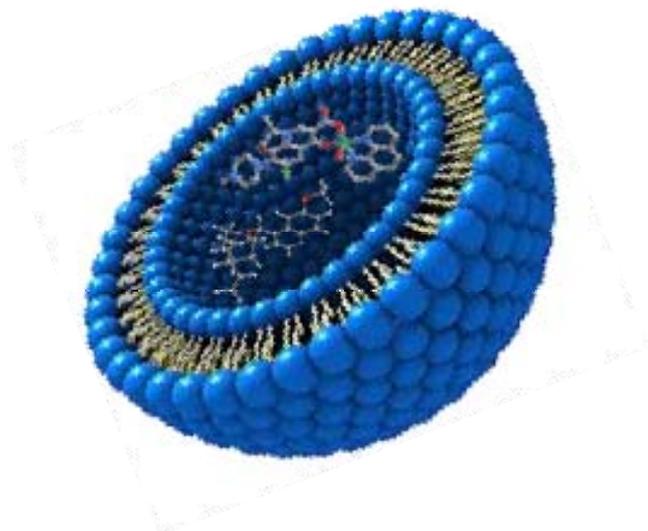


Estudo, caracterização e desenvolvimento de sistemas de libertação controlada para as quinolonas e seus derivados

Isabel Cristina de Sá Correia de Sousa
2013



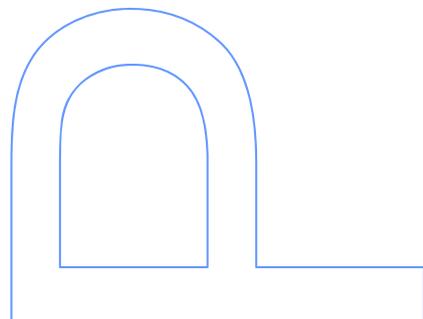
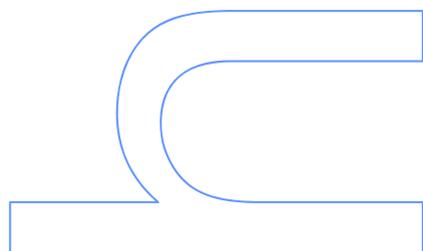
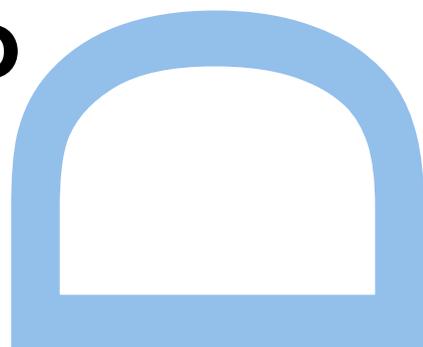
Estudo, caracterização e desenvolvimento de sistemas de libertação controlada para as quinolonas e seus derivados

Isabel Cristina de Sá Correia de Sousa

Programa Doutoral em Química
Departamento de Química e Bioquímica
2013

Orientador

Alberta Paula Lobo Machado Gameiro dos Santos, Professora Auxiliar com Agregação,
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA



Agradecimentos

No final deste percurso gostaria de agradecer a quem, de algum modo, contribuiu para o seu desenvolvimento:

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento e atribuição da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/47486/2008) financiada pelo Programa Operacional Potencial Humano (POPH) - Quadro de Referência Estratégico Nacional (QREN) e co-financiada pelo Fundo Social Europeu (FSE).

À Professora Doutora Paula Gameiro, pela orientação, amizade, boa disposição, disponibilidade, constante incentivo e carinho durante os 9 anos de trabalho que temos em conjunto.

À Professora Doutora Eulália Pereira por toda a amizade, boa disposição e incansável ajuda na síntese e caracterização dos complexos, finalmente “*Habemus crystallis!*”

Ao Doutor Luís Cunha e Silva, pela obtenção e caracterização das estruturas de Raio X dos complexos sintetizados e por toda a sua disponibilidade.

À Doutora Maria José Feio não só pela determinação das MIC's dos complexos sintetizados, uma preciosa contribuição para os artigos de síntese, como por todas as valiosas trocas de ideias.

Ao “gang da marmita” por todos os momentos de amizade, diversão e boa disposição em cafés matinais, pausas para almoço, ou lanches, em especial à Daniela, Diana, Andreia, Columbiana, Kit Kat, Cristina, Carla, Leonor, Pedro, Ana Margarida, Susana, Salete, André, Vítor e Mariana.

À Sílvia um agradecimento especial por toda a boa disposição, carinho peculiar, amizade e ajuda e pelo seu famoso “dancing queen”.

À Tânia, por aquilo que nós sabemos, foste uma amizade inesperada sem dúvida.

Às meninas do ballet, por todos os nossos momentos em ensaios, espetáculos e “road trips” como a de Vimioso, especialmente às minhas pequenas Sofia Valente (Miss V) e Sofia Barbosa (mini Sophie 1), à Sofia Moita, à minha querida Sophie Peartree, Sara Costa Leite e Filipa Osório (Pipas), foram os 4 melhores anos destes 27 que levo de dança nas pernas, sobretudo este último ano. Para sempre “Keep Calm and be a snowflake”.

À Sónia Patrício, colega e amiga desde o primeiro dia de faculdade, por toda a amizade.

Aos meus eternos amigos, Ana Isabel, Ana Luísa, Daisy, Luís, Susana, João, Cláudia, Gabriela, Andreia, Rui e novas aquisições, miúdos ou graúdos, por estes treze anos cheios de momentos de amizade, descontração e diversão.

Aos meus pais por todo o apoio e carinho, ao meu irmão Paulo por ser um “herói” (o meu) e por todos os apertos, que eu contestei, ao longo dos anos e à minha Juju, por ter sempre um sorriso e boa disposição para dar.

E por fim, ao Frederico, por tudo, todo o apoio, paciência, carinho, amor incondicional, não esquecendo todas as nossas discussões científicas valiosas e palavras de incentivo, por não me deixares cair mesmo quando tudo parecia andar para trás e o mundo parecia que ia acabar.

Resumo

Com o aumento da ameaça de resistência bacteriana nos últimos anos, tornou-se extremamente importante o desenvolvimento de novas estratégias para aumentar a eficácia terapêutica dos antibióticos, visto o desenvolvimento de novas classes de fármacos ser um processo moroso, dispendioso e difícil. Assim, os sistemas de transporte/distribuição têm sido alvo de intensa investigação, uma vez que visam aumentar a eficácia no local de ação podendo melhorar a farmacocinética e/ou minimizar os efeitos secundários associados a certos antibióticos.

Desde sua descoberta, na década de 60, os lipossomas têm vindo a ser reconhecidos devido à sua elevada biocompatibilidade (tamanho, composição e propriedades físico-químicas) e versatilidade, tanto como modelos de membranas biológicas, como veículos de transporte e libertação de moléculas hidrofóbicas ou hidrofílicas. Normalmente são considerados como sistemas de *drug delivery* quando os agentes terapêuticos são tóxicos, possuem potência elevada e tempos de circulação sanguínea baixa.

Sendo as fluoroquinolonas fármacos frequentemente prescritos para o tratamento dos mais diversos tipos de infeções bacterianas e, devido a essa prescrição abusiva, alvo de elevada resistência bacteriana, o objetivo geral deste trabalho residiu no desenvolvimento de estratégias de combate à resistência bacteriana, quer através da encapsulação dos fármacos em lipossomas como através da síntese e encapsulação de complexos de cobre derivados de fluoroquinolonas e 1,10-fenantrolina, de modo a constituir uma alternativa à terapêutica convencional.

Numa primeira abordagem à encapsulação de fluoroquinolonas optou-se por um método de encapsulação passiva enquanto numa segunda abordagem, foi selecionado um método de encapsulação ativo. Com base nas propriedades físico-químicas das fluoroquinolonas estabeleceu-se a encapsulação ativa como o método de encapsulação a adotar, uma vez que os fármacos em estudo possuem características anfotéricas.

Sendo possível obter percentagens de encapsulação relativamente elevadas para as fluoroquinolonas em estudo, com exceção da levofloxacina, para um método de encapsulação ativa, a utilização de diferentes composições lipídicas permitiu avaliar a influência das diferentes características estruturais e físico-químicas das fluoroquinolonas no processo de encapsulação. A utilização de sistemas lipossómicos diferentes foi igualmente testada para verificar se a composição lipídica influenciaria a percentagem de encapsulação.

Através de estudos de estabilidade dos diferentes lipossomas, após armazenamento, determinou-se que sistemas lipídicos de composição sintética (SPPC e PMPC) retêm uma maior percentagem do fármaco encapsulado enquanto se verificaram perdas significativas para lipossomas de composição natural (SPM) permitindo, deste modo, a seleção do sistema adequado para estudos posteriores.

A realização de estudos de libertação de SPPC:Col em PBS e SBF (meios que mimetizam condições fisiológicas) a pH= 7,4 e 37 °C, forneceu informações sobre a influência de condições fisiológicas na retenção de fluoroquinolonas. O perfil de libertação obtido permitiu verificar que não ocorre libertação significativa das fluoroquinolonas encapsuladas, em nenhum dos meios, num período de 60 min.

Considerando que complexos de cobre e quinolonas com 1,10-fenantrolina poderão ser derivados alternativos a esta classe de fármacos, a síntese (por otimização de processos experimentais descritos na literatura) e caracterização (UV/Visível, Infravermelho e difração de Raio X) de vários complexos ternários fluoroquinolona foram realizadas. Estudos de encapsulação e libertação foram realizados apenas para o complexo ternário de levofloxacin. Estudos microbiológicos presentes na literatura, para alguns destes complexos, evidenciam a sua potencial ação como antibióticos como estratégia de combate à resistência bacteriana.

Tentativas de encapsulação passiva e ativa do complexo Culvxphen originaram percentagens de encapsulação muito baixas, dadas as características electroestáticas destes complexos em solução aquosa. De modo a ultrapassar este problema, foi iniciado o estudo da formação do complexo ternário no interior dos lipossomas. Este objetivo foi alcançado após se efetuar uma encapsulação passiva de uma mistura da fluoroquinolona e cobre numa proporção de 1:1 e uma encapsulação ativa da 1,10-fenantrolina tendo-se formado o complexo ternário Culvxphen no interior dos lipossomas.

Os estudos de estabilidade realizados, após armazenamento, permitem afirmar que uma elevada percentagem do complexo formado nos lipossomas é libertado, num período de quatro semanas. Esta perda significativa de complexo ternário poderá ser uma consequência da formação de espécies neutras no interior dos lipossomas que permearão facilmente a membrana para o exterior dos lipossomas.

Relativamente aos estudos de libertação em condições fisiológicas (PBS, SBF e FBS), a libertação do material encapsulado parece depender da composição e semelhança do meio externo com fluidos biológicos. Os resultados obtidos evidenciam uma maior libertação do complexo num meio mais simples, PBS, e uma menor libertação para o FBS, que por ser um fluido biológico possui uma composição mais

complexa, permitindo concluir que quanto maior a semelhança fisiológica do meio de libertação utilizado, menor será a libertação.

Palavras-chave: Fluoroquinolonas, resistência bacteriana, encapsulação, lipossomas, *drug delivery*, complexos ternários de cobre, estudos de libertação.

Abstract

With the increasing menace of bacterial resistance in recent years, it has become extremely important to develop new strategies to increase antibiotic efficacy, since the development of new drugs is a lengthy, costly and difficult process. Thus, transport/delivery systems have been the subject of intense investigation, since they aim to increase the efficacy on the site of action, may improve pharmacokinetics and/or minimize side effects associated with antibacterial drugs.

Since their discovery in the 1960's, liposomes have been recognized, due to their biocompatibility (size, composition and physicochemical properties) and versatility, either as models for biological membranes or as carriers for hydrophobic/hydrophilic molecules. Usually they are considered for drug delivery when therapeutic agents are toxic, have high potency and low blood circulation times.

Fluoroquinolones are antibacterial drugs often prescribed for the treatment of several bacterial infections and, due to this "overuse", they have become targets of high bacterial resistance. The aim of this study was based on the development of strategies to fight bacterial resistance, either through encapsulation of fluoroquinolones in liposomes or by synthesis and encapsulation of copper complexes of 1,10-phenanthroline and fluoroquinolones, in order to provide an alternative to conventional therapy.

On a first approach to the encapsulation of fluoroquinolones in liposomes, a passive method of encapsulation was chosen while on a second approach an active encapsulation procedure was selected. Knowledge of the physicochemical properties of fluoroquinolones enabled us to establish an active encapsulation method as the adequate procedure for fluoroquinolone encapsulation since these drugs possess amphoteric characteristics.

Having obtained relatively high encapsulation for the fluoroquinolones under study, for an active encapsulation with the exception of levofloxacin, the different lipid composition allowed us to evaluate the influence of the structural and physicochemical properties of these antibacterial agents in the encapsulation process. These lipid systems were equally tested to verify whether the lipid composition would influence the encapsulation efficiency.

Through stability studies of the different liposomes, after storage, it was possible to determine that synthetic lipid systems (SPPC and PMPC) were able to retain a higher percentage of the encapsulated fluoroquinolone, while a significant loss

occurred for natural lipids (SPM) allowing the selection of a suitable system for further studies.

Release studies in PBS and SBF pH 7,4 and 37°C (release media that mimic physiological conditions), provided information on the influence of physiological conditions on the retention of fluoroquinolones. The obtained release profile allowed us to demonstrate that there is no significant release of the encapsulated drugs, in both PBS and SBF, over a period of 60 min.

Taking into consideration that copper complexes of fluoroquinolones and 1,10-phenanthroline might be an alternative concept to this class of antibacterial agents, as novel derivatives of fluoroquinolones, the synthesis (by optimization of published procedures) and characterization (UV-Vis, Infrared and X-Ray diffraction) of several ternary complexes was performed. Encapsulation and release studies were performed for the ternary complex of levofloxacin. Documented microbiological studies, for some of the synthesized complexes stated their potential antibacterial action as a strategy to counteract resistance.

Attempts to actively and passively encapsulate the Culvxphen complex lead to very low encapsulation given the electrostatic characteristics of these complexes in aqueous solution. In order to surpass this issue, a study of the formation of the ternary complex in the liposome interior was initiated. This goal was reached after passively encapsulating a copper:levofloxacin aqueous mixture, in a 1:1 ratio, and actively encapsulating 1,10-phenanthroline, giving rise to the formation of the Culvxphen ternary complex inside the liposomes.

Stability studies performed after storage revealed that a high percentage of the complex is released over a period of four weeks. This significant loss of ternary complex might be a consequence of formation of neutral species inside the liposomes that will easily permeate the membrane toward the outside of the liposomes.

Regarding the release studies of the ternary complex in physiological conditions (PBS, SBF and FBS) the release of the encapsulated complex seems to depend on the composition and similarity of the external medium with biological fluids. The obtained results show a higher release in a simpler release medium like PBS and a smaller release for FBS which, as a biological fluid has a more complex composition. This allowed us to conclude that a higher similarity between the release medium and a biological fluid will lead to a smaller release.

Key Words: Fluoroquinolones, fluoroquinolone bacterial resistance, encapsulation, drug delivery, liposomes, ternary copper complexes, release studies.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	ix
Índice.....	xi
Índice de tabelas.....	xvii
Índice de figuras.....	xxi
Abreviaturas.....	xxviii
Capítulo 1. Introdução.....	1
1. Sistemas de libertação/transporte controlado.....	3
1.1. Lipossomas.....	4
1.1.1. Propriedades físico-químicas.....	6
1.1.2. Fosfolípidos.....	6
1.1.3. Colesterol.....	9
1.1.4. Preparação dos lipossomas.....	11
1.2. Lipossomas como sistemas de libertação controlada.....	12
2. Quinolonas: Breve introdução e caracterização geral.....	14
2.1. Da origem do ácido nalidíxico aos dias de hoje.....	14
2.1.1. As fluoroquinolonas.....	16
2.2. Propriedades físico-químicas.....	19
2.2.1. Ionização.....	19
2.2.2. Complexação.....	20
2.3. Mecanismo de ação e resistência.....	21
2.3.1. Mecanismo de ação.....	21
2.3.2. Mecanismos de resistência.....	22
2.4. Estratégias de combate à resistência bacteriana.....	23
2.4.1. Complexos ternários de cobre.....	23

2.4.2.	Encapsulação de fármacos na libertação controlada	24
3.	Processos de Encapsulação	26
3.1.	Encapsulação passiva.....	27
3.2.	Encapsulação Ativa.....	28
3.2.1.	Encapsulação através de gradientes de pH.....	28
3.2.1.1.	Criação de gradiente de pH através de gradientes transmembranares de sulfato de amónio	29
3.2.1.2.	Criação de gradiente de pH através de gradientes transmembranares de acetato	31
3.2.2.	Encapsulação através de um gradiente transmembranar de iões de metal de transição.....	32
3.3.	Libertação do fármaco encapsulado.....	35
	Objetivos e Enquadramento.....	37
	Capítulo 2: Metodologia Experimental	41
1.	Reagentes e soluções.....	43
2.	Instrumentação	44
3.	Preparação de lipossomas	45
3.1.	Análise do tamanho dos lipossomas (Espectroscopia de Correlação fotónica)	45
3.2.	Determinação da concentração de lípido (doseamento de lípido)	46
4.	Encapsulação de fluoroquinolonas em diferentes sistemas lipídicos	46
4.1.	Encapsulação por hidratação do filme lipídico.....	46
4.2.	Encapsulação por gradiente transmembranar de sulfato de amónio	46
4.2.1.	Quantificação do gradiente de pH transmembranar.....	46
4.2.2.	Formação do gradiente por mini colunas de spin.....	47
4.2.3.	Encapsulação de fármacos.....	47
4.3.	Determinação da quantidade de fármaco encapsulado.....	48
4.4.	Preparação e otimização de mini colunas de spin.....	48
4.4.1.	Reutilização de Sephadex	49

4.5.	Estabilidade dos sistemas lipídicos preparados	49
4.6.	Estudos de libertação de fluoroquinolonas em condições fisiológicas	49
5.	Síntese de complexos ternários de Cobre (II), fluoroquinolonas e 1,10-fenantrolina.....	50
5.1.	Caracterização por Espectroscopia de Ultravioleta-Visível.....	50
5.2.	Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho	50
5.3.	Caracterização por Difração de Raio X	51
6.	Encapsulação de Complexos ternários de fluoroquinolonas.....	55
6.1.	Hidratação do filme lipídico	55
6.2.	Gradiente de transmembranar de sulfato de amónio.....	55
6.3.	Formação de complexos ternários de cobre, levofloxacin e 1,10-fenantrolina em lipossomas.....	55
6.3.1.	Gradiente transmembranar de acetato/NaCl.....	55
6.3.2.	Gradiente transmembranar de acetato/Hepes	56
6.3.3.	Gradientes de iões de metais de transição	57
6.4.	Determinação da quantidade de cobre encapsulada nos lipossomas	57
6.5.	Estabilidade do sistema lipídico utilizado na formação de complexos ternários em lipossomas.....	58
6.6.	Estudos de libertação de Culvphen em condições fisiológicas	58
Capítulo 3. Resultados e discussão		59
1.	Estudos de encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas	61
1.1.	Encapsulação por hidratação do filme lipídico.....	62
1.2.	Encapsulação por gradiente transmembranar de sulfato de amónio	64
1.2.1.	Quantificação do gradiente transmembranar	64
1.3.	Estudos de encapsulação de fluoroquinolonas por gradiente transmembranar	72
1.3.1.	Em NaCl (150 mmol.dm ⁻³)	72
1.3.2.	Em Sacarose (10%).....	76
1.4.	Estabilidade dos sistemas lipídicos preparados	78

1.5.	Estudos de libertação de fluoroquinolonas em condições fisiológicas	81
1.5.1.	Estudos de libertação em PBS	82
1.5.2.	Estudos de libertação em SBF.....	83
2.	Síntese e caracterização de complexos ternários Cobre (II), fluoroquinolonas e 1,10-fenantrolina.....	87
2.1.	Caracterização por Espectroscopia de Ultravioleta-Visível.....	88
2.2.	Espectroscopia de Infravermelho	92
2.3.	Difração de Raio X	95
2.3.1.	Culvphen	95
2.3.2.	Culmphen	100
3.	Encapsulação de Complexos ternários de fluoroquinolonas.....	107
3.1.	Hidratação do filme lipídico	107
3.2.	Gradiente transmembranar de sulfato de amónio.....	107
3.3.	Formação do complexo ternário Culvphen em lipossomas.....	108
3.3.1.	Utilização de gradiente transmembranar de acetato	109
3.3.1.1.	Utilização de diferentes concentrações de acetato de cobre	109
3.3.1.2.	Otimização da razão molar lípido:ligando.....	110
3.3.1.3.	Encapsulação individual de phen e lvx, com diferentes razões molares lípido:ligando	111
3.3.2.	Utilização de gradiente transmembranar de acetato de cobre/Hepes (10 mmol.dm ⁻³ , NaCl 0.1 mol.dm ⁻³)	112
3.3.2.1.	Encapsulação simultânea de lvx e phen em lipossomas contendo acetato de cobre/Hepes 10 mmol.dm ⁻³	113
3.3.3.	Encapsulação de phen em lipossomas através de gradientes de iões de metais de transição.....	115
3.3.3.1.	Utilização de mini colunas de spin em tampão SHE pH 7,5	116
3.3.3.2.	Influência da razão molar lípido:phen e da pré-incubação dos lipossomas no processo de encapsulação	117
3.3.3.2.1.	Encapsulação de phen em diferentes razões molares lípido:phen.....	118

3.3.3.2.2. Influência da pré-incubação dos lipossomas na encapsulação de phen	119
3.4. Estabilidade do sistema lipídico na formação de complexos ternários em lipossomas.....	125
3.5. Estudos de libertação de Culvphen em condições fisiológicas	126
3.5.1. Utilização de PBS.....	126
3.5.2. Utilização de SBF	127
3.5.3. Utilização de FBS (50%).....	129
Capítulo 4: Considerações Finais	133
Bibliografia.....	137
Anexos	151
Anexo 1	153
Otimização das condições de preparação de mini colunas de spin para a encapsulação de fluoroquinolonas.....	153
Anexo 2	155
Estabilidade dos sistemas lipídicos preparados	155
Anexo 3	157
Estudos de oxidação.....	157

Índice de tabelas

Tabela 1 – Efeito da composição lipídica na estabilidade, <i>in vitro</i> (plasma de rato, 37°C), de SUV's - adaptado de [14].	36
Tabela 2 – Dados cristalográficos, solução e refinamento das estruturas Cunrxphen, Cucpxphen, Culmxphen, Cuofxphen, Culvxphen e Cupfxphen.	53
Tabela 3 – Equações da reta, correspondentes à lei de Beer-Lambert, e correspondentes coeficientes de correlação linear, determinados para as diferentes fluoroquinolonas, em NaOH 200 mmol.dm ⁻³ em metanol (extração de Bligh-Dyer, pH _{final} = 14).	62
Tabela 4 – Valores de ΔpH determinados para SPPC:Col (1:1).	71
Tabela 5 – Percentagens de encapsulação (%) das diferentes fluoroquinolonas, ao fim de 120 min, para incubação em NaCl 150 mmol.dm ⁻³ . Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.	73
Tabela 6 – pKa's das fluoroquinolonas em estudo e a razão entre as espécies ião-dipolar/neutra [90, 111, 112].	75
Tabela 7 – Percentagens (%) de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas, ao fim de 120 min para incubação em Sacarose 10%. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.	76
Tabela 8 – Percentagem de retenção (%) das diferentes fluoroquinolonas, em PBS pH 7,4, de acordo com o meio de encapsulação. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.	83
Tabela 9 – Percentagem de retenção (%) das diferentes fluoroquinolonas, em SBF pH 7,4, de acordo com o meio de encapsulação. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.	85
Tabela 10 – Percentagens de C, H, N e S e rendimento calculados e obtidos para os complexos de metal sintetizados.	87
Tabela 11 – Valores de λ _{máx} observados para os ligandos phen, as diferentes fluoroquinolonas e respetivos complexos ternários.	91
Tabela 12 – Frequências de vibração dos grupos funcionais característicos presentes nos ligandos e complexos de metal sintetizados.	94

Tabela 13 – Comprimentos de ligação (em Å) e ângulos (em graus) nos ambientes de coordenação do Cobre observados na estrutura de $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	97
Tabela 14 – Geometria de ligação de hidrogénio (distâncias em Å e ângulos em graus) para o complexo $[\text{Cu}(\text{LvX})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100
Tabela 15 - Comprimentos de ligação (em Å) e ângulos (em graus) nos ambientes de coordenação do Cobre observados na estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{Imx})(\text{phen})(\text{NO}_3)]$	102
Tabela 16 – Valores de absorvidade molar (ϵ ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{cm}^{-1}$), a $\lambda= 273$ nm e $\lambda= 300$ nm, para o complexo ternário $\text{Cu}(\text{lvx})\text{phen}$ e concentrações determinadas através das absorvâncias obtidas a partir do espectro da figura 50, na encapsulação de phen em lipossomas de SPPC:Col (1:1) contendo Cu:lvx. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.	116
Tabela 17 – Concentrações intralipossómicas de cobre após uma, duas ou três passagens, das alíquotas recolhidas, através de mini colunas de <i>spin</i> de Sephadex equilibradas com tampão SHE, pH 7,5. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.	117
Tabela 18 - Concentrações de $\text{Cu}(\text{lvx})\text{phen}$ encapsulado após rutura dos lipossomas. $\epsilon(273 \text{ nm}) = 35893$ ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{cm}^{-1}$), $\epsilon(300 \text{ nm}) = 46964$ ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{cm}^{-1}$). Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes com pré-incubação a 65°C ~30min.....	119
Tabela 19 - Concentrações de $\text{Cu}(\text{lvx})\text{phen}$, após rutura dos lipossomas, para estudos de encapsulação de phen (razão molar lípido:phen= 1:0,3) com e sem pré-incubação a 65°C (~30 min) para (A) 3x mini coluna de <i>spin</i> SHE pH 7,5) e (B) 3x mini coluna de <i>spin</i> SHE pH 7,5 + 1x mini coluna de <i>spin</i> Hepes pH 7.0. $\epsilon(273 \text{ nm}) = 70355$ ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{cm}^{-1}$) e $\epsilon(294 \text{ nm}) = 75470$ ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{cm}^{-1}$). Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.	121
Tabela 20 - Concentrações de $\text{Cu}(\text{lvx})\text{phen}$, após rutura dos lipossomas, para estudos de encapsulação de phen (razão molar lípido:phen= 1:0,2) sem pré-incubação para (A) 3x mini coluna de <i>spin</i> SHE pH 7,5) e (B) 3x mini coluna de <i>spin</i> SHE pH 7,5 + 1x mini coluna de <i>spin</i> Hepes pH 7.0. $\epsilon(273 \text{ nm}) = 70355$ ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{cm}^{-1}$) e $\epsilon(294 \text{ nm}) = 75470$ ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{cm}^{-1}$). Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.....	123

Tabela 21 - Concentrações de Cobre encapsulado em lipossomas de SPPC:Coolesterol (1) sem pré-incubação a 65° C (~30 min) e em estudos de encapsulação (2-4) de 1,10-fenantrolina (razão molar lípido:phen= 1:0,3)..... 124

Tabela 22 – Diâmetro médio dos lipossomas no dia da sua preparação e após duas semanas..... 156

Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática dos diferentes tipos de vesículas lipossômicas. (adaptado de www.avantilipids.com).....	5
Figura 2 – Representação esquemática de (A) glicerofosfolípido, (B) esfingofosfolípido e (C) grupos que podem esterificar o grupo fosfato (adaptado de [19]).....	7
Figura 3 – Fórmulas estruturais de fosfolípidos (A) naturais e (B) sintéticos.	8
Figura 4 – Representação esquemática da influência da temperatura de transição de fase em bicamadas lipídicas [19].	8
Figura 5 – Estrutura molecular de alguns esteróis.	9
Figura 6 – Posição ocupada pelo colesterol na bicamada lipídica (adaptada de New).	10
Figura 7 – Representação esquemática da preparação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico. 1) Dissolução dos lípidos num solvente orgânico adequado; 2) Formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação do solvente orgânico; 3) Hidratação do filme por adição de solução aquosa; 4) Agitação e obtenção de MLV's; 5) SUV's ou LUV's obtidas por sonicação ou extrusão, respetivamente, adaptado de Avanti Polar Lipids: (www.avantilipids.com) e [14].....	11
Figura 8 – Núcleo base das Quinolonas/naftiridonas vs estrutura do Ácido Nalidíxico.	15
Figura 9 – Quinolonas de primeira geração.	16
Figura 10 – Fluoroquinolonas de segunda geração.	17
Figura 11 – Fluoroquinolonas de terceira geração.	17
Figura 12 – Fluoroquinolonas de quarta geração.....	18
Figura 13 – Relação estrutura atividade das fluoroquinolonas - adaptada de [30].	19
Figura 14 – Diferentes modos de coordenação de metais ao grupo carboxilo das quinolonas - adaptado de [45].....	20
Figura 15 – Representação esquemática da encapsulação de fármacos através da formação de um gradiente transmembranar de sulfato de amónio. Tampão interno sulfato de amónio, pH 5,5, e tampão externo NaCl 150 mmol.dm ⁻³ . DH ⁺ /D=fármaco na sua forma protonada/neutra [8].....	30

- Figura 16 – Representação esquemática do gradiente de pH transmembranar estabelecido por acetato de cálcio como $DH^+/DCOOH$ =fármaco na sua forma aniónica/neutra [8].32
- Figura 17 – Espectro de UV-Vis das frações retiradas da coluna de exclusão. Lomefloxacina ($\sim 4 \text{ mmol.dm}^{-3}$), SPPC:Coolesterol (1:1). 63
- Figura 18 – Espectros de UV-Vis de AA ($1 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$). Os espectros foram obtidos a 65°C para (—) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 mmol.dm^{-3} e (—) NaCl 150 mmol.dm^{-3} , respetivamente, na ausência de lipossomas. Na presença de lipossomas, a solução externa é composta por (—) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$ /NaCl $149,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$, dando origem a um gradiente transmembranar de sulfato de amónio de ~ 500 (espectro obtido após 3 min da adição de lipossomas); $|\text{SPPC:Col}|=267 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ 65
- Figura 19 – Espectros de Fluorescência do alaranjado de acridina ($1 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) após a adição de lipossomas em sulfato de amónio. Os espectros foram obtidos a 65°C na ausência (1) e presença de gradientes transmembranares crescentes (2-8) de (A) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 mmol.dm^{-3} /NaCl 150 mmol.dm^{-3} e (B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 mmol.dm^{-3} /Sacarose 10%. ($|\text{AA}|\sim 1 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$; $|\text{SPPC:Col}|=267 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ para (8) e (2-7) $|\text{SPPC:Col}|=36 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ 66
- Figura 20 – Espectro de fluorescência de AA ($1 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) em lipossomas de SPPC:Col ($267 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) em (A) NaCl (150 mmol.dm^{-3}) e (B) Sacarose (10%) em diferentes dias. (—) dia 0, (—) dia 1, (—) dia 7, (—) dia 8 e (—) 30 dias. 67
- Figura 21 – Gradientes crescentes de pH de AA ($1 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) em (A) NaCl 150 mmol.dm^{-3} , (B) Sacarose 10% e (C) sem gradiente. ($|\text{SPPC:Col}|=36 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$). Gradientes NaCl: (—) 8,3, (—) 83, (—) 167, (—) 250, (—) 333, (—) 417, (—) 500, (—) 583, (—) substituição total do meio externo; Gradientes Sacarose: (—) 4,3, (—) 43, (—) 86, (—) 128, (—) 171, (—) 214, (—) 257, (—) 300, (—) substituição total do meio externo..... 68
- Figura 22 – Extensão da acumulação de AA em função do gradiente transmembranar de sulfato de amónio (A) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/ 150 \text{ mmol.dm}^{-3}$ NaCl e (B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/ 10\%$ Sacarose. $|\text{AA}|= 1 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $|\text{SPPC:Col}|= 36 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e $T=65^\circ\text{C}$. Os resultados apresentados correspondem à média de pelo menos 3 ensaios independentes..... 71
- Figura 23 – Núcleo base das fluoroquinolonas e respetivos substituíntes..... 72

Figura 24 – Percentagem de encapsulação (%) das diferentes fluoroquinolonas (A) Cpx, (B) Nrx, (C) Pfx e (D) Lvx vs tempo (min), em diferentes sistemas lípido:colesterol (■) PMPC, (o) SPM, (△) SPPC. A incubação foi realizada em NaCl 150 mmol.dm⁻³. 73

Figura 25 – Percentagem de encapsulação (%) das diferentes fluoroquinolonas (A) Cpx, (B) Nrx, (C) Lvx, (D) Pfx e (E) Spx vs tempo (min), em diferentes sistemas lípido:colesterol (■) PMPC, (o) SPM, (△) SPPC. A incubação foi feita em Sacarose 10%. 77

Figura 26 – Comparação entre percentagens de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas ao fim de 120 min e 4 semanas de armazenamento a 4° C (% retida) para o sistema lipídico PMPC:Colesterol em (A) NaCl 150 mmol.dm⁻³ e (B) Sacarose 10%. 79

Figura 27 – Comparação entre percentagens de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas ao fim de 120 min e 4 semanas de armazenamento a 4° C (% retida) para o sistema lipídico SPM:Colesterol em (A) NaCl 150 mmol.dm⁻³ e (B) Sacarose 10%. 79

Figura 28 – Comparação entre percentagens de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas ao fim de 120 min e 4 semanas de armazenamento a 4° C (% retida) para o sistema lipídico SPPC:Colesterol em (A) NaCl 150 mmol.dm⁻³ e (B) Sacarose 10%. 80

Figura 29 – Estudos de libertação de (A) Cpx, (B) Nrx, (C) Pfx, (D) Lvx e (E) Spx em PBS pH 7,4, 37°C, ao longo de 60 min, após encapsulação das mesmas em (////) NaCl 150 mmol.dm⁻³ ou (////) Sacarose 10%. 82

Figura 30 – Estudos de libertação de (A) Cpx, (B) Nrx, (C) Pfx, (D) Lvx e (E) Spx em SBF pH 7,4, ao longo de 60 min, após encapsulação das mesmas em (////) NaCl 150 mmol.dm⁻³ ou (////) Sacarose 10%. 84

Figura 31 – Estrutura prevista para os complexos de cobre (II), fluoroquinolona e 1,10-fenantrolina, com base nos resultados obtidos por análise elementar. 88

Figura 32 – Espectros de UV-Vis de (—) 1,10-fenantrolina, (—) fluoroquinolonas (~10⁻⁵ mol.dm⁻³) e (—) respetivos complexos de cobre (Cuflqphen ~10⁻⁵ mol.dm⁻³): (A) Cpx (B) Lmx (C) Lvx (D) Mfx (E) Nrx (F) Ofx (G) Pfx e (H) Spx. Os espectros inseridos em cada gráfico correspondem à banda de transição d-d do cobre do respetivo complexo de metal (~10⁻³ mol.dm⁻³). 89

- Figura 33 – Espectro de UV-Vis do complexo de metal Cucpxphen, em água, na gama de temperaturas 25-65°C..... 92
- Figura 34 – Espectro de infravermelho da fluoroquinolona (—) pefloxacina e do seu complexo de metal (—) Cupfxphen. A seta demonstra a presença da vibração de estiramento (C=O) característica do grupo carboxilo presente na posição 3 das fluoroquinolonas. No espectro do respetivo complexo de metal a banda não se encontra presente..... 93
- Figura 35 – **(a)** Representação esquemática do complexo catiónico $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$, com esquema de identificação de todos os átomos do ambiente de coordenação do Cu(II) e **(b)** o centro de coordenação $\{\text{CuN}_2\text{O}_3\}$ com uma geometria piramidal quadrada ligeiramente distorcida. 96
- Figura 36 – Representação da unidade assimétrica da estrutura cristalina do composto $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio. 97
- Figura 37 – **(a)** Representação das interações $\pi\cdots\pi$ de empilhamento (sombreado verde) envolvendo os anéis de phen de dois complexos vizinhos. **(b)** Representação esquemática do empacotamento cristalino dos complexos catiónicos (ball-and-stick) e moléculas de água de cristalização e aniões NO_3^- (space filling) de $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) 2\text{H}_2\text{O}$ na perspetiva ao longo da direção cristalográfica $[1\ 0\ 0]$ da célula unitária. Os átomos de hidrogénio foram omitidos por questões de simplicidade..... 98
- Figura 38 – **(a)** Representação esquemática das ligações de hidrogénio (tracejado dourado) presentes na estrutura cristalina de $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)] 2\text{H}_2\text{O}$: ligações de hidrogénio envolvendo os iões nitrato e todas as moléculas de água interligando complexos vizinhos e **(b)** Empacotamento de duas camadas de hidrogénio ao longo da direção $[0\ 1\ 0]$ da célula unitária. Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio..... 99
- Figura 39 – Representação esquemática da estrutura cristalina do complexo neutro $[\text{Cu}(\text{lmx})(\text{phen})(\text{NO}_3)]$ com esquema de identificação de todos os átomos do ambiente de coordenação do Cu(II). Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio. Dados sobre os comprimentos de ligação e ângulos do centro de coordenação C1 encontram-se na tabela 15. 101
- Figura 40 – **(a)** Interações $\pi\cdots\pi$ de empilhamento (sombreado amarelo) envolvendo os anéis de phen e os anéis aromáticos dos ligando lmx de dois complexos vizinhos e

(b) representação esquemática do empacotamento cristalino de $[\text{Cu}(\text{lmx})(\text{phen})(\text{NO}_3)] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: complexo ternário (*ball-and-stick*) e moléculas de água de cristalização (*space filling*), vistas da direção $[1\ 0\ 0]$ da célula unitária. Os átomos de hidrogénio foram omitidos por questões de simplicidade. 103

Figura 41 – Representação esquemática das estruturas cristalinas dos complexos ternários catiónicos com fluoroquinolonas de 2ª geração **(a)** $[\text{Cu}(\text{nrx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Cunrxphen), **(b)** $[\text{Cu}(\text{cpx})(\text{phen})](\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cucpxphen), **(c)** $[\text{Cu}(\text{erx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cuerxphen) e **(d)** $[\text{Cu}(\text{ofx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cuofxphen) e esquema de identificação de todos os átomos do ambiente de coordenação do Cu(II). Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio..... 104

Figura 42 – Representação esquemática da estrutura cristalina do complexo ternário catiónico $[\text{Cu}(\text{cpx})(\text{phen})]_n(\text{NO}_3) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cucpxphen) com esquema de identificação de todos os átomos do ambiente de coordenação do Cu(II). Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio..... 105

Figura 43 – Espectros do complexo Culvxphen , sintetizado, após rutura dos lipossomas de SPPC:Col (1:1)..... 108

Figura 44 - Espectro de UV-Vis do material encapsulado em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas em etanol, **(A)** $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{inicial}}=0,327 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{NaCl}]=0,196 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{lvx}]_i=[\text{phen}]_i \sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$; e **(B)** $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}}=7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{NaCl}]=150 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{lvx}]_i=[\text{phen}]_i \sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$; (—) 0 min, (—) 5 min, (—) 10 min, (—) 15 min, (—) 30 min, (—) 60 min, (—) 120 min..... 109

Figura 45 - Espectro de UV-Vis do material encapsulado em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas, $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}}=7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{NaCl}]=150 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{lvx}]_i=[\text{phen}]_i \sim 1,86 \text{ mmol.dm}^{-3}$; (—) 0 min, (—) 5 min, (—) 10 min, (—) 15 min, (—) 30 min, (—) 60 min, (—) 120 min. 110

Figura 46 - Espectro de UV-Vis, após rutura das vesículas, de **(A)** phen e **(B)** lvx em lipossomas de SPPC:Col (1:1). $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}}=7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{NaCl}]=150 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{phen}]_i \sim 1,86 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $[\text{lvx}]_i \sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$. (—) 0 min, (—) 5 min, (—) 10 min, (—) 15 min, (—) 30 min, (—) 60 min, (—) 120 min..... 111

Figura 47 - Espectros de UV-Vis de lvx em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas. **(A)** aos 0 min e **(B)** 20 min $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}}=7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $[\text{lvx}]_i=1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$. (—) pH 6,0, (—) pH 6,5, (—) pH 7,0, (—) pH 7,5, (—) pH 9,0.112

- Figura 48 - Espectros de UV-Vis de phen em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas. **(A)** aos 0 min e **(B)** 20 min $|\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2|_{\text{lipossomas}}=7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $|\text{phen}|_i=1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$. (—) pH 6,0, (—) pH 6,5, (—) pH 7,0, (—) pH 7,5, (—) pH 9,0. 113
- Figura 49 – Espectros de UV-Vis do material encapsulado em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas, aos (—) 0 min, (—) 10 min e (—) 20 min $|\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2|_{\text{lipossomas}}=7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $|\text{lvx}|_i=|\text{phen}|_i=1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e Hepes 10 mmol.dm^{-3} , pH 7,0. 114
- Figura 50 - Espectros de UV-Vis de Culvxphen em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas, aos (—) 0 min, (—) 10 min e (—) 20 min $|\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2:\text{Lvx}|_{\text{lipossomas}} \sim 1,81 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $|\text{phen}|_i \sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e Hepes 10 mmol.dm^{-3} , pH 7,0. 115
- Figura 51 – Espectro de UV-Vis, após rutura das vesículas, de Culvxphen encapsulado em lipossomas de SPPC:Col (1:1), com gradiente transmembranar de iões de metal, aos (—) 0 min, (—) 10 min e (—) 20 min. $|\text{Cu}(\text{NO}_3)_2:\text{Lvx}|_{\text{lipossomas}} \sim 0,346 \text{ mmol.dm}^{-3}$, razão lípido:phen **(A)** 1:0,3 (mol/mol) $|\text{phen}| \sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e **(B)** 1:0,2 (mol/mol) $|\text{phen}| \sim 1,12 \text{ mmol.dm}^{-3}$. Ensaio com pré-incubação a $65^\circ\text{C} \sim 30\text{min}$ 118
- Figura 52 - Espectro de UV-Vis de Culvxphen em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas em oPOE 1%, (—) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5 e (—) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5 + 1x mini coluna de *spin* Hepes pH 7,0. Razão lípido:phen=1:0,3 (mol/mol), $|\text{phen}| \sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$ **(A)** com e **(B)** sem pré-incubação. $|\text{Cu}(\text{NO}_3)_2:\text{Lvx}|_{\text{lipossomas}} \sim 0,346 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $|\text{Cu}(\text{NO}_3)_2:\text{Lvx}|_{\text{lipossomas}} \sim 0,399 \text{ mmol.dm}^{-3}$ (para A e B, respetivamente) e Hepes 10 mmol.dm^{-3} , pH 7,0. 121
- Figura 53 - Espectro de UV-Vis de Culvxphen em lipossomas de SPPC:Col(1:1), após rutura das vesículas em oPOE 1%, (—) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,50 min e (—) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5 + 1x mini coluna de *spin* Hepes pH 7,0. Razão lípido:phen=1:0,2 (mol/mol), $|\text{Phen}| \sim 1,12 \text{ mmol.dm}^{-3}$ sem pré-incubação. $|\text{Cu}(\text{NO}_3)_2:\text{Lvx}|_{\text{lipossomas}} \sim 0,399 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e Hepes 10 mmol.dm^{-3} , pH 7,0. 122
- Figura 54 – **(A)** Espectro de UV-Vis de Culvxphen encapsulado em lipossomas de SPPC:Coolesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1%, (—) 0 min e (—) 4 semanas e **(B)** comparação entre percentagens de encapsulação do complexo ternário formado em lipossomas após adição de phen ($t=0 \text{ min}$) e após 4 semanas de armazenamento a 4°C para o mesmo sistema lipídico. 125

- Figura 55 – **(A)** Espectro de UV-Vis de Culvphen em lipossomas de SPPC:Colesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1% ao longo de um período de 24h (1440 min) em PBS pH 7,4 e **(B)** libertação, em PBS pH 7,4, do complexo ternário formado em lipossomas num período de 24h onde (—) $\lambda=273$ nm e (—) $\lambda=294$ nm. 127
- Figura 56 – **(A)** Espectro de UV-Vis de Culvphen em lipossomas de SPPC:Colesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1% ao longo de um período de 24h (1440 min) em SBF pH 7,4 e **(B)** libertação, em SBF pH 7,4, do complexo ternário formado em lipossomas num período de 24h onde (—) $\lambda=273$ nm e (—) $\lambda=294$ nm. 128
- Figura 57 – **(A)** Espectro de UV-Vis de Culvphen em lipossomas de SPPC:Colesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1% ao longo de um período de 24h (1440 min) em FBS (50%) (—) 0 min, (—) 15 min, (—) 30 min, (—) 45 min, (—) 60 min, (—) 240 min e (—) 360 min, (—) 1140 min e **(B)** comportamento do complexo ternário formado em lipossomas em FBS num período de 24h. 129
- Figura 58 – Espectro de UV-Vis de (—) FBS 50%, (—) Ivx em FBS, (—) phen em FBS, (—) Culvphen em FBS e (—) Culvphen encapsulado em lipossomas de SPPC:Colesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1% aos 15 min de incubação. 130
- Figura 59 – **(A)** Volume de lipossomas recuperados (eluídos) vs o volume ocupado (tamanho) pelo gel de Sephadex G-50 e **(B)** volume de gel e volume eluído vs massa de algodão. Os resultados apresentados representam a média de pelo menos 3 ensaios independentes. 153
- Figura 60 – Distribuição de tamanho de lipossomas de SPM:Col (1:1) (—) no dia da preparação e (—) após duas semanas de armazenamento. 155
- Figura 61 – Distribuição de tamanho de lipossomas de SPPC:Col (1:1) (—) no dia da preparação e (—) após duas semanas de armazenamento. 155
- Figura 62 – Distribuição de tamanho de lipossomas de PMPC:Col (1:1) (—) no dia da preparação e (—) após duas semanas de armazenamento. 156
- Figura 63 – Espectro de UV-Vis de fosfatidilcolinas oxidadas. Alterações na absorvância dos lípidos, na zona de UV, são o primeiro sinal da ocorrência de reações envolvendo radicais, que podem levar à oxidação. A presença de dienos conjugados é indicada pela presença de um pico ~230 nm, enquanto a formação de trienos conjugados (remoção de dois átomos hidrogénios por cada molécula) leva à presença de um pico adicional a ~270-280 nm. (—) lípidos não oxidado, (---) lípidos moderadamente oxidados, (.....) lípidos muito oxidados (adaptado de New, 1990)... 157

Figura 64 – Espectro de UV-Vis de lipossomas de SPM:Col (1:1) após duas semanas de armazenamento..... 158

Abreviaturas

CMC – Concentração Micelar Crítica

Col – Colesterol

Cpx – Ciprofloxacina

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

DPPC – 1,2-Dipalmitoílfosfatidilcolina

DSPC – 1,2-Diesteroílfosfatidilcolina

EAA – Espectroscopia de Absorção Atómica

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

Erx - Enrofloxacina

FBS – Fetal Bovine Serum (Soro fetal bovino)

Flq – Fluoroquinolona

HEPES – Ácido N-(2-hidroxietyl)piperazina-N-etanossulfónico

Lmx – Lomefloxacina

LUV's – Large Unilamellar Vesicles

Lvx – Levofloxacina

Mfx – Moxifloxacina

MPS – Mononuclear Phagocyte System (Sistema Fagocitário Mononuclear)

Nrx – Norfloxacina

Ofx – Ofloxacina

oPOE – n-octilpolioxietileno

PBS – Phosphate Buffer Solution (Solução tampão fosfato)

Pfx – Pefloxacina

Phen – 1,10-fenantrolina

PMPC – 1-Palmitoíl-2-Miristoílfosfatidilcolina

PrIx – Prulifloxacina

RES – Reticuloendothelial system (Sistema Reticuloendotelial)

SBF – Simulated Body Fluid (Fluido corporal simulado)

SPM – Esfingomielina

SPPC – 1-Esteroíl-2-Palmitoílfosfatidilcolina

Capítulo 1. Introdução

Introdução

1. Sistemas de libertação/transporte controlado

O transporte de fármacos, ou sistemas de libertação controlada de fármacos são definidos como “o uso de qualquer meio possível, seja ele químico, físico-químico ou mecânico para regular a velocidade de acesso de um fármaco ao local de ação isto é, diretamente nos tecidos envolvidos” [1].

Os sistemas de libertação controlada de fármacos têm vindo a ser, nos últimos anos, alvos de uma intensa pesquisa uma vez que visam minimizar grande parte dos efeitos adversos dos mesmos e alcançar uma ação direta dos fármacos no seu local de ação [2, 3]. O transporte de fármacos, que tem em consideração o transportador, o percurso e o alvo, revelou-se uma estratégia de processos ou dispositivos desenvolvidos para aumentar a eficácia dos agentes terapêuticos através da libertação controlada. Deste modo é possível obter um aumento da biodisponibilidade, um índice terapêutico acentuado ou uma melhor aceitação por parte do paciente. Estas novas estratégias são implementadas através de abordagens interdisciplinares que combinam ciência de polímeros, ciências farmacêuticas, química, bioquímica e biologia molecular [1].

Nas últimas décadas, avanços significativos têm sido alcançados na área da libertação controlada, sobretudo nos últimos anos, devido a um declínio significativo no desenvolvimento de novos fármacos e recente competição entre as grandes indústrias farmacêuticas e o mercado dos fármacos genéricos. Deste modo, os fármacos já existentes, são apresentados com novas formulações e utilizando novas formas de transporte [1]. Os sistemas de libertação controlada transformaram-se, assim, em ferramentas importantes para a libertação específica de uma vasta gama de fármacos e têm vindo a evoluir de modo a produzir sistemas avançados, de elevada sofisticação e espectro alargado [4, 5].

A necessidade de criar um “veículo” de transporte para reduzir os efeitos tóxicos dos fármacos surgiu devido ao facto da concentração para uso terapêutico ser, em muitos casos, muito próxima da concentração tóxica [6]. Controlando de forma precisa a localização do fármaco no corpo, os efeitos secundários podem ser reduzidos, levando à administração de doses menores e permitindo o desenvolvimento de novas terapias [7]. Desta forma, estes sistemas permitem melhorar as propriedades farmacológicas de grande parte dos fármacos, o que resulta em tempos de circulação sanguínea maiores e numa maior eficácia [8]. A libertação controlada de fármacos

permite uma manutenção contínua dos níveis de fármaco, na gama de concentração desejada, uma redução dos seus efeitos secundários e uma potencial diminuição da quantidade de fármaco necessária. A possibilidade de diminuição do número de doses administradas assim como a utilização de dosagens menos invasivas traduz ainda uma maior facilidade de administração, para fármacos com tempos de vida *in vivo* pequenos [3, 7, 9, 10].

Atualmente, existem vários sistemas de libertação controlada (nanopartículas, nanotubos, micelas poliméricas, polímeros e lipossomas) [3]. De todos os sistemas mencionados, os que se encontram melhor caracterizados e os primeiros a serem desenvolvidos são os lipossomas [3, 8, 11, 12]. Grande parte dos sistemas aprovados para administração parental (intravenosa) (Doxurubicina – DOXIL e Myocet, Daunorubicina - DaunoXome, Anfotericina B – AmbiSome, Amphotect e ABELCET) são sistemas lipossómicos, formulações lipídicas ou lipossomas conjugados com moléculas de Polietilenoglicol (PEG). Devido à sua composição, tamanho e propriedades físico-químicas, os lipossomas permitem um variado leque de aplicações em diversas áreas científicas como por exemplo na Biofísica, Biologia, Química, Medicina ou Indústria [6, 13].

1.1. Lipossomas

Os lipossomas são definidos como estruturas esféricas (vesículas) compostas por uma bicamada lipídica que encerra no seu interior um determinado volume de solução aquosa [14]. Podem ser constituídos por uma ou várias membranas concêntricas e o tamanho das vesículas lipossómicas encontra-se compreendido entre 20 nm e dezenas de micrómetros, dependendo as suas dimensões do método utilizado para a sua preparação. Os lipossomas podem ser preparados de forma personalizada, de acordo com a sua aplicação, variando o conteúdo lipídico, tamanho, carga superficial e modo de preparação. Uma vez que as diferentes aplicações dos lipossomas requerem diferentes dimensões, a sua classificação é feita de acordo com o tamanho que apresentam [14, 15].

A simples dispersão de lípidos (geralmente fosfolípidos) em água origina uma suspensão, polidispersa, de vesículas multilamelares (MLV'S – **M**ulti**L**amellar **V**esicles). As MLV's possuem um tamanho estrutural relativamente elevado e um volume interno bastante pequeno devido à subdivisão da estrutura em várias bicamadas concêntricas [16]. Embora as MLV's sejam as vesículas mais fáceis de preparar, é possível obter vesículas de dimensões controláveis através de métodos

alternativos de preparação de lipossomas: vesículas unilamelares pequenas (SUV's – **S**mall **U**nilamellar **V**esicles) de diâmetro entre 20 e 50 nm e vesículas unilamelares grandes (LUV's – **L**arge **U**nilamellar **V**esicles) com diâmetros superiores a 50 nm (figura 1).

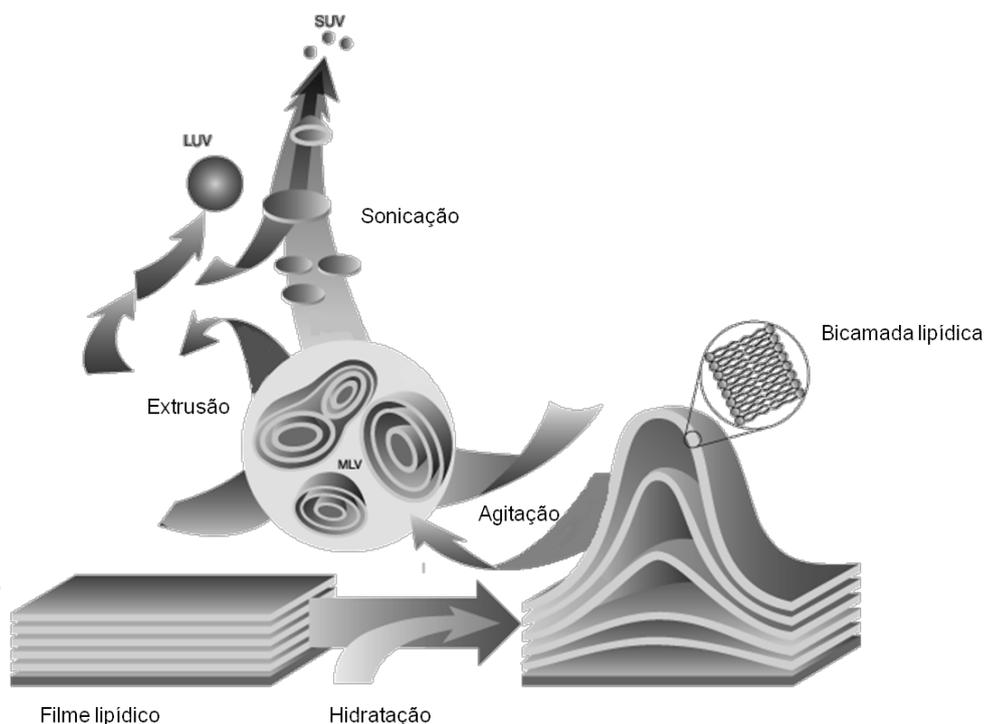


Figura 1 – Representação esquemática dos diferentes tipos de vesículas lipossômicas. (adaptado de www.avantilipids.com).

A natureza dos lípidos que constituem os lipossomas é predominantemente anfifílica, isto é, moléculas que possuem, simultaneamente, um grupo hidrofílico (solúvel em água) e um grupo hidrofóbico (insolúvel em água). Tipicamente, um lipossoma é constituído por fosfolípidos possuindo duas cadeias hidrocarbonadas ligadas a um grupo hidrofílico (geralmente designado por cabeça polar). Quando expostos a um ambiente aquoso as interações entre os dois grupos (interações hidrofílicas entre os grupos polares, interações de van der Waals entre as cadeias hidrocarbonadas e ligações de hidrogénio com moléculas de água) levam à reorganização espontânea em bicamadas onde os grupos polares se encontram à superfície, expostos à fase aquosa e as cadeias hidrocarbonadas se encontram no interior da bicamada [14, 17, 18].

1.1.1. Propriedades físico-químicas

Os lípidos presentes nas membranas celulares dividem-se em quatro grupos principais: fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos e esteróis. Os fosfolípidos são os principais constituintes das membranas celulares eucariotas, sendo os mais comuns as fosfatidilcolinas. Uma vez que as fosfatidilcolinas são os fosfolípidos mais abundantes na natureza e constituem uma grande parte das membranas celulares, geralmente são utilizados como componente lipídica principal em lipossomas contudo, possuem uma elevada heterogeneidade relativamente ao comprimento, composição e saturação das suas cadeias hidrocarbonadas. Os fosfolípidos que contêm colina encontram-se sob a forma de ião dipolar, a pH fisiológico.

1.1.2. Fosfolípidos

Os glicerofosfolípidos derivam de moléculas de glicerol enquanto os esfingolípidos possuem, no seu “esqueleto”, uma molécula de esfingosina. Os ácidos gordos esterificados podem ser saturados ou insaturados e geralmente possuem cadeias hidrocarbonadas entre 8 e 24 átomos de carbono. No caso dos esfingolípidos, a molécula de esfingosina encontra-se ligada a um ácido gordo através de uma ligação amida e o seu grupo hidroxilo esterificado a uma colina ou etanolamina. A fosfatidilcolina (lecitina) e a fosfatidiletanolamina são os únicos fosfolípidos que se apresentam sob a forma de ião dipolar, apresentando-se os restantes sob a forma de anião. Na ausência de um grupo que esterifique o grupo hidroxilo os esfingolípidos denominam-se ceramidas (figura 2) [14].

Os glicerofosfolípidos, vulgo fosfolípidos, são lípidos que, na sua forma mais simples, são compostos por uma molécula de glicerol esterificada com moléculas de ácido gordo e um grupo fosfato que, por sua vez, se encontra esterificado a um álcool. Assim, é possível verificar a presença de um carácter anfifílico nestas moléculas uma vez que existe um grupo hidrófobo apolar, do qual fazem parte as cadeias hidrocarbonadas dos ácidos gordos e um grupo hidrófilo polar constituído pela molécula de ácido fosfórico e uma molécula hidrossolúvel esterificadas entre si. As suas propriedades físico-químicas vão depender não só das propriedades dos ácidos gordos mas também das características dos grupos hidrossolúveis esterificados. Assim, as moléculas de fosfolípidos poderão ter um carácter neutro ou negativo, de acordo com a carga presente nos grupos esterificados ao ácido fosfórico [15].

No que diz respeito aos esfingolípidos, estes são lípidos constituídos por uma molécula de esfingosina ligada a um ácido gordo através de uma ligação amida. A

esfingomielina é, no que diz respeito ao grupo polar, equivalente à lecitina. É geralmente encontrada em células dos glóbulos vermelhos, na matéria branca do cérebro onde possui cadeias hidrocarbonadas invulgarmente longas (~70% C₂₂-C₂₆) e na matéria cinzenta onde a cadeia hidrocarbonada é, geralmente, constituída por 18 átomos de carbono.

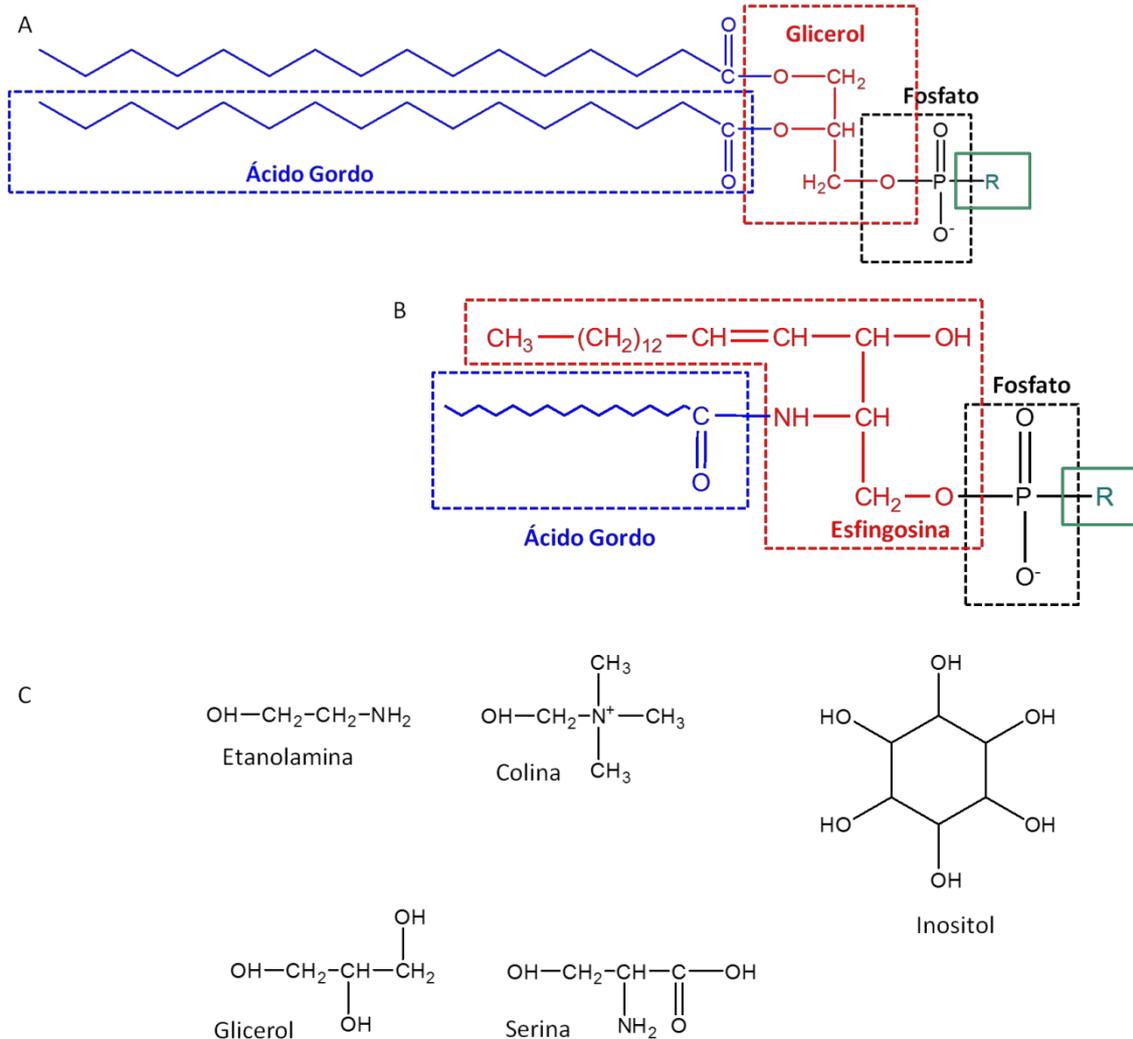


Figura 2 – Representação esquemática de (A) glicerofosfolípido, (B) esfingofosfolípido e (C) grupos que podem esterificar o grupo fosfato (adaptado de [19]).

Quanto à origem, os fosfolípidos podem ser de origem natural ou sintética (figura 3). Os de origem natural são extraídos de material biológico, por exemplo, da gema de ovo ou dos feijões de soja, como a fosfatidilcolina (lecitina). Os lípidos de origem sintética apresentam uma composição lipídica definida, embora as cadeias hidrocarbonadas possam ter maior ou menor número de átomos de carbono (geralmente de 14 a 18), ácidos gordos diferentes ou iguais e cadeias saturadas ou insaturadas. O facto de possuírem uma maior homogeneidade permite uma melhor

compreensão, caracterização e manipulação do seu comportamento relativamente aos fosfolípidos de origem natural [14, 15].

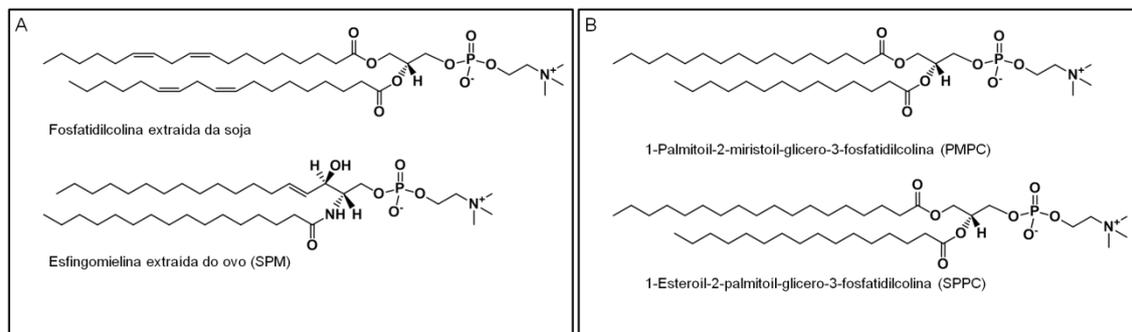


Figura 3 – Fórmulas estruturais de fosfolípidos (A) naturais e (B) sintéticos.

Propriedades físicas como a permeabilidade, temperatura de transição de fase (T_m) ou estabilidade dependem da composição dos ácidos gordos que constituem os fosfolípidos, tanto ao nível do comprimento das cadeias hidrocarbonadas, do seu grau de saturação/insaturação como das propriedades dos grupos polares que os constituem [14-16].

A fluidez das membranas depende da natureza das cadeias hidrocarbonadas que constituem maior parte dos lípidos membranares. A diferentes temperaturas, as bicamadas fosfolipídicas podem existir em fases termodinâmicas distintas. A transição ocorre entre uma fase rigorosamente ordenada, chamada de fase de gel (“fase sólida”) e uma fase menos ordenada, mais fluida, denominada de fase de cristal-líquido (“fase fluida”) (figura 4). A temperatura de transição de fase (T_m) difere entre os fosfolípidos pois depende da composição das cadeias hidrocarbonadas que cada um possui. O aumento do comprimento e saturação dos ácidos gordos aumenta o valor de T_m , temperatura à qual se verifica a passagem da fase gel à fase de cristal líquido. A introdução de moléculas não fosfolipídicas também provoca alterações no comportamento termodinâmico das bicamadas lipídicas [15].

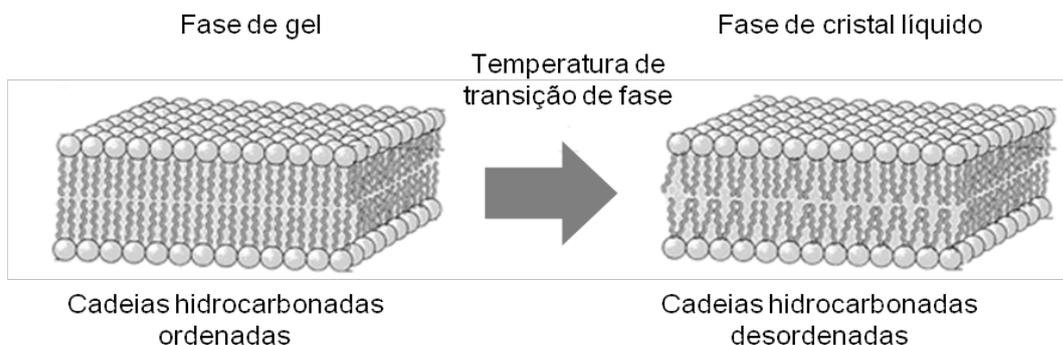


Figura 4 – Representação esquemática da influência da temperatura de transição de fase em bicamadas lipídicas [19].

Para temperaturas inferiores à T_m dos fosfolípidos, a bicamada apresenta uma estrutura ordenada, onde os fosfolípidos se encontram empacotados e com movimentos restritos. No entanto, acima de T_m existe um aumento, considerável da fluidez da membrana (maior mobilidade) e da área ocupada por cada molécula de fosfolípido levando a uma diminuição da espessura da bicamada [14, 15].

Uma compreensão da temperatura de transição de fase e fluidez das bicamadas fosfolípídicas é fundamental tanto na formulação como na exploração das aplicações dos lipossomas, uma vez que o comportamento termodinâmico de uma membrana lipossômica determina propriedades como a permeabilidade, fusão, agregação e ligação a proteínas, podendo afetar a estabilidade dos lipossomas e o seu comportamento em sistemas biológicos.

1.1.3. Colesterol

Os esteróis são componentes importantes de maior parte das membranas naturais e, a sua incorporação em lipossomas, pode introduzir alterações nas propriedades das mesmas. São moléculas constituídas por três anéis hexagonais e um anel pentagonal que formam uma estrutura planar rígida onde vários grupos se podem ligar. O principal esterol presente em tecidos animais é o colesterol embora também se encontre em tecidos vegetais (stigmaesterol) e em membranas bacterianas e fúngicas (lanosterol e ergosterol, respetivamente) (figura 5).

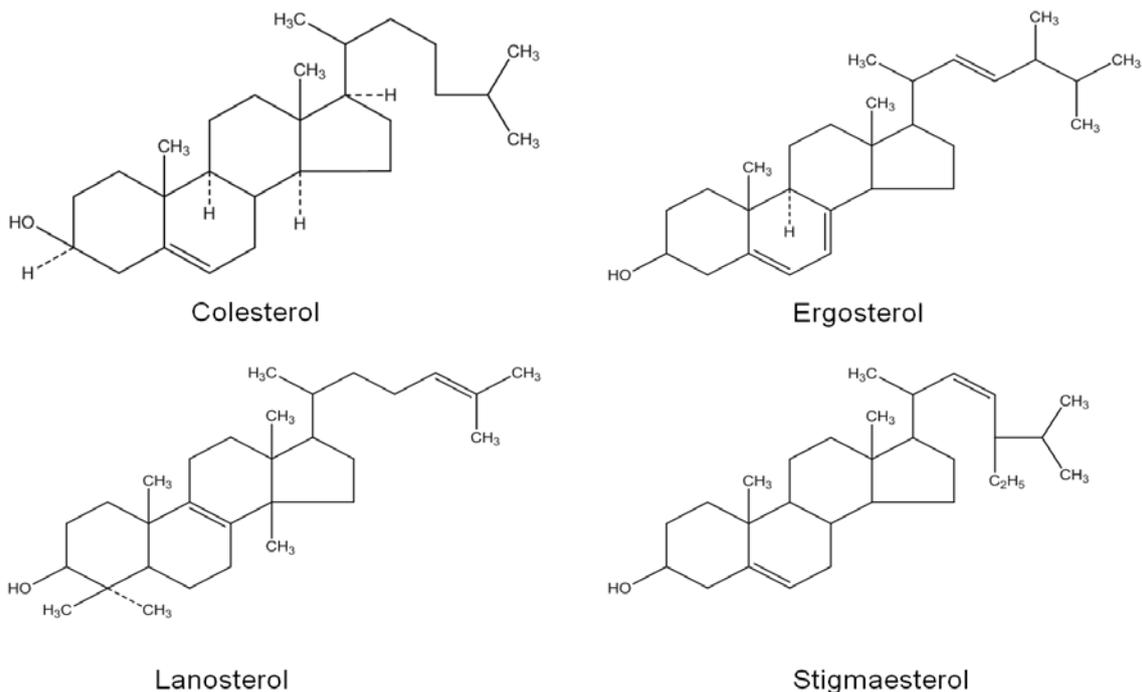


Figura 5 – Estrutura molecular de alguns esteróis.

O colesterol, em si, não é capaz de formar bicamadas mas pode ser introduzido em membranas fosfolipídicas em diversas razões molares. Sendo uma molécula anfipática, a sua inserção (figura 6) ocorrerá de modo a que o seu grupo hidroxilo se encontre orientado para a superfície aquosa e a sua cadeia alifática alinhada paralelamente às cadeias hidrocarbonadas do fosfolípido, no centro da bicamada [15].

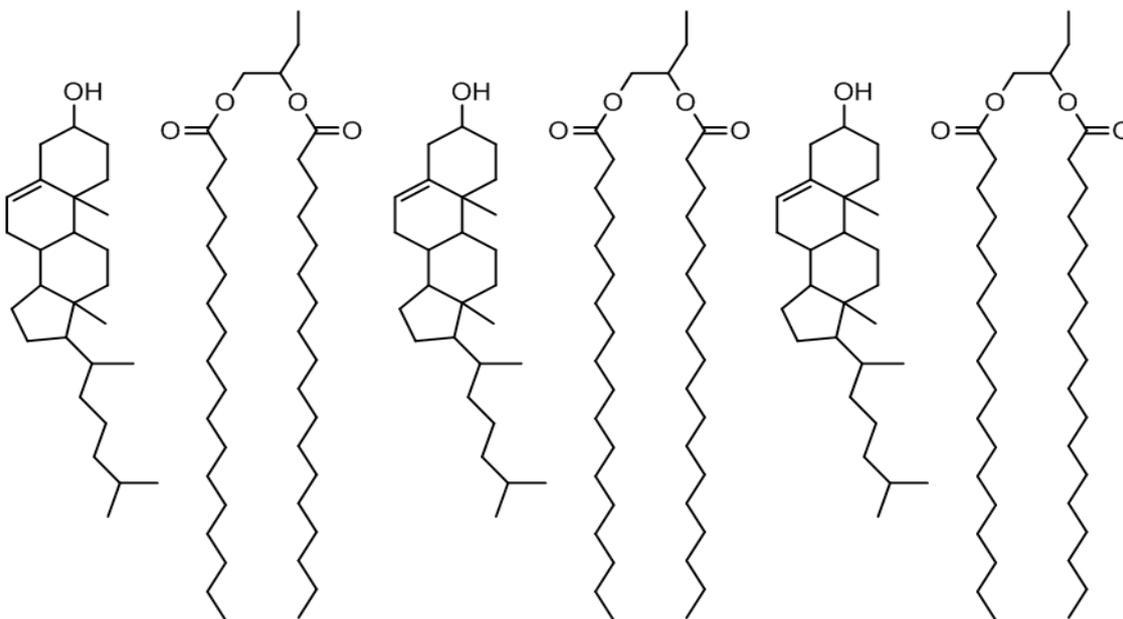


Figura 6 – Posição ocupada pelo colesterol na bicamada lipídica (adaptada de New).

Uma percentagem de colesterol (~30 mol %) é frequentemente inserida na formulação lipídica para aumentar a sua estabilidade, diminuir a mobilidade das suas moléculas e reduzir a sua permeabilidade. Na fase de cristal-líquido a interação do colesterol com as cadeias hidrocarbonadas fluidas aumenta a ordem e empacotamento molecular dentro da membrana enquanto na fase de gel, as cadeias hidrocarbonadas interagem entre si logo, a presença do colesterol levará a uma diminuição da ordem da bicamada (efeito fluidizante). Para concentrações superiores (>30% mol), a temperatura de transição é praticamente eliminada e a membrana pode manter-se numa fase fluida ordenada numa vasta gama de temperaturas reduzindo, assim, a permeabilidade das bicamadas fosfolipídicas que se apresentam fluidas à temperatura ambiente [14]. Para percentagens de colesterol de 50% mol a membrana encontra-se saturada e concentrações superiores levarão a uma instabilidade da membrana [14].

1.1.4. Preparação dos lipossomas

São diversos os processos de preparação de lipossomas de diferente tamanho e lamelaridade descritos na literatura. Todos os métodos de preparação de lipossomas envolvem alguns passos básicos, sendo essencial, para a obtenção de MLV's, LUV's ou SUV's a dispersão do fosfolípido num meio aquoso. Não sendo os fosfolípidos moléculas solúveis em água, um procedimento fundamental à preparação de lipossomas passa pela solubilização dos fosfolípidos num solvente orgânico adequado (solvente apolar) após a qual se prepara um filme lipídico por evaporação desse solvente [14, 15]. Dos vários métodos de preparação de lipossomas os mais frequentemente utilizados são: dispersão física (sonicação, extrusão), dispersão bifásica (evaporação de fase reversa) ou solubilização em detergente, no entanto, a escolha do método a utilizar depende da aplicação final dos lipossomas [15].

Das várias abordagens à preparação de lipossomas, a primeira e mais frequentemente utilizada, a hidratação do filme lipídico (figura 7), surgiu em 1965 por Bangham [20]. A simples dispersão do filme lipídico em solução aquosa produz MLV's, de diferentes tamanhos e número de camadas lipídicas, que podem ser tratadas mecanicamente de forma a obter populações mais homogêneas e de tamanho definido [14, 15].



Figura 7 – Representação esquemática da preparação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico. 1) Dissolução dos lípidos num solvente orgânico adequado; 2) Formação do filme lipídico nas paredes do balão, por evaporação do solvente orgânico; 3) Hidratação do filme por adição de solução aquosa; 4) Agitação e obtenção de MLV's; 5) SUV's ou LUV's obtidas por sonicação ou extrusão, respetivamente, adaptado de Avanti Polar Lipids: (www.avantilipids.com) e [14].

Os métodos mais utilizados para a obtenção de populações homogêneas e de tamanho definido são os meios mecânicos, mais concretamente, a extrusão através de filtros de tamanho de poro fixo ou a sonicação [14, 15]. Inicialmente, os tratamentos mecânicos aplicados incluíam, apenas, a sonicação das suspensões fosfolipídicas. Atualmente, a sonicação é frequentemente utilizada para a obtenção de vesículas de

pequenas dimensões (SUV's) e baseia-se na inserção da suspensão lipossómica num banho (indiretamente) ou por inserção de uma sonda (ponta) de ultrassons diretamente na suspensão [14]. Embora a utilização do banho possua a vantagem de não haver contato direto com os lipossomas, a densidade de energia destes é geralmente muito baixa para produzir vesículas unilamelares homogéneas, sendo a utilização da sonda o método de produção de SUV's mais frequente [14].

O processo de extrusão consiste na passagem forçada, através de filtros com um diâmetro de poro definido, sob pressão (< 100 atm), atmosfera inerte e a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase dos lípidos presentes na suspensão lipossómica. Extrusões sucessivas levam a uma diminuição do número de bicamadas que compõem as MLV's e, ao fim de aproximadamente dez passagens, obtém-se uma suspensão lipossómica predominantemente unilamelar e homogénea, no que diz respeito ao diâmetro das vesículas [14]. Ciclos de congelação/descongelação são igualmente utilizados na obtenção de populações homogéneas de lipossomas pois permitem aumentar o volume interno aquoso dos lipossomas por eliminação das sucessivas camadas presentes nas MLV's [14, 15]. As LUV's, de tamanho compreendido entre 50-150 nm, permitem uma boa encapsulação e uma boa estabilidade dos lipossomas.

1.2. Lipossomas como sistemas de libertação controlada

Os lipossomas são estruturas de interesse às mais diversas disciplinas científicas como a física (estudo da interação entre propriedades anfifílicas), biofísica (estudo de propriedades de membranas celulares e proteínas membranares), bioquímica (função de proteínas membranares), biologia (função celular), química (catálise, fotossíntese) e farmacologia (potenciais transportadores de fármacos) entre outras [1, 6, 21].

Inicialmente eram apenas utilizados como modelos de membranas biológicas todavia, o interesse nos lipossomas como sistemas de transporte e libertação de fármacos (*drug delivery*) tem vindo a aumentar nos últimos anos [22-24]. Uma das grandes vantagens da utilização de lipossomas como sistemas de libertação controlada provém da natureza biocompatível dos lípidos utilizados na sua formação e a fácil preparação em diferentes tamanhos e composição [2, 22, 25]. Além de grande parte dos lípidos utilizados frequentemente na preparação de lipossomas serem comuns em membranas celulares, estes podem conter, ainda, na sua composição componentes membranares como o colesterol [15, 23, 26].

Desde a sua descoberta, os lipossomas têm vindo a ser reconhecidos como modelos para estudo de membranas biológicas e como sistemas de libertação controlada tanto de moléculas hidrofóbicas como de moléculas hidrofílicas [1, 12, 21]. Atualmente são inúmeras as aplicações de lipossomas. Porém, a escolha do sistema a utilizar depende do objetivo final da sua aplicação. No caso de lipossomas para a libertação controlada de fármacos é fundamental a encapsulação de um fármaco dentro do compartimento aquoso da vesícula dependendo, deste modo, das características físico-químicas não só dos lipossomas como do fármaco a encapsular [1, 5, 27]. Na seleção de lipossomas para estes sistemas, alguns dos principais fatores a ter em consideração são o tamanho, carga, fluidez membranar e biodegradabilidade. O tamanho e carga afetam a distribuição, incorporação e destino *in vivo* dos lipossomas [11, 25, 28].

Embora o uso de lipossomas tenha a potencial vantagem de providenciar um transporte de maiores concentrações de fármaco, para que este transporte seja realizado de forma eficiente é necessário ultrapassar barreiras como o tempo de vida de armazenamento (*shelf-life*), a dificuldade de alcançar tecidos específicos e a sua rápida eliminação através dos fagócitos do sistema reticuloendotelial – RES (ou sistema fagocitário mononuclear) [9, 12, 29]. Após administração intravenosa (parental), a fração principal de quase todos os tipos de lipossomas é rapidamente removida do sangue e absorvida pelas células mononucleares do sistema fagocitário (MPS), particularmente pelos macrófagos presentes no fígado e baço. Esta tendência natural dos lipossomas se acumularem nas células do MPS não é necessariamente uma desvantagem, pois pode ser utilizada na prevenção e tratamento de doenças infecciosas, como por exemplo, na utilização de lipossomas como sistemas de libertação de antibióticos em infeções que se localizem, principalmente, nas células do MPS. No entanto, ao considerar os lipossomas como sistemas de libertação controlada de antibióticos para infeções em tecidos que não façam parte do MPS, é necessário reduzir a captação inicial por parte do MPS, de modo a permitir, que os lipossomas circulem no sangue tempo suficiente para alcançarem os tecidos infetados. Para que tal seja possível, é fundamental a manipulação das características físico-químicas dos lipossomas, tal como ligação de um polímero biodegradável na sua superfície, por exemplo polietilenoglicol – PEG, dando origem aos lipossomas de longa circulação (*Sterically Stabilized Liposomes* ou *Stealth*) [7, 21].

O destino (local de ação), *in vivo*, dos lipossomas, assim como do agente encapsulado, depende fundamentalmente de propriedades como a carga, rigidez, tamanho e propriedades superficiais, podendo variar consoante o método de

preparação e o tipo de lípido utilizado, conferindo aos lipossomas a, já referida, elevada versatilidade.

2. Quinolonas: Breve introdução e caracterização geral

As **quinolonas** encontram-se, atualmente, incluídas nas mais importantes classes de agentes antimicrobianos e fazem parte de uma família de fármacos genericamente designada por antibióticos. São agentes antibacterianos sintéticos utilizados, extensivamente em medicina e medicina veterinária, no tratamento de infeções de origem bacteriana tendo as suas indicações terapêuticas evoluído da aplicação no tratamento infeções urinárias simples a aplicações em infeções em quase todo o corpo [19, 30].

O desenvolvimento deste grupo de fármacos deu-se de forma a ultrapassar grande parte dos seus efeitos adversos possuindo, atualmente, um espectro de ação bastante mais abrangente, uma boa disponibilidade oral, uma melhor difusão para os tecidos, um maior tempo de semi-vida e uma toxicidade consideravelmente mais reduzida tornando-se, assim, em fármacos de primeira escolha no tratamento dos mais diversos tipos de infeções bacterianas. No entanto, alguns dos efeitos tóxicos ainda limitam o seu enorme potencial e espectro de ação [31].

2.1. Da origem do ácido nalidíxico aos dias de hoje

A origem das quinolonas remonta a 1962 quando, na síntese do antimalárico cloroquina, se isolou um produto secundário que revelou possuir atividade antimicrobiana. Após investigação das propriedades deste composto e compostos semelhantes surgiu, no início da década de 60, como um “feliz acaso” a primeira quinolona: o Ácido Nalidíxico (figura 8), patenteado em 1962 [32-34].

O Ácido Nalidíxico (1-etil-7-metil-1,8-naftiridina-4-oxo-3-carboxílico) é um derivado das 1,8-naftiridinas que foi limitado, inicialmente, ao tratamento de infeções urinárias devido ao seu espectro de ação reduzido, uma vez que a sua ação antibacteriana contra organismos Gram (-) (limitada a *Enterobacteriaceae*) era moderadamente baixa, possuía uma pobre difusão a nível dos tecidos e problemas de toxicidade a nível cardíaco e do sistema nervoso central [35]. Deste modo, o uso do ácido nalidíxico rapidamente entrou em declínio, devido ao crescente número de bactérias resistentes à sua atividade, surgindo a necessidade de novos compostos para combater estas dificuldades. Porém, várias das características estruturais do ácido nalidíxico ainda estão presentes nos novos compostos e baseiam-se num núcleo

4-oxo-1,8-naftiridina-3-carboxilo [32]. Devido à complexa nomenclatura dos compostos subsequentes, estes são geralmente designados por 4-quinolonas, como referência ao oxigénio exocíclico na posição 4. Existem dois tipos de estruturas anelares: um núcleo naftiridona (com átomos de azoto nas posições 1 e 8, como no ácido nalidíxico) e um núcleo com apenas um átomo de azoto, na posição 1, denominado de núcleo quinolona. Tanto as naftiridonas como as quinolonas, possuem um oxigénio exocíclico na posição 4 do anel e um grupo carboxilo na posição 3 para os quais foi detetada atividade antibacteriana [32].

Alterações à sua estrutura base, como a inserção de átomos de azoto nas posições 1 e 8, de aminas cíclicas na posição 7, ou de grupos alquilo como substituintes em N-1, originaram outras quinolonas de 1ª geração como o ácido oxalínico, a cinoxacina ou o ácido pipemídico. No entanto estas novas quinolonas, embora possuíssem uma atividade antibacteriana ligeiramente superior para organismos Gram (-), esta não era suficientemente significativa comparativamente ao ácido nalidíxico, além de não possuírem atividade contra organismos Gram (+) [32-34].

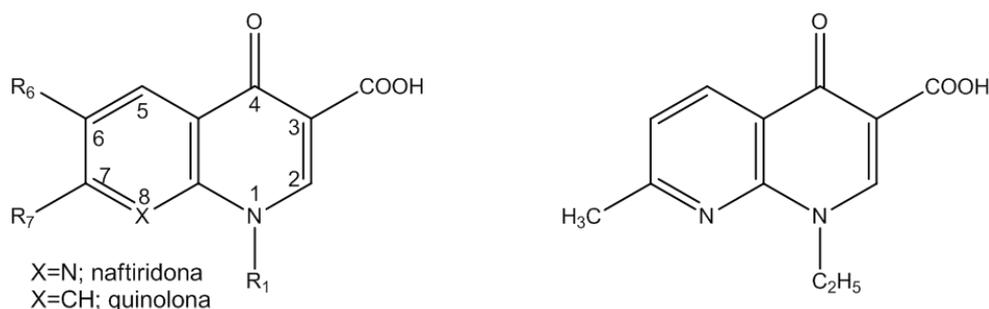


Figura 8 – Núcleo base das Quinolonas/naftiridonas vs estrutura do Ácido Nalidíxico.

Um grande avanço na evolução da atividade antibacteriana das quinolonas surgiu aquando da combinação de um átomo de flúor e de um grupo piperazinil nas posições 6 e 7, respetivamente, do núcleo quinolona. Esta combinação levou a um aumento do espectro de atividade e perfil farmacocinético contra organismos Gram (-) e alguns Gram (+) surgindo, assim, uma segunda geração de quinolonas e uma nova denominação: fluoroquinolonas [32-34]. No entanto, é importante lembrar que, embora se denominem (fluoro)quinolonas, quando na posição 8 do núcleo base se encontra um átomo de azoto as quinolonas são, efetivamente, naftiridonas e só são, verdadeiramente, fluoroquinolonas (ou quinolonas) quando na posição 8 se encontra um átomo de carbono [32, 34].

As várias alterações ao núcleo base tiveram como objetivo a obtenção de compostos com melhor solubilidade, maior espectro de ação antimicrobiana, menor

nível de toxicidade, melhor farmacocinética e capacidade para ultrapassar a resistência desenvolvida por diferentes microrganismos. No entanto, não são possíveis alterações nas posições **2**, **3**, **4** e **6** pois levam à perda da atividade da molécula. Na posição **2**, qualquer grupo maior que um átomo de hidrogénio pode levar a interações estereoquímicas com os grupos nas posições **3** e **4**, onde se encontram os grupos carbonilo e carboxilo, que também não podem ser alterados pois ao serem responsáveis pelas ligações de hidrogénio às bases de ADN ou complexação aos grupos fosfato do ADN via Mg^{2+} são essenciais para a atividade antibacteriana [32, 35]. Na posição **6**, o átomo de flúor é um elemento fundamental para a potência visto possuir uma atividade antibacteriana muito superior a qualquer outro grupo/átomo [35].

2.1.1. As fluoroquinolonas

As (fluoro)quinolonas podem ser agrupadas em quatro gerações. A primeira geração (figura 9), como já foi referido, é representada pelo ácido nalidíxico, cinoxacina, ácido oxalínico, ácido pipemídico ou flumequina.

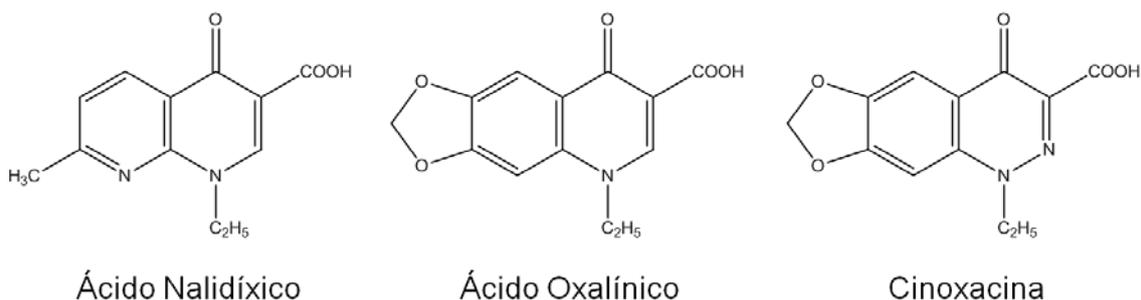


Figura 9 – Quinolonas de primeira geração.

As primeiras fluoroquinolonas, propriamente ditas, surgiram na década de 80, com a combinação de um átomo de flúor (posição 6) característica comum a todas as gerações (2^a, 3^a e 4^a) e um grupo piperazinil (posição 7) [33]. A atividade antibacteriana das fluoroquinolonas não depende apenas do núcleo heteroaromático bicíclico mas também da natureza dos substituintes periféricos e a sua relação espacial [36].

Como já foi referido, esta combinação levou a um maior espectro de ação, a um aumento da capacidade das quinolonas penetrarem na parede bacteriana levando, conseqüentemente, a uma melhor atividade contra bactérias Gram (–), passando a abranger, também, algumas espécies Gram (+), além de atingir um perfil farmacocinético melhor, chegando a ter uma atividade antibacteriana 1000 vezes superior à observada para o ácido nalidíxico [32, 33].

As principais alterações verificadas nas fluoroquinolonas de 2ª geração (figura 10) foram a introdução/alteração de grupos alquilo ligados ao azoto na posição 1 e na posição *para* do grupo piperazínico. Estas alterações levaram a um aumento da lipossolubilidade e do volume de distribuição dos compostos [37]. As fluoroquinolonas de segunda geração mais utilizadas são a ciprofloxacina e a ofloxacina no entanto, a ciprofloxacina é mais ativa contra *Pseudomonas aeruginosa* assim como foi a primeira quinolona a ser utilizada em diversas infeções e não apenas limitada ao uso em infeções urinárias ou sexualmente transmissíveis [30, 38].

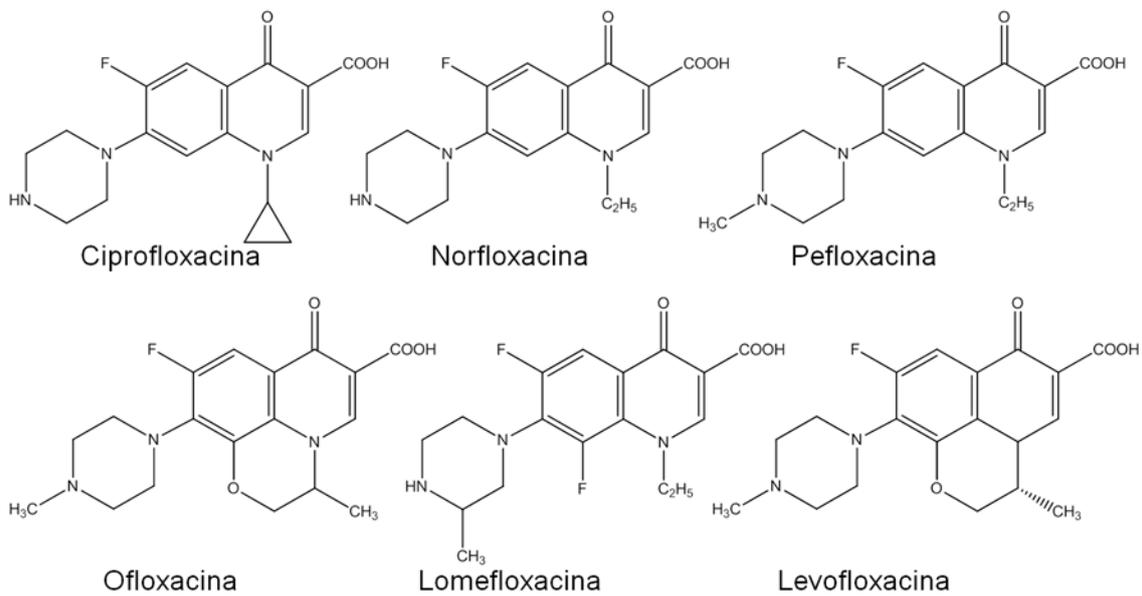


Figura 10 – Fluoroquinolonas de segunda geração.

A atividade contra bactérias Gram (+) aumentou, significativamente, com a terceira geração (figura 11) com as fluoroquinolonas grepafloxacina, sparfloxacina e temafloxacina, fundamentalmente devido a alterações na posição 5 do núcleo base das fluoroquinolonas [38].

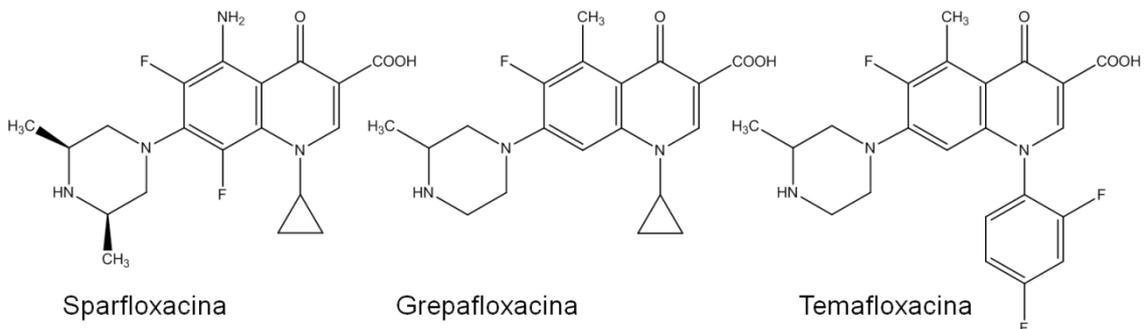


Figura 11 – Fluoroquinolonas de terceira geração.

Uma maior atividade contra bactérias anaeróbias permitiu distinguir parte destes novos compostos numa quarta geração de quinolonas (moxifloxacina, gatifloxacina, trovafloxacina). A inserção de um grupo metoxi na posição 8, a substituição do grupo piperazina por um grupo pirrolidina ou diamidas mais complexas são as principais alterações verificadas nos compostos de quarta geração [38] (figura 12).

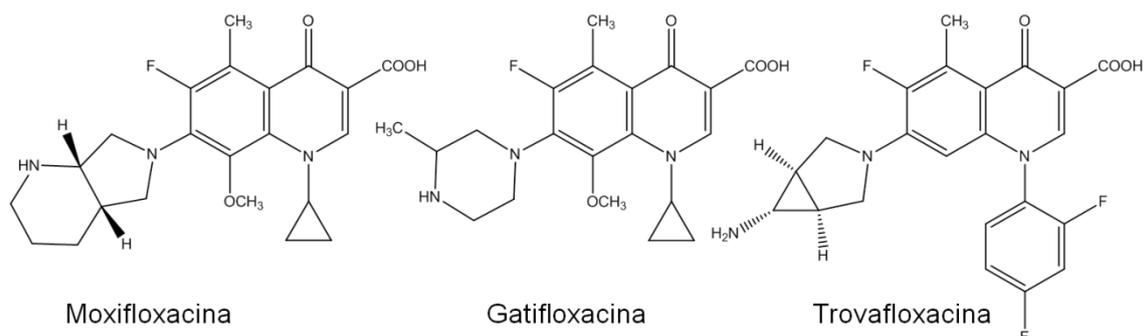


Figura 12 – Fluoroquinolonas de quarta geração.

A vasta pesquisa realizada nesta área permitiu uma melhor definição das alterações ao núcleo base das quinolonas que oferecem uma maior eficácia clínica, resistência e toxicidade reduzida. Tais alterações incluem um grupo ciclopropil na posição 1, um grupo metoxi na posição 8, um substituinte na posição 7 como um grupo piperazina ou pirrolidina e um átomo de flúor na posição 6. No entanto, a remoção do átomo de flúor na posição 6 (suspeito de provocar genotoxicidade e defeitos a nível do sistema nervoso central) deu origem a quinolonas designadas de des-fluoroquinolonas, sendo o primeiro composto desta geração a garenoxacina [30].

As fluoroquinolonas são os únicos agentes antibacterianos a competir com os antibióticos β -lactâmicos (amoxicilina, cefalosporinas) ao nível do seu impacto na utilização clínica. Existe, atualmente, um enorme número de novas fluoroquinolonas e as modificações estruturais efetuadas permitiram que esta classe de antibióticos se desenvolvesse drasticamente, desde os primeiros compostos sintetizados (com aplicação limitada) até aos novos compostos, cujo maior espectro de ação e farmacocinética permitem apenas uma dosagem diária [32].

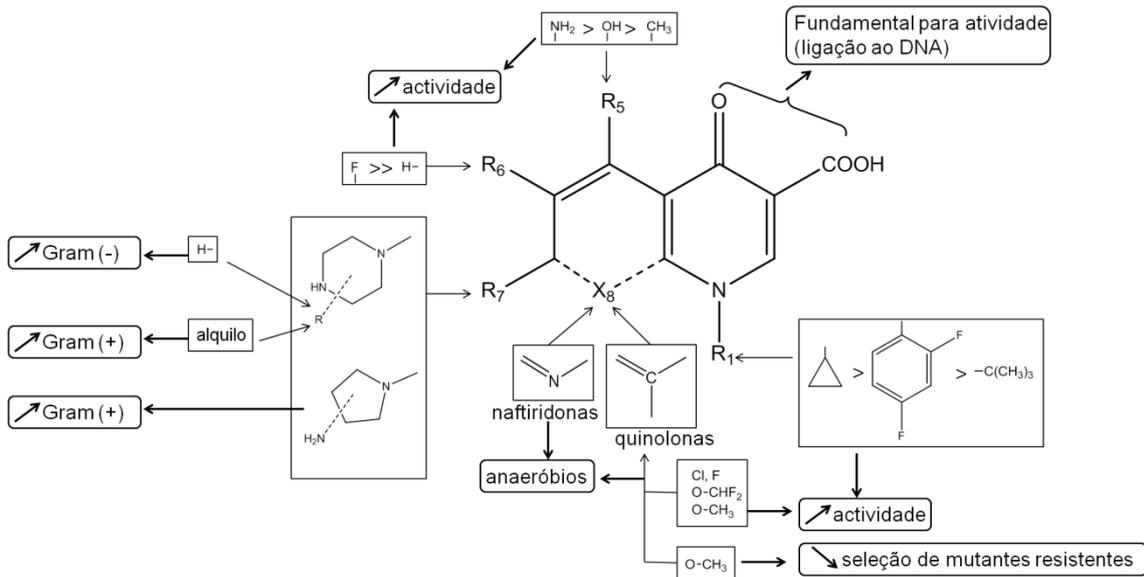


Figura 13 – Relação estrutura atividade das fluoroquinolonas - adaptada de [30].

2.2. Propriedades físico-químicas

2.2.1. Ionização

As fluoroquinolonas, como já foi referido, pertencem a uma classe de agentes antibacterianos com um largo espectro de atividade contra organismos Gram (+) e Gram (-) assim como contra organismos anaeróbios, sendo a sua ação terapêutica fundamental, sobretudo em infeções causadas por organismos resistentes a outras classes de fármacos [32, 33].

As propriedades físico-químicas das quinolonas são um fator importante pois influenciam o seu comportamento tanto *in vivo* como *in vitro*, sobretudo as suas propriedades ácido-base, o seu grau de ionização, o seu carácter hidro/lipofílico e a sua capacidade para complexar iões de metais [39-41].

As fluoroquinolonas são uma classe de compostos relativamente insolúveis em água. A presença simultânea de um grupo carboxilo (no núcleo 4-quinolona) e de uma amina (na posição 7 do grupo piperazina) confere ao composto características anfotéricas. Como consequência da sua anfotericidade é possível existir mais do que uma espécie em solução, dependendo do pH, devido à protonação/desprotonação dos grupos carboxilo e amina, sendo possível encontrar as quinolonas em quatro formas distintas (aniónica, catiónica, ião-dipolar e neutra) [38, 40]. Os valores de pK_a para estes grupos funcionais encontram-se entre 5,5-6,3 para o ácido carboxílico e 7,6-9,3 para o grupo amina [38]. Assim, para valores de pH baixos ambos os grupos encontram-se protonados, conferindo à molécula uma carga geral positiva, enquanto a

pH's mais elevados a amina se encontra sob a forma de base livre e o grupo carboxilo sob a forma de ião carboxilato, ou seja carregado negativamente. Devido a estas propriedades, as fluoroquinolonas tendem a ser mais solúveis em pH's ácidos ou básicos e possuem solubilidade mínima a pH's fisiológicos (neutros) [38]. A pH 7,4 (fisiológico) as quinolonas encontram-se total ou parcialmente ionizadas influenciando assim, o comportamento farmacológico destes compostos, uma vez que a presença de grupos carregados é necessária para a sua atividade biológica [41].

É importante lembrar que, a atividade antibacteriana das quinolonas depende fortemente do pH do meio em que se encontram, visto atuarem por inibição da ADN girase (enzima alvo destes fármacos) processo este que depende do pH e concentração de ácido [37, 42]. No entanto, quinolonas com diferentes estruturas e diferentes substituintes vão exibir diferentes ações antibacterianas [41].

2.2.2. Complexação

As quinolonas possuem um grupo carboxilo e carbonilo fundamentais para a sua atividade antibacteriana mas que também constituem um local onde pode ocorrer complexação de diversos catiões metálicos [43] que poderá alterar as propriedades farmacológicas e toxicológicas dos fármacos quando administrados sob a forma de complexo de metal [44].

No que diz respeito à complexação, o ião carboxilato geralmente coordena aos iões metálicos numa das seguintes formas (figura 14):

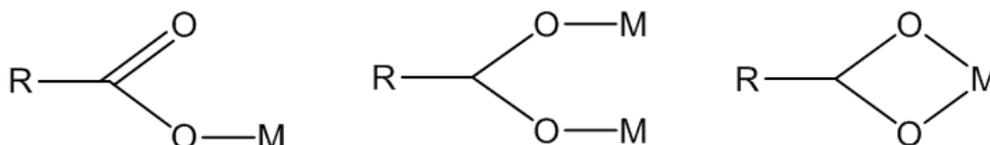


Figura 14 – Diferentes modos de coordenação de metais ao grupo carboxilo das quinolonas - adaptado de [45].

O átomo de azoto na posição 4 do grupo piperazina, visto ser um grupo facilmente ionizável, poderá participar na complexação no entanto o mais provável é estabilizar o complexo e não o principal local de complexação [42].

A formação de complexos entre as quinolonas e de iões de metal divalentes (alcalino-terrosos e transição) tem um importante papel a nível biológico. A capacidade destes fármacos interagirem com alguns componentes celulares (proteínas, membranas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas) é mediada através desta complexação [42, 46, 47].

In vivo, os metais de transição encontram-se presentes em concentrações extremamente baixas (vestigiais) e os ligandos no seu ambiente podem ser consideravelmente alterados na presença de concentrações significativas de um fármaco. Estas alterações no equilíbrio entre o íon de metal e o ligando podem ter um profundo efeito na atividade do fármaco contra bactérias potencialmente suscetíveis [48].

2.3. Mecanismo de ação e resistência

2.3.1. Mecanismo de ação

As fluoroquinolonas possuem um mecanismo de ação único no que diz respeito a agentes antimicrobianos, uma vez que interagem com dois alvos relacionados, mas distintos. As fluoroquinolonas atuam por inibição, específica, da atividade catalítica de duas das enzimas responsáveis e essenciais à replicação e transcrição do ADN bacteriano e que se encontram ausentes em células humanas: a ADN girase e a topoisomerase IV (topoisomerasas do tipo II) [38, 49-51]. A ADN girase é o alvo principal em organismos Gram (-) enquanto que em organismos Gram (+) o alvo é a topoisomerase IV [49].

Na sua forma relaxada, o ADN apresenta-se como uma dupla hélice que pode ser enrolada e torcida, no sentido oposto ao da hélice, provocando um superenrolamento “negativo” da dupla hélice [49]. Para que a replicação se proceda, é necessário a separação das duas cadeias, ou seja, é fundamental que a dupla hélice se desenrole [52]. O grau de enrolamento depende da ação superenrolamento/relaxamento pela qual a ADN girase (superenrolamento negativo) e topoisomerase IV (relaxamento da molécula de ADN) são responsáveis [19, 50]. Uma vez que ambas as enzimas são essenciais ao crescimento e divisão das células bacterianas, ao bloquearem a ação destas enzimas as fluoroquinolonas inibem todos os processos consequentes da sua ação levando, assim, à morte da célula bacteriana.

O local de ação das quinolonas é intracelular [53]. Embora o mecanismo específico de como as quinolonas atuam sobre as topoisomerasas, ou como a inibição das enzimas leva à morte bacteriana ainda não seja claro, atualmente defende-se que os fármacos se ligam a um complexo formado entre o ADN e as topoisomerasas, induzindo uma estabilização do complexo e causando o efeito letal destes fármacos, uma vez que leva à quebra do ADN e bloqueia o processo de replicação do mesmo. Complexos entre ADN, quinolona e a topoisomerase IV parecem criar uma barreira física à replicação deste [30, 52].

De acordo com a estrutura base das quinolonas, os dois grupos carbonilo adjacentes, pertencentes ao grupo carboxilo e oxo nas posições 3 e 4, constituem potenciais locais de complexação de íons divalentes. Assim, existe a possibilidade das quinolonas interagirem com a membrana externa da célula bacteriana como agentes quelantes dos íons magnésio aí presentes [19, 54]. Estes íons ligam moléculas de lipopolissacarídeo entre si impedindo a entrada dos fármacos na célula. As quinolonas, ao complexarem estes catiões vão destabilizar a estrutura da membrana externa expondo, deste modo, locais da bicamada lipídica por onde os antibióticos se podem difundir. Esta via de permeação é denominada de via autopromovida [38, 55].

As fluoroquinolonas são um grupo atrativo de fármacos para diversos tipos de infeções. Como resultado, o uso exagerado e indiscriminado destes antibióticos levou a um aumento repentino e inesperado da resistência bacteriana a esta classe de agentes antibacterianos [52].

2.3.2. Mecanismos de resistência

Os mecanismos de resistência à ação antibacteriana das quinolonas ocorrem por dois mecanismos fundamentais: alterações nas enzimas alvo (ADN girase, topoisomerase IV ou ambas) e por alterações a nível da permeação (entrada e saída) dos antibióticos da célula [19, 30, 51, 52, 56].

Alterações a nível das topoisomerasas ocorrem através de mutações nos genes que codificam as suas subunidades levando a uma menor afinidade dos fármacos para com o complexo enzima-ADN. O transporte de fluoroquinolonas através da membrana ocorre por três possíveis processos: difusão através da bicamada lipídica, interface lípido/proteína ou através das porinas presentes na membrana externa da célula bacteriana [53, 57]. Modificações a nível de permeabilidade podem dever-se a uma diminuição da permeabilidade da membrana externa por alteração das proteínas membranares externas (porinas), nos organismos Gram (-), alterando o mecanismo de influxo dos fármacos ou por alteração dos sistemas de transporte ativo (bombas de efluxo) levando ambos, conseqüentemente, a uma acumulação intracelular reduzida das fluoroquinolonas [19, 30, 37].

Como conseqüência do uso excessivo das quinolonas, o aparecimento de resistências bacterianas tornou crucial a apresentação de novas estruturas/mecanismos que permitam um espectro de ação ainda mais abrangente de modo a atuar sobre as estirpes resistentes.

2.4. Estratégias de combate à resistência bacteriana

2.4.1. Complexos ternários de cobre

Os íons de metal têm um papel fundamental na ação de alguns antibióticos tanto de origem sintética como de origem natural e estão envolvidos em interações específicas destas moléculas com proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas. O aumento da incidência de resistência bacteriana levou à procura de novas estratégias para melhorar os fármacos existentes e ao desenvolvimento de novos compostos de atividade antibacteriana superior. Estudos recentes revelaram que o íon Cu^{2+} tem um papel significativo no modo de ação das fluoroquinolonas, sugerindo que a intercalação do fármaco como complexo de metal seria um passo importante neste mecanismo [54].

O cobre é o terceiro metal biologicamente mais relevante, a seguir ao ferro e ao zinco, exibindo uma ação bioquímica considerável, tanto como metal vestigial essencial como constituinte de vários compostos administrados a humanos [58]. Embora seja conhecido por ser um elemento essencial na regulação de diversos processos fisiológicos (humanos), quando presente em excesso é capaz de induzir toxicidade como: produção de radicais livres, oxidação de lípidos, proteínas e ADN. Cobre em excesso também pode levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Doença de Wilson, Doença de Menke, Doença de Alzheimer) [58, 59].

O interesse atual em complexos de cobre advém do seu potencial como agente antimicrobiano, antivírico, anti-inflamatório, anti-tumoral, como inibidor de enzimas ou nucleases químicas [58]. Estudos efetuados reportam que a complexação com cobre inibe eficazmente os mecanismos de efluxo permitindo uma maior acumulação intracelular [60]. Deste modo, o estudo e desenvolvimento de complexos de cobre poderá ser útil na conceção e produção de materiais antivirais e antibacterianos capazes de desativar vírus como o HIV ou H1N1 e bactérias resistentes a antibióticos, respetivamente [58].

Desde que, em 1979, Sigman e seus colaboradores descobriram que íons Cu^{2+} , quando complexados à 1,10-fenantrolina levavam à destruição do ADN, complexos de cobre com ligandos dadores de azoto heterocíclicos têm vindo a ser utilizados devido às suas propriedades de intercalação e função como nucleases artificiais [61-63]. As propriedades antifúngicas e antibacterianas de uma vasta gama de complexos de cobre foram avaliadas contra vários fungos e bactérias patogénicos.

Complexos de Cu(II) com fármacos são bastante mais ativos na presença de ligandos heterocíclicos doadores de azoto como a 2,2-bipiridina, 1,10-fenantrolina ou 2,2-dipiridilamina [64].

As reações entre iões de metal e fluoroquinolonas poderão ser essenciais para a atividade destes agentes uma vez que os iões como Mg^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{2+} permitem estabelecer uma ponte entre a ligação da quinolona à ADN girase ou diretamente ao ADN bacteriano [54]. Vários estudos relativamente à interação entre diferentes quinolonas e catiões de metais foram já revistos na literatura. Em particular, estudos de complexos quinolona-cobre-1,10-fenantrolina tornaram-se um campo interessante e importante devido à elevada afinidade para o ADN deste tipo de complexos [54], conjugado com a possível diminuição da resistência bacteriana, o que sugere o conceito de complexos de metal de fluoroquinolonas como uma boa alternativa aos fármacos convencionais [54, 65].

2.4.2. Encapsulação de fármacos na libertação controlada

A utilização de lipossomas como vetores farmacológicos no transporte e libertação de fármacos oferece vantagens sobre a administração convencional, sobretudo na forma de administração tópica, pulmonar e parental [6, 11]. A alteração da sua farmacocinética e biodistribuição, observada em diversos casos, quando comparadas com o fármaco livre leva, inclusive, a um aumento da eficácia terapêutica do fármaco [6, 11].

Os benefícios da encapsulação de fármacos em lipossomas, que podem ser aplicados como soluções coloidais, aerossóis, cremes ou géis, podem ser resumidos em sete categorias [6, 11, 14]:

- i) aumento da solubilização de fármacos lipofílicos e anfifílicos;
- ii) direcionamento, passivo, para células do sistema imunitário;
- iii) libertação controlada de lipossomas administrados localmente/sistemicamente;
- iv) redução da sua toxicidade (fuga à deposição em determinados órgãos - *site-avoidance mechanism*);
- v) atuação direta no local de ação (*site specific targeting*);
- vi) transferência melhorada de fármacos diretamente nas células;
- vii) penetração nos tecidos melhorada.

A encapsulação de fármacos em lipossomas é ponderada quando os fármacos possuem elevada potência e tempos de semi-vida curtos, na circulação sanguínea, ou em locais de administração subcutânea, intramuscular ou intrapulmonar.

Os fatores mais importantes para a escolha do tipo de lipossoma (convencionais ou de longa circulação), composição e preparação baseiam-se nas propriedades físico-químicas e modo de ação dos fármacos em questão. No que diz respeito à fase aquosa e quando se pretende aplicações *in vivo*, a sua tonicidade é ditada pela osmolaridade dos fluidos biológicos (~300 mOsm/kg) enquanto a força iónica pode variar entre 150 e 200 mmol.dm⁻³. As soluções aquosas utilizadas são geralmente tamponadas (soluções tampão conhecidas) e numa gama de pH compreendida entre 3,5 a 8,5. Como a presença de alguns tampões pode afetar a estabilidade dos lipossomas e promover agregação e fusão dos mesmos, em certos lipossomas, neutros ou carregados são utilizadas, preferencialmente, soluções não iónicas como a lactose e glucose (5%) ou Sacarose (10%) [14, 66].

Existe um número de propriedades físico-químicas dos fármacos a ter em consideração aquando da utilização de um sistema de transporte lipossómico: estabilidade, solubilidade, tamanho (peso molecular), carga e potência, sendo esta última uma das propriedades mais importantes. Regra geral, quanto menos moléculas um sistema transportar, mais potente terá de ser o fármaco. No entanto, o uso de elevadas quantidades do sistema de transporte aumenta a probabilidade de ocorrerem problemas a nível de toxicidade, metabolismo, eliminação e biodegradabilidade. Uma vez que os lipossomas permitem o transporte de uma maior quantidade de moléculas, a potência do fármaco não é o maior problema que estes sistemas de transporte encaram [5]. Existem quatro fatores, fundamentais na formulação de um sistema lipídico de transporte/libertação, que influenciam o comportamento *in vitro* dos lipossomas, assim como a sua biodistribuição [7, 11]:

- i) os lipossomas tendem a libertar o material encapsulado se a sua formulação não incluir colesterol;
- ii) lipossomas mais pequenos são eliminados mais lentamente do que lipossomas maiores;
- iii) o tempo de semi-vida de um lipossoma aumenta com a concentração de lípido;
- iv) lipossomas carregados são eliminados mais rapidamente do que lipossomas neutros.

A encapsulação de fármacos em lipossomas representa um sistema de libertação controlada que aparenta oferecer vantagens terapêuticas importantes

relativamente aos outros métodos de libertação. Uma vez que a encapsulação altera radicalmente a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco (a sua farmacocinética), esta poderá contornar grande parte dos problemas atuais existentes na libertação controlada. Embora grande parte das suas aplicações envolva injeções intravenosas das preparações lipossómicas é possível a conceção de outras vias de administração (oral, ocular e transdérmica) [7, 12].

Embora existam estudos que abrangem os mais diversos fármacos, as quinolonas, não se encontram extensamente investigadas na área dos sistemas de transporte. A maior parte dos estudos de interação de quinolonas com lipossomas prende-se com a determinação de coeficientes de partição e estudos físico-químicos e apenas uma pequena parte desses estudos foca a encapsulação das quinolonas em vesículas lipídicas. No entanto os poucos estudos existentes demonstram e evidenciam o potencial clínico promissor da sua encapsulação em lipossomas [7, 12].

3. Processos de Encapsulação

Os fármacos podem interagir com os lipossomas de variadas formas. Estas interações dependem de propriedades físico-químicas como a solubilidade e polaridade. Fármacos hidrossolúveis podem ser encapsulados no compartimento aquoso, dissolvidos na membrana ou intercalados na zona das cabeças polares. No caso de fármacos lipossolúveis, a única possibilidade de encapsulação dos mesmos em lipossomas encontra-se na parte hidrofóbica das vesículas lipídicas (cadeias hidrocarbonadas) aquando da sua preparação [11].

Os diferentes fármacos podem ser encapsulados em lipossomas de dois modos: durante a sua preparação (encapsulação passiva) ou após a sua formação (encapsulação ativa). Independentemente da encapsulação ser passiva ou ativa, quatro requisitos deverão ser cumpridos para que os lipossomas se possam tornar terapeuticamente eficazes [11, 23, 67]:

1. uma encapsulação estável e suficiente em lipossomas, de modo a alcançar o local de ação ao nível necessário para atingir eficácia terapêutica;
2. uma circulação prolongada, no plasma, na forma lipossómica;
3. uma libertação dos fármacos encapsulados nos tecidos alvo;
4. uma libertação dos fármacos encapsulados nas células alvo.

Para que os sistemas de libertação controlada possuam uma circulação prolongada e eficácia terapêutica nos tecidos e células alvo, é fundamental, em primeiro lugar, assegurar uma encapsulação estável e elevada em sistemas lipídicos

mais simples antes de proceder a modificações na sua composição. Deste modo, embora todos os pontos sejam de elevada importância, focar-nos-emos apenas no ponto 1.

3.1. Encapsulação passiva

A encapsulação passiva é o método de encapsulação mais simples e mais adequado na utilização de fármacos hidrossolúveis pois envolve a formação dos lipossomas numa solução aquosa do fármaco que se pretende encapsular. Embora seja um método simples e frequentemente utilizado, este tipo de encapsulação depende da capacidade dos lipossomas capturarem um determinado volume aquoso dependendo, deste modo, do tipo de vesícula utilizada (a eficiência de encapsulação varia de 1% para SUV's até cerca de 88% para algumas MLV's) [23, 68]. O método mais frequente para a encapsulação deste tipo de fármacos baseia-se na hidratação do filme lipídico com o fármaco, em solução aquosa, e, após extrusão dos lipossomas, remoção de todo o fármaco não encapsulado através de técnicas como diálise, filtração por gel, ultracentrifugação ou permuta iónica, esta última no caso de fármacos com carga [14].

A maior desvantagem deste tipo de encapsulação é a baixa percentagem de encapsulação, uma vez que a fração de fármaco que permanece dentro dos lipossomas é, no máximo, igual ao volume interno aquoso da vesícula selecionada [11, 14, 69].

No método de encapsulação passivo assume-se que os compostos serão encapsulados por introdução dos mesmos nos lipossomas antes ou em determinada altura da sua preparação. No entanto, fármacos com grupos ionizáveis e com propriedades hidro/lipofílicas, tal como as fluoroquinolonas, também podem ser introduzidos nos lipossomas após a formação dos mesmos. Normalmente, a encapsulação deste tipo de compostos é difícil uma vez que a sua lipofilicidade leva a que possam difundir-se, facilmente, para dentro e para fora da membrana, estabelecendo um equilíbrio entre o interior e o exterior do lipossoma. Uma grande parte dos compostos com atividade terapêutica são compostos com as propriedades acima referidas sendo, conseqüentemente, a sua encapsulação passiva em lipossomas um processo complicado [15, 69]. Quando se verificam estas condições são preferíveis métodos de encapsulação ativa, visto os fármacos serem encapsulados em vesículas lipídicas pré-formadas através da utilização de um gradiente transmembranar [69].

3.2. Encapsulação Ativa

A encapsulação ativa de fármacos dentro de lipossomas pode ocorrer por diferentes processos: Através da criação de gradientes de pH, por diferentes métodos de preparação dos lipossomas ou através da criação de um gradiente de iões de metal. Este último, deriva do método de encapsulação via ionóforos, no entanto não é estabelecido um gradiente de pH e baseia-se apenas na encapsulação de iões de metais, no nosso caso metais de transição, e um ou mais fármacos [70].

3.2.1. Encapsulação através de gradientes de pH

Um dos possíveis métodos de encapsulação ativa consiste na encapsulação ativa de fármacos dentro de lipossomas, após o estabelecimento de um gradiente transmembranar de pH, entre o interior e o exterior do lipossoma e é frequentemente utilizado em fármacos com propriedades de ácidos/bases fracas.

O mecanismo de encapsulação de fármacos dentro de lipossomas consiste na permeação, na sua forma neutra, para o interior do lipossoma onde ficará carregado, devido à diferença de pH. Consequentemente, este permanecerá encapsulado visto a velocidade de difusão de moléculas carregadas, através da bicamada lipídica, ser substancialmente menor do que para moléculas neutras (a sua lipofilicidade é significativamente reduzida). A acumulação dos fármacos dentro dos lipossomas continua enquanto se mantiver o gradiente entre o meio externo e o meio interno. As técnicas de encapsulação envolvendo gradientes de pH podem ser designadas por encapsulações ativas ou remotas e habitualmente envolvem dois passos: a geração do gradiente e a subsequente encapsulação do fármaco [14, 15, 24, 66].

Uma das possíveis desvantagens deste método, embora seja possível acumular quantidades substanciais de fármaco dentro dos lipossomas, é a libertação do fármaco através da membrana à medida que o gradiente cessa de existir.

Atualmente existem, pelo menos, 4 métodos utilizados para a encapsulação de fármacos com propriedades anfipáticas, por criação de gradientes de pH [69]:

1. preparação dos lipossomas em tampão citrato pH 4,0 (encapsulação por gradiente de pH) – para a encapsulação de ácidos/bases fracas;
2. encapsulação utilizando uma solução de sulfato de amónio (encapsulação por gradiente transmembranar de ião amónio) – para a encapsulação de bases fracas;
3. formação de lipossomas numa solução de sulfato de magnésio pH 6,5 (encapsulação via ionóforos) e,

4. preparação de lipossomas utilizando soluções de sais de acetato (encapsulação por gradiente transmembranar de acetato) – para a encapsulação de ácidos fracos.

Uma vez que no decorrer deste trabalho apenas se utilizaram os gradientes transmembranares de sulfato de amónio e acetato (gradientes de pH) e gradientes transmembranares de iões de metal, apenas estes serão descritos em pormenor.

3.2.1.1. Criação de gradiente de pH através de gradientes transmembranares de sulfato de amónio

As fluoroquinolonas como já foi referido anteriormente, são moléculas anfipáticas, com características de ião dipolar, solúveis e com carga a pH ácido ou alcalino mas que se encontram na sua forma neutra (baixa solubilidade) a pH fisiológico (pH 7,4) condições necessárias para maior parte das técnicas de encapsulação). Embora a encapsulação por gradiente de pH (tampão citrato) seja igualmente utilizada para a encapsulação de fluoroquinolonas, a criação de gradientes transmembranares utilizando sulfato de amónio (figura 15) origina percentagens de encapsulação superiores, de acordo com a bibliografia [8, 11, 69], sendo por esse motivo o processo de encapsulação selecionado para os estudos apresentados.

A preparação dos lipossomas para este método de encapsulação consiste na hidratação do filme lipídico numa solução de sulfato de amónio, pH 5,5, e posterior substituição do meio externo por uma solução salina, não tamponada, frequentemente NaCl 150 mmol.dm⁻³. O gradiente transmembranar é criado pela difusão de uma pequena quantidade de amoníaco através da vesícula, estabelecendo um interior ácido com um baixo valor de pH. No exterior do lipossoma, as fluoroquinolonas que se encontrem na sua forma neutra e que se difundam para o interior do lipossoma, serão protonadas, ficando sobre a forma catiónica e conseqüentemente encapsuladas dentro da vesícula. Este processo repete-se até à total encapsulação das fluoroquinolonas ou até cessar a difusão de amoníaco para o exterior da membrana e conseqüente ionização/protonação no interior do lipossoma [8, 14].

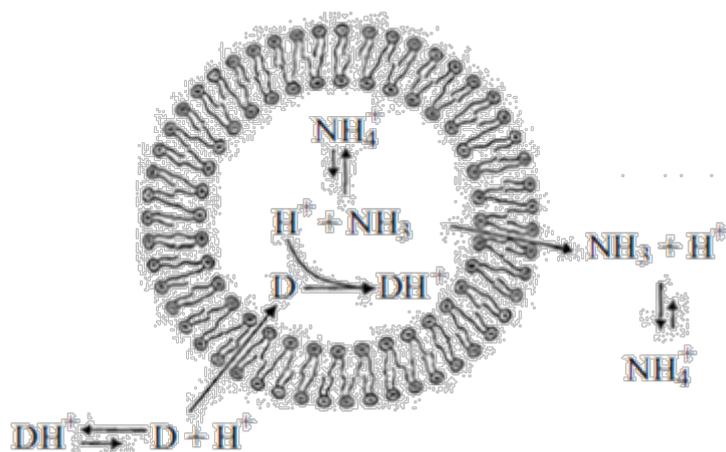
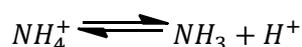


Figura 15 – Representação esquemática da encapsulação de fármacos através da formação de um gradiente transmembranar de sulfato de amónio. Tampão interno sulfato de amónio, pH 5,5, e tampão externo NaCl 150 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. DH^+/D =fármaco na sua forma protonada/neutra [8].

O papel do ião amónio

A encapsulação através deste método, remete para a capacidade do ião amónio se dissociar num protão e numa molécula de amoníaco (coeficiente de permeabilidade elevado), de acordo com a reação traduzida pela equação:



Quanto maior for o pH, maior é a extensão da dissociação e mais moléculas de amoníaco se formam porém, para valores baixos de pH a dissociação é menos extensa e o meio contém mais iões amónio. O amoníaco difunde-se através da membrana para o meio aquoso externo, devido à sua elevada permeabilidade. Ao passar para o meio externo cria, dentro dos lipossomas, um excesso de protões e, conseqüentemente, um gradiente de protões (para além do gradiente de iões amónio) onde $|\text{H}^+|_{\text{lipossoma}} \gg |\text{H}^+|_{\text{meio externo}}$ tornando o meio interno ácido. Esta acidificação impede a dissociação de mais iões NH_4^+ e conseqüentemente a difusão de amoníaco dos lipossomas estabilizando, deste modo, o sistema. Ao adicionar o fármaco a este sistema, este vai difundir-se para o interior dos lipossomas na sua forma neutra. Após a difusão, o fármaco vai ser protonado, devido ao excesso de protões presentes no interior do lipossoma. Há assim um aumento do pH do meio interno, reiniciando o processo de dissociação do ião NH_4^+ em NH_3 e H^+ permitindo, deste modo, a continuação do ciclo de encapsulação. Este ciclo continua até que todos os iões NH_4^+ sejam substituídos pelas moléculas que se pretende encapsular [67].

A função do contra-ião do ião NH_4^+ é o controlo da estabilidade da encapsulação e o perfil e velocidade de libertação do fármaco (com propriedades de base fraca) do lipossoma para a fase aquosa externa. Dos aniões, de baixo peso molecular, geralmente utilizados em encapsulações através de iões amónio a estabilidade é mais elevada para o ião sulfato e segue a seguinte ordem: sulfato>citrato>fosfato>cloreto>glucoronato [67, 69].

3.2.1.2. Criação de gradiente de pH através de gradientes transmembranares de acetato

Neste tipo de encapsulação, os lipossomas são preparados numa solução aquosa contendo o sal de um ácido fraco (geralmente, acetato de cálcio ou sódio, a pH compreendido entre 5 e 7) de modo a encapsular fármacos anfifílicos com comportamento de ácidos fracos. O meio externo é, por sua vez, substituído por uma solução de sulfato de sódio na mesma concentração de modo a manter a osmolaridade em ambos os compartimentos do lipossoma [66, 69, 71]. Enquanto os iões de cálcio se mantêm no interior do lipossoma, devido à sua carga, o ácido acético formado no interior das vesículas facilmente permeia a membrana, tornando o meio interno mais alcalino (devido ao excesso de iões hidroxilo) e comporta-se como um transportador de prótons, estabelecendo o gradiente de pH (figura 16). Ao permear para o meio externo vai protonar o fármaco (inicialmente com carga negativa) tornando-o numa espécie neutra sendo, então, encapsulado dentro do lipossoma por difusão através da bicamada lipídica. Já dentro do lipossoma, como consequência da alcalinidade do meio, o fármaco perde um próton e fica carregado negativamente, formando um precipitado com os iões de metal presentes (Ca^{2+} ou Na^+). A precipitação estabiliza a encapsulação e permite evitar problemas associados com efeitos de osmolaridade [69, 71].

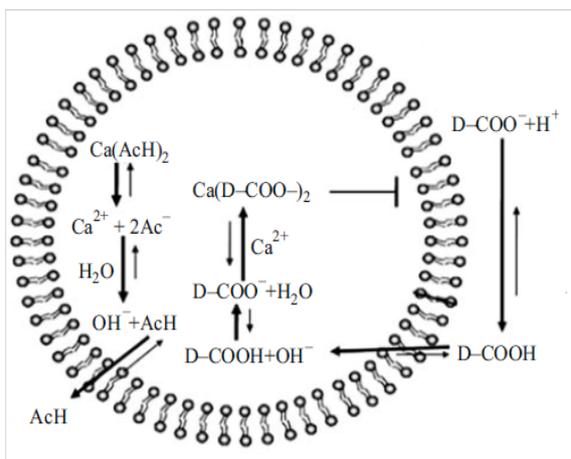


Figura 16 – Representação esquemática do gradiente de pH transmembranar estabelecido por acetato de cálcio como $DH/D-COOH$ =fármaco na sua forma aniônica/neutra [8].

Uma vez que o gradiente de acetato de cálcio fornece a força motriz para o processo de encapsulação ocorrer, pode-se afirmar que este é um método de encapsulação ativo. Este método baseia-se no mesmo princípio que o método de encapsulação por gradiente transmembranar de sulfato de amónio. Em ambos, existe um equilíbrio entre duas espécies cujos coeficientes de permeabilidade diferem em várias ordens de magnitude. No entanto, a natureza das espécies envolvidas (as que facilmente permeiam a membrana e as que se mantêm encapsuladas) é diferente, o que permite a encapsulação, num caso, de ácidos fracos anfífilos e no outro, bases fracas anfífilas [72].

3.2.2. Encapsulação através de um gradiente transmembranar de iões de metal de transição

Lipossomas com iões de metal encapsulados no seu interior têm vindo a ser utilizados em aplicações de diagnóstico, como por exemplo no transporte de agentes de contraste para acumulação dos mesmos em determinada parte do corpo.

Nos estudos de encapsulação da doxorubicina e ciprofloxacina verificou-se que é possível a sua encapsulação na presença de $MnSO_4$ e de um ionóforo existindo, simultaneamente, um gradiente primário “iónico” (estabelecido após a preparação de lipossomas em $MnSO_4$) e um gradiente secundário de pH (estabelecido pela adição de um ionóforo adequado) [8, 70, 73]. No entanto, também é possível a encapsulação da doxorubicina [70, 73] na presença de um gradiente de $MnSO_4$ mas na ausência de um gradiente de pH. Neste caso, a força motriz para a encapsulação é a complexação com o catião Mn^{2+} [74]. A presença de um interior lipossómico ácido e um meio

exterior neutro/básico permite que fármacos que se encontrem na sua forma neutra, a pH neutro ou alcalino, e essencialmente na sua forma carregada em meio ácido, sejam facilmente encapsulados dentro de um lipossoma [70].

Neste método de encapsulação prevê-se a encapsulação em lipossomas, de um ou mais fármacos, na ausência de um ionóforo. Neste tipo de encapsulação os lipossomas podem ser preparados por dois procedimentos diferentes, de acordo com o tipo de lipossomas que se pretende formular. Os metais de transição podem ser encapsulados nos lipossomas de acordo com as técnicas convencionais conhecidas [70].

Para a encapsulação de um fármaco: Preferencialmente os lipossomas deverão ser formados em soluções contendo um sal de ião de metal de transição, farmacologicamente aceitável e solúvel em solução aquosa como por exemplo cloretos, sulfatos, acetatos ou nitratos numa concentração entre 50 e 800 mmol.dm⁻³. O fármaco a encapsular deverá ser capaz de coordenar o ião de metal presente no interior do lipossoma, como as (fluoro)quinolonas, antraciclina e outros antibióticos que possuam locais de coordenação como aminas, grupos carbonilo ou carboxilo.

Para encapsulação de dois ou mais fármacos: o método de preparação dos lipossomas é semelhante, diferindo apenas na hidratação do filme lipídico, que neste caso é feito pela encapsulação passiva de uma mistura do(s) fármaco(s) pretendido(s) e o ião de metal de transição. Posteriormente, os restantes agentes a encapsular serão inseridos no interior dos lipossomas através de encapsulação ativa. Estes, deverão ser capazes de transpor a membrana lipídica quando presentes no meio externo mas incapazes de a permear na forma de complexo.

Quanto ao meio externo, este é substituído por uma solução tampão a pH fisiológico, e de modo a que os lipossomas não contenham qualquer ião de metal livre em solução ou complexado à sua superfície adicionando, para o efeito, um agente complexante à solução tampão, se necessário. Um exemplo de soluções tampão frequentemente utilizadas neste tipo de estudos são HBS (Hepes 20 mmol.dm⁻³, NaCl 150 mmol.dm⁻³) pH 7,4 ou SHE (Sacarose 300 mmol.dm⁻³, Hepes 20 mmol.dm⁻³, EDTA 30 mmol.dm⁻³) pH 7,4.

A determinação do fármaco encapsulado, neste método de encapsulação, é feita por rutura dos lipossomas numa solução de detergente, aquecimento até ao seu “ponto nuvem” e posterior arrefecimento à temperatura ambiente, uma vez que a utilização de solventes orgânicos poderá alterar as propriedades químicas do complexo formado. O ponto nuvem é um fenómeno no qual soluções aquosas micelares de alguns surfactantes exibem turbidez por aquecimento ou arrefecimento

acima ou abaixo de uma determinada temperatura. Quando uma solução micelar de um surfactante não-iónico é aquecida acima da temperatura do ponto nuvem ocorre a formação de duas fases, uma das quais rica em surfactante e a outra contendo uma concentração de surfactante próxima da sua concentração micelar crítica a essa temperatura. Este fenómeno é reversível e após arrefecimento forma-se novamente uma única fase [75]. Embora a simples adição de um detergente (surfactante) não iónico, numa concentração acima da sua concentração micelar crítica, a uma suspensão de lipossomas seja suficiente para levar à rutura dos mesmos, na presença de sistemas lipídicos saturados e com colesterol, a mistura lipossomas/detergente, deverá ser aquecida até ao seu “ponto nuvem” para solubilização total das vesículas, ou através da utilização de maiores concentrações de surfactante (tendo em consideração o fator diluição) sendo posteriormente arrefecida para que a sua medição através de técnicas espectroscópicas seja possível [76-78].

Para qualquer um dos métodos acima mencionados é sempre necessário estabelecer um gradiente transmembranar assim como remover qualquer fármaco não encapsulado do meio exterior do lipossoma.

O gradiente de pH é formado, regra geral, por substituição do tampão existente no exterior dos lipossomas (solução com a qual os lipossomas são hidratados). Após a extrusão, as LUV's são sujeitas a diálise, por 24h, contra o tampão externo desejado. No entanto, este passo é passível de ser substituído e o gradiente ou material não encapsulado ser formado/removido através de um de dois métodos alternativos:

1. através da passagem das LUV's por uma coluna de Sephadex G-50 equilibrada com o tampão externo desejado;
2. utilização de mini colunas de *spin* de Sephadex G-50.

As mini colunas de *spin* além de permitirem uma rápida separação dos lipossomas do seu tampão de hidratação e do fármaco não encapsulado facilitam a monitorização do consumo do fármaco ao longo do tempo [8].

As mini colunas de *spin* possuem, ainda, a vantagem de serem um método de separação rápido que requer pequenas quantidades de amostra e que pode ser utilizado em amostras diferentes simultaneamente. A sua maior vantagem é, no entanto, o facto de os lipossomas poderem ser recuperados sem praticamente qualquer diluição da amostra [15].

3.3. Liberação do fármaco encapsulado

Como sistemas de transporte, os lipossomas têm como objetivo principal alcançar uma localização seletiva e suficientemente elevada do fármaco ativo em locais como tumores ou tecidos inflamados, além que para alcançar uma eficácia terapêutica, o fármaco encapsulado nos lipossomas deverá encontrar-se disponível para as células alvo [67].

A retenção do fármaco no interior do lipossoma é um fator importante pois é necessário que ele se mantenha no seu interior tempo suficiente para atingir o seu alvo, altura em que a liberação de algum fármaco é aceitável e até necessária [67]. A velocidade de liberação do fármaco pode ter implicações ao nível dos efeitos terapêuticos do sistema de transporte/liberação. Em sistemas lipossômicos o fármaco encontra-se indisponível enquanto estiver associado ao sistema de transporte e a incapacidade de libertar o seu conteúdo num período de tempo viável pode resultar numa diminuição do efeito terapêutico quando comparado com o fármaco na sua forma livre. Por outro lado, uma liberação demasiado rápida do lipossoma pode resultar em efeitos terapêuticos iguais aos do fármaco livre [5].

A retenção dos fármacos pode ser regulada pela escolha da composição da membrana lipossômica. No que diz respeito ao tamanho, maior parte dos sistemas lipossômicos são formados por vesículas unilamelares grandes (LUV's) cujos diâmetros se encontram perto de 100 nm. Deste modo, o seu volume interno aquoso é suficiente para transportar volumes consideráveis de material encapsulado mas também são estruturas pequenas o suficiente para circularem tempo suficiente na corrente sanguínea de modo a atingirem os locais desejados (tempos de circulação prolongados também se encontram associados a sistemas com diâmetros inferiores a 250 nm) [67, 79]. A composição lipídica de uma LUV irá afetar o tempo de circulação assim como a retenção do fármaco. Estudos efetuados revelam que a fosfatidilcolina, esfingomielina e o colesterol, assim como a substituição de lípidos insaturados por lípidos saturados permitem um aumento de ambos os fatores [67]. A tabela 1 apresenta uma medida da liberação do material encapsulado em função da composição lipídica selecionada para a preparação dos lipossomas, que confirma que à medida que a cadeia hidrocarbonada e a saturação do fosfolípido aumenta, na presença de colesterol, mais lenta é a liberação do material que se encontra no interior da vesícula.

Tabela 1 – Efeito da composição lipídica na estabilidade, *in vitro* (plasma de rato, 37°C), de SUV's - adaptado de [14].

Composição	% de carboxifluoresceína libertada				
	1 min	1 h	5 h	29 h	48 h
EPC	51,8	100			
HEPC	6,6	2,6	4,6		
DSPC	3,9	2,6	7		
EPC/Col	2,6	3,2	3,9		
DLPC/Col	25,4	84,5			
DOPC/Col	2,7	2,2	13		
DMPC/Col	0,5	1,1	2,5		
SM/Col	0,3	0,5	0,7	1,4	
DPPC/Col	0	0	0,3	0,8	
DSPC/Col	0	0	0	1	1,6

Abreviaturas: EPC – Fosfatidilcolina do ovo; HEPC- Fosfatidilcolina do ovo hidrogenada

Um ponto essencial da avaliação de um sistema de transporte e libertação de fármacos é a velocidade de libertação do fármaco do sistema lipossómico. Os estudos de libertação *in vitro* são geralmente utilizados não só no controlo de qualidade das formulações mas também na previsão do seu comportamento *in vivo*. Deste modo, os estudos de libertação de sistemas lipossómicos de transporte/libertação de fármacos em modelos animais (*in vivo*), só se justificam para formulações que nos testes *in vitro* permitam prever o seu comportamento farmacológico, farmacocinético, perfil de libertação e biodistribuição e que demonstrem potencial (após desenvolvimento farmacêutico) para se tornarem aceites farmacologicamente como alternativas à terapêutica convencional [14, 80].

Objetivos e Enquadramento

Um dos mais preocupantes e atuais problemas em Saúde Pública é o aumento da resistência bacteriana a antibióticos, sendo a necessidade de otimizar e melhorar os antibióticos existentes e/ou desenvolvimento de novos fármacos um dos principais objetivos a alcançar. No entanto, dada a morosidade do processo de desenvolvimento de novos fármacos, a formulação e apresentação dos atuais agentes antimicrobianos sob novas formas tem sido alvo de extensa investigação.

A frequente, e por vezes abusiva, prescrição de antibióticos da família das (fluoro)quinolonas para o tratamento das mais diversas infeções, a sua reformulação quer através da sua encapsulação em lipossomas ou da síntese de derivados de fluoroquinolonas (complexos ternários de cobre) como alternativa à terapêutica convencional poderá constituir um recurso para a atenuação da crescente resistência bacteriana.

Neste sentido o trabalho efetuado nesta dissertação visou essencialmente o estudo da: **(i)** encapsulação de fluoroquinolonas de 2ª e 3ª geração em lipossomas de diferente composição lipídica (PMPC, SPM e SPPC) e colesterol; **(ii)** síntese de complexos ternários de cobre, 1,10-fenantrolina e fluoroquinolonas e **(iii)** possível encapsulação destes complexos ternários nos sistemas lipossómicos.

O estudo da encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas permitiu avaliar a influência das propriedades físico-químicas das várias fluoroquinolonas e dos vários sistemas lipídicos na percentagem de encapsulação. A encapsulação de fluoroquinolonas foi realizada através de métodos de encapsulação passivos (hidratação do filme lipídico) e ativos (gradientes de pH), no entanto verificou-se que a encapsulação só era eficaz através de métodos de encapsulação ativos utilizando gradientes transmembranares de pH de sulfato de amónio.

A síntese de complexos ternários de cobre com várias fluoroquinolonas e 1,10-fenantrolina foi efetuada por otimização de alguns processos descritos na literatura. A caracterização destes complexos foi efetuada por espectroscopia de UV/Visível e de Infravermelho e por difração de Raio X (em alguns casos a primeira estrutura cristalina conhecida para o complexo ternário).

Estudos microbiológicos, já efetuados, para alguns destes complexos, mostram a sua potencial ação como antibióticos. No entanto, a sua encapsulação em sistemas lipídicos poderá ser vantajosa, minimizando processos de decomposição/substituição

em fluidos biológicos. Assim sendo, foi testada a encapsulação do complexo no sistema lipossómico SPPC:Col.

Os métodos de encapsulação, passivos e ativos, previamente utilizados para as fluoroquinolonas foram testados. No entanto, a percentagem de encapsulação obtida foi muito baixa. Deste modo, e com base nas características dos dois ligandos utilizados, desenvolveu-se um método de encapsulação que envolveu a formação do complexo ternário no interior dos lipossomas.

A formação do complexo foi efetuada utilizando duas metodologias de encapsulação: **(i)** utilização de gradientes transmembranares de pH utilizando acetato de cobre e, **(ii)** utilização de gradientes transmembranares de iões de metais de transição.

Estudos de estabilidade foram realizados quer para as fluoroquinolonas quer para o complexo ternário encapsulado e verifica-se que embora para as fluoroquinolonas exista uma boa retenção no interior dos lipossomas, após quatro semanas de armazenamento, para o complexo existe uma perda significativa do material encapsulado, para o mesmo sistema lipossómico.

Por fim, foi determinada a possível influência de condições fisiológicas (pH 7,4 e 37°C) na retenção das fluoroquinolonas e do complexo ternário em lipossomas através de estudos de libertação na presença de PBS, SBF e FBS (meios que mimetizam as condições fisiológicas).

A maior parte da literatura existente sobre encapsulação de quinolonas foca a encapsulação da ciprofloxacina (fluoroquinolona de 2ª geração) e frequentemente para os lípidos DSPC e DPPC ou lípidos de origem natural como a fosfatidilcolina do ovo/soja. Este estudo utilizou lípidos de cadeias hidrocarbonadas diferentes e fluoroquinolonas distintas mas estruturalmente semelhantes contribuindo, deste modo, para uma maior caracterização da influência dos lípidos no desenvolvimento de sistemas de transporte/libertação de fluoroquinolonas.

Esta dissertação está estruturada fundamentalmente em três capítulos.

No primeiro capítulo, **introdução teórica**, apresenta-se um breve resumo do estado da arte, focando a importância dos lipossomas como sistemas de transporte/libertação controlada, das quinolonas e seus derivados (complexos ternários de cobre) como estratégias de combate à resistência bacteriana. Neste capítulo encontram-se, ainda, definidos os conceitos básicos fundamentais à compreensão e execução do trabalho experimental.

O segundo capítulo, a **metodologia experimental**, onde se descrevem as diferentes metodologias utilizadas encontra-se dividido em quatro subcapítulos:

- preparação e caracterização dos lipossomas utilizados;
 - métodos de encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas e todos os procedimentos experimentais associados (determinação de percentagens de encapsulação, estudos de estabilidade e estudos de libertação em condições fisiológicas);
 - síntese e caracterização espectroscópica de complexos ternários de cobre com fluoroquinolonas e 1,10-fenantrolina e,
 - métodos de encapsulação de complexos ternários de cobre em lipossomas, assim como estudos da sua estabilidade e libertação em condições fisiológicas.
- No terceiro capítulo, **resultados e discussão**, apresentam-se:

- (1) os resultados obtidos relativamente às percentagens de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas em estudo, em lipossomas de diferente composição lipídica e os resultados obtidos no estudo da estabilidade das mesmas, após armazenamento, para o sistema SPPC:Col. Por fim apresenta-se o estudo da sua libertação em condições fisiológicas (PBS e SBF);
- (2) os resultados da síntese e caracterização de oito complexos ternários de cobre, 1,10-fenantrolina e fluoroquinolonas e,
- (3) os resultados do estudo da encapsulação do complexo ternário de cobre e levofloxacina, em lipossomas através dos métodos já utilizados para as fluoroquinolonas e através da formação do complexo no interior dos lipossomas assim como os resultados dos estudos da sua retenção/estabilidade e da sua libertação em condições fisiológicas (PBS, SBF, FBS).

Capítulo 2: Metodología Experimental

Metodologia Experimental

O presente capítulo terá como objetivo a descrição, de um modo geral, de todas as condições e execuções experimentais, instrumentação e reagentes utilizados.

1. Reagentes e soluções

Todas as fluoroquinolonas foram adquiridas à Sigma, com exceção da moxifloxacina que foi uma oferta da Bayer, armazenadas à temperatura ambiente (ciprofloxacina, levofloxacina, sparfloxacina), a 4°C (norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina) ou a -18°C (lomefloxacina, prulifloxacina) ao abrigo da luz e utilizadas sem purificação adicional.

Os lípidos, 1-Esteroíl-2-palmitoíl-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (SPPC), 1-Palmitoíl-2-miristoíl-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (PMPC) e Esfingomiéline do ovo (SPM) foram adquiridos à Avanti Polar Lipids, armazenados a -18°C e utilizados sem qualquer purificação adicional.

O colesterol foi adquirido à Sigma, armazenado a -18°C e utilizado sem qualquer purificação adicional.

O sulfato de amónio, hidróxido de sódio e metanol de qualidade *p.a.* foram adquiridos à Merck e o etanol (*p.a.*) à Panreac.

A sacarose, cloreto de sódio e 1,10-fenantrolina foram adquiridos à Sigma e armazenados à temperatura ambiente.

Os sais de metal utilizados para a síntese e formação de complexos ternários em lipossomas (nitrato de cobre trihidratado e acetato de cobre monohidratado) foram adquiridos à Fluka e Sigma, respetivamente.

As soluções padrão de dihidrogenofosfato de potássio de qualidade *p.a.*, utilizadas no doseamento dos lípidos, foram adquiridas à Merck e preparadas por diluição de uma solução mais concentrada. O reagente de Fiske & Subbarow (Sigma) e o molibdato de amónio (Fluka), igualmente usados no doseamento dos lípidos, foram preparados no momento da sua utilização.

O alaranjado de acridina utilizado na determinação qualitativa de gradientes de pH foi adquirido à Sigma e as suas soluções preparadas por pesagem e armazenadas ao abrigo da luz.

A solução tampão HEPES foi preparada por pesagem do ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N-etanosulfónico (Sigma), na concentração 10 mmol.dm⁻³ e força iónica ajustada a 0,1 mol.dm⁻³ com NaCl.

A solução Tritriplex[®] III utilizada para a preparação do tampão SHE foi adquirida à Merck.

A solução tampão SHE (Sacarose 300 mmol.dm⁻³, Hepes 20 mmol.dm⁻³ e EDTA 15 mmol.dm⁻³) foi preparada por pesagem (sacarose e hepes) e adição de 15 mL de Tritriplex[®] III.

O Sephadex[®] G-50 medium, DNA grade, utilizado na preparação das mini colunas de spin foi adquirido à Sigma.

O detergente n-octilpolioxiétileno (oPOE) utilizado na quantificação do complexo de metal formado em lipossomas foi adquirido à Bachem AG.

Os meios preparados para os estudos de libertação controlada, PBS (10 mmol.dm⁻³ $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$, 0,1 mol.dm⁻³ NaCl) e SBF (142 mmol.dm⁻³ Na^+ , 5,0 mmol.dm⁻³ K^+ , 1,0 mmol.dm⁻³ Mg^{2+} , 1,6 mmol.dm⁻³ Ca^{2+} , 103,0 mmol.dm⁻³ Cl^- , 27,0 mmol.dm⁻³ HCO_3^- , 1,0 mmol.dm⁻³ HPO_4^{2-} e 0,5 mmol.dm⁻³ SO_4^{2-}) foram preparados a partir dos sais dos seus reagentes, de qualidade *p.a.*, em água e de acordo com a bibliografia [81, 82]. O FBS (low quality, lote 41Q3993x) foi adquirido à Gibco[®] e utilizado sem purificação adicional.

Todas as soluções foram preparadas em água milipore e guardadas à temperatura ambiente, com a exceção das soluções de fármaco e 1,10-fenantrolina armazenadas a 4°C e ao abrigo da luz.

As suspensões lipossómicas preparadas foram mantidas a 4°C e sempre ao abrigo da luz.

2. Instrumentação

Para as determinações de ultravioleta-visível de fluoroquinolonas e seus complexos de cobre, foram utilizados espectrofotómetros Varian Cary Eclipse 50 e Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR equipados com acessórios de controlo de temperatura rigoroso (Peltier).

Os espectros de Infravermelho foram obtidos através de um Espectrómetro Perkin-Elmer BX equipado com acessório de ATR (Attenuated Total Reflectance).

Utilizou-se um extrusor Lipex Biomembranes de capacidade 10 mL e filtros de policarbonato da Nucleopore-Corning para extrusão das suspensões lipossómicas multilamelares (MLV's).

Os estudos de espectroscopia de correlação fotónica efetuados para a determinação do tamanho dos lipossomas foram realizados num Zeta Sizer Nano ZS da Malvern Instruments.

Todos os estudos envolvendo centrifugações foram efetuados numa centrífuga Sigma 3-30K.

Todas as pesagens foram efetuadas numa balança analítica Mettler AT201 ($\pm 2 \times 10^5$ g).

3. Preparação de lipossomas

A preparação de lipossomas baseou-se no método de preparação designado por Método de Hidratação do Filme Lipídico, descrito por Bangham [20, 83].

Dissolveram-se os lípidos (SPPC, PMPC e SPM) e o colesterol em clorofórmio, evaporou-se o solvente orgânico até à secura sob uma corrente de Árgon e colocou-se o filme lipídico sob uma linha de vácuo (mínimo 3 h) para eliminar qualquer vestígio de solvente orgânico.

Após 3 h, hidratou-se o filme preparado com uma solução 250 mmol.dm^{-3} em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5,5 (ou de solução de fármaco na concentração desejada) e agitou-se a suspensão em vórtice, alternando com imersão num banho a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase do lípido em questão (T_m) obtendo vesículas multilamelares (MLV's).

Realizaram-se, de seguida, 5 ciclos de congelação/descongelação (azoto líquido a -196°C /banho termostático a $55^\circ\text{C}/65^\circ\text{C}$) e deixou-se a suspensão final estabilizar, durante 30 min, num banho termostático a $55^\circ\text{C}/65^\circ\text{C}$ (para os lípidos SPM e PMPC/SPPC, respetivamente). Para SPM a temperatura utilizada foi menor devido à sua temperatura de transição de fase ser muito próxima de 0°C . Após o período de estabilização (ao abrigo da luz) fez-se passar a suspensão lipídica de MLV's pelo extrusor. A extrusão foi realizada a uma temperatura superior à temperatura de transição de fase dos lípidos e a uma pressão de 250 bar, em atmosfera inerte (corrente de árgon), fazendo passar a suspensão lipossómica por filtros de polycarbonato de diâmetro de 200 nm (5 ciclos) e 100 nm (10 ciclos) [15].

No final, a suspensão lipídica apresentava-se com um aspeto translúcido e constituída por vesículas unilamelares (LUV's) com aproximadamente 100-120 nm de diâmetro, verificadas por espectroscopia de correlação fotónica.

3.1. Análise do tamanho dos lipossomas (Espectroscopia de Correlação fotónica)

Todas as determinações foram realizadas em células de quatro faces óticas descartáveis.

3.2. Determinação da concentração de lípido (doseamento de lípido)

Para o doseamento dos lípidos, recorreu-se a um método de determinação da quantidade de fosfato em cada amostra, designado Método de Bartlett modificado, que permite, indiretamente, determinar a concentração de fosfolípido nas mesmas [84].

Este doseamento consistiu na adição de 0,4 mL de ácido perclórico 70% a 0,5 mL de cada amostra e solução padrão de fosfato de potássio e posterior incubação em banho de areia, a uma temperatura controlada entre 180 e 200°C durante 1 h. Após o arrefecimento das amostras e padrões, à temperatura ambiente, adicionaram-se 4,6 mL de molibdato de amónio e 0,2 mL de reagente de Fiske & Subbarow a cada amostra/padrão e procedeu-se à sua incubação num banho de água a 100°C durante 7 min. Após novo arrefecimento à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura da absorvância das amostras a 830 nm.

4. Encapsulação de fluoroquinolonas em diferentes sistemas lipídicos

4.1. Encapsulação por hidratação do filme lipídico

O método mais simples de encapsulação de substâncias em lipossomas é o passivo e, neste trabalho, consistiu na hidratação do filme lipídico com uma solução de fármaco ($\sim 4 \text{ mmol.dm}^{-3}$) seguida de 5 ciclos de congelação/descongelação e posterior extrusão. Procedeu-se, de seguida, à sua passagem através de uma coluna de gel Sephadex (em tampão Hepes pH 7,4) para se proceder à remoção do fármaco não encapsulado. Foram recolhidas alíquotas de 0,5 mL para a quantificação do fármaco por análise espectrofotométrica de UV-Vis.

A rutura dos lipossomas, para determinação do fármaco encapsulado foi feita por adição de etanol (*p.a.*).

4.2. Encapsulação por gradiente transmembranar de sulfato de amónio

4.2.1. Quantificação do gradiente de pH transmembranar

Para a quantificação do gradiente de pH estabelecido prepararam-se mini colunas de *spin* de Sephadex® G-50 equilibradas em NaCl 150 mmol.dm^{-3} e sacarose 10%. Fez-se passar pelas colunas lipossomas unilamelares de SPPC:Col em

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 250 mmol.dm^{-3} e recolheu-se o volume eluído para o procedimento experimental.

A emissão de fluorescência do alaranjado de acridina (AA) (525 nm) foi medida para o comprimento de onda de excitação de 490 nm, numa cuvette de fluorescência (sob agitação constante) e registada durante 30s. Após este período de tempo, os lipossomas foram adicionados e a intensidade de fluorescência monitorizada até atingir um valor constante. A intensidade de fluorescência do AA foi calculada como a média dos valores obtidos.

De modo a minimizar a dispersão de luz provocada pela adição dos lipossomas e pelo efeito de filtro interno provocado pela fluorescência do AA, adotaram-se as seguintes condições experimentais: concentração de lípido $\leq 0,3 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e absorvância da sonda ao comprimento de onda de excitação $< 0,1$.

4.2.2. Formação do gradiente por mini colunas de spin

Para estabelecer o gradiente de pH as vesículas lipossómicas foram eluídas através de mini colunas de *spin* equilibradas com uma solução salina (NaCl 150 mmol.dm^{-3}) com a exceção da sparfloxacin cujo gradiente foi estabelecido através de colunas equilibradas com sacarose 10% [8, 85-87].

4.2.3. Encapsulação de fármacos

A solução de fármaco ($\sim 4 \text{ mmol.dm}^{-3}$) foi adicionada aos lipossomas ($\sim 20 \text{ mmol.dm}^{-3}$) numa razão lípido:fármaco de (1:0,3 mol/mol), o restante volume preenchido com NaCl 150 mmol.dm^{-3} ou sacarose 10% e a mistura agitada em vórtice. Retirou-se uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ da mistura inicial para posterior determinação da concentração inicial de fármaco na mistura. A solução foi incubada durante 120 min, a uma temperatura acima da temperatura de transição de fase dos lípidos utilizados (65°C para SPPC/PMPC e 55°C para SPM), durante os quais foram recolhidas alíquotas de $100 \mu\text{L}$ (5, 10, 15, 30, 60 e 120 min) e colocadas em mini colunas de *spin* equilibradas com Sacarose 10% (2000 rpm, 3 min) para remoção do material não encapsulado [8].

As frações recolhidas após centrifugação foram analisadas quanto à quantidade de fármaco encapsulada [8].

4.3. Determinação da quantidade de fármaco encapsulado

A quantidade de fármaco encapsulado presente nas alíquotas após centrifugação das mini colunas de *spin* foi determinada, por UV-Vis, através de um processo designado por Extração de Bligh-Dyer, que consistiu na remoção do fármaco do lípido onde se encontrava encapsulado.

Os padrões (preparados a partir de uma solução concentrada de fármaco $\sim 4 \text{ mmol.dm}^{-3}$) e as alíquotas recolhidas foram ajustados a 1 mL com NaOH (200 mmol.dm^{-3}). Foi também preparado um branco.

Aos padrões, branco e alíquotas foram adicionados 2,1 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio, agitando brevemente em vórtice. Após agitação, adicionou-se 1 mL NaOH (200 mmol.dm^{-3}) e 1 mL de clorofórmio e agitou-se, novamente, em vórtice. Procedeu-se, então, a uma centrifugação (6 min, 2000 rpm) para separação das fases formadas. Após centrifugação foi possível verificar a presença de duas fases: uma fase aquosa (4,1 mL) correspondente ao fármaco encapsulado e uma fase orgânica (2,0 mL) correspondente ao lípido dissolvido. No final do processo de separação determinou-se a concentração de fármaco encapsulado por espectrofotometria de UV/Visível [8].

4.4. Preparação e otimização de mini colunas de *spin*

Para a preparação de mini colunas de *spin*, hidratou-se o Sephadex[®] G-50 (enchimento da coluna) na solução desejada (NaCl 150 mmol.dm^{-3} ou sacarose 10%) numa razão volume de solução/Sephadex igual a 24. A mistura foi colocada sob agitação, no mínimo 5 h, para promover uma hidratação completa do gel e posteriormente foi armazenado a 4°C. O gel hidratado ocupou cerca de metade do volume aquoso [8].

O empacotamento das colunas consistiu na colocação de uma porção de algodão na base das colunas, inserção do Sephadex em seringas descartáveis de 1 mL e centrifugação das mesmas a 2000 rpm por breves instantes. O processo repetiu-se até obtenção de colunas preenchidas com cerca de 0,9 a 1,0 mL de Sephadex [15].

Várias colunas de Sephadex[®] G-50 foram preparadas nos eluentes desejados (NaCl 150 mmol.dm^{-3} ou sacarose 10%) por inserção do gel, até preenchimento total na seringa descartável (coluna), centrifugação das colunas (3 min, 2000 rpm) e registo do volume ocupado pelo gel. Para verificar se o empacotamento do gel na seringa foi bem sucedido, inseriram-se 100 μL de lipossomas (nas mini colunas) e mediu-se o volume eluído após centrifugação, nas condições anteriormente descritas.

Posteriormente, compararam-se todos os fatores passíveis de influenciar os estudos de encapsulação como a massa do algodão, tamanho do gel e volume eluído para determinação do volume médio e respetivo erro associado. (**Anexo 1**)

4.4.1. Reutilização de Sephadex

Após os estudos de encapsulação colocou-se o gel utilizado numa solução de etanol a 70% para recuperação do Sephadex. Decantou-se a suspensão, lavou-se novamente o Sephadex com etanol (70%), filtrou-se a pressão reduzida num funil de placa porosa e lavou-se o material filtrado com água desionizada (3 vezes). Após decantar a água desionizada, reidratou-se o gel com o eluente desejado para hidratação (pelo menos duas vezes).

Para verificar a ausência de qualquer vestígio de fármaco no Sephadex recuperado, utilizou-se a espectrofotometria de UV-Vis na gama de comprimentos de onda de 230-400 nm.

4.5. Estabilidade dos sistemas lipídicos preparados

Ao fim de 120 min de incubação foram retiradas duas alíquotas: uma para a determinação da quantidade de fluoroquinolona encapsulada e outra para armazenar a 4°C. Os estudos de estabilidade foram efetuados por eluição das alíquotas armazenadas através de uma mini coluna de *spin* de Sephadex® G-50 equilibrada com sacarose (10%). A quantidade de fármaco que permanece encapsulado, após 4 semanas de armazenamento foi determinada do mesmo modo que o fármaco aquando dos estudos de encapsulação descritos em **4.3**.

4.6. Estudos de libertação de fluoroquinolonas em condições fisiológicas

Para os estudos de libertação controlada, as alíquotas recolhidas após os 120 min de incubação foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, diluídas numa proporção 1:1 (v/v) [73, 86, 88] em PBS pH 7,4 e SBF pH 7,4 e colocadas num banho termostaticado (37°C) por 60 min. Foram recolhidas alíquotas de 100 µL em determinados períodos de tempo (0, 15, 30, 45, 60 min) e colocadas em mini colunas de *spin* equilibradas em Sacarose 10% (2000 rpm, 3 min). A quantidade de fármaco que permanece encapsulado foi determinada de acordo com o descrito em **4.3**.

5. Síntese de complexos ternários de Cobre (II), fluoroquinolonas e 1,10-fenantrolina

A síntese dos complexos de metal de fluoroquinolonas foi realizada com base num procedimento experimental publicado [89] tendo sido realizadas algumas alterações [90].

A uma solução 0,5 mmol de fluoroquinolona e NaOH 1 mol.dm⁻³ (1,0 mL para a mfx, pfx, lmx, cpx e prlx e 0,5 mL para as restantes fluoroquinolonas) foram adicionados 0,5 mmol de 1,10-fenantrolina. A esta mistura (sob agitação constante) adicionaram-se 0,5 mmol de Cu(NO₃)₂ previamente dissolvidos em água. O volume final foi de 25 mL e o solvente utilizado água:etanol (1:1). As diferentes misturas foram, posteriormente, concentradas num evaporador rotativo até 75 mbar ou até se verificarem os primeiros sinais de precipitação e colocadas a repousar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após algumas horas verificou-se a formação de precipitado ou de cristais adequados para determinação da sua estrutura por difração de Raio-X [90].

5.1. Caracterização por Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

Prepararam-se soluções aquosas das diferentes fluoroquinolonas, 1,10-fenantrolina e respetivos complexos ~10⁻³ mol.dm⁻³, por pesagem rigorosa, para observação de bandas de transição d-d. Por diluição das mesmas prepararam-se soluções ~10⁻⁵ mol.dm⁻³ para os restantes estudos espectroscópicos (FQ e phen).

Realizaram-se, igualmente, estudos da estabilidade dos diferentes complexos sintetizados, em solução aquosa, numa gama de temperaturas entre 25 e 65°C.

5.2. Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos por diluição dos complexos sintetizados em KBr (seco em estufa) até obtenção de uma mistura homogénea. Seguidamente, a mistura foi colocada numa prensa para obtenção de uma pastilha adequada para leitura do espectro. Nos estudos com acessório de ATR, os espectros foram obtidos por leitura direta do composto colocado no suporte.

Todos os espectros foram obtidos numa gama entre 400 e 4000 cm⁻¹, com velocidade de varrimento de 1 cm⁻¹, medição de %T e com correção manual da linha de base para 100%.

5.3. Caracterização por Difração de Raio X

Materiais cristalinos dos compostos Culvxphen, Cunrxphen, Cucpxphen, Cuofxphen, Cupfxphen, Culmxphen estudados foram recolhidos dos recipientes de cristalização e imediatamente imersos num óleo elevada viscosidade, minimizando-se assim a evaporação do solvente de cristalização e conseqüente degradação dos cristais. Um cristal de cada um dos compostos foi montado em *CryoLoops* ou fibra de vidro com auxílio de um estereomicroscópio [91].

Todos os dados de difração foram adquiridos a baixa temperatura num difractómetro da marca Brüker, modelo X8 Kappa APEX II, com um detetor de área CCD e radiação Mo K α monocromada pelo uso de um filtro de grafite ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). As aquisições foram controladas pelo *software* APEX-2 [92] enquanto a temperatura foi conseguida com um crióstato da Oxford Cryosystems, modelo Series 700, controlado remotamente através do programa *Cryopad* [93].

As imagens adquiridas foram processadas usando o *software* SAINT+ [94] e a correção dos efeitos de absorção foi efetuada usando o método semi-empírico de multi-aquisição implementado no SADABS [95]. As estruturas foram resolvidas através de algoritmos baseados em métodos diretos presentes no SHELXS-97 [96, 97] permitindo a localização imediata de grande parte dos átomos mais pesados. Todos os restantes átomos (com exceção dos de hidrogénio) foram localizados a partir dos mapas de diferenças de Fourier calculados através de sucessivos refinamentos de mínimos quadrados com matriz completa usando o SHELXS-97 [96, 98].

De um modo geral todos os átomos diferentes do hidrogénio foram refinados assumindo parâmetros de deslocamento anisotrópico, para todas as estruturas cristalinas apresentadas nesta dissertação.

Os átomos de hidrogénio ligados a carbono foram colocados em posições geométricas idealizadas de acordo com o ambiente químico local, usando as instruções HFIX (do SHELXL) adequadas a cada caso. Todos estes átomos foram incluídos nos modelos estruturais finais, com geometrias rígidas baseadas nos movimentos relativos dos átomos de carbono, e assumindo movimentos isotrópicos de deslocamento térmico (U_{iso}) fixados a 1,2 (aromáticos e $-\text{CH}_2-$) ou 1,5 (grupos metilo) vezes U_{eq} dos átomos aos quais estão ligados. Por sua vez, os átomos de hidrogénio associados aos átomos de azoto ou oxigénio tiveram um tratamento diferenciado de acordo com a estrutura cristalina em questão. Em algumas estruturas foram localizados diretamente nos mapas de diferenças de Fourier e incluídos nos modelos

estruturais com as distâncias N–H e/ou O–H limitadas, enquanto que noutros casos foram posicionados nos locais geométricos ideais.

A tabela 2 sistematiza os dados referentes à aquisição de dados cristalográficos, solução e refinamento das estruturas.

Tabela 2 – Dados cristalográficos, solução e refinamento das estruturas Cunrxphen, Cucpxphen, Culmxphen, Cuofxphen, Culvxphen e Cupfxphen.

	Culvxphen	Cucpxphen	Culmxphen	Cupfxphen	Cunrxphen	Cuofxphen
Formula	$C_{30}H_{33}CuFN_6O_{10}$	$C_{29}H_{33}CuFN_6O_{10}$	$C_{29}H_{36}CuF_2N_6O_{11}$	$C_{29}H_{43}CuFN_6O_{14}$	$C_{56}H_{66}Cu2F2N_{12}O_{20}$	$C_{30}H_{33}CuFN_6O_{10}$
Peso Molecular	720,16	708,15	746,18	782,23	1392,3	720,16
Descrição do Cristal	Prisma verde		Prisma verde	Prisma verde		Prisma verde
Tamanho do Cristal /mm	0,33 × 0,11 × 0,08	0,18 × 0,12 × 0,09	0,39 × 0,19 × 0,15	0,37 × 0,22 × 0,15	0,26 × 0,08 × 0,07	0,30 × 0,20 × 0,10
Sistema Cristalino	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico	Triclínico	Triclínico
Grupo Espacial	<i>P</i> 1	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	<i>P</i> -1	<i>P</i> -1	<i>P</i> -1
<i>a</i> /Å	10,0702(14)	8,7693(2)	11,5181(7)	10,928(5)	10,5243(2)	10,29
<i>b</i> /Å	11,0953(16)	18,2141(5)	25,3285(13)	12,940(7)	11,5733(3)	12,74
<i>c</i> /Å	15,0436(18)	18,6695(4)	11,7699(7)	14,040(7)	13,0166(3)	12,88
α /°	81,163(5)°	90		63,83(3)	77,7990(10)	73,24
β /°	84,419(5)°	95,4070(10)	112,426	74,51(3)	84,7350(10)	85,92
γ /°	68,664(5)	90		77,24(3)	71,8820(10)	71,07
Volume /Å ³	1545,5(4)	2970,35(12)	3174,0(3)	1704,9(8)	1472,21(6)	1528
<i>Z</i>	2	4	4	2	1	
$\rho_{calculado}$ /g cm ⁻³	1,548	1,548	1,561	1,524	1,570	
<i>F</i> (000)	746	1468		818	722	
μ /mm ⁻¹	0,782	0,812	0,771	0,723	0,817	
θ gama /°	3,58 – 26,37	3,78 – 27,48	26,37	3,68 – 25,03	3,78 – 26,73	
Índices	-12 ≤ <i>h</i> ≤ 12	-11 ≤ <i>h</i> ≤ 11		-13 ≤ <i>h</i> ≤ 12	-13 ≤ <i>h</i> ≤ 13	
	-13 ≤ <i>k</i> ≤ 13	-19 ≤ <i>k</i> ≤ 23		-15 ≤ <i>k</i> ≤ 15	-14 ≤ <i>k</i> ≤ 14	
	-18 ≤ <i>l</i> ≤ 18	-24 ≤ <i>l</i> ≤ 21		-16 ≤ <i>l</i> ≤ 16	-16 ≤ <i>l</i> ≤ 16	
Reflecções recolhidas	25461	30168	35588	23917	29649	
Reflecções independentes	11067 (<i>R</i> _{int} = 0,0286)	6801 (<i>R</i> _{int} = 0,0401)	6453 (<i>R</i> _{int} = 0,0407)	5942 (<i>R</i> _{int} = 0,0426)	6179 (<i>R</i> _{int} = 0,0309)	
Índices <i>R</i> finais [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)] ^{a, b}	<i>R</i> ₁ = 0,0514	<i>R</i> ₁ = 0,0373		<i>R</i> ₁ = 0,0487	<i>R</i> ₁ = 0,0339	
	w <i>R</i> ₂ = 0,1350	w <i>R</i> ₂ = 0,0927		w <i>R</i> ₂ = 0,1449	w <i>R</i> ₂ = 0,0864	
Índices <i>R</i> finais (para todos os dados) ^{a, b}	<i>R</i> ₁ = 0,00597	<i>R</i> ₁ = 0,0514	<i>R</i> ₁ = 0,0892	<i>R</i> ₁ = 0,0588	<i>R</i> ₁ = 0,0416	
	w <i>R</i> ₂ = 0,1419	w <i>R</i> ₂ = 0,0999	w <i>R</i> ₂ = 0,2290	w <i>R</i> ₂ = 0,1536	w <i>R</i> ₂ = 0,0908	
Maior diferença de pico e vale /e Å ³	1,50 e -0,767	0,456 e -0,422		0,983 e -0,756	0,796 e -0,345	

6. Encapsulação de Complexos ternários de fluoroquinolonas

6.1. Hidratação do filme lipídico

Prepararam-se lipossomas de SPPC:Colesterol (5 mmol.dm⁻³), de acordo com o procedimento estabelecido em 3. A hidratação do filme lipídico foi realizada com uma solução do complexo de metal Culvxphen (1,5 mmol.dm⁻³).

Após a extrusão, retiraram-se alíquotas de 100 µL de lipossomas (com complexo) e fizeram-se passar as mesmas por mini colunas de *spin* equilibradas com NaCl 150 mmol.dm⁻³. A determinação da quantidade encapsulada foi feita de acordo com o descrito em 4.3.

6.2. Gradiente de transmembranar de sulfato de amónio

Prepararam-se lipossomas de SPPC:Colesterol (1:1), ~20 mmol.dm⁻³, por hidratação em (NH₄)₂SO₄ 250 mmol.dm⁻³, como descrito no ponto 3.

Após extrusão procedeu-se à criação do gradiente transmembranar por passagem das vesículas através de mini colunas de *spin* de Sephadex[®] G-50 equilibradas em NaCl 150 mmol.dm⁻³. A encapsulação do complexo ternário Culvxphen realizou-se de acordo com o descrito em 4.2.3 e a determinação da quantidade de complexo encapsulada de acordo com o descrito 4.3.

6.3. Formação de complexos ternários de cobre, levofloxacin e 1,10-fenantrolina em lipossomas

Para os estudos de formação de complexos ternários de lvx, phen e Cu(II), em lipossomas, foram realizadas diferentes abordagens no que diz respeito a concentrações e gradientes estabelecidos. O sistema lipídico selecionado foi o SPPC:Colesterol (1:1) ~20 mmol.dm⁻³.

6.3.1. Gradiente transmembranar de acetato/NaCl

Prepararam-se lipossomas com uma solução de acetato de cobre (em diferentes concentrações) de acordo com o procedimento descrito no ponto 3. A suspensão lipossómica inicial foi, posteriormente, eluída através de mini colunas de *spin* de Sephadex[®] equilibradas com NaCl 150 mmol.dm⁻³ não só para a criação de

um gradiente transmembranar assim como para a remoção de cobre não encapsulado.

Os estudos de encapsulação/complexação em lipossomas foram realizados como descrito anteriormente (4.2.3) por adição simultânea ou individual dos dois ligandos (lvx e phen), variando a razão lípido:lvx ou lípido:phen, e remoção do material não encapsulado por centrifugação das alíquotas em mini colunas de *spin* equilibradas com NaCl 150 mmol.dm⁻³.

A quantidade de 1,10-fenantrolina ou levofloxacina complexada ao cobre presente dentro dos lipossomas foi determinada por rutura dos mesmos em etanol (*p.a.*) e análise espectrofotométrica de UV-Vis.

Em todos os ensaios, à solução de levofloxacina mãe foi adicionado NaOH (1 mol.dm⁻³) para que se desse a sua desprotonação total (pH=14) e pudesse haver coordenação do ião Cu²⁺ à quinolona.

6.3.2. Gradiente transmembranar de acetato/Hepes

Prepararam-se lipossomas com uma solução de acetato de cobre (~200 mmol.dm⁻³) [59, 99, 100] de acordo com o procedimento descrito anteriormente (ponto 3). O gradiente transmembranar foi criado por passagem das alíquotas da suspensão lipossômica mãe por mini colunas de *spin* de Sephadex[®] equilibradas com tampão Hepes a diferentes pH's (6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 9,0) para poder identificar a que pH existirá maior percentagem de encapsulação de cada um dos ligandos (lvx e phen).

O processo de encapsulação, por adição simultânea ou individual dos dois ligandos, foi realizado como descrito em 4.2.3 alterando apenas o meio utilizado para a encapsulação utilizando uma solução tampão Hepes, nos pH's referidos, em alternativa à solução de NaCl utilizada anteriormente. Aos 0 e 20 min foram recolhidas alíquotas e colocadas em mini colunas de *spin*, equilibradas em tampão Hepes para separação do material encapsulado do material livre em solução.

A determinação da quantidade de lvx e phen dentro dos lipossomas consistiu na rutura dos lipossomas em etanol (*p.a.*) e análise espectrofotométrica de UV-Vis.

Posteriormente procedeu-se à encapsulação de levofloxacina e 1,10-fenantrolina utilizando mini colunas de *spin* equilibradas em Hepes pH 7,0 para criação do gradiente transmembranar e separação dos lipossomas do material não encapsulado.

6.3.3. Gradientes de iões de metais de transição

Prepararam-se lipossomas com soluções de cobre:levofloxacinina 1:1 (sais de cobre: acetato e nitrato) de concentração $\sim 50 \text{ mmol.dm}^{-3}$ de acordo com o procedimento descrito para a formação de lipossomas (ponto 3). A criação do gradiente transmembranar foi realizada através de mini colunas de *spin* equilibradas em tampão SHE pH 7,5 (3 passagens por colunas independentes). Após a terceira mini coluna de tampão SHE, em alguns dos estudos, a alíquota recolhida foi ainda centrifugada numa coluna equilibrada com tampão Hepes pH 7,0 [100].

Para os estudos de encapsulação foram, então, testadas as seguintes hipóteses:

- 1) Encapsulação de 1,10-fenantrolina nas razões lípido:phen 1:0,3 e 1:0,2 (mol/mol), com incubação a 65°C por 30 min antes do processo de encapsulação, da alíquota sujeita ao gradiente;
- 2) Encapsulação da 1,10-fenantrolina nas razões lípido:phen 1:0,3 e 1:0,2 (mol/mol) sem incubação a 65°C anterior ao processo de encapsulação.

Durante o processo de encapsulação (realizado de acordo com o procedimento descrito em 4.2.3.) foram retiradas alíquotas aos 0, 10 e 20 min e a quantidade de fármaco encapsulado determinada por rutura dos lipossomas recolhidos em etanol (*p.a.*) [101] ou em oPOE 1%, [59, 100], neste último caso, seguida de aquecimento de todas as alíquotas até ao ponto “nuvem” do detergente, após o qual se deixou arrefecer à temperatura ambiente e se procedeu à análise espectrofotométrica de UV-Vis para determinação da sua absorvância [59, 100].

6.4. Determinação da quantidade de cobre encapsulada nos lipossomas

A concentração de cobre foi determinada por Espectrometria de Absorção Atómica (EAA). De acordo com o limite de deteção (100 $\mu\text{g/L}$ ou 10 $\mu\text{g/L}$) as amostras lipossómicas recolhidas após centrifugação nas mini colunas de *spin*, foram diluídas em ácido nítrico até uma concentração em ácido de 0,1% [59]. Todas as amostras foram posteriormente enviadas para análise no Laboratório de Especificação Química, na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

6.5. Estabilidade do sistema lipídico utilizado na formação de complexos ternários em lipossomas

Tal como referido em 4.4, após a encapsulação ($t=0$ min) retiraram-se duas alíquotas, uma para a determinação da quantidade de complexo formado nos lipossomas e outra para armazenamento a 4°C. Os estudos de estabilidade foram efetuados por eluição das alíquotas armazenadas através de uma mini coluna de *spin* de Sephadex® G-50 equilibrada com Hepes pH 7,0. A quantidade de complexo ternário que permanece encapsulado, após 4 semanas de armazenamento foi determinada por rutura dos lipossomas em oPOE 1%, de acordo com o procedimento descrito em 6.3.3.

6.6. Estudos de libertação de Culvixphen em condições fisiológicas

Os estudos de libertação controlada consistiram na transferência das alíquotas recolhidas, após a formação do complexo no interior dos lipossomas, para microtubos de 1,5 mL seguido da adição de igual volume dos diferentes meios utilizados para a libertação PBS pH 7,4, SBF pH 7,4 e FBS e posterior incubação a 37°C num banho termostaticado [73, 86, 88]. Durante um período de 24 h foram recolhidas alíquotas de 100 µL (0, 15, 30, 45, 60, 120, 150 e 1140 min) e colocadas em mini colunas de *spin* equilibradas em Hepes pH 7,0 (2000 rpm, 3 min). A quantidade de complexo ternário que se mantém encapsulada dentro dos lipossomas foi determinada por UV-Vis após rutura dos mesmos em oPOE 1% [8].

Capítulo 3. Resultados e discussão

Resultados e discussão

Um dos assuntos mais recorrentes na medicina atual tem sido a crescente ameaça da resistência bacteriana, entre os agentes patogénicos, o que tem vindo a limitar a aplicação terapêutica dos diferentes antibióticos existentes. Devido a um declínio significativo no desenvolvimento de novos antibióticos, têm vindo a ser desenvolvidas novas formulações de antibióticos já existentes de modo a desenvolver novas formas de transporte. Assim sendo, nos últimos anos, vários estudos têm vindo a focar-se em melhorar a ação de alguns dos agentes antibacterianos existentes [1, 11].

No decorrer deste capítulo descrevem-se os resultados obtidos na encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas de diferente composição, através da utilização de duas metodologias distintas: hidratação do filme lipídico e gradientes transmembranares de sulfato de amónio. Seguidamente são apresentados os resultados obtidos no estudo da estabilidade e libertação dos antibióticos nos sistemas lipídicos mais promissores.

Como estratégia de conceção de “novos antibióticos” descreve-se a síntese e caracterização de vários complexos ternários de cobre:fluoroquinolona:1,10-fenantrolina. Posteriormente descreve-se os estudos efetuados na tentativa de encapsulação de um dos complexos sintetizados (Culv_xphen) em lipossomas de SPPC:Coolesterol através de diferentes metodologias de encapsulação: hidratação do filme lipídico, gradientes transmembranares de sulfato de amónio e, por fim, através da formação do complexo ternário em lipossomas (gradiente transmembranar de acetato e gradiente de ião de metal). Por fim, de forma a caracterizar o sistema lipídico selecionado quanto à sua estabilidade após armazenamento e em condições fisiológicas, realizaram-se estudos de retenção e libertação do complexo encapsulado/formado nas mesmas condições utilizadas nos estudos envolvendo, apenas, as fluoroquinolonas.

1. Estudos de encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas

A determinação da lei de Beer Lambert permite estabelecer uma relação linear entre as propriedades óticas de cada fármaco (Abs) e a sua concentração, de acordo com a equação:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

onde, A é a absorvância de uma solução de fármaco, ϵ a sua absorvidade molar ($\text{cm} \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)⁻¹ e c a sua concentração ($\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

As leis de Beer-Lambert estabelecidas encontram-se representadas na tabela 3, e foram utilizadas para determinar as concentrações das várias fluoroquinolonas nos estudos de encapsulação.

Tabela 3 – Equações da reta, correspondentes à lei de Beer-Lambert, e correspondentes coeficientes de correlação linear, determinados para as diferentes fluoroquinolonas, em NaOH 200 $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ em metanol (extração de Bligh-Dyer, $\text{pH}_{\text{final}} = 14$).

Equação da reta	
Ciprofloxacina	$y = 0,03034x; R^2 = 0,9998$
Norfloxacina	$y = 0,03539x; R^2 = 0,9998$
Levofloxacina	$y = 0,02942x; R^2 = 0,9998$
Pefloxacina	$y = 0,03871x; R^2 = 0,9998$
Sparfloxacina	$y = 0,02679x; R^2 = 0,9998$

O intervalo de concentrações dos fármacos determinado para os estudos de encapsulação, é semelhante para todas as fluoroquinolonas e encontra-se entre 4,97 e 35,4 $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

1.1. Encapsulação por hidratação do filme lipídico

No processo de encapsulação de fluoroquinolonas por hidratação do filme lipídico, ao proceder à análise por UV-Vis do material encapsulado nos lipossomas, após recolha de diferentes alíquotas, verificou-se que praticamente todo o fármaco se encontrava não encapsulado, como se pode observar na figura 17.

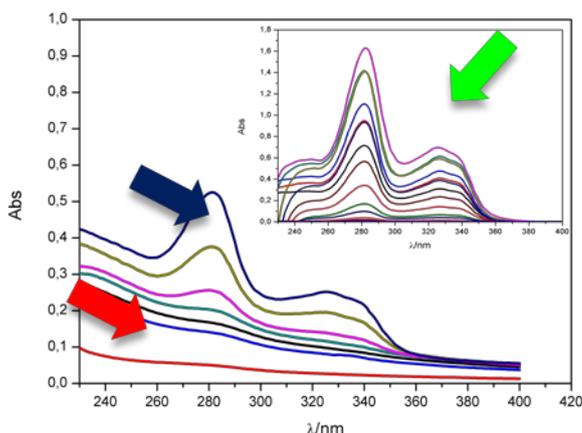


Figura 17 – Espectro de UV-Vis das frações retiradas da coluna de exclusão. Lomefloxacina ($\sim 4 \text{ mmol.dm}^{-3}$), SPPC:Coolesterol (1:1).

Na figura 17, encontram-se representados os espectros de UV-Vis das diferentes frações recolhidas da coluna de Sephadex G-50 utilizada para separar o fármaco encapsulado do fármaco não encapsulado. A análise dos espectros permite distinguir, claramente, as frações que apenas contêm lípido (seta vermelha), onde apenas se verifica dispersão de luz, das de fármaco encapsulado nos lipossomas (seta azul) e de fármaco livre em solução (seta verde). No entanto, a quantificação do fármaco encapsulado/não encapsulado não foi possível dada a baixa percentagem de encapsulação.

Embora seja uma técnica frequentemente utilizada, uma das maiores desvantagens da encapsulação de fluoroquinolonas por hidratação do filme lipídico é a sua fraca eficácia de encapsulação (5-20%) devido às suas propriedades hidro/lipofílicas, uma vez que as moléculas, por serem anfotéricas, se podem difundir para dentro e fora da membrana, sendo a sua retenção afetada [69, 102].

A encapsulação das fluoroquinolonas em estudo, em lipossomas, não foi possível através dos métodos tradicionais de encapsulação, o que levou à aplicação de métodos de encapsulação alternativos (encapsulação ativa), a partir da criação de um gradiente de pH através da membrana lipossómica [8, 72, 87].

1.2. Encapsulação por gradiente transmembranar de sulfato de amónio

1.2.1. Quantificação do gradiente transmembranar

Os gradientes de pH são utilizados para encapsular bases ou ácidos fracos em lipossomas. De um modo geral os lipossomas são preparados numa solução de pH ácido e a criação do gradiente dá-se por substituição do meio externo por uma solução neutra (normalmente uma solução salina não tamponada) [8] e, deste modo, a base fraca acumular-se-á dentro dos lipossomas em resposta a esse mesmo gradiente. Já foi anteriormente descrito que, utilizando sulfato de amónio para a formação de lipossomas e removendo a solução presente no meio externo aos lipossomas, se cria um gradiente de pH transmembranar, que pode levar à acumulação de fármacos com características de base fraca, como as fluoroquinolonas, dentro dos lipossomas [8, 85, 86, 103].

Na monitorização de gradientes de pH em modelos membranares, as amins fluorescentes são consideradas ferramentas importantes. Assume-se que estes compostos (bases fracas) facilmente permeiam as membranas na sua forma não protonada e permitem determinar o gradiente de pH por acumulação da sua forma protonada, a pH ácido [104]. O alaranjado de acridina (AA) (base fraca, pKa= 10,45) [105] foi a sonda escolhida para monitorização do gradiente de pH criado entre o interior e o exterior de lipossomas neste trabalho.

A fluorescência e absorvância de AA dependem da sua concentração. Na sua forma de monómero, a sonda absorve a ~492 nm (banda α) e emite luz a 530 nm. Uma absorção/emissão a 465/655 nm é atribuída a dímeros (banda β) enquanto que a 450 nm temos a absorção de agregados de maiores dimensões do AA [105, 106]. A monitorização de gradientes de pH torna-se possível visto a fluorescência de AA ser extinta ao pH ácido presente no interior dos lipossomas [107].

Na figura 18 apresentam-se os espectros de UV-Vis de soluções de AA ~1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, onde se pode observar a típica banda α ($\lambda_{\text{máx}}= 492$ nm) correspondente à forma de monómero. É também possível observar que a natureza do catião presente em solução (NH_4^+ ou Na^+) não tem qualquer influência sobre AA uma vez que a sonda, tanto em sulfato de amónio como em cloreto de sódio, possui o mesmo comprimento de onda máximo e o mesmo comportamento espectral. Os lipossomas de SPPC:Col foram utilizados como exemplo de um sistema lipossómico.

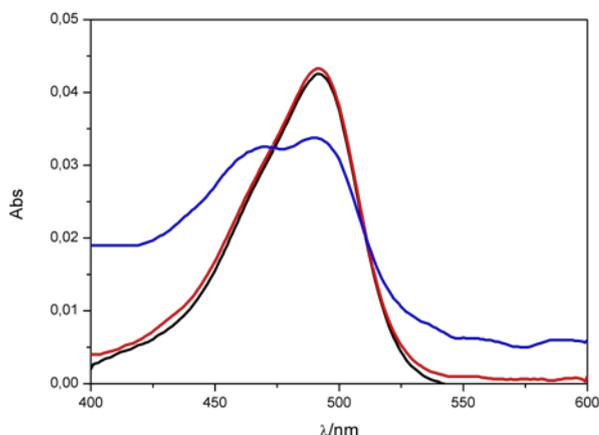


Figura 18 – Espectros de UV-Vis de AA ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Os espectros foram obtidos a 65°C para (\blackrightarrow) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $250 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ e ($\color{red}\rightarrow$) NaCl $150 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, respetivamente, na ausência de lipossomas. Na presença de lipossomas, a solução externa é composta por ($\color{blue}\rightarrow$) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ / NaCl $149,5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, dando origem a um gradiente transmembranar de sulfato de amónio de ~ 500 (espectro obtido após 3 min da adição de lipossomas); $|\text{SPPC:Coll}|=267 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

A imposição de um gradiente de sulfato de amónio através a membrana lipídica leva a alterações espectrais, geralmente caracterizadas por uma diminuição da banda α e um aumento das bandas β e γ ($\lambda_{\text{máx}}= 465$ e 450 nm , respetivamente) e apenas ocorrem quando existe um gradiente transmembranar de sulfato de amónio. No entanto, como se pode verificar pelo espectro a cor azul, apresentado na figura 18, apenas se observa uma diminuição da banda α e a formação da banda β , sugerindo que não se formaram agregados maiores do que dímeros para as condições experimentais estabelecidas.

Estas alterações do espectro (em soluções aquosas), são usualmente interpretadas como consequências da agregação da sonda. De acordo com [105] para lípidos não carregados o espectro da sonda não sofrerá alterações, o que torna improvável que qualquer alteração observada seja devida a interações entre a sonda e a bicamada lipídica. Assim, as alterações observadas por imposição de um gradiente de sulfato de amónio poderão ser explicadas pela agregação de AA no interior dos lipossomas e não por ligações à membrana.

À medida que os monómeros se acumulam nos lipossomas, ocorre formação de dímeros e/ou oligómeros e, simultaneamente e consequentemente, a concentração de monómeros no meio exterior diminui, o que se traduz numa diminuição da intensidade da banda α .

Relativamente à extinção de fluorescência de AA, esta ocorre devido à difusão do alaranjado de acridina através da membrana onde no interior, devido à presença de um ambiente mais ácido, a sonda vai ser protonada ficando impossibilitada de permear, novamente, a membrana lipídica. O aumento da concentração de AA, no interior da vesícula leva à sua agregação e, conseqüentemente, à extinção da sua fluorescência [107].

Analisando a figura 19 é possível verificar que à medida que aumenta o gradiente estabelecido, a fluorescência da sonda diminui, tal como previsto, para a mesma concentração de sonda ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Também se pode observar que para a mesma concentração de sonda, mas onde existe uma substituição completa do meio externo (8), existe uma maior extinção de fluorescência, o que mostra que o gradiente que se estabelece é maior do que os gradientes testados (1 a 7).

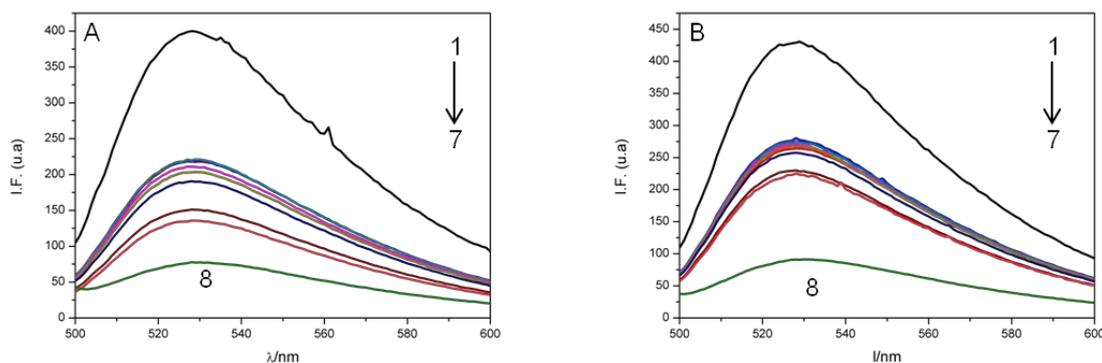


Figura 19 – Espectros de Fluorescência do alaranjado de acridina ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) após a adição de lipossomas em sulfato de amónio. Os espectros foram obtidos a 65°C na ausência (1) e presença de gradientes transmembranares crescentes (2-8) de (A) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $250 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ / NaCl $150 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ e (B) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $250 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ /Sacarose 10%. ($[\text{AA}] = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$; $|\text{SPPC}:\text{Col}| = 267 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ para (8) e (2-7) $|\text{SPPC}:\text{Col}| = 36 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

A fluorescência da sonda foi monitorizada ao longo do tempo ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) e verificou-se que, após a adição de lipossomas sujeitos a um gradiente transmembranar de sulfato de amónio, existiu uma diminuição significativa da intensidade de fluorescência inicialmente observada. A figura 20 apresenta a extinção de fluorescência de AA em função do tempo ($t = 5 \text{ min}$) provocada pela adição de lipossomas cujo meio externo foi totalmente substituído por (A) NaCl ou (B) Sacarose. Este estudo, além de permitir verificar e comprovar a presença de um gradiente de pH transmembranar permitiu, igualmente, determinar a estabilidade do gradiente estabelecido.

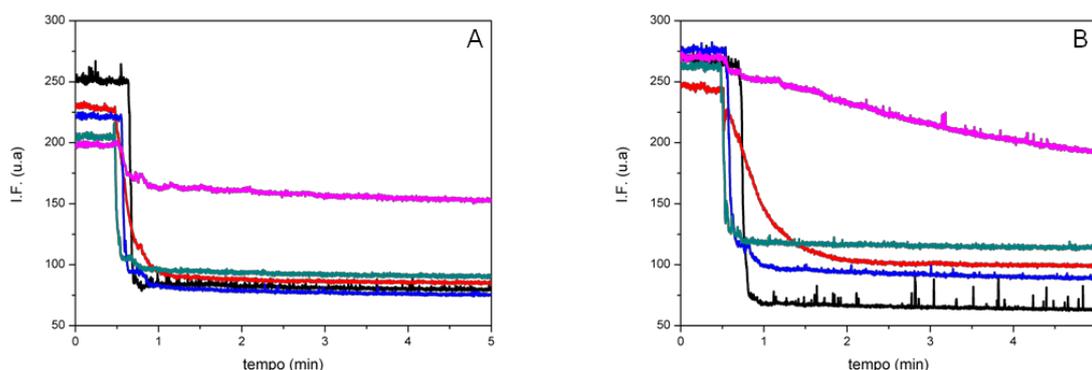


Figura 20 – Espectro de fluorescência de AA ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) em lipossomas de SPPC:Col ($267 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) em (A) NaCl ($150 \text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) e (B) Sacarose (10%) em diferentes dias. (—) dia 0, (—) dia 1, (—) dia 7, (—) dia 8 e (—) 30 dias.

A análise dos espectros obtidos na figura 20 permite afirmar que o gradiente de pH estabelecido em NaCl $150 \text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ se formou e estabeleceu mais rapidamente assim como possui uma maior estabilidade ao longo do tempo do que o estabelecido em Sacarose 10%, uma vez que, num período de 8 dias, a variação da extinção da fluorescência de AA, não foi significativa ao contrário do que se verifica para a Sacarose (figura 20 B). Ao fim de 30 dias o gradiente em NaCl, embora substancialmente menor, ainda se mantinha, no entanto, o mesmo não se verificou para o gradiente estabelecido com Sacarose.

No que diz respeito à extinção de fluorescência de AA, em função do tempo, observada para os diferentes gradientes (g) criados (4-600) (figura 21) a presença de um gradiente de pH começa a verificar-se a partir de $g=167$ para NaCl enquanto para a Sacarose a sua presença é mais evidente a partir de $g=214$. É também possível verificar, novamente, que o gradiente de pH estabelecido em NaCl $150 \text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ se forma mais rapidamente do que o estabelecido em Sacarose (10%).

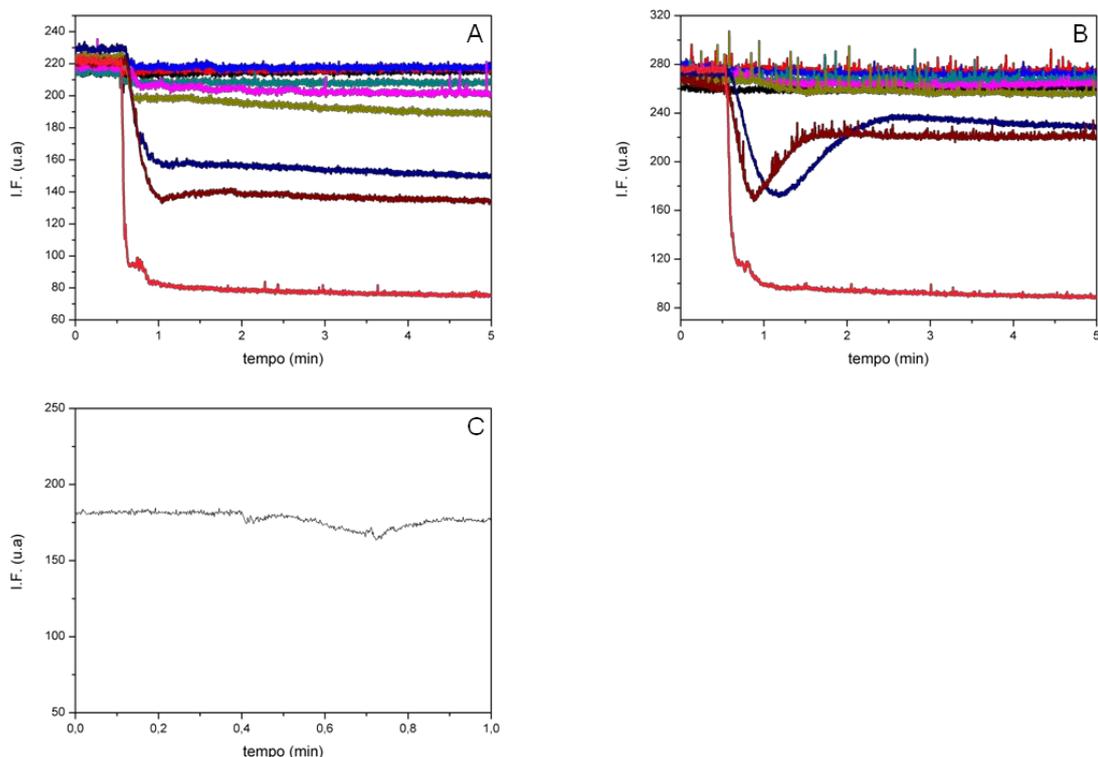


Figura 21 – Gradientes crescentes de pH de AA ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) em (A) NaCl $150 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, (B) Sacarose 10% e (C) sem gradiente. ($[\text{SPPC}:\text{Col}]=36 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Gradientes NaCl: (—) 8,3, (—) 83, (—) 167, (—) 250, (—) 333, (—) 417, (—) 500, (—) 583, (—) substituição total do meio externo; Gradientes Sacarose: (—) 4,3, (—) 43, (—) 86, (—) 128, (—) 171, (—) 214, (—) 257, (—) 300, (—) substituição total do meio externo.

Os resultados foram analisados assumindo que a extinção de fluorescência se deveu à transferência de moléculas de AA do meio externo para o meio interno dos lipossomas. Comparando a figura 21A e B com a figura 21C facilmente se conclui que se estabeleceu, efetivamente, um gradiente de pH transmembranar, uma vez que adicionando lipossomas não sujeitos a gradiente (figura 21C), isto é, com sulfato de amónio dentro e fora da vesícula lipídica, não se verificou qualquer alteração à intensidade de fluorescência da sonda.

A razão mássica de AA do interior para o exterior dos lipossomas foi calculada a partir da sua fluorescência média (~ 30 s) antes da adição de lipossomas (F_0) e da fluorescência registada após adição (F_∞) e estabilização do sistema e é dada por [105]:

$$\frac{m_{\text{int}}}{m_{\text{ext}}} = \frac{F_0 - F_\infty}{F_\infty} \quad \text{Eq. 1}$$

Para a quantificação do gradiente e respetiva diferença de pH, entre o meio interno e externo, é necessário ter em consideração o comportamento do AA em solução e na presença/ausência de gradientes, tal como o equilíbrio de distribuição transmembranar da base fraca (AA) e a sua acumulação nos lipossomas.

Sabendo que, no que diz respeito ao equilíbrio de distribuição, as bases fracas monocatiónicas se distribuem entre o espaço interno/externo das vesículas, de acordo com a razão de concentração de protões temos:

$$\frac{|BH^+|_{int}}{|BH^+|_{ext}} = \frac{|H^+|_{int}}{|H^+|_{ext}} \quad \text{Eq. 2}$$

onde os sufixos int e ext correspondem, respetivamente, aos compartimentos interno e externo do lipossoma e BH^+ à base fraca na sua forma catiónica. Esta equação assume que apenas a forma neutra (não carregada) permeará a membrana lipídica. Sendo o ião amónio uma base fraca ($pK_a = 9,26$) e a sua permeabilidade 11 vezes inferior à permeabilidade da molécula de amoníaco, de acordo com a equação anterior a criação de um gradiente de concentração transmembranar de sulfato de amónio resultará em alterações de pH em ambos os compartimentos. O estabelecimento de um gradiente transmembranar leva, igualmente, à redistribuição das moléculas de base fraca adicionadas ao compartimento externo [105].

Numa primeira aproximação, a razão de concentrações de catiões entre o meio interno e externo é igual ao gradiente de concentração transmembranar do sulfato de amónio (g):

$$g = \frac{|(NH_4)_2SO_4|_{int}}{|(NH_4)_2SO_4|_{ext}} = \frac{|H^+|_{int}}{|H^+|_{ext}} = \frac{|BH^+|_{int}}{|BH^+|_{ext}} \quad \text{Eq. 3}$$

A encapsulação do alaranjado de acridina dentro dos lipossomas, em função do gradiente de sulfato de amónio estabelecido baseia-se no processo de agregação de catiões e no gradiente de concentração estabelecido.

A conservação de massa diz-nos que:

$$C_{AA,total} = (1 - \nu)C_{AA,ext} + \nu.C_{AA,int} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde C_{AA} , total é a concentração total de AA no sistema, e ν a fração volúmica encapsulada dentro dos lipossomas. A fração volúmica é determinada a partir da concentração de lípido (em cada ensaio) assumindo um volume encapsulado de 3,6 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$ de lípido. O volume encapsulado foi determinado para vesículas esféricas de

50 nm de raio e para uma área molecular do sistema lípido:colesterol de 0,84 nm [108] e através da equação:

$$V = \frac{N_A \times a \times (r - \delta)^3}{3 \times (r^2 + (r - \delta)^2)} \quad \text{Eq. 5}$$

onde N_A é o número de avogadro, a a área molecular do lipossoma, r o raio do lipossoma e δ a espessura da bicamada.

A concentração total de sonda em ambos os compartimentos (interior e exterior) foi calculada com base na equação do gradiente de concentração [3] e com base na equação da conservação de massa de AA [4], dando origem a:

$$\frac{m_{\text{int}}}{m_{\text{ext}}} = \frac{v}{1-v} \frac{|AA|_{\text{int}}}{|AA|_{\text{ext}}} \quad \text{Eq. 6}$$

A partir da equação [6] foi possível obter um gráfico dos valores obtidos experimentalmente ($m_{\text{int}}/m_{\text{ext}}$ calculado a partir da equação [1] em função do gradiente criado).

A figura 22 mostra que existe acumulação de AA nos lipossomas em função do gradiente transmembranar de sulfato de amónio. É possível identificar, igualmente, fases distintas nos estudos com NaCl: uma primeira fase onde a acumulação praticamente não é detetável, para gradientes inferiores de 100 ($\Delta\text{pH} = 1,92$ calculado através do logaritmo do gradiente), uma segunda fase, até gradientes próximos de 400 ($\Delta\text{pH} = 2,60$), onde o valor de $m_{\text{int}}/m_{\text{ext}}$ parece depender linearmente do gradiente e, ainda, uma terceira fase, para valores de gradiente superiores a 400, onde é possível observar um crescimento acentuado na acumulação de AA dentro dos lipossomas e de valor superior ao previsto pelas equações apresentadas anteriormente.

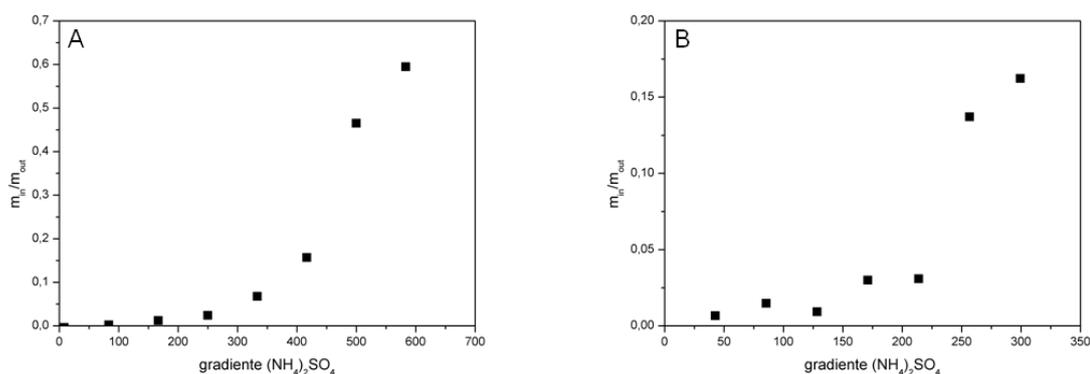


Figura 22 – Extensão da acumulação de AA em função do gradiente transmembranar de sulfato de amónio (A) $(NH_4)_2SO_4/150\text{ mmol.dm}^{-3}$ NaCl e (B) $(NH_4)_2SO_4/10\%$ Sacarose. $[AA]=1\text{ mmol.dm}^{-3}$, $[SPPC:Col]=36\text{ mmol.dm}^{-3}$ e $T=65^\circ\text{C}$. Os resultados apresentados correspondem à média de pelo menos 3 ensaios independentes.

Os gráficos obtidos, apresentados na figura 22, encontram-se de acordo com o comportamento descrito para o AA, na literatura para gradientes transmembranares criados por substituição do sulfato de amónio, presente no exterior dos lipossomas, por soluções salinas [105, 109].

Com base nas equações do gradiente e conservação de massa (equações 3 e 4) foi possível determinar o valor de ΔpH quando todo o meio externo dos lipossomas se encontra substituído por NaCl 150 mmol.dm^{-3} ou sacarose 10%. Os valores de ΔpH determinados, após a formação do gradiente e após 30 dias (1 mês) encontram-se representados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de ΔpH determinados para SPPC:Col (1:1).

	ΔpH	ΔpH (1 mês)*
NaCl 150 mmol.dm^{-3}	3,25	2,48
Sacarose 10%	3,36	-----

* valor de ΔpH após 30 dias da formação do gradiente. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos 3 ensaios independentes

Os valores ΔpH de cerca de 3 unidades, presentes na tabela anterior, comprovam a presença de um gradiente transmembranar suficiente para levar à encapsulação de fluoroquinolonas e embora diminua ao longo do tempo, no caso de NaCl ainda será suficiente para acumulação de fluoroquinolonas em lipossomas.

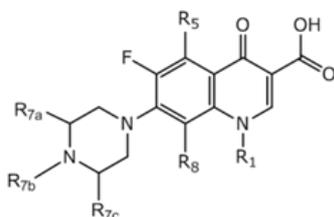
Os valores determinados vão de encontro aos descritos na literatura que referem que, para diferenças de pH estabelecidas por remoção total do meio externo

de lipossomas hidratados com sulfato de amónio, por NaCl ou Sacarose se originam gradientes de aproximadamente 3 unidades [8, 69, 86, 110].

1.3. Estudos de encapsulação de fluoroquinolonas por gradiente transmembranar

A encapsulação de todas as fluoroquinolonas, devido ao seu perfil anfotérico/ião dipolar e baixa solubilidade a pH fisiológico realizou-se através de um gradiente de pH baseado nos gradientes transmembranares de sulfato de amónio [8, 85, 86, 103].

Os estudos de encapsulação permitiram a encapsulação e retenção das fluoroquinolonas ciprofloxacina (cpx), norfloxacina (nrx), pefloxacina (pfx), levofloxacina (lvx) e sparfloxacina (spx) em lipossomas constituídos por três sistemas lípido:colesterol (1:1) diferentes (PMPC, SPM, SPPC). A encapsulação dos fármacos foi possível através da incubação dos lipossomas referidos na presença das fluoroquinolonas em estudo, em NaCl 150 mmol.dm⁻³ ou Sacarose 10%, após o estabelecimento de um gradiente de pH através da membrana lipídica.



	R ₅	R ₁	R ₈	R _{7a}	R _{7b}	R _{7c}
Ciprofloxacina	-----	cC ₃ H ₅	-----	-----	-----	-----
Levofloxacina	-----	-OCH ₂ CH(CH ₃)-	-----	-----	CH ₃	-----
Norfloxacina	-----	C ₂ H ₅	-----	-----	-----	-----
Pefloxacina	-----	C ₂ H ₅	-----	-----	CH ₃	-----
Sparfloxacina	NH ₂	cC ₃ H ₅	F	CH ₃	-----	CH ₃

Figura 23 – Núcleo base das fluoroquinolonas e respetivos substituintes.

1.3.1. Em NaCl (150 mmol.dm⁻³)

Para todos os sistemas lipídicos testados (PMPC:Col, SPPC:Col e SPM:Col), os resultados obtidos mostram um nível de encapsulação de cerca de 80%, exceto para a lvx cujas percentagens de encapsulação nunca ultrapassaram o valor médio de

50%. De seguida apresenta-se uma tabela (tabela 5) com as diferentes percentagens de encapsulação obtidas para cada fluoroquinolona nos diferentes sistemas lipídicos testados.

Tabela 5 – Percentagens de encapsulação (%) das diferentes fluoroquinolonas, ao fim de 120 min, para incubação em NaCl 150 mmol.dm⁻³. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.

	PMPC:Coolesterol	SPM:Coolesterol	SPPC:Coolesterol
Cpx	78,3	73,6	73,1
Nrx	76,4	71,0	79,1
Pfx	76,6	84,7	76,9
Lvx	53,1	55,9	57,3

A figura 24 traduz o perfil de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas estudadas e permite-nos observar que a percentagem de encapsulação máxima foi atingida, praticamente após 10 min de incubação.

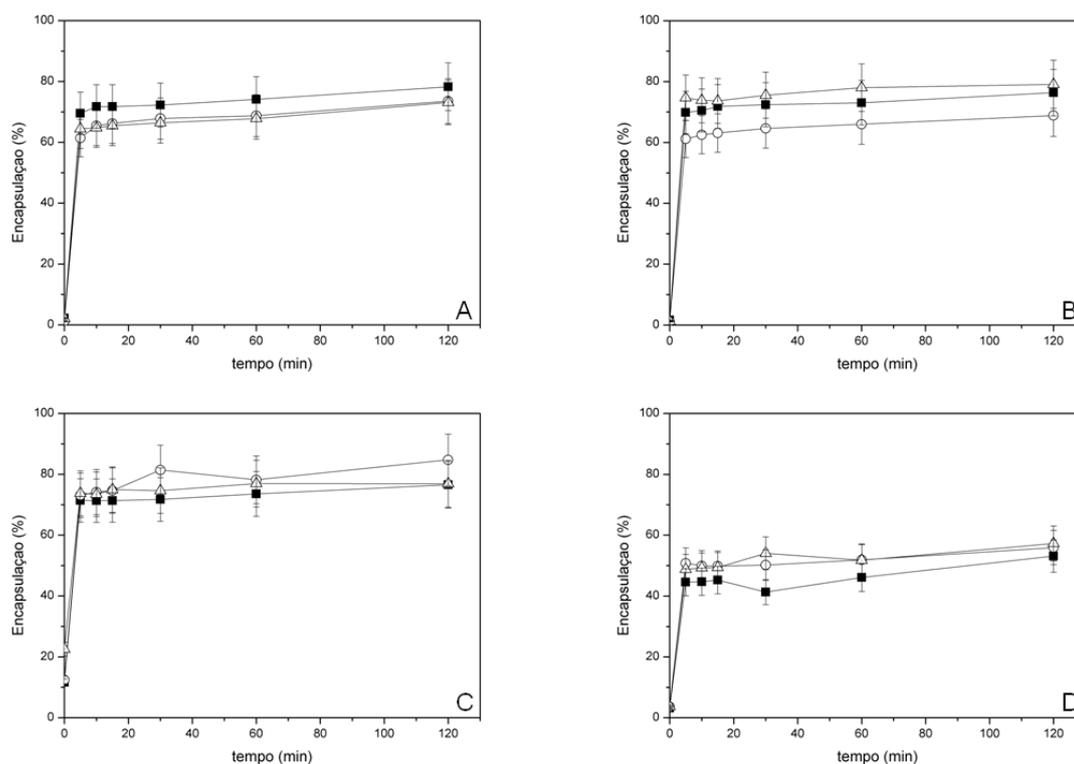


Figura 24 – Percentagem de encapsulação (%) das diferentes fluoroquinolonas (A) Cpx, (B) Nrx, (C) Pfx e (D) Lvx vs tempo (min), em diferentes sistemas lípido:colesterol (■) PMPC, (○) SPM, (△) SPPC. A incubação foi realizada em NaCl 150 mmol.dm⁻³.

Para o sistema lipídico PMPC:Coolesterol, aproximadamente 70% de encapsulação de fármaco foi obtida ao fim de 10 min de incubação e aumentou até um máximo de 78% (120 min), como se pode observar na figura 24. Este comportamento foi igualmente observado para as fluoroquinolonas cpx, nrx e pfx. Embora a lvx seja estruturalmente semelhante, este comportamento não se observou obtendo-se, apenas, um máximo de 53% de encapsulação ao fim de um período de 2 h.

No que diz respeito ao sistema SPM:Coolesterol (círculos fechados), para a cpx e nrx observou-se uma encapsulação de aproximadamente 66% ao fim de 10 min enquanto para a pfx a percentagem obtida foi cerca de 74% e para a lvx 50%. Ao fim de 120 min foi possível observar um aumento da encapsulação para 74, 69 e 85% para a cpx, nrx e pfx, respetivamente. No caso da lvx, tal como no sistema anterior, a fluoroquinolona atingiu somente 56% de encapsulação após o término da incubação.

Relativamente ao terceiro sistema testado, SPPC:Coolesterol, foi possível verificar que, ao fim de 10 min, a encapsulação obtida para nrx e pfx foi cerca de 74% enquanto para cpx e lvx foi de 65 e 50%, respetivamente. As percentagens de encapsulação obtidas ao fim de 120 min encontram-se relativamente próximas, sendo o seu valor médio ~77% com a exceção da lvx que, tal como para os sistemas anteriores apenas se obteve uma encapsulação de 54% dentro dos lipossomas como se pode verificar pela figura 24 (triângulos).

A encapsulação de spx foi testada, em NaCl, e obtiveram-se valores elevados de encapsulação no entanto não foi possível determinar se seria devido à encapsulação ou devido a algum precipitado que tivesse atravessado a coluna de Sephadex G-50. Foram realizadas medições de tamanho através da espectroscopia de correlação fotónica e verificou-se a presença de uma segunda população, de maiores dimensões, que sugere a presença de precipitado.

Considerando as diferenças estruturais entre as fluoroquinolonas em estudo, apresentadas na figura 23, é possível observar que a nrx e a pfx diferem apenas na presença de um grupo metilo na posição *para* do grupo piperazinil o que pode explicar as suas similaridades a nível da percentagem de encapsulação obtida, mesmo para diferentes sistemas lipídicos. O mesmo pode ser afirmado para a cpx que diferindo da nrx apenas, na posição 1 apresenta encapsulações semelhantes às obtidas para a nrx e pfx, sendo que as diferenças observadas se encontram dentro do erro experimental.

No que diz respeito aos resultados obtidos para a lvx, os baixos níveis de encapsulação poderão ser uma consequência de interações estereoquímicas entre a fluoroquinolona e as cabeças polares do fosfolípido, uma vez que este fármaco possui

uma estrutura mais volumosa, devido ao anel formado entre as posições 1 e 8 do núcleo base das quinolonas.

Considerando que as fluoroquinolonas possuem dois locais de protonação (no grupo carboxilato do núcleo e na amina na posição *para* do grupo piperazina), podem adotar quatro formas diferentes em solução (neutra, ião-dipolar, catiónica e aniónica) e, uma vez que apenas a forma neutra do fármaco é capaz de transpor a membrana lipídica, através da determinação da razão entre as formas neutra e de ião-dipolar, pela razão entre as suas constantes de protonação (K_{a1} e K_{a2}), é possível prever o comportamento de cada fármaco aquando do processo de encapsulação [111]. Tendo isto em consideração, e de acordo com razão ião dipolar/forma neutra, determinada para todas as fluoroquinolonas em estudo (tabela 6), é possível verificar que, para fluoroquinolonas que exibam uma menor razão, a forma neutra deverá estar numa concentração mais elevada do que a forma de ião-dipolar.

Tabela 6 – pKa's das fluoroquinolonas em estudo e a razão entre as espécies ião-dipolar/neutra [90, 111, 112].

	Cpx	Lvx	Nrx	Pfx	Spx
pKa ₁	6,15	6,10	6,25	6,02	6,13
pKa ₂	8,95	8,60	8,44	7,95	7,43
[FQ] [±] /[FQ]	631	316	155	85,1	20,0

Contudo, para todos os fármacos, a concentração do ião dipolar predomina sobre o ião neutro e, uma vez que a concentração total de ambas as espécies é máxima quando próxima da neutralidade, pode concluir-se que um maior coeficiente de partição de n-octanol/água pode ser correlacionado com a predominância dessas espécies [111].

Tendo em consideração os fatores mencionados anteriormente em conta, a tabela 6 permite confirmar os dados obtidos a partir dos estudos de encapsulação com a exceção da fluoroquinolona lvx pois, como já foi referido, devido à sua estrutura mais volumosa, é possível que a sua baixa encapsulação se deva a interações estereoquímicas entre a fluoroquinolonas e as cabeças polares dos fosfolípidos, interações estas que não ocorrem num modelo simples como o n-octanol/água [111].

1.3.2. Em Sacarose (10%)

Na tabela 7 encontram-se apresentados os valores de percentagem de encapsulação obtidos para todas as fluoroquinolonas nos diferentes sistemas lípido:colesterol testados, para incubação em sacarose 10%.

Tabela 7 – Percentagens (%) de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas, ao fim de 120 min para incubação em Sacarose 10%. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.

	PMPC:Colesterol	SPM:Colesterol	SPPC:Colesterol
Cpx	80,6	66,5	76,6
Nrx	71,1	65,5	80,6
Pfx	73,5	72,8	79,4
Lvx	55,3	53,1	53,0
Spx	85,6	92,3	71,6

A figura 25 apresenta o perfil de encapsulação das fluoroquinolonas em estudo, em função do tempo de incubação em Sacarose 10%.

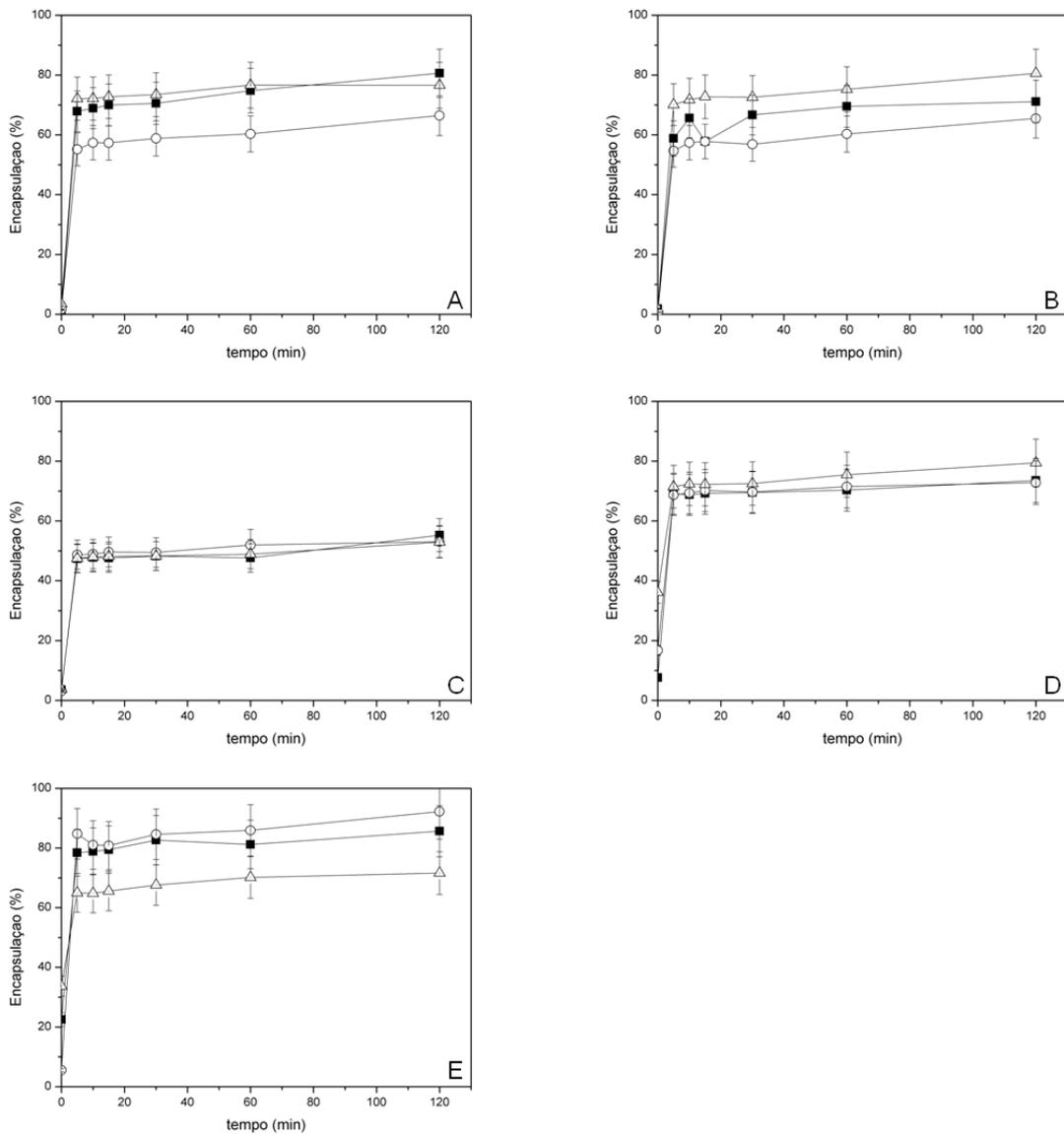


Figura 25 – Percentagem de encapsulação (%) das diferentes fluoroquinolonas (A) Cpx, (B) Nrx, (C) Lvx, (D) Pfx e (E) Spx vs tempo (min), em diferentes sistemas lípido:colesterol (■) PMPC, (○) SPM, (△) SPPC. A incubação foi feita em Sacarose 10%.

De acordo com os diferentes gráficos apresentados, na figura 25, é possível observar que para o sistema envolvendo o lípido PMPC, existe uma encapsulação, ao fim de 120 min entre 55%, para a lvx e 86% para a spx.

Relativamente ao sistema SPM:Coolesterol, observaram-se percentagens de encapsulação mais baixas do que as obtidas para os outros sistemas variando entre 53% para a lvx e 66-73% para as restantes fluoroquinolonas. A spx possui, no entanto, uma percentagem de encapsulação maior que as restantes quinolonas (92%).

No caso do sistema SPPC:Coolesterol verificaram-se percentagens semelhantes, dentro do erro, para todas as fluoroquinolonas ao fim de 120 min, novamente com a lvx como exceção atingindo apenas 53% de encapsulação relativamente aos cerca de 80% determinados para os restantes fármacos.

De todas as fluoroquinolonas estudadas foi possível verificar que, quando incubadas em sacarose, a pfx e lvx são as que têm uma encapsulação semelhante em todos os sistemas lipídicos utilizados. Embora pareça existir uma diferença significativa para a spx, devido a um ligeiro aumento na sua encapsulação, em sistemas de SPM:Col, quando comparada com o sistema SPPC:Col esta diferença provavelmente resultará das propriedades físico-químicas do fármaco e lípido, como hidrofobicidade, temperatura de transição de fase e fluidez do lípido [8, 88, 111, 113].

No que diz respeito à fluoroquinolona lvx, tanto para NaCl como para a Sacarose, os baixos níveis de encapsulação, tal como mencionado nos estudos de encapsulação em NaCl 150 mmol.dm⁻³, serão uma consequência de interações estereoquímicas entre a fluoroquinolona e as cabeças polares do fosfolípido.

De um modo geral é possível afirmar que a encapsulação de diferentes fluoroquinolonas em diferentes sistemas lipídicos é possível, com encapsulações na ordem dos 80-90% independentemente do meio utilizado para a incubação (NaCl ou Sacarose) e da composição do sistema lipídico.

Também é possível observar, pela análise das tabelas apresentadas (tabela 5 e tabela 7), que o sistema que contém SPM e colesterol origina, de um modo geral, percentagens de encapsulação mais baixas (à exceção da lvx) do que para os outros dois sistemas que, de acordo com a literatura [26], é uma das desvantagens da utilização de esfingomiéline para sistemas de transporte/libertação controlada. Embora todos os sistemas lipídicos utilizados (PMPC:Col, SPM:Col e SPPC:Col) permitam a encapsulação de cpx, nrx, lvx, pfx e spx, a sua utilização como sistemas de transporte/libertação de fluoroquinolonas dependerá de estudos que permitam avaliar a sua estabilidade e retenção do antibiótico encapsulado assim como a libertação das quinolonas em condições fisiológicas.

1.4. Estabilidade dos sistemas lipídicos preparados

Para o sistema lipídico PMPC, a retenção dos fármacos encapsulados, após 4 semanas de armazenamento a 4°C (figura 26) encontra-se entre 90 e 100%, perdendo, relativamente à quantidade de fármaco encapsulada inicialmente, cerca de

3% para sistemas em NaCl e 6% para sistemas nos quais foi utilizada sacarose como meio de incubação.

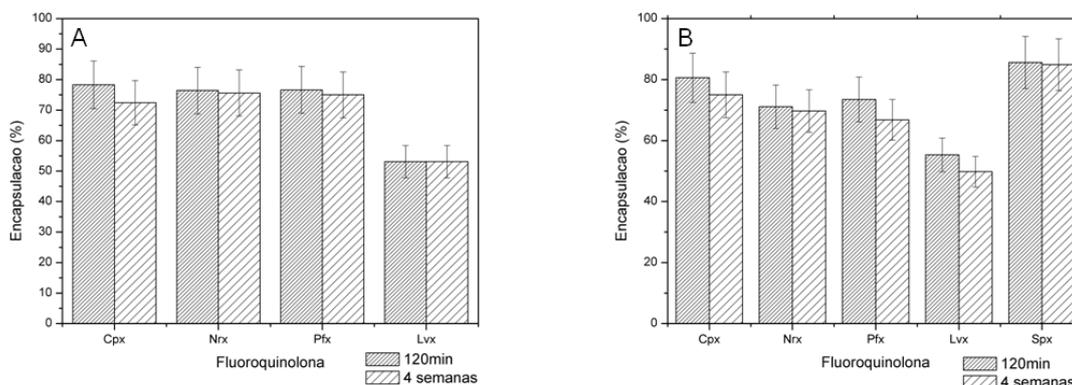


Figura 26 – Comparação entre percentagens de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas ao fim de 120 min e 4 semanas de armazenamento a 4° C (% retida) para o sistema lipídico PMPC:Coolesterol em (A) NaCl 150 mmol.dm⁻³ e (B) Sacarose 10%.

No que diz respeito ao sistema lipídico composto por SPM:Col (figura 27) verifica-se que as percentagens de retenção dos fármacos dentro dos lipossomas, ao fim de 4 semanas, são significativamente mais baixas e a diferença entre elas, superior ao erro associado. Para os estudos com NaCl a retenção encontra-se entre 73 e 83% enquanto para a sacarose este intervalo situa-se entre 72 e 94%. Existe uma perda de cerca de 22% do material inicialmente encapsulado nos lipossomas. (ver **anexo 3**)

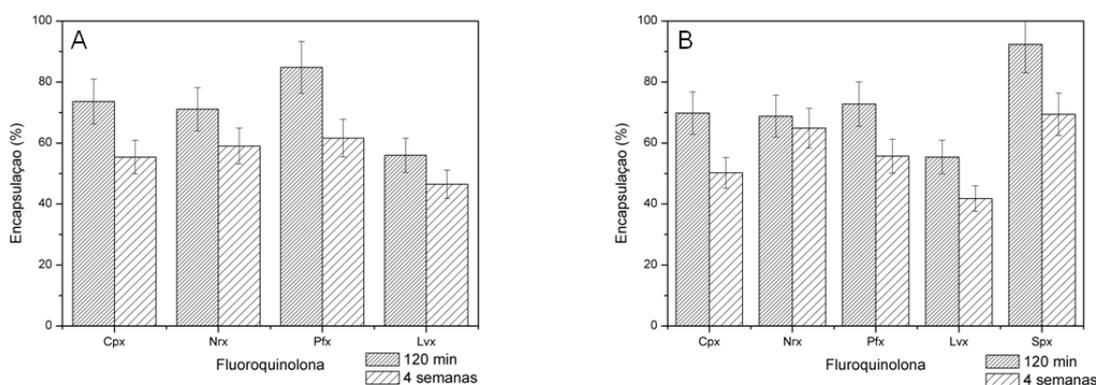


Figura 27 – Comparação entre percentagens de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas ao fim de 120 min e 4 semanas de armazenamento a 4° C (% retida) para o sistema lipídico SPM:Coolesterol em (A) NaCl 150 mmol.dm⁻³ e (B) Sacarose 10%.

Relativamente ao sistema lipídico SPPC:Col verifica-se, na figura 28, uma retenção média entre 87 e 100% para os estudos em NaCl e de 81-98% para os estudos em Sacarose, resultando numa perda de material encapsulado de cerca de 8

e 10%, respetivamente. Analisando a figura 28B é possível observar que apenas nos sistemas com Sacarose e para a fluoroquinolona nrx existe uma perda significativa, estando todos os outros resultados dentro do erro de 10%.

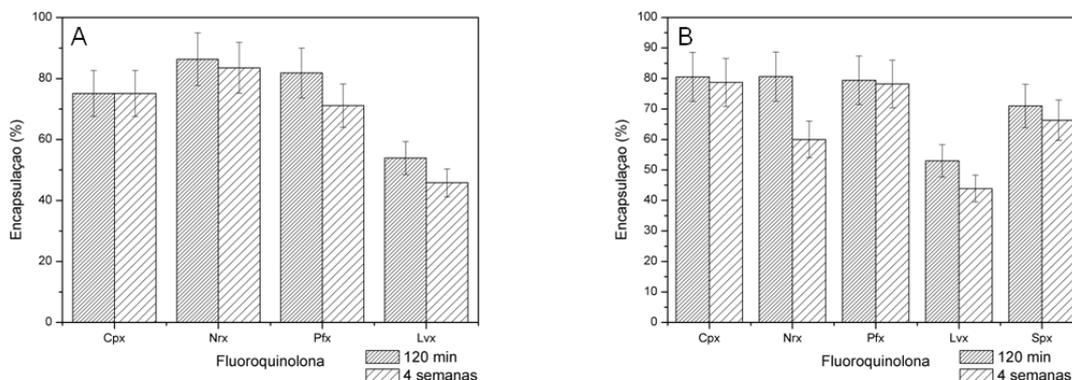


Figura 28 – Comparação entre percentagens de encapsulação das diferentes fluoroquinolonas ao fim de 120 min e 4 semanas de armazenamento a 4° C (% retida) para o sistema lipídico SPPC: Colesterol em (A) NaCl 150 mmol.dm⁻³ e (B) Sacarose 10%.

A retenção do fármaco dentro dos lipossomas depende da estabilidade do lípido ao longo do tempo e os estudos realizados (DLS e oxidação anexo 2) indicam que sistemas lipídicos sintéticos como PMPC e SPPC são mais estáveis que a SPM como se pode confirmar através dos resultados obtidos.

De acordo com a literatura, no que diz respeito à composição lipídica, lipossomas constituídos por lípidos com elevadas temperaturas de transição de fase (como SPPC e PMPC) e percentagens relativamente elevadas de colesterol (~40% mol), libertam menor quantidade de fármaco do que lipossomas constituídos por lípidos com baixa T_m (SPM) com a mesma, ou menor, percentagem de colesterol. A utilização de longas cadeias hidrocarbonadas saturadas e a presença de uma quantidade “ótima” de colesterol na bicamada lipídica reduz possíveis defeitos na membrana, reduzindo, deste modo, a sua permeabilidade [66].

De um modo geral existe menor retenção do fármaco dentro do lipossoma para estudos de encapsulação realizados na presença de sacarose 10% e para o sistema lipídico SPM:Col. O comportamento observado para os sistemas lipídicos sintéticos (PMPC e SPPC) foi semelhante para todas as fluoroquinolonas e dentro do erro associado, pelo que qualquer um destes dois sistemas será adequado para estudos de encapsulação de fluoroquinolonas.

1.5. Estudos de libertação de fluoroquinolonas em condições fisiológicas

A escolha do sistema lipídico utilizado para os estudos de libertação (SPPC:Col) prendeu-se com o facto de este ser um sistema, de composição sintética, que permite uma boa retenção/estabilidade dos fármacos encapsulados, como se verificou nos estudos referidos em 1.4.

Geralmente, a libertação de um fármaco a partir de lipossomas é influenciada pelas características físico-químicas do sistema lipossómico e do seu meio externo. Deste modo, estes sistemas deverão ser avaliados num ambiente biomimético (condições fisiológicas) de modo a obter uma correlação entre os estudos *in vitro* e *in vivo* [3]. Os estudos de libertação *in vitro* efetuados, permitiram avaliar a capacidade do sistema lipídico SPPC:Colesterol reter o material encapsulado, em condições fisiológicas (pH 7,4 e 37°C) e de, prever qual o seu comportamento *in vivo* [80].

Os meios utilizados para os estudos de libertação foram o PBS e SBF. A seleção dos meios de libertação utilizados nestes estudos baseou-se na literatura, no caso do PBS devido à maior parte dos estudos de libertação, *in vitro*, ser realizada nesta solução tampão [3, 114] enquanto a seleção do SBF prendeu-se com a sua elevada semelhança com a composição iónica do plasma sanguíneo [82], permitindo-nos uma avaliação do comportamento dos lipossomas num fluido biomimético. Sendo o objetivo da encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas a sua aplicação *in vivo*, é importante que a semelhança entre o meio onde ocorrerá libertação e os fluidos biológicos seja elevada, de modo a obter perfis de libertação em condições o mais próximas possível das fisiológicas, ou seja, das condições *in vivo*.

A libertação das fluoroquinolonas foi determinada, *in vitro*, por incubação das alíquotas para as quais se verificou a maior percentagem de encapsulação e foi efetuada imediatamente após os estudos de encapsulação (120 min de incubação, ver ponto 1.3) em PBS e SBF, pH 7,4 e 37°C. É importante referir que, uma vez que os volumes de lipossomas obtidos, após centrifugação em mini coluna de *spin*, são pequenos ($100 \pm 10 \mu\text{L}$), foi necessário recolher e centrifugar, após encapsulação máxima, alíquotas para cada um dos períodos de tempo pretendidos nos estudos de libertação (0, 15, 30 45 e 60 min). A recolha de diferentes alíquotas poderá levar a maiores oscilações nos valores de percentagem de encapsulação obtidos após incubação nos meios selecionados uma vez que cada alíquota terá um erro associado de 10%.

Na literatura encontra-se descrito que, para a fluoroquinolona cpx se observa uma libertação superior a 90% do material encapsulado após 5 min [86] pelo que os estudos realizados contemplam apenas a libertação por um período de 60 min, tempo suficiente, de acordo com a literatura, para uma total libertação das fluoroquinolonas.

1.5.1. Estudos de libertação em PBS

A figura 29 traduz a libertação dos fármacos em PBS, num período de 60 min, para uma razão molar lípido:fluoroquinolona de 1:0,3, nos dois meios utilizados para a incubação aquando dos estudos de encapsulação: NaCl 150 mmol.dm⁻³ e sacarose 10%.

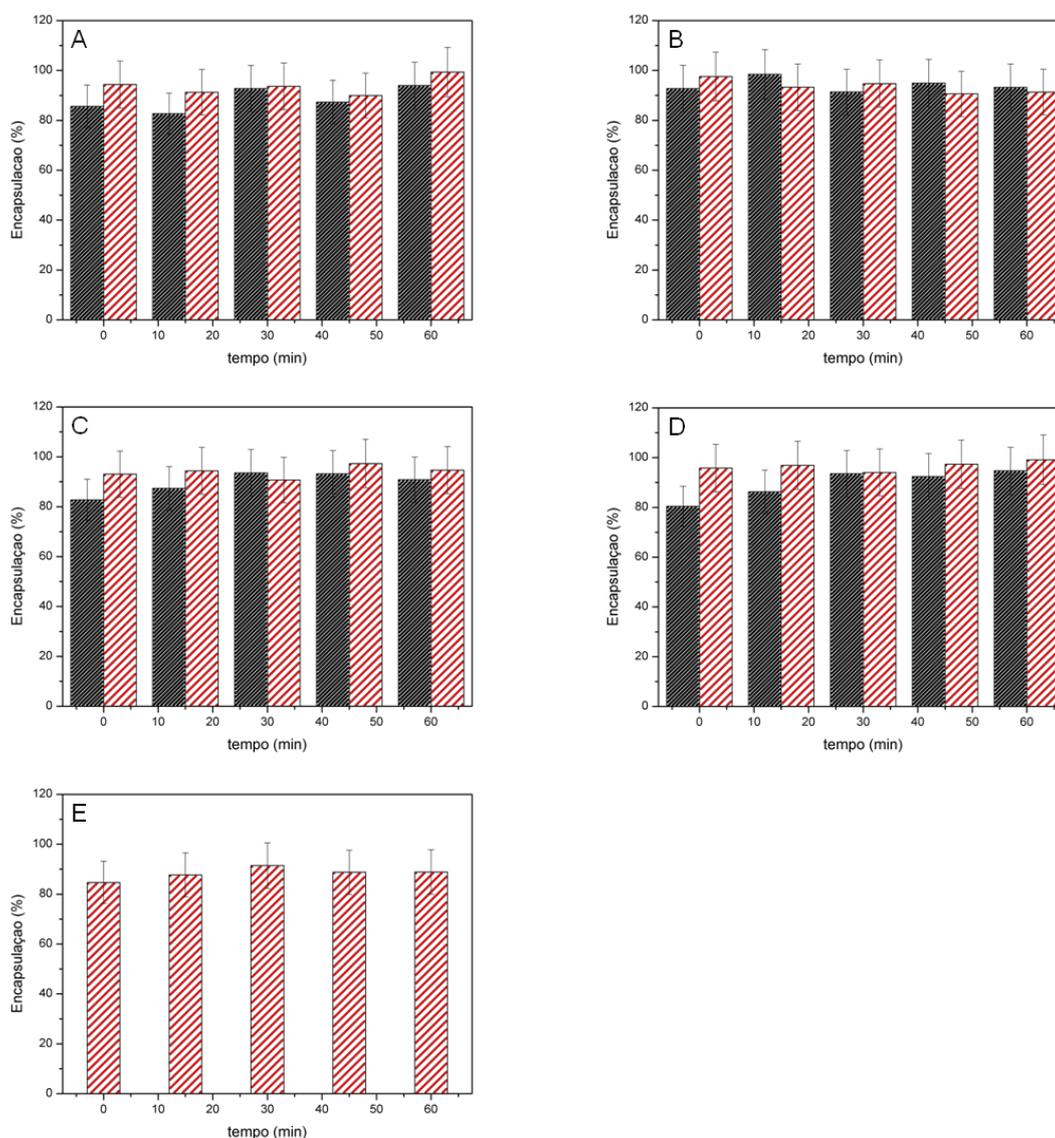


Figura 29 – Estudos de libertação de (A) Cpx, (B) Nrx, (C) Pfx, (D) Lvx e (E) Spx em PBS pH 7,4, 37°C, ao longo de 60 min, após encapsulação das mesmas em (////) NaCl 150 mmol.dm⁻³ ou (////) Sacarose 10%.

Verifica-se, com base na figura 29 que não existe libertação significativa do material encapsulado durante um período de 60 min independentemente do meio usado para se efetuar a encapsulação (NaCl ou Sacarose. Os diferentes valores obtidos para a percentagem de encapsulação são idênticos a menos do erro experimental (10% associado à centrifugação por mini colunas de *spin*) determinado no ponto 1.4.

É igualmente possível determinar a percentagem média de retenção para cada uma das fluoroquinolonas em estudo, relativamente ao meio de encapsulação. Para a encapsulação em NaCl existe uma percentagem de retenção do material encapsulado entre 88 e 94% e para os estudos envolvendo sacarose a percentagem de retenção encontra-se entre 88 e 97%. Assim pode-se afirmar que não existem diferenças significativas em termos de libertação entre a encapsulação em NaCl ou Sacarose. Os valores determinados encontram-se resumidos na tabela 8.

Tabela 8 – Percentagem de retenção (%) das diferentes fluoroquinolonas, em PBS pH 7,4, de acordo com o meio de encapsulação. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.

	% média retenção (NaCl)	% média retenção (sacarose)
Cpx	88,5	93,7
Nrx	94,1	93,5
Pfx	89,6	94,0
Lvx	89,5	96,7
Spx	-----	88,3

1.5.2. Estudos de libertação em SBF

No que diz respeito aos estudos de libertação em SBF pH 7,4, observou-se o mesmo comportamento anteriormente registado para as fluoroquinolonas em PBS. Os valores são concordantes a menos do erro experimental determinado em 1.4.

A análise da figura 30 permite-nos determinar a percentagem de fluoroquinolona que se mantém encapsulada no interior dos lipossomas após o fim dos estudos de libertação, em SBF. Com base nos valores de encapsulação máximos, determinados anteriormente no ponto 1.3, e os valores obtidos nos estudos de libertação foi possível calcular a percentagem de fármaco que se mantém retida dentro dos lipossomas após 60 min em contacto com o meio de libertação.

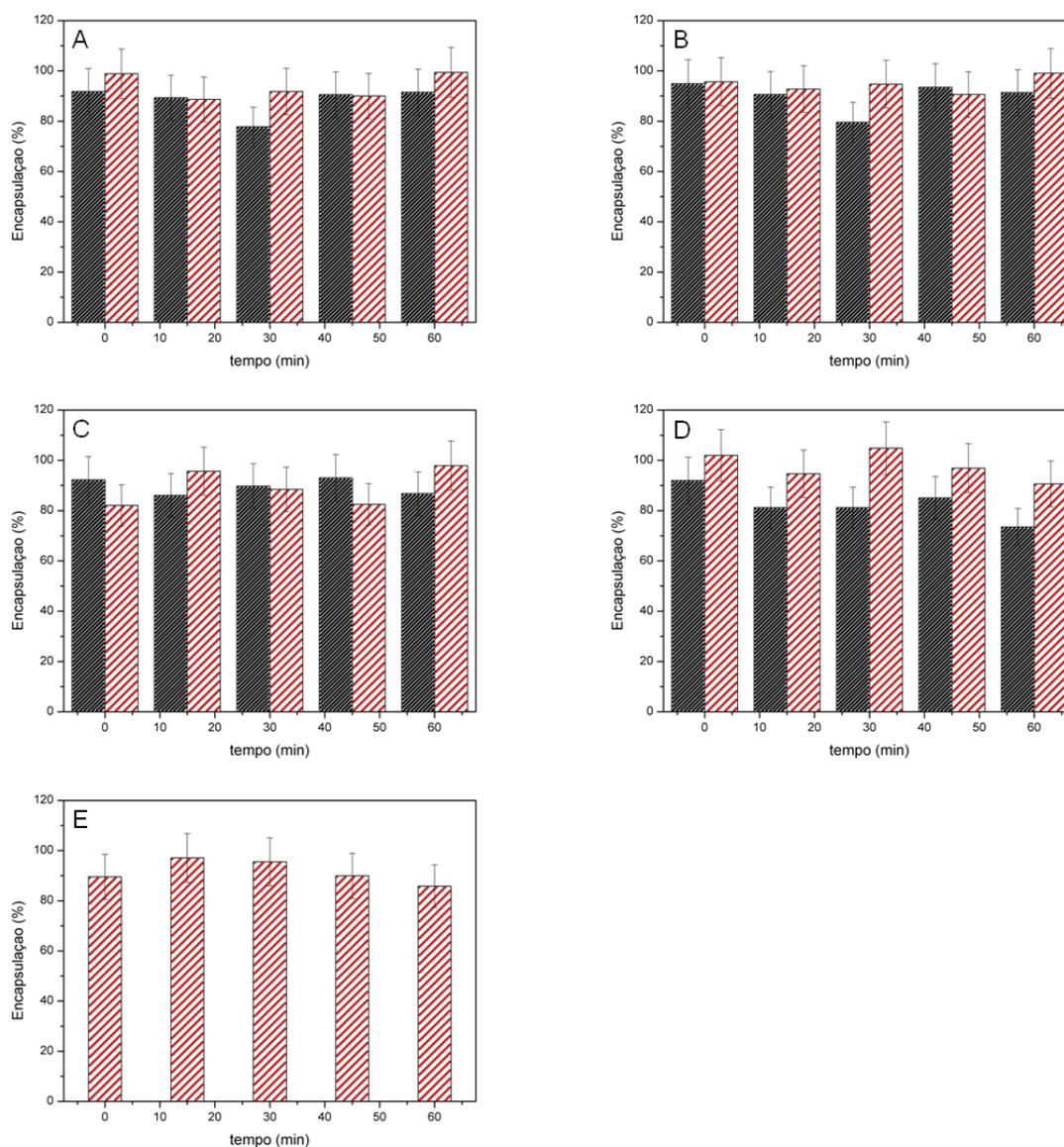


Figura 30 – Estudos de libertação de (A) Cpx, (B) NrX, (C) PfX, (D) LvX e (E) SpX em SBF pH 7,4, ao longo de 60 min, após encapsulação das mesmas em (////) NaCl 150 mmol.dm⁻³ ou (////) Sacarose 10%.

Para a encapsulação em NaCl observa-se uma percentagem de retenção do material encapsulado entre 88 e 93% enquanto para os estudos em sacarose a percentagem de retenção encontra-se entre 89 e 98%. De acordo com os valores determinados, apresentados na tabela 9, é possível verificar que estudos de encapsulação onde a incubação foi realizada em sacarose possuem uma retenção do material encapsulado, em SBF, ligeiramente superior à retenção observada para os estudos em NaCl. No entanto, uma vez que os valores se encontram dentro do erro associado, embora exista uma retenção superior, é possível concluir que as diferenças

verificadas não são significativas em termos de libertação entre a encapsulação em NaCl ou Sacarose. Os valores determinados encontram-se resumidos na tabela 9.

Tabela 9 – Percentagem de retenção (%) das diferentes fluoroquinolonas, em SBF pH 7,4, de acordo com o meio de encapsulação. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.

	% média retenção (NaCl)	% média retenção (sacarose)
Cpx	88,2	93,5
Nrx	92,6	94,6
Pfx	89,5	89,3
Lvx	82,6	97,8
Spx	-----	92,6

Comparando os valores apresentados nas tabelas tabela 8 e tabela 9 é possível afirmar, que em ambos os meios de libertação, as fluoroquinolonas encapsuladas em lipossomas de SPPC:Colesterol (e diferentes meios de encapsulação) adotam praticamente o mesmo comportamento durante os primeiros 60 min, relativamente à retenção do material encapsulado. Pode-se igualmente afirmar que durante este período, não existe qualquer influência do meio de libertação nas propriedades de retenção do sistema SPPC:Colesterol.

A pequena libertação observada, para o sistema lipídico utilizado (SPPC:Col), deve-se ao sal escolhido para a criação do gradiente transmembranar: sulfato de amónio. De acordo com a literatura, a libertação de fármacos do interior dos lipossomas depende, entre outros fatores, do contra-íão associado [66, 67]. O contra-íão utilizado permite controlar a estabilidade de encapsulação e o perfil e cinética de libertação de fármacos (com características de base fraca) do interior dos lipossomas para o meio externo [67].

Para substâncias com características de bases fracas anfipáticas, como as fluoroquinolonas, a libertação é menor quando se utiliza sais de amónio para estabelecer o gradiente [66]. No que diz respeito ao contra-íão, de entre os aniões de baixo peso molecular (orgânicos e inorgânicos) utilizados em estudos de encapsulação através do catião amónio, a estabilidade da encapsulação, ou seja, a retenção do material encapsulado, é maior para o anião sulfato [67].

Considerando que o gradiente transmembranar foi estabelecido, para todos os estudos de encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas, através de sulfato de amónio, os resultados obtidos para a libertação das fluoroquinolonas em PBS e SBF

encontram-se de acordo com a literatura, uma vez que a libertação, durante um período de 60 min, foi muito pequena.

2. Síntese e caracterização de complexos ternários Cobre (II), fluoroquinolonas e 1,10-fenantrolina

Os complexos ternários de fluoroquinolonas, Cu(II) e 1,10-fenantrolina foram obtidos como sólidos cristalinos ou amorfos e com cores características do ião de metal utilizado. Os complexos obtidos são hidratados, com diferentes graus de hidratação, e encontram-se na razão metal:ligandos 1:1:1.

Os resultados de análise elementar obtidos permitiram a determinação das percentagens de erro associadas a cada elemento, por comparação com os valores calculados teoricamente (tabela 10), assim como uma previsão da estrutura do complexo de metal.

Tabela 10 – Percentagens de C, H, N e S e rendimento calculados e obtidos para os complexos de metal sintetizados.

Complexo	C (%)	H (%)	N (%)	Rendimento (%)
	Teor. (Exp)	Teor. (Exp)	Teor. (Exp)	
CuNrxPhen ($M_M=642,09 \text{ g.mol}^{-1}$)	52,4 (51,7)	4,24 (4,21)	13,1 (12,9)	81,0
CuSpxPhen ($M_M=769,21 \text{ g.mol}^{-1}$)	48,4 (48,0)	4,85 (4,83)	12,8 (12,6)	83,3
CuOfxPhen ($M_M=720,16 \text{ g.mol}^{-1}$)	50,0 (50,0)	4,62 (4,58)	11,7 (11,8)	69,4
CuLvxPhen ($M_M=720,16 \text{ g.mol}^{-1}$)	50,7 (50,6)	4,54 (4,51)	11,8 (11,9)	64,0
CuPfxPhen ($M_M=692,15 \text{ g.mol}^{-1}$)	50,3 (50,1)	4,94 (4,85)	12,1 (12,0)	61,2
CuCpxPhen ($M_M=726,17 \text{ g.mol}^{-1}$)	48,0 (48,3)	4,86 (4,83)	11,6 (11,5)	75,8
CuLmxPhen ($M_M=728,16 \text{ g.mol}^{-1}$)	47,8 (48,5)	4,71 (4,85)	11,5 (11,7)	66,1
CuMfxPhen ($M_M=787,25 \text{ g.mol}^{-1}$)	50,4 (50,6)	5,12 (5,37)	10,7 (10,5)	61,4
CuPrxPhen ($M_M=858,30 \text{ g.mol}^{-1}$)	46,2 (46,4)	4,58 (4,57)	9,8 (10,9)	63,0
		S(%)	3,74 (4,14)	

De acordo com os resultados apresentados na tabela anterior é possível prever qual a fórmula de estrutura de cada complexo de metal. De acordo com as propriedades físico-químicas das fluoroquinolonas sabe-se que os grupos carboxilo e carbonilo (na posição 3 e 4 no núcleo base, respetivamente) constituem um local de coordenação para iões divalentes enquanto a 1,10-fenantrolina, sendo um ligando heterocíclico dador de azoto, irá coordenar ao cobre através dos átomos de azoto presentes na sua estrutura. A análise da tabela 10 permitiu a sugestão da estrutura de cada complexo sintetizado. Assim, de uma forma geral, a complexação de fluoroquinolonas e fenantrolina ao ião divalente Cu^{2+} originará a seguinte estrutura (figura 31):

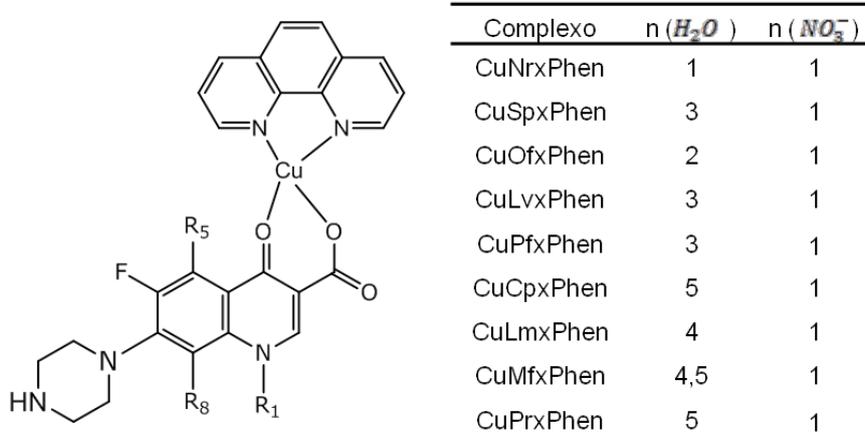


Figura 31 – Estrutura prevista para os complexos de cobre (II), fluoroquinolona e 1,10-fenantrolina, com base nos resultados obtidos por análise elementar.

As percentagens de erro obtidas, associadas a cada elemento, permitiram concluir que a síntese dos complexos de cobre com fluoroquinolonas e 1,10-fenantrolina foi bem sucedida e com rendimentos elevados com a exceção, apenas, do complexo ternário de cobre da fluoroquinolona prulifloxacina.

2.1. Caracterização por Espectroscopia de Ultravioleta-Visível

Os espectros de ultravioleta-visível das fluoroquinolonas, 1,10-fenantrolina e respetivos complexos, obtidos em solução aquosa estão apresentados na figura 32. De acordo com os diagramas de distribuição consultados [65, 90, 112, 115], nas concentrações utilizadas, os espectros observados correspondem ao complexo ternário cobre:fluoroquinolona:1,10-fenantrolina.

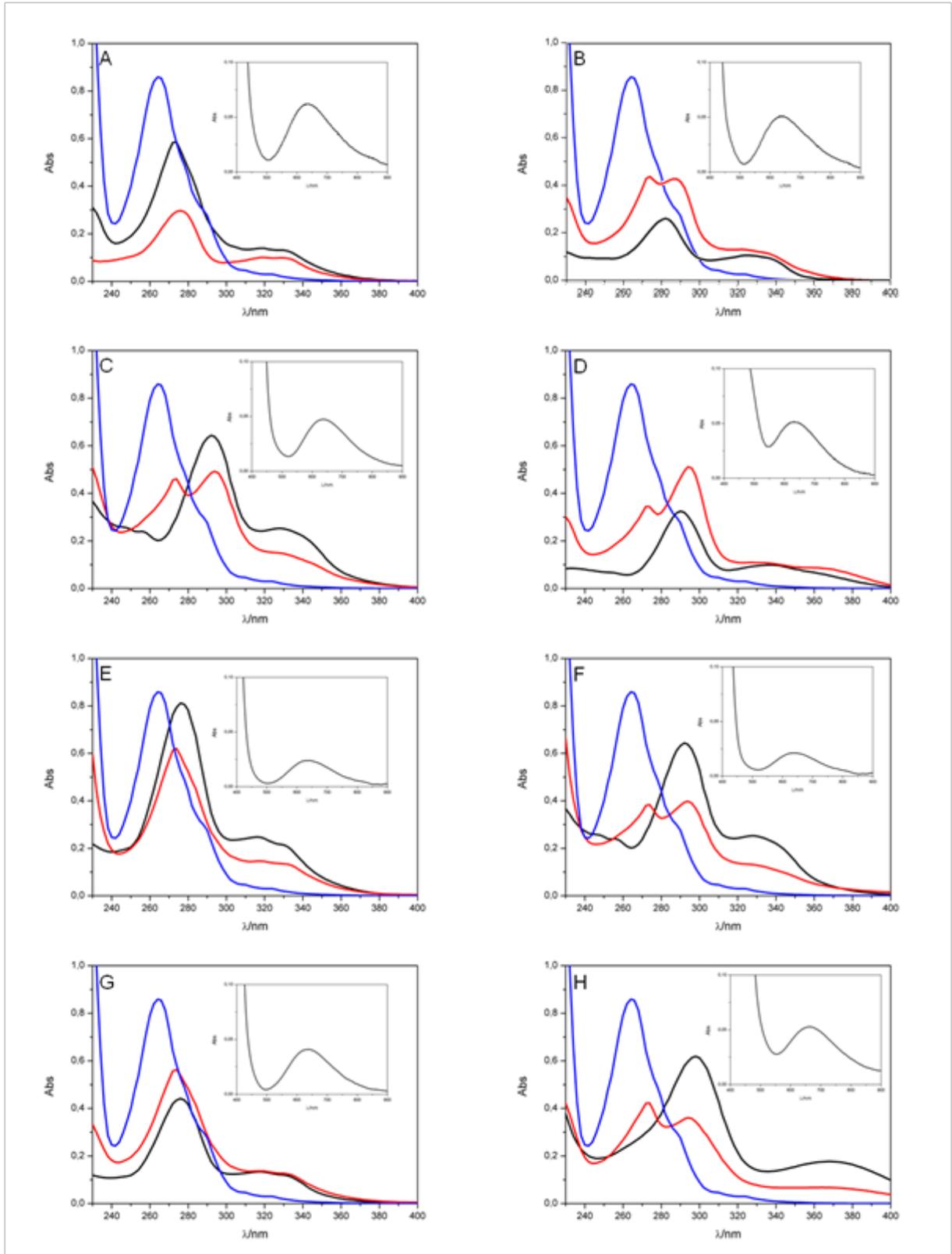


Figura 32 – Espectros de UV-Vis de (—) 1,10-fenantrolina, (—) fluoroquinolonas ($\sim 10^{-5}$ mol.dm $^{-3}$) e (—) respetivos complexos de cobre (CuIqphen $\sim 10^{-5}$ mol.dm $^{-3}$): (A) Cpx (B) Lmx (C) Lvx (D) Mfx (E) Nr (F) Ofx (G) Pfx e (H) Sp. Os espectros inseridos em cada gráfico correspondem à banda de transição d-d do respetivo complexo de metal ($\sim 10^{-3}$ mol.dm $^{-3}$).

No que diz respeito aos espectros das fluoroquinolonas, é possível observar a presença das suas bandas características a [270-298 nm] e [~320-340 nm] [116, 117]. A 1,10-fenantrolina, em solução aquosa, apresenta uma banda bem definida a 264 nm.

Para os complexos é possível observar um desvio do comprimento de onda máximo, tanto das fluoroquinolonas como da 1,10-fenantrolina. Embora os espectros de UV-Vis dos complexos de metal sintetizados sejam semelhantes aos dos ligandos (fármacos e fenantrolina) a presença dos desvios indica a coordenação entre os ligandos e o metal permitindo-nos distinguir entre os diferentes espectros.

A 1,10-fenantrolina (phen) sofre, em todos os complexos sintetizados, um desvio batocrómico de aproximadamente 10 nm. Nos espectros dos complexos ternários dos fármacos cpx, nrx, pfx e spx existe um desvio hipsocrómico do seu comprimento de onda máximo quando complexado ao metal. Assim, para os complexos apresentados na figura 32A, E, G e H temos um desvio batocrómico mencionado anteriormente para a phen, um desvio hipsocrómico de 6 nm para a spx e de 2 nm para os restantes fármacos mencionados.

Os restantes complexos (figura 32B, C, D e F) no que diz respeito à banda da fluoroquinolona, sofrem um desvio batocrómico, ao contrário do observado anteriormente, de 2 nm para a lvx e ofx, de 4 nm para a mfx e de 6 nm para a lmx.

Todos os complexos apresentados na figura 32 apresentam uma banda na zona do visível [620-662 nm] que, de acordo com a literatura, é característica de compostos de Cu(II) com geometria piramidal de base quadrada, sugerindo que o cobre estará penta-coordenado com os átomos de azoto presentes na phen e os oxigénios do grupo carbonilo e carboxilo, sendo a quinta coordenação "reservada" a moléculas de água ou iões nitrato [116].

A tabela 11 apresenta os valores de comprimento de onda para as bandas verificadas nos espectros na figura 32:

Tabela 11 – Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ observados para os ligandos phen, as diferentes fluoroquinolonas e respetivos complexos ternários.

	IL (nm)		d-d (nm)	
phen	264			
Cpx	276		318	
CuCpxPhen	274		320	636
Lmx	282		324	
CuLmxPhen	274	288	322	642
Lvx	292		328	
CuLvxPhen	274	294	~328	638
Mfx	290		338	
CuMfxPhen	272	288	326	634
Nrx	276		316	
CuNrxPhen	274		318	636
Ofx	292		328	
CuOfxPhen	274	294	~328	636
Pfx	276		318	
CuPfxPhen	274		318	
Spx	298		368	
CuSpxPhen	274	294	364	656

IL- Intraligando; d-d- transições d-d

No que diz respeito à estabilidade das soluções aquosas, após armazenamento (30 dias), os seus espectros não apresentavam quaisquer alterações permitindo afirmar que estes são estáveis ao longo do tempo.

Como no processo de encapsulação, em lipossomas, são necessárias temperaturas elevadas para que a encapsulação ocorra acima da temperatura de transição do lípido realizaram-se estudos da estabilidade, numa gama de temperaturas de 25 a 65°C, dos complexos formados. Uma vez que se pretende encapsular, posteriormente, os complexos sintetizados em lipossomas, os estudos de estabilidade (figura 33) permitiram-nos verificar se existiria degradação dos complexos com o aumento da temperatura.

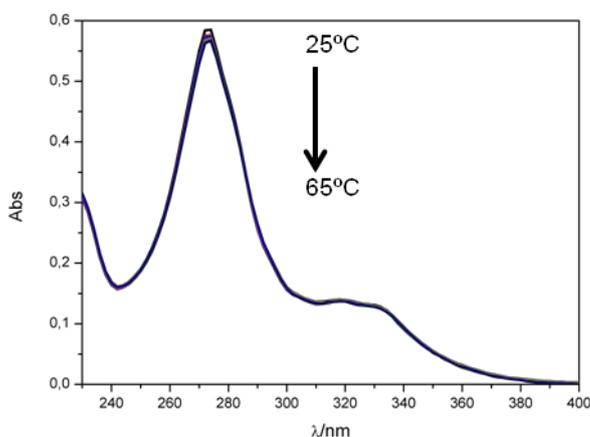


Figura 33 – Espectro de UV-Vis do complexo de metal Cucpxphen, em água, na gama de temperaturas 25-65°C.

Embora os estudos realizados evidenciem um ligeiro decréscimo da absorvância em função do aumento da temperatura, as diferenças espectrais (entre 25 e 65°C) são inferiores a 0,06 permitindo, deste modo, afirmar que os diferentes complexos são estáveis na gama de temperaturas contemplada como se pode ver pelo exemplo apresentado na figura anterior. Este comportamento espectral foi observado para todos os complexos ternários sintetizados.

Embora se tenha realizado a síntese de um complexo ternário de cobre (II), prlx e phen, a sua dissolução não foi possível em nenhum solvente que pudesse ser posteriormente utilizado em estudos de encapsulação em sistemas lipídicos. Devido às propriedades físico-químicas dos lípidos, a utilização de solventes orgânicos ou pH's extremos não é possível por levar à rutura das vesículas lipídicas ou alteração das suas propriedades membranares, como a fluidez ou permeabilidade.

2.2. Espectroscopia de Infravermelho

A análise dos espectros de Infravermelho, permitiu obter informações sobre o modo de coordenação entre os ligandos e o ião metálico. No entanto, devido à presença de diversos grupos funcionais, a análise dos espectros baseou-se nas suas vibrações mais características, estando a região de maior importância compreendida entre 1800 e 1300 cm^{-1} [117].

Todas as fluoroquinolonas possuem bandas características de vibrações de estiramento para o grupo carboxilo $\nu(\text{C}=\text{O})_c$ a $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ e para o grupo carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})_p$ a $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$. Em todos os complexos sintetizados, a banda correspondente ao estiramento C=O do grupo carboxilo (seta apresentada na figura 34A) desapareceu

aquando da formação do complexo e foi substituída por duas bandas características, designadas por estiramento assimétrico ($\nu(\text{C=O})_{\text{assim}} \sim 1550\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$) e estiramento simétrico ($\nu(\text{C=O})_{\text{sim}} \sim 1472\text{-}1384 \text{ cm}^{-1}$) indicando a sua desprotonação e possível coordenação ao íon metálico.

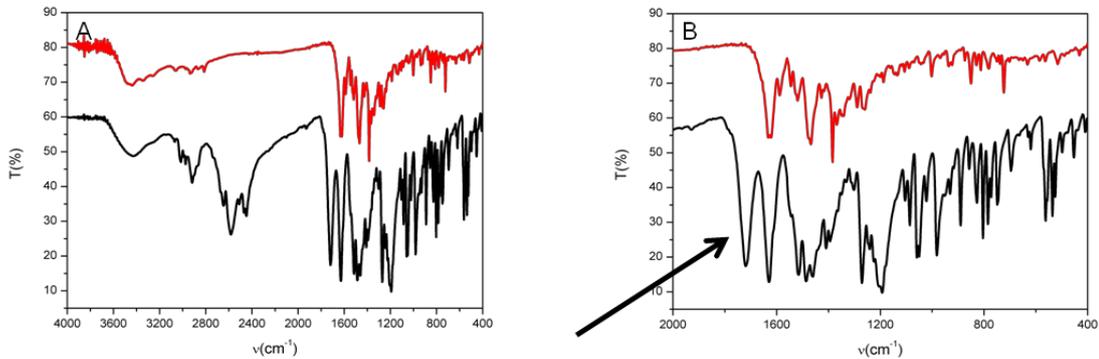


Figura 34 – Espectro de infravermelho da fluoroquinolona (—) pefloxacina e do seu complexo de metal (—) Cupfxphen. A seta demonstra a presença da vibração de estiramento (C=O) característica do grupo carboxilo presente na posição 3 das fluoroquinolonas. No espectro do respetivo complexo de metal a banda não se encontra presente.

Na tabela 12 encontram-se resumidas todas as atribuições feitas aos sinais mais relevantes nos espectros de Infravermelho traçados.

Tabela 12 – Frequências de vibração dos grupos funcionais característicos presentes nos ligandos e complexos de metal sintetizados.

	$\nu(\text{C=O})_c$	$\nu(\text{C=O})_p$	$\nu(\text{O-C-O})_{\text{assim}}$	$\nu(\text{O-C-O})_{\text{sim}}$	Δ
Cpx	1700	1622			
Cucpxphen		1628	1610	1472	138
Lmx	1722	1612			
Culmxphen		1616	1582	1458	124
Lvx	1725	1621			
Culvxphen		1628	1589	1384	205
Oflx	1714	1622			
Cuofxphen		1624	1613	1384	229
Mfx	1704	1622			
Cumfxphen		1622	1576	1454	122
Nrx	1734	1624			
Cunrxphen	-----	1631	1588	1384	204
Pfx	1719	1629			
Cupfxphen		1632	1621	1384	237
Spx	1717	1641			
Cuspxphen		1636	1576	1384	192
Prlx	1716	1626			
Cuprlxphen		1600	1576	1374	202

$$\Delta = \nu(\text{OCO})_{\text{assim}} - \nu(\text{OCO})_{\text{sim}}$$

Estas variações espectrais, de acordo com $\nu(\text{OCO})_{\text{assim}} - \nu(\text{OCO})_{\text{sim}}$ indicam um modo de coordenação monodentada do grupo carboxilo [36, 62, 116-122]. As variações, de um modo geral, sugerem que as fluoroquinolonas coordenam ao ião metálico através do oxigénio do grupo carbonilo e um dos oxigénios do grupo carboxilo. Também é possível observar que entre 3500 e 3000 cm^{-1} , existe uma banda dividida, atribuída às vibrações de estiramento O-H e N-H de moléculas de água e átomos de azoto do grupo piperazina, respetivamente. A banda intensa que se verifica a $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ corresponde, igualmente, à vibração do grupo $\nu(\text{NO}_3)$ confirmando, deste modo, a presença de um grupo nitrato não coordenado ao metal.

2.3. Difração de Raio X

Alguns dos complexos ternários de Cu(II) com phen e diferentes fluoroquinolonas sintetizados foram caracterizados por métodos cristalográficos, nomeadamente difração de Raios-X de cristal único. Foram isolados, por evaporação controlada a partir misturas de água-etanol, cristais dos seguintes complexos: Cunrxphen, Cucpxphen, Culvxphen, Culmxphen, Cupfxphen e Cuofxphen. As respetivas estruturas cristalinas foram confirmadas ou determinadas por difração de Raios-X. As estruturas cristalinas dos complexos Culvxphen e Culmxphen serão apresentadas em maior detalhe, sendo que as características estruturais dos restantes são semelhantes e estas apresentadas detalhadamente, salvo quando descrito o contrário.

Misturas de água:etanol de Cumfxphen e Cuspdxphen foram, de igual modo, colocadas sob evaporação controlada. No entanto, para Cumfxphen, o material cristalino obtido não difratava suficientemente para obter dados necessários à obtenção de uma estrutura, enquanto para Cuspdxphen nunca foi possível obter material com características cristalinas obtendo-se, apenas, material amorfo.

2.3.1. Culvxphen

A estrutura do complexo Culvxphen revelou a formação de um complexo de Cu(II) catiónico com os dois ligandos (lvx e phen), sendo formulado como $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (figura 35). A estrutura cristalina foi determinada no sistema triclinico e no grupo espacial quiral P1 (os detalhes sobre os dados de aquisição cristalográficos e de refinamento estrutural encontram-se descritos na parte experimental e na tabela 2) com a unidade assimétrica (asu) composta por dois catiões $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$ independentes cristalograficamente, dois aniões NO_3^- e quatro moléculas de água não coordenadas (figura 36). Uma vez que os dois complexos cristalograficamente independentes apresentam características idênticas, a discussão estrutural será focada no complexo catiónico que contém o centro Cu1. As distâncias e ângulos das ligações envolvendo os dois centros de Cu(II), Cu1 e Cu2, apresentam-se sumarizados na tabela 13. A estrutura molecular do complexo catiónico $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+$ encontra-se representada na figura 35a. O centro Cu1 coordena a um ligando lvx, o qual apresenta um comportamento desprotonado bidentado e liga-se ao metal através do oxigénio do grupo piridinona e de um oxigénio do grupo carboxilato,

a uma phen e a uma molécula de água. É um centro com número de coordenação cinco $\{CuN_2O_3\}$ e apresenta uma geometria piramidal quadrada com ligeira distorção. O plano equatorial (basal) é formado por dois átomos de oxigénio (O1 e O2) da lvx e dois átomos de Azoto (N1 e N2) do ligando phen, enquanto o átomo de oxigénio (O1W) da molécula de água ocupa a posição axial (figura 35b). As distâncias Cu1–N e Cu1–O no plano basal variam entre 1,898(4) e 2,000(5) Å, mas a distância da ligação Cu1–O1W no eixo axial é consideravelmente mais longa, 2,262(5) Å. Os ângulos N/O–Cu1–O/N *cis* e *trans* encontram-se nos intervalos 82,2(2)-101,4(2)° e 168,5(2)-168,9(2)°, respetivamente. Convém salientar que o Cu1 apresenta apenas um ligeiro desvio de 0,1715(5) Å relativamente ao plano médio definido através dos quatro átomos do plano equatorial na direção da molécula de água coordenada. De facto, o índice de trigonalidade [$\tau = (\varphi_1 - \varphi_2)/60^\circ$, onde φ_1 e φ_2 representam os ângulos maiores da esfera de coordenação; $\tau = 0$ para uma pirâmide quadrangular perfeita, e $\tau = 1$ no caso de uma bi-pirâmide trigonal perfeita], $\tau = (168,9^\circ - 168,5^\circ)/60^\circ = 0,007$, confirma, claramente, que o centro Cu(II) apresenta uma geometria piramidal quadrada quase perfeita [123].

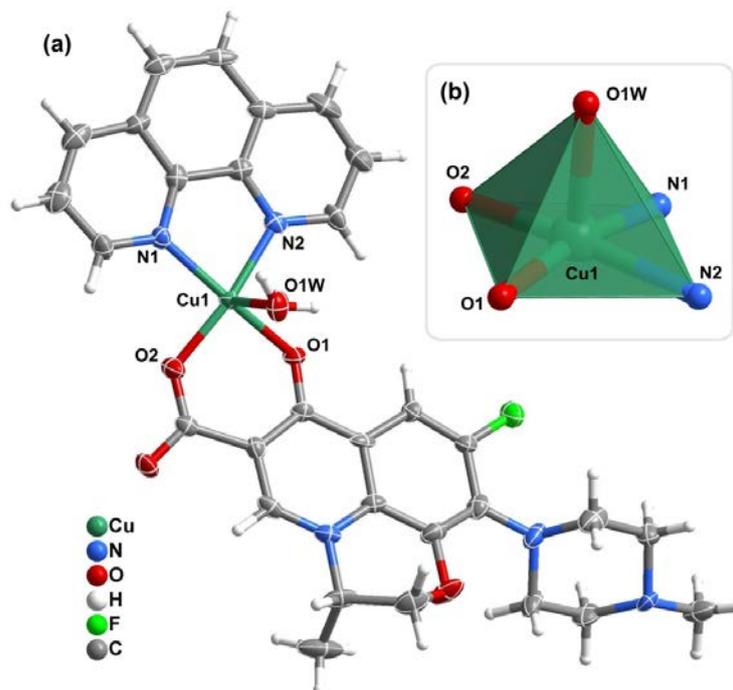


Figura 35 – (a) Representação esquemática do complexo catiónico $[Cu(lvx)(phen)(H_2O)]^+$, com esquema de identificação de todos os átomos do ambiente de coordenação do Cu(II) e (b) o centro de coordenação $\{CuN_2O_3\}$ com uma geometria piramidal quadrada ligeiramente distorcida.

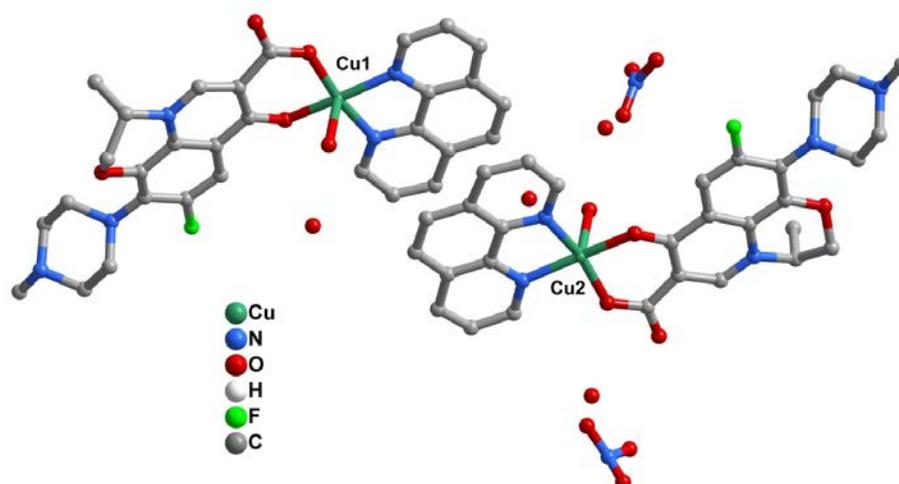


Figura 36 – Representação da unidade assimétrica da estrutura cristalina do composto $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio.

Tabela 13 – Comprimentos de ligação (em Å) e ângulos (em graus) nos ambientes de coordenação do Cobre observados na estrutura de $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Cu1–O2	1,898(4)	Cu2–O6	1,910(4)
Cu1–O1	1,941(4)	Cu2–O5	1,949(4)
Cu1–N1	1,987(5)	Cu2–N6	2,006(5)
Cu1–N2	2,000(5)	Cu2–N7	2,023(6)
Cu1–O1W	2,262(5)	Cu2–O2W	2,241(4)
O2–Cu1–O1	92,37(18)	O6–Cu2–O5	94,01(18)
O2–Cu1–N1	91,3(2)	O6–Cu2–N6	165,81(19)
O2–Cu1–N2	168,9(2)	O6–Cu2–N7	89,3(2)
O2–Cu1–O1W	94,47(19)	O6–Cu2–O2W	94,94(19)
O1–Cu1–N1	168,5(2)	O5–Cu2–N6	92,82(19)
O1–Cu1–N2	92,3(2)	O5–Cu2–N7	170,8(2)
O1–Cu1–O1W	89,19(19)	O5–Cu2–O2W	87,87(18)
N1–Cu1–N2	82,2(2)	N6–Cu2–N7	82,2(2)
N1–Cu1–O1W	101,4(2)	N6–Cu2–O2W	97,73(19)
N2–Cu1–O1W	95,68(19)	N7–Cu2–O2W	100,45(19)

O empacotamento cristalino de complexos catiónicos mononucleares, mediado por numerosas ligações C–H \cdots O, ligações de hidrogénio C–H \cdots F fracas (não apresentadas) e interações $\pi\cdots\pi$ de empilhamento envolvendo os anéis de phen de complexos vizinhos (figura 37a), leva a espaços vazios visíveis ao longo da direção

[1 0 0] da célula unitária, que são ocupados pelos contra-íões NO_3^- e moléculas de água (figura 37b). Além disso, estes íões nitrato e as moléculas de água de cristalização têm um papel decisivo na estrutura cristalina estendida. Efetivamente, como se demonstra na figura 38, as moléculas de água de hidratação (não coordenadas) estão envolvidas numa série de interações de hidrogénio fortes e altamente direcionais $\text{O-H}\cdots\text{O}$ e $\text{O-H}\cdots\text{N}$ com as moléculas de água coordenadas, os átomos de oxigénio dos grupos carbonilo e carboxilo e os átomos de azoto do ligando lvx (figura 38a e tabela 14 para detalhes geométricos das ligações de hidrogénio).

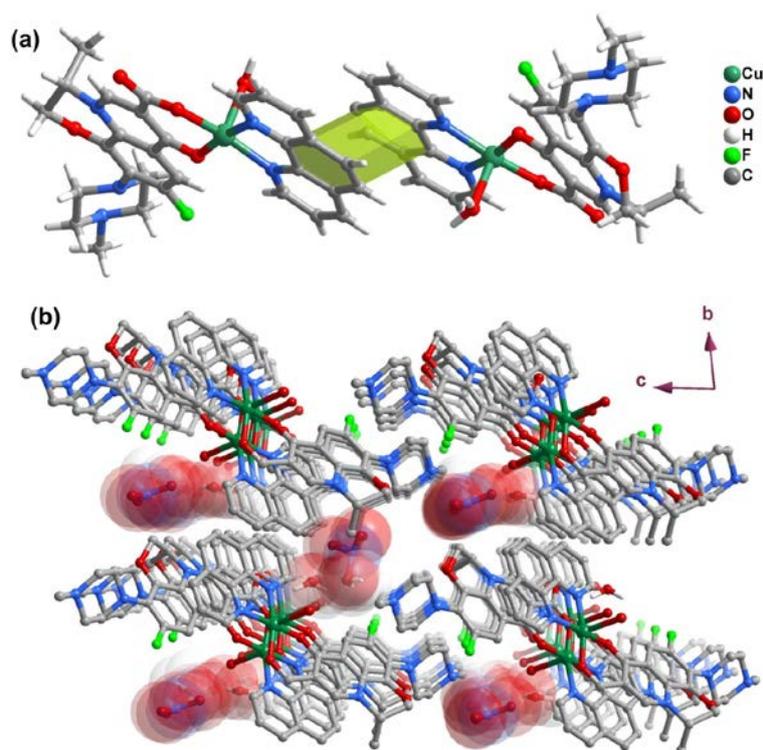


Figura 37 – **(a)** Representação das interações $\pi\cdots\pi$ de empilhamento (sombreado verde) envolvendo os anéis de phen de dois complexos vizinhos. **(b)** Representação esquemática do empacotamento cristalino dos complexos catiónicos (ball-and-stick) e moléculas de água de cristalização e aniões NO_3^- (space filling) de $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na perspetiva ao longo da direção cristalográfica [1 0 0] da célula unitária. Os átomos de hidrogénio foram omitidos por questões de simplicidade.

Uma característica significativa da estrutura cristalina do composto $[\text{Cu}(\text{lvx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ relaciona-se facto das ligações de hidrogénio $\text{O-H}\cdots\text{O}$ e $\text{O-H}\cdots\text{N}$ que interligando cada molécula de complexo às moléculas de água de cristalização e íões nitrato leva à formação de uma rede supramolecular 2D ligada através de átomos de hidrogénio (camadas), que se estende ao longo da direção [0 0 1] da célula unitária. Além disso, estas camadas individuais empacotam, firmemente, ao longo da direção [0 1 0], com a coesão estrutural deste arranjo

reforçada por várias ligações de hidrogénio fracas C–H...O (não representadas) envolvendo as camadas supramoleculares adjacentes (figura 38b).

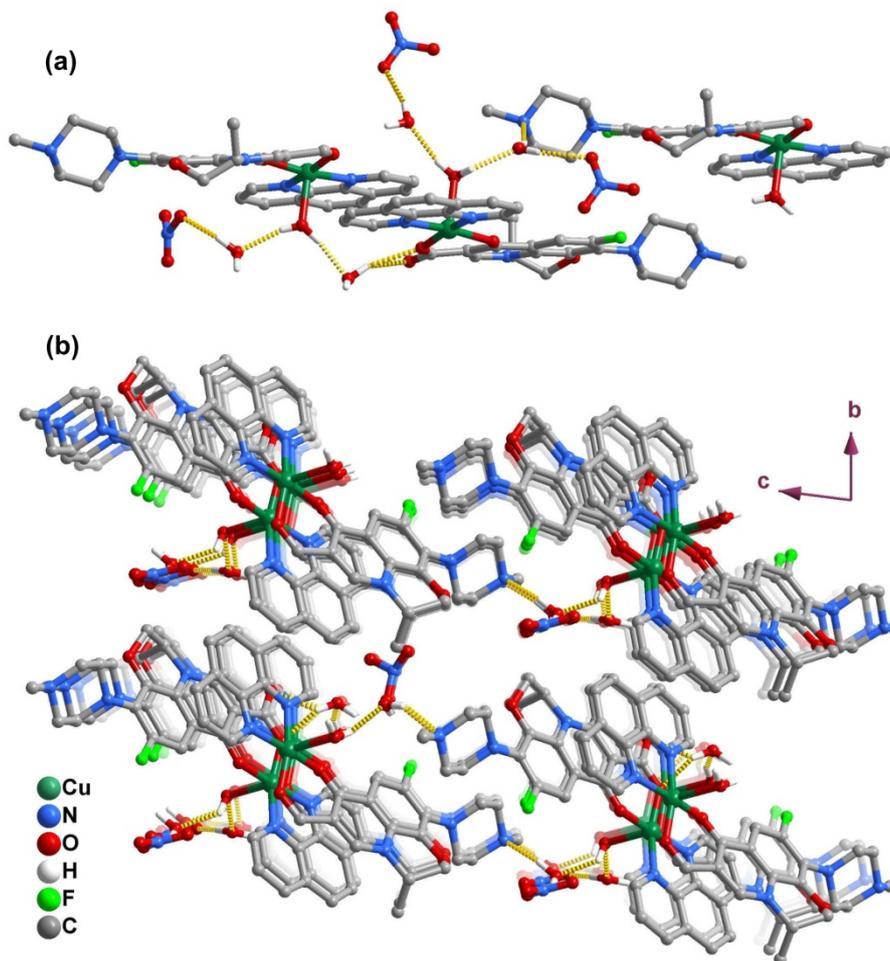


Figura 38 – (a) Representação esquemática das ligações de hidrogénio (tracejado dourado) presentes na estrutura cristalina de $[\text{Cu}(\text{IVx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: ligações de hidrogénio envolvendo os iões nitrato e todas as moléculas de água interligando complexos vizinhos e (b) Empacotamento de duas camadas de hidrogénio ao longo da direção $[0\ 1\ 0]$ da célula unitária. Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio.

Na tabela 14 encontram-se sistematizados todos os detalhes relevantes acerca da geometria de ligação de hidrogénio.

Tabela 14 – Geometria de ligação de hidrogénio (distâncias em Å e ângulos em graus) para o complexo [Cu(Lvx)(phen)(H₂O)](NO₃)·2H₂O.

D–H...A	d(D–A)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O1W–H1W...O6W ⁱ	0,914(14)	1,89(3)	2,739(8)	154(6)
O1W–H2W...O3W	0,76(5)	2,01(6)	2,748(7)	161(6)
O2W–H3W...O5W	0,878(19)	1,99(3)	2,808(7)	155(5)
O2W–H4W...O4W	0,892(19)	2,01(4)	2,752(7)	139(6)
O3W–H5W...O12 ⁱⁱ	0,90(2)	2,05(5)	2,801(9)	140(6)
O3W–H6W...N10 ⁱⁱⁱ	0,89(2)	1,96(5)	2,753(7)	147(6)
O4W–H7W...O11	0,88(2)	2,13(3)	2,962(10)	157(5)
O4W–H8W...N5 ^{iv}	0,897(19)	1,94(3)	2,807(7)	161(6)
O5W–H9W...O10 ^v	0,91(2)	1,97(3)	2,861(8)	164(5)
O5W–H10W...O3 ^v	0,89(2)	1,98(2)	2,869(7)	170(6)
O6W–H11W...O6	0,89(2)	2,36(4)	3,155(6)	149(6)
O6W–H11W...O7	0,89(2)	2,06(5)	2,801(7)	141(6)

Transformações, de simetria, utilizadas para gerar átomos equivalentes:

- (i) $x+1, y-1, z$; (ii) $x, y-1, z$; (iii) $x, y-1, z-1$; (iv) $x, y+1, z+1$; (v) $x-1, y, z$;
 (vi) $x-1, y+1, z$;

2.3.2. Culmxphen

A determinação da estrutura cristalina do composto Culmxphen confirma a formação de um complexo neutro com ambos os ligandos: [Cu(lmx)(phen)(NO₃)]·5H₂O. Neste caso, a estrutura foi determinada no grupo especial monoclinico $P2_1/c$ (os detalhes sobre os dados de aquisição cristalográficos e de refinamento estrutural encontram-se descritos na parte experimental e tabela 2), com a asu contendo um único complexo [Cu(lmx)(phen)(NO₃)] e cinco moléculas de água de cristalização (não coordenadas) ocupando seis posições possíveis. A figura 39 mostra a estrutura molecular do complexo [Cu(lmx)(phen)(NO₃)], o qual revela apenas um centro de Cu(II) coordenado a um ligando lmx, uma phen e um anião NO₃⁻. Tal como foi descrito para o complexo anterior, Culvxphen, a lmx encontra-se desprotonada e atua como ligando bidentado (une-se ao metal através de um átomo de oxigénio da piridinona e outro do grupo carboxilato). Consequentemente, o Cu1 resulta num centro

com coordenação cinco, $\{CuN_2O_3\}$, cuja geometria se assemelha a uma pirâmide quadrangular: os dois átomos de azoto (N1 e N2) do ligando phen e os dois átomos de oxigénio (O1 e O3) do ligando lmx formam o plano equatorial, e um átomo de oxigénio (O4) do anião NO_3^- ocupa a posição axial (figura 39). De facto, o valor do índice de trigonalidade é praticamente nulo ($\tau = 0.021$) confirmando que esta geometria do centro de cobre é quase perfeita [123]. Enquanto as distâncias Cu1–N e Cu1–O no plano equatorial variam entre 1,896(4) e 2,015(4) Å, a ligação Cu1–O4 da posição axial é consideravelmente mais longa, 2,319(5) Å. A ligeira distorção do ambiente de coordenação do Cu(II) reflete-se nos ângulos internos *cis* e *trans* N/O–Cu1–O/N, e encontram-se nos intervalos 89,25(17)-94,7(2)° e 169,82(18)-171,07(17)°, respetivamente (tabela 15). Novamente, tal como para *Culvxphen* o Cu1 encontra-se, praticamente ao mesmo nível do plano médio definido através dos quatro átomos do plano equatorial, uma vez apenas apresenta um ligeiro desvio de 0,1287(8) Å relativamente a este plano, na direção do átomo de oxigénio do anião nitrato coordenado.

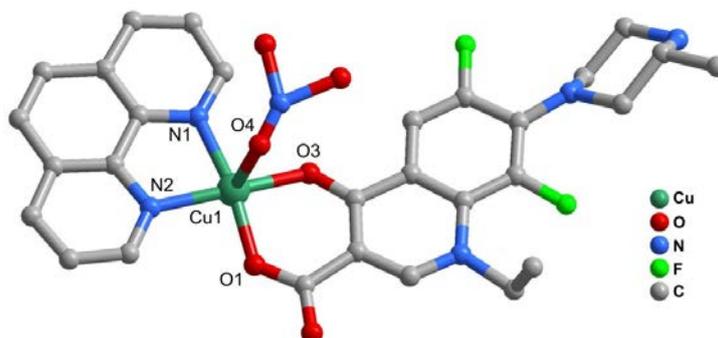


Figura 39 – Representação esquemática da estrutura cristalina do complexo neutro $[Cu(lmx)(phen)(NO_3)]$ com esquema de identificação de todos os átomos do ambiente de coordenação do Cu(II). Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio. Dados sobre os comprimentos de ligação e ângulos do centro de coordenação C1 encontram-se na tabela 15.

Tabela 15 - Comprimentos de ligação (em Å) e ângulos (em graus) nos ambientes de coordenação do Cobre observados na estrutura do complexo [Cu(lmx)(phen)(NO₃)].

Cu1–O1	1,896(4)	O1–Cu1–O3	93,65(16)
Cu1–O3	1,945(3)	O1–Cu1–N1	169,82(18)
Cu1–N1	2,011(4)	O1–Cu1–N2	89,25(17)
Cu1–N2	2,015(4)	O1–Cu1–O4	94,7(2)
Cu1–O4	2,319(5)	O3–Cu1–N1	93,60(16)
		O3–Cu1–N2	171,07(17)
		O3–Cu1–O4	90,18(17)
		N1–Cu1–N2	82,55(18)
		N1–Cu1–O4	92,4(2)
		N2–Cu1–O4	98,00(18)

Os complexos [Cu(lmx)(phen)(NO₃)] adjacentes interagem através de interações $\pi\cdots\pi$ de empilhamento entre os anéis de phen e os grupos aromáticos dos ligandos lmx [distâncias Cg \cdots Cg de 3,7855(1) e 3,6605(1) Å], originando entidades diméricas num arranjo antiparalelo (rodado cerca 180°; figura 40a). Além disso, os complexos encontram-se envolvidos em numerosas ligações C–H \cdots O, C–H \cdots N e ligações de hidrogénio fracas C–H \cdots F (não representadas) originando um empacotamento cristalino geral com “largos” canais, claramente evidentes ao longo da direção [1 0 0] da célula unitária (figura 40b). Estes túneis, unidimensionais, encontram-se ocupados pela moléculas de água de cristalização, que por sua vez, se encontram envolvidas numa extensa rede de ligações de hidrogénio fortes e altamente direcionais O–H \cdots O e N–H \cdots O com os aniões nitrato coordenados, os átomos de oxigénio dos grupos carbonilo e carboxilo e ainda, os átomos de azoto dos ligandos lmx (ligações de hidrogénio não representadas). Tipicamente as distâncias O \cdots O e O \cdots N destas interações de carácter forte encontram-se entre 2,803(1) e 3,009(1) Å originando, por fim, uma rede de ligações de hidrogénio supramolecular tridimensional.

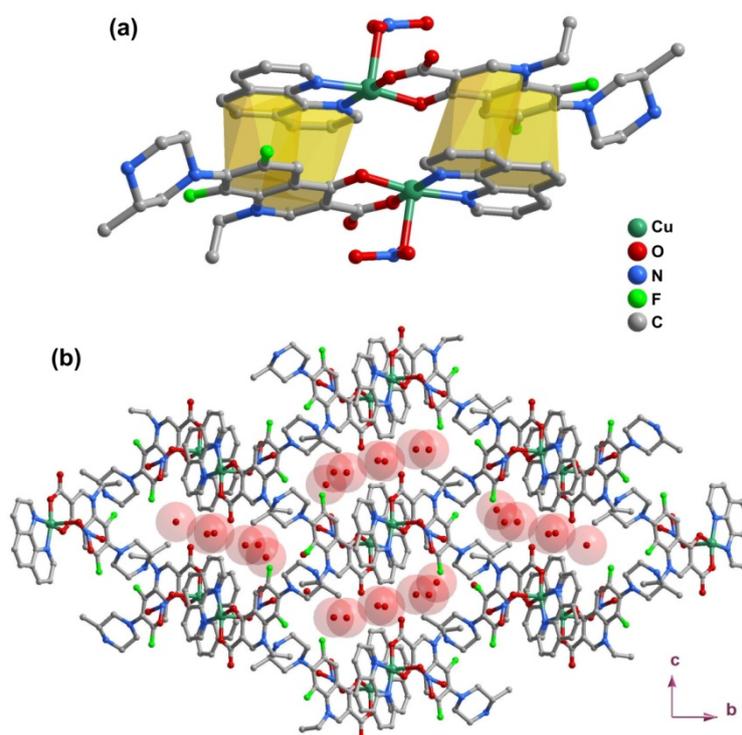


Figura 40 – (a) Interações $\pi\cdots\pi$ de empilhamento (sombreado amarelo) envolvendo os anéis de phen e os anéis aromáticos dos ligando lmx de dois complexos vizinhos e (b) representação esquemática do empacotamento cristalino de $[\text{Cu}(\text{lmx})(\text{phen})(\text{NO}_3)]\cdot 5\text{H}_2\text{O}$: complexo ternário (*ball-and-stick*) e moléculas de água de cristalização (*space filling*), vistas da direção $[1\ 0\ 0]$ da célula unitária. Os átomos de hidrogénio foram omitidos por questões de simplicidade.

Relativamente aos restantes complexos estudados neste trabalho, os dados cristalográficos (adquiridos ou consultados na literatura) confirmam a formação de complexos ternários catiónicos com phen e fluoroquinolonas, distintas, de segunda geração: $[\text{Cu}(\text{nrx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - (*Cunrxphen*), $[\text{Cu}(\text{cpx})(\text{phen})](\text{NO}_3)\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - (*Cucpxphen*), $[\text{Cu}(\text{erx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - (*Cuerxphen*) e $[\text{Cu}(\text{ofx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - (*Cuofxphen*). As estruturas moleculares destes quatro complexos de Cu(II) catiónicos encontram-se representados na figura 41 e revelam características de coordenação semelhantes entre si e também idênticas às detalhadas para os dois complexos anteriores. Os centros de Cu(II) são centros penta-coordenados, com uma geometria que se assemelha a uma pirâmide quadrada ligeiramente distorcida. Nos complexos *Cunrxphen*, *Cuerxphen* e *Cuofxphen*, as fluoroquinolonas comportam-se como ligandos bidentados desprotonados, coordenando ao Cu(II) através dos oxigénios do grupo carbonilo e carboxilo. O centro de coordenação é completado pelos átomos de azoto da phen e por uma molécula de água, $\{\text{CuN}_2\text{O}_3\}$. Dois átomos de oxigénio do ligando fluoroquinolona e dois átomos de azoto da phen formam o plano basal (equatorial) da pirâmide quadrada enquanto os

átomos de oxigénio (O1W) da molécula de água estão posicionados axialmente. Como é típico em complexos estruturalmente análogos, as distâncias Cu–O e Cu–N no plano basal encontram-se nos intervalos 1,898(4)-2,000(5) Å e 1,898(4)-2,000(5) Å, respetivamente, enquanto a ligação Cu–O(água) é consideravelmente mais longa [2,262(5) to 2,262(5) Å]. Além disso, os ângulos *cis* e *trans* N/O–Cu1–O/N situam-se nos intervalos 82,2(2)-101,4(2)° e 168,5(2)-168,9(2)° respetivamente [61, 89, 116, 124].

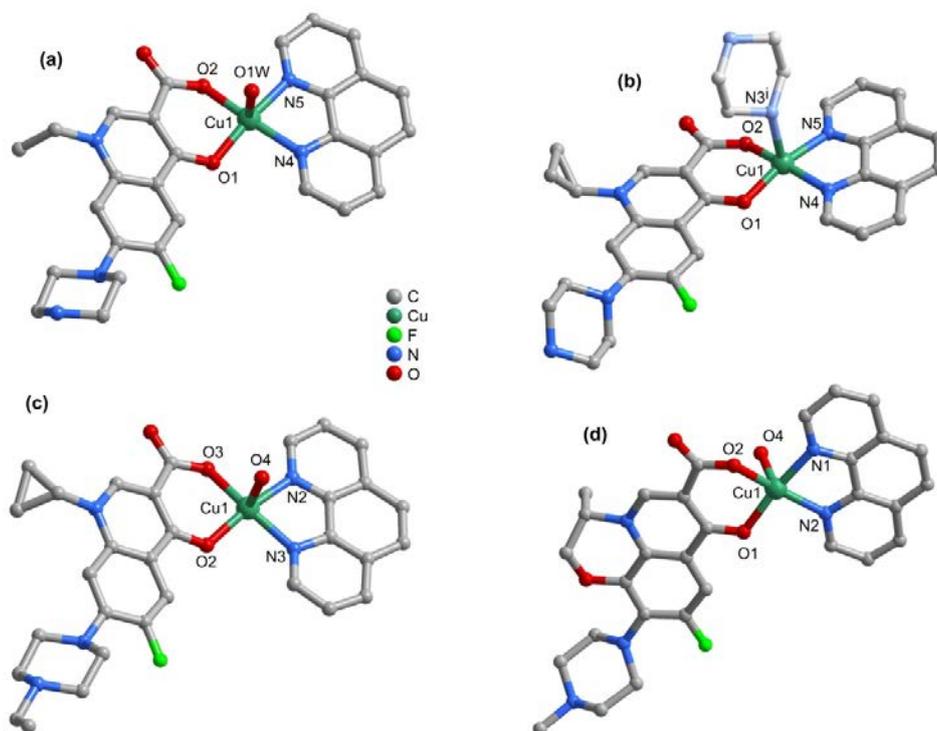


Figura 41 – Representação esquemática das estruturas cristalinas dos complexos ternários cationicos com fluoroquinolonas de 2ª geração **(a)** [Cu(nrx)(phen)(H₂O)](NO₃)·3H₂O (Cunrxphen), **(b)** [Cu(cpx)(phen)](NO₃)·4H₂O (Cucpxphen), **(c)** [Cu(erx)(phen)(H₂O)](NO₃)·2H₂O (Cuernphen) e **(d)** [Cu(ofx)(phen)(H₂O)](NO₃)·2H₂O (Cuofxphen) e esquema de identificação de todos os átomos do ambiente de coordenação do Cu(II). Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio.

Contrastando com o que é observado para os restantes compostos, no complexo Cucpxphen as moléculas de cpx atuam como ligandos tridentados desprotonados, coordenando aos centros de Cu(II) através do oxigénio do grupo carbonilo, um dos oxigénios do grupo carboxilo e um azoto do grupo piperazina terminal, {CuN₂O₃} levando à formação de cadeias de coordenação unidimensionais (figura 42). O centro cristalográfico independente é, em última análise, penta-coordenado, revelando uma geometria piramidal quadrada ligeiramente distorcida, com os dois átomos de oxigénio do ligando cpx e dois átomos de azoto da phen no plano basal (equatorial) e o átomo

de azoto do anel piperazina de uma molécula cristalográfica de cpx equivalente na posição axial.

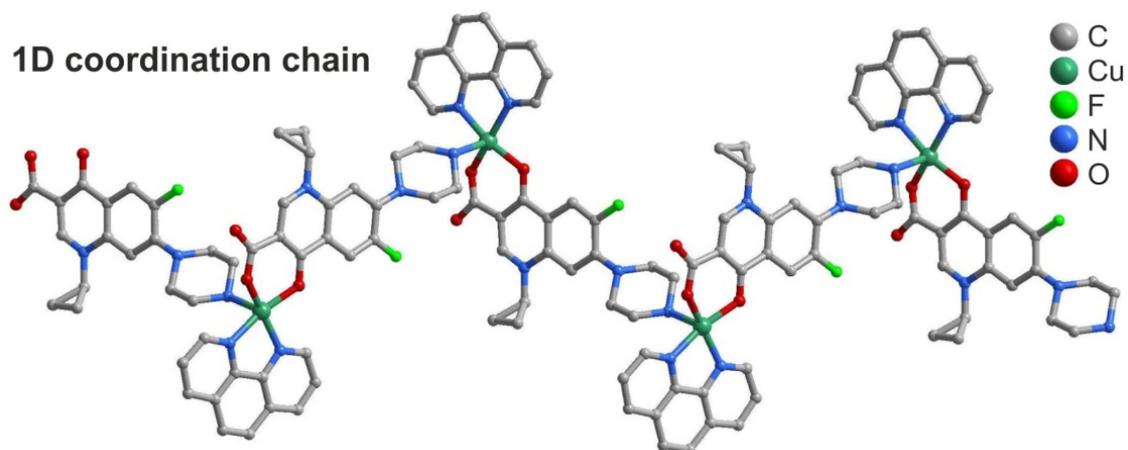


Figura 42 – Representação esquemática da estrutura cristalina do complexo ternário catiónico $[\text{Cu}(\text{cpx})(\text{phen})]_n(\text{NO}_3)_4\text{H}_2\text{O}$ (Cucpxphen) com esquema de identificação de todos os átomos do ambiente de coordenação do Cu(II). Por razões de simplicidade foram omitidos os átomos de hidrogénio.

3. Encapsulação de Complexos ternários de fluoroquinolonas

Neste subcapítulo apresentam-se os resultados obtidos para os estudos da encapsulação do complexo ternário de Ivx. Esta escolha remete para o facto do complexo Culvxphen, de acordo com a sua estrutura cristalina, possuir carga positiva. Uma vez que apenas moléculas neutras são capazes de permear a membrana lipídica, o facto do complexo se encontrar carregado sugere uma maior percentagem de encapsulação assim como uma maior retenção.

3.1. Hidratação do filme lipídico

Uma vez que por difração de R-X é possível confirmar que o complexo de metal sintetizado adota a estrutura de um catião, $[\text{Cu}(\text{Ivx})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, testou-se a encapsulação do mesmo por hidratação do filme lipídico de SPPC:Coolesterol (1:1) $\sim 20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ com uma solução aquosa do complexo ternário de cobre referido. O sistema lipossómico SPPC:Col foi selecionado por ser um sistema com boas propriedades de retenção após quatro semanas de armazenamento, de acordo com os estudos de estabilidade apresentados em 1.4.

O sinal registado para o complexo encapsulado, para todas as alíquotas recolhidas após a rutura dos lipossomas pelo método de Bligh-Dyer, descrito na metodologia experimental (4.3.), é muito baixo ($\text{Abs} < 0,02$) e encontra-se dentro do erro associado à técnica (espectrofotometria de UV-Vis), o que não permite a determinação quantitativa de uma percentagem de encapsulação, mas revela que esta metodologia não é adequada. Embora o método de encapsulação por hidratação do filme lipídico origine percentagens de encapsulação baixas, como já foi demonstrado para as fluoroquinolonas (1.1), uma baixa percentagem de encapsulação era, igualmente, esperada para a encapsulação do complexo ternário. No entanto, realizou-se este estudo de modo a obter um estudo completo da encapsulação do complexo ternário Culvxphen comparável com o das fluoroquinolonas.

3.2. Gradiente transmembranar de sulfato de amónio

Considerando que a encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas se realizou através de um gradiente transmembranar de sulfato de amónio foi efetuada com sucesso, o mesmo método foi adotado para a encapsulação do complexo ternário sintetizado (Culvxphen).

Os espectros obtidos, após rutura dos lipossomas pelo método de extração de Bligh-Dyer encontram-se representados na figura 43.

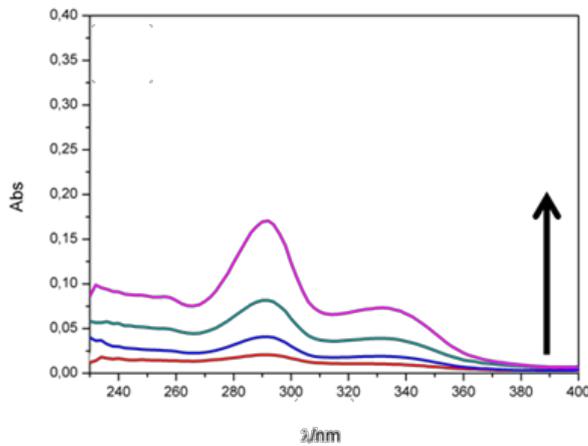


Figura 43 – Espectros do complexo Culvxphen, sintetizado, após rutura dos lipossomas de SPCC:Col (1:1).

Como se pode verificar, através dos espectros da figura 43, após a rutura dos lipossomas, os valores de comprimento de onda máximo obtidos para o complexo correspondem ao valor conhecido para as fluoroquinolonas e não o determinado para o complexo no ponto 2.1, onde seriam esperadas bandas a 272 nm e 294 nm.

Com base nos espectros de soluções do complexo de Culvxphen submetidas ao método de extração de Bligh-Dyer (método utilizado para a rutura dos lipossomas) é possível verificar a presença de uma única banda, para o complexo, ao comprimento de onda máximo determinado para a fluoroquinolona que o constitui devido aos valores elevados de pH utilizados na rutura dos lipossomas (pH~14) levarem à eliminação do complexo.

3.3. Formação do complexo ternário Culvxphen em lipossomas

De acordo com os resultados obtidos em 3.1 e 3.2, tanto a encapsulação de complexos ternários por hidratação do filme lipídico como por gradiente transmembranar de sulfato de amónio não foi possível. Deste modo, prosseguiram-se estudos na tentativa de conseguir a encapsulação do complexo ternário Culvxphen através da sua formação em lipossomas.

3.3.1. Utilização de gradiente transmembranar de acetato

Dadas as características anfífilas do complexo ternário em estudo, começou-se por testar a possível encapsulação dos diferentes constituintes do complexo, utilizando acetato de cobre para estabelecer o gradiente de pH. Nestes estudos foram realizadas diferentes abordagens no que diz respeito a concentrações de acetato de cobre, razão molar lípido:ligandos (phen e Ivx) e gradientes estabelecidos.

3.3.1.1. Utilização de diferentes concentrações de acetato de cobre

De modo a criar a mesma diferença de osmolaridade entre o interior e o exterior dos lipossomas, estabelecida para os estudos de encapsulação de fluoroquinolonas, reduziu-se a concentração de NaCl no ensaio e mini colunas de *spin*, de acordo com a concentração de cobre utilizada (figura 44A). Testou-se, igualmente, a encapsulação de Ivx e phen em lipossomas hidratados com acetato de cobre mantendo a concentração de Ivx e phen utilizando, no entanto, uma solução de cobre mais concentrada de modo a poder verificar se o aumento da concentração de cobre influenciaria a formação do complexo em lipossomas (figura 44B).

Os espectros de UV-Vis apresentados na figura 44 representam, o comportamento da phen e Ivx quando adicionadas simultaneamente a lipossomas contendo acetato de cobre (em diferentes concentrações).

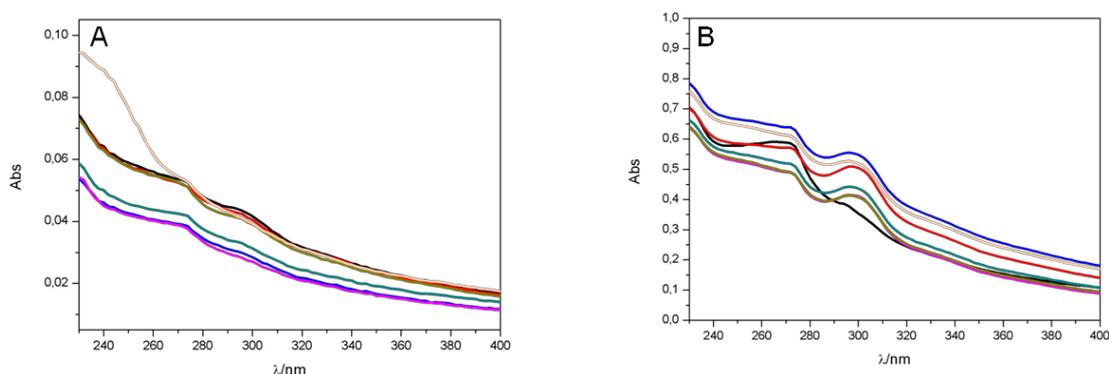


Figura 44 - Espectro de UV-Vis do material encapsulado em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas em etanol, **(A)** $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{inicial}}=0,327 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{NaCl}]=0,196 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{Ivx}]_i=[\text{phen}]_i\sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$; e **(B)** $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}}=7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{NaCl}]=150 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{Ivx}]_i=[\text{phen}]_i\sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$; (—) 0 min, (—) 5 min, (—) 10 min, (—) 15 min, (—) 30 min, (—) 60 min, (—) 120 min.

No que diz respeito à figura 44A como é possível verificar, além de se observarem absorvâncias muito baixas para ambos os ligandos, também é possível

observar que, embora o espectro obtido se assemelhe ao espectro de UV-Vis para o complexo Culvxphen em etanol, as bandas não estão suficientemente definidas para se poder afirmar que ocorreu a formação do complexo ternário Culvxphen.

A figura 44B apresenta os espectros de UV-Vis obtidos para a encapsulação, simultânea, de Ivx e phen em lipossomas contendo uma maior concentração de cobre inicial. Neste espectro observa-se uma maior absorvância das bandas presentes e embora a banda relativa ao fármaco se encontre melhor definida, o mesmo não ocorre para a banda correspondente ao sinal da phen.

3.3.1.2. Otimização da razão molar lípido:ligando

Num outro estudo, manteve-se a concentração, inicial, de acetato de cobre constante e variou-se a razão molar lípido:ligando (de 1:0,3 para 1:0,4) aumentando a concentração dos ligandos phen e Ivx a adicionar aos lipossomas, com o intuito de verificar se uma maior ou menor concentração de ligando influenciaria a sua encapsulação (figura 45).

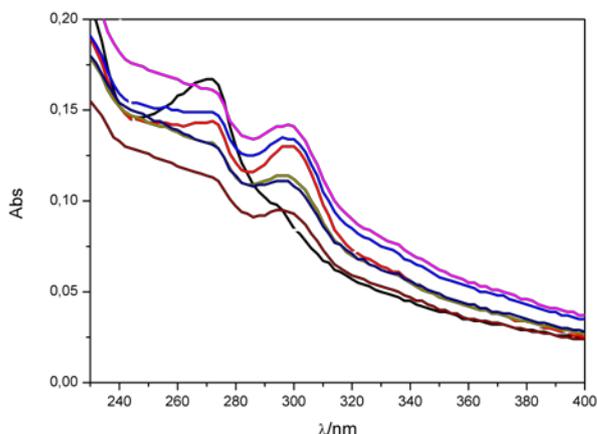


Figura 45 - Espectro de UV-Vis do material encapsulado em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após ruptura das vesículas, $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}}=7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{NaCl}]=150 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{Ivx}]_i=[\text{phen}]_i\sim 1,86 \text{ mmol.dm}^{-3}$; (—) 0 min, (—) 5 min, (—) 10 min, (—) 15 min, (—) 30 min, (—) 60 min, (—) 120 min.

A partir da figura 45 é possível observar, aos 0 min, uma banda definida ao comprimento de onda correspondente à fenantrolina quando coordenada ao íon cobre ($\lambda_{\text{máx}}=272 \text{ nm}$). No entanto, à medida que tempo de incubação dos lipossomas aumenta, a banda vai-se tornando menos definida ao contrário da banda de levofloxacina que se vai evidenciando com o aumento do tempo de incubação (aos 0 min não se observa qualquer sinal para a fluoroquinolona).

Não sendo possível obter, nestes estudos (3.3.1.1 e 3.3.1.2), duas bandas distintas correspondentes à phen e lvx quando complexadas ao ião cobre, de modo a poder obter uma quantificação do complexo formado no interior dos lipossomas, procurou-se compreender o comportamento individual de cada ligando envolvido (phen e lvx) quando encapsulados em lipossomas contendo acetato de cobre.

3.3.1.3. Encapsulação individual de phen e lvx, com diferentes razões molares lípido:ligando

A encapsulação individual dos ligandos phen e lvx, nas razões molares 1:0,4 e 1:0,3 lípido:phen e lípido:lvx, respetivamente, foi realizada de acordo com os resultados anteriores onde se observou um maior sinal de phen para a razão molar selecionada. A razão molar 1:0,3 para a lvx foi selecionada por ser a razão utilizada para a encapsulação de fluoroquinolonas e nos estudos anteriores se verificar que origina um sinal passível de ser quantificado.

Na figura 46 encontram-se representados os espectros obtidos para a encapsulação de phen e lvx em lipossomas contendo acetato de cobre.

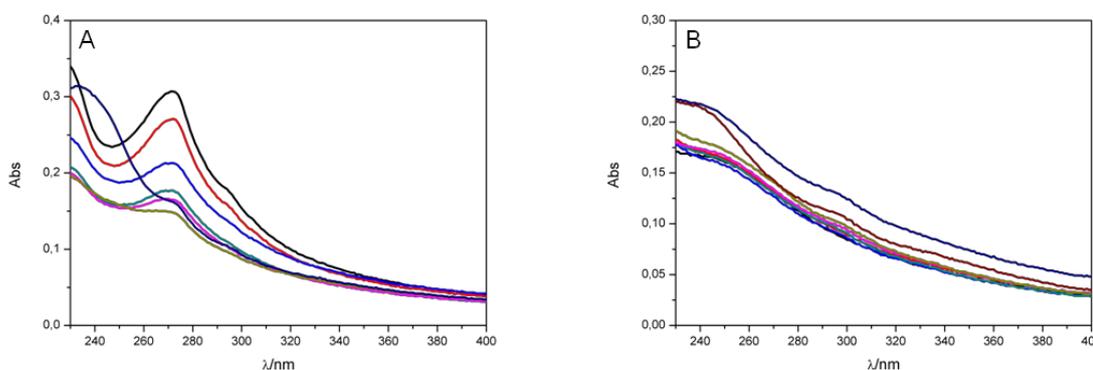


Figura 46 - Espectro de UV-Vis, após rutura das vesículas, de (A) phen e (B) lvx em lipossomas de SPPC:Col (1:1). $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}}=7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{NaCl}]=150 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{phen}]_i \sim 1,86 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $[\text{lvx}]_i \sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$. (—) 0 min, (—) 5 min, (—) 10 min, (—) 15 min, (—) 30 min, (—) 60 min, (—) 120 min.

A figura 46A representa a encapsulação de phen em lipossomas contendo acetato de cobre durante um período de incubação de 120 min. É possível observar, claramente, que existe uma diminuição da intensidade da banda com o aumento do tempo de incubação e, aos 120min, o sinal é semelhante ao espectro de uma solução de cobre, o que sugere que um longo tempo de incubação levará à perda do complexo formado no interior dos lipossomas.

No que diz respeito à encapsulação da lvx em lipossomas contendo acetato de cobre (figura 46B) não existe a formação da banda a ~300 nm (em etanol) observada

em estudos anteriores existe sim, um “ombro” ao mesmo comprimento de onda, mas não é suficientemente definido para uma quantificação do fármaco.

3.3.2. Utilização de gradiente transmembranar de acetato de cobre/Hepes (10 mmol.dm^{-3} , $\text{NaCl } 0.1 \text{ mol.dm}^{-3}$)

Uma vez que as propriedades físico-químicas das fluoroquinolonas dependem do pH do meio em que se encontram, de modo a associar o valor de pH utilizado para a hidratação do gel com uma maior ou menor percentagem de encapsulação, testou-se a encapsulação dos diferentes ligandos (phen e lvx) em lipossomas contendo acetato de cobre, cujo meio exterior se encontra substituído por tampão Hepes, 10 mmol.dm^{-3} e $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$ NaCl, a diferentes pH's.

Os espectros obtidos para a encapsulação da lvx (0 e 20 min) encontram-se na figura 47.

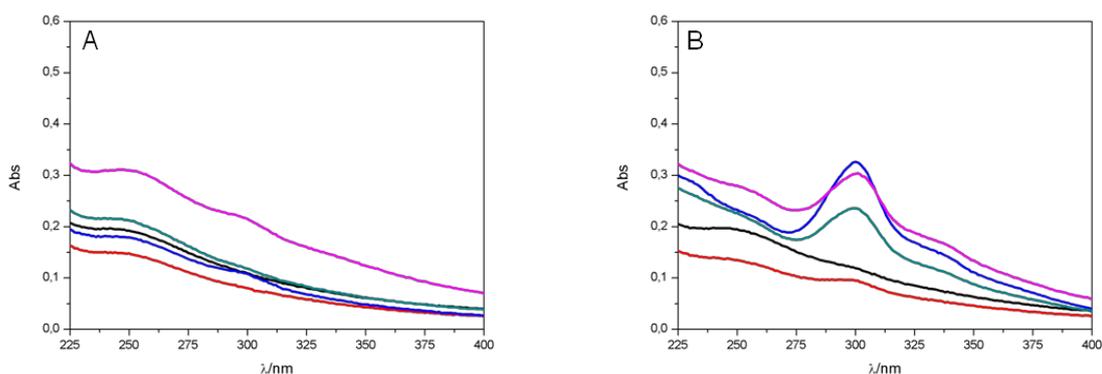


Figura 47 - Espectros de UV-Vis de lvx em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas. **(A)** aos 0 min e **(B)** 20 min $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}} = 7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $[\text{lvx}]_i = 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$. (—) pH 6,0, (—) pH 6,5, (—) pH 7,0, (—) pH 7,5, (—) pH 9,0.

No que diz respeito à encapsulação da lvx, na figura 47A, verifica-se que assim que a fluoroquinolona é colocada em contacto com os lipossomas, isto é, aos 0 min, não se observa qualquer sinal para $\lambda = 300 \text{ nm}$, para nenhum dos pH's testados. Porém, aos 20 min (figura 47B) já é possível observar, claramente, a formação da banda esperada para pH's compreendidos entre 7,0 e 9,0 estando uma maior encapsulação associada a um intervalo de pH compreendido entre 7,0 e 9,0.

Os espectros representados na figura 48 correspondem à encapsulação individual da phen em lipossomas contendo acetato de cobre/Hepes 10 mmol.dm^{-3} .

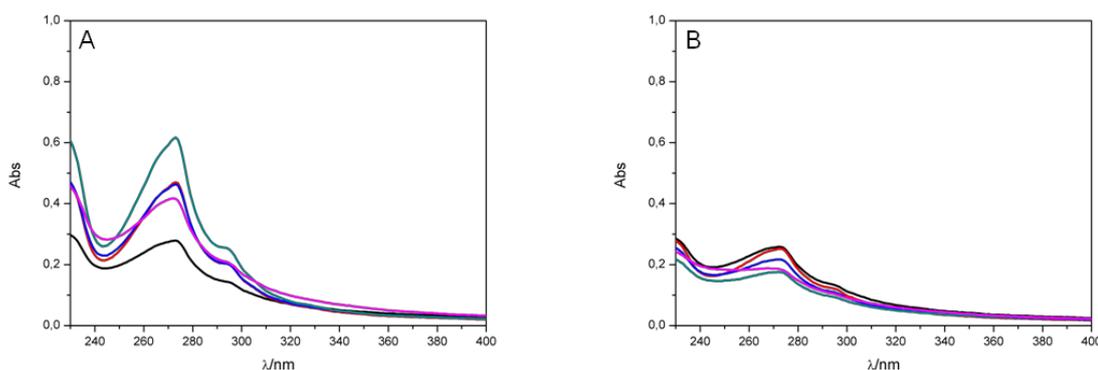


Figura 48 - Espectros de UV-Vis de phen em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas. (A) aos 0 min e (B) 20 min $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}} = 7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{phen}]_i = 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$. (—) pH 6,0, (—) pH 6,5, (—) pH 7,0, (—) pH 7,5, (—) pH 9,0.

Para a encapsulação individual da phen, em lipossomas contendo acetato de cobre, verifica-se um comportamento oposto ao observado para a fluoroquinolona no sentido em que aos 0 min, existe maior encapsulação do que ao fim de 20 min de incubação. Neste caso, o pH mais favorável à encapsulação da fenantrolina será 7,5 aos 0 min e pH 6,0 ao fim de 20 min.

Porém, e uma vez que o objetivo final é a encapsulação de ambos (lvx e phen) dentro dos lipossomas que contêm cobre, selecionou-se, para estudos posteriores, um valor de pH para o qual a incubação pudesse originar sinais passíveis de quantificação e, de acordo com os espectros apresentados, o pH selecionado foi 7,0.

Após a seleção do meio externo dos lipossomas, assim como o meio utilizado para hidratar as mini colunas de *spin* (tampão Hepes 10 mmol.dm^{-3} , pH 7,0) realizaram-se estudos de encapsulação simultânea de phen e lvx em lipossomas.

3.3.2.1. Encapsulação simultânea de lvx e phen em lipossomas contendo acetato de cobre/Hepes 10 mmol.dm^{-3}

A figura 49 representa os espectros obtidos para a encapsulação simultânea de phen e lvx, após rutura dos lipossomas contendo acetato de cobre.

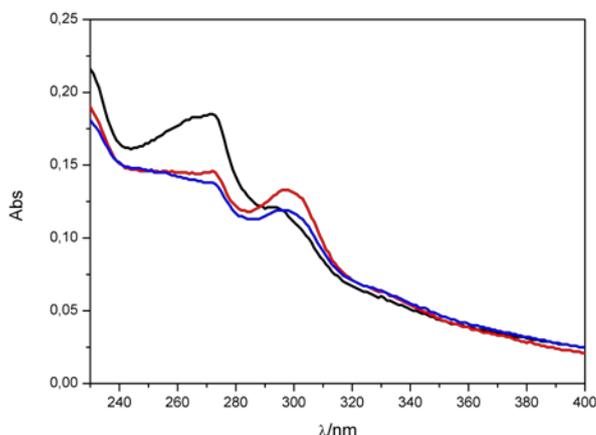


Figura 49 – Espectros de UV-Vis do material encapsulado em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas, aos (—) 0 min, (—) 10 min e (—) 20 min $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2]_{\text{lipossomas}} = 7,38 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[\text{lvx}]_i = [\text{phen}]_i = 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e HEPES 10 mmol.dm^{-3} , pH 7,0.

O comportamento observado no espectro apresentado vai de encontro ao observado em todos os estudos realizados anteriormente. É possível constatar, novamente, que aos 0 min temos uma banda relativamente bem definida para a phen mas apenas um “ombro” para a lvx, invertendo-se os papéis com o aumento do tempo de incubação. Embora se verifiquem resultados mais promissores, com a utilização de tampão HEPES a pH 7,0, ainda não é possível, sob estas condições experimentais, confirmar a formação de um complexo ternário de cobre (II), phen e lvx na proporção desejada (1:1:1) nem tão pouco é possível a quantificação de ambos, sob a forma de complexo ternário, dentro dos lipossomas.

Embora as propriedades físico-químicas da lvx impliquem a presença de um gradiente transmembranar para que possa ser encapsulada, o mesmo não ocorre para a phen. Sendo uma molécula neutra, facilmente atravessará a membrana lipídica não sendo necessário a criação de um gradiente transmembranar de pH e, sendo um ligando quelante forte, facilmente complexará o cobre presente dentro dos lipossomas. Estas características são evidentes nos espectros apresentados uma vez que aos 0 min se observa uma banda correspondente à phen, que vai diminuindo de intensidade ao longo do tempo, enquanto a lvx praticamente não apresenta sinal quando colocada em contacto com os lipossomas, sendo o seu sinal apenas evidente ao fim de 10 min.

Analisando os resultados obtidos através das diferentes abordagens testadas conclui-se que um gradiente transmembranar de acetato não será o método de encapsulação adequado para a phen e lvx na formação em lipossomas do complexo ternário Culvxphen.

3.3.3. Encapsulação de phen em lipossomas através de gradientes de iões de metais de transição

Um outro método possível para a encapsulação de fármacos em lipossomas é a encapsulação através de gradientes de iões de metais de transição. Embora as propriedades físico-químicas da lvx ditem a necessidade de um gradiente transmembranar para que a sua encapsulação ocorra, o mesmo não se aplica para a phen. Sendo uma molécula neutra, facilmente atravessará a membrana lipídica e, sendo um ligando quelante forte, facilmente complexará o cobre presente dentro dos lipossomas como já foi referido anteriormente.

Procedeu-se então, à encapsulação da phen dentro de lipossomas de SPPC:Coolesterol (1:1) contendo uma solução de acetato de cobre (II): lvx (1:1) ~50 mmol.dm⁻³. Os espectros obtidos, após rutura dos lipossomas, encontram-se na figura 50.

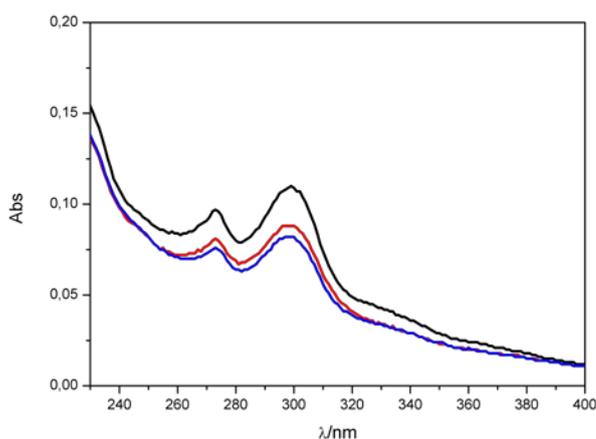


Figura 50 - Espectros de UV-Vis de $Cu(lvx)phen$ em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas, aos (—) 0 min, (—) 10 min e (—) 20 min $[Cu(CH_3COO)_2:Lvx]_{lipossomas} \sim 1,81 \text{ mmol.dm}^{-3}$; $[phen]_i \sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e HEPES 10 mmol.dm^{-3} , pH 7,0.

Através da figura 50 é possível observar duas bandas distintas a 273 e 300 nm correspondentes à phen e lvx, respetivamente, quando coordenadas ao ião cobre (II) num complexo de metal ternário (em etanol). A partir de um espectro de uma solução do complexo sintetizado (1:1:1), em etanol, é possível obter a absorvância molar (ϵ) ($(\text{mol.dm}^{-3}.\text{cm})^{-1}$) do complexo aos diferentes comprimentos de onda e determinar a concentração do complexo dentro dos lipossomas (tabela 16). Deste modo, é possível quantificar a encapsulação do complexo nas vesículas lipídicas.

De acordo com o espectro de $[Cu(lvx)(phen)](NO_3).2H_2O$ (complexo sintetizado) em etanol *p.a* obtêm-se as absorvâncias molares do complexo ternário, e

correspondentes concentrações do mesmo nos lipossomas aos comprimentos onda 273 e 300 nm.

Tabela 16 – Valores de absorvidade molar (ϵ (mol.dm⁻³.cm)⁻¹), a $\lambda= 273$ nm e $\lambda= 300$ nm, para o complexo ternário Culvxphen e concentrações determinadas através das absorvâncias obtidas a partir do espectro da figura 50, na encapsulação de phen em lipossomas de SPPC:Col (1:1) contendo Cu:lvx. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.

Complexo ternário	ϵ (mol.dm⁻³.cm)⁻¹
$\lambda=273$ nm	35893
$\lambda=300$ nm	46964
Encapsulação em lipossomas	Concentração (mol.dm⁻³)
$\lambda=273$ nm	1,22x10 ⁻⁴
$\lambda=300$ nm	1,18x10 ⁻⁴
Razão 273/300 nm	1,0
Cu (ensaio)	1,81x10 ⁻³

*concentração de cobre determinada por EAA

A partir dos resultados apresentados é possível afirmar que a formação de um complexo ternário dentro dos lipossomas é possível através da hidratação do filme lipídico com uma solução equimolar de acetato de cobre e lvx. A tabela 16 revela uma razão entre a concentração de complexo, determinada aos diferentes comprimentos de onda, igual à proporção desejada, isto é 1:1. A tabela apresentada permite-nos, igualmente, verificar que a concentração de cobre determinada é substancialmente mais elevada, sendo a razão entre a concentração determinada para o cobre e o complexo muito maior que a desejada. Esta diferença na concentração de cobre pode dever-se à existência de cobre livre ou cobre:lvx livre, devido a uma remoção incompleta através da centrifugação em mini colunas de *spin* equilibradas com Hepes (10 mmol.dm⁻³, pH 7,0).

3.3.3.1. Utilização de mini colunas de spin em tampão SHE pH 7,5

De modo a garantir a remoção de todo o cobre e lvx não encapsulados após a hidratação do filme lipídico, assim como para a criação do gradiente transmembranar, utilizaram-se mini colunas de *spin* equilibradas em tampão SHE pH 7,5 (3 passagens, da mesma alíquota, por colunas independentes). A quantificação da quantidade de

cobre por EAA permitiu verificar quanto cobre permanece encapsulado após cada passagem por mini coluna. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 17.

Tabela 17 – Concentrações intralipossômicas de cobre após uma, duas ou três passagens, das alíquotas recolhidas, através de mini colunas de *spin* de Sephadex equilibradas com tampão SHE, pH 7,5. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.

Colunas	[Cu] (mol.dm ⁻³)	% Encapsulação
1	1,45x10 ⁻²	29
2	3,11x10 ⁻³	6,1
3	2,41x10 ⁻³	4,6

Através dos valores obtidos, por EAA, conclui-se que uma única passagem por uma mini coluna de *spin* equilibrada com tampão SHE pH 7,5 não é suficiente para remover todo o cobre não encapsulado. Já a diferença de concentrações obtida para uma segunda e terceira passagem revela menores diferenças, permitindo inferir que o cobre não encapsulado será removido após 3 centrifugações em mini colunas de *spin*. Visualmente, também é possível observar que embora da primeira para a segunda coluna ainda se observe uma coloração azul forte, do gel de Sephadex, esta praticamente não se verifica da segunda para a terceira coluna, permitindo assumir e confirmar que todo o cobre não encapsulado ficará retido na coluna após três mini colunas de *spin* equilibradas com tampão SHE pH 7,5.

Com base nas propriedades físico-químicas da phen, desenvolveu-se um método de encapsulação ativo aquando da adição de phen a lipossomas contendo uma mistura equimolar de Cu:lvx. A influência de parâmetros como a pré-incubação dos lipossomas a 65°C antes da encapsulação, a concentração de cobre, a razão molar lípido:phen, o solvente utilizado para a rutura e a influência de EDTA na suspensão lipossômica foram avaliados, nos pontos que se seguem.

3.3.3.2. Influência da razão molar lípido:phen e da pré-incubação dos lipossomas no processo de encapsulação

Após a determinação da concentração de cobre dentro dos lipossomas, procedeu-se à encapsulação da phen em vesículas de SPPC:Col (1:1) preparadas em ~50 mmol.dm⁻³ de Cu:lvx (pH 6,29) na presença e ausência de incubação (antes do processo de encapsulação) e diferentes razões molares lípido:phen (1:0,3 e 1:0,2), de modo a determinar se estas diferenças influenciariam a quantidade de complexo nos

lipossomas. Após a adição da phen aos lipossomas, a sua encapsulação dentro dos lipossomas foi monitorizada por um período até 20 min.

3.3.3.2.1. Encapsulação de phen em diferentes razões molares lípido:phen

Após a determinação da concentração de cobre dentro dos lipossomas, por EAA, procedeu-se à encapsulação da phen, variando as razões molares lípido:phen de modo a verificar se este fator (maior ou menor razão molar) condicionaria a sua encapsulação. Os espectros relativos à encapsulação da phen encontram-se representados na figura 51.

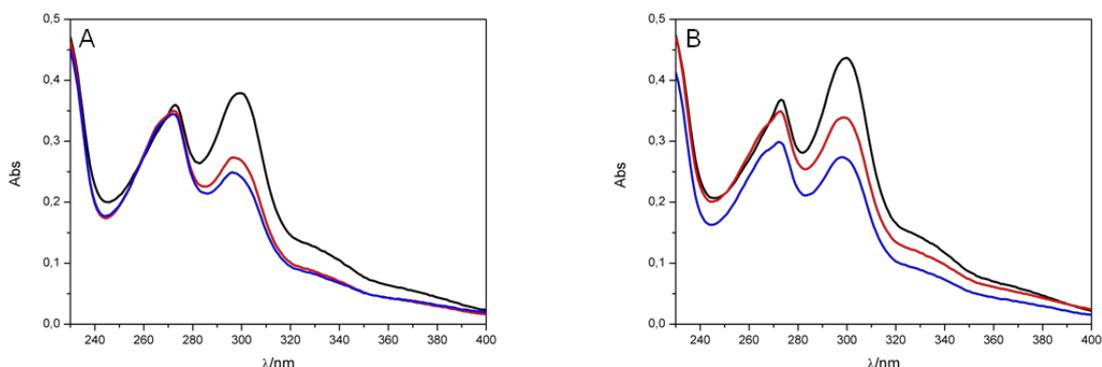


Figura 51 – Espectro de UV-Vis, após rutura das vesículas, de Culvphen encapsulado em lipossomas de SPPC:Col (1:1), com gradiente transmembranar de iões de metal, aos (—) 0 min, (—) 10 min e (—) 20 min. $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2:\text{Lvx}]_{\text{lipossomas}} \sim 0,346 \text{ mmol.dm}^{-3}$, razão lípido:phen (A) 1:0,3 (mol/mol) $[\text{phen}] \sim 1,50 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e (B) 1:0,2 (mol/mol) $[\text{phen}] \sim 1,12 \text{ mmol.dm}^{-3}$. Ensaio com pré-incubação a $65^\circ\text{C} \sim 30\text{min}$.

Numa primeira observação é possível verificar que existe uma rápida encapsulação da phen. Aos 0 min o complexo ternário Culvphen é imediatamente formado, uma vez que os comprimentos de onda máximos obtidos (273 e 300 nm) correspondem aos valores conhecidos para a phen e lvx, respetivamente, quando coordenadas ao ião cobre e em solução etanólica.

Também possível observar que com o aumento do tempo de incubação, para ambas as razões molares, embora não se verifiquem alterações significativas para a banda da phen, estas ocorrem para a banda da fluoroquinolona: as bandas perdem definição e existe um desvio hipsocrómico de cerca de 5 nm, o que nos leva a acreditar que existirá perda de fluoroquinolona do interior dos lipossomas e que o complexo ternário deixará de existir. No entanto, estas alterações permitem afirmar que o complexo se formará aos 0 min, ou seja, logo após a adição da phen aos lipossomas. Através das absorvidades molares do complexo, aos diferentes

comprimentos de onda, é possível determinar a sua concentração, assim como a concentração de cobre (por EAA), no ensaio de encapsulação (tabela 18).

Tabela 18 - Concentrações de Culvxphen encapsulado após rutura dos lipossomas. $\epsilon(273 \text{ nm}) = 35893 \text{ (mol.dm}^{-3}\text{.cm)}^{-1}$, $\epsilon(300 \text{ nm}) = 46964 \text{ (mol.dm}^{-3}\text{.cm)}^{-1}$. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes com pré-incubação a 65°C -30min.

	Concentração (mol.dm ⁻³)	
	1:0,3 (mol/mol)	1:0,2 (mol/mol)
$\lambda = 273 \text{ nm}$	$4,26 \times 10^{-4}$	$4,18 \times 10^{-4}$
$\lambda = 300 \text{ nm}$	$3,32 \times 10^{-4}$	$4,08 \times 10^{-4}$
Culvxphen (273/300)	1,3	1,0
Cu/Culvxphen (273 nm)	0,81	0,83
Cu/Culvxphen (300 nm)	1,0	0,85
Cu (ensaio)	$3,46 \times 10^{-4}$	

A quantificação de Culvxphen e cobre dentro dos lipossomas permite-nos verificar se a proporção entre a concentração de complexo no interior dos lipossomas e a concentração de cobre determinada por EAA se encontra de acordo com a desejada. Se ambos se encontrarem na proporção desejada, a razão entre as concentrações de cobre e de complexo deverá ser igual a 1. Através da tabela 18 é possível concluir que efetivamente existe a formação de um complexo da phen com Cu(II) e lxx dentro dos lipossomas e, embora a percentagem de encapsulação não seja elevada (28 e 38% para as razões molares 1:0,3 e 1:0,2, respetivamente), as concentrações de cada um encontram-se bastante próximas e dentro do erro associado às mini colunas de *spin* (10%), o que leva a proporções intralipossómicas de complexo muito próximas das pretendidas.

3.3.3.2.2. Influência da pré-incubação dos lipossomas na encapsulação de phen

As mini colunas de *spin* de Sephadex equilibradas com tampão SHE são utilizadas para remover o cobre não encapsulado que poderá estar electrostaticamente adsorvido ou ligado à membrana lipídica [59]. Devido à capacidade que o EDTA tem para complexar iões divalentes, como o Cu^{2+} , a sua

presença nas suspensões lipossômicas, após as passagens através das mini colunas de *spin*, mesmo em quantidades residuais, poderá interferir nos resultados obtidos.

De modo a estabelecer se o EDTA, presente nas mini colunas de *spin* em tampão SHE, se mantém na suspensão lipossômica final e se influenciará os resultados, após a eluição/centrifugação, as vesículas foram sujeitas a uma centrifugação adicional em mini colunas de *spin* equilibradas com tampão Hepes, pH 7,0 [100].

Tendo realizado alguns testes nos quais se abordou esta possibilidade, verificou-se que a rutura das vesículas em etanol, para recuperação do material encapsulado, na presença de EDTA não permite efetuar qualquer quantificação por espectrofotometria de UV-Vis, não só pela elevada dispersão de luz verificada mas também pela destruição do complexo formado, o que levou à utilização do detergente oPOE como agente de rutura dos lipossomas nos estudos seguintes. A concentração utilizada, 1%, foi determinada com base na sua concentração micelar crítica (CMC).

Neste estudo, após a última passagem pelas mini colunas de *spin*, uma fração dos lipossomas recolhidos foi colocada em contacto com a phen em diferentes proporções lípido:phen. Às alíquotas removidas ($t= 0$ min) foi adicionado um volume adequado de oPOE (1%) e, posteriormente colocadas num banho termostático até a obtenção do ponto nuvem do detergente. As alíquotas foram analisadas, por espectrofotometria de UV-Vis após atingirem, novamente, a temperatura ambiente.

Como nos estudos anteriores, para tempos de incubação mais prolongados (10 e 20 min), as alterações espectrais revelaram-se significativas e os espectros obtidos não correspondiam ao espectro do complexo de cobre pretendido, os processos de encapsulação seguintes apenas contemplaram a alíquota removida logo após a adição da phen aos lipossomas.

Os espectros obtidos para os estudos de encapsulação de phen, na razão molar 1:0,3 mol/mol, na presença ou ausência de pré-incubação, encontram-se representados na figura 52.

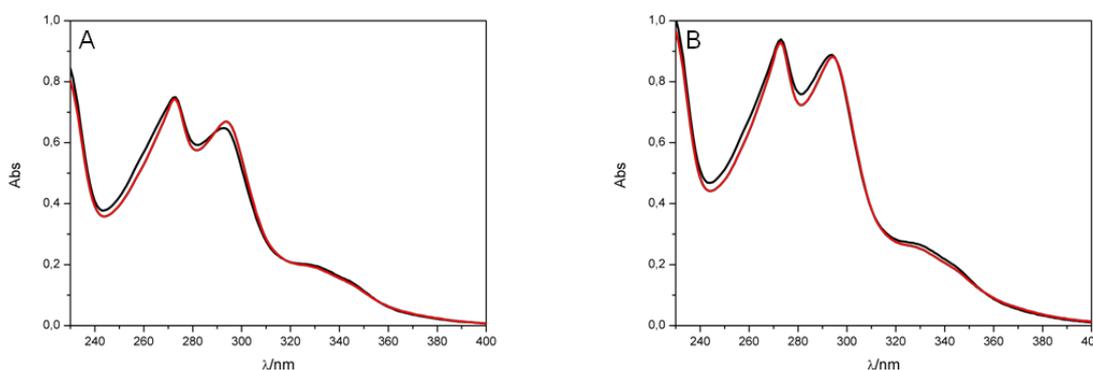


Figura 52 - Espectro de UV-Vis de Culvxphen em lipossomas de SPPC:Col (1:1), após rutura das vesículas em oPOE 1%, (—) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5 e (—) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5 + 1x mini coluna de *spin* Hepes pH 7,0. Razão lípido:phen=1:0,3 (mol/mol), $[\text{phen}] \sim 1,50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (A) com e (B) sem pré-incubação. $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{Lvx}]_{\text{lipossomas}} \sim 0,346 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{Lvx}]_{\text{lipossomas}} \sim 0,399 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (para A e B, respetivamente) e Hepes $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 7,0.

Os espectros apresentados na figura 52 traduzem a formação do complexo de cobre ternário, em lipossomas, em alíquotas sem e com centrifugação adicional (mini coluna de *spin*/tampão Hepes pH 7,0) para uma razão molar lípido:phen de 1:0,3. Verifica-se que esta última centrifugação não será estritamente necessária uma vez que não existem diferenças significativas a nível espectral e a nível da quantificação do complexo encapsulado. No que diz respeito à influência da pré-incubação, verifica-se que esta se reflete na intensidade das bandas observadas. As concentrações de complexo encapsulado encontram-se na tabela 19.

Tabela 19 - Concentrações de Culvxphen, após rutura dos lipossomas, para estudos de encapsulação de phen (razão molar lípido:phen= 1:0,3) com e sem pré-incubação a 65°C (~ 30 min) para (A) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5) e (B) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5 + 1x mini coluna de *spin* Hepes pH 7,0. $\epsilon(273 \text{ nm}) = 70355 \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{cm)}^{-1}$ e $\epsilon(294 \text{ nm}) = 75470 \text{ (mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{cm)}^{-1}$. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.

	Concentração ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)			
	Com pré-incubação		Sem pré-incubação	
	(A)	(B)	(A)	(B)
$\lambda = 273 \text{ nm}$	$3,38 \times 10^{-4}$	$3,28 \times 10^{-4}$	$4,10 \times 10^{-4}$	$4,12 \times 10^{-4}$
$\lambda = 294 \text{ nm}$	$2,70 \times 10^{-4}$	$2,71 \times 10^{-4}$	$3,68 \times 10^{-4}$	$3,70 \times 10^{-4}$
Culvxphen (273/294)	1,2	1,2	1,1	1,1
Cu/Culvxphen (273 nm)	1,0	1,1	0,97	0,97
Cu/Culvxphen (294 nm)	1,3	1,3	1,1	1,1

Embora por observação dos espectros com e sem pré-incubação se verifique uma diferença na intensidade das bandas presentes a 273 e 294 nm, que poderá traduzir diferentes encapsulações ao quantificar o complexo, com base nas absorvidades molares determinadas, em oPOE 1%, para os diferentes comprimentos de onda, as diferenças observadas encontram-se dentro do erro associado ao método de separação utilizado. Não havendo diferenças significativas, em termos de concentração, ao proceder à encapsulação da phen em lipossomas de SPPC:Colesterol sem incubação prévia a 65°C, reduz-se o tempo necessário para a formação de complexos de cobre em lipossomas, sendo este um fator vantajoso se, no futuro, for considerada uma produção em maior escala destes sistemas. Em relação à proporção entre os diferentes componentes do complexo de cobre, para estudos sem incubação prévia verificam-se valores mais próximos da proporção pretendida.

Não sendo a pré-incubação, então, um fator essencial para a formação do complexo Culvxphen em lipossomas utilizou-se uma razão molar lípido:phen de 1:0,2 (mol/mol), visto nos estudos com pré-incubação se verificar uma maior percentagem de encapsulação para esta proporção. Pretendeu-se, também, verificar se esta razão molar levaria a maiores percentagens de encapsulação e proporções entre os ligandos iguais às obtidas na síntese. Os espectros obtidos encontram-se representados na figura 53.

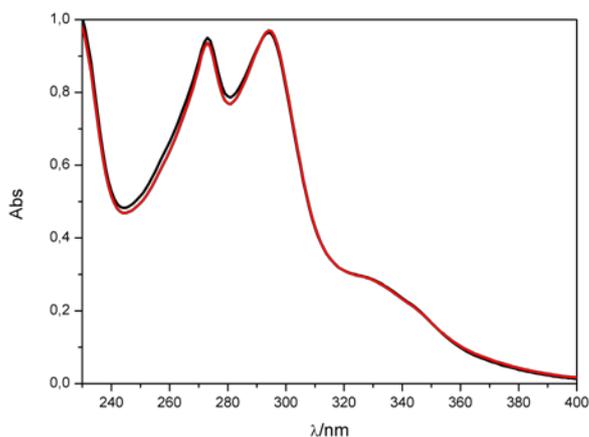


Figura 53 - Espectro de UV-Vis de Culvxphen em lipossomas de SPPC:Col(1:1), após rutura das vesículas em oPOE 1%, (—) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,50 min e (—) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5 + 1x mini coluna de *spin* Hepes pH 7.0. Razão lípido:phen=1:0,2 (mol/mol), [Phen]~1,12 mmol.dm⁻³ sem pré-incubação. [Cu(NO₃)₂·Lvx]_{lipossomas}~0,399 mmol.dm⁻³ e Hepes 10 mmol.dm⁻³, pH 7,0.

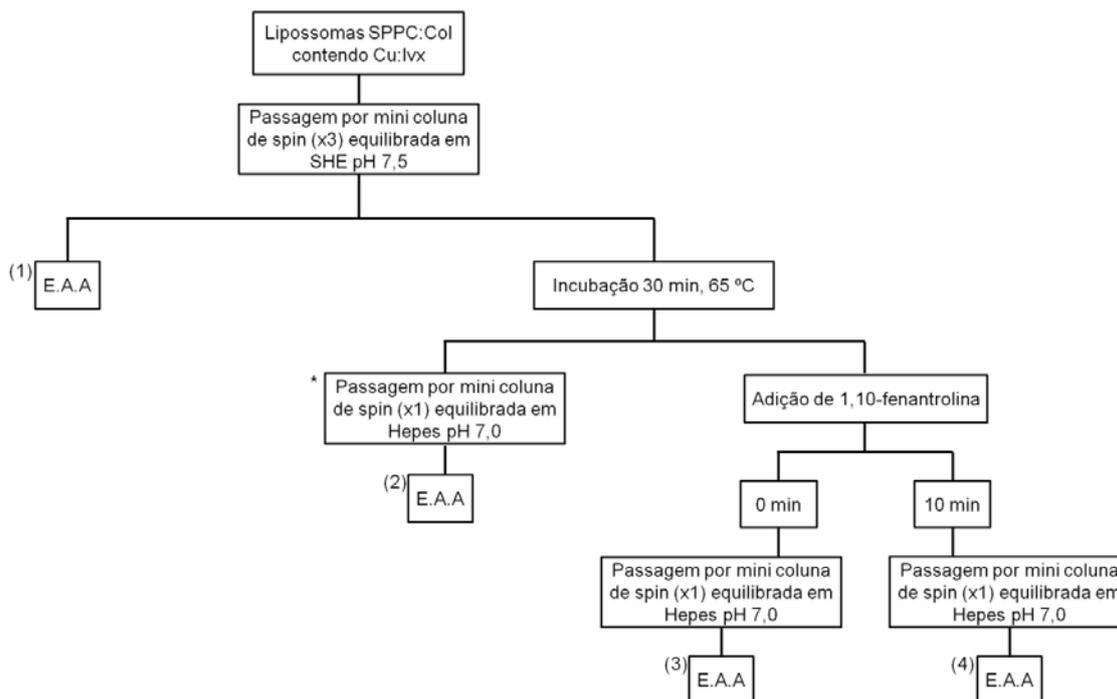
De acordo com a figura 53, não existem alterações significativas entre os espectros com uma centrifugação “extra” por mini coluna de *spin* em tampão Hepes pH 7,0 adicional, como já se tinha verificado anteriormente para a razão molar lípido:phen de 1:0,3. A quantificação do complexo encapsulado (tabela 20) permite provar se uma encapsulação nesta razão molar levará a maiores percentagens de encapsulação e a proporções estequiométricas entre os diferentes componentes, mais próximas das desejadas.

Tabela 20 - Concentrações de Culvphen, após rutura dos lipossomas, para estudos de encapsulação de phen (razão molar lípido:phen= 1:0,2) sem pré-incubação para (A) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5) e (B) 3x mini coluna de *spin* SHE pH 7,5 + 1x mini coluna de *spin* Hepes pH 7.0. $\epsilon(273 \text{ nm}) = 70355 \text{ (mol.dm}^{-3}.\text{cm)}^{-1}$ e $\epsilon(294 \text{ nm}) = 75470 \text{ (mol.dm}^{-3}.\text{cm)}^{-1}$. Os valores apresentados correspondem à média de pelo menos três ensaios independentes.

	Concentração (mol.dm ⁻³)	
	(A)	(B)
$\lambda = 273 \text{ nm}$	$4,15 \times 10^{-4}$	$4,24 \times 10^{-4}$
$\lambda = 294 \text{ nm}$	$3,94 \times 10^{-4}$	$4,06 \times 10^{-4}$
Culvphen (273/294)	1,0	1,0
Cu/Culvphen (273 nm)	0,96	0,94
Cu/Culvphen (294 nm)	1,0	0,98

Os valores obtidos tanto para (A) como para (B) encontram-se muito próximos e dentro do erro experimental no entanto, permitem concluir que uma razão molar de 1:0,2 (lípido:phen) permite obter uma razão molar, entre o cobre, determinado por EAA, e o complexo ternário igual ou muito próxima de 1. Relativamente às percentagens de encapsulação, para esta razão molar, os valores obtidos são de 37% para a situação (A) e 38% para (B) mas superiores em relação aos valores obtidos para a razão molar 1:0,3 (27%, para as duas situações referidas e para ensaios sem pré-incubação).

De modo a confirmar a influência de uma pré-incubação, antes da encapsulação da phen, na formação de complexos ternários Culvphen, a quantidade de cobre dentro dos lipossomas foi determinada em quatro situações diferentes, de acordo com o esquema 1.



* Para remover qualquer cobre que possa encontrar-se não encapsulado

Esquema 1 – Esquema para a determinação da concentração de cobre dentro dos lipossomas, para quatro situações distintas.

O esquema 1 representa as diferentes situações para as quais foi determinada a concentração de cobre dentro dos lipossomas e, na tabela 21, apresentam-se os valores obtidos por EAA.

Tabela 21 - Concentrações de Cobre encapsulado em lipossomas de SPPC: Colesterol (1) sem pré-incubação a 65° C (~30 min) e em estudos de encapsulação (2-4) de 1,10-fenantrolina (razão molar lípido:phen= 1:0,3).

Concentração	
(mol.dm⁻³)	
(1)	$2,34 \times 10^{-3}$
(2)	$1,67 \times 10^{-3}$
(3)	$1,80 \times 10^{-3}$
(4)	$1,32 \times 10^{-3}$

Os valores apresentados na tabela 21 permitem uma comparação entre a quantidade de cobre presente nos lipossomas quando estes são sujeitos, ou não, a uma incubação a 65°C, por um período de 30 min, antes de proceder aos estudos de encapsulação. De acordo com os valores obtidos, uma pré-incubação dos lipossomas

leva a um decréscimo da concentração de Cu(II) superior ao erro associado à separação por mini colunas de *spin*.

No que diz respeito aos lipossomas, sujeitos a pré-incubação, aos quais foi adicionada phen (1:0,3 mol/mol) verifica-se que, aos 0 min não existem diferenças significativas entre a quantidade de cobre encapsulada nas vesículas lipídicas antes e depois da encapsulação da phen. Porém, após 10 min, a concentração de cobre nos lipossomas é menor sendo a diferença observada, relativamente aos 0 min, superior ao erro associado de 10%.

Estes resultados vêm, de certo modo, confirmar o que se verificou anteriormente no ponto 3.3.3.2.1, isto é, com o aumento do tempo de incubação dos lipossomas com a phen, o espectro vai sofrendo alterações. Estas alterações, de acordo com a tabela 21, (3) e (4), provavelmente devem-se à diminuição da concentração de cobre no interior dos lipossomas, o que sugere que parte do complexo permeará a membrana para o meio externo.

3.4. Estabilidade do sistema lipídico na formação de complexos ternários em lipossomas

A estabilidade do sistema lipídico, nos estudos de formação do complexo ternário $CuIvxphen$ em lipossomas, foi avaliada com base na retenção do complexo encapsulado, após 4 semanas de armazenamento a 4°C. Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 54.

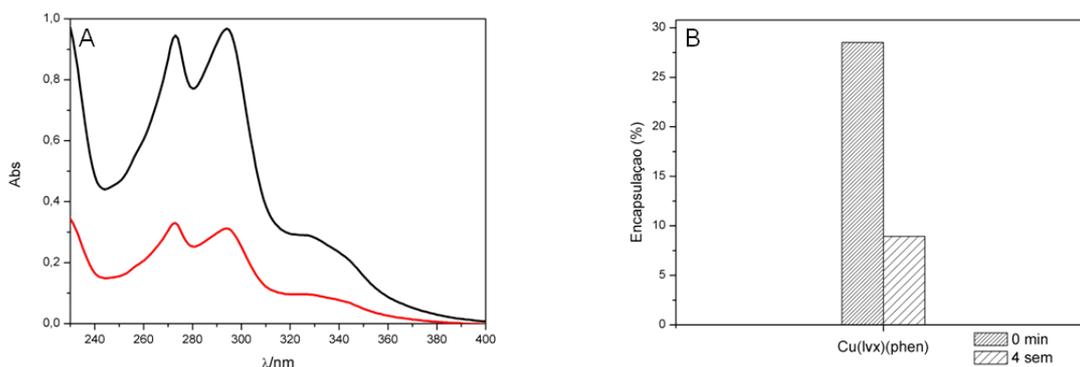


Figura 54 – (A) Espectro de UV-Vis de $CuIvxphen$ encapsulado em lipossomas de SPPC: Colesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1%, (—) 0 min e (—) 4 semanas e (B) comparação entre percentagens de encapsulação do complexo ternário formado em lipossomas após adição de phen ($t=0$ min) e após 4 semanas de armazenamento a 4°C para o mesmo sistema lipídico.

A figura 54 permite-nos observar uma perda substancial do material encapsulado ao fim de quatro semanas de armazenamento. No que diz respeito ao

comportamento espectral da alíquota, após 4 semanas, este é igual ao observado aquando da formação do complexo em lipossomas, uma vez que não se verificam desvios aos comprimentos de onda máximos assim como o perfil do espectro não sofre alterações (figura 54A) mantendo, também, a mesma proporção entre a concentração de complexo a 273 e 294 nm, após armazenamento. No entanto, ao fim de quatro semanas apenas cerca de 31% do material inicialmente encapsulado se mantém retido nos lipossomas.

De acordo com os diagramas de distribuição presentes na literatura [90] existe predominância dos complexos ternários por toda a gama de pH contemplada (3-9) e para concentrações na ordem 10^{-3} mol.dm⁻³. No entanto, os mesmos diagramas de distribuição, para as concentrações utilizadas experimentalmente, embora ainda evidenciem uma predominância do complexo ternário (1:1:1), revelam a presença, igualmente significativa, de outras espécies, o que justifica a perda substancial do material inicialmente encapsulado.

3.5. Estudos de libertação de Culvxphen em condições fisiológicas

De modo a compreender o comportamento *in vivo* dos lipossomas contendo o complexo ternário Culvxphen formado em lipossomas, realizaram-se estudos de libertação na presença de condições fisiológicas (37°C, pH 7,4) em três meios de libertação distintos: um meio de libertação mais simples, PBS, que na sua composição apenas inclui iões Na⁺, PO₄²⁻ e HPO₄⁻, o SBF cuja composição/concentração iónica mimetiza aquela do plasma sanguíneo e, por fim, um meio de libertação mais complexo, constituído por um fluido biológico (FBS).

3.5.1. Utilização de PBS

A figura 55 representa os espectros obtidos para a libertação do complexo ternário formado no interior de lipossomas de SPPC, a 37 °C em PBS pH 7,4. Encontra-se, também representado o perfil de libertação do complexo, em função do tempo.

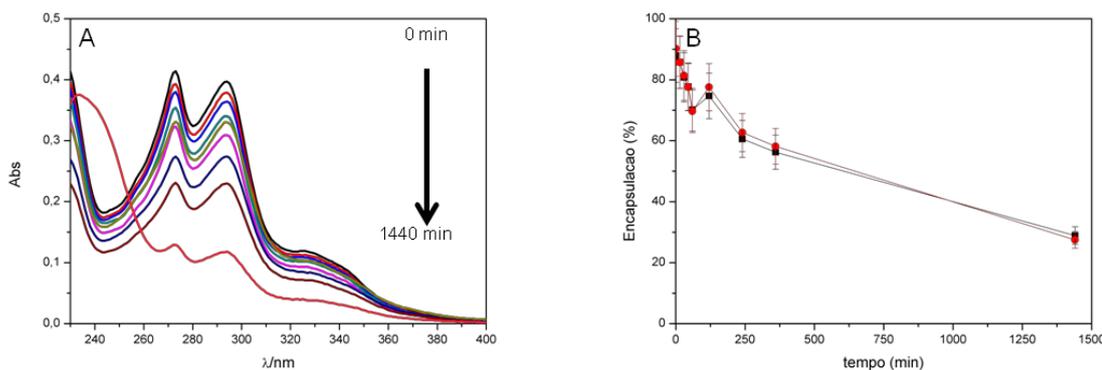


Figura 55 – (A) Espectro de UV-Vis de Culvixphen em lipossomas de SPPC:Colesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1% ao longo de um período de 24h (1440 min) em PBS pH 7,4 e (B) libertação, em PBS pH 7,4, do complexo ternário formado em lipossomas num período de 24h onde (—) $\lambda=273$ nm e (—) $\lambda=294$ nm.

À medida que se procede à análise das alíquotas removidas ao longo do tempo, é possível observar uma diminuição da intensidade das bandas correspondentes ao complexo ternário de cobre Culvixphen formado em lipossomas, figura 55A, e, conseqüentemente, uma diminuição da concentração do complexo dentro do lipossoma ao longo de um período de 24h. A figura 55B, como já foi referido, traduz o perfil de libertação a 37°C em PBS pH 7,4 do complexo de cobre encapsulado em lipossomas de SPPC:Colesterol em função do tempo de incubação (24h). Uma vez que o complexo possui dois comprimentos de onda característicos sendo caracterizado pela presença de duas bandas, a libertação encontra-se representada para as bandas a 273 e 294 nm. Num período de 24h existe uma perda média do material encapsulado de cerca de 72% relativamente à quantidade inicial de complexo formado dentro dos lipossomas.

Ao longo de todo o período de monitorização da libertação de complexo verifica-se que, embora o complexo se encontre em menor quantidade, a proporção entre as concentrações de complexo a 273 e 294 nm inicialmente observada se mantém durante todo o período de monitorização (24h).

3.5.2. Utilização de SBF

O SBF utilizado nestes ensaios foi preparado de modo a possuir concentrações de iões dissociados iguais às do plasma sanguíneo [82]. Deste modo, o comportamento dos lipossomas contendo Culvixphen terá uma maior semelhança com o que seria de esperar para estudos *in vivo*.

A figura 56 representa os espectros obtidos para os estudos de libertação de Culvixphen em SBF, assim como o perfil de libertação do complexo em função do tempo.

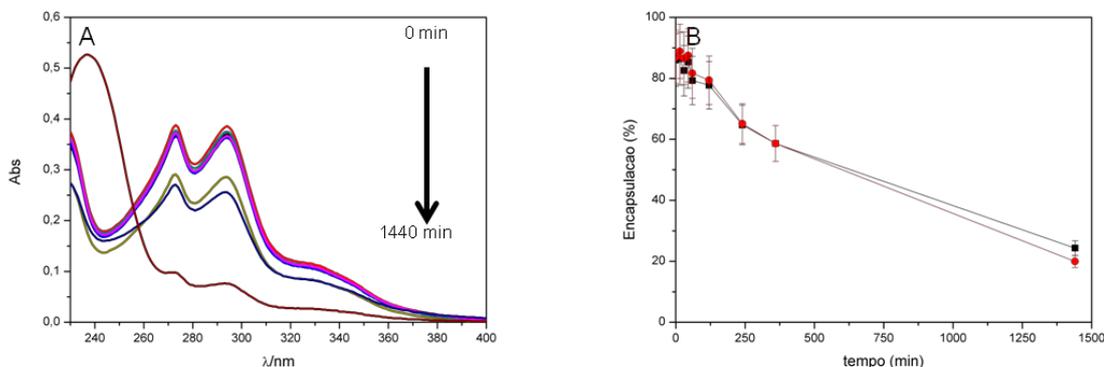


Figura 56 – (A) Espectro de UV-Vis de Culvixphen em lipossomas de SPPC:Coolesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1% ao longo de um período de 24h (1440 min) em SBF pH 7,4 e (B) libertação, em SBF pH 7,4, do complexo ternário formado em lipossomas num período de 24h onde (—) $\lambda=273$ nm e (—) $\lambda=294$ nm.

Os espectros de UV-Vis representados na figura 56A revelam que os lipossomas, quando em contacto com SBF, possuem um comportamento oposto aos dos estudos de libertação em PBS, isto é, em vez de se observar uma diminuição progressiva do material encapsulado, não existe praticamente libertação durante um período aproximadamente de 120 min. Uma diminuição acentuada do sinal do complexo de metal presente dentro dos lipossomas apenas se verifica após 360 min de incubação em SBF a 37°C. Ao fim de 24 h a quantidade intralipossómica de complexo é substancialmente menor.

Relativamente à razão de concentrações aos diferentes comprimentos de onda, a razão observada inicialmente mantém-se constante até 360 min aumentando para 1,4 ao fim de 24h, o que implica uma alteração significativa na composição do complexo. O espectro da figura 56A permite, também, a observação de uma banda relativamente intensa a aproximadamente 240 nm, o que sugere a presença de outras espécies. Esta banda também se encontra presente, embora menos intensa, nos estudos de libertação em PBS 7,4.

O perfil de libertação, a 37°C, do complexo de cobre do interior dos lipossomas em função do tempo de incubação, em SBF pH 7,4, encontra-se representado na figura 56B, para as duas bandas observadas ($\lambda=273$ nm e $\lambda=294$ nm). Durante um período de 24h é possível quantificar uma libertação média do complexo formado de 78% relativamente às concentrações determinadas inicialmente.

3.5.3. Utilização de FBS (50%)

O FBS é, geralmente, utilizado como suplemento para meios de cultura celular. É um meio de composição complexa, uma vez que possui na sua constituição proteínas (como a BSA) e um baixo nível de anticorpos ou vitaminas. A albumina sérica é a proteína mais abundante no plasma e está envolvida em processos de transporte de iões de metal, de fármacos e dos seus complexos através da corrente sanguínea. Deste modo, a ligação de iões de metal ou complexos de metal com fármacos a albuminas pode ditar propriedades biológicas do fármaco inferiores ou superiores às do fármaco livre, ou novos caminhos para o transporte dos mesmos [125]. A figura 57 representa os espectros obtidos para a libertação de Culvixphen em FBS durante um período de 24h e o seu perfil de libertação em função do tempo de incubação.

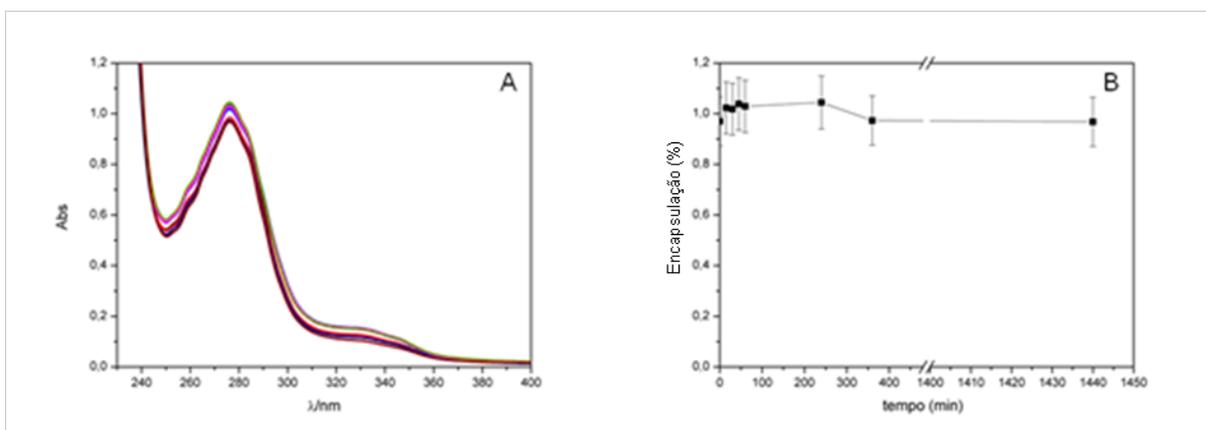


Figura 57 – (A) Espectro de UV-Vis de Culvixphen em lipossomas de SPPC:Coolesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1% ao longo de um período de 24h (1440 min) em FBS (50%) (—) 0 min, (—) 15 min, (—) 30 min, (—) 45 min, (—) 60 min, (—) 240 min e (—) 360 min, (—) 1140 min e (B) comportamento do complexo ternário formado em lipossomas em FBS num período de 24h.

Para os estudos de libertação em FBS observa-se um perfil completamente diferente do esperado. O espectro de UV-Vis apresentado na figura 57A apresenta apenas uma banda, de intensidade elevada quando seriam esperadas as duas bandas correspondentes a $\lambda=273$ nm e $\lambda=294$ nm. Quanto à libertação do material encapsulado, a figura 57B permite-nos verificar que praticamente não existe libertação e, embora se verifique um aumento da intensidade da banda observada com o tempo de incubação até 240 min os valores encontram-se dentro do intervalo do erro determinado para a separação do material encapsulado por mini coluna de *spin*.

Como os espectros obtidos nos ensaios de libertação em FBS não coincidiam com os espectros esperados para o complexo Culvixphen, procedeu-se à obtenção de

diferentes espectros para verificar que fator induzirá as alterações ao espectro observadas durante o ensaio. Deste modo, encontram-se representados na figura 58 espectros de FBS (50%), da lvx em FBS (50%), da phen em FBS (50%) e do complexo ternário sintetizado em FBS (50%). Todas estas soluções foram ainda comparadas com um dos espectros obtidos no ensaio (por ex: 15 min).

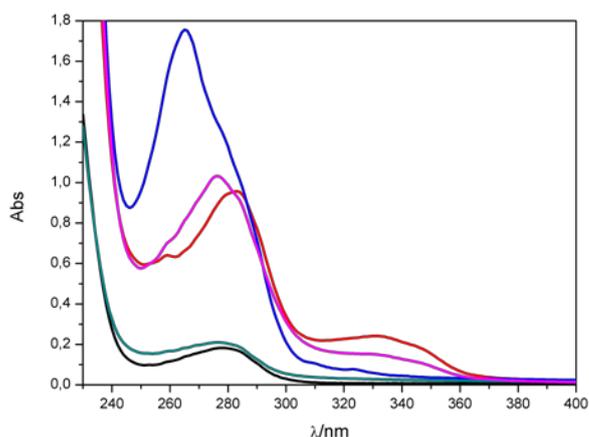


Figura 58 – Espectro de UV-Vis de (—) FBS 50%, (—) lvx em FBS, (—) phen em FBS, (—) Culvxphen em FBS e (—) Culvxphen encapsulado em lipossomas de SPPC:Coolesterol, após rutura das vesículas em oPOE 1% aos 15 min de incubação.

Uma vez que o que se pretende é uma compreensão do comportamento das diferentes soluções em FBS (50%) e não uma quantificação das mesmas, o facto das intensidades registadas serem relativamente elevadas não foi tido em conta.

A partir da figura 58 é possível verificar que o sinal observado durante o ensaio não se deve apenas à lvx ou à phen em FBS (50%) pois os comprimentos de onda máximos observados são distintos (276 nm para o ensaio e 282/264 nm para a levofloxacina e 1,10-fenantrolina, respetivamente). No que diz respeito ao FBS (50%) e ao complexo Culvxphen, embora os espectros sejam bastante semelhantes e apenas exista uma diferença de 2 nm entre os seus comprimentos de onda máximos, o valor obtido para o complexo é igual ao valor obtido durante o ensaio de libertação (276 nm). Também é possível observar, na figura 58, a presença de uma das bandas características da fluoroquinolona lvx (~ 330 nm), o que indica que o sinal observado nos estudos de libertação não será devido apenas ao meio de libertação (FBS) mas a uma possível interação do complexo formado dentro do lipossoma com o FBS. Uma vez que ocorre um pequeno desvio ao comprimento de onda máximo para o complexo (ou alíquota) na presença do FBS, este desvio poderá dever-se a interações entre as

albuminas presentes no fluido (FBS) e a fluoroquinolona presente no complexo, como se encontra referido na literatura [126-128].

A partir de um espectro menos concentrado do complexo sintetizado, foi possível determinar a sua absorvidade molar de modo a quantificar o complexo dentro do lipossoma e a sua percentagem de libertação num período de 24 h. De acordo com os resultados obtidos, após 24 h de incubação em FBS a 37°C, obtém-se uma retenção do complexo, dentro dos lipossomas, de cerca de 100%.

No que diz respeito à libertação do complexo ternário formado em condições fisiológicas é possível afirmar que à medida que o meio se aproxima das condições de um fluido fisiológico, a libertação do material encapsulado é reduzida, para um curto período de tempo. A retenção do material encapsulado poderá depender, igualmente, do contra-íão presente no interior dos lipossomas. Nos estudos de libertação de fluoroquinolonas apresentados em 1.5. a presença do contra-íão SO_4^{2-} confere aos lipossomas uma maior retenção. No entanto, nos estudos de libertação de Culvxphen, em lipossomas, o contra-íão do complexo é o íão NO_3^- , o que poderá influenciar a capacidade de retenção do sistema lipídico SPPC:Col.

Para PBS e SBF, ao fim de 24h a percentagem de complexo ternário que se mantém encapsulada é significativamente baixa e apresenta um sinal, a ~240 nm, que poderá corresponder a outras espécies em solução, o que implica que para aplicações terapêuticas de prolongada duração, estes sistemas não serão viáveis.

Capítulo 4: Considerações Finais

Considerações finais

Com este capítulo pretende-se proceder a uma síntese das conclusões retiradas, uma vez que a sua discussão foi apresentada no capítulo anterior, onde sempre que possível, foram estabelecidas comparações entres os resultados obtidos e resultados descritos na literatura.

A encapsulação de quinolonas em lipossomas tem vindo a ser uma técnica abordada, nos últimos anos, como estratégia de combate à crescente resistência bacteriana a esta família de fármacos. Deste modo, o principal objetivo deste trabalho consistiu na encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas visto este processo levar a um aumento da eficácia antibacteriana destes fármacos. Dos processos de encapsulação testados, apenas a encapsulação através de um gradiente transmembranar de sulfato de amónio permitiu a encapsulação de fluoroquinolonas com percentagens de encapsulação satisfatórias.

A encapsulação de fluoroquinolonas de 2^a e 3^a geração, estruturalmente semelhantes, em lipossomas (SPPC, PMPC, SPM) contendo colesterol revelou percentagens de encapsulação superiores a 65% para todos os sistemas lipídicos e meios utilizados (NaCl ou Sacarose) com a exceção da levofloxacina.

A estabilidade dos sistemas lipídicos foi testada através da quantificação de fluoroquinolona que se mantém encapsulada ao fim de 4 semanas de armazenamento a 4°C. Os resultados obtidos permitiram determinar quais os melhores sistemas para estudos de transporte e libertação de fármacos, tendo-se concluído que, para o nosso estudo, os sistemas mais estáveis seriam o PMPC:Col e SPPC:Col.

Além da encapsulação em lipossomas, uma outra estratégia de combate à resistência bacteriana residiu na apresentação das fluoroquinolonas sob outras formas, como por exemplo derivados de fluoroquinolonas como alternativa aos agentes antibacterianos existentes. A síntese de complexos de cobre com (fluoro)quinolonas e 1,10-fenantrolina tem vindo a ser uma das abordagens mais frequentes. A síntese dos referidos complexos ternários foi realizada e permitiu a obtenção de rendimentos entre 61 e 83%. A sua caracterização físico-química (análise elementar, espectroscopia de UV-Vis e Infravermelho e difração de Raio-X permitiu a determinação da sua estrutura, confirmação da formação de um complexo ternário Cobre:Fluoroquinolona:1,10-fenantrolina e da sua estabilidade a diferentes temperaturas.

Do mesmo modo que se procedeu ao estudo da encapsulação de fluoroquinolonas em lipossomas, testou-se a encapsulação de complexos ternários

nos mesmos, o que permitiu verificar a possibilidade destes derivados das quinolonas poderem ser utilizados em sistemas lipídicos de transporte e libertação de fármacos. Foram aplicados diferentes processos de encapsulação, como a hidratação do filme lipídico ou a criação de um gradiente transmembranar de sulfato de amónio. No entanto a baixa percentagem de encapsulação obtida por estes processos (e já esperada) conduziu ao estudo da formação do complexo ternário no interior dos lipossomas. A conjugação de um processo de encapsulação passivo (hidratação do filme lipídico com uma solução aquosa de cobre e a fluoroquinolona levofloxacina) e de um processo ativo (encapsulação da 1,10-fenantrolina após a formação dos lipossomas) permitiu alcançar este objetivo.

Por fim foram efetuados estudos de libertação (fluoroquinolonas e complexo ternário) em condições fisiológicas, pH 7,4 e 37°C e em diferentes meios (PBS, SBF e FBS). Os estudos permitiram concluir que as fluoroquinolonas só começarão a ser libertadas após 60 min, independentemente dos meios utilizados (PBS e SBF). Para o complexo ternário formado em lipossomas (Culvphen), os resultados obtidos revelaram uma maior libertação do complexo em PBS, que possui uma composição iónica mais simples, e uma menor libertação para o FBS que, sendo um fluido biológico possui uma composição química mais complexa, permitindo concluir que quanto maior a semelhança fisiológica do meio de libertação utilizado, menor será a libertação do complexo dos lipossomas (maior retenção).

O facto de alguns complexos ternários de cobre sintetizados demonstrarem potencial antibacteriano poderá constituir uma solução para a crescente resistência bacteriana. A sua encapsulação em sistemas lipossómicos poderá ser vantajosa, minimizando processos de decomposição/substituição em fluidos biológicos ou aumentando a atividade contra agentes patogénicos extracelulares.

O trabalho apresentado permitiu desenvolver três sistemas lipossómicos para o transporte/libertação de fluoroquinolonas, diferentes dos que se encontram descritos na literatura. A síntese de complexos ternários de cobre(II) com fluoroquinolonas e 1,10-fenantrolina, permitiu determinar a estrutura cristalográfica de três novos complexos ternários. Também foi possível a encapsulação de um complexo ternário, pela primeira vez, da fluoroquinolona levofloxacina, através da sua formação no interior dos lipossomas um procedimento que, de acordo com a bibliografia consultada, não se encontra descrito para as fluoroquinolonas.

Bibliografia

Bibliografia

1. Ranade, V.V. and M.A. Hollinger, *Site-specific drug delivery using liposomes as carriers*, in *Drug Delivery Systems, Second Edition*. 2004, CRC Press.
2. Kshirsagar, N., S. Pandya, B. Kirodian, and S. Sanath, *Liposomal drug delivery system from laboratory to clinic*. *Journal of Postgraduate Medicine*, 2005. **51**(5): p. 5-15.
3. Nakamura, K., K. Yoshino, K. Yamashita, and H. Kasukawa, *Designing a novel in vitro drug-release-testing method for liposomes prepared by pH-gradient method*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **430**(1–2): p. 381-387.
4. Gregoriadis, G., *Chapter 1.2 - Liposome research in drug delivery and targeting: Thoughts of an early participant*, in *Medical Applications of Liposomes*, D.D. Lasic and D. Papahadjopoulos, Editors. 1998, Elsevier Science B.V.: Amsterdam. p. 9-13.
5. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1818-1822.
6. Lasic, D.D., *Chapter 10 Applications of liposomes*, in *Handbook of Biological Physics*, R. Lipowsky and E. Sackmann, Editors. 1995, North-Holland. p. 491-519.
7. Shaheen, S.M., F.R.S. Ahmed, N. Hossen, M. Ahmed, S. Amran, and A.-U. Islam, *Liposome as a carrier for advanced drug delivery*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2006. **9**(6): p. 1181-1191.
8. Fenske, D. and P. Cullis, *Encapsulation of Drugs Within Liposomes by pH-Gradient Techniques*, in *Liposome Technology, Volume II*. 2007, Informa Healthcare. p. 27-50.
9. Langer, R., *Drug delivery and targeting*. *Nature*, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 5-10.
10. Ebrahim, S., G.A. Peyman, and P.J. Lee, *Applications of Liposomes in Ophthalmology*. *Survey of Ophthalmology*, 2005. **50**(2): p. 167-182.
11. Drulis-Kawa, Z. and A. Dorotkiewicz-Jach, *Liposomes as delivery systems for antibiotics*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. **387**(1-2): p. 187-198.
12. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. **65**(1): p. 36-48.
13. Wang, G., *Liposomes as Drug Delivery Vehicles*, in *Drug Delivery: Principles and Applications*, B. Wang, Siahaan, T., Soltero, R., Editor. 2005, John Wiley & Sons, Inc. p. 411-434.

14. Lasic, D.D., *Liposomes: from physics to applications*. 1993, Amsterdam ; New York: Elsevier. xviii, 575 p.
15. New, R.R.C., *Liposomes: a practical approach*. 1990: IRL Press.
16. Jones, M.N., *The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1995. **54**: p. 93-128.
17. Uhumwangho, M.U. and R.S. Okor, *Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review*. *Journal of Medicine and Biomedical Research*, 2005. **4**(1): p. 9-21.
18. Jesorka, A. and O. Orwar, *Liposomes: Technologies and Analytical Applications*. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2008. **1**(1): p. 801-832.
19. Sousa, I.C.d.S.C.d., *Interacção da Enrofloxacina com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físico-químicas*, in *Departamento de Química, Faculdade de Ciências*. 2007, Universidade do Porto: Porto.
20. Bangham, A.D., M.M. Standish, and J.C. Watkins, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. *Journal of Molecular Biology*, 1965. **13**(1): p. 238-IN27.
21. ElBayoumi, T. and V. Torchilin, *Current Trends in Liposome Research*, in *Liposomes methods and protocols Volume1: Pharmaceutical Nanocarriers*, V. Weissig, Editor. 2009, Humana Press. p. 1-27.
22. Hans, M. and A. Lowman, *Nanoparticles for Drug Delivery*, in *Nanomaterials Handbook*. 2006, CRC Press.
23. Jasmine, D. and T. Tushar, *Role of Liposomes in Nanotechnology and Drug Delivery*. *International Journal of Drug Development & Research*, 2011. **3**(1): p. 341-350.
24. Maurer, N., D.B. Fenske, and P.R. Cullis, *Developments in liposomal drug delivery systems*. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2001. **1**(6): p. 923-947.
25. Siler-marinkovic, S., L. Mojovic, V. Davinic, and B. Bugarski, *Liposomes as Carriers of Antimicrobial Drugs*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1997. **23**(5): p. 483-488.
26. Saraf, S., S. Paliwal, and S. Saraf, *Sphingosomes a novel approach to vesicular drug delivery*. *International Journal of Current Scientific Research*, 2011. **1**(2): p. 63-68.
27. Lasic, D.D., *Novel applications of liposomes*. *Trends in Biotechnology*, 1998. **16**(7): p. 307-321.

28. Bergers, J., T.M. Hagen, E.M. Etten, and I.J.M. Bakker-Woudenberg, *Liposomes as delivery systems in the prevention and treatment of infectious diseases*. Pharmacy World and Science, 1995. **17**(1): p. 1-11.
29. Chopra, S., N. Venkatesan, and G. Betageri, *Liposomes as nanocarriers for anti-HIV therapy*. Drug Delivery and Translational Research, 2013: p. 1-8.
30. Van Bambeke, F., J.M. Michot, J. Van Eldere, and P.M. Tulkens, *Quinolones in 2005: an update*. Clinical Microbiology and Infection, 2005. **11**(4): p. 256-280.
31. Andriole, V., *The Quinolones, Third Edition*. 2000: Academic Press.
32. Appelbaum, P.C. and P.A. Hunter, *The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000. **16**(1): p. 5-15.
33. De Souza, M.V.N., *New fluoroquinolones: a class of potent antibiotics*. Mini Reviews In Medicinal Chemistry, 2005. **5**(11): p. 1009-1017.
34. Ball, P., *The Quinolones: History and Overview*, in *The Quinolones (Third Edition)*, T.A. Vincent, Editor. 2000, Academic Press: San Diego. p. 1-31.
35. Higgins, P.G., A.C. Fluit, and F.J. Schmitz, *Fluoroquinolones: Structure and Target Sites*. Current Drug Targets, 2003. **4**(2): p. 181-190.
36. Efthimiadou, E.K., G. Psomas, Y. Sanakis, N. Katsaros, and A. Karaliota, *Metal complexes with the quinolone antibacterial agent N-propyl-norfloxacin: Synthesis, structure and bioactivity*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2007. **101**(3): p. 525-535.
37. Sárközy, G., *Quinolones: a class of antimicrobial agents*. Veterinarni Medicina, 2001. **46**: p. 257-274.
38. Brighty, K.E. and T.D. Gootz, *Chemistry and Mechanism of Action of the Quinolone Antibacterials*, in *The Quinolones (Third Edition)*, T.A. Vincent, Editor. 2000, Academic Press: San Diego. p. 33-97.
39. Drakopoulos, A.I. and P.C. Ioannou, *Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution*. Analytica Chimica Acta, 1997. **354**(1-3): p. 197-204.
40. Montero, M.T., J. Freixas, and J. Hernández-Borrell, *Expression of the partition coefficients of a homologous series of 6-fluoroquinolones*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. **149**(2): p. 161-170.
41. Park, H.-R., K.-Y. Chung, H.-C. Lee, J.-K. Lee, and K.-M. Bark, *Ionization and Divalent Cation Complexation of quinolone antibiotics in aqueous solution*. Bull. Korean Chem. Soc, 2000. **21**(9): p. 849-854.

42. Park, H.-R., T.H. Kim, and K.-M. Bark, *Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2002. **37**(6): p. 443-460.
43. Kapetanović, V., L. Milovanović, and M. Erceg, *Spectrophotometric and polarographic investigation of the Ofloxacin—Cu(II) complexes*. Talanta, 1996. **43**(12): p. 2123-2130.
44. López-Gresa, M.P., R. Ortiz, L. Perelló, J. Latorre, M. Liu-González, S. García-Granda, M. Pérez-Priede, and E. Cantón, *Interactions of metal ions with two quinolone antimicrobial agents (cinoxacin and ciprofloxacin): Spectroscopic and X-ray structural characterization. Antibacterial studies*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002. **92**(1): p. 65-74.
45. Behrens, N.B., G.M. Diaz, and D.M.L. Goodgame, *Metal complexes of the antibiotic nalidixic acid*. Inorganica Chimica Acta, 1986. **125**(1): p. 21-26.
46. Arayne, S., N. Sultana, U. Haroon, and M.A. Mesaik, *Synthesis, Characterization, Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities of Enoxacin Metal Complexes*. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2009. **2009**: p. 1-6.
47. Shaikh, A., R. Giridhar, F. Megraud, and M.R. Yadav, *Metalloantibiotics: Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of bismuth-fluoroquinolone complexes against Helicobacter pylori*. Acta Pharmaceutica, 2009. **59**(3): p. 259-271.
48. Cole, A., J. Goodfield, D.R. Williams, and J.M. Midgley, *The complexation of transition series metal ions by nalidixic acid*. Inorganica Chimica Acta, 1984. **92**(2): p. 91-97.
49. Blondeau, J.M., *Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: A review*. Clinical Therapeutics, 1999. **21**(1): p. 3-40.
50. Drlica, K. and X. Zhao, *DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 1997. **61**(3): p. 377-392.
51. Blondeau, J.M., *Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance*. Survey of Ophthalmology, 2004. **49**(2, Supplement 2): p. S73-S78.
52. Scholar, E.M., *Fluoroquinolones: Past, Present and Future of a Novel Group of Antibacterial Agents (Galley)*. American Journal of Pharmaceutical Education, 2002. **66**(2): p. 164-172.
53. Piddock, L.J.V., Y.-F. Jin, V. Ricci, and A.E. Asuquo, *Quinolone accumulation by Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1999. **43**(1): p. 61-70.

54. Serafin, A. and A. Stańczak, *The complexes of metal ions with fluoroquinolones*. Russian Journal of Coordination Chemistry/Koordinatsionnaya Khimiya, 2009. **35**(2): p. 81-95.
55. Chapman, J.S. and N.H. Georgopapadaku, *Routes of quinolone permeation in Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1988. **32**(4): p. 438-442.
56. Jacoby, G.A., *Mechanisms of Resistance to Quinolones*. Clinical Infectious Diseases, 2005. **41**(Supplement 2): p. S120-S126.
57. Hooper, D.C., *Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **32**(Supplement 1): p. S9-S15.
58. Iakovidis, I., I. Delimaris, and S.M. Piperakis, *Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach*, in *Molecular Biology International*. 2011.
59. Patankar, N., M. Anantha, E. Ramsay, D. Waterhouse, and M. Bally, *The Role of the Transition Metal Copper and the Ionophore A23187 in the Development of Irinophore CTM*. Pharmaceutical Research, 2011. **28**(4): p. 848-857.
60. Saha, D.K., S. Padhye, C.E. Anson, and A.K. Powell, *Antimycobacterial activity of mixed-ligand copper quinolone complexes*. Transition Metal Chemistry, 2003. **28**(5): p. 579-584.
61. Hernández-Gil, J., L. Perelló, R. Ortiz, G. Alzuet, M. González-Álvarez, and M. Liu-González, *Synthesis, structure and biological properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with ciprofloxacin and 1,10-phenanthroline*. Polyhedron, 2009. **28**(1): p. 138-144.
62. Katsarou, M.E., E.K. Efthimiadou, G. Psomas, A. Karaliota, and D. Vourloumis, *Novel copper(II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**(3): p. 470-478.
63. Sigman, D.S., D.R. Graham, V. D'Aurora, and A.M. Stern, *Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline . cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I*. Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(24): p. 12269-72.
64. Psomas, G., A. Tarushi, E.K. Efthimiadou, Y. Sanakis, C.P. Raptopoulou, and N. Katsaros, *Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with oxolinic acid*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006. **100**(11): p. 1764-1773.

65. Saraiva, R., S. Lopes, M. Ferreira, F. Novais, E. Pereira, M.J. Feio, and P. Gameiro, *Solution and biological behaviour of enrofloxacin metalloantibiotics: A route to counteract bacterial resistance?* Journal of Inorganic Biochemistry, 2010. **104**(8): p. 843-850.
66. Zucker, D., D. Marcus, Y. Barenholz, and A. Goldblum, *Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties.* Journal of Controlled Release, 2009. **139**(1): p. 73-80.
67. Barenholz, Y., *Amphipathic Weak Base Loading into Preformed Liposomes Having a Transmembrane Ammonium Ion Gradient*, in *Liposome Technology, Volume II*, G. Gregoriadis, Editor. 2007, Informa Healthcare: New York. p. 1-25.
68. Mayer, L.D., M.B. Bally, M.J. Hope, and P.R. Cullis, *Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes.* Chemistry and Physics of Lipids, 1986. **40**(2-4): p. 333-345.
69. Tazina, E., K. Kostin, and N. Oborotova, *Specific features of drug encapsulation in liposomes (A review).* Pharmaceutical Chemistry Journal, 2011. **45**(8): p. 481-490.
70. Tardi, P., Johnstone, Sharon, Webb, Murray, Bally, Marcel, Abraham, Sheela, *Liposome loading with metal ions.* 2010, Celator Pharmaceuticals, Inc. (Floor 2, 1 Airport Place, Princeton, NJ 08540, US).
71. Clerc, S.C., (FR), Barenholz, Yechezkel (Jerusalem, IL), *Liposome drug-loading method and composition.* 1999, Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem (IL): United States.
72. Clerc, S. and Y. Barenholz, *Loading of amphipathic weak acids into liposomes in response to transmembrane calcium acetate gradients.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1995. **1240**(2): p. 257-265.
73. Fenske, D.B., K.F. Wong, E. Maurer, N. Maurer, J.M. Leenhouts, N. Boman, L. Amankwa, and P.R. Cullis, *Ionophore-mediated uptake of ciprofloxacin and vincristine into large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane ion gradients.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1998. **1414**(1-2): p. 188-204.
74. Fenske, D.B. and P.R. Cullis, *Liposomal nanomedicines.* Expert Opinion on Drug Delivery, 2008. **5**(1): p. 25-44.
75. Carabias-Martínez, R., E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, and E. Fernández Laespada, *Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography*

- and capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2000. **902**(1): p. 251-265.
76. Fenske, D.B. and P.R. Cullis, *Entrapment of Small Molecules and Nucleic Acid-Based Drugs in Liposomes*, in *Methods in Enzymology*, D. Nejat, Editor. 2005, Academic Press. p. 7-40.
77. Mozafari, M.R., *Nanoliposomes: Preparation and Analysis*, in *Liposomes : Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers*, V. Weissig, Editor. 2009, Humana Press. p. 29-50.
78. Antimisiaris, S.G., *Preparation of DRV Liposomes*, in *Liposomes : Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers*, V. Weissig, Editor. 2009, Humana Press. p. 51-75.
79. Kisak, E.T., B. Coldren, C.A. Evans, C. Boyer, and J.A. Zasadzinski, *The vesosome- a multicompart ment drug delivery vehicle*. Current Medicinal Chemistry, 2004. **11**(2): p. 199-219.
80. Nounou, M.M., L.K. El-Khordagui, N.A. Khalafallah, and S.A. Khalil, *In vitro release of hydrophilic and hydrophobic drugs from liposomal dispersions and gels*. Acta Pharm, 2006. **56**(3): p. 311-324.
81. Perrin, D.D. and B. Dempsey, *Buffers for Ph and Metal Ion Control*. 1974: Chapman and Hall.
82. Oyane, A., H.-M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, and T. Nakamura, *Preparation and assessment of revised simulated body fluids*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. **65A**(2): p. 188-195.
83. Bangham, A.D., M.M. Standish, and G. Weissmann, *The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations*. Journal of Molecular Biology, 1965. **13**(1): p. 253-288.
84. Bartlett, G.R., *Phosphorus Assay in Column Chromatography*. Journal of Biological Chemistry, 1959. **234**(3): p. 466-468.
85. Webb, M.S., N.L. Boman, D.J. Wiseman, D. Saxon, K. Sutton, K.F. Wong, P. Logan, and M.J. Hope, *Antibacterial Efficacy against an In Vivo Salmonella typhimurium Infection Model and Pharmacokinetics of a Liposomal Ciprofloxacin Formulation*. Antimicrob. Agents Chemother., 1998. **42**(1): p. 45-52.
86. Maurer-Spurej, E., K.F. Wong, N. Maurer, D.B. Fenske, and P.R. Cullis, *Factors influencing uptake and retention of amino-containing drugs in large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane pH gradients*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1999. **1416**(1-2): p. 1-10.

87. Lasic, D.D., B. Ceh, M.C.A. Stuart, L. Guo, P.M. Frederik, and Y. Barenholz, *Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles: lessons for drug delivery*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1995. **1239**(2): p. 145-156.
88. Jia, Y., H. Joly, and A. Omri, *Liposomes as a carrier for gentamicin delivery: Development and evaluation of the physicochemical properties*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. **359**(1-2): p. 254-263.
89. Ruíz, P., R. Ortiz, L. Perelló, G. Alzuet, M. González-Álvarez, M. Liu-González, and F. Sanz-Ruíz, *Synthesis, structure, and nuclease properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with norfloxacin and 1,10 phenantroline*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007. **101**(5): p. 831-840.
90. Sousa, I., V. Claro, J.L. Pereira, A.L. Amaral, L. Cunha-Silva, B. de Castro, M.J. Feio, E. Pereira, and P. Gameiro, *Synthesis, characterization and antibacterial studies of a copper(II) levofloxacin ternary complex*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012. **110**(0): p. 64-71.
91. Kottke, T. and D. Stalke, *Crystal Handling at Low-Temperatures*. *J. App. Cryst.*, 1993. **26**: p. 615-619.
92. APEX2, Data Collection Software Version 2.1-RC13, Bruker AXS, Delft, The Netherlands, 2006.
93. Cryopad, Remote monitoring and control, Version 1.451, Oxford Cryosystems, Oxford, United Kingdom, 2006.
94. SAINT+, Data Integration Engine v. 7.23a ©, 1997-2005. **Bruker AXS, Madison, Wisconsin, USA.**
95. Sheldrick, G.M., SADABS v.2.01, Bruker/Siemens Area Detector Absorption Correction Program, 1998. **Bruker AXS, Madison, Wisconsin, USA.**
96. Sheldrick, G.M., *A short history of SHELX*. *Acta Cryst. A*, 2008. **64**: p. 112-122.
97. Sheldrick, G.M., SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement, University of Göttingen, 1997.
98. Sheldrick, G.M., SHELXS-97, Program for Crystal Structure Solution, University of Göttingen, 1997.
99. Ramsay, E., J. Alnajim, M. Anantha, A. Taggar, A. Thomas, K. Edwards, G. Karlsson, M. Webb, and M. Bally, *Transition Metal-Mediated Liposomal Encapsulation of Irinotecan (CPT-11) Stabilizes the Drug in the Therapeutically Active Lactone Conformation*. *Pharmaceutical Research*, 2006. **23**(12): p. 2799-2808.

100. Taggar, A.S., J. Alnajim, M. Anantha, A. Thomas, M. Webb, E. Ramsay, and M.B. Bally, *Copper–topotecan complexation mediates drug accumulation into liposomes*. *Journal of Controlled Release*, 2006. **114**(1): p. 78-88.
101. Webb, M.S., J.J. Wheeler, M.B. Bally, and L.D. Mayer, *The cationic lipid stearylamine reduces the permeability of the cationic drugs verapamil and prochlorperazine to lipid bilayers: Implications for drug delivery*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1995. **1238**(2): p. 147-155.
102. Sharma, A. and U.S. Sharma, *Liposomes in drug delivery: Progress and limitations*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997. **154**(2): p. 123-140.
103. Mayer, L.D., L.C.L. Tai, M.B. Bally, G.N. Mitilenes, R.S. Ginsberg, and P.R. Cullis, *Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1990. **1025**(2): p. 143-151.
104. Cools, A.A. and L.H.M. Janssen, *Fluorescence response of acridine orange to changes in pH gradients across liposome membranes*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1986. **42**(8): p. 954-956.
105. Clerc, S. and Y. Barenholz, *A Quantitative Model for Using Acridine Orange as a Transmembrane pH Gradient Probe*. *Analytical Biochemistry*, 1998. **259**(1): p. 104-111.
106. Han, J. and K. Burgess, *Fluorescent Indicators for Intracellular pH*. *Chemical Reviews*, 2009. **110**(5): p. 2709-2728.
107. Grinius, L., D.T. Stanton, C.M. Morris, J.M. Howard, and A.W. Curnow, *Profiling of Drugs for Membrane Activity Using Liposomes as an In Vitro Model System*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2002. **28**(2): p. 193-202.
108. Cullis, P.R., B. De Kruffyff, and R.E. Richards, *Factors affecting the motion of the polar headgroup in phospholipid bilayers. A 31P NMR study of unsonicated phosphatidylcholine liposomes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1976. **426**(3): p. 433-446.
109. Barenholz, Y. and G. Haran, *Method of amphiphatic drug loading in liposomes by pH gradient*. 1993, Yissum Research Development Company of the Hebrew University of Jerusalem (IL): United States.
110. Abraham, S.A., K. Edwards, G. Karlsson, N. Hudon, L.D. Mayer, and M.B. Bally, *An evaluation of transmembrane ion gradient-mediated encapsulation of topotecan within liposomes*. *Journal of Controlled Release*, 2004. **96**(3): p. 449-461.

111. Montero, M.T., D. Saiz, R. Sitges, J.L. Vázquez, and J. Hernández Borrell, *Influence of physicochemical properties of fluoroquinolones on encapsulation efficiency in liposomes*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **138**(1): p. 113-120.
112. Gameiro, P., C. Rodrigues, T. Baptista, I. Sousa, and B. de Castro, *Solution studies on binary and ternary complexes of copper(II) with some fluoroquinolones and 1,10-phenanthroline: Antimicrobial activity of ternary metalloantibiotics*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **334**(1-2): p. 129-136.
113. Puglisi, G., M. Fresta, G. Mazzone, P.M. Furneri, and G. Tempera, *Formulation parameters of fluoroquinolone-loaded liposomes and in vitro antimicrobial activity*. International Journal of Pharmaceutics, 1995. **118**(1): p. 65-76.
114. Qiu, L., N. Jing, and Y. Jin, *Preparation and in vitro evaluation of liposomal chloroquine diphosphate loaded by a transmembrane pH-gradient method*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **361**(1-2): p. 56-63.
115. Rizzotto, M., *Metal Complexes as Antimicrobial Agents*, V. Bobbarala, Editor. 2012, InTech: Rijeka.
116. Chen, C.-Y., Q.-Z. Chen, X.-F. Wang, M.-S. Liu, and Y.-F. Chen, *Synthesis, characterization, DNA binding properties, and biological activities of a mixed ligand copper(II) complex of ofloxacin*. Transition Metal Chemistry, 2009. **34**(7): p. 757-763.
117. Turel, I., *The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **232**(1-2): p. 27-47.
118. Patitungkho, S., S. Adsule, P. Dandawate, S. Padhye, A. Ahmad, and F.H. Sarkar, *Synthesis, characterization and anti-tumor activity of moxifloxacin–Copper complexes against breast cancer cell lines*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2011. **21**(6): p. 1802-1806.
119. Batista, D.d.G.J., P.B. da Silva, L. Stivanin, D.R. Lachter, R.S. Silva, J. Felcman, S.R.W. Louro, L.R. Teixeira, and M.d.N.C. Soeiro, *Co(II), Mn(II) and Cu(II) complexes of fluoroquinolones: Synthesis, spectroscopical studies and biological evaluation against Trypanosoma cruzi*. Polyhedron, 2011. **30**(10): p. 1718-1725.
120. Patel, M.N., M.R. Chhasatia, and D.S. Gandhi, *DNA-interaction and in vitro antimicrobial studies of some mixed-ligand complexes of cobalt(II) with fluoroquinolone antibacterial agent ciprofloxacin and some neutral bidentate ligands*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. **19**(10): p. 2870-2873.

121. Skyrianou, K.C., E.K. Efthimiadou, V. Psycharis, A. Terzis, D.P. Kessissoglou, and G. Psomas, *Nickel-quinolones interaction. Part 1 - Nickel(II) complexes with the antibacterial drug sparfloxacin: Structure and biological properties*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2009. **103**(12): p. 1617-1625.
122. Efthimiadou, E.K., M.E. Katsarou, A. Karaliota, and G. Psomas, *Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: Structure-activity relationship*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2008. **102**(4): p. 910-920.
123. Addison, A.W., T.N. Rao, J. Reedijk, J. Vanrijn, and G.C. Verschoor, *Synthesis, structure, and spectroscopic properties of copper (II) compounds containing nitrogen sulfur donor ligands - the crystal and molecular structure of aqua 1,7-bis(N-methylbenzimidazol-2'-yl)-2,6-dithiaheptane copper (II) perchlorate*. Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions, 1984(7): p. 1349-1356.
124. Efthimiadou, E.K., Y. Sanakis, M. Katsarou, C.P. Raptopoulou, A. Karaliota, N. Katsaros, and G. Psomas, *Neutral and cationic mononuclear copper(II) complexes with enrofloxacin: Structure and biological activity*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006. **100**(8): p. 1378-1388.
125. Psomas, G. and D.P. Kessissoglou, *Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper(ii), nickel(ii), cobalt(ii) and zinc(ii): structural features, biological evaluation and perspectives*. Dalton Transactions, 2013. **42**(18): p. 6252-6276.
126. Ni, Y., S. Su, and S. Kokot, *Spectrometric studies on the interaction of fluoroquinolones and bovine serum albumin*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2010. **75**(2): p. 547-552.
127. Kamat, B.P., *Study of the interaction between fluoroquinolones and bovine serum albumin*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005. **39**(5): p. 1046-1050.
128. Wang, Y.-J., R.-D. Hu, D.-H. Jiang, P.-H. Zhang, Q.-Y. Lin, and Y.-Y. Wang, *Synthesis, Crystal Structure, Interaction with BSA and Antibacterial Activity of La(III) and Sm(III) Complexes with Enrofloxacin*. Journal of Fluorescence, 2011. **21**(2): p. 813-823.

Anexos

Anexo 1

Otimização das condições de preparação de mini colunas de spin para a encapsulação de fluoroquinolonas

A otimização de preparação de mini colunas de *spin* permite uma padronização do método de preparação das mesmas, avaliando propriedades essenciais como velocidade e tempo de centrifugação, tamanho e empacotamento da coluna, volumes inseridos/eluídos. Deste modo, otimizando o método de preparação das mini colunas de *spin*, é possível determinar o erro associado a este procedimento e não é necessário proceder à medição dos volumes eluídos uma vez que estes serão iguais em todas as centrifugações e dentro do erro experimental determinado.

A recuperação do volume de lipossomas inserido nas colunas em função do volume ocupado pelo gel e da massa de algodão encontra-se apresentada na figura 59.

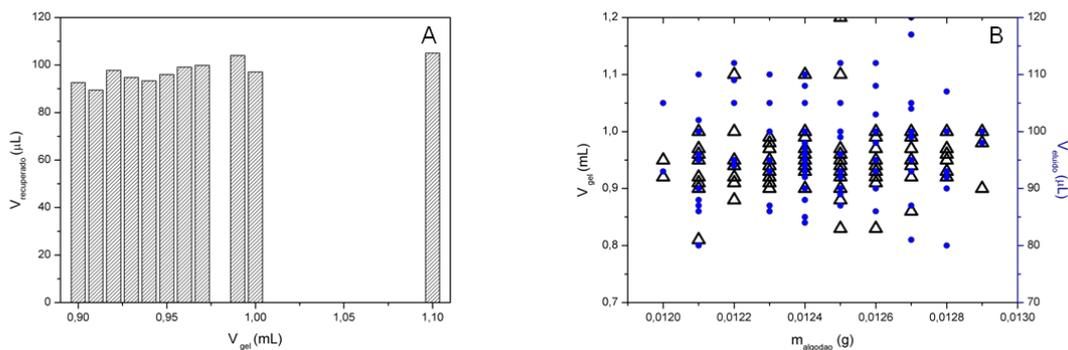


Figura 59 – (A) Volume de lipossomas recuperados (eluídos) vs o volume ocupado (tamanho) pelo gel de Sephadex G-50 e (B) volume de gel e volume eluído vs massa de algodão. Os resultados apresentados representam a média de pelo menos 3 ensaios independentes.

Como é possível observar, na figura 59A, para as condições otimizadas (2000 rpm, 3 min), o volume médio recuperado encontra-se entre 90 e 110 µL, o que corresponde a uma percentagem de recuperação de entre 90 e 100% e um erro associado de ~10% (o volume médio recuperado foi $98,4 \pm 5,87$ µL). A figura 59B permite-nos averiguar qual a massa de algodão (Δ) que permite a obtenção do volume de gel e volume eluído (\bullet) dentro dos valores determinados na figura 59A (0,9-1,0 mL e 90-100 µL respetivamente). Assim é possível afirmar que a massa de algodão para a qual ocorrem mais frequentemente os valores mencionados se encontra num intervalo

entre 0,0123 e 0,0126 g, sendo este o intervalo a respeitar aquando da preparação das mini colunas.

Anexo 2

Estabilidade dos sistemas lipídicos preparados

Realizaram-se estudos de Espectroscopia de Correlação Fotónica para os sistemas lipídicos (SPM:Col, PMPC:Col, SPPC:Col) em estudo, com o intuito de verificar se o seu diâmetro sofreria alterações significativas ao longo do tempo.

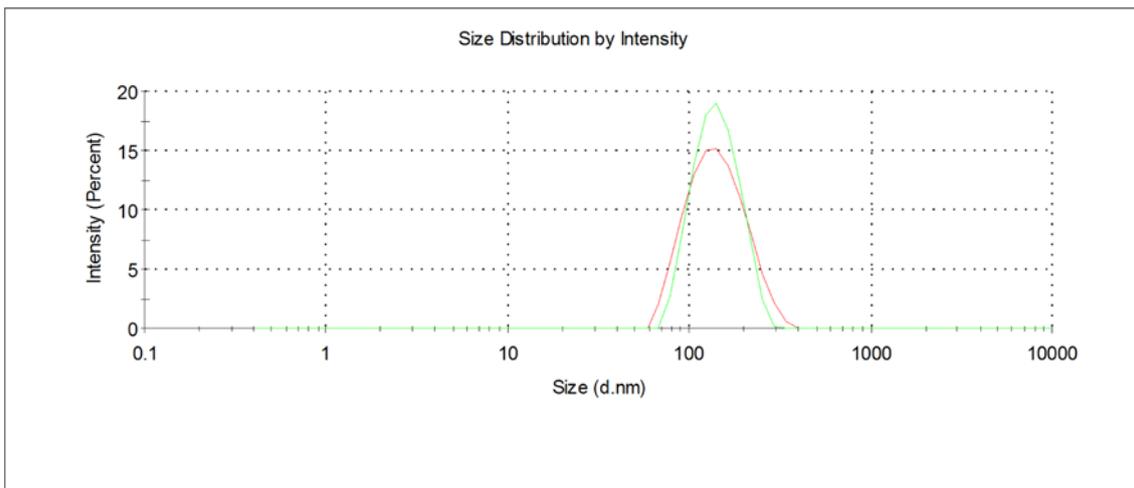


Figura 60 – Distribuição de tamanho de lipossomas de SPM:Col (1:1) (—) no dia da preparação e (—) após duas semanas de armazenamento.

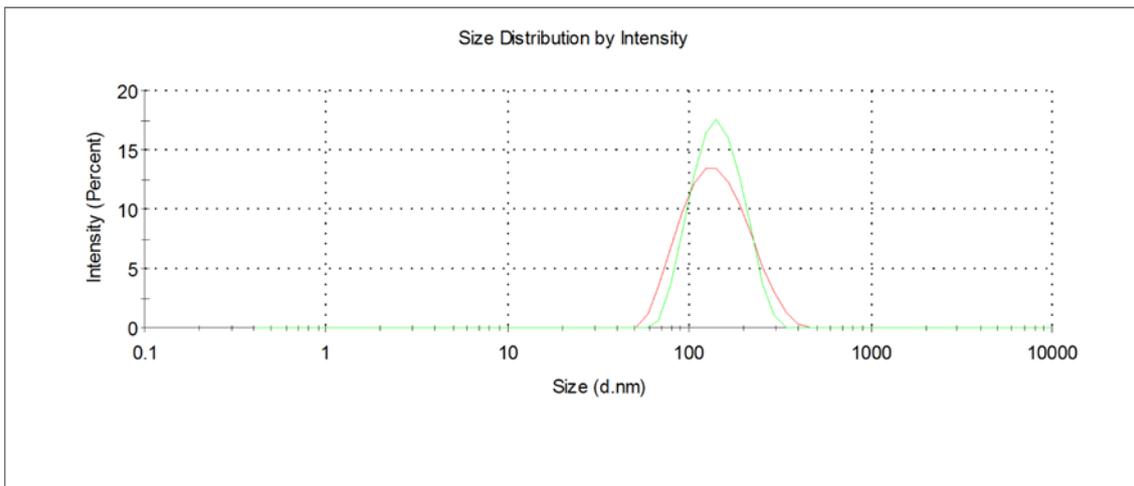


Figura 61 – Distribuição de tamanho de lipossomas de SPPC:Col (1:1) (—) no dia da preparação e (—) após duas semanas de armazenamento.

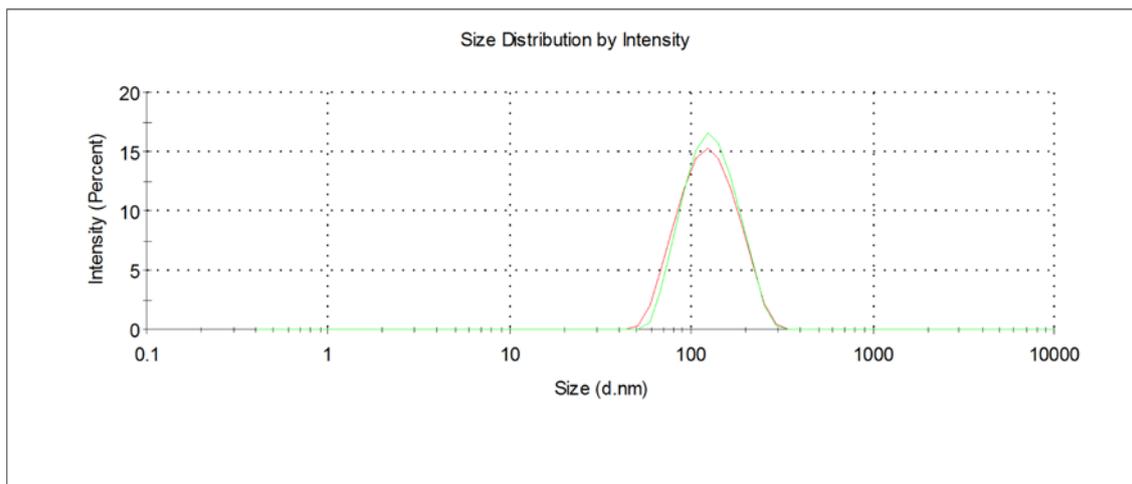


Figura 62 – Distribuição de tamanho de lipossomas de PMPC:Col (1:1) (→) no dia da preparação e (→) após duas semanas de armazenamento.

No que diz respeito ao tamanho dos lipossomas existe uma ligeira diferença, mas que não é significativa. É possível observar que também não existem agregados de maiores dimensões uma vez que apenas se verifica uma única população de lipossomas de diâmetro médio ~120 nm. A tabela seguinte representa os valores de diâmetro médio registados para os diferentes lipossomas, no dia da sua preparação e após 1 semana de armazenamento.

Tabela 22 – Diâmetro médio dos lipossomas no dia da sua preparação e após duas semanas.

	SPM:Col (1:1)		SPPC:Col (1:1)		PMPC:Col (1:1)	
	Tamanho médio (nm)	IPd	Tamanho médio (nm)	IPd	Tamanho médio (nm)	IPd
0 dias	135		129		121	0,08
14 dias	150		136		123	0,121

IPd – Índice de polidispersão

Como é possível verificar, a nível do diâmetro dos lipossomas, com a exceção do sistema SPM:Col, não existem alterações significativas com o armazenamento. Realizaram-se, posteriormente, estudos de UV-Vis, após 2 semanas de armazenamento para verificar se existiam indícios de oxidação dos lipossomas.

Relativamente aos lipossomas de SPM:Col, uma vez que se verificam maiores diferenças a nível do diâmetro médio dos lipossomas, após 2 semanas de armazenamento, realizaram-se estudos de oxidação para verificar se os lipossomas preparados exibiam algum sinal de oxidação.

Anexo 3

Estudos de oxidação

Para a determinação da percentagem de oxidação dos lípidos em lipossomas, procedeu-se à preparação de amostras contendo 6 μmol de fosfolípido (volume máximo de 0,3 mL). Preencheu-se o volume até 0,3 mL com etanol e retiraram-se duas alíquotas de 0,1 mL cada.

A cada alíquota de 0,1 mL adicionaram-se 3 mL de etanol. De seguida, traçaram-se espectros de UV-Vis, de cada alíquota, num intervalo entre 200-350 nm, utilizando etanol como referência (branco).[15]

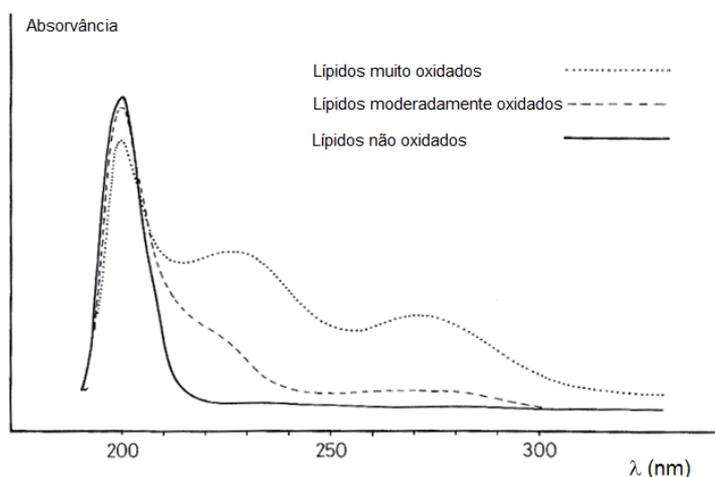


Figura 63 – Espectro de UV-Vis de fosfatidilcolinas oxidadas. Alterações na absorvância dos lípidos, na zona de UV, são o primeiro sinal da ocorrência de reações envolvendo radicais, que podem levar à oxidação. A presença de dienos conjugados é indicada pela presença de um pico ~230 nm, enquanto a formação de trienos conjugados (remoção de dois átomos hidrogénios por cada molécula) leva à presença de um pico adicional a ~270-280 nm. (—) lípidos não oxidado, (---) lípidos moderadamente oxidados, (.....) lípidos muito oxidados (adaptado de New, 1990).

Tendo sido verificados problemas na encapsulação de fluoroquinolonas apenas para os lipossomas de SPM:Col, os estudos de oxidação por UV-Vis apenas foram realizados para o sistema lipídico SPM:Col. O espectro obtido encontra-se representado na figura 64.

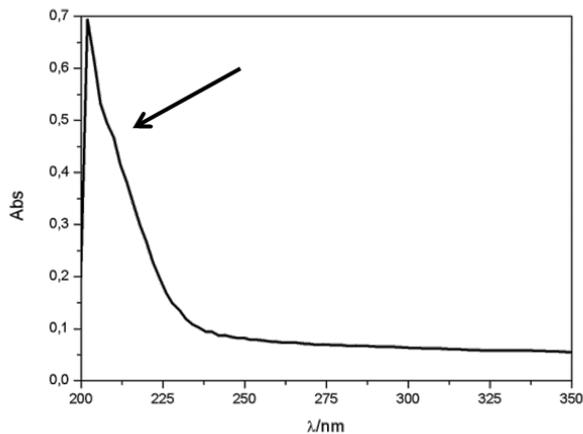


Figura 64 – Espectro de UV-Vis de lipossomas de SPM:Col (1:1) após duas semanas de armazenamento.

Como se pode observar na figura apresentada, a ~230nm existe uma banda pequena que poderá indicar o início do processo de oxidação dos lipossomas. Deste modo a retenção das fluoroquinolonas dentro dos lipossomas após 4 semanas de armazenamento (ver estudos de estabilidade, capítulo 3 ponto 1.4.) poderá ser afetada, uma vez que com o tempo existe degradação dos lipossomas preparados.

U. PORTO
FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

