-[1-(2,3-Dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamónio e com ADN incorporado, conseguiam interagir melhor com as membranas celulares, cuja carga é negativa⁵⁹.

Para além da sua base composição, é necessária a adição de lípidos neutros como agentes auxiliares. A adição do lípido neutro Dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) permite que os lipossomas escapem ao processo de endocitose, aumentando assim a eficácia na entrega⁵⁹.

2.4.2 Caracterização dos lipossomas

Tamanho e Polidispersividade

O tamanho dos lipossomas e a sua polidispersividade são dois parâmetros importantes do ponto de vista terapêutico, e são essenciais para determinar a qualidade e as variações associadas ao processo de produção dos lipossomas¹³. O controlo do tamanho é crucial quando se pretende que a sua administração seja por via parenteral^{13,31}. De facto, o seu tamanho deve variar entre 50 – 450 nm para aplicações médicas⁵⁸. A polidispersividade, traduz a distribuição de tamanhos presente num lote de lipossomas. O valor deste parâmetro não deve ultrapassar 0,5; valores superiores a este indicam que as amostras são muito heterogéneas.

A análise do tamanho e da polidispersividade pode ser efetuada por várias técnicas, sendo elas o DLS (Dispersão Dinâmica da Luz), o SEC (Cromatografia de Exclusão de Tamanho), o RMN (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear), o TEM (Microscopia de Transmissão Eletrónica) e o AFM (Microscopia de Força Atómica^{13,31}). Dentro destas técnicas, a mais utilizada é o DLS devido à sua facilidade e à sua rapidez, e por permitir a análise dos lipossomas no seu meio de síntese¹³.

Potencial Zeta

O potencial zeta é uma propriedade física característica de partículas suspensas. A partir desta característica, pode ser determinada a estabilidade das partículas num sistema coloidal, assim como a sua capacidade de interação³¹. Portanto, esta propriedade pode ser utilizada para a caracterização de lipossomas.

Os lipossomas podem possuir carga positiva, negativa ou neutra, dependendo da sua composição. Quanto maior for a carga, negativa ou positiva, maior é a repulsão entre os lipossomas e menor é a possibilidade de ocorrer a sua agregação^{13,31,58}. Portanto, as partículas com um potencial zeta baixo (em valor absoluto) ou nulo, terão uma maior probabilidade de agregação. Deste modo, os lipossomas deverão apresentar um potencial zeta menor/maior que - 30 mV ou + 30 mV para serem estáveis³¹.

Para além da estabilidade, o potencial zeta é bastante importante para avaliar a interação entre lipossomas e células. A carga elevada facilita e beneficia esta interação, e, por sua vez, a entrega de um fármaco no interior das células. De facto, os lipossomas de carga neutra possuem uma interação reduzida com as células, que provoca a libertação das moléculas encapsuladas no meio extracelular⁵⁸. Assim, o desejável é que os lipossomas possuam um potencial zeta elevado.

Eficiência de Encapsulação

A eficiência de encapsulação é definida como a quantidade encapsulada nos lipossomas em relação à quantidade inicial colocada na solução de encapsulante. O valor da eficiência de encapsulação depende da capacidade de encapsulação dos lipossomas. Esta capacidade provém da composição dos lipossomas, assim como do seu método de produção e da sua lamellaridade, da quantidade inicial de encapsulante e capacidade dos lipossomas para capturarem as moléculas a encapsular³¹.

Para determinar este valor, primeiro remove-se as moléculas da solução que não tenham sido encapsuladas, ou seja, que estejam livres na solução. A remoção pode ser efetuada por diálise ou por ultracentrifugação^{13,31}. Após a sua remoção, é adicionado um composto orgânico, como o metanol ou Triton X-100, que provoca a rutura da bicamada dos lipossomas, e por sua vez, a libertação do seu conteúdo. As moléculas libertadas são quantificadas através de técnicas, como a Espectroscopia de Fluorescência, e também de técnicas eletroquímicas e métodos baseados em enzimas. A técnica utilizada para a quantificação depende da natureza das moléculas encapsuladas^{13,31}.

Lamelaridade

O estudo da lamelaridade dos lipossomas é de particular importância, pois determina o sucesso dos lipossomas utilizados numa terapia. O número de bicamadas lipídicas tem influência na capacidade de encapsulação e na cinética do fármaco encapsulado. A partir deste estudo define-se a estrutura dos lipossomas, cuja dependência se deve aos lípidos utilizados e ao método de produção^{13,31}.

A lamelaridade pode ser determinada por técnicas baseadas em químicos, por Crio-TEM e por RMN, com o Crio-TEM a ser o mais utilizado para o estudo da lamelaridade e morfologia dos lipossomas^{13,31}. Os métodos baseados em químicos podem levar a resultados errados, uma vez que pressupõem que os químicos utilizados na determinação do número de bicamadas espalham-se uniformemente na camada exterior¹³.

Concentração de lípidos

A determinação da concentração de lípidos é importante, uma vez que a composição dos lipossomas tem influência na capacidade de encapsulação, no perfil de libertação das moléculas encapsuladas e na estabilidade dos mesmos⁶⁰.

A quantificação de lípidos pode ser efetuada por cromatografia, mais precisamente por HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência), por GC (Cromatografia Gasosa) e TLC (Cromatografia de camada fina)⁴⁶. Estas técnicas separam e quantificam os lípidos presentes na amostra através do tamanho das cadeias das caudas, da composição da cabeça e também da polaridade⁶⁰.

A leitura da fluorescência também pode ser utilizada para a obtenção da concentração de lípidos. Neste caso, são utilizados reagentes químicos e enzimáticos que desencadeiam reações químicas, e por sua vez a formação de compostos com cor. O método de Bartley e o método do ácido ascórbico são exemplos de técnicas que utilizam reagentes químicos. Quanto aos métodos enzimáticos, o mais utilizado analisa fosfatidilcolina e colesterol³¹.

Libertação *in vitro*

O estudo do perfil de libertação de lipossomas *in vitro* deve ser efetuado anteriormente à sua administração *in vivo*. Este passo é crucial para perceber a estabilidade dos lipossomas, assim como a farmacocinética do agente ativo encapsulado. Portanto, este estudo deve ser efetuado com as mesmas condições *in vivo* e ao longo do tempo.

As condições são obtidas através da utilização de uma solução tampão de fosfato-salino com pH=7,4 e a uma temperatura de 37°C. Estas condições simulam as condições *in vivo* e são mantidas à medida que as amostras são retiradas e analisadas por espectroscopia de fluorescência ou de UV. A partir da espectroscopia quantifica-se a quantidade de fármaco libertado, podendo traçar-se o seu perfil de libertação ¹³.

Citotoxicidade

Os fosfolípidos permitem que os lipossomas sejam biocompatíveis. No entanto, a incorporação de outros compostos na sua constituição pode originar efeitos secundários indesejáveis, ou seja, pode desencadear a sua toxicidade. Deste modo, o estudo da citotoxicidade deve ser efetuado para que tal não aconteça após a sua administração *in vivo*.

Para avaliar a toxicidade dos lipossomas deve-se determinar a viabilidade celular através do estudo de MTT. Neste estudo, o MTT (brometo de 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é reduzido e convertido em formazan pelas células viáveis. A determinação deste composto é efetuada por um espectrofotómetro através da leitura da absorvância da solução. A absorvância é convertida em concentração, quantificando assim o composto convertido. Por sua vez, pode ser estabelecida uma relação entre a quantidade de MTT convertida e o número de células viáveis ⁶¹.

Além do estudo MTT, este deve ser combinado com um método que contabilize a relação entre as células vivas e as células mortas ⁶¹.

2.4.3 Métodos de Produção

As características dos lipossomas, como o tamanho, a eficiência de encapsulação e o número de bicamadas, são determinadas pela forma como são produzidos. Para escolher o método apropriado deve-se considerar a composição dos lipossomas, a natureza da molécula encapsulada, a reprodutibilidade de lotes, entre outros parâmetros ⁶². Os métodos de produção podem ser divididos em métodos convencionais e novos ¹³, e também podem ser classificados de acordo com a técnica base de produção, ou seja, em métodos que utilizam a agitação mecânica, a evaporação do solvente, injeção do solvente ou solubilização do detergente ⁶².

Dentro do grupo dos métodos convencionais, a hidratação por filme fino, também denominado de método de Bangham, foi o primeiro método a ser descrito para a produção de lipossomas ^{13,31}. Neste método, é criado um filme de fosfolípidos através da evaporação do solvente orgânico em que estavam dispersos. Os filmes são de seguida congelados para

assegurar a remoção completa do solvente. Os lipossomas são formados a partir da hidratação dos filmes com uma solução tampão^{13,63}. Este método é simples de aplicar, mas produz lipossomas com tamanhos heterogêneos, principalmente MLV, e com uma baixa eficiência de encapsulação. Para produzir SUV recorre-se a ultrassons e à extrusão para reduzir o tamanho dos lipossomas produzidos⁶². A evaporação por fase reversa é outro dos métodos convencionais. Neste método, são formados filmes lipídicos através da evaporação do solvente em que os lípidos estavam dispersos. Os filmes são purgados com azoto e são dissolvidos num solvente diferente do utilizado inicialmente, que pode ser éter dietílico e éter isopropílico. De seguida, forma-se uma emulsão com a adição de uma solução aquosa e o solvente orgânico é removido por evaporação, através de um fluxo de azoto. Com este método formam-se lipossomas com uma elevada eficiência de encapsulação^{13,31,63}. No caso da injeção de solvente, a fase orgânica com os fosfolípidos dispersos é injetada numa solução aquosa com o fármaco. A injeção do solvente provoca a formação de lipossomas com uma gama de tamanhos estreita (< 100 nm), dispensando assim a extrusão ou os ultrassons para reduzir o tamanho. O éter e o etanol são os solventes utilizados neste método. Como o etanol é miscível com a solução aquosa, os lipossomas formam-se instantaneamente. Quanto ao éter, este deve ser adicionado à solução aquosa a 60 °C devido à sua imiscibilidade. Ao contactar com a solução aquosa, o éter é evaporado e os lipossomas são formados. Com este método obtêm-se lipossomas com elevadas eficiências de encapsulação, mas que podem conter resíduos de solventes, principalmente de etanol^{13,31}. A diálise de detergente é o último método convencional. Neste método, os fosfolípidos são dissolvidos em micelas de detergente e adicionados a uma solução aquosa. De seguida, remove-se o detergente por diálise, formando-se lipossomas unilamelares com 40 - 180 nm³¹.

Apesar de os métodos convencionais serem fáceis de aplicar, não são adequados a nível industrial. Uma vez que a distribuição de tamanhos é heterogênea, e, relacionado com isso, a eficiência de encapsulação é inconsistente e a esterilização é complicada, surgiram métodos novos para criarem lipossomas eficazmente¹³. Os métodos novos incluem o *spray-drying*, a liofilização, a evaporação por fase reversa supercrítica com CO₂, a injeção por fluxo cruzado, a microfluidização, entre outros^{13,31}. Estes métodos conseguem ultrapassar os problemas associados à formação de lipossomas convencionais, como a heterogeneidade de tamanhos e a baixa eficiência de encapsulação. Além disso, vários destes métodos realizam-se em uma etapa, encurtando assim o tempo necessário à síntese dos lipossomas^{13,31}.

2.4.4 Esterilização dos lipossomas

A esterilização dos lipossomas deve anteceder a sua administração *in vivo*, principalmente se a via de administração for parenteral. Esta deve ser realizada para eliminar contaminantes, como endotoxinas, vírus, pirogênios e bactérias, que advêm dos seus constituintes. No entanto, a esterilização destes sistemas é um desafio devido à sua constituição característica e aos requisitos inerentes ao processo de produção destas vesículas. Assim, o método de esterilização aplicado deve ter o menor impacto possível nas propriedades e na estrutura dos lipossomas e deve evitar a sua degradação ¹³.

A esterilização por filtração é um método que não utiliza calor nem radiação, e, portanto, não utiliza fatores ou condições aos que os lipossomas são sensíveis ⁶⁴. Neste método, os lipossomas são passados por um filtro sob pressão, que consegue reter as bactérias e outros contaminantes com uma dimensão maior que 200 nm. Para aplicar este método os lipossomas têm de possuir um tamanho inferior a 200 nm de forma a garantir a sua separação dos contaminantes ¹³. Apesar de ser uma técnica que não provoca a degradação dos lipossomas, a filtração consome muito tempo, é bastante cara, deve ser realizada em condições assépticas e é pouco eficiente na remoção de vírus ⁶⁴.

Outro dos métodos que não utiliza calor é a esterilização química mediante o uso de óxido de etileno, que atua como agente de alquilação de proteínas bacterianas e de material genético, provocando assim a eliminação efetiva de bactérias e vírus ⁶⁴. Apesar deste método não afetar as bicamadas lipídicas, a remoção do óxido de etileno deve ser efetuada com todo o cuidado para garantir a inexistência de resíduos desse composto nos lipossomas. Como os resíduos são carcinogénicos, os lipossomas esterilizados por este método devem estar liofilizados e não em dispersão aquosa. Esta é inadequada devido à formação de compostos tóxicos secundários com a solução tampão ^{13,64}. Neste método não existe a barreira do tamanho dos lipossomas.

A esterilização com vapor saturado é um método que utiliza calor para eliminar os contaminantes. A utilização de vapor com uma temperatura acima da T_M ($T = 121\text{ °C}$), mesmo por pouco tempo (15-20 min), pode levar à transição de fases da bicamada lipídica e, conseqüentemente, à libertação do conteúdo encapsulado. Também pode provocar reações de hidrólise e a agregação dos lipossomas. Estes efeitos podem ser minimizadas com uma solução tampão apropriada e um pH adequado, tornando este método uma boa escolha para a esterilização de lipossomas. Por razões óbvias, os lipossomas formulados para terem sensibilidade à temperatura não devem ser esterilizados por este método ^{13,64}.

A radiação- γ , a radiação UV e a esterilização por calor seco são métodos bastantes utilizados no âmbito da medicina. No entanto, são inadequados à esterilização de lipossomas pois provocam a sua degradação através da formação de radicais e de reações de oxidação e de hidrólise ⁶⁴.

Uma forma de evitar a utilização de métodos de esterilização é a produção asséptica, em que os materiais necessários à formação dos lipossomas são esterilizados previamente, assim como o material necessário para o processo. Apesar de ser efetuada a esterilização prévia, existe sempre um risco de contaminação. A produção asséptica é um processo muito caro e deve ser efetuado como última escolha ^{13,64}.

2.4.5 Conservação

A conservação dos lipossomas deve garantir a sua estabilidade física e química durante o armazenamento até à sua administração *in vivo*. Ao longo do tempo, os lipossomas tendem a agregar-se para formar vesículas maiores, uma vez que estas são termodinamicamente mais estáveis. A fusão das vesículas provoca a libertação extemporânea das moléculas encapsuladas ^{31,63}.

A libertação das moléculas encapsuladas também pode ser provocada devido a reações de oxidação. Os fosfolípidos sofrem processos de oxidação que alteram a permeabilidade da bicamada lipídica, e, por sua vez, a estabilidade desta. A alteração da permeabilidade desencadeia a libertação das moléculas encapsuladas ³¹.

Para resolver os problemas associados à estabilidade dos lipossomas deve-se desenvolver uma formulação adequada e liofilizar. Além disto, também podem ser adicionados outros compostos para prevenir a degradação dos lipossomas. A adição de colesterol e esfingomiélinas diminui a permeabilidade da bicamada, e, por sua vez, a fuga das moléculas encapsuladas. Por outro lado, a oxidação pode ser reduzida pela adição de ascorbato de sódio (regulador de pH) ⁶³.

Além da estabilidade física e química, também se deve controlar a estabilidade microbiana. Assim, a esterilização deve ser efetuada antes do armazenamento destes sistemas de libertação ³¹.

2.5 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas constituídas pela repetição de moléculas mais pequenas denominadas de monómeros. Designam-se homopolímeros se a unidade de repetição for um monómero apenas, ou copolímeros, se forem constituídos por mais do que um tipo de monómero. Para além da composição, os polímeros podem ser classificados pela sua estrutura (linear, ramificado, reticulado) e pelos grupos funcionais presentes. Os polímeros podem ser de origem natural, sintética ou mista (artificial), no caso da modificação dos polímeros naturais. No caso dos polímeros sintéticos, a sua formação ocorre através de reações de polimerização. Estas reações podem ser de dois tipos, sendo o primeiro a reação em cadeia e o segundo a reação gradual ⁶⁵.

2.5.1 Reações de polimerização

A síntese de polímeros pode ser efetuada por reações em cadeia e graduais. As reações em cadeia dividem-se em 3 etapas, sendo elas a iniciação, a propagação e a terminação. Para que estas reações ocorram é necessária a presença de um iniciador. O iniciador é ativado por via térmica, pela luz ou com o potencial redox. Dependendo do iniciador, as reações podem ser radicalares, catiónicas, aniónicas e por coordenação. As reações em cadeia possuem um consumo lento dos monómeros, mas um aumento rápido do peso molecular ⁶⁶.

No caso das reações graduais, não é necessário um iniciador para desencadear a reação, uma vez os próprios monómeros possuem grupos reativos na sua constituição. Como não existe a etapa da terminação, os grupos permanecem ativos no fim das cadeias poliméricas. Portanto, existe apenas um mecanismo de reação durante a polimerização ⁶⁶.

As reações de polimerização podem ser efetuadas por várias técnicas. Estas técnicas distinguem-se em técnicas homogéneas e heterogéneas. A polimerização em massa e em solução pertencem ao grupo das técnicas homogéneas, e a emulsão, suspensão e miniemulsão pertencem ao grupo das heterogéneas. A técnica deve ser escolhida tendo em conta uma série de fatores, como a viscosidade do meio reacional, a pureza desejada do polímero, a remoção de calor do meio e a polidispersividade ^{65,66}.

A polimerização em massa diferencia-se da polimerização em solução pela ausência de um solvente e pela quantidade de polímero sintetizado. A ausência do solvente evita o processo de remoção deste do polímero sintetizado. No entanto, na polimerização em massa existe um aumento substancial de viscosidade, que torna a transferência de calor mais difícil. Assim, existe a possibilidade de ocorrer o efeito de gel, que é indesejável. Quanto à polimerização em solução, é mais vantajosa pois não existe o risco de desencadear o efeito de gel. Nesta técnica

deve-se escolher o solvente adequado, para que não ocorra reações de transferência de cadeia para o solvente ⁶⁵.

Quanto às técnicas heterogêneas, a polimerização por emulsão necessita de um solvente, do monómero, do iniciador e de um surfactante acima da CMC. O monómero migra para o interior das micelas devido à sua insolubilidade no solvente. Assim, a síntese polimérica ocorre no interior das micelas. No caso da suspensão, é necessário um agente tensioativo para estabilizar as gotículas de monómero. O iniciador, insolúvel no solvente, migra para as gotículas e desencadeia o início da reação de polimerização ⁶⁶.

2.5.2 Polimerização Radicalar Viva

A polimerização viva é um tipo de reação em cadeia que não possui a etapa da terminação ou reações de transferência de cadeia. A ausência da terminação permite a síntese de polímeros com uma menor polidispersividade e com uma composição e estrutura bem definida. Assim, esta polimerização permite a síntese de macromoléculas com uma estrutura específica como os copolímeros em bloco. A polimerização viva pode ser aniônica, catiônica ou radicalar ⁶⁷.

A polimerização radicalar viva inicia-se com a decomposição homolítica do iniciador e, por sua vez, a formação de um radical reativo e outro estável. O radical reativo reage com o monómero, iniciando assim a reação de polimerização. O radical estável liga-se à cadeia polimérica para evitar a etapa da terminação e manter a cadeia “viva”. A ligação do radical estável cria uma espécie dormente, que pode continuar a crescer como uma nova polimerização por adição de monómeros ^{66,67}. O mecanismo da polimerização radicalar viva está exemplificado na Figura 13.

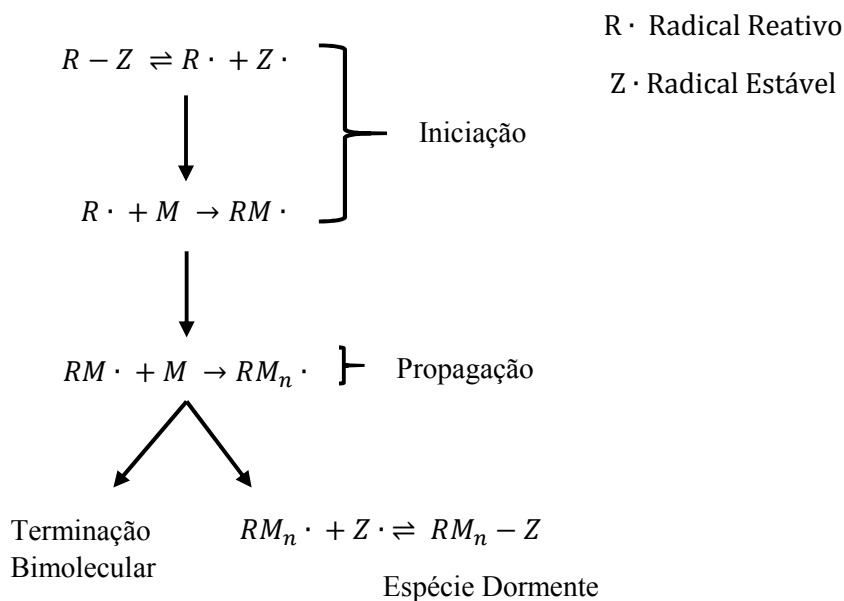


Figura 14 - Esquema da polimerização radicalar viva

Na polimerização radicalar viva o iniciador deve decompor-se ao mesmo tempo, para garantir que as cadeias poliméricas crescem de igual forma. Portanto, a iniciação deve ser rápida para estabelecer o equilíbrio entre as cadeias em crescimento e as espécies dormentes. A constante deste equilíbrio deve ter um valor baixo. O início da polimerização ocorre por estímulo térmico ou fotoquímico. Dentro da polimerização radicalar existem três técnicas: a polimerização radicalar por transferência atômica (ATRP), a polimerização de transferência de cadeia por fragmentação reversível de adição (RAFT) e a polimerização radicalar livre estável (SFRP) ⁶⁶⁻⁶⁸.

- Polimerização radicalar por transferência atômica (ATRP)

A polimerização ATRP inicia-se com formação de um complexo por transferência de um átomo halogenado para o catalisador de um metal de transição (exemplo: Cobre). A transferência do átomo do iniciador desencadeia o crescimento das cadeias poliméricas, através da reação entre os radicais gerados pela transferência e os monómeros. As cadeias deixam de crescer quando o catalisador é regenerado e o átomo halogenado é transferido para as mesmas. A presença do átomo halogenado nas cadeias cria as espécies dormentes ^{66,67}.

Os fatores que afetam o controle da ATRP são a razão entre a quantidade de ligante e de catalisador, a temperatura e a quantidade de iniciador. Além disto, deve-se escolher o iniciador e o catalisador mais adequado para a etapa de iniciação ser rápida. A polimerização é mais rápida com a transferência de um átomo de bromo do iniciador em vez de um de cloro. O

maior problema da ATRP reside na remoção do metal de transição do polímero, visto que este é regenerado no fim da reação ⁶⁷.

- Polimerização de transferência de cadeia por fragmentação reversível de adição (RAFT)

A RAFT é uma técnica que controla o tamanho das cadeias poliméricas através de reações de transferência de cadeia. Para efetuar estas reações é necessário um agente de transferência de cadeia, como ditioestéres, tritioarbonatos, ditiocarbamatos e xantatos ⁶⁹. A polimerização ocorre na presença destes agentes e inicia-se com um iniciador convencional, ou seja, com um iniciador utilizado na polimerização radicalar convencional ⁶⁶. A etapa da iniciação ocorre por via térmica, fotoquímica, ou mesmo por via do potencial redox. À medida que as cadeias poliméricas vão crescendo, estas reagem com o agente de transferência de cadeia. A reação cria espécies dormentes e também novos radicais para a síntese de novas cadeias poliméricas. A polimerização cria polímeros com um baixo índice de polidispersividade e sem catalisadores metálicos. No entanto, produz polímeros com cores e odores devido aos grupos tioestér ⁶⁶. A escolha dos reagentes e das condições adequadas é crucial para o sucesso da RAFT na criação de polímeros com uma estrutura específica (estrela, tri-blocos, di-blocos, etc.) ⁶⁹.

- Polimerização radicalar livre estável (SFRP)

A SFRP é uma técnica de polimerização que utiliza a ligação covalente de um radical estável com um radical ativo para criar uma espécie dormente reversível. A polimerização utiliza como radicais estáveis os óxidos de azoto, ditiocarbamatos, espécies organometálicas e derivados de benzidriolo. Quando são empregues os óxidos de azoto, a polimerização é mais eficiente e denomina-se de polimerização mediada por óxidos de azoto (NMP) ⁷⁰. Um dos óxidos de azoto mais utilizado em NMP é o TEMPO (2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidinol). Este composto promove a decomposição do iniciador e liga-se ao fim das cadeias poliméricas para criar as espécies dormentes e, por sua vez, evitar a etapa da terminação. A quebra do iniciador ocorre por via térmica ^{66,67}.

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

Os seguintes compostos foram utilizados tal como adquiridos: Lecitina de soja (Acros Organics, granular, USA), Colesterol (95 %, Sigma-Aldrich, USA), Estearilamina (90 %, Acros Organics, Bélgica), Pluronic[®] F68 (Sigma-Aldrich, USA), Clorofórmio (99,2 %, VWR Chemicals, França), Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfónico (Amresco[®], USA) e Calceína (Acros Organics, Bélgica), Ácido Clorídrico (37 %, VWR Chemicals, França), Metanol (99 %, VWR Chemicals, França), Dimetilsulfóxido (99,6 %, VWR Chemicals, França), Brometo de Cobre (I) (99 %, Alfa Aesar, Alemanha), Ácido trifluoracético (99 %, VWR Chemicals, França), n-Hexano (99,3 %, VWR Chemicals, França), Tolueno (99 %, VWR Chemicals, França), 1,1,4,7,7-Pentametildietenotriamina (98 %, Alfa Aesar, Alemanha), Tetrahidrofurano (VWR Chemicals, França), Brometo de 2-bromoisobutiril (97 %, Alfa Aesar, Alemanha), 4-Dimetilaminopiridina (99 %, Merck, China), Cloreto de Sódio (99 %, Sigma-Aldrich, USA), Triton[®] X-100 (Sigma-Aldrich, USA), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, USA) e meio de cultura celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO BRL Life Technologies, USA). Purificou-se o Acrilato de *tert*-butilo (99 %, Alfa Aesar, Alemanha) e o 2-Dimetilaminoetil metacrilato (≥ 99 %, Merck, Alemanha) em colunas de sílica e alumina para remover os agentes estabilizantes que impedem a polimerização dos monómeros aquando o seu armazenamento. O Diclorometano (99,8 %, VWR Chemicals, França) foi previamente destilado para a sua utilização nas sínteses. A Trietilamina (99 %, Merck, Bélgica) foi seca sobre Hidreto de Cálcio e destilada a vácuo. Membranas de diálise (3 500 Da, Medicell Membranes Ltd., UK) foram utilizadas na purificação dos polímeros. Para a determinação da concentração de lípidos um *kit* comercial de colorimetria enzimática (CHO-POD, Spinreact, Portugal).

3.2 Técnicas

3.2.1 Dispersão dinâmica da luz (DLS) e Eletroforese de Laser Doppler (LDM)

A análise do tamanho, polidispersividade e potencial zeta dos CPL foi realizada com o equipamento ZetaSizer Nano. Este equipamento mede o tamanho e distribuição de tamanhos das nanopartículas através da deteção de luz dispersa. A dispersão de luz é provocada pelos

movimentos brownianos das nanopartículas suspensas na amostra. Através da equação de Stokes-Einstein, a dispersão é medida e convertida no tamanho das partículas ⁷¹.

Para além do DLS, o equipamento utiliza o LDM para medir o potencial zeta das nanopartículas. A aplicação de um campo elétrico sobre as partículas suspensas na amostra promove o seu movimento. A velocidade com que partículas se movem está diretamente ligada ao seu potencial zeta. Como tal, ao medir a velocidade pela técnica M3-PALS (Phase analysis Light Scattering), calcula-se a mobilidade eletroforética e a partir desta obtém-se o potencial zeta ⁷¹.

3.2.2 Cromatografia de permeação de gel (GPC)

Os polímeros sintetizados tiveram de ser analisados para avaliar a sua aplicabilidade nos CPL. Para tal, foi utilizada a técnica de GPC para determinar o peso molecular e a polidispersividade.

O GPC é uma técnica que separa as moléculas poliméricas presentes numa solução pelo seu tamanho. Este tipo de cromatografia usa uma coluna com um enchimento com poros, que permite que a fase estacionária passe à volta e pelo interior do enchimento. Assim, as moléculas maiores são as mais rápidas a passar a coluna, pois não conseguem passar no interior dos poros, enquanto as mais pequenas são as últimas devido à sua passagem pelos poros. A passagem das moléculas pela coluna é detetada e é determinado o seu tempo de eluição. Este tempo é relacionado com a calibração (efetuada com padrões de peso molecular conhecido) para a obtenção do peso molecular numérico (M_n) e o peso molecular ponderal (M_w). A razão M_w/M_n é importante para definir a dispersão de tamanhos de cadeia que existe na amostra. Pretende-se que esta razão seja próxima de 1, para a amostra possuir uma distribuição de tamanhos estreita ⁷².

3.2.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma técnica que estuda a estrutura das moléculas, as suas interações e a sua dinâmica. Deste modo, os estudos por RMN permitem a determinação de propriedades químicas e físicas das moléculas através da análise das propriedades magnéticas dos núcleos de alguns átomos ⁷³.

Os núcleos dos átomos são carregados eletricamente e possuem *spin*. Quando são sujeitos a um campo magnético externo, estes sofrem um aumento de energia relativo à sua base, emitindo assim esta mudança na gama das radiofrequências. Ao voltar à sua energia

inicial, ocorre também a sua emissão em radiofrequências. As emissões são medidas e processadas para a obtenção de um espectro com picos. A partir destes picos é possível a identificação dos grupos funcionais presentes nas moléculas⁷³. Portanto, este método pode ser utilizado como um complemento de outras técnicas analíticas. É uma técnica quantitativa e não destrutiva, podendo ser aplicada a amostras sólidas e a soluções⁷³.

3.2.4 Espectroscopia de Infravermelho (ATR-FTIR)

A radiação infravermelha (IV) é uma região do espectro da radiação eletromagnética que possui aplicações práticas na espectrometria. A espectrometria de IV é uma técnica instrumental que investiga a estrutura química de compostos orgânicos e de alguns inorgânicos, de modo a confirmar e identificar a presença de grupos funcionais característicos numa amostra. A técnica baseia-se na medida da reflectância, absorção e emissão das amostras, dependendo da região espectral de IV utilizada, do tipo de amostra e do tipo de análise. A região de IV mais utilizada para espectrometria é a de IV média, com números de onda na gama de 670 a 4000 cm^{-1} ⁷⁴.

O FTIR é um espectrómetro que utiliza a Transformada de Fourier para analisar amostras complexas, pequenas e com bandas de absorção fracas. Este equipamento é simples, fiável, rápido e realiza sobretudo análises qualitativas. Com este equipamento obtém-se um espectro, que regista a frequência e a intensidade dos grupos funcionais presentes na amostra. A identificação dos grupos é efetuada por via de tabelas de correlação, e por comparação de catálogos de espectros de substâncias puras e conhecidas⁷⁴. Para analisar amostras sólidas, como polímeros, mede-se a reflexão no IV. A reflexão pode ser de vários tipos; difusa, interna, especular e total atenuada (ATR). O modo ATR-FTIR tem a vantagem de ser uma análise rápida e sem uma preparação complicada⁷⁵.

3.2.5 Espectrofluorimetria

A incidência de radiação eletromagnética sobre as moléculas provoca a transição de um estado de menor energia para um superior, através da absorção da energia radiante. Ao atingir o estado de maior energia, as moléculas voltam rapidamente ao seu estado fundamental com a emissão da energia absorvida. A emissão é efetuada sob a forma de fluorescência quando o eletrão transita do nível de menor energia do estado excitado para o estado fundamental^{76,77}. Para medir a fluorescência recorre-se a um espectrofluorímetro. Este equipamento possui uma lâmpada de tungsténio ou deutério, que emite e incide radiação com um comprimento de onda específico sobre a amostra. A radiação emitida pela amostra é detetada num ângulo de 90°^{76,77}.

A espectroscopia de fluorescência pode ser utilizada no estudo de sistemas de liberação controlada de fármacos, mais precisamente no estudo da liberação ⁷⁸.

3.3 Métodos

3.3.1 Síntese do Pluronic[®]-2-bromoisobutiril

Importa começar por referir que a síntese do iniciador do Pluronic[®]-2-bromoisobutiril (PLU-Br) foi realizada previamente à realização deste trabalho por uma investigadora pertencente ao grupo de investigação. O iniciador necessário à síntese do polímero PPD e PP foi obtido pela esterificação do Pluronic[®] F68 (PLU) com o Brometo de 2-bromoisobutiril (2-BiB). A reação de esterificação ocorre nos terminais da cadeia de PLU, devido à presença de dois grupos –OH. A título representativo, a figura 15 ilustra a reação de esterificação que ocorre num dos terminais do PLU. A síntese do iniciador teve como base o processo utilizado na síntese do Colesterol-2-bromoisobutiril (CHO-Br), reportado em trabalhos desenvolvidos anteriormente por outros membros do grupo de investigação ¹⁴.

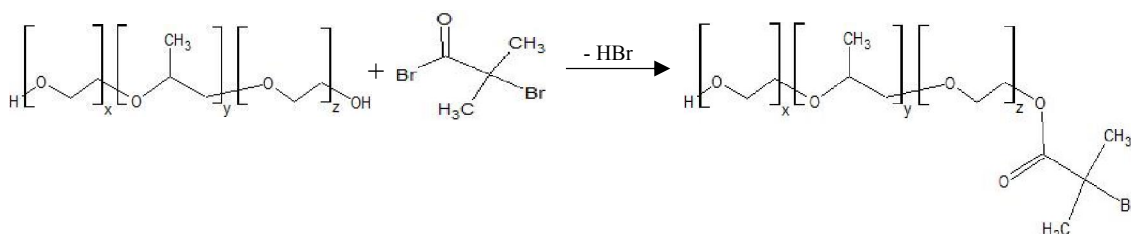


Figura 15 - Esquema da síntese do iniciador Plu-Br

Para a síntese do iniciador, foram adicionados 10 mL de uma solução de 4-dimetilaminopiridina, recristalizada em tolueno, em diclorometano seco (100 g/L) a um balão de fundo redondo de 250 mL com 0,7 mL de trietilamina previamente destilada.

O balão foi equipado com um condensador, um agitador magnético, uma ampola de adição e com uma entrada/saída de azoto. Em atmosfera inerte, através de um fluxo contínuo de azoto, a mistura foi colocada num banho de gelo para garantir que a temperatura da mistura se mantivesse a 0 °C. De seguida, adicionou-se, gota-a-gota, 3 mL de 2-BiB em 10 mL de diclorometano seco. Por fim, foram adicionados, também gota-a-gota, o mais lentamente possível, 50 mL de uma solução de PLU em diclorometano seco (20 g/L). No final da adição, a temperatura da mistura foi elevada até aos 27 °C e assim se manteve durante 20 horas, ao longo das quais se deu a reação de esterificação.

Após a reação, a mistura foi lavada com uma solução saturada de cloreto de sódio para remover resíduos de trietilamina e de 2-BiB. Cerca de metade do solvente orgânico, diclorometano, foi removido com o auxílio de um evaporador rotativo, a 40 °C e 0.1 mbar. Por fim, o PLU-Br foi precipitado em etanol, filtrado e seco sob vácuo numa estufa a 40 °C até apresentar valores de massa constantes. O produto final, um composto branco de alta densidade e granuloso, foi ainda reduzido a pó através de ação mecânica.

3.3.2 Síntese do polímero Pluronic® - Poli(N,N-dimetilaminoetil metacrilato)

O polímero Pluronic® - Poli(N,N-dimetilaminoetil metacrilato) (PPD) obteve-se através de polimerização radicalar viva (ATRP), usando tolueno como solvente (Figura 16). O tolueno foi borbulhado em azoto e o catalisador Brometo de Cobre (I) e o ligante 1,1,4,7,7-Pentametildietilenotriamina (PMDETA) foram dissolvidos no mesmo. De seguida, a solução foi colocada num reator Schlenk de 25 mL, ao qual também se adicionou o monómero purificado N,N-dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA) e o iniciador PLU-Br. O reator, num banho de gelo, foi alimentado com azoto durante 1 hora para efetuar a desgaseificação da mistura reacional. Ao fim deste tempo, colocou-se o reator num banho quente a 60 °C ou 80 °C e à pressão atmosférica por diferentes tempos de reação. As reações foram interrompidas com a abertura do reator, e consequente entrada de ar, e a adição de 2 mL de THF.

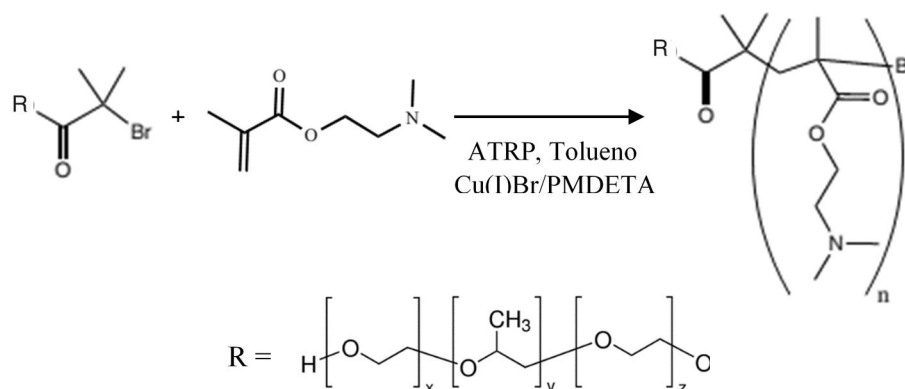


Figura 16 - Representação esquemática da reação de síntese do PPD (Apesar de as cadeias de PDMAEMA crescerem em ambos os lados da cadeia de PLU, devido à presença de dois grupos funcionais, a figura ilustra o que ocorre num dos terminais)

A seguir à síntese polimérica, procedeu-se à etapa de purificação do polímero através da passagem em colunas de sílica-alumina e a diálise em água miliQ durante 48 horas, com renovação de água de 12 em 12 horas. Após a diálise, evaporou-se o solvente e procedeu-se à dissolução do polímero em água. O polímero foi de seguida colocado num liofilizador durante 48 h a -50 °C e a 0,5 mbar. Com a liofilização, o polímero adquire um estado sólido

caracterizado por um pó branco de baixa densidade. Para confirmar o sucesso da polimerização e avaliar as propriedades do polímero, este foi analisado por ATR-FTIR, RMN e GPC.

3.3.2 Síntese do polímero Pluronic[®] - Poli (acrilato de *tert*-butilo)

Cabe começar por dizer que a síntese deste composto foi realizada previamente à realização deste trabalho por uma investigadora pertencente ao grupo de investigação. O polímero Pluronic[®] - Poli(acrilato de *tert*-butilo) (PPtBA) obteve-se através de ATRP. O procedimento para a síntese deste polímero é igual à do PPD, anteriormente descrita (secção 3.3.1), à exceção do monómero utilizado, neste caso o acrilato de *tert*-butilo (tBA). A caracterização foi igualmente realizada por ATR-FTIR, RMN e GPC.

3.3.3 Síntese do polímero Pluronic[®] - Poli(ácido acrílico)

É de referir que a síntese deste composto foi realizada previamente à realização deste trabalho por uma investigadora pertencente ao grupo de investigação. O polímero Pluronic[®]-Poli(ácido acrílico) (PP) foi obtido pela hidrólise do PPtBA (Figura 17). Para tal, o PPtBA sintetizado anteriormente foi dissolvido 10 mL de diclorometano e colocado num balão de fundo redondo. O balão foi colocado num banho a 0 °C e equipado com um condensador, um agitador magnético, uma entrada e saída de azoto e uma ampola de adição. Através da ampola, foram adicionados, em excesso, 10 mL de ácido trifluoracético, gota-a-gota, o mais lentamente possível. Depois da adição, procedeu-se à hidrólise em atmosfera inerte durante a 48 horas e a 30 °C.

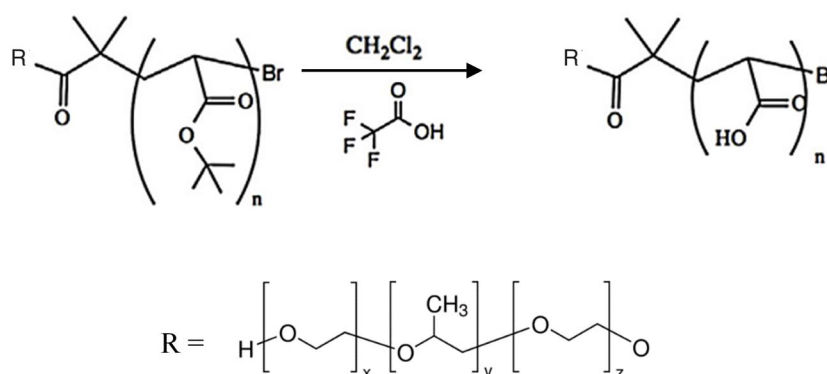


Figura 17 - Representação esquemática da reação de hidrólise do PPtBA

O polímero obtido foi precipitado em n-hexano, filtrado e lavado em éter dietílico, e seco a vácuo a uma temperatura de 40 °C até apresentar valores de massa constantes. Este foi de seguida analisado por ART-FTIR, RMN e GPC.

3.3.4 Formulação de lipossomas

O lipossomas foram preparados pelo método de Hidratação de Filme Fino¹³. Para tal, 100 µL de uma solução de lecitina de soja (LC) em clorofórmio (4 mg/mL) foram inseridos em tubos de ensaio de fundo redondo. O clorofórmio foi evaporado a partir de um fluxo contínuo de azoto para a formação dos filmes lipídicos. Em seguida, os tubos foram colocados no congelador durante 12 horas, para assegurar a remoção total do clorofórmio.

Após as 12 horas, os filmes lipídicos foram hidratados com 200 µL de Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES) (50 mM e pH=7) e colocados em tubos contendo, cada um, 6 esferas de vidro. Depois de vigorosamente agitadas, as soluções lipídicas foram incubadas a 37 °C e 100 rpm por uma noite, ao fim do qual se deu formação de lipossomas. Testou-se ainda o efeito da adição de 5 % de SA e CHO em clorofórmio (4 mg/mL) nas propriedades dos CPL. Estas soluções foram adicionadas a cada tubo juntamente com a solução de LC.

3.3.5 Formação de CPL

A formação dos CPL ocorre em duas fases: a primeira corresponde à formação dos lipossomas (descrita anteriormente); e a segunda à formação dos CPL através da incorporação de polímeros nas bicamadas lipídicas. De forma a obter a melhor formulação de CPL, foram testadas diferentes percentagens (2.5 %, 5 % e 10 %) de PLU e dos polímeros sintetizados anteriormente (PP e PPD).

Assim, após a formação dos lipossomas, foram adicionados diferentes quantidades de PLU, PP e PPD em HEPES (10 mg/mL). Feita a adição, os tubos foram colocados de novo na incubadora a 37 °C e com uma agitação de 100 rpm durante 24 horas. Esta operação levou à formação CPL prontos a serem caracterizados.

3.3.6 Encapsulação dos CPL

Para os estudos de libertação, os filmes lipídicos, formados pelo processo descrito na secção 3.3.4, foram hidratados com 100 µL de uma solução de 60 mM de calceína em HEPES. A calceína é uma molécula que pode ser encapsulada nos CPL e quantificada por fluorescência, podendo assim ser utilizada em testes de libertação. Feita a adição desta molécula, as amostras foram colocadas na incubadora a 37 °C e 100 rpm durante 24 horas. Posteriormente, foram adicionadas a soluções dos polímeros PLU, PP e PPD aos tubos, para a formação dos CPL. A

seguir à adição, os tubos foram colocados de novo na incubadora a 37 °C e 100 rpm durante a noite.

As amostras foram de seguida retiradas da incubadora e lavadas 3 vezes com a solução tampão de HEPES. Para o processo de lavagem foram efetuados 3 ciclos de 5 min a 10000 rpm numa centrifugadora. A lavagem remove a calceína que não foi encapsulada. Depois da última lavagem, as amostras foram hidratadas de novo com 200 µL de HEPES.

3.3.7 Determinação da quantidade de lípidos

Após a preparação dos CPL pelo processo descrito anteriormente, as amostras foram colocadas em eppendorfs e foram sujeitas a uma centrifugação de 10 000 rpm durante 10 min. De seguida, o sobrenadante foi retirado e foi adicionada a solução de HEPES para voltar a hidratar os CPL. A determinação da quantidade de lípidos foi efetuada com recurso às instruções de um *kit* de colorimetria enzimática da Spinreact (Apêndice I).

3.3.8 Perfis de libertação e eficiência de encapsulação

Para os testes de libertação foram usadas amostras de CPL com calceína. A fluorescência das amostras ao longo do tempo foi monitorizada com o auxílio de um espectrofluorímetro com comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485/20 nm e de 528/20 nm, respetivamente. Os testes de libertação foram efetuados em diferentes condições de temperatura (37 °C e 42 °C) e pH (1,3,5,7,9 e 11).

De forma a conhecer a quantidade total de calceína contida nos CPL procedeu-se ao colapso dos mesmos através da adição de uma solução de Trítion X-100 a 20 % (v/v). Esta informação permite traçar os perfis de libertação e determinar a eficiência de encapsulação. Com os valores de fluorescência medidos no início (F_i), ao longo do tempo (F) e no fim após a adição do Trítion X-100 (F_t), é calculada a percentagem de libertação pela equação (1).

$$\% \text{ Libertação} = \frac{(F - F_i)}{(F_t - F_i)} \times 100 \quad (1)$$

O cálculo da eficiência de encapsulação efetuou-se após a determinação da concentração de lípidos nas amostras e da obtenção dos perfis de libertação. Com recurso aos valores de fluorescência, obteve-se o valor de calceína encapsulada pela conversão destes em concentração molar pela reta de calibração (2).

$$[\text{Calceína}] = 1 \times 10^{-3}(F_t - F_i), R=0,99 \quad (2)$$

A eficiência de encapsulação foi calculada pela equação (3), no qual a concentração de lípidos foi obtida pelo passo descrito na secção (3.3.8).

$$EE(\%) = \frac{[\text{Calceína}]}{[\text{Lípidos}]} \times 100 \quad (3)$$

Estes testes foram efetuados no Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, La Plata, Argentina (CIDCA).

3.3.9 Testes de viabilidade celular

Para perceber o impacto dos CPL nas células e a viabilidade das mesmas, avaliou-se a atividade mitocondrial das células através de um estudo MTT. Para tal, células humanas do tipo enterócito Caco-2TC7 foram cultivadas num meio DMEN e incubadas a 37 °C com uma atmosfera de 5 % CO₂ e 95 % de ar. As células foram inoculadas numa microplaca de 96 poços, com uma densidade de 105 000 células/cm², e durante 7-9 dias não foram movidas para permitir a sua fixação à placa. O meio de cultura foi mudado todos os dias. Os CPL foram adicionados às células através de soluções com concentrações de 75, 375, 750 µM, tendo sido utilizados para cada grupo 8 poços. Após a adição dos CPL, as células foram incubadas durante 24h. Ao fim deste tempo, as células foram lavadas duas vezes com uma solução tampão de fosfato-salino e adicionou-se a solução de MTT com uma concentração de 2 mg/mL ao meio de cultura. As células foram de novo incubadas durante 3 horas, e, posteriormente, juntou-se 120 mL de DMSO a cada poço para ocorrer a lise celular. A placa foi agitada durante 20 min a 25 °C num agitador de placas para solubilizar as células e para formar os cristais de formazan. A quantidade formada de formazan foi quantificada em quadruplicado pela leitura da absorvância a 570 nm (comprimento de onda de referência 650 nm) por um leitor de placas (Safire XFluor 4, Tecan Group Ltd.). Para conseguir expressar a viabilidade celular, foi monitorizada a atividade mitocondrial de um grupo de controlo tratado com o meio de transporte. O *background* da absorvância foi medido nos poços com apenas o meio (branco), e subtraído à absorvância dos poços com as células. A viabilidade celular de cada grupo foi calculada através da equação (4), no qual OD_t é a densidade ótica das células tratadas, ou seja, com os CPL e os lipossomas, e OD_c a densidade ótica das células controlo.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{OD_t}{OD_c} \times 100 \quad (4)$$

Estes testes foram efetuados no Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, La Plata, Argentina (CIDCA).

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização do iniciador e polímeros

Na primeira fase do trabalho laboratorial efetuou-se a síntese dos polímeros necessários para à formação dos CPL. Para tal, executaram-se várias reações para obter os polímeros PP e PPD mais adequados, ou seja, com um baixo peso molecular ($< 20\,000$ Da) e baixa polidispersividade (\bar{D}) ($< 1,2$). Nestas reações variou-se as condições de operação tempo e temperatura, e a proporção entre os reagentes utilizados.

Os polímeros obtidos foram analisados por GPC, ATR-FTIR e RMN. Na Tabela 5 apresentam-se as condições de reação e os resultados de GPC relativos às reações realizadas para a síntese do polímero PP.

Tabela 5 – Condições e resultados de GPC das sínteses do polímero PP

Amostra	Tempo/h	Temperatura/°C	tBA/PLU- Br/Cu(I)Br/PMDETA	M _{w,GPC} /Da	\bar{D}_{GPC}
PP1	24	50	64/0,25/1,545/0,707	-	-
PP2	24	50	99/1/2/4	-	-
PP3	24	80	64/0,25/1,545/0,707	13258	1,139
PP4	24	80	64/0,25/1,545/0,707	12603	1,343
PP5	24	80	64/0,25/1,545/0,707	15829	1,133
PP6	24	80	64/0,25/1,545/0,707	12615	1,189
PP7	24	80	64/0,25/1,545/0,707	16535	1,317
PP8	24	80	64/0,25/1,545/0,707	15218	1,044
PP9	24	80	64/0,25/1,545/0,707	14192	1,075
PP10	48	80	64/0,25/1,545/0,707	15189	1,099
PP11	48	80	64/0,25/1,545/0,707	14651	1,129
PP12	24	80	64/0,25/1,545/0,707	15089	1,035
PP13	24	80	64/0,25/1,545/0,707	14663	1,041
PP14	24	80	64/0,25/1,545/0,707	14084	1,051
PP15	24	80	64/0,125/1,545/0,707	14223	1,087
PP16	84	80	64/0,25/1,545/0,707	14301	1,093
PP17	24	80	328/0,25/1,545/0,707	14623	1,035
PP18	48	80	328/0,25/1,545/0,707	14558	1,029
PP19	48	80	64/0,25/1,545/0,707	13022	1,095

Após a análise dos resultados das injeções de GPC presentes na Tabela 5, constata-se que a 50 °C a síntese não ocorre, e que a 80 °C há a formação do polímero. Os polímeros PP 3 a PP 9 e PP 12 a PP 14, inclusive, possuem o mesmo tempo de reação (24 h) e as mesmas proporções entre reagentes. Estes apresentam pesos moleculares e dispersividades abaixo dos

20 000 Da e 1,2, respetivamente. Deste conjunto de polímeros, o PP 4 e PP 7 não apresentam polidispersividade abaixo de 1,2. Em relação ao polímero PP 15, manteve-se o tempo de reação de 24h e variou-se a proporção de iniciador para metade. Com a diminuição do iniciador, obteve-se valores semelhantes de dispersividade e peso molecular aos polímeros com o dobro do iniciador. Assim, a quantidade de iniciador não influenciou de forma significativa estes parâmetros. Em relação ao PP 10 e PP 11, variou-se o tempo de reação de 24 h para 48 h. Observa-se que esta variação não é impactante nos parâmetros avaliados, em relação às amostras de 24 h. Também foram realizadas reações com 24 h e 48 h, cuja proporção de monómero foi a variável estudada. Verifica-se que o aumento do monómero tBA também não tem um impacto significativo nos parâmetros, em relação às restantes amostras. Quanto ao PP 16, este possui o maior tempo de reação, 84 h. Tal como as reações de 48 h, com as mesmas proporções entre reagentes, constata-se que não existe um desfasamento significativo dos valores dos parâmetros. Portanto, devido aos valores apresentados, constatou-se que são vários os polímeros que poderiam ser utilizados nos CPL e que a síntese de PP é reprodutível. Assim, o polímero utilizado na síntese dos CPL foi o PP 16, pois tal como a maioria dos polímeros apresentados, possui uma baixa dispersividade e um baixo peso molecular.

Na Tabela 6, apresentam-se as condições de reação e os resultados de GPC das reações de síntese de PPD efetuadas.

Tabela 6 – Condições e resultados das sínteses do polímero PPD

Amostra	Temperatura/°C	Tempo/h	DMAEMA/PLU- Br/Cu(I)Br/PMDETA	M _{w,GPC} /Da	Đ _{GPC}
PPD 1	80	24	42/0.25/1.6/0.7	22501	1,431
PPD 2	80	8	42/0.25/1.6/0.7	17256	1,313
PPD 3	80	6	42/0.25/1.6/0.7	14998	1,351
PPD 4	80	2	42/0.25/1.6/0.7	14342	1,305
PPD 5	80	1	42/0.25/1.6/0.7	14529	1,459
PPD 6	80	23	42/0.25/1.6/0.5	10569	1,458
PPD 7	80	0,5	42/0.25/1/2	16297	1,133
PPD 8	60	4	42/0.25/1/2	12734	1,301
PPD 9	80	0,5	42/0.25/1/2	15997	1,178

No caso da síntese do PPD, considerando as reações realizadas a 80° C, constata-se que com o aumento do tempo de 1 h para 24 h, existe um aumento do peso molecular e da dispersividade, características que não são ideais para CPL. Na síntese do PPD 6, variou-se a proporção de ligante. Esta alteração deu origem a um polímero com cadeias menores e com uma dispersividade alta, o que é indesejável. Portanto, os polímeros escolhidos para a produção de CPL foram PPD 7 e PPD 9, cuja diminuição da proporção de catalisador e o aumento da

proporção de ligante, em relação ao PPD 6, induziram a síntese do polímero com valores de peso molecular e dispersividade adequados.

De forma a verificar se as reações de polimerização, esterificação e hidrólise foram bem-sucedidas, o polímero PLU, o iniciador PLU-Br (estruturas químicas das moléculas Apêndice II) e os polímeros sintetizados (PPtBA, PP, PPD), foram ainda analisados através das técnicas de ATR-FTIR e RMN.

A Figura 18 mostra os espectros de ATR-FTIR dos diferentes polímeros (espectro com as bandas assinaladas no Apêndice III para melhor visualização). Verifica-se que existem picos comuns nos vários polímeros, como os picos de estiramento alifático – CH a 2860 cm^{-1} (A), de flexão – CH₂ a 1460 cm^{-1} (B), de flexão *in-plane* – OH a 1340 cm^{-1} (C), da ligação – CH₃ a 1280 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} (D), do estiramento – CO a 1100 cm^{-1} (E) e do estiramento C – OH a 960 cm^{-1} (F). No caso do PLU-Br, confirma-se que foi efetuada a esterificação, uma vez que existe um pico pequeno a 800 cm^{-1} (G) respeitante à ligação C – Br. Além disto, também existe um pico a 1720 cm^{-1} (H) que indica a presença do grupo – COOR pertencente ao 2-BiB (Figura 2, Apêndice II), molécula responsável pela introdução dos grupos -Br necessários na síntese do PPtBA e PPD.

Em relação ao espectro do PLU - PtBA, também existe o pico da ligação C – Br (a 800 cm^{-1} (G), que indicia que a presença dos grupos -Br nos terminais em algumas cadeias poliméricas. Uma diferença deste polímero em relação aos outros, reflete-se na presença de um pico a 1260 cm^{-1} (I) que indica a presença do grupo *tert*-butilo característica do tBA.

Quanto ao polímero PP, o pico a 1260 cm^{-1} (I) desaparece uma vez que o grupo -C(CH₃)₃ característico do PtBA é removido na hidrólise. Neste espectro o pico relativo à ligação C – Br terminal também desaparece o que indica a perda destes grupos durante a hidrólise.

Por último, o espectro do PPD é muito semelhante ao do PLU-Br, não havendo distinções expressivas a nível das bandas. A explicação deste caso advém da sobreposição das bandas de PLU com as bandas características do PPD.

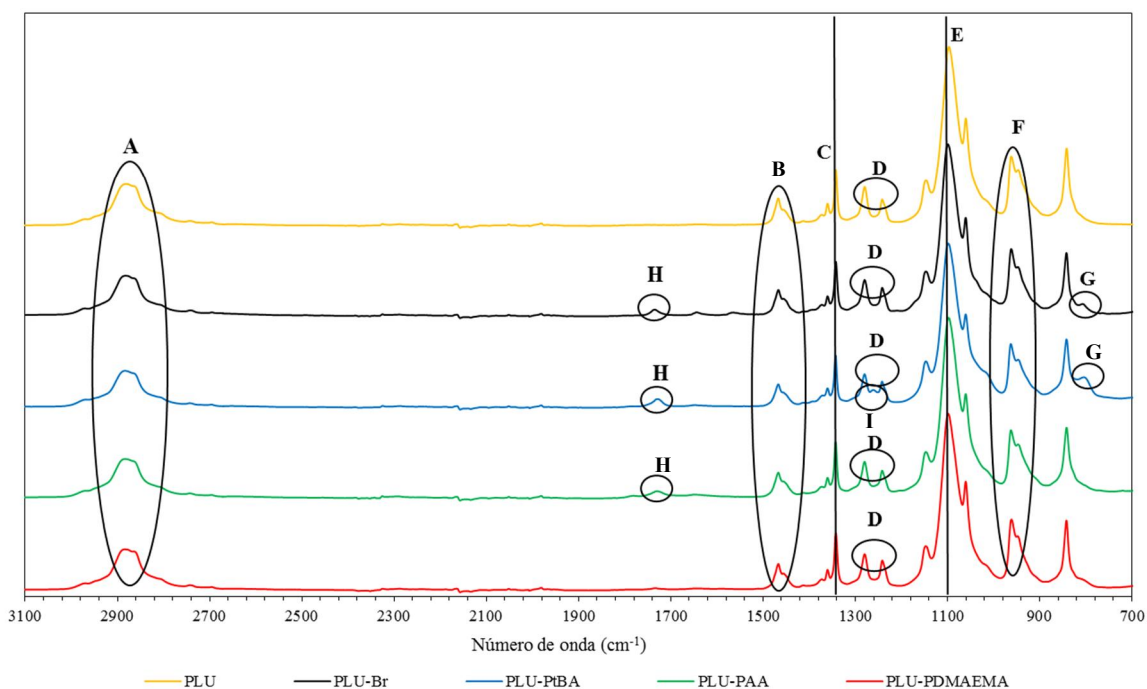


Figura 18 - Espectro de ATR-FTIR dos polímeros sintetizados

Os espectros de ^1H RMN do PLU e do PLU-Br estão representados na Figura 19. Os picos respeitantes ao solvente THF são o (a) 3,58 ppm e o (b) 1,72 ppm ⁷⁹. Em relação ao espectro do PLU, identifica-se do bloco PPO picos a 1,1 ppm (c), 3,3 ppm (d) e 3,5 ppm (e) relativos aos prótons de - CH_3 , - CH e - CH_2 , respetivamente. A 3,6 ppm (f) observa-se um pico dos prótons - CH_2 dos blocos PEO ⁸⁰. O pico que diferencia os espectros é o (g) a 2,03 ppm. Este indica a presença da ligação $\text{CH}_3\text{C} - \text{Br}$ proveniente do 2-BiB, o que confirma o sucesso da reação de esterificação ¹⁴. A ligação éster proveniente da esterificação não é detetável por esta técnica de RMN, uma vez que os elementos que são detetáveis são os prótons. Deste modo, seria necessário a técnica de C^{13} RMN para detetá-la.

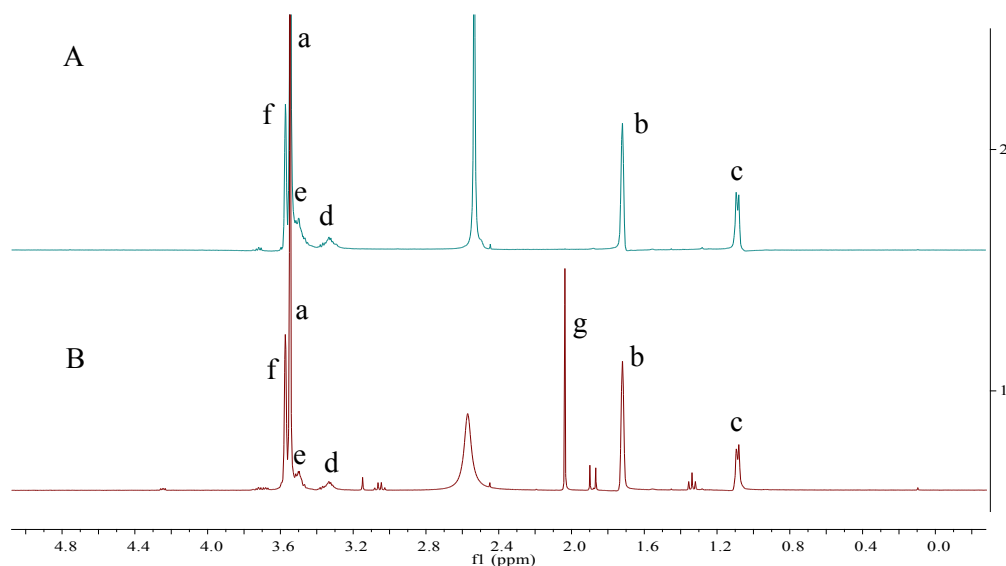


Figura 19 - Espectro de ^1H RMN dos polímeros sintetizados: (A) PLU e (B) PLU-Br

A Figura 20 representa o espectro de ^1H RMN do PPtBA e do PP. Nesta Figura existem picos em comum com os espectros anteriores, como os picos do solvente (a) e (b) e os picos (c), (d), (e) e (f) provenientes da cadeia de PLU⁸⁰. O pico (g) a 2,56 ppm representa o próton –CH presente no tBA e no PAA. No espectro A existe o pico (h) a 1,45 ppm, que indica a presença dos prótons –C(CH₃)₃ do tBA⁵. Este pico desaparece no espectro B, indicando que a hidrólise foi bem-sucedida.

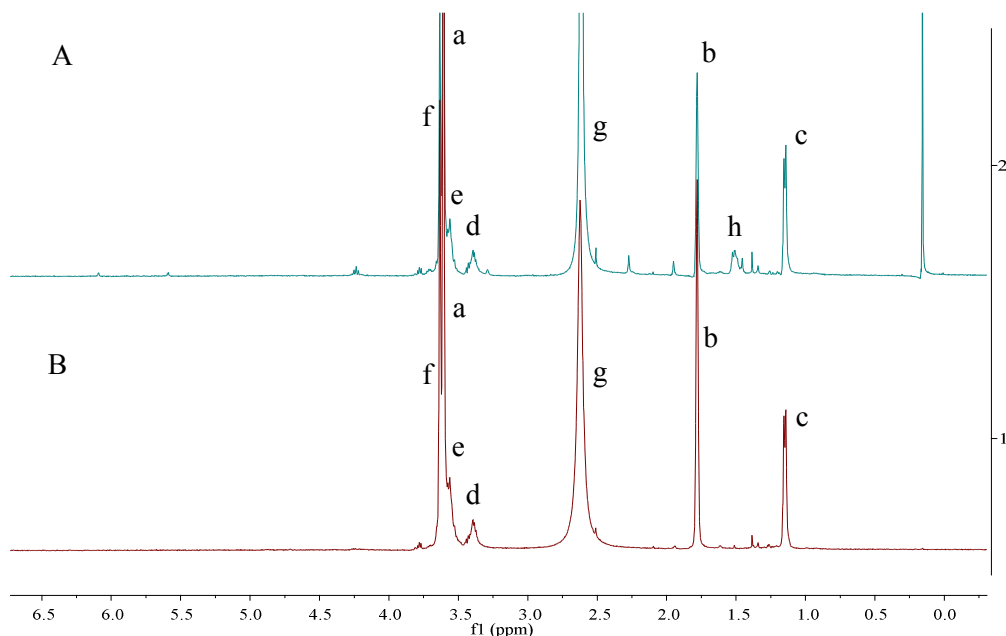


Figura 20 - Espectro de ^1H RMN dos polímeros sintetizados: (A) PPtBA e (B) PP

A Figura 21 refere-se ao espectro de RMN do polímero PPD. Os picos em comum deste espectro com os espectros representados nas figuras anteriores são os picos (a), (b), (c), (d), (e) e (f). Os restantes picos são característicos do PDMAEMA. O pico (g) entre 1,8 – 2 ppm é relativo à ligação –CH₂ na cadeia do PDMAEMA. Em relação ao (h), este é respeitante à ligação de dois grupos metil ao átomo de azoto (–(CH₃)₂-N), e tem como valor 2,62 ppm. A 4,1 ppm (i), existe um pico que indicia a presença da ligação –O-CH₂¹⁴.

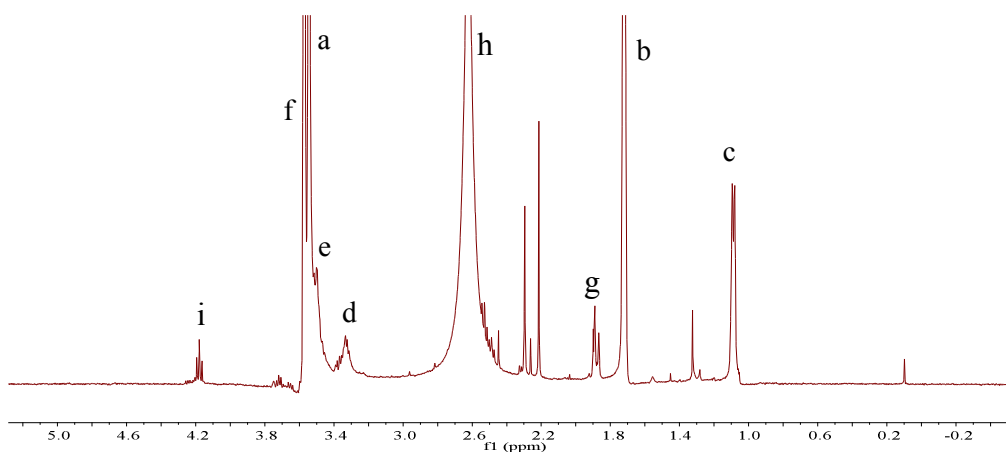


Figura 21 - Espectro de ^1H RMN do PPD

4.2 Caracterização de Lipossomas Convencionais e de CPL

De forma a assegurar uma formulação base adequada à formação dos CPL, foram preparados e caracterizados lipossomas convencionais de LC. Para tal, foram preparadas quatro amostras de cada formulação, que foram medidas cinco vezes pelo ZetaSizer Nano para determinar o diâmetro médio, polidispersividade e potencial zeta (Tabela 7). As formulações são compostas por LC e por CHO e SA em diferentes combinações.

Tabela 7 - Tamanho e potencial zeta (média e desvio padrão) dos lipossomas convencionais

Amostras	Diâmetro/nm	Polidispersividade	Potencial Zeta/mV
LC	227 ± 12	0,326 ± 0,055	-20,10 ± 1,38
LC/SA	212 ± 7	0,250 ± 0,015	-27,87 ± 2,24
LC/CHO	210 ± 12	0,448 ± 0,051	-35,37 ± 2,34
LC/CHO/SA	224 ± 8	0,286 ± 0,049	-29,67 ± 2,33

Verifica-se que os lipossomas formados possuem um tamanho adequado para a formulação dos CPL, uma vez que estes têm um diâmetro abaixo de 400 nm. Quanto menor for o diâmetro destas vesículas, menor vai ser a opsonização por parte do sistema imunológico, e, portanto, mais estáveis serão os lipossomas *in vivo*⁸¹. Logo, estes terão uma maior longevidade que permite que o fármaco seja libertado de forma controlada. Além disto, se for utilizado o efeito EPR (fenómeno relacionado com as diferenças anatómicas e patofisiológicas nos tecidos cancerosos em relação aos normais⁸²) para a formulação de lipossomas cujo alvo são tumores, o seu diâmetro deverá ser inferior a 400 nm⁸³.

A polidispersividade dá indicações sobre a distribuição de tamanhos de cada amostra. Constata-se que o melhor valor (média e, também, desvio padrão) corresponde aos lipossomas de LC/SA. No entanto, a polidispersividade de todas as amostras é aceitável, uma vez que todos os valores estão abaixo de 0,5.

A medição do potencial zeta das amostras indica que os lipossomas possuem carga negativa, sendo os mais negativos os de LC/CHO. A incorporação de CHO em lipossomas de lecitina provoca uma diminuição no potencial zeta, devido à formação de pontes de hidrogénio com o grupo hidroxilo do colesterol. A formação das pontes altera a conformação da bicamada, principalmente na posição da cabeça polar dos fosfolípidos. Como a cabeça é um dipolo, a parte positiva desloca-se mais para o interior e a parte negativa para o exterior. Assim, a presença do colesterol contribuiu para a negatividade dos lipossomas⁸⁴. De facto, quanto maior for a carga dos lipossomas, positiva ou negativa, maiores são as forças de repulsão no meio e menor é a tendência destes se aglomerarem¹³. Os valores obtidos indicam que os lipossomas terão esse atributo, o que é vantajoso do ponto de vista da aplicação como formulação base para CPL.

Uma vez selecionada a formulação lipossômica base, foram preparadas amostras de CPL com diferentes quantidades de polímero. A SA não foi adicionada às formulações com PPD, pois é um polímero catiónico. Como a SA é uma molécula com carga positiva, que facilita a incorporação de polímeros de carga negativa em lipossomas negativos, não é necessária a sua incorporação com polímeros positivos ⁵. Logo, como o PPD é positivo e os lipossomas são negativos, não existem forças de repulsão que impeçam a incorporação deste nos lipossomas. No caso do polímero PP, a presença de SA neutraliza parcialmente a carga dos lipossomas com carga negativa, permitindo a redução das repulsões eletrostáticas entre a LC e o polímero PP, cuja carga é negativa, e facilitando a incorporação do PP ⁸⁵. Portanto, para perceber o impacto da SA na formulação, foram preparadas com e sem esta molécula. Em relação ao polímero PLU, também foram preparadas amostras com e sem SA, de forma a analisar a influência deste composto. De facto, já foi reportado em trabalhos efetuados por membros do grupo de investigação, anteriormente, que 5 % de SA em lipossomas de LC favorece a contração do tamanho dos mesmos ⁵. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Tamanho, polidispersividade e potencial zeta dos CPL

Formulação Base	Polímero incorporado	Diâmetro/nm	Polidispersividade	Potencial Zeta/mV
LC	2,5 % PLU	201 ± 7	0,444 ± 0,062	-21,70 ± 2,99
	5 % PLU	210 ± 16	0,296 ± 0,049	-15,45 ± 1,76
	10 % PLU	216 ± 12	0,458 ± 0,072	-19,47 ± 1,12
	2,5 % PP	240 ± 11	0,427 ± 0,055	-20,02 ± 2,49
	5 % PP	253 ± 12	0,452 ± 0,076	-19,68 ± 1,29
	10 % PP	311 ± 10	0,437 ± 0,078	-16,68 ± 0,97
	2,5 % PPD	222 ± 9	0,432 ± 0,030	-13,63 ± 1,05
	5 % PPD	201 ± 15	0,393 ± 0,038	-14,08 ± 2,61
	10 % PPD	236 ± 6	0,369 ± 0,058	-9,80 ± 1,67
LC/SA	2,5 % PLU	238 ± 11	0,323 ± 0,063	-26,35 ± 2,34
	5 % PLU	223 ± 9	0,348 ± 0,108	-24,70 ± 1,55
	10 % PLU	227 ± 9	0,417 ± 0,059	-22,19 ± 2,16
	2,5 % PP	288 ± 16	0,529 ± 0,122	-28,07 ± 2,77
	5 % PP	273 ± 15	0,443 ± 0,074	-24,14 ± 2,16
	10 % PP	271 ± 13	0,462 ± 0,065	-21,08 ± 2,52
LC/SA/CHO	5 % PLU	247 ± 10	0,326 ± 0,113	-25,72 ± 2,29
	5 % PP	450 ± 13	0,325 ± 0,071	-22,73 ± 1,44
LC/CHO	5% PPD	273 ± 14	0,474 ± 0,056	-17,88 ± 2,21

As amostras com LC/PLU possuem um tamanho inferior quando comparadas com as formulações com SA. No entanto, a diferença de tamanho não é significativa devido aos

desvios-padrão das amostras. Verifica-se também que o aumento da quantidade de polímero incorporado, não tem um efeito drástico no tamanho dos CPL em ambas as formulações. A maior diferença reside no potencial zeta das amostras. Constata-se que o potencial zeta é inferior nos CPL de LC/PLU, em relação aos CPL de LC/SA/PLU. Os valores do potencial indicam que a SA dificulta a incorporação de PLU, responsável pela neutralização da carga negativa da LC. Assim, pode-se afirmar que a quantidade de polímero incorporado foi inferior nos CPL de LC/SA/PLU do que nos de LC/PLU. Observa-se também a diminuição da carga negativa com o aumento da quantidade de polímero adicionado. Este resultado vai de encontro ao expectável, pois o PLU atenua a carga dos lipossomas negativos. Logo, quanto maior for a quantidade adicionada de polímero, maior é o efeito de neutralidade do PLU, e menor será a negatividade dos complexos ¹⁹.

Pela comparação dos resultados das amostras de LC/SA/PLU e LC/SA/PP, verifica-se que existe um aumento do tamanho dos CPL. Isto deve-se ao facto de o polímero PP ter um tamanho superior ao polímero PLU. Logo, a incorporação do PP na bicamada lipídica provoca o aumento do diâmetro dos complexos. Em relação aos valores de polidispersividade, estes são superiores aos das amostras de LC/SA/PLU, ou seja, as amostras de LC/SA/PP possuem uma maior distribuição de tamanhos. Quanto ao potencial zeta, constata-se que estes seguem a mesma tendência que os descritos anteriormente, devido à presença do PLU no polímero PP. Apesar de o PAA ser negativo, a presença do PLU favorece a diminuição do potencial negativo dos CPL. Isto poderá ser explicado pelo facto de o polímero ter uma cadeia de PLU de tamanho superior à do PAA, que faz com que a neutralidade do PLU tenha uma influência maior na carga dos CPL, e, por sua vez, reduz o potencial negativo destes.

Em relação aos CPL de LC/PP e LC/SA/PP, constata-se que o tamanho dos CPL de LC/SA/PP diminui com a adição de polímero. Isto é explicado pela presença da SA, que permite a contração dos lipossomas base, e por uma incorporação superior de PP, uma vez que a SA facilita a incorporação de polímeros negativos. A contração dos CPL ocorre por via da interação entre o PAA e os protões da interface dos lípidos, que promove a formação de uma estrutura mais compacta ⁵. Ou seja, quanto maior for a quantidade de polímero incorporado, maiores são as interações e menor é o diâmetro dos CPL ⁸⁶. Os valores do potencial zeta refletem a incorporação do PP. De facto, verifica-se que existe uma diminuição da negatividade na ausência de SA, que indica que a incorporação do polímero foi inferior. Constata-se que a polidispersividade das amostras de LC/SA/PP é adequada, uma vez que está abaixo de 0,5.

A incorporação de 5 % de PPD favoreceu a formação de CPL de menor tamanho. Além disto, também se verificou que o tamanho dos CPL é menor com o polímero PPD do que com o PP. Apesar de o PPD possuir um peso molecular superior ao PP, o facto de o PPD possuir

PDMAEMA, cuja carga é positiva, pode facilitar a incorporação de polímero na bicamada e estabilizar o CPL. Quanto à polidispersividade, constata-se que os valores estão abaixo de 0,5, sendo estes admissíveis. Em relação ao potencial zeta, este vai de encontro ao expectável, pois a presença do polímero catiónico PDMAEMA reduz o potencial negativo dos CPL. Esta redução poderá não ser o melhor a nível da estabilidade da formulação, pois baixos valores absolutos da carga superficial sugerem que os CPL possam ter alguma propensão para se aglomerarem. No entanto, estabelecendo uma comparação entre os CPL de LC/PP e LC/PLU, verifica-se uma diferença significativa a nível do potencial apenas para os CPL com 10 % de polímero.

Para além do estudo da formulação base LC/SA para os CPL, também foram sintetizados CPL com CHO. Neste caso, a quantidade de polímero incorporada nas amostras foi de 5 %, uma vez que se pretendia avaliar o efeito da presença do CHO nos CPL. Comparando os resultados da Tabela 8 referentes às amostras de 5 % PLU com a amostra de LC/SA/CHO/PLU, verifica-se que o aumento de tamanho dos CPL com a adição de CHO e SA não é significativo. Quanto aos CPL com LC/SA/CHO/PP, é evidente que a presença do CHO provoca um aumento substancial do tamanho quando comparados com os CPL de LC/SA/PP. Em relação aos CPL com o polímero PPD, verifica-se que os CPL com CHO possuem um diâmetro médio superior aos CPL com 5 % de PPD incorporado. Portanto, a adição do CHO induziu a formação de CPL com diâmetros mais elevados. Os valores da polidispersividade para estas amostras são aceitáveis, uma vez que são inferiores a 0,5. Para o caso do potencial zeta, verifica-se que a presença do CHO permite a redução do potencial negativo dos CPL com PLU e PP e o aumento deste valor dos CPL com PPD quando comparados com os seus homólogos na Tabela 8.

4.3. Perfis de libertação

Os perfis de libertação foram avaliados após a encapsulação dos CPL com calceína, num leitor de placas (Synergy HT, Bio-Tek Instruments). As condições usadas procuraram simular as que os CPL encontram *in vivo* (pH neutro e 37 °C de temperatura), para poder averiguar o comportamento que estes sistemas teriam após a sua administração. A percentagem de calceína libertada tem como máximo a quantidade total de calceína que foi efetivamente encapsulada. Portanto, a Tabela 9 possui os resultados da quantidade total presente no interior dos CPL e dos lipossomas de LC.

Tabela 9 - Valores totais de calceína encapsulada nos CPL e lipossomas de LC

Formulação	Calceína Encapsulada/mM
LC	0,062 ± 0,004
2,5 % PLU	0,056 ± 0,010
5 % PLU	0,051 ± 0,0004
10 % PLU	0,063 ± 0,004
2,5 % PP	0,052 ± 0,010
LC 5 % PP	0,075 ± 0,002
LC 10 % PP	0,047 ± 0,003
2,5 % PPD	0,056 ± 0,002
5 % PPD	0,037 ± 0,001
10 % PPD	0,055 ± 0,003
2,5 % PP	0,076 ± 0,012
LC/SA 5 % PP	0,054 ± 0,009
LC/SA 10 % PP	0,059 ± 0,003

Os resultados da Tabela 9 demonstram que os CPL de LC/10 % PLU são os que contêm mais calceína quando comparados com os de 2,5 % e 5 % PLU. No caso da formulação de LC/PP, isto não se verifica, uma vez que são os CPL de 5 % de PP que encapsulam uma quantidade de calceína superior. Comparando com a formulação com SA, constata-se que o valor mais alto corresponde aos CPL com 2,5 % de polímero PP incorporado. Por último, a formulação composta por LC e PPD possui valores semelhantes com 2,5 % e 10 % de polímero incorporado.

A Figura 22 revela o perfil de libertação dos CPL de LC/PLU. Verifica-se que os melhores CPL são os que contêm 10 % de polímero, pois são aqueles que libertam menos ao longo do tempo. Quanto à libertação dos CPL com 2,5 % e 5 %, constata-se que existe pouca diferença na calceína libertada ao longo do tempo. Logo, os CPL mais estáveis são que possuem 10 % de polímero, pois a perda das moléculas encapsuladas é menor. Estes resultados sugerem que a incorporação de uma quantidade maior de polímero beneficia a estabilidade da bicamada lipídica e, por sua vez, dos CPL.

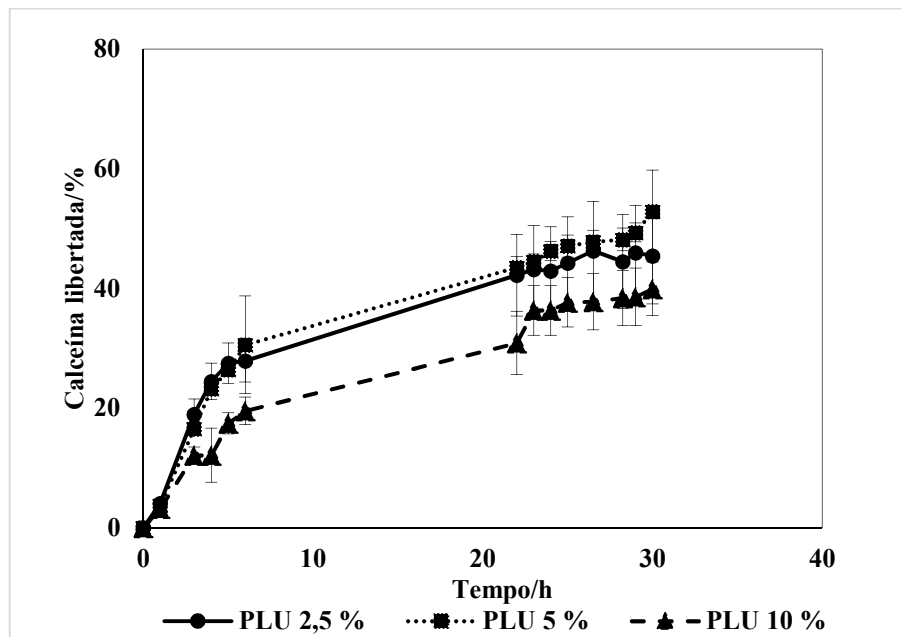


Figura 22 - Perfil de liberação dos CPL com LC/PLU

Quanto aos CPL compostos por LC/PP, verifica-se que os CPL com 10 % de polímero incorporado são os que libertam menos e que os CPL com 2,5 % e 5 % apresentam perfis de liberação semelhantes (Figura 23). Pode-se afirmar que a incorporação de 10 % favorece a estabilidade da bicamada lipídica.

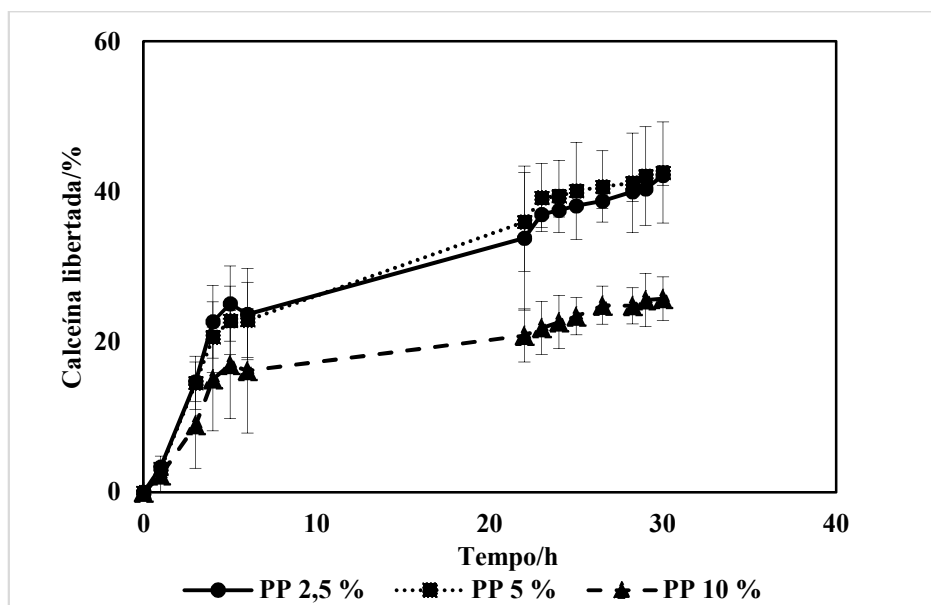


Figura 23 - Perfil de liberação dos CPL com LC/PP

Os perfis de liberação correspondentes aos CPL com PP e SA estão representados na Figura 24. Apesar da percentagem de polímero incorporado ser diferente, verifica-se que o

perfil de libertação é idêntico para os vários de CPL. Ou seja, a quantidade incorporada de polímero não tem influência na eficiência de encapsulamento dos complexos.

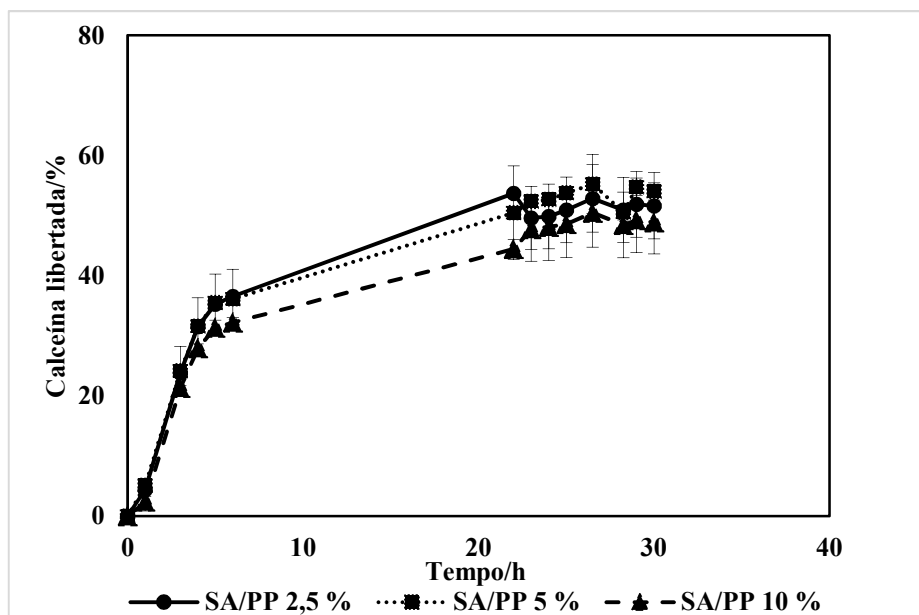


Figura 24 - Perfil de libertação dos CPL com LC/SA/PP

Comparando os resultados da Figura 24 com os da Figura 23, constata-se que, para o mesmo tempo, os CPL com SA libertam mais calceína. Deste modo, a presença da SA não favorece a estabilidade dos CPL com PP. De facto, a interação entre a SA e o polímero poderá desencadear a instabilidade da bicamada, favorecendo assim uma libertação precoce da calceína.

Em relação aos CPL com o polímero PPD (Figura 25), também se constata que os CPL que libertam menos calceína ao longo das 30 h são os de 10 %. Para além da quantidade libertada de calceína ser baixa, estes são os que libertam menos nas primeiras horas, quando comparados com os de 10 % de PLU e PP sem SA. Esta característica é bastante importante, pois quando são administrados CPL com fármacos encapsulados *in vivo*, a libertação deve ser baixa nas primeiras horas para assegurar que os CPL chegam ao local alvo. Portanto, a libertação baixa da calceína é indicativa da estabilidade destes CPL e na eficácia destes em manter as moléculas encapsuladas. Se for feita uma comparação dos CPL com as várias quantidades de PPD, verifica-se que a maior diferença reside entre os de 2,5 % e 5 %, e que a quantidade de calceína libertada dos de 10 % e 5 % é semelhante. Isto indica que o efeito de incorporação do polímero nos CPL evidencia-se a partir dos 5 %.

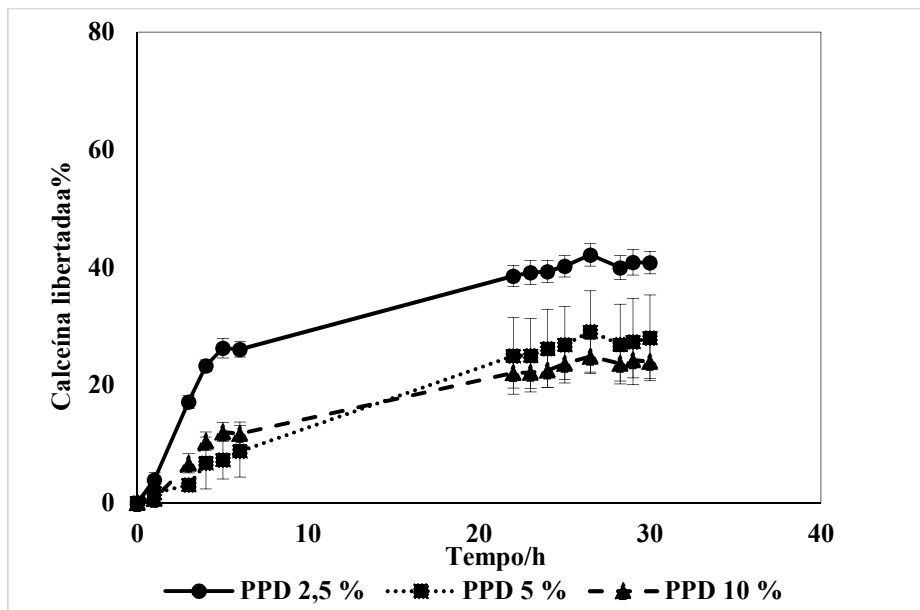


Figura 25 - Perfis de liberação dos CPL com LC/PPD

Em suma, o cruzamento dos resultados dos vários perfis de liberação indica que os CPL que apresentam melhores características são que têm 10 % de polímero incorporado.

A Figura 26 demonstra que os CPL obtidos possuem uma boa capacidade de retenção das moléculas encapsuladas, quando comparados com os lipossomas de apenas LC. Os lipossomas de LC possuem uma camada lipídica com uma fluidez maior que a presente nos CPL. Esta fluidez torna a bicamada pouco estável, permitindo a fuga das moléculas encapsuladas³⁷. Ao invés, a incorporação dos polímeros confere estabilidade ao conjunto, resultando em CPL com perfis de liberação baixos. Consta-se que dos CPL cujos perfis se apresentam na Figura 25, que possuem PPD e PP, são os que libertam menos calceína. De facto, os perfis de liberação são semelhantes à exceção das primeiras 15 h.

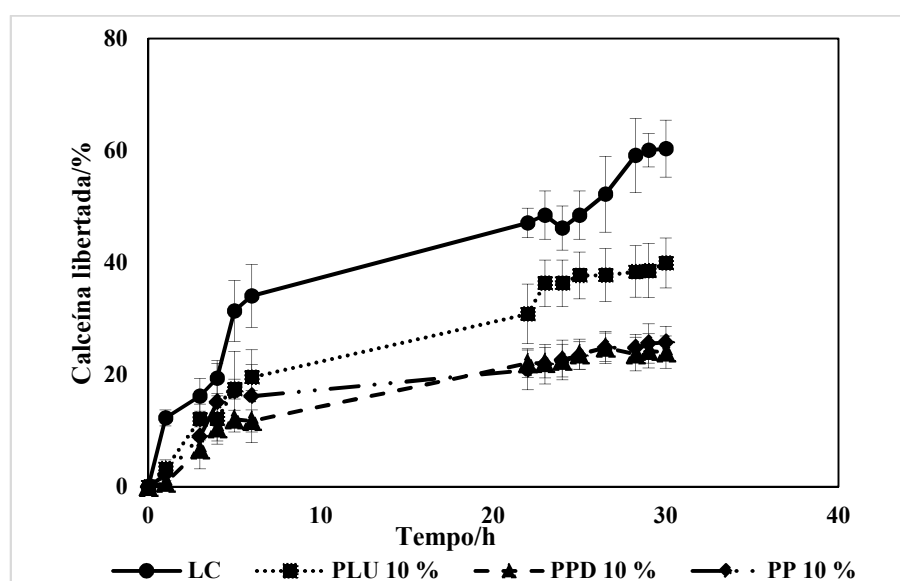


Figura 26 - Perfis de Liberação dos CPL com 10 % de polímero

Uma vez que os polímeros incorporados na formulação dos CPL são sensíveis ao pH e temperaturas, foram realizados testes em diferentes condições relativas a essas variáveis. Nestes estudos, foram testadas as amostras com 10 % de polímero incorporado pelas razões acima apontadas.

Primeiro, testaram-se as amostras com uma temperatura diferente de 37 °C, mais precisamente de 42 °C, temperatura considerada como condição de hipertermia *in vivo*. Ou seja, os lipossomas com sensibilidade à temperatura devem libertar o seu conteúdo a esta temperatura⁸⁷. Portanto, os CPL formulados devem ser capazes de libertar o seu conteúdo nestas condições *in vitro*, uma vez que contêm polímeros sensíveis temperatura. O polímero PPD é sensível à temperatura assim como o PLU. No caso dos polímeros PP e PLU, estes apenas contêm o PLU na sua cadeia com esta característica.

Pela análise dos resultados da Figura 27, verifica-se claramente que os CPL que libertam mais calceína são que os possuem PPD. Isto vai de encontro ao expectável, uma vez que o polímero PPD é sensível à temperatura devido à presença do PDMAEMA na sua estrutura. A sensibilidade do polímero à temperatura provoca a destabilização dos CPL, e a libertação da calceína encapsulada, através da mudança de estado do polímero, i.e. estado hidrofílico para hidrofóbico. Quanto aos CPL com PLU e PP, a percentagem de calceína libertada não variou de forma significativa dos lipossomas de LC. Apesar de possuir alguma sensibilidade à temperatura, o Pluronic[®] presente no polímero PLU e PP não possui a mesma eficácia que o PDMAEMA presente no PPD.

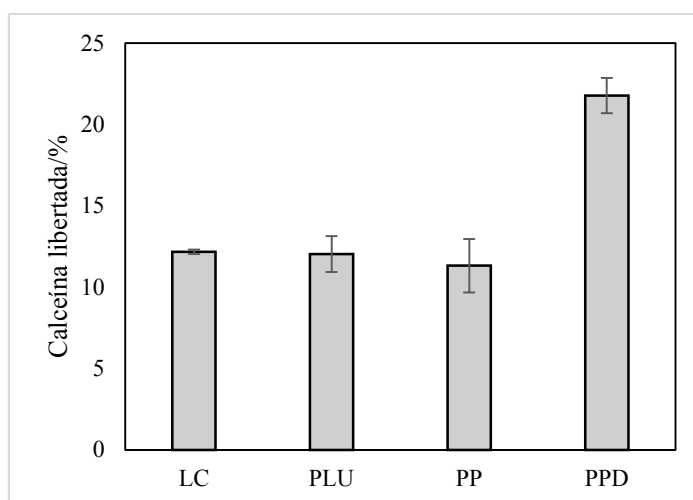


Figura 27 - Libertação dos CPL a 42 °C

O estudo da libertação a diferentes pH encontra-se representado na Figura 28. Este estudo foi efetuado a 37 °C para perceber a influência do pH na taxa de libertação dos lipossomas.

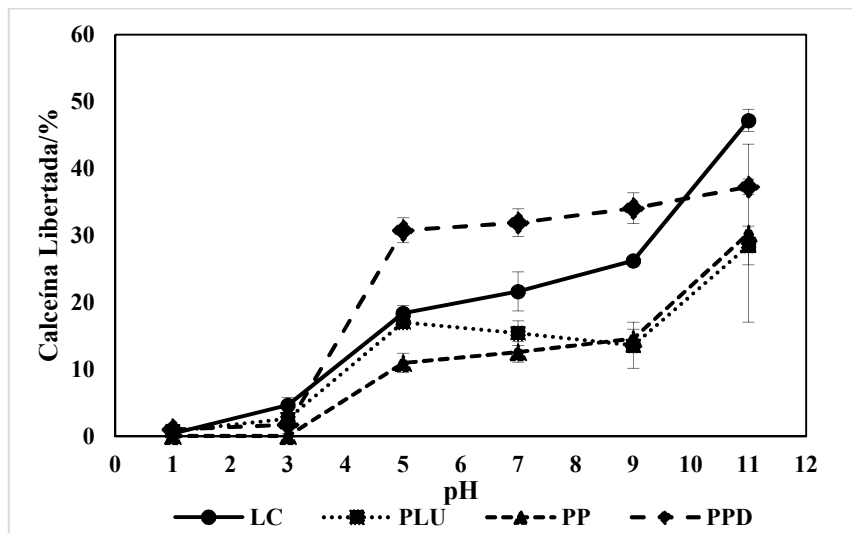


Figura 28 - Perfil de libertação dos CPL com pH diferentes

Pela Figura 28 observa-se que os CPL libertam mais calceína a pH básico, do que a pH neutro. Também se verifica que a pH ácidos, a taxa de libertação é inferior à do pH neutro. Isto não é expectável, uma vez que estes resultados são opostos aos que foram obtidos em trabalhos publicados. De facto, os trabalhos publicados indicam que os CPL devem libertar mais o seu conteúdo a pH ácido, devendo assim a libertação da calceína encapsulada a pH 5 ser superior em relação ao pH básico. A libertação a pH neutro deve também ser mínima quando comparada com pH ácido e básico. Constata-se que os CPL com PPD libertam uma quantidade superior, quando comparados com os que contêm PP. Este resultado não é expectável, pois o polímero PP possui PAA, que é sensível ao pH, e, portanto, os CPL com PP deveriam ser os que libertam mais a pH ácido. De facto, verificando os resultados para pH 7, estes vão contra o que é apresentado na Figura 19, em que os CPL de PPD são os que libertam menos e os lipossomas de lecitina mais. Portanto, conclui-se que a capacidade de responder ao pH ácido por parte dos CPL não foi atingida na formulação dos mesmos, devendo-se repetir este teste para confirmar estes resultados e para afastar a possibilidade de estes valores advirem de algum erro experimental.

4.4 Determinação da concentração de lípidos e da eficiência de encapsulação

A determinação da concentração de lípidos foi efetuada apenas para os CPL com 10 % de polímero, uma vez que foram estes que apresentaram os melhores resultados nos testes de libertação. Esta determinação é necessária para o cálculo da eficiência de encapsulação dos CPL.

Com a concentração de lípidos determinada (pelo método descrito na secção 3.3.7), calculou-se a eficiência de encapsulação, para tal foram utilizados os valores obtidos nos testes

de libertação, mais precisamente, o valor final de calceína após o colapso dos CPL e o valor obtido no início da libertação. Estes valores são obtidos após a conversão da fluorescência em concentração mediante uma reta de calibração. Assim, para calcular a eficiência de encapsulação recorre-se à expressão (3) da secção 3.3.8. Os valores obtidos para a eficiência de encapsulação estão presentes na Tabela 10.

Tabela 10 - Eficiência de encapsulação e dados necessários ao seu cálculo

Amostras	Calceína Encapsulada/mM	Lípidos/mM	Eficiência de Encapsulação/ %
LC	0,062 ± 0,004	3,083 ± 0,440	18,98 ± 1,15
LC/10 % PLU	0,063 ± 0,004	2,806 ± 0,273	17,56 ± 1,05
LC/10 % PP	0,047 ± 0,003	2,647 ± 0,151	12,55 ± 0,69
LC/10 % PPD	0,055 ± 0,003	2,791 ± 0,379	15,35 ± 0,78

Para que os CPL possam ser utilizados como sistemas de entrega controlada de fármacos, é crucial que possuam uma eficiência de encapsulação elevada, i.e. que impeçam a fuga do fármaco encapsulado, mantendo a concentração no seu interior⁸⁸. Apesar de a diferença entre as eficiências não ser significativa, os resultados obtidos são contrários ao que é pretendido, pois os CPL possuem uma eficiência de encapsulação inferior aos lipossomas de LC. Os CPL possuem uma eficiência inferior são os de PP. Devido à carga do PAA, o copolímero PP é bastante negativo. Esta negatividade poderá afetar negativamente a capacidade de retenção da calceína, cuja carga é bastante negativa, devido a repulsões electrostáticas entre o PP e a molécula. A forma como os polímeros incorporam na bicamada também poderá explicar a baixa eficiência de encapsulação. Neste trabalho, como os polímeros possuem PLU e foram adicionados após a formação dos lipossomas, deduz-se que estes foram incorporados por adsorção. Portanto, estes não ocupam o núcleo, e não é a sua disposição que explica as baixas eficiências. Uma possível explicação remete para o facto de Pluronic[®] F68 ter a capacidade de agir como um agente selante, quando incorporado nas membranas lipídicas, através da redução da flutuação da superfície e da hidratação da parte interna da bicamada⁸⁹. Deduz-se que o PLU presente nos polímeros dificultou a encapsulação, devido a esta característica.

4.5 Viabilidade Celular

De forma a avaliar a toxicidade dos CPL com 10 % de polímero PLU, PP e PPD incorporado, foi efetuado um estudo MTT com células Caco-2/TC7. As células foram expostas a concentrações de 75, 375 e 750 μM das diferentes formulações, durante 24 horas. Os resultados obtidos estão presentes na Figura 29.

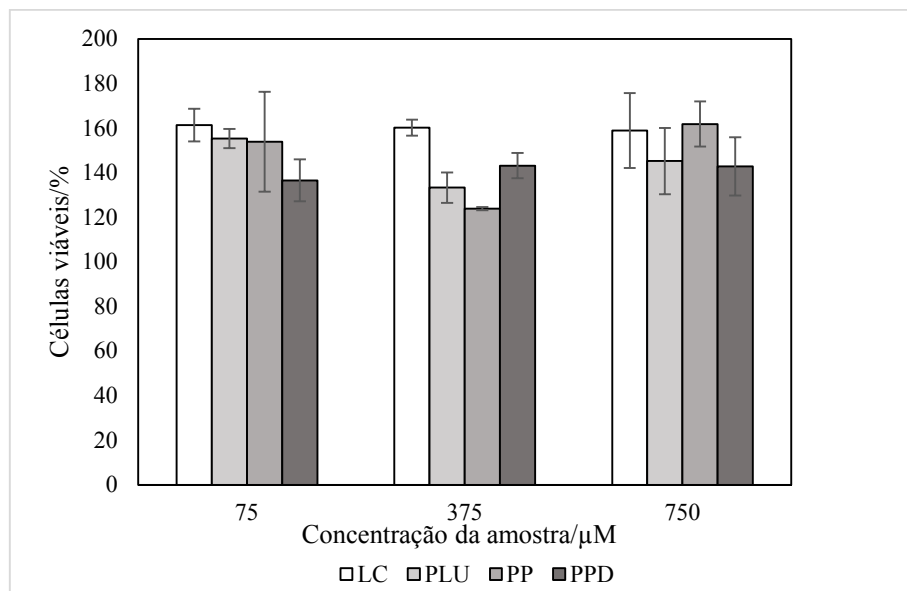


Figura 29 - Quantidade de células viáveis e função da concentração das amostras

Verifica-se em qualquer das concentrações estudadas que as amostras de CPL não possuem efeitos nocivos para células, uma vez que todos os resultados se encontram acima dos 100 % de viabilidade. Isto significa que as células não morreram e ainda foram capazes de se reproduzirem na presença dos lipossomas de LC e dos CPL. Portanto, os CPL não apresentam efeitos tóxicos, graças à presença de polímeros biocompatíveis e devido à natureza dos fosfolípidos, uma vez que estes são similares aos constituintes fundamentais das células.

5. Conclusões

O trabalho desenvolvido no âmbito dos CPL como sistemas inteligentes de liberação controlada dividiu-se em duas partes. A primeira correspondeu à síntese dos polímeros a serem incorporados nos lipossomas, e a segunda à formação dos CPL. Com a polimerização ATRP sintetizaram-se polímeros com as características ideais, como a dispersividade e peso molecular, para a sua utilização nos CPL.

Após o estudo do tamanho, polidispersividade e potencial zeta de várias formulações base, formularam-se CPL com a incorporação de várias quantidades dos polímeros. Os CPL formados possuíam um tamanho, polidispersividade e potencial zeta adequados às exigências padrão. Além disto, demonstrou-se que os CPL com 10 % de polímero incorporado eram mais estáveis, uma vez que libertavam menos em condições fisiológicas, sendo esta uma característica desejada nos CPL. Como os CPL formados têm como objetivo ser sensíveis a estímulos, verificou-se que com PPD eram sensíveis à temperatura, e, portanto, libertavam mais a temperaturas superiores à fisiológica. Os CPL obtidos também mostraram ser biocompatíveis e não tóxicos.

Apesar destas características serem ideais para a sua utilização, pretendia-se que os CPL possuíssem sensibilidade ao pH, principalmente a pH ácido. Ou seja, os CPL deviam libertar mais a pH abaixo de 7. Este critério não foi atingido, devendo os testes de liberação ser repetidos para comprovar ou contradizer os resultados obtidos. Como foi dito anteriormente, os resultados são contrários aos demonstrados noutros trabalhos. Além disto, as eficiências de encapsulação obtidas para os CPL foram inferiores à eficiência de encapsulação dos lipossomas de LC. Idealmente, a presença do polímero deve fornecer estabilidade à bicamada lipídica e aumentar a capacidade de retenção das moléculas nos CPL. No entanto, isto não significa que o polímero facilite a entrada das moléculas para o interior dos CPL. Deste modo, este fator contribui para a baixa encapsulação e eficiência, e poderá ser a causa mais provável para os valores obtidos de eficiência.

Os CPL formados neste trabalho apresentam potencial para serem utilizados como sistemas de liberação controlada. No entanto, devem ainda ser efetuados mais estudos e otimizações para poderem ser aplicados *in vivo*.

6. Trabalhos Futuros

Apesar dos CPL demonstrarem algumas das características fundamentais para a sua utilização, ainda devem ser efetuados alguns estudos e otimizações. Como o Pluronic® apresenta propriedades mucoadesivas e interage com as células, devem ser realizados testes para perceber melhor a interação dos CPL com as células, principalmente com as células tumorais. Além disto, deve ser estudada a encapsulação de agentes ativos, ou de moléculas, como proteínas e anticorpos, para perceber se as formulações possuem as características ideais para serem utilizadas. Fica também a intenção de alcançar uma formulação com sensibilidade simultânea ao pH e à temperatura, devendo ser feitos, futuramente, mais testes de libertação com pH diferentes para apurar os resultados obtidos.

6. Bibliografia

1. Rambhia KJ, Ma PX. Controlled drug release for tissue engineering. *J Control Release*. 2015;219:119-128. doi:10.1016/j.jconrel.2015.08.049.
2. Bastiancich C, Danhier P, Pr at V, Danhier F. Anticancer drug-loaded hydrogels as drug delivery systems for the local treatment of glioblastoma. *J Control Release*. 2016;243:29-42. doi:10.1016/j.jconrel.2016.09.034.
3. Saadat E, Amini M, Khoshayand MR, Dinarvand R, Dorkoosh FA. Synthesis and optimization of a novel polymeric micelle based on hyaluronic acid and phospholipids for delivery of paclitaxel, in vitro and in-vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2014;475(1-2):163-173. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.08.030.
4. Robert C, Wilson CS, Venuta A, Ferrari M, Arreto CD. Evolution of the scientific literature on drug delivery: A 1974–2015 bibliometric study. 2017;260(June):226-233. doi:10.1016/j.jconrel.2017.06.012.
5. Simões MG, Alves P, Carneiro M, Simões PN. Stability effect of cholesterol-poly(acrylic acid) in a stimuli-responsive polymer-liposome complex obtained from soybean lecithin for controlled drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017;152:103-113. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.01.002.
6. Vasi AM, Popa MI, Tanase EC, Butnaru M, Verestiuc L. Poly(Acrylic Acid)-Poly(Ethylene Glycol) nanoparticles designed for ophthalmic drug delivery. *J Pharm Sci*. 2014;103(2):676-686. doi:10.1002/jps.23793.
7. Lee SM, Nguyen ST. Smart nanoscale drug delivery platforms from stimuli-responsive polymers and liposomes. *Macromolecules*. 2013;46(23):9169-9180. doi:10.1021/ma401529w.
8. Yang W-W, Pierstorff E. Reservoir-based polymer drug delivery systems. *J Lab Autom*. 2012;17(1):50-58. doi:10.1177/2211068211428189.
9. Holowka E, Bhatia SK. *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective*. 1st ed. New York: Springer-Verlag; 2014. doi:10.1007/978-3-642-00477-3.
10. Siegel RA, Rathbone MJ. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. 1st ed. (Siepmann J, Siegel RA, Rathbone MJ, eds.). New York: Springer US; 2012. doi:10.1007/978-1-4614-0881-9.
11. Cabane E, Zhang X, Langowska K, Palivan CG, Meier W. Stimuli-responsive polymers and their applications in nanomedicine. *Biointerphases*. 2012;7(1-4):1-27. doi:10.1007/s13758-011-0009-3.
12. Park K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *J Control*

- Release*. 2014;190:3-8. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.054.
13. Pattni BS, Chupin V V., Torchilin VP. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chem Rev*. 2015;115(19):10938-10966. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00046.
 14. Alves P, Hugo AA, Tymczyszyn EE, et al. Effect of cholesterol-poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) on the properties of stimuli-responsive polymer liposome complexes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013;104:254-261. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.12.016.
 15. Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(11):813-827. doi:10.1038/nrd4333.
 16. Zhu L, Torchilin VP. Stimulus-responsive nanopreparations for tumor targeting. *Integr Biol*. 2013;5(1):96-107. doi:10.1039/C2IB20135F.
 17. Ta T, Porter TM. Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *J Control Release*. 2013;169(1-2):112-125. doi:10.1016/j.jconrel.2013.03.036.
 18. Zhirnov AE, Demina T V., Krylova OO, Grozdova ID, Melik-Nubarov NS. Lipid composition determines interaction of liposome membranes with Pluronic L61. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2005;1720(1-2):73-83. doi:10.1016/j.bbamem.2005.11.010.
 19. Li X, Chen D, Le C, et al. Novel mucus-penetrating liposomes as a potential oral drug delivery system: preparation, in vitro characterization, and enhanced cellular uptake. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:3151-3162. doi:10.2147/IJN.S25741.
 20. Bonacucina G, Cespi M, Mencarelli G, Giorgioni G, Palmieri GF. Thermosensitive self-assembling block copolymers as drug delivery systems. *Polymers (Basel)*. 2011;3(2):779-811. doi:10.3390/polym3020779.
 21. Batrakova E V., Li S, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov A V. Optimal Structure Requirements for Pluronic Block Copolymers in Modifying P-glycoprotein Drug Efflux Transporter Activity in Bovine Brain Microvessel Endothelial Cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(2):845-854. doi:10.1124/jpet.102.043307.
 22. Batrakova E V., Kabanov A V. Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers. *J Control Release*. 2008;130(2):98-106. doi:10.1016/j.jconrel.2008.04.013.Pluronic.
 23. Tianyi K, Exner AA. Structural parameters governing activity of Pluronic triblock copolymers in hyperthermia cancer therapy. *Int J Hyperth*. 2011;27(7):663-671. doi:10.3109/02656736.2011.599828.Structural.
 24. Swift T, Swanson L, Geoghegan M, Rimmer S. The pH-responsive behaviour of poly(acrylic acid) in aqueous solution is dependent on molar mass. *Soft Matter*.

- 2016;12(9):2542-2549. doi:10.1039/C5SM02693H.
25. Agarwal S, Zhang Y, Maji S, Greiner A. PDMAEMA based gene delivery materials. *Mater Today*. 2012;15(9):388-393. doi:10.1016/S1369-7021(12)70165-7.
 26. Car A, Baumann P, Duskey JT, Chami M, Bruns N, Meier W. pH-Responsive PDMS- b -PDMAEMA Micelles for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Biomacromolecules*. 2014;15(9):3235-3245. doi:10.1021/bm500919z.
 27. Lungu II, Radulescu M, Mogosanu GD, Grumezescu AM. pH sensitive core-shell magnetic nanoparticles for targeted drug delivery in cancer therapy. 2016;57(1):23-32.
 28. Trehan S, Misra A. Polymers in Drug Delivery Systems. In: Misra A, Shahiwala A, eds. *Applications of Polymers in Drug Delivery*. 1st ed. Shawbury: Smithers Raper Technology Ltd; 2014:546.
 29. Naeem S, Kiew LV, Chung LY, Fui KS, Misran M Bin. A Comparative Approach for the Preparation and Physicochemical Characterization of Lecithin Liposomes Using Chloroform and Non-Halogenated Solvents. *J Surfactants Deterg*. 2015;18(4):579-587. doi:10.1007/s11743-015-1689-3.
 30. Mahajan RK, Shaheen A, Sachar S. Effect of triblock polymer (Pluronic F68) on the mixed systems of oppositely charged hydrocarbon surfactants. *J Dispers Sci Technol*. 2009;30(7):1020-1026. doi:10.1080/01932690802701515.
 31. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J Colloid Sci Biotechnol*. 2012;1(2):147-168. doi:10.1166/jcsb.2012.1020.
 32. Li J, Wang X, Zhang T, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci*. 2014;10(2):81-98. doi:10.1016/j.ajps.2014.09.004.
 33. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd editio. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9928/>.
 34. Yang S-T, Kreutzberger AJB, Lee J, Kiessling V, Tamm LK. The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem Phys Lipids*. 2016;199:136-143. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003.
 35. Wang J, Xing X, Fang X, et al. Cationic amphiphilic drugs self-assemble to the core-shell interface of PEGylated phospholipid micelles and stabilize micellar structure. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci*. 2013;371(2000):20120309-20120309. doi:10.1098/rsta.2012.0309.
 36. Alves P, Hugo AA, Szymanowski F, et al. Stabilization of polymer lipid complexes prepared with lipids of lactic acid bacteria upon preservation and internalization into

- eukaryotic cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;123:446-451. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.09.043.
37. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(1):36-48. doi:10.1016/j.addr.2012.09.037.
 38. Storm G, Crommelin DJA. Liposomes : quo vadis ? 1998;1(1):7-8.
 39. De Araújo Lopes SC, Novais MVM, Teixeira CS, et al. Preparation, physicochemical characterization, and cell viability evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing ursolic acid. *Biomed Res Int*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/467147.
 40. Karanth H, Murthy RSR. pH-Sensitive liposomes-principle and application in cancer therapy. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(4):469-483. doi:10.1211/jpp.59.4.0001.
 41. Li M, Fei X, Shi F, et al. Homoharringtonine delivered by high proportion PEG of long-circulating liposomes inhibits RPMI8226 multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Am J Transl Res*. 2016;8(3):1355-1368.
 42. Yang C, Liu HZ, Fu ZX, Lu WD. Oxaliplatin long-circulating liposomes improved therapeutic index of colorectal carcinoma. *BMC Biotechnol*. 2011;11(1):21. doi:10.1186/1472-6750-11-21.
 43. Schmidt J, Metselaar JM, Wauben MHM, Toyka K V., Storm G, Gold R. Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain*. 2003;126(8):1895-1904. doi:10.1093/brain/awg176.
 44. Lee Y, Thompson DH. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2017;(Figure 2). doi:10.1002/wnan.1450.
 45. Simões S, Nuno Moreira J, Fonseca C, Düzgüneş N, Pedroso De Lima MC. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(7):947-965. doi:10.1016/j.addr.2003.10.038.
 46. Kneidl B, Peller M, Winter G, Lindner LH, Hossann M. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:4387-4398. doi:10.2147/IJN.S49297.
 47. Kono K. Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;53(3):307-319. doi:10.1016/S0169-409X(01)00204-6.
 48. Andresen TL, Thompson DH, Kaasgaard T. Enzyme-triggered nanomedicine: Drug release strategies in cancer therapy (Invited Review). *Mol Membr Biol*. 2010;27(7):353-363. doi:10.3109/09687688.2010.515950.
 49. Sawant RR, Torchilin VP. Liposomes as “smart” pharmaceutical nanocarriers. *Soft Matter*. 2010;6(17):4026. doi:10.1039/b923535n.

50. Hardiansyah A, Huang L-Y, Yang M-C, et al. Magnetic liposomes for colorectal cancer cells therapy by high-frequency magnetic field treatment. *Nanoscale Res Lett.* 2014;9(1):497. doi:10.1186/1556-276X-9-497.
51. Pradhan P, Giri J, Rieken F, et al. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *J Control Release.* 2010;142(1):108-121. doi:10.1016/j.jconrel.2009.10.002.
52. Pradhan P, Giri J, Banerjee R, Bellare J, Bahadur D. Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer. *J Magn Magn Mater.* 2007;311(1 SPEC. ISS.):208-215. doi:10.1016/j.jmmm.2006.10.1179.
53. You J, Zhang P, Hu F, et al. Near-Infrared light-sensitive liposomes for the enhanced photothermal tumor treatment by the combination with chemotherapy. *Pharm Res.* 2014;31(3):554-565. doi:10.1007/s11095-013-1180-7.
54. Puri A. Phototriggerable liposomes: Current research and future perspectives. *Pharmaceutics.* 2014;6(1):1-25. doi:10.3390/pharmaceutics6010001.
55. Schroeder A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chem Phys Lipids.* 2009;162(1-2):1-16. doi:10.1016/j.chemphyslip.2009.08.003.
56. Schroeder A, Honen R, Turjeman K, Gabizon A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *J Control Release.* 2009;137(1):63-68. doi:10.1016/j.jconrel.2009.03.007.
57. Kontermann RE. Immunoliposomes for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2006;8(1):39-45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506524>.
58. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:975-999. doi:10.2147/IJN.S68861.
59. Shim G, Kim MG, Park JY, Oh YK. Application of cationic liposomes for delivery of nucleic acids. *Asian J Pharm Sci.* 2013;8(2):120-128. doi:10.1016/j.ajps.2013.07.009.
60. Roces CB, Kastner E, Stone P, Lowry D, Perrie Y. Rapid quantification and validation of lipid concentrations within liposomes. *Pharmaceutics.* 2016;8(3):1-11. doi:10.3390/pharmaceutics8030029.
61. Angius F, Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair. *Toxicol Vitro.* 2015;29(2):314-319. doi:10.1016/j.tiv.2014.11.009.
62. Çağdaş M, Sezer AD, Bucak S. Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery. *Appl Nanotechnol Drug Deliv.* 2014:1-50. doi:10.5772/58459.
63. Samad A, Sultana Y, Aqil M. Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review.

- Curr Drug Deliv.* 2007;4(4):297-305. doi:10.2174/156720107782151269.
64. Toh M-R, Chiu GNC. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian J Pharm Sci.* 2013;8(2):88-95. doi:10.1016/j.ajps.2013.07.011.
 65. Canevarolo Jr. SV. *Ciência Dos Polímeros - Um Texto Básico Para Tecnólogos E Engenheiros.* 2nd Editio. São Paulo: Artliber Editora Ltda.; 2006.
 66. Su W-F. *Principles of Polymer Design and Synthesis.* Vol 82. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2013. doi:10.1007/978-3-642-38730-2.
 67. Bisht HS, Chatterjee AK. Living Free-Radical Polymerization—a Review. *J Macromol Sci Part C Polym Rev.* 2001;41(3):139-173. doi:10.1081/MC-100107774.
 68. Li X, Mastan E, Wang W-J, Lia B-G, Zhu S. Reaction Chemistry & Engineering Progress in reactor engineering of controlled radical polymerization : a comprehensive review. *React Chem Eng.* 2016;1:23-59. doi:10.1039/C5RE00044K.
 69. Moad G, Rizzardo E, Thang SH. Radical addition e fragmentation chemistry in polymer synthesis. *Polymer (Guildf).* 2008;49(5):1079-1131. doi:10.1016/j.polymer.2007.11.020.
 70. Qiu J, Charleux B, Matyjaszewski K, Pierre Â, Curie M. Controlled / living radical polymerization in aqueous media : homogeneous and heterogeneous systems. *Prog Polym Sci.* 2001;26:2083-2134. doi:10.1016/S0079-6700(01)00033-8.
 71. Malvern. <https://www.malvern.com/en/>. Accessed May 10, 2017.
 72. Agilent Technologies Inc. An Introduction to Gel Permeation Chromatography and Size Exclusion Chromatography. [http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-6969EN GPC SEC Chrom Guide.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/5990-6969EN%20GPC%20SEC%20Chrom%20Guide.pdf). Published 2015. Accessed May 10, 2017.
 73. Bruker. Nuclear Magnetic Resonance (NMR). <https://www.bruker.com/pt/products/mr/nmr.html>. Published 2017. Accessed May 10, 2017.
 74. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principles of Instrumental Analysis.* 5th ed. Orlando: Harcourt Inc.; 1998.
 75. Scientific T. FTIR-ATR. <https://www.thermofisher.com>. Accessed May 15, 2017.
 76. Williams ATR. *An Introduction to Fluorescence Spectroscopy.* Buckinghamshire: PerkinElmer, Inc; 1981.
 77. Pina F. Espectrofluorimetria - O fenómeno da absorção e emissão de luz pelas moléculas. *Química.* 1994;54:88-91.
 78. Chen C, Yao J, Durst RA. Liposome encapsulation of fluorescent nanoparticles :

- Quantum dots and silica nanoparticles. *J Nanoparticles Res.* 2006;8(6):1033-1038. doi:10.1007/s11051-006-9142-1.
79. Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, et al. NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics.* 2010;29(9):2176-2179. doi:10.1021/om100106e.
80. Ding H, Yong K-T, Law W-C, et al. Non-invasive tumor detection in small animals using novel functional Pluronic nanomicelles conjugated with anti-mesothelin antibody. *Nanoscale.* 2011;3(4):1813-1822. doi:10.1039/c1nr00001b.
81. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front Pharmacol.* 2015;6(DEC):1-13. doi:10.3389/fphar.2015.00286.
82. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(3):136-151. doi:10.1016/j.addr.2010.04.009.
83. Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond).* 2013;8(9):1-32. doi:10.2217/nnm.13.118.Current.
84. Mohammadi M, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H. Formulation of nanoliposomal vitamin D3 for potential application in beverage fortification. *Adv Pharm Bull.* 2014;4(Suppl 2):569-575. doi:10.5681/apb.2014.084.
85. Hollmann A, Delfederico L, Glikmann G, De Antoni G, Semorile L, Disalvo EA. Characterization of liposomes coated with S-layer proteins from lactobacilli. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2007;1768(3):393-400. doi:10.1016/j.bbmem.2006.09.009.
86. Munavirov B, Gnezdilov O, Rudakova M. Interaction of polyacrylic acid with lipid bilayers: effect of polymer mass. *Magn Reson Chem.* 2013;51(11):750-755. doi:10.1002/mrc.4013.
87. Zeng C, Yu F, Yang Y, et al. Preparation and evaluation of oxaliplatin thermosensitive liposomes with rapid release and high stability. *PLoS One.* 2016;11(7). doi:10.1371/journal.pone.0158517.
88. Huang Z, Li X, Zhang T, Song Y, She Z, Li J. Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian J Pharm Sci.* 2014;9(4):176-182. doi:10.1016/j.ajps.2014.06.001.
89. Alakhova DY, Kabanov A V. Pluronics and MDR reversal: An update. *Mol Pharm.* 2014;11(8):2566-2578. doi:10.1021/mp500298q.

Apêndices

Apèndice I



PHOSPHOLIPIDS

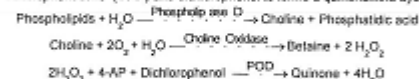
Phospholipids CHO-POD. Enzymatic colorimetric

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 quinoneimine dye:



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

CLINICAL SIGNIFICANCE

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

REAGENTS

R 1	TRIS pH 7.55	50 mM
Buffer	Dichlorophenol	2.1 mM
R 2	Phospholipase D	400 U/L
	Choline oxidase (CHO)	2200 U/L
	Peroxidase (POD)	3500 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 ≥ 0.18.

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 ^{PHOSPHOLIPIDS} (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: SPINREACT 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^{1,3}.

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 2.04 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=9079x + 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 concentration¹.

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

NOTES

- PHOSPHOLIPIDS CAL: Proceed carefully with this product because due to 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

- Noto 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. AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACCC 2001.
- Burtis A, et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACCC 1995.

PACKAGING

Ref:1001140 Cont: 5 x 10 mL

BSS14-I Ed 03/2007



SPINREACT S.A.U. Ctra Santa Coloma, 7 E-17175 SANT ESTEVE DE BAS (ID) SPAIN
Tel. +34 972 69 08 00 Fax +34 972 69 00 99 e-mail: spinreact@spinreact.com

Apêndice II

- Estruturas químicas das moléculas analisadas por ATR-FTIR e por RMN

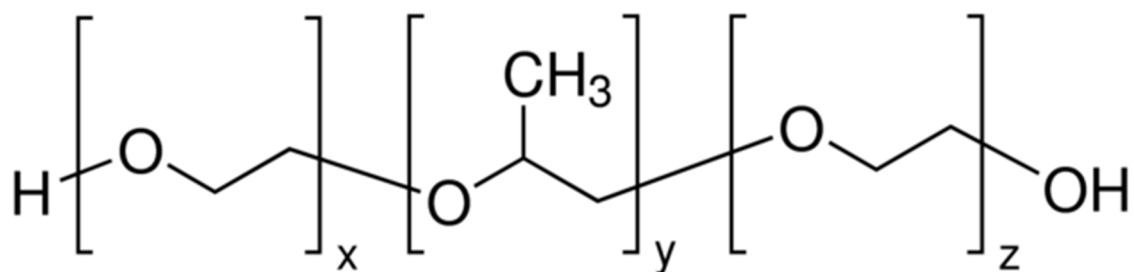


Figura 1 – Estrutura química do Pluronic® F68

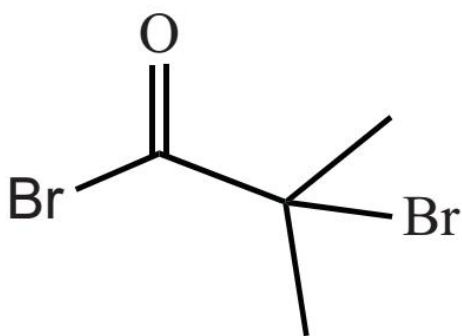


Figura 2 – Estrutura química do Brometo de 2-Bromoisobutiril

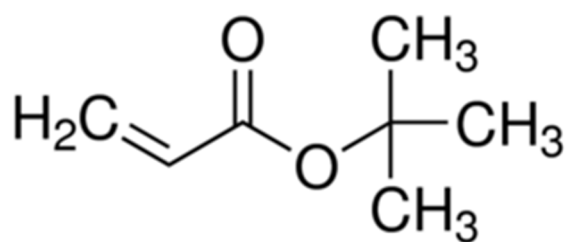


Figura 3 – Estrutura química do acrilato de tert-butilo

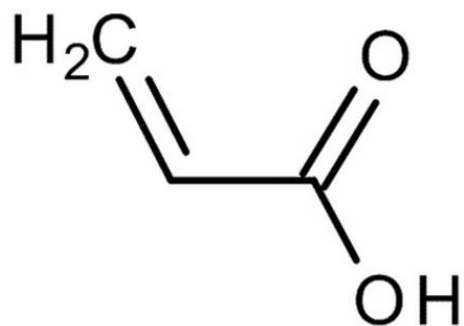


Figura 4 – Estrutura química do ácido acrílico

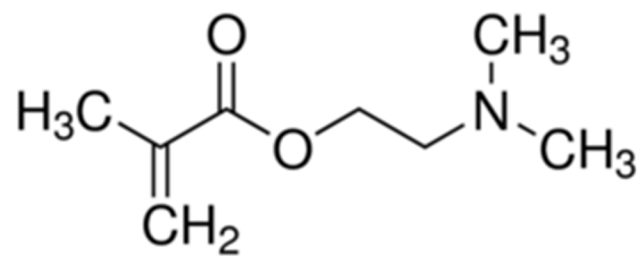


Figura 5 – Estrutura química do 2-dimetilaminoetil metacrilato

Apêndice III

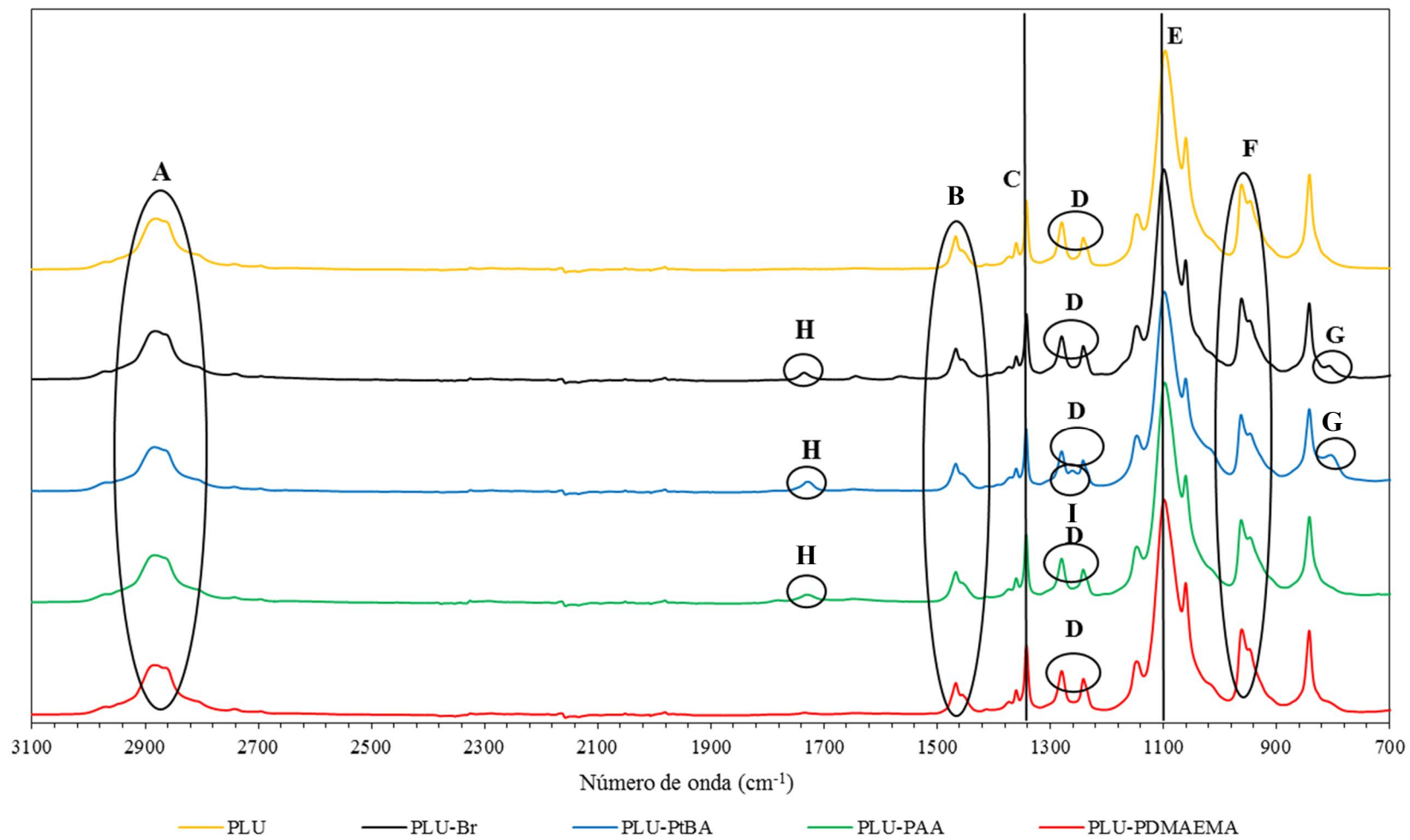


Figura 6 - Espectros de ATR-FTIR do PLU e dos polímeros sintetizados com as bandas assinaladas

- A – Estiramento alifático –CH a 2860 cm^{-1}
- B – Estiramento de flexão –CH₂ a 1460 cm^{-1}
- C – Estiramento de flexão *in-plane* –OH a 1340 cm^{-1}
- D – Ligação –CH₃ a 1280 cm^{-1} e 1240 cm^{-1}
- E – Estiramento –CO a 1100 cm^{-1}
- F – Estiramento C-OH a 960 cm^{-1}
- G – Ligação C-Br a 800 cm^{-1}
- H – Ligação –COOR a 1720 cm^{-1}
- I – Grupo -C(CH₃)₃ a 1260 cm^{-1}