



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA**



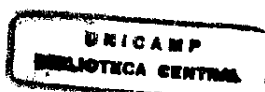
**ENCAPSULAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA
DO ANTIBIÓTICO NORFLOXACIN EM LIPOSSOMAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Neife Lilian Zalloum

Orientador. Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine

Campinas, 03/05/2001



COMISSÃO JULGADORA

Presidente

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (IQ – UNICAMP)

Membros

Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe (IQ – UNICAMP)

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana (FEQ – UNICAMP)

Suplentes

Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero (IQ – UNICAMP)

Profa. Dra. Inés Joeques (IQ – UNICAMP)

Profa. Dra. Maria Helena Bueno da Costa (IQ – USP)

RESUMO

ENCAPSULAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ANTIBIÓTICO NORFLOXACIN EM LIPOSSOMAS

AUTORA: NEIFE LILIAN ZALLOUM

ORIENTADOR: FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE

PALAVRAS-CHAVE: NORFLOXACIN; LIPOSSOMAS; FLUORESCÊNCIA

Neste trabalho descreve-se a caracterização físico-química do antibiótico Norfloxacin (NFX) em lipossomas multilamelares (MLV). Estas vesículas têm sido testadas, com sucesso, como transportadoras de substâncias com atividade farmacológica, por via intravenosa, melhorando a eficácia terapêutica das mesmas, pelo fato de serem capturadas pelo sistema imunológico. Estes sistemas poderiam portanto, tornar as fluoroquinolonas capazes de interagir com células microbianas através de formas diferentes daquelas apresentadas pelo fármaco livre.

Para investigar as interações entre NFX e lipossomas, foram utilizadas as técnicas de espalhamento quase elástico de luz, espectroscopia de absorção e de emissão (UV-Vis), microcalorimetria diferencial de varredura (Micro-DSC) e medidas de grau de anisotropia de fluorescência. Foram feitas, ainda, análises quimiométricas em dados espectroscópicos.

Os resultados confirmaram o encapsulamento de NFX nos lipossomas MLV. As análises de Micro-DSC, grau de anisotropia de fluorescência e supressão de fluorescência confirmaram a inserção de duas formas diferentes de NFX nas bicamadas lipídicas em pH 7, e de apenas uma espécie (catiônica) em pH 3. Desta forma, conclui-se que o método de hidratação do filme seco de lipídios, com encapsulamento passivo, é adequado à incorporação de NFX, bem como a calibração multivariada, via Partial Least Squares (PLS) na quantificação do antibiótico encapsulado. O tratamento quimiométrico, desenvolvido por Lawton & Sylvestre, utilizado para a análise de espectros eletrônicos de amostras lipossomais e de NFX, permitiu a constatação das espécies neutra e zwitteriônica inseridas nos lipossomas, sendo a primeira na bicamada lipídica e a última, na interface lipídio/água.

ABSTRACT

ENCAPSULATION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE ANTIBIOTIC NORFLOXACIN IN LIPOSOMES

AUTHOR: NEIFE LILIAN ZALLOUM

ADVISER: PROF. DR. FRANCISCO BENEDITO TEIXEIRA PESSINE

KEY WORDS: NORFLOXACIN; LIPOSOMES; FLUORESCENCE

This research describes the physico-chemical characterization of the antibiotic Norfloxacin (NFX) in multilamellar liposomes (MLV). Liposomes have been successfully tested as carriers of substances with pharmacological activity, after intravenous administration, improving their therapeutic efficacy, due to their rapid clearance to the mononuclear phagocytic system. Therefore, the liposomal systems might allow the fluoroquinolones to interact with microbial cells through different routes as compared to the free, non-encapsulated, drug.

To evaluate the interactions between NFX and liposomes the following techniques were used: quasi elastic light scattering (QELS), absorption and emission spectroscopy in the ultraviolet/visible region, micro differential scanning calorimetry (Micro-DSC) and steady-state fluorescence anisotropy measurements. Chemometric analyses were also used in ultraviolet/visible absorption and emission data.

The results confirmed the encapsulation of NFX into MLV. The analyses of Micro-DSC, fluorescence anisotropy and fluorescence quenching data confirmed the existence of two different forms of NFX (neutral and zwitterionic) inside the lipidic bilayers at pH 7, and just one (the cationic) at pH 3.

Thus, it can be concluded that the hydration of a dry lipid film method, in a passive encapsulation, is suitable to the incorporation of NFX into vesicles, as well as multivariate calibration, using Partial Least-Squares (PLS) method, applied to the quantification of the encapsulated antibiotic. It can also be concluded that the chemometric treatment developed by Lawton & Sylvestre, applied to the electronic spectra analyses of NFX and liposomes samples, allowed the inference that these two different equilibria drug species (neutral and zwitterionic) were inserted in the liposomes, the first in the lipidic bilayer and the latter in the lipid/water interface.

CURRICULUM VITAE

1 - DADOS PESSOAIS

Nome: Neife Lilian Zalloum
Data de Nascimento: 27/07/77
Estado civil: solteira
Naturalidade/Nacionalidade: Maringá – PR/ Brasileira
Filiação: Ali Mahmoud Zalloum e Guiomar Rodrigues Zalloum
RG: 6869114-1 (SSP- PR)
Título de eleitor: 633056406/04; Z. 137; S. 0219; Maringá-PR
CPF: 023937499-18

2 – FORMAÇÃO EDUCACIONAL

2.1 - GRADUAÇÃO

Bacharelado em Química (Universidade Estadual de Maringá-UEM)
Curso iniciado em 1995 e concluído em 1998

2.2 - PÓS-GRADUAÇÃO

Instituto de Química – Departamento de Físico-química (UNICAMP)
Dissertação de Mestrado
Iniciado em Março de 1999
Concluído em 03 de maio de 2001

3 – EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

3.1 – Projetos CNPq/PIBIC:

3.1.1 – “Construção e caracterização de eletrodos íon-seletivos à Dipirona, baseado em membranas poliméricas”

Orientação: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz (UEM - agosto de 1996 a julho de 1997)

3.1.2 – “Estudo de reações de preparação do auxiliar quiral (S)-(-)-2-metoximetil-pirrolidina (SMP)”

Orientação: Profa. Dra. Silvana Maria de Oliveira (UEM - agosto de 1997 a julho de 1998)

3.2 – Projeto de Dissertação de Mestrado: “Encapsulamento e Caracterização Físico-química do antibiótico Norfloxacin em Lipossomas”

Orientação: Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine (UNICAMP)

Período: março de 1999 a maio de 2001

4 – ESTÁGIO

Estágio supervisionado na Cooperativa dos Cafeicultores de Maringá – COCAMAR
Setor: Processamento e refino do óleo de soja
Período: 15 de fevereiro a 14 de março de 1998 (136 horas)

5 – TRABALHOS APRESENTADOS

5.1 - "Construção e caracterização de eletrodos íon-seletivos à Dipirona, baseado em membranas poliméricas"

- a) 20ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG (24 a 27 de maio de 1997);
- b) XIII Semana de Química da UEM, Maringá – PR (16 a 20 de junho de 1997);
- c) VI Encontro anual de Iniciação Científica, Ponta Grossa – PR (29 de junho a 01 de julho de 1997);
- d) VII International Macromolecular Colloquium, Gramado – RS (29 de setembro a 03 de outubro de 1996).

5.2 - "Estudo de reações de preparação do auxiliar quiral (S)-(-)-2-metoximetil-pirrolidina (SMP)"

- a) V Encontro de Química da Região Sul da Sociedade Brasileira de química, Porto alegre – RS (16 e 17 de outubro de 1997);
- b) XIV Semana de Química da UEM, Maringá – PR (15 a 19 de junho de 1998);
- c) VII Encontro anual de Iniciação Científica, Maringá – PR (28 a 30 de junho de 1998);
- d) VI Encontro de Química da Região Sul, Maringá – PR (04 a 06 de novembro de 1998).

5.3 - "Encapsulamento e Caracterização Físico-química do antibiótico Norfloxacin em Lipossomas"

- a) XL Congresso Brasileiro de Química – Química: ontem, hoje e sempre", Recife – PE (23 a 26 de outubro de 2000)

Título: "Encapsulamento de Norfloxacin em lipossomas investigado através de medidas do grau de anisotropia de fluorescência"

- b) First Mercosur Workshop on Biomembranes and Primer Workshop de Biomembranas del Mercosur
Universidad Nacional de Quilmes - Buenos Aires (Bernal) – Argentina (30 de novembro a 01 de dezembro de 2000)

Título: "Norfloxacin Distribution in Multilamellar Liposomes Studied by Spectrofluorimetry"

6 – TRABALHO PUBLICADO

E.I. Baptista, G.M. Campese, N.L. Zalloum, A.F. Rubira & E.C. Muniz, Degradation of polyisoprene induced by chloranil, *Polymer Degradation and Stability*, 60(1998), 309-315

A Deus, por permitir com que o bom fruto *sempre* caia perto do tronco!

À minha mãe, Guiomar, imagem de Fé e Coragem.

A meu pai, Ali, inspirador da Paciência e Perseverança .

À Leila, minha irmã amada. Ensinou-me a ter Ternura e Saudades...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de explicitar minha sincera gratidão às pessoas que tanto colaboraram para que este trabalho se realizasse.

Ao Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine, pela amizade, orientação, dedicação e paciência em todos os momentos.

Aos colegas de grupo Débora, Edelza, Lauro, Milene, Rita, Robson e Sílvia pela amizade e companheirismo nas horas difíceis, e pela alegria particular de cada um.

A todos do grupo, que singelamente marcaram minha vida, porém em particular, gostaria de agradecer à Débora, nossa "japonesa italiana", pelos longos e constantes momentos de discussões científicas, e que me ensinou com muita presteza muito do que aprendi neste dois anos.

Aos amigos da "salinha de estudos" Melissa, Cláudio e Kesley, que todos os dias nestes dois anos, abrihantaram minha vida com pequenos gestos de carinho e solidariedade.

Aos colegas do laboratório B-200: Carol, Marilene, Daniel, Marcelo (técnico), Vanderlei, Kai, Denise, Alexandre.

À Fabiana, pela grande ajuda nos experimentos.

À Nara e Maria do Carmo, sempre prontas à ensinar e emprestar os equipamentos.

À Martha, minha amiga "carioca baiana", pelas boas risadas que demos juntas.

Ao Dr. Neme Moussa Fouani, por sua generosidade. Obrigada por estar junto mesmo não estando perto!

Aos meus grandes amigos Rogério C. da Silva e Andrey W. Paludetto, pela presença marcante em todos os momentos nestes dois anos.

À Márcia e ao Sr. Carlos Signorelli, expressão viva do amor pelo semelhante. À Luciana e Mário, ao Cristiano e Paula, obrigada pela amizade e respeito em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

Ao Mariano, simplesmente pelo que representou em minha vida...

À Cláudia Martelli, pela grande ajuda na utilização do espectrofotômetro UV-vis e espectrofluorímetro.

Aos funcionários da vidraria, em especial ao Fontana pela amizade e carinho.

Aos funcionários das oficinas, almoxarifado, manutenção, xerox, informática, BIQ .

Aos funcionários da CPG, em especial à Bel, André, e Celi pela alegria e paciência com que sempre fui recebida, e pela resolução eficiente dos vários problemas que sempre surgem.

Ao Iveraldo e à Eliane, pela generosidade e ajuda com os painéis.

Aos professores da Universidade Estadual de Maringá, responsáveis por minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Edvani Curti Muniz, por ter sido meu primeiro orientador científico.

À Profa. Dra. Silvana Maria de Oliveira, por ser tão excelente orientadora e amiga.

Ao Prof Nailor Marques Júnior, por sua solidariedade e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán Caballero, pelo uso do liofilizador.

Ao Prof. Dr. Watson Loh, pelo uso do Micro-DSC.

Ao Prof. Dr. Amando S. Ito (IF-USP), pela atenção dispensada e pelo uso do espectrofluorímetro com resolução temporal.

Ao Prof. Dr. Pedro L. O Volpe (IQ-UNICAMP) e à Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana (FEQ-UNICAMP) pela inestimável contribuição científica em meu Exame de Qualificação.

À Prodome Química e Farmacêutica Ltda, pelo fornecimento do Norfloxacin

À Lucas Meyer, pelo fornecimento da fosfatidilcolina de soja (Epikuron 200SH).

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao FAEP, pelo auxílio-ponte

Ao Instituto de Química/Unicamp por seu prestígio e receptividade, o que possibilitou a execução deste trabalho.

Enfim, a todos ligados direta e indiretamente a este trabalho, meu muito obrigada!

ÍNDICE

<i>Índice</i>	<i>xi</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>xiii</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>xvi</i>
I. Introdução Téorica	1
I.1 Fluoroquinolonas: Características Gerais	1
I.2 Introdução Geral sobre Lipossomas	6
I.3 Considerações Gerais sobre Lipossomas.	7
I.4 Classificação dos Lipossomas.	8
I.5 Mecanismo de Formação de Lipossomas.	9
I.6 Preparação de Lipossomas.	11
I.7 Aplicação dos Lipossomas.	13
II. Objetivos	16
III. Materiais e Métodos	17
III.1 Materiais.	17
III.2 Caracterização do Norfloxacin.	17
III.2.1 Avaliação da solubilidade do Norfloxacin.	18
III.2.2 Avaliação da influência da polaridade de solventes no espectro de absorção do Norfloxacin.	18
III.3 Estudo em função do pH.	18

<i>III.4 Preparação dos Lipossomas.</i>	<i>19</i>
<i>III.5 Centrifugação dos Lipossomas.</i>	<i>20</i>
<i>III.6 Determinação da concentração de Norfloxacin em solução.</i>	<i>20</i>
<i>III.7 Avaliação do comportamento de Norfloxacin através de Micro- calorimetria Diferencial de Varredura.</i>	<i>21</i>
<i>III.8 Avaliação do encapsulamento de Norfloxacin através de medidas do grau de anisotropia de fluorescência.</i>	<i>21</i>
<i>III.9 Estudo de supressão de fluorescência de Norfloxacin em Lipossomas MLV.</i>	<i>21</i>
IV. Resultados e Discussão	23
<i>IV.1 Caracterização do Norfloxacin.</i>	<i>23</i>
<i>IV.2 Espectroscopia do Norfloxacin em solução.</i>	<i>25</i>
<i>IV.3 Espectroscopia do Norfloxacin em função do pH.</i>	<i>28</i>
<i>IV.4 Preparação dos Lipossomas.</i>	<i>36</i>
<i>IV.5 Centrifugação dos Lipossomas.</i>	<i>38</i>
<i>IV.6 Avaliação de Norfloxacin incorporado em bicamadas lipídicas através de Micro-calorimetria Diferencial de Varredura.</i>	<i>42</i>
<i>IV.7 Investigação sobre encapsulamento de Norfloxacin através de medidas de grau de anisotropia de fluorescência.</i>	<i>46</i>
<i>IV.8 Estudo sobre interações lipossomas-Norfloxacin através de supressão de fluorescência.</i>	<i>48</i>
V. Conclusões.	57
VI. Referências Bibliográficas.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1</i> – Fórmula estrutural da quinolona.	1
<i>Figura 2</i> – Estruturas centrais das quinolonas: a) naftiridina; b) cinolina e c) piridopirimidina.	2
<i>Figura 3</i> – Fórmula molecular do Norfloxacin.	3
<i>Figura 4</i> – Produto resultante da complexação entre NFX e o íon metálico Fe^{+3}	4
<i>Figura 5</i> – Reação de fotodegradação de NFX em meio aquoso.	5
<i>Figura 6</i> – Representação de um lipossoma multilamelar (MLV), encapsulando substâncias hidrofílicas (amarelo), hidrofóbicas (azul), anfífilas (verde) e colesterol (vermelho).	8
<i>Figura 7</i> – Classificação dos lipossomas quanto à forma: a) vesícula unilamelar pequena (SUV); b) vesícula unilamelar grande (LUV); c) vesícula multilamelar (MLV); d) vesícula oligolamelar (OLV); e) vesícula multivesicular (MVV).	9
<i>Figura 8</i> – Representação esquemática do possível mecanismo de formação de lipossomas multilamelares (MLV) no método de hidratação do filme seco de fosfolipídios. ...	10
<i>Figura 9</i> – Fórmula estrutural da fosfatidilcolina de soja.	12
<i>Figura 10</i> – Posição ocupada pelo colesterol nas bicamadas de membranas.	13
<i>Figura 11</i> – Espectro de massa do Norfloxacin.	24
<i>Figura 12</i> – Espectros de absorção de soluções de NFX ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em a) n-hexano (preto), etanol (vermelho) e metanol (verde) e b) em misturas de $CHCl_3$:MeOH, a 25 °C.	26

<i>Figura 13</i> – Espectros de fluorescência de NFX em a) n-hexano (preto), etanol (vermelho) e metanol (verde) e b) em misturas de $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$, a 25 °C ($\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$) . . .	26
<i>Figura 14</i> – Espectros de fluorescência não normalizados de NFX em a) n-hexano (preto), etanol (vermelho) e metanol (verde) e b) em misturas de $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$, a 25 °C ($\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$)	27
<i>Figura 15</i> – Espectros de fluorescência de NFX em função do pH para soluções em diferentes tampões a 25 °C ($\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$)	29
<i>Figura 16</i> – Espectros de emissão de espécies puras de Norfloxacin obtidos via tratamento quimiométrico.	32
<i>Figura 17</i> – Decaimento da intensidade de fluorescência das espécies catiônica, neutra e aniônica de NFX em função do pH.	33
<i>Figura 18</i> – Espectros de absorção de soluções de NFX em diferentes pH.	34
<i>Figura 19</i> – Espectros de absorção de espécies puras de NFX obtidos via tratamento quimiométrico	35
<i>Figura 20</i> – Decaimento da absorbância das espécies catiônica, neutra e aniônica de NFX em função do pH.	35
<i>Figura 21</i> – Distribuição de tamanho de lipossomas MLV contendo NFX em HEPES 0,01 mol.L^{-1} (pH 7).	37
<i>Figura 22</i> – Gráfico de PRESS para o modelo PLS multivariado.	40
<i>Figura 23</i> – "Leverage" versus resíduos calculados com a distribuição "t" obtidos da modelagem feita por PLS.	41
<i>Figura 24</i> – Vetores de regressão na faixa espectral entre 210 e 400 nm.	42
<i>Figura 25</i> – Micro-DSC de lipossomas MLV. Curvas de Micro-DSC de fosfatidilcolina sem NFX (a, c) e fosfatidilcolina com NFX (b, d) em tampão HEPES 0,01 mol.L^{-1} (pH 7)	44
<i>Figura 26</i> – Representação esquemática das fases das bicamadas em lipossomas, com o aumento da temperatura.	45
<i>Figura 27</i> – Esquema ilustrativo de anisotropia de fluorescência de um fluoróforo simétrico cilíndrico cujos dipolos de excitação e emissão são paralelos ao eixo de simetria.	47

<i>Figura 28</i> – Espectros de fluorescência do NFX encapsulado em lipossomas MLV 25 mg PC (a, b) e 45 mg PC (c, d) após adições sucessivas de alíquotas de 200 µL dos agentes supressores KI (a, c) e acrilamida (b, d) a 25 °C.	49
<i>Figura 29</i> – Gráfico de Stern-Volmer para os valores de intensidade de fluorescência do NFX, obtidos na ausência e na presença dos agentes supressores KI (preto) e acrilamida (vermelho), para (a) lipossomas MLV de 25 mg PC e (b) NFX livre em solução tampão HEPES 0,01 mol.L ⁻¹ (pH 7)	50
<i>Figura 30</i> – Gráfico de Stern-Volmer modificado para os valores de intensidade de fluorescência de NFX, obtidos na presença dos agentes supressores I ⁻ e acrilamida para (a) lipossomas MLV de 25 mg PC e (b) NFX livre em solução tampão HEPES 0,01 mol.L ⁻¹ (pH 7)	50
<i>Figura 31</i> – Espectros de fluorescência de NFX em lipossomas MLV (a, b) e NFX livre em solução (c, d), após fazer a deconvolução espectral por quimiometria. Os espectros (a, c) mostram a supressão pelo I ⁻ e os espectros (b, d) a supressão por acrilamida, para duas espécies diferentes representadas por duas Componentes Principais, PC1 (preto) e PC2 (vermelho)	52
<i>Figura 32</i> – Espectros de fluorescência do NFX livre em solução tampão HEPES 0,01 mol.L ⁻¹ pH 3 após adições sucessivas de alíquotas de 200 µL dos agentes supressores a) KI 0,5 mol.L ⁻¹ e b) acrilamida 0,5 mol.L ⁻¹ , a 25 °C.	53
<i>Figura 33</i> – Decaimento da intensidade de fluorescência do NFX livre e em lipossomas MLV descritos pela PC1, em função da concentração dos supressores KI (quadrados) e acrilamida (círculos)	54
<i>Figura 34</i> - Gráfico de a) Stern-Volmer e b) Stern-Volmer modificado para os valores de fluorescência do NFX, obtidos na presença dos agentes supressores KI e acrilamida para NFX livre em solução tampão HEPES 0,01 mol.L ⁻¹ com pH 7 e NFX em lipossomas MLV de 25 e 45 mg de PC a 25 °C.	55

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> - Classificação de lipossomas quanto ao tamanho.	9
<i>Tabela 2</i> - Massa de fosfatidilcolina e ciclos de congelamento/descongelamento utilizados. .	19
<i>Tabela 3</i> - Solubilidade de NFX em diferentes solventes	24
<i>Tabela 4</i> - Diâmetro dos lipossomas contendo NFX	37
<i>Tabela 5</i> - Diâmetro dos lipossomas antes e após 2 h de repouso	38
<i>Tabela 6</i> - Valores de concentrações reais e previstas e erros calculados pelo modelo de calibração multivariado PLS para soluções de Norfloxacin	39
<i>Tabela 7</i> - Parâmetros termodinâmicos para a fosfatidilcolina em Hepes 0,01 mol.L ⁻¹ (pH 7), na ausência e na presença de NFX (duplicata)	43
<i>Tabela 8</i> - Valores de grau de anisotropia de fluorescência (r) de NFX e NFX-MLV obtidos a 25 °C em vários solventes	48
<i>Tabela 9</i> - Valores das constantes de Stern-Volmer (K) obtidas experimentalmente.	51
<i>Tabela 10</i> - Valores experimentais das constantes de Stern-Volmer (K) obtidas para NFX livre em HEPES 0,01mol.L ⁻¹ (pH 3) e em lipossomas de 25 e 45 mg de PC, após a utilização dos agentes supressores I ⁻ e acrilamida	55

CAPÍTULO I

I. INTRODUÇÃO TEÓRICA

I.1 FLUOROQUINOLONAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS

O termo quinolona foi utilizado pela primeira vez por Price e col., em 1949, ao descreverem um ácido carboxílico com a estrutura das quinoleínas e contendo uma função cetona na posição 4 da molécula. Esta substância, o ácido 1-metil-quinolona-3-carboxílico, Figura 1, foi obtida da degradação de alguns alcalóides, não sendo reconhecida como uma droga com atividade biológica.

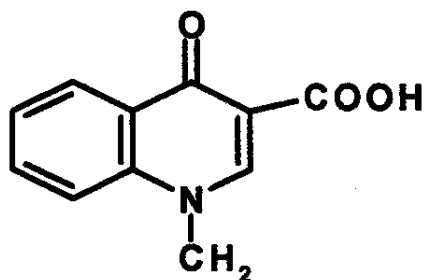


Figura 1 – Fórmula estrutural da quinolona

Como resultado de algumas pesquisas, foi descoberto o ácido nalidíxico, a primeira das substâncias atualmente conhecidas como "quinolonas" usada na clínica médica, que apresenta ação bactericida contra bactérias Gram-negativas, mas sem ação contra a *Pseudomonas aeruginosa*, com pequena ação contra bactérias Gram-positivas, sendo absorvida pelo trato digestivo e rapidamente metabolizada e excretada pelos rins. Por isso seu uso ficou restrito às infecções urinárias causadas por enterobactérias [1, 2].

Após a descoberta desta substância houve interesse na obtenção de outras com características químicas semelhantes e que pudessem ter melhor atividade antimicrobiana. Dentre os inúmeros derivados descobertos têm-se o ácido oxolínico (introduzido por Turner e col. em 1967), o ácido piromídico (descoberto por Shimizu e col. em 1970) e a cinoxacina (anunciada por White em 1970).

Para que o termo quinolona não fosse usado incorretamente, atualmente ele designa uma classe de substâncias com a estrutura básica 4-quinolona, e as substâncias antimicrobianas cujo núcleo central é uma naftiridina, uma cinolina ou uma piridopirimidina (Figura 2) [1, 3].

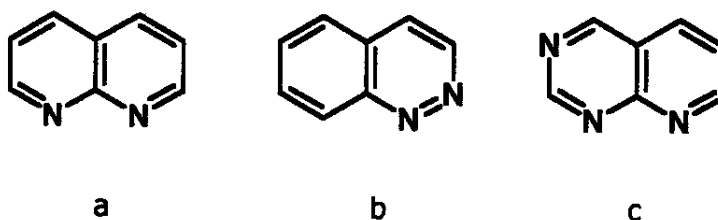


Figura 2 – Estruturas centrais das quinolonas: a) naftiridina; b) cinolina e c) piridopirimidina

Um novo e decisivo avanço na obtenção de novas quinolonas para fins terapêuticos ocorreu em 1980, quando Ito e col. [4] apresentaram o Norfloxacin (NFX), substância sintetizada e registrada em 1977 pela Companhia Farmacêutica Kyorin, Japão, e que só foi liberada para uso nos Estados Unidos no início de 1987 (Figura 3).

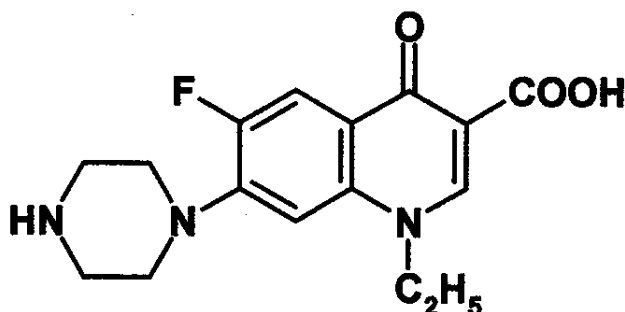


Figura 3- Fórmula molecular do Norfloxacin

O NFX é a primeira das quinolonas fluoradas, lançada para uso clínico em humanos, e que marcou o início do descobrimento de diversas novas quinolonas fluoradas, com diferentes propriedades microbianas e farmacocinéticas [5]. Apresenta como núcleo central o anel quinolônico e, como as demais quinolonas fluoradas, o átomo de flúor ligado ao carbono 6 da molécula, responsável pela elevada ação contra os bacilos Gram-negativos, pelo aumento da atividade inibidora da DNA-girase e pela penetração através da parede celular bacteriana. Apresenta, ainda, um grupo piperazínico ligado ao carbono 7, que lhe confere atividade contra a *Pseudomonas aeruginosa*.

O NFX é a fluoroquinolona que apresenta a farmacocinética menos favorável, pois são absorvidos apenas 30 a 40% da dose administrada por via oral e tendo sua concentração tecidual baixa [6]. Por isso, a principal indicação clínica do NFX consiste na terapêutica de infecções urinárias (cistite, pielite, pielonefrite), prostáticas (prostatite crônica) e intestinais, embora estudos recentes a recomendem no tratamento de infecções do trato respiratório [7, 8].

A presença de alimentos no estômago retarda a absorção da droga, o pico de concentração sérica aparece mais tardiamente e é menor. A absorção oral é ainda reduzida pela administração concomitante de antiácidos à base de hidróxido de alumínio. Djurdjevic e col. [9] descreve a formação de um complexo entre o antibiótico e os íons metálicos através de uma ligação entre o Al^{3+} e os átomos de oxigênio da carbonila e do grupo carboxílico. Segundo este trabalho, esta mesma complexação poderia resultar em um novo método de determinar a concentração de NFX em preparações farmacêuticas ou em amostras de urina humana usando espectrofluorimetria, uma vez que este complexo promove um aumento na intensidade de fluorescência do NFX [10]. Belal e col. [11]

propuseram o produto de reação de complexação de NFX e Fe^{+3} , que pode ser o mesmo entre o antibiótico e Al^{+3} (Figura 4) [12].

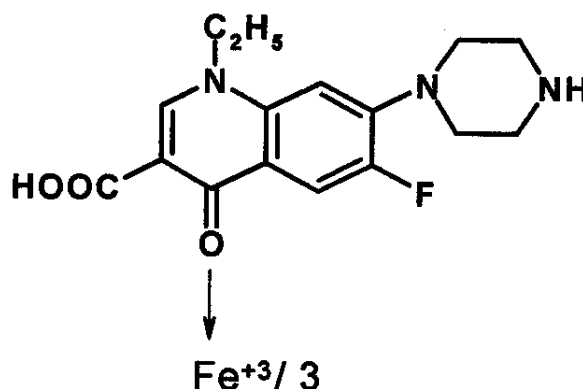


Figura 4 – Produto resultante da complexação entre NFX e o íon metálico Fe^{+3}

O mecanismo de ação bactericida do NFX, e das fluoroquinolonas de forma geral, consiste na inibição da atividade da enzima DNA girase (Topoisomerase II), importante no processo de replicação do DNA bacteriano. Esta enzima contém duas subunidades A, as quais são responsáveis pelo rompimento do duplo filamento do DNA cromossômico e, também, pelo resselamento destes filamentos, e duas subunidades B responsáveis pelo superespiralamento do DNA. As fluoroquinolonas ligam-se especificamente à subunidade A da DNA girase relaxando-as e passando a ocupar um espaço maior que o contido no corpo bacteriano, além de induzir a síntese descontrolada de RNA-mensageiro e proteínas, levando à degradação cromossômica e, conseqüentemente, à morte celular [1, 3,13].

A propriedade mais importante de um antibiótico está em sua capacidade de destruir células bacterianas sem danificar as células de humanos (toxicidade seletiva). Embora ambos os tipos de células possuam DNA com duplo filamento, ocorrem algumas diferenciações que permitem às fluoroquinolonas não serem tóxicas ao homem. Dentre elas pode ser citada a girase presente em células de humanos cuja estrutura apresenta somente duas subunidades ao invés de quatro, o que possibilita a não inibição desta. Contudo, como a grande maioria dos medicamentos utilizados, o NFX causa efeitos colaterais, como: náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, dispepsia, flatulência e fotossensibilidade de superfícies dérmicas expostas à luz, o que ocorre em 1,1% dos pacientes.

Têm sido relatados em vários trabalhos o potencial de fotossensibilização das fluoroquinolonas, dentre os quais pode-se citar a indução de tumores dérmicos em ratos e a fototoxicidade em células mamárias *in vitro*, causada por radiação UVA [14, 15, 16, 17]. Ouédraogo e col. [18] observaram que estes antibióticos se acumulam em lisossomos de fibroblastos HS68 da pele humana e em outras organelas citoplasmáticas e danificam a membrana lisossomal após a fotossensibilização com radiação UVA.

Um mecanismo plausível para explicar a fototoxicidade e a fotocarcinogenicidade está no fato de que a fotodecomposição das fluoroquinolonas gera espécies reativas de oxigênio uma vez que o NFX e outras fluoroquinolonas são fotossensibilizadores moderados [19]. Geralmente as reações responsáveis pela ação fototóxica são iniciadas por espécies destas no estado triplete, devido ao longo tempo de vida no estado excitado, e que permite a reação direta com biomoléculas ou com moléculas de oxigênio, gerando espécies tóxicas aos sistemas biológicos. Uma dessas espécies é o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), formado predominantemente via transferência de energia do estado triplete das FQ para o oxigênio dissolvido. Burhenne e col. [20] descereveram o principal produto de fotodegradação de NFX com alterações no grupo piperazínico (Figura 5).

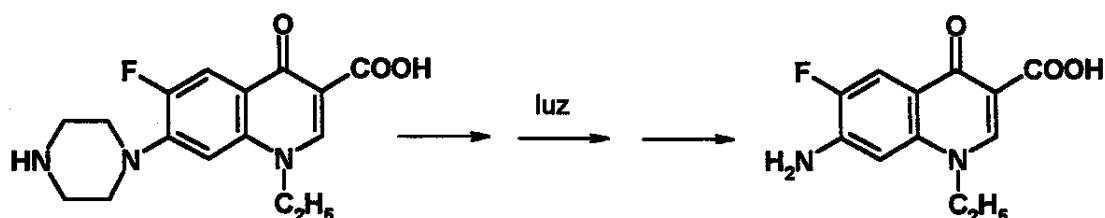


Figura 5 – Reação de fotodegradação de NFX em meio aquoso

Saniabadi e col. [21] relata a ocorrência de fototoxicidade após irradiar ratos com luz UVA, mesmo utilizando concentrações muito pequenas de NFX. Verificaram os danos em leucócitos durante a irradiação, provavelmente causados por moléculas excitadas e por espécies reativas de oxigênio, que são geradas e reagem com os componentes dos tecidos produzindo mediadores inflamatórios, estimulando o acúmulo de leucócitos no local irradiado.

Esta foi a principal motivação deste trabalho, uma vez que o uso de sistemas lipossomais poderia minimizar a fototoxicidade por diminuir a concentração de NFX a ser administrada, pois a fototoxicidade depende da concentração de FQ. Também, por

entregar o fármaco preferencialmente nos locais de infecção, devido ao aumento da captura destas vesículas pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial, se administrado por via intravenosa [22], e ainda, por promover interações efetivas entre bactéria e fármaco encapsulado devido à pequena solubilidade deste em soluções com pH 7 (solubilidade em água a 25 °C: 0,28 mg/mL), o que torna este fármaco não disponível para uso parenteral.[1, 19, 23].

Diferentes formulações lipossomais têm sido desenvolvidas com a finalidade de promover interações efetivas entre bactéria e o fármaco encapsulado, aumentando seu tempo de vida e reduzindo absorção sistêmica do mesmo [23]. Majumdar e col. [24] , descreveram o comportamento de Ciprofloxacina (CPX) encapsulado em lipossomas no tratamento de infecções causadas por *Mycobacterium avium*-M. intracellulare complex (MAC), que frequentemente causam infecções oportunistas em pacientes com AIDS, observando que o antibiótico encapsulado foi 50 vezes mais eficiente que o fármaco livre [25, 26].

De acordo com Nagata e col. [27] estes resultados obtidos para o CPX encapsulado em lipossomas podem ser estendidos às outras FQ, uma vez que estes sistemas induzem o aumento das funções dos macrófagos, da produção de NO e de citocinas, o que os torna de extrema importância em terapias antimicrobianas, anticâncer e AIDS.

I.2 INTRODUÇÃO GERAL SOBRE LIPOSSOMAS

A ciência envolvida na obtenção de novos medicamentos teve grande desenvolvimento e continua em evolução, mas o custo para obtê-los é muito elevado. Por outro lado, a forma de administração de medicamentos ainda é pouco eficiente, e muitos deles produzem efeitos colaterais indesejáveis e danosos ao organismo. De modo geral é necessário que o medicamento seja administrado em quantidades mínimas, para não causar danos ao organismo mas, ao mesmo tempo, em quantidades suficientes para produzir sua ação terapêutica após sua absorção pelos tecidos, diluição nos fluidos corporais ou excreção.

Muitas vezes, isto pode ser conseguido pela administração da droga pura ou livre. Entretanto, a eficácia do medicamento pode ser aumentada encapsulando-o em algum tipo de carregador, que o levará ao local onde ele é necessário, evitando a sua perda e a

ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis devido à absorção sistêmica pelo organismo. Dentre estes sistemas de carregadores utilizados destacam-se os lipossomas, descobertos no início da década de 60 por Alec D. Bangham, e que passaram a despertar interesse dos pontos de vista científico e comercial na década de 70, quando Gregoriadis e Ryman os utilizaram como veículos de transporte de enzimas e fármacos antineoplásicos e antimicrobianos [28, 29, 30].

O uso destas vesículas como veículos para a liberação controlada de fármacos e de outras substâncias está baseado no fato de que elas modificam suas propriedades farmacocinéticas, tempo de trânsito na circulação sanguínea e metabolismo, resultando em diversas características de importância farmacológica [31].

I.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE LIPOSSOMAS

Lipossomas é a designação genérica dada às menores vesículas artificiais de formato esférico que podem ser produzidas a partir de lipídios apropriados, organizados em bicamadas concêntricas, separadas por compartimentos aquosos. Os lipídios que constituem as bicamadas têm regiões polares e apolares bem definidas e, quando dispersos em água, organizam-se espontaneamente de modo a não exporem as regiões hidrofóbicas à fase aquosa. Desta forma, os lipossomas são estruturas termodinamicamente favoráveis de substâncias anfífilas em água, tendo como característica comum a exposição das partes hidrofílicas, tanto internas como externas, para o meio aquoso, e regiões internas apolares. [32]

Os lipossomas podem encapsular substâncias hidrofílicas em seu interior, hidrofóbicas em suas bicamadas lipídicas ou anfífilas na interface lipídio/água (Figura 6). Estes sistemas têm sido testados e bastante usados como transportadores de diversos fármacos, material genético, enzimas e outras macromoléculas para o interior das células [33, 34].

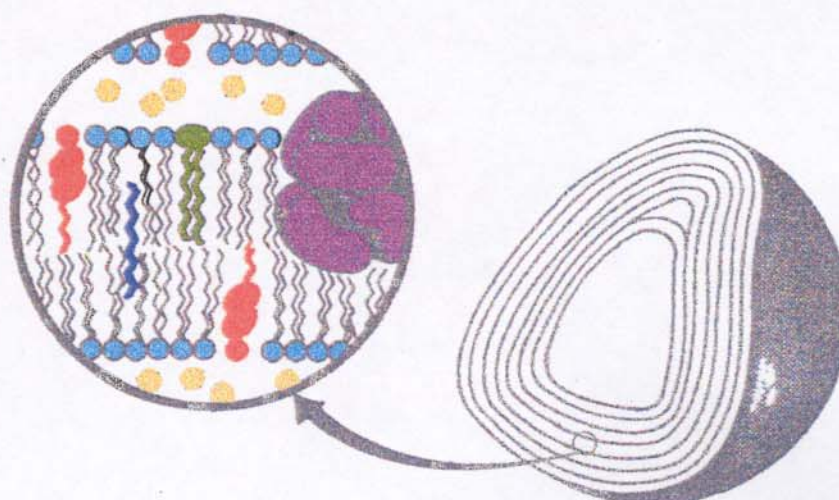


Figura 6 – Representação de um lipossoma multilamelar (MLV), encapsulando substâncias hidrofílicas (amarelo), hidrofóbicas (azul), anfifílicas (verde) e colesterol (vermelho)

Dentre as principais propriedades dos lipossomas pode-se citar a baixa toxicidade, a pouca imunogenicidade, a biodegradabilidade e a capacidade de proteger os compostos encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que quando alcançam os tecidos que necessitam de tratamento podem liberar doses concentradas de medicamento tornando o tratamento mais eficaz, além de possibilitar a administração *in vivo* por várias vias, como intravenosa, ocular, pulmonar, nasal, oral, intramuscular, subcutânea e dérmica.[32]

I.4 CLASSIFICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Estas vesículas fosfolipídicas podem ser classificadas em função do tamanho, lamelaridade ou por sua forma. Quanto à lamelaridade e forma, podem apresentar diversas bicamadas, sucessivamente separadas por compartimentos fluidos, sendo chamadas de vesículas multilamelares (MLV-Multilamellar Vesicle) e oligolamelares (OLV-Oligolamellar Vesicle). Podem conter outros lipossomas em seu interior, sendo, portanto, chamadas de multivesiculares (MVV-Multivesicular Vesicle), e por último, vesículas unilamelares que apresentam somente uma bicamada e uma região aquosa central, que podem ser pequenas (SUV-Small Unilamellar Vesicle), grandes (LUV-Large Unilamellar Vesicle) ou gigantes (GUV-Giant Unilamellar Vesicle). A Figura 7 ilustra esta classificação.

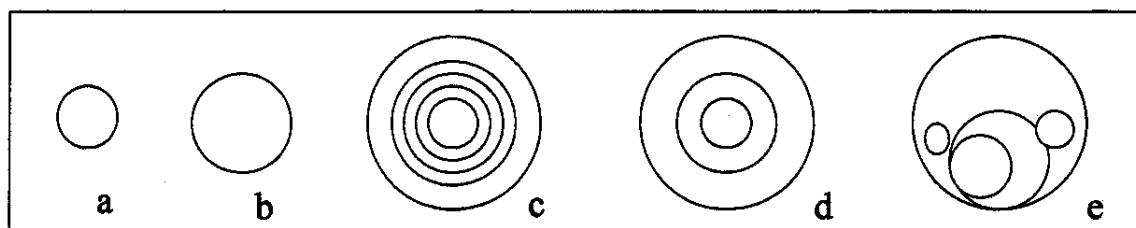


Figura 7- Classificação dos lipossomas quanto à forma: a) vesícula unilamelar pequena (SUV); b) vesícula unilamelar grande (LUV); c) vesícula multilamelar (MLV); d) vesícula oligolamelar (OLV); e) vesícula multivesicular (MVV). Figura adaptada de Barenholz e Crommelin, 1994 [31]

A Tabela 1 mostra a classificação em termos de tamanho.

Tabela 1 - Classificação de lipossomas quanto ao tamanho

Classificação	Diâmetro da vesícula
Vesícula Multilamelar (MLV)	>0,5 μm
Vesícula Oligolamelar (OLV)	0,1 a 1 μm
Vesícula Unilamelar Pequena (SUV)	20 a 100 nm
Vesícula Unilamelar Grande (LUV)	>100 nm
Vesícula Unilamelar Gigante (GUV)	>1 μm
Vesícula Multivesicular (MVV)	Geralmente >1 μm

I.5 MECANISMO DE FORMAÇÃO DE LIPOSSOMAS

Embora o método de hidratação de filmes lipídicos secos seja conhecido há bastante tempo, não se sabe detalhadamente como ocorre a formação de vesículas MLV. Acredita-se que a adição de água ao filme seco de fosfolípidios possibilita maior hidratação das monocamadas mais externas em relação às internas, o que leva à existência de um gradiente de concentração de água através das bicamadas. A água penetra, então, entre e através das bicamadas, reduz a energia do sistema, e causa um aumento da área superficial, de forma que as duplas camadas transformam-se em fibras tubulares,

aumentando sua área de contato com a água. Assim, a indução de transformações na curvatura e na forma das vesículas passa a ser consequência direta de processos termodinâmicos e cinéticos ligados à hidratação (exotérmica) e à taxa lenta e limitada de permeabilidade de água através das bicamadas. Deste modo, as bicamadas estabilizam mantendo uma distância de equilíbrio, a qual envolve forças atrativas de van der Waals e repulsivas de origem eletrostática (estéricas e de ondulação) [35].

A Figura 8 mostra como poderia ser esta provável explicação.

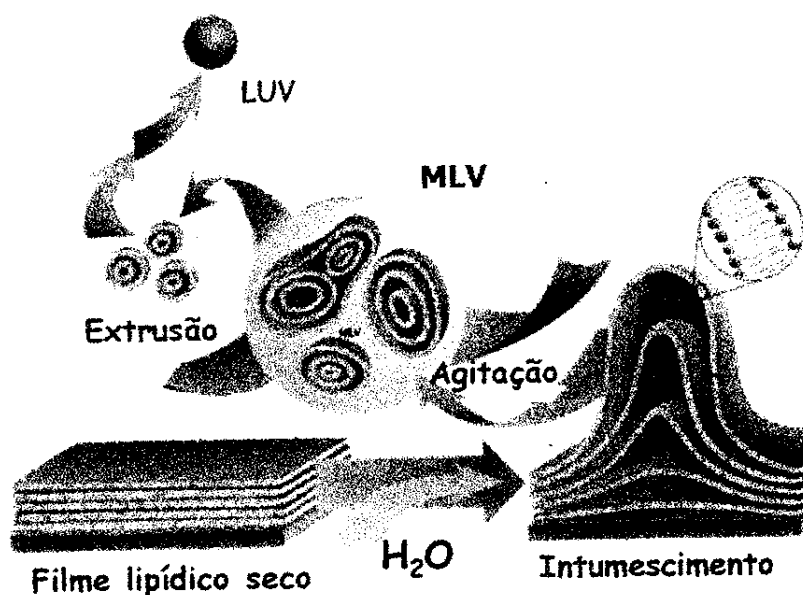


Figura 8 - Representação esquemática do possível mecanismo de formação de lipossomas multilamelares (MLV) no método de hidratação do filme seco de fosfolípidios

Com o passar do tempo, estas estruturas ovais são, aos poucos, transformadas em esféricas, pois esta é a forma geométrica em que a energia de curvatura é mínima e o volume encapsulado é máximo. Este estado é provavelmente alcançado através de deslocamentos bidirecionais das moléculas de fosfolípido, uma vez que os eventos que ocorrem durante a formação das vesículas MLV e que ditam a forma final são dependentes das moléculas da monocamada externa e que por sua vez representam mais da metade do total de moléculas [35].

I.6 PREPARAÇÃO DE LIPOSSOMAS

O desenvolvimento bem sucedido de lipossomas para aplicações clínicas depende de uma série de fatores: metodologia na preparação das vesículas, seleção dos lipídios, tamanho da vesícula, método utilizado na incorporação do agente a ser encapsulado e natureza da substância a ser encapsulada. De modo geral, existem três etapas básicas na preparação de lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico seco: a) obtenção de filme seco de fosfolipídios proveniente da evaporação de solventes orgânicos usados em sua dissolução; b) hidratação e dispersão do filme seco em meio aquoso e c) redução do tamanho da vesícula ou do número de bicamadas, caso seja necessário.

Encontram-se na literatura vários métodos para preparar lipossomas. De forma resumida, as diferenças entre os métodos consistem em diferentes técnicas de dispersão mecânica, de mudança de tamanho e fusão de vesículas, alteração de pH durante a etapa de hidratação dos lipídios, forma de separação do material encapsulado do material livre em solução, sendo que pequenas variações nas técnicas e condições experimentais podem alterar as propriedades finais destas vesículas.[28]

Neste trabalho, utilizou-se o método de hidratação de um filme lipídico seco para preparar vesículas multilamelares (MLV), contendo colesterol. Esta técnica produz vesículas MLV com tamanho heterogêneo, consistindo de várias bicamadas concêntricas capazes de encapsular substâncias hidrofóbicas, e um volume aquoso interno pequeno, disponível ao encapsulamento de substâncias hidrofílicas [36].

Lipossomas são normalmente preparados a partir de fosfolipídios, pois estes são os principais componentes de membranas biológicas. Os fosfolipídios mais comuns são as fosfatidilcolinas (PC), moléculas anfífilas formadas por um par de cadeias acila (hidrofóbicas) e uma cabeça polar (hidrofílica). As moléculas de PC não são solúveis em água, e acabam se alinhando próximas umas das outras, formando bicamadas planares.

As fosfatidilcolinas, conhecidas também como lecitinas, podem ser extraídas de fontes naturais como gema de ovo, soja ou da medula espinhal e coração de bovinos, sendo o composto mais comum e frequentemente usado em formulações lipossomais devido ao seu custo relativamente baixo, à sua neutralidade e também ao fato de serem quimicamente inertes (Figura 9). Estas lecitinas são, na verdade, uma mistura de fosfatidilcolinas com diferentes comprimentos de cadeia e de grau de insaturação, o que

pode ser constatado pelo alto nível de ácidos graxos poliinsaturados em plantas e de saturados em animais.

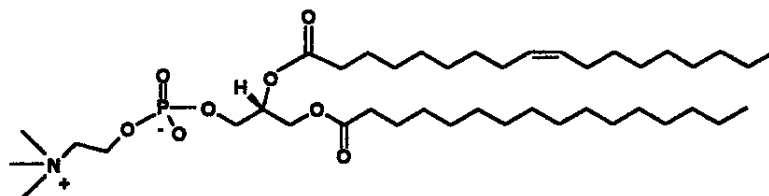


Figura 9 - Fórmula estrutural molecular da fosfatidilcolina de soja

O outro lipídio importante utilizado nas preparações lipossomais é o colesterol, o esterol mais encontrado em membranas de células animais, e que por si próprio não forma estruturas na forma de bicamadas, mas que pode ser incorporado às membranas fosfolipídicas com o objetivo de aumentar a estabilidade mecânica e a rigidez da bicamada, reduzindo o vazamento de substâncias que são incorporadas nas vesículas. O colesterol se insere na bicamada lipídica orientando seu grupo hidroxila para a superfície aquosa, alinhando sua cadeia alifática paralelamente às cadeias acila da bicamada. A Figura 10 ilustra como ocorre a inserção de colesterol nos lipossomas [37].

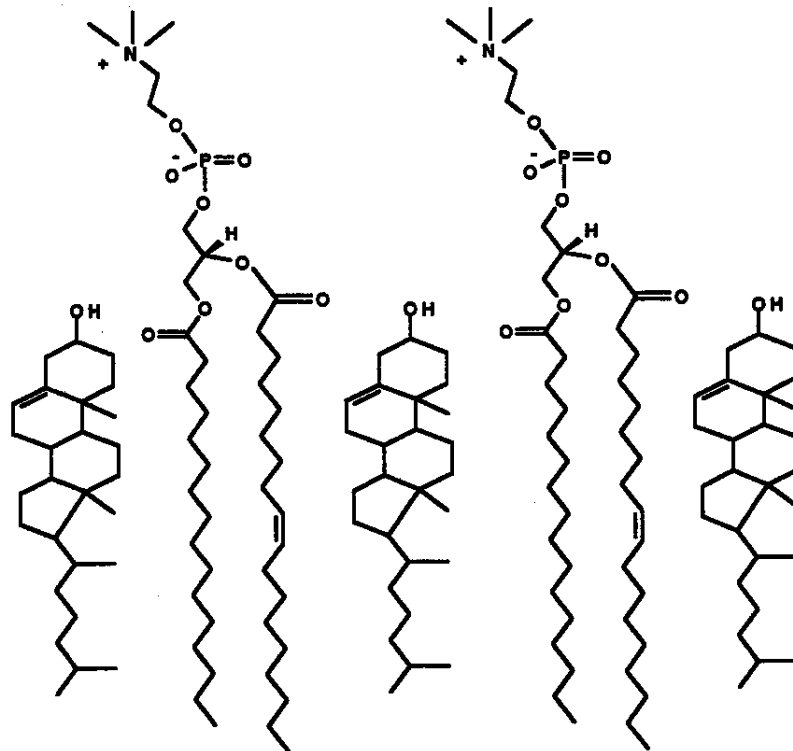


Figura 10 – Posição ocupada pelo colesterol nas bicamadas de membranas

É importante notar que a presença de colesterol entre as cadeias acila fosfolípídicas reduz a liberdade de movimento ao longo dos dez primeiros átomos de carbono, e permite um aumento no grau de liberdade dos átomos restantes da cadeia alifática. Porém, acima de uma certa concentração o colesterol proporciona uma diminuição considerável da área livre existente entre as cadeias fosfolípídicas, eliminando a transição de fase observada em PC pura.

I.7 APLICAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

O tipo de lipossoma utilizado para uma determinada finalidade está diretamente ligado à sua composição, estrutura, lamelaridade e tamanho de seu compartimento aquoso e, dependendo da forma com que é administrada, pode seguir por diferentes vias dentro do organismo.

Cruz e col. [38] mostraram que vesículas formadas por lipídios contendo grupos com carga positiva são fagocitadas muito mais rapidamente que aquelas com carga negativa. Abra e col.[39] observaram que injeção intravenosa (iv) de vesículas MLV aumenta a entrega seletiva de drogas ao pulmão enquanto que Senior e col. [40] notaram que vesículas SUV entregam à medula óssea.

O aumento da dose ou a diminuição do tamanho dos lipossomas pode aumentar seu tempo de permanência na circulação sanguínea quando administrados iv. Entretanto, quando aplicados mediante injeção intramuscular (im) ou subcutânea ocorre dispersão lenta dos lipossomas no local, absorção pelo sistema linfático e retorno à corrente sanguínea onde são fagocitados.

Desta forma, os lipossomas destacam-se por serem utilizados em um número grande de aplicações como emulsificantes e transportadores de aditivos alimentares (antioxidantes e odores) [41]; como transportadores de material genético; como constituintes de cremes e loções [42] e como sistemas terapêuticos, transportando e direcionando fármacos e adjuvantes de vacinas, tendo nestes dois últimos itens sua principal aplicação, uma vez que estes sistemas lipossomais são química e biologicamente compatíveis com membranas celulares.

Têm-se relatado a incorporação de um grande número de agentes bioativos, de alto e baixo peso molecular, e que estão relacionados a vários tipos de terapias: antimicrobiana, antineoplásica, gênica, de doenças metabólicas, hormonal de substituição e tópica (oftálmica e dérmica); em desintoxicação (agentes quelantes), em transfusões (lipossomas com hemoglobina), em vacinas (adjuvantes imunológicos). Estas substâncias passam pela fase de desenvolvimento das formulações sendo submetidos, posteriormente, a testes pré-clínicos e clínicos. Alguns princípios ativos encapsulados em lipossomas hoje se encontram nestas fases de testes ou esperando autorização governamental para serem usados em humanos. Pode-se citar, dentre estas substâncias, a Anfotericina B (Amfocil e Ambisome), utilizada em infecções fúngicas e leishmaniose sistêmicas; Daunorrubicina (Daunoxoma) e Doxorrubicina (Doxil; já liberado para uso), utilizados em sarcoma de Kaposi; a Nistatina (Nistatina lipossomal), utilizada em infecções sistêmicas fúngicas; Anamicina (Anamicina lipossomal), utilizada em câncer de mama e Amicadina (Micasoma), em infecções bacterianas [32].

De forma simplificada, pode-se dizer que os sistemas lipossoma/fármaco têm sido empregados com a finalidade de reduzir toxicidades clínicas sistêmicas e de aumentar a eficácia terapêutica de alguns fármacos.

CAPÍTULO II

II. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos a preparação e caracterização físico-química de lipossomas multilamelares (MLV) contendo o antibiótico Norfloxacin (NFX), pertencente à classe das fluoroquinolonas, e amplamente utilizado em infecções do trato urinário. Em virtude das inúmeras vantagens que o uso de fármacos encapsulados em sistemas lipossomais podem apresentar, acredita-se que, incorporado em lipossomas, este antibiótico pudesse ter seu efeito fototóxico diminuído, além de facilitar sua entrega aos locais de infecções, permitindo sua utilização para o tratamento de outras doenças infecciosas, às quais o NFX não é empregado.

CAPÍTULO III

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 MATERIAIS

Neste trabalho, foram usados o antibiótico Norfloxacin (Prodome Química e Farmacêutica Ltda.); fosfatidilcolina de soja, PC, (Epikuron 200SH, Lucas Meyer), que possui 99% de fosfatidilcolina; colesterol (recristalizado em metanol a 50°C e caracterizado por espectrometria de massa). Os solventes utilizados foram n-hexano (Synth), metanol (Merck), etanol (Planta Piloto), acetona (Nuclear), clorofórmio (Nuclear), ácido acético (Synth) e mistura de CHCl_3 :MeOH (2:1), todos com grau de pureza p.a. A água destilada foi delonizada em equipamento Milli Q-plus, Millipore.

III.2 CARACTERIZAÇÃO DO NFX

A pureza foi determinada através de espectrometria de massa, feita em instrumento da VG Auto Spec, e por medidas de ponto de fusão em equipamento

composto por uma unidade de controle de temperatura, marca Mettler FP5, forno de fusão, marca Mettler FP52 e microscópio, marca Olympus CBA-K.

III.2.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO NFX

Os testes de solubilidade foram feitos à 25°C) e avaliados visualmente dissolvendo-se 5,0 mg do fármaco em 10 mL de solvente, sob constante agitação até que houvesse o máximo de dissolução. Em algumas amostras se fez necessário o uso de banho em ultrassom (marca Thorntan, T7) por, no mínimo, 30 min.

III.2.2 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA POLARIDADE DOS SOLVENTES NO ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO NFX

Foram preparadas soluções de Norfloxacin (concentração $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$), dissolvendo-se o fármaco em diferentes proporções de CHCl_3 :MeOH. Foram obtidos espectros de absorção em espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos, marca Hewlett-Packard, modelo 8453, que opera na região UV-vis.

III.3 ESTUDO EM FUNÇÃO DO PH

Foram preparadas soluções de NFX (concentração final $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) variando o pH. Os reagentes foram diluídos em água deionizada, preparando-se os tampões ácido cítrico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 3, 4, 5, 6 e 7), ácido bórico $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 8 e 9), NaHCO_3 -NaOH $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 10 e 11) e KCl-NaOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 12). Foram obtidos espectros de absorção e de fluorescência em espectrofluorímetro SLM-AMINCO (modelo SPF-500C), tendo como fonte de excitação uma lâmpada de xenônio (250 W). O comprimento de onda de excitação utilizado foi o de máxima absorção em cada pH e o sinal de fluorescência foi monitorado em 426,5 nm.

III.4 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme seco produzindo MLV de diversos tamanhos.

Para a obtenção de 50 mL de suspensão de lipossomas multilamelares com concentração final $1,0 \cdot 10^{-6}$ e $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de Norfloxacin foram diluídos, em balão de fundo redondo (250 mL), volumes adequados de solução $1,0 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ do fármaco em 15 mL de mistura de CHCl₃:MeOH (2:1 v/v), 15 mg de colesterol além da fosfatidilcolina (Tabela 1).

O solvente foi evaporado no balão de um rotaevaporador (Büchi, modelo 461), à 35 °C, em rotação lenta por, aproximadamente, por 1 h, formando o filme seco de lipídios. Em seguida, este filme foi hidratado com solução de tampão HEPES 0,01 mol.L⁻¹ pH 7, em um banho a 75°C, sob agitação vigorosa por 1 h. A solução foi transferida para um balão volumétrico e completou-se o volume a 50 mL. A suspensão foi deixada em repouso por 2 h para que as vesículas atingissem o equilíbrio. Foram feitas medidas para determinação de tamanho de partículas antes e após este tempo de descanso.

A distribuição de tamanhos dos lipossomas foi analisada através da medida de espalhamento dinâmico quase elástico de luz (QELS), em um equipamento marca Brookhaven Instruments Corp., modelo BI-MAS, que utiliza a espectroscopia de correlação de fótons (PCS – Photon Correlation Spectroscopy).

Foram feitos testes de ciclos de congelamento/descongelamento em solução contendo lipossomas MLV, utilizando-se nitrogênio líquido para o congelamento (Tabela 2). Foram feitas medidas de tamanho de partículas após estes ciclos.

Tabela 2 - Massa de fosfatidilcolina e ciclos de congelamento/descongelamento utilizados

Ensaio	Fosfatidilcolina (mg)	ciclos de cong./descong.
1	25	0
2	45	0
3	25	6
4	45	6

As soluções lipossomais foram preparadas em duplicata.

III.5 CENTRIFUGAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Para a separação de NFX livre e encapsulado, submeteu-se a solução lipossomal à centrifugação a 6000 rpm por 20 min, repetindo-se este procedimento por 3 vezes, em uma centrífuga simples, cuja velocidade máxima de rotação é de 10000 rpm. O precipitado branco foi ressuspensionado e lavado com tampão HEPES, por 3 vezes, e recolhido com pipeta Pasteur. Tanto esta solução ressuspensionada como a solução recolhida das lavagens foram reservadas para posteriores medidas de concentração de NFX.

Foram feitas medidas espectroscópicas de absorção a cada lavagem para analisar a existência de NFX remanescente.

III.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NFX EM SOLUÇÃO

Após a centrifugação dos lipossomas, foram usadas alíquotas de 2 mL tanto do precipitado ressuspensionado como da água de lavagem, às quais adicionou-se etanol numa proporção de 5:1 v/v, com o objetivo de romper as vesículas e dosar a quantidade de fármaco encapsulado. Os resultados foram analisados utilizando-se um modelo de calibração multivariado.

Para esta modelagem foram usadas como padrão dez soluções de NFX em etanol de concentrações 0; $9,0 \cdot 10^{-6}$; $7,0 \cdot 10^{-6}$; $5,0 \cdot 10^{-6}$; $4,0 \cdot 10^{-6}$; $3,0 \cdot 10^{-6}$; $2,0 \cdot 10^{-6}$; $1,0 \cdot 10^{-6}$; $3,0 \cdot 10^{-5}$ e $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Para a construção do modelo de calibração multivariado via PLS ("Partial Least Squares" – Quadrados dos Mínimos Parciais) foram utilizadas as dez soluções de NFX mencionadas, sendo todas elas usadas na etapa de calibração e na validação. O modelo foi feito empregando a subrotina **modlgui** do software MATLAB™. Para definir o melhor modelo a ser usado, os espectros de absorção das soluções foram truncados em regiões diferentes e várias tentativas foram feitas alterando o número de variáveis latentes e verificando os erros na etapa de validação para cada um [43].

III.7 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE NFX EM BICAMADAS LIPÍDICAS ATRAVÉS DE MICRO-CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

Os dados de calorimetria foram obtidos usando-se um micro-calorímetro diferencial de varredura VP-DSC (MicroCal, Northampton, MA), com uma rampa de aquecimento de 1 °C/min, sendo as medidas feitas sob uma pressão de 23 PSI para evitar formação de bolhas. O volume da amostra foi 0,5 mL, usando-se tampão HEPES 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7) como referência. As amostras foram submetidas a quatro corridas consecutivas em um intervalo de temperatura entre 25 e 90 °C e análises feitas em duplicata para cada experimento. Os dados foram avaliados com o software Origin versão 5,0 SR2 fornecido pelo fabricante do equipamento.

III.8 AVALIAÇÃO DO ENCAPSULAMENTO DO NFX ATRAVÉS DE MEDIDAS DO GRAU DE ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA

Determinaram-se os valores do grau de anisotropia se fluorescência (r) para NFX em solução micelar de dodecilsulfato de sódio (SDS, 40 mmol.L⁻¹; CMC do SDS = 8,1 mmol.L⁻¹) em pH 3 e 7, em água deionizada, etanol, clorofórmio, tampões citrato 0,01mol.L⁻¹ (pH 3) e HEPES 0,01mol.L⁻¹ (pH 7) e em MLV preparados em HEPES 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7), a 25 °C, no fluorímetro Fluorolog 3 da Jobin Yvon-Spex, equipado com polarizadores Glan-Thompson, em configuração L. As fendas de excitação e emissão tiveram "band pass" igual a 2 nm.

III.9 ESTUDO DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA DE NFX EM LIPOSSOMAS MLV

As medidas de fluorescência foram obtidas em um espectrofluorímetro SLM-AMINCO. O comprimento de onda de excitação utilizado foi 284 nm e o sinal de fluorescência foi monitorado em 426,5 nm.

O NFX livre e o encapsulado foram mantidos à 25 °C na presença de soluções de iodeto de potássio e acrilamida, em tampão HEPES 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7), como agentes supressores. As concentrações destas soluções variou entre 0 e 0,22 mol.L⁻¹, uma faixa na qual, segundo a literatura, não se induz qualquer mudança na estrutura da bicamada lipossomal [44]. Posteriormente, as soluções de NFX e de ambos os supressores foram preparadas em tampão HEPES 0,01 mol.L⁻¹ (pH 3).

Os espectros de emissão foram tratados, a princípio, com a equação de Stern-Volmer (Equação 1):

$$F_0 / F = 1 + K \cdot [Q] \quad (\text{Equação 1})$$

sendo K a constante de Stern-Volmer e F₀ e F as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente.

Para distinguir duas populações prováveis de fluoróforos, usou-se uma equação modificada de Stern-Volmer (Equação 2):

$$F_0 / \Delta F = [1 / (f \cdot K \cdot [Q])] + (1 / f_a) \quad (\text{Equação 2})$$

sendo f_a a fração de fluorescência inicial acessível ao supressor Q, ΔF a diferença entre as intensidades de fluorescência na ausência (F₀) e na presença (F) do supressor, e K a constante de Stern-Volmer [45].

Para fazer a deconvolução dos espectros e resolver os perfis de supressão das formas zwitteriônica e neutra, aplicou-se a cada experimento o método quimiométrico desenvolvido por Lawton e Sylvestre [46], o qual usa a Análise de Componentes Principais (PCA), cujo cerne é a Decomposição do Valor Singular (SVD).

CAPÍTULO IV

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 CARACTERIZAÇÃO DO NFX

Para avaliar a pureza do Norfloxacin foram obtidos o ponto de fusão e o espectro de massa. A temperatura de fusão foi $(220,3 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C})$, resultado de três determinações e concordante com o valor mencionado na literatura de $221 \text{ }^{\circ}\text{C}$. O espectro de massa obtido foi comparado a um espectro de referência, através do qual pôde-se observar perfeita sobreposição dos picos, Figura 11 [47].

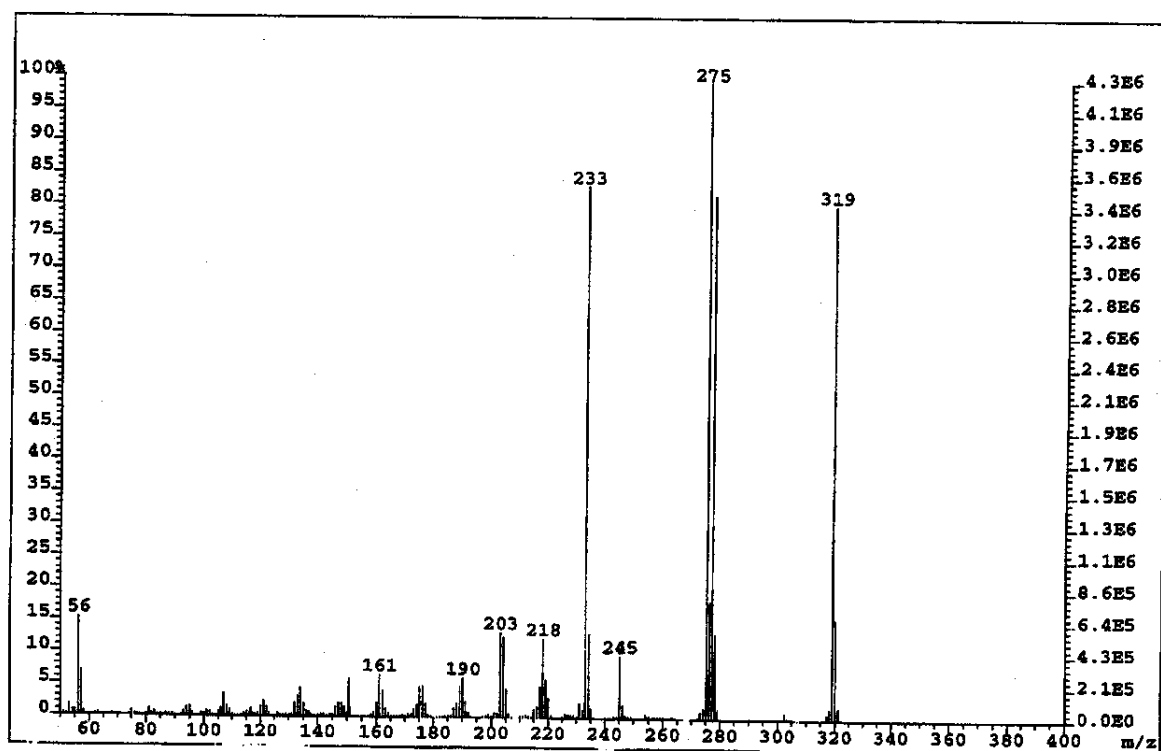


Figura 11 – Espectro de massa do Norfloxacin

Devido ao caráter parcialmente hidrofóbico da molécula de NFX, observou-se a solubilidade deste composto em diferentes solventes [48]. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos.

Tabela 3 – Solubilidade de NFX em diferentes solventes

Solvente	Solubilidade
Água destilada	insolúvel
Metanol	muito pouco solúvel
Etanol	muito pouco solúvel
Acetona	pouco solúvel
Clorofórmio	pouco solúvel
Ácido acético	solúvel
Clorofórmio:metanol (2:1)	solúvel

Em ácido acético a solubilidade foi imediata devido à formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas do solvente e do fármaco, e à protonação dos pares de elétrons não-ligantes dos átomos de nitrogênio presentes na estrutura do Norfloxacin.

A mistura clorofórmio:metanol apresenta uma constante dielétrica diferente das constantes dos solventes puros, e que favoreceu a solubilidade do NFX pela formação de ligações de hidrogênio.

IV.2 ESPECTROSCOPIA DO NORFLOXACIN EM SOLUÇÃO

Com o intuito de relacionar propriedades eletrônicas do NFX com seu comportamento fotoquímico frente ao aumento da polaridade do meio, estudou-se o comportamento espectroscópico deste antibiótico nos solventes n-hexano, etanol e metanol e em diferentes proporções da mistura CHCl_3 :MeOH.

Diferentes tipos de transições são originadas a partir dos orbitais moleculares envolvidos. Moléculas orgânicas, como o NFX, apresentam orbitais moleculares ligantes (σ e π), antiligantes (σ^* e π^*) e não ligantes (n). Em se tratando de transições permitidas por simetria, na excitação de um elétron, este é promovido do orbital de maior energia ocupado (HOMO) ao orbital molecular de menor energia não ocupado (LUMO), que normalmente é um antiligante σ^* ou π^* .

Uma molécula no estado excitado é energeticamente menos estável que no estado fundamental, e uma vez tendo ocorrido a transição, a energia absorvida pode ser dissipada por processos radiativos, não radiativos ou por supressão. Isto foi observado nos experimentos com NFX, notando-se, ainda, que não há sobreposição das bandas $0 \rightarrow 0$ para absorção e emissão, o que indica estar ocorrendo um efeito de interação diferenciada da espécie nos estados fundamental e excitado com as moléculas do solvente [49].

A molécula de NFX em solução apresentou uma intensa absorção entre 280 e 288nm, dependendo da polaridade do solvente, e uma outra banda larga com dois picos mal resolvidos entre 310 e 330 nm, conforme pode ser observado nos espectros normalizados indicados na Figura 12.

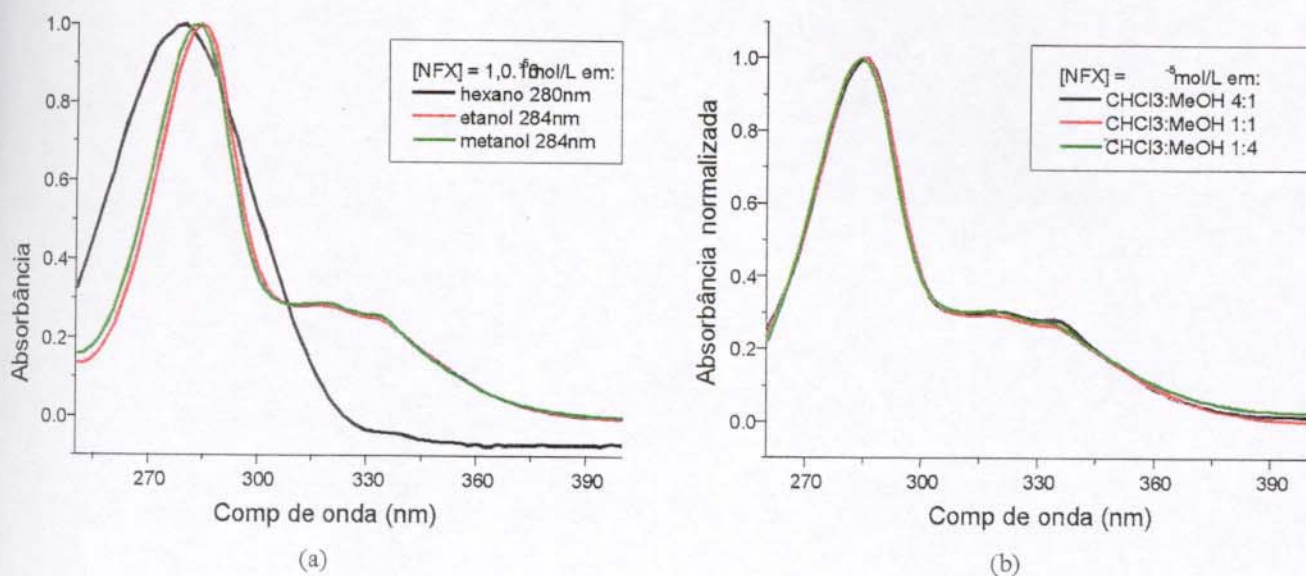


Figura 12 – Espectros de absorção de soluções de NFX ($1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) em a) n-hexano (preto), etanol (vermelho) e metanol (verde) e b) em misturas de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, a 25°C

O espectro de fluorescência apresentou somente uma banda larga e intensa entre 409 e 437 nm com o aumento da polaridade do solvente, devido a um aumento da conjugação dos pares de elétrons presentes no grupo quinolona (Figura 13).

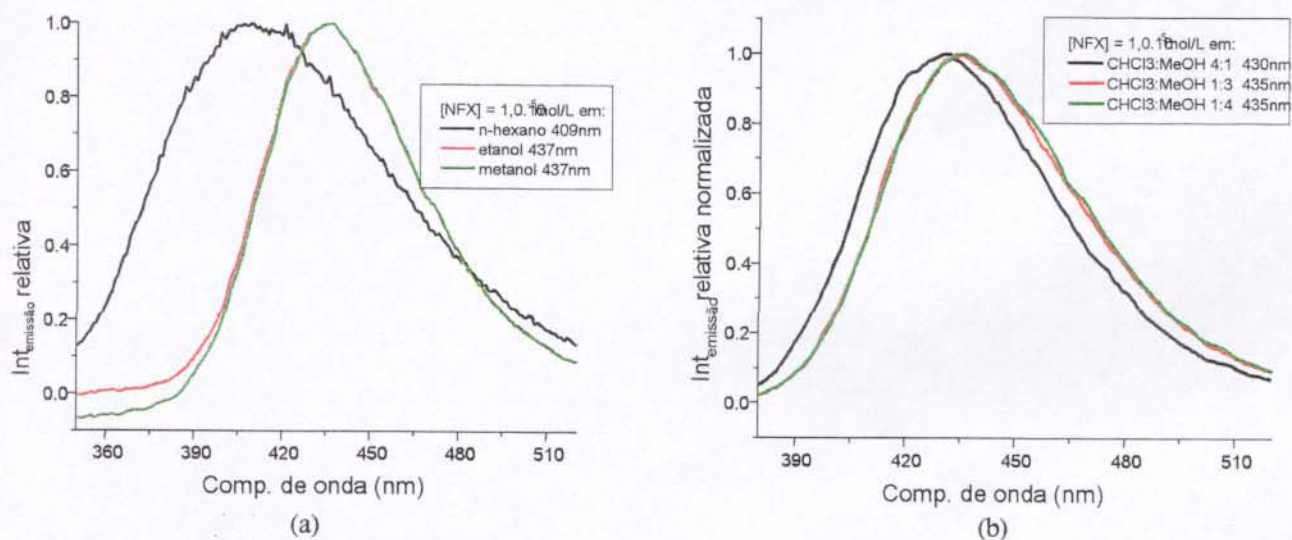


Figura 13 – Espectros de fluorescência de NFX em a) n-hexano (preto), etanol (vermelho) e metanol (verde) e b) em misturas de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, a 25°C ($\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$)

Com respeito à intensidade de emissão, observou-se um aumento desta com o aumento da polaridade em misturas de clorofórmio:metanol (Figura 14b). Estes resultados concordam com a literatura [50], na qual verificou-se que solventes próticos são responsáveis pelo aumento na intensidade de fluorescência do NFX.

Analogamente, os resultados espectrais obtidos em n-hexano, etanol e metanol (Fig 14a), também concordam com os descritos na literatura [51], em que sistemas heterocíclicos contendo nitrogênio, como as quinolonas, existe um estado n,π^* muito próximo do estado π,π^* . Isto faz com que em solventes apolares, como o n-hexano, o estado singlete excitado de menor energia seja do tipo n,π^* que é pouco ou não fluorescente. Em solventes próticos, a interação das ligações de hidrogênio dos solventes com os pares de elétrons livres dos nitrogênios do grupamento piperazínico e até mesmo do grupamento quinolônico, desestabiliza o estado n,π^* e estabiliza o estado π,π^* , responsável pela intensa fluorescência.

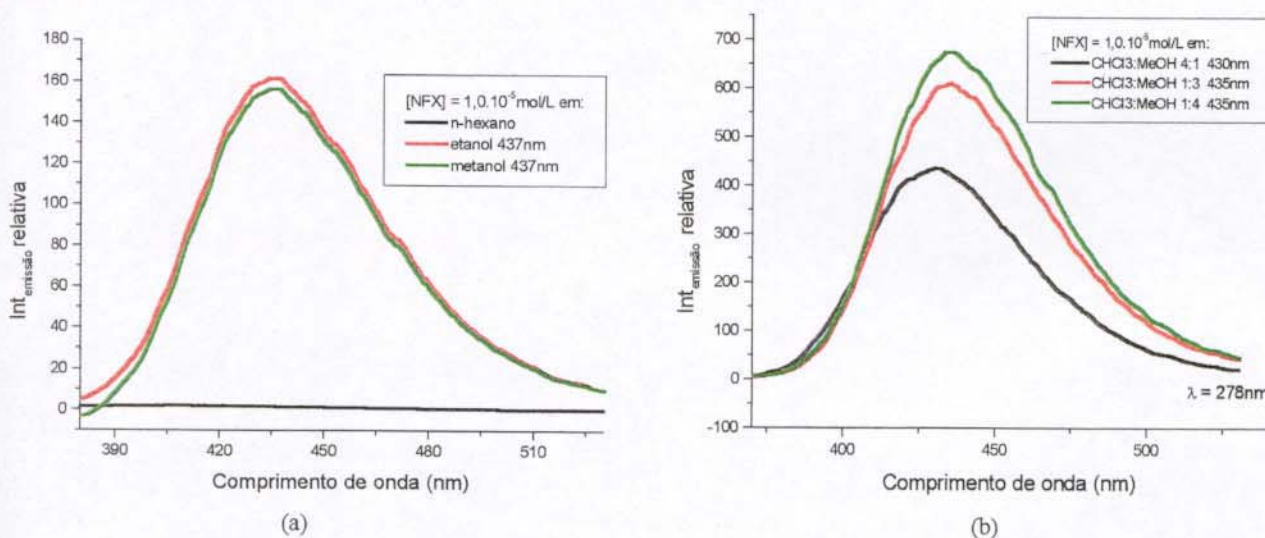


Figura 14 – Espectros de fluorescência não normalizados de NFX em a) n-hexano (preto), etanol (vermelho) e metanol (verde) e b) em misturas de CHCl₃:MeOH, a 25 °C ($\lambda_{\text{ex}} = 278\text{ nm}$)

As bandas intensas de absorção e as de emissão sugerem que o estado singlete excitado de menor energia da molécula do NFX é de caráter π,π^* . Isto é confirmado espectroscopicamente pelo deslocamento do máximo de emissão para o vermelho quando a polaridade do solvente aumenta. Pela Figura 13 nota-se que este deslocamento foi de

28 nm. O fato de ocorrer uma mudança significativa na posição do máximo de emissão com o aumento da polaridade sugere que o momento de dipolo da molécula muda significativamente à medida que ocorre excitação para o estado S_1 . Entretanto, os espectros de absorção foram menos sensíveis à mudança de polaridade do meio. Pôde-se observar um deslocamento para o vermelho de, no máximo, 4 nm para a banda mais intensa e nenhum deslocamento para a banda menos intensa (310-330 nm) (Figura 12). Esta banda desaparece em n-hexano, pois, neste solvente, os pares de elétrons estão livres podendo estar ocorrendo uma interconversão rápida de estados excitados n,π^* e π,π^* , aumentando a população da transição de mais baixa energia n,π^* que normalmente é uma banda muito fraca ou não detectável [52]. À esta banda foi atribuído o caráter n,π^* pois elas aparecem em maiores comprimentos de onda devido à menor energia de transição, além de ser menos intensa que a transição π,π^* .

IV.3 ESPECTROSCOPIA DO NFX EM FUNÇÃO DO pH

Todos os antibióticos da classe das fluoroquinolonas apresentam cromóforo comum que é o responsável pela absorção da luz UV. As moléculas destes fármacos diferem por seus substituintes, porém, todas possuem os grupos carbonila e carboxílico nas posições 4 e 3 do anel quinolona, respectivamente. A dissociação do grupo carboxílico ou a protonação dos átomos de nitrogênio pode produzir espécies carregadas, que frequentemente determinam a distribuição do fármaco nos tecidos, e que apresentam propriedades fotoquímicas e fotofísicas diferentes [53].

O estudo sobre espectroscopia de fluorescência e de absorção de NFX mostrou que as intensidades do sinal e comprimentos de onda de excitação e emissão (λ_{ex} e λ_{em}) são dependentes do pH do meio.

Nota-se na Figura 15, nos espectros de emissão em função do pH, que a banda associada à transição π,π^* possui maior intensidade em soluções ácidas (pH 3 e 4), enquanto que diminuiu consideravelmente em soluções alcalinas, chegando a ser suprimida quando o pH está entre 11 e 12. Verifica-se, ainda, que esta banda apresenta um deslocamento espectral de 35 nm para o azul.

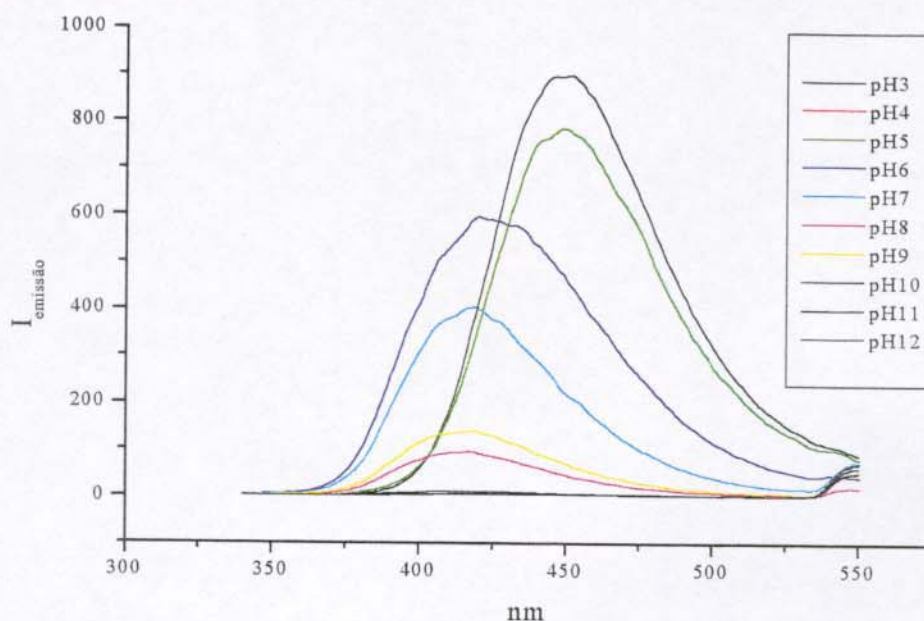
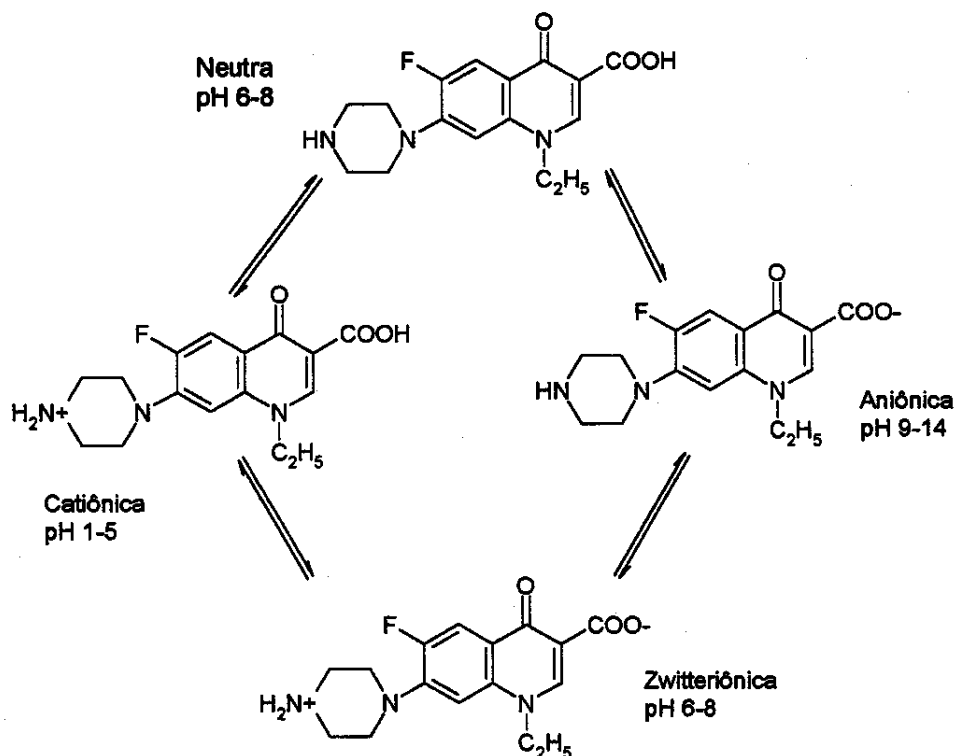


Figura 15 – Espectros de fluorescência de NFX em função do pH para soluções em diferentes tampões a 25 °C ($\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$)

Isso ocorre devido às ionizações sucessivas que a molécula de NFX sofre. As fluoroquinolonas apresentam dois grupos funcionais ionizáveis, o carboxílico e o amino, pertencentes ao anel quinolona e piperazínico, respectivamente. Sendo assim, podem existir na forma protonada em meio ácido, na forma zwitteriônica em equilíbrio com a neutra em meio levemente ácido a neutro, e na forma aniônica em meio alcalino (Esquema 1) [54]. Os valores das constantes de ionização, pK_{a1} ($6,36 \pm 0,12$) e pK_{a2} ($8,62 \pm 0,08$), referentes aos grupos carboxílico e prótons piperazínicos, respectivamente, indicam que a máxima lipofilicidade do NFX é obtida em pH 7, próximo de seu ponto isoelétrico [55, 56].



Esquema 1 – Equilíbrios entre diferentes espécies de Norfloxacin

Portanto, pode-se inferir que a diminuição na intensidade de emissão em meio básico está ligada ao fato da transição π, π^* ser desativada não radiativamente através da rotação livre do grupamento carboxila desprotonado. Em meio ácido isso não ocorre, pois há formação de ligação de hidrogênio entre os grupos carboxila e o carbonila, diminuindo o grau de liberdade de rotação do grupamento ácido. O deslocamento espectral para o vermelho, verificado em meio ácido, pode ser explicado através da maior delocalização eletrônica, o que confere uma maior estabilização ao sistema. Como este apresenta quatro espécies diferentes em função do pH, pôde ser feita uma análise quimiométrica dos espectros, com o objetivo de obter espectros das espécies puras predominantes ou em equilíbrio nos diferentes pH.

O método quimiométrico escolhido para fazer a deconvolução espectral foi o SMCR ("Self-Modeling Curve Resolution") [46], que pode ser aplicado na resolução de bandas superpostas de duas substâncias, quando espectros de absorção destas podem ser representados pela lei de Beer (Equação 3).

$$a_k = c_A(k)b_A(\lambda_i) \quad \text{Equação 3,}$$

onde a_k é a absorbância da amostra k no comprimento de onda λ_i , $c_A(k)$ é a concentração de uma substância A na amostra k (mol.L⁻¹), $b_A(\lambda_i)$ é o coeficiente de absorvidade molar da substância A no comprimento de onda λ_i (mol⁻¹.L.cm⁻¹) em um caminho ótico de 1 cm.

Para duas substâncias A e D, que absorvem em uma mesma região espectral, o espectro de absorção pode ser escrito como a soma das absorbâncias de cada uma (Equação 4).

$$R_k = c_A(k)b_A(\lambda_i) + c_D(k)b_D(\lambda_i) \quad \text{ou}$$

$$R = C \cdot B^t \quad (y) \quad \text{Equação 4,}$$

onde R é a matriz do espectro de absorção, C é a matriz das concentrações de A e D, e B é a matriz dos coeficientes de absorvidade molar de ambas as substâncias.

Entretanto, este método SMCR possui algumas hipóteses que devem ser satisfeitas para que possa ser utilizado, dentre elas:

- (1) as curvas devem ser positivas;
- (2) as curvas devem ser linearmente independentes. Por definição, duas funções são linearmente dependentes se uma for múltipla da outra, o que não é observado.
- (3) a razão c_{AK} / c_{DK} não deve ser constante e
- (4) deve existir dois comprimentos de onda λ_1 e λ_2 de forma que:

$$b_A(\lambda_1) = 0 \text{ e } b_D(\lambda_1) > 0,$$

$$b_A(\lambda_2) > 0 \text{ e } b_D(\lambda_2) = 0$$

Uma vez satisfeitas todas estas hipóteses, este método pôde ser aplicado nos espectros de absorção e de emissão do NFX [57]. A Figura 16 mostra a deconvolução espectral, sendo necessárias somente duas Componentes Principais (PC) para descrever o sistema, o que é razoável, pois a cada pH têm-se pelo menos duas espécies em equilíbrio,

portanto, cada PC descreveria uma espécie diferente. Observa-se uma banda em 450 nm (PC1) e outra em 414 nm (PC2) sendo a primeira referente à espécie protonada, e a segunda, à espécie neutra e posteriormente à aniônica. Na Figura 17 pode-se observar, para a PC1, a diminuição da intensidade de fluorescência à medida que o pH aumenta, confirmando os resultados mencionados.

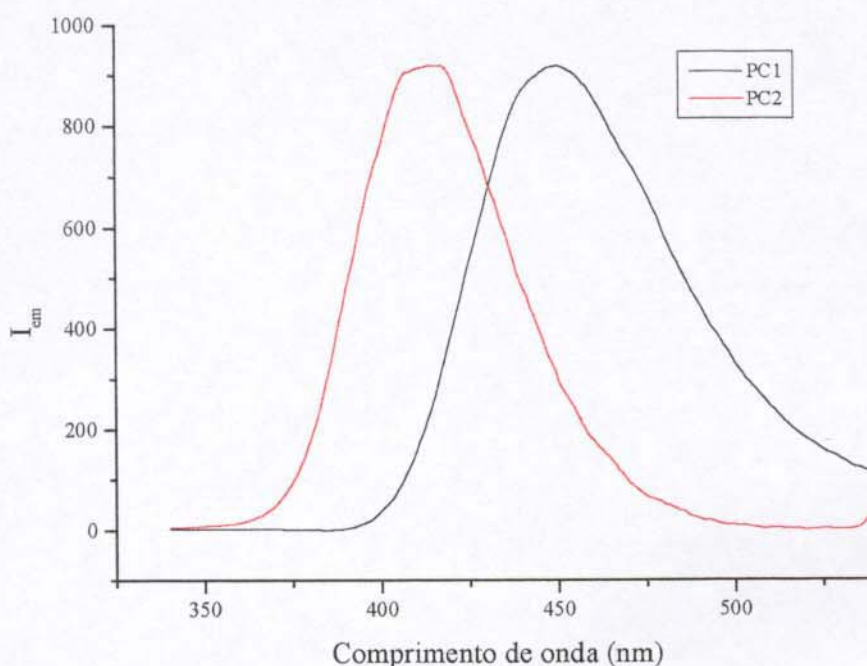


Figura 16 – Espectros de emissão de espécies puras de Norfloxacin obtidos via tratamento quimiométrico

Os valores das intensidades de emissão de cada PC separadamente (Figura 17), mostram que há um equilíbrio entre as espécies zwitteriônica e a neutra em torno de pH 6, enquanto que em torno de pH 10, onde não há mais a espécie neutra, a fluorescência praticamente desaparece. Isto significa que o sinal correspondente à PC1 pertence à forma carregada positivamente e que a PC2 à espécie neutra, pois a aniônica apresenta pouca ou nenhuma fluorescência.

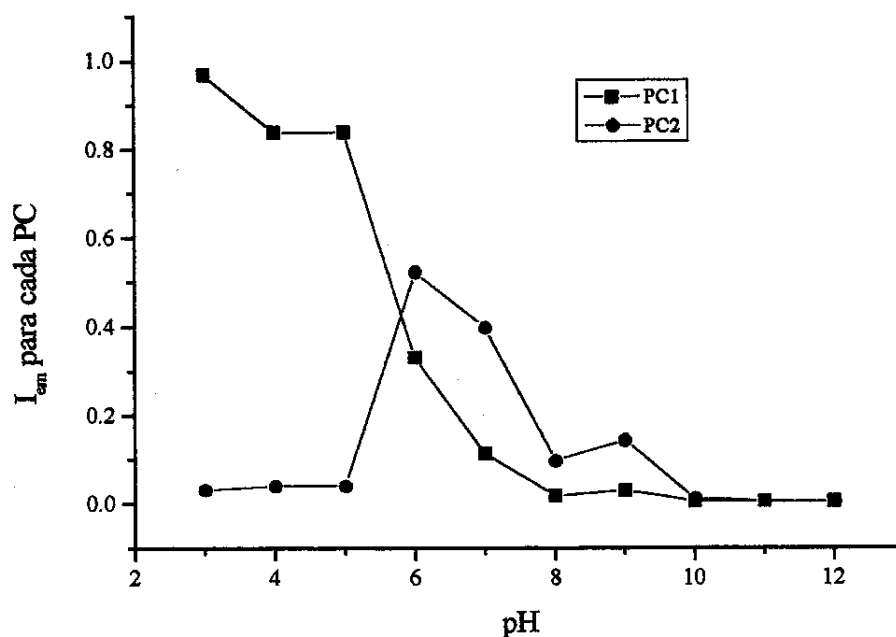


Figura 17 – Decaimento da intensidade de fluorescência das espécies catiônica, neutra e aniônica de NFX em função do pH

O mesmo estudo foi feito com os espectros de absorção do NFX (Figura 18), nos quais se observou que houve diminuição na intensidade da banda associada à transição $\pi-\pi^*$ e aumento da correspondente à transição $n-\pi^*$, quando o meio se tornava mais alcalino. Além disso, verificou-se um deslocamento de 6nm para o azul, da banda em 278 nm e de 6 nm para o vermelho da banda no intervalo 310-330 nm à medida que o pH aumentava. Provavelmente, em meio alcalino, os pares de elétrons livres existentes no grupamento carboxila e no grupamento amino, vão estar participando da conjugação com os anéis aromáticos, estabilizando termodinamicamente o sistema, o que é comprovado pelo deslocamento da banda $n-\pi^*$ em direção ao vermelho.

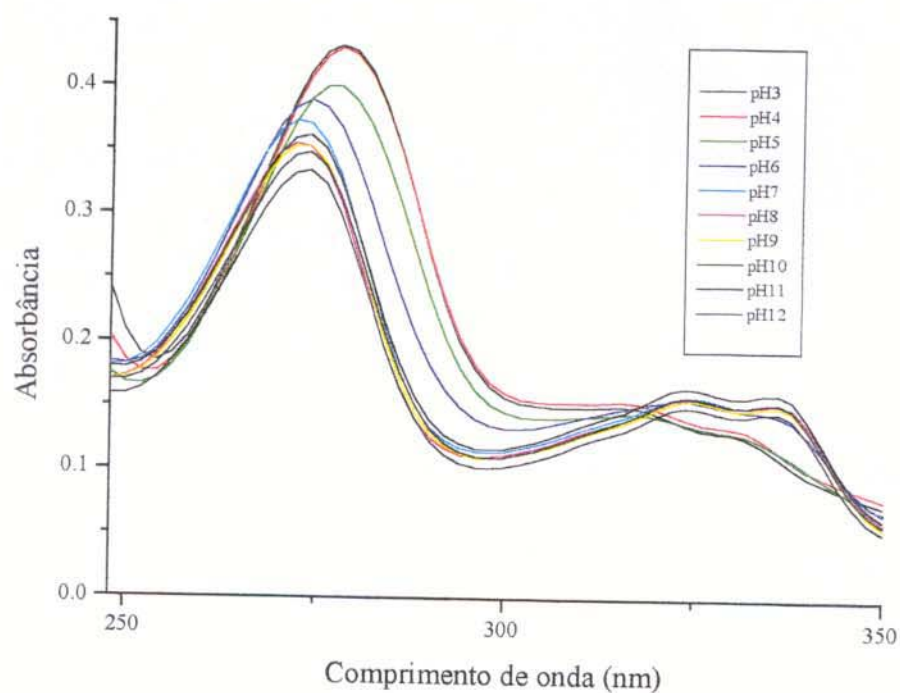


Figura 18 – Espectros de absorção de soluções de NFX em diferentes pH

Aplicando o mesmo tratamento matemático já mencionado aos espectros de absorção em função do pH, observa-se que duas PC descrevem o sistema, tendo-se a partir da PC1 os valores de absorbância da espécie protonada, e com a PC2, os da espécie aniônica, cujos máximos de absorção estão separados de 14 nm (Figuras 19 e 20).

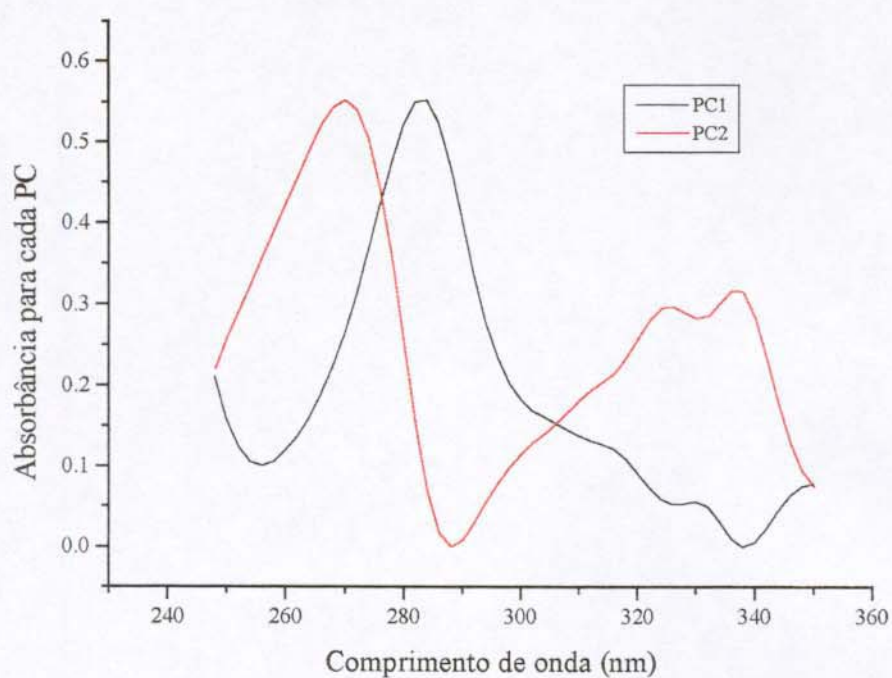


Figura 19– Espectros de absorção de espécies puras de NFX obtidos via tratamento quimiométrico

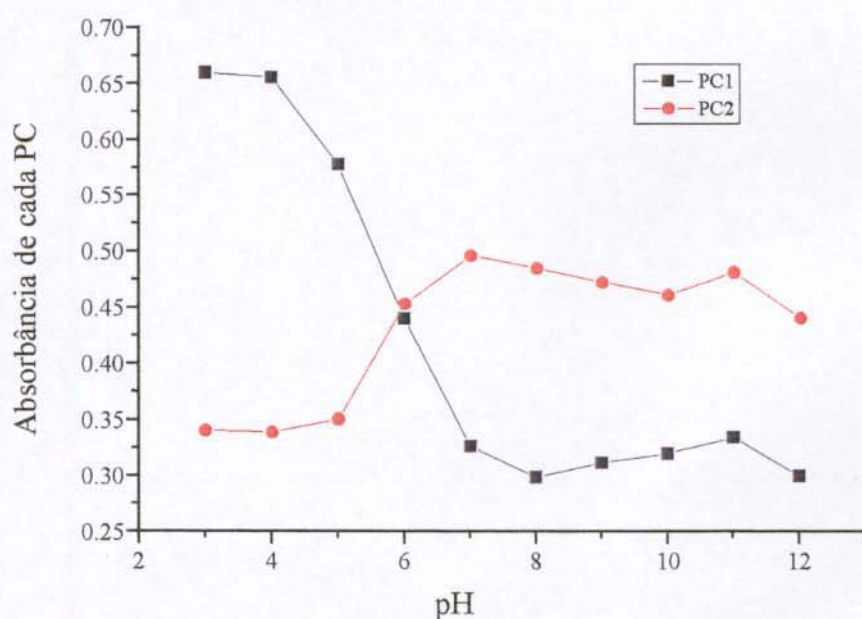


Figura 20 – Decaimento da absorbância das espécies catiônica, neutra e aniônica de NFX em função do pH

Novamente, verifica-se que em torno de pH 6 há um equilíbrio entre as formas zwitteriônica e neutra, sendo que em pH 10 a absorbância observada é devida apenas à aniônica.

A deconvolução espectral foi relevante para o tratamento e interpretação dos espectros, pois foi possível avaliar as diferentes espécies do NFX separadamente, além de concluir que a espécie carregada negativamente existe, embora não fluoresça.

IV.4 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os lipossomas MLV contendo NFX foram preparados através da adição do antibiótico durante a dissolução dos fosfolípidios, na etapa de obtenção do filme seco de. Esta é uma técnica utilizada para o encapsulamento de substâncias pouco solúveis em água e que podem ser incorporadas à bicamada lipídica durante a formação das vesículas, o que se aplica ao NFX. O colesterol, também adicionado durante a dissolução dos fosfolípidios, pode alterar propriedades destes lipossomas por intercalar-se entre as cadeias lipídicas, resultando na diminuição da permeabilidade e aumento da rigidez da bicamada fosfolipídica, levando a uma diminuição substancial da taxa de liberação da fármaco durante a estocagem ou mesmo na corrente sanguínea [58].

Após a hidratação dos filmes, as soluções de lipossomas foram submetidas à análises de tamanho de partícula. Porém, devido à grande heterogeneidade de diâmetros destas vesículas, não foi possível obter medidas reprodutíveis de espalhamento de luz, o que pode ser visto nos resultados entre as diferentes amostras preparadas sob as mesmas condições experimentais (Tabela 4).

Tabela 4 – Diâmetro dos lipossomas contendo NFX

	Ensaio 1	Ensaio 3*
Número de medidas	Diâmetro efetivo (nm)	Diâmetro efetivo (nm)
1	386,3	1016,3
2	479,6	1334,6
3	412,9	1176,1
4	461,1	1304,8
5	405,5	1007,8

*sem ciclos de congelamento/descongelamento

As medidas de espalhamento quase elástico de luz mostraram a existência de duas a três populações de diferentes tamanhos de vesículas, com polidispersidade entre 0,4 e 0,6. Estes resultados são coerentes com o sistema utilizado, uma vez que se trata de vesículas MLV (Figura 21)

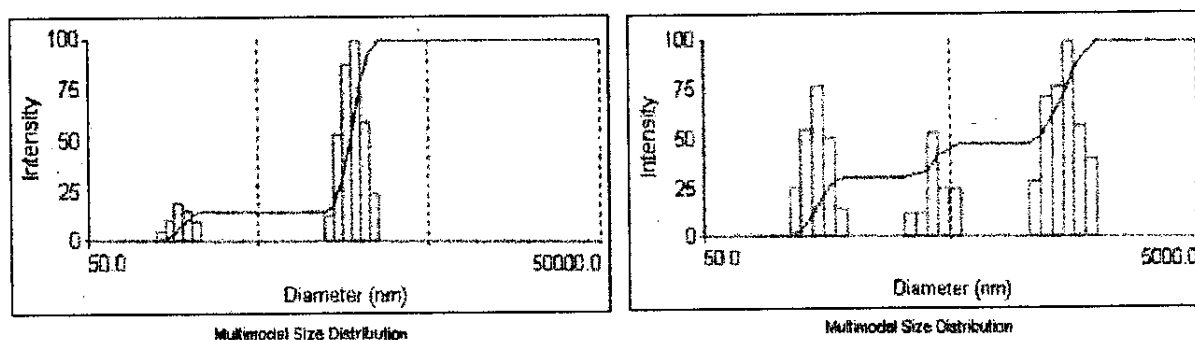


Figura 21 – Distribuição de tamanho de lipossomas MLV contendo NFX em HEPES 0,01 mol.L⁻¹ pH 7, (ensaio 1 e ensaio 3)

É importante ressaltar que as medidas feitas imediatamente após a hidratação dos filmes e após duas horas de repouso [37], para uma mesma amostra, tiveram valores de mesma ordem de grandeza, mostrando que este tempo dado para reorganização, não levou à mudanças significativas na distribuição de tamanhos das populações (Tabela 5).

Tabela 5 – Diâmetro dos lipossomas antes e após 2 h de repouso

Ensaio 1		Ensaio 3*	
Diâmetro efetivo após preparo (nm)	Diâmetro efetivo após 2h de repouso (nm)	Diâmetro efetivo após preparo (nm)	Diâmetro efetivo após 2h de repouso (nm)
386,3	472,1	1016,3	1149,5
479,6	537,8	1334,6	1166,7
412,9	562,4	1176,1	1354,2
461,1	487,5	1304,8	1141,8
405,5	593,9	1007,8	1017,7

*sem ciclos de congelamento/descongelamento

O método de congelamento/descongelamento é utilizado em algumas soluções de lipossomas por oferecer a) uma redução temporária da barreira à permeabilidade da bicamada, de forma que lipossomas MLV podem se equilibrar com o meio externo e aumentar a capacidade do encapsulamento; b) aumento no tamanho das vesículas, podendo formar até mesmo vesículas gigantes. No entanto, isto poderia levar a uma perda do conteúdo encapsulado em até 55% para MLV [59]. Para substâncias hidrofílicas, o aumento do tamanho da vesícula aumenta o tamanho do cerne aquoso, o que resulta em um aumento na eficiência de encapsulamento. Tratando-se de um fármaco hidrofóbico, como é o NFX, ciclos de congelamento/descongelamento não apresentaram grandes vantagens a não ser uma tentativa de homogeneizar o tamanho dos lipossomas, uma vez que durante a fase de congelamento formam cristais de gelo que desestruturam as bicamadas, ocorrendo um rearranjo durante a fase de descongelamento. Entretanto, estes estudos mostraram que esta técnica não modificou a distribuição do tamanho das vesículas.

IV.5 CENTRIFUGAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

A centrifugação a 6000 rpm foi feita para separar o NFX livre do encapsulado. Assim, recolheu-se um precipitado branco que foi ressuspenso em tampão HEPES 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7), sendo este procedimento realizado três vezes. A concentração esperada de NFX era de 1,0.10⁻⁶ mol.L⁻¹, se todo o fármaco tivesse sido encapsulado.

Verificou-se por espectroscopia de absorção que na água da terceira lavagem não havia mais NFX. Após a etapa de separação, utilizou-se etanol para romper os lipossomas e quantificar o NFX encapsulado. Para tanto, construiu-se um modelo de calibração multivariado, através do qual observou-se os melhores resultados com o emprego de 2 variáveis latentes, todas as soluções padrão e o espectro de 210 a 400 nm, o que é mais adequado que usar o espectro todo.

Este processo de calibração consistiu de duas etapas: modelagem, que estabeleceu uma relação matemática entre a matriz X (onde estão organizados os comprimentos de onda para cada amostra) e a matriz Y (constituída de variáveis dependentes, ou seja, dos espectros de cada amostra) no conjunto de calibração e a validação, que otimizou a relação no sentido de uma melhor descrição do NFX. Para possibilitar uma distribuição mais adequada dos dados originais utilizou-se como préprocessamento o método de centrar na média (calcula-se o valor médio para cada variável do conjunto de dados e, então, o subtrai de cada variável correspondente), que é o recomendado em análise de dados espectroscópicos [60, 61].

Uma vez concluída a calibração, o sistema (instrumento físico + modelo matemático) pôde ser utilizado para prever a concentração de outras amostras. A Tabela 6 mostra os valores das concentrações previstas e dos erros de previsão.

Tabela 6 – Valores de concentrações reais e previstas e erros calculados pelo modelo de calibração multivariado PLS para soluções de Norfloxacin

Concentrações reais (10^{-5} mol.L $^{-1}$)	Concentrações previstas (10^{-5} mol.L $^{-1}$)	Erros calculados
0	0,001	
0,056	0,055	0,91
0,28	0,29	-1,86
0,39	0,37	5,45
0,56	0,57	-1,32
0,73	0,73	-0,13
1,00	1,03	-2,58
1,12	1,11	1,23
3,90	3,89	0,06

No gráfico de PRESS (soma dos quadrados dos erros de previsão) observa-se que modelos com até oito variáveis poderiam apresentar bons resultados, já que os valores do

PRESS seriam muito baixos (Figura 22). Como se trata de somente um analito, o número de variáveis latentes deveria também ser um. Todavia, as modelagens mostraram que os erros calculados quando utilizou-se uma variável latente são mais significativos que os calculados para o modelo com duas variáveis.

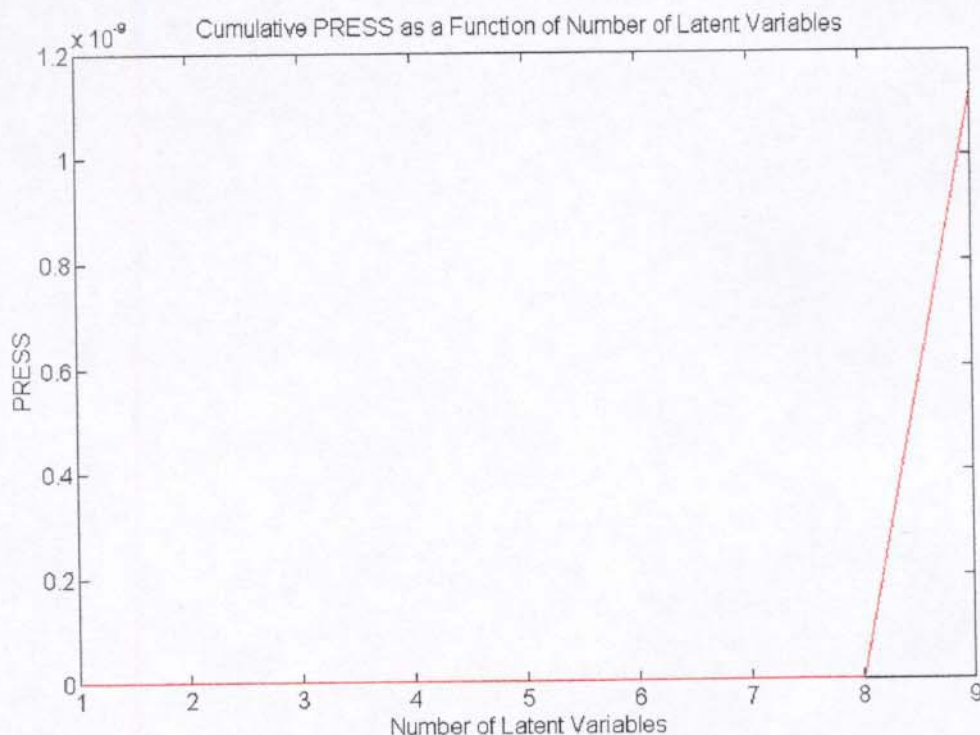


Figura 22 – Gráfico de PRESS para o modelo PLS multivariado

Na Figura 23 (gráfico de "leverage" versus resíduos calculados segundo a distribuição "t"), observa-se uma distribuição aleatória dos pontos, indicando que o modelo não é tendencioso. Os valores de resíduos são menores que 1,5 que é o valor limite calculado pelo programa para estes dados. O limite crítico dos valores de "leverage" é dado por $h = 3K/N$, sendo K o número de variáveis latentes e N o número de amostras. Neste caso, $K = 2$ e $N = 9$ de forma que o valor aproximado de h é 0,7. Observa-se, ainda, que a amostra 9 está ligeiramente acima do limite, mas como os demais parâmetros estão dentro dos limites e os valores dos erros calculados são pequenos, não se pode considerar esta amostra como sendo anômala.

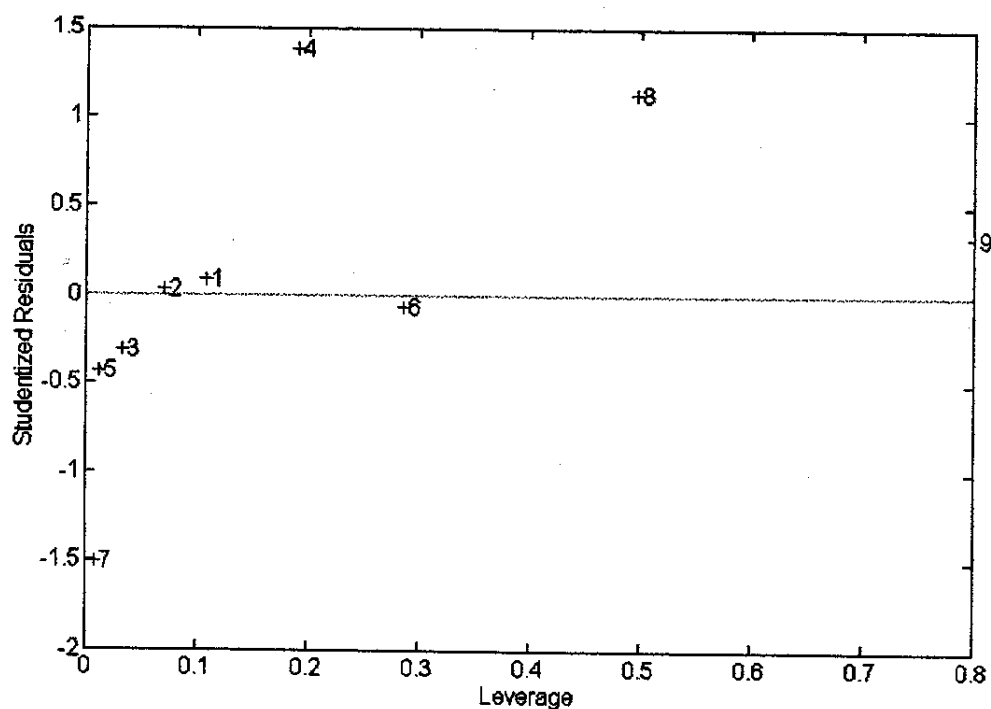


Figura 23 - "Leverage" versus resíduos calculados com a distribuição "t" obtidos da modelagem feita por PLS

A Figura 24, o gráfico dos vetores de regressão na faixa espectral entre 210 e 400 nm (variáveis 21 a 211), apresentou valores na sua grande maioria diferentes de zero, indicando que toda a região usada é significativa para o modelo, uma vez que a presença de muitos pontos próximos a zero indicaria que uma parte da faixa usada não teria efeito no modelo.

É interessante notar que o vetor de regressão foi igual ao espectro de absorção do NFX, o que mostra que não houve sobreposição de bandas de nenhum outro analito.

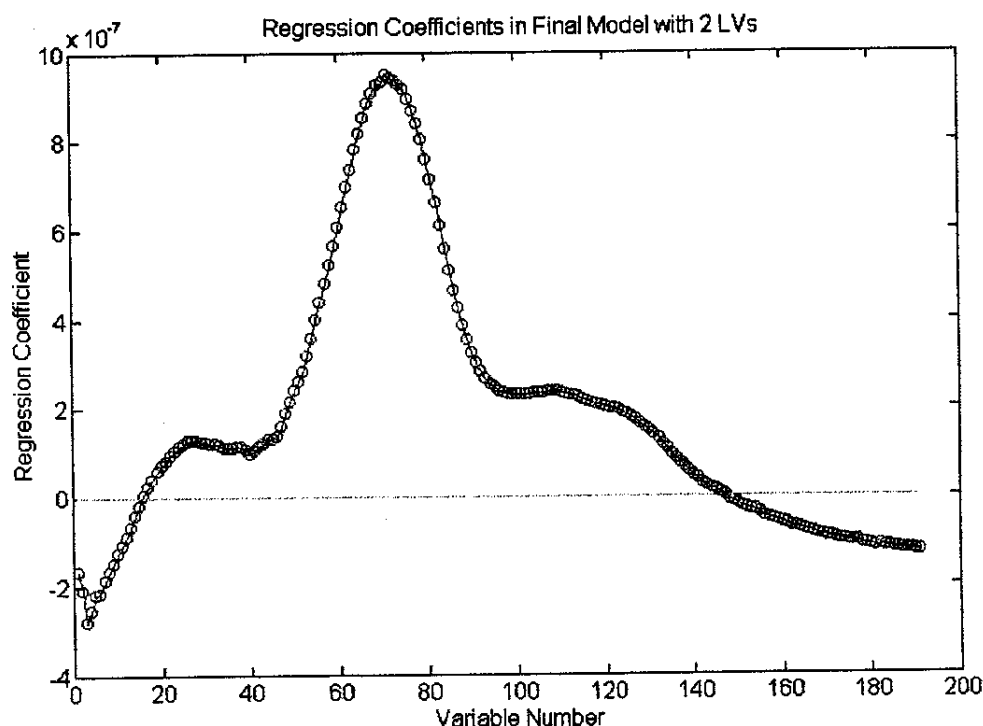


Figura 24 - Vetores de regressão na faixa espectral entre 210 e 400 nm

De acordo com este modelo de calibração multivariado, com duas variáveis latentes, foi possível quantificar o NFX após romper os lipossomas com etanol. Dentre todos os lipossomas preparados e cujas concentrações foram previstas, os melhores valores de eficiência de encapsulamento foram de 3,5 e 5,1 % para os lipossomas contendo 25 e 45 mg de PC, respectivamente.

IV.6 AVALIAÇÃO DE NFX INCORPORADO EM BICAMADAS LIPÍDICAS ATRAVÉS DE MICRO-CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA

Micro-DSC é uma técnica termodinâmica muito eficiente, sensível e não invasiva utilizada para a caracterização do comportamento termotrópico e da estabilidade térmica das bicamadas lipídicas e para a investigação de interações fármaco-membrana [62]. Esta técnica foi utilizada com o objetivo de analisar a influência de NFX na bicamada lipossomal.

Para todas as estruturas formadas por fosfolípidos existe uma temperatura na qual as cadeias acila sofrem transformação (reversível) passando de um estado mais ordenado gel (L_α) para um estado mais fluido e desordenado, líquido-cristalino (L_β). A temperatura na qual ocorre esta transição é denominada temperatura de transição de fase (T_m) [63].

As curvas de capacidade calorífica (C_p) versus temperatura foram obtidas diretamente das medidas de microcalorimetria diferencial de varredura através das quais pôde-se obter a temperatura de transição de fase, que é a temperatura onde C_p é máxima, e calcular o valor de ΔH^0 [64].

Para a fosfatidilcolina na ausência de NFX, o valor de T_m observado (transição principal) foi 52,65 e 52,88 °C para soluções lipossomais contendo 25 e 45 mg de fosfolípido, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos para a fosfatidilcolina em Hepes 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7), na ausência e na presença de NFX (duplicata)

Massa PC (mg)	Fármaco	T_m (°C)	ΔH (kcal/g)
25 mg	sem NFX	52,65 ± 0,02	0,95 ± 0,07
	com NFX	52,598 ± 0,003	1,05 ± 0,01
45 mg	sem NFX	52,883 ± 0,008	1,1095 ± 0,0005
	com NFX	52,61 ± 0,01	1,10 ± 0,04

Observou-se outro pico menos intenso correspondente à uma pré-transição em $\approx$ 45 °C para todos os lipossomas correspondente à uma região de transição de fase onde coexistem anfífilicos no estado gel e no estado líquido-cristalino ($L_\alpha + L_\beta$) (Figura 25).

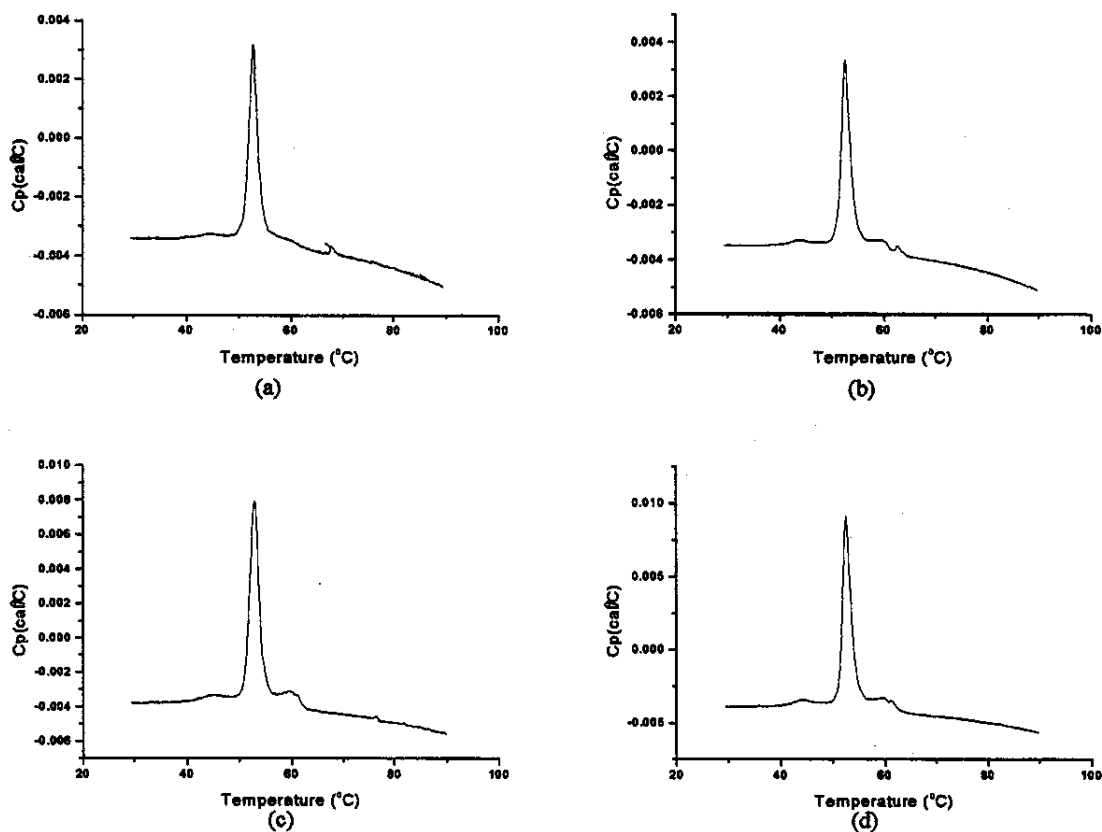


Figura 25 – Micro-DSC de lipossomas MLV. Termogramas de fosfatidilcolina sem NFX (a, c) e fosfatidilcolina com NFX (b,d) em tampão HEPES 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7)

A pré-transição pode ser explicada considerando-se que abaixo da T_m , as ligações simples C-C das cadeias alifáticas dos fosfolípidios estão em conformação "trans" originando uma estrutura de maior rigidez. Acima da T_m a bicamada lipídica passa para um estado mais fluido que o gel denominado estado líquido-cristalino, decorrente do aumento da possibilidade de rotações "gauche" ao redor das ligações simples C-C da cadeia alifática e da formação de dobraduras, as quais levam à formação de uma fase ondulada [65, 66].

A Figura 26 é uma representação das fases gel, líquido-cristalina e ondulada que ocorrem em algumas bicamadas fosfolipídicas [67].

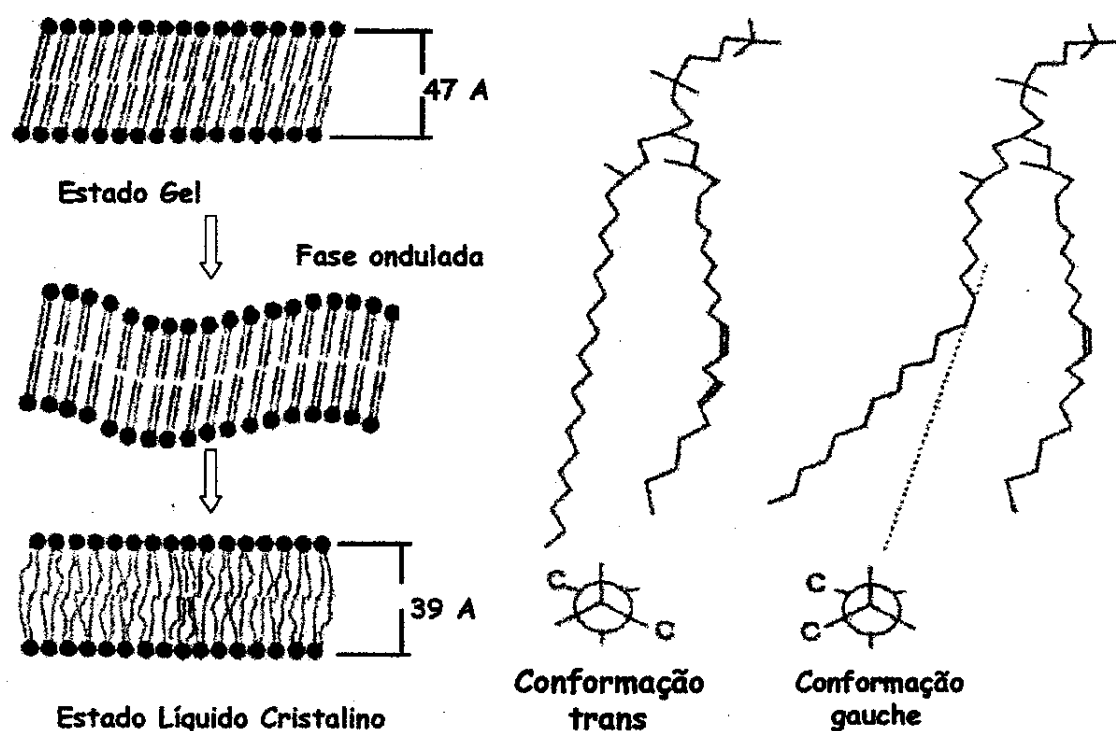


Figura 26: Representação esquemática das fases das bicamadas em lipossomas, com o aumento da temperatura

As formulações contendo colesterol não apresentaram transição de fase quando investigadas via Micro-DSC, pois esta substância, dependendo da concentração usada, modifica a bicamada da membrana de forma a eliminar a transição de fase.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 7, percebe-se que o NFX influenciou bastante nos valores de T_m e, em menor intensidade, nos valores de ΔH . Isto ocorreu devido à desestabilização da bicamada lipídica, ou seja, à uma perturbação do arranjo da bicamada em resposta à incorporação da parte hidrofóbica do NFX no corpo lipídico da matriz lipossomal.

Embora as análises tenham sido feitas com o mesmo tipo de fosfolípido, o valor de T_m para a PC sem NFX variou em 0,23 °C. Isto pode ter ocorrido devido à um melhor empacotamento das bicamadas lipossomais na presença de maior concentração de fosfolípido.

A diminuição da T_m é causada pelas interações o grupo fosfato do fosfolípido com a da molécula do antibiótico, que em pH 7 está em quase sua totalidade na forma

zwitteriônica, proporcionando um aumento no afastamento entre as cadeias fosfolipídicas. Esta repulsão afasta as bicamadas, levando à uma diminuição da energia requerida para que ocorra a transição de fase, e consequentemente, a temperatura em que ocorrerá a transição será menor. Portanto, o fato de a temperatura diminuir na presença de NFX é um forte indicativo de que ele incorporou na bicamada, ocorrendo o encapsulamento.

IV.7 INVESTIGAÇÃO SOBRE ENCAPSULAMENTO DO NFX ATRAVÉS DE MEDIDAS DO GRAU DE ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA

A distribuição eletrônica dos estados excitado e fundamental está relacionada à probabilidade de uma dada molécula absorver ou emitir um fóton, conforme a direção e sentido dos momentos de dipolo de excitação e emissão. Quando a luz de excitação, polarizada, incide no cromóforo, cujo vetor momento de transição está na mesma direção e sentido do vetor campo elétrico da radiação, o cromóforo vai absorvê-la. Dado que o processo de absorção é muito mais rápido que a rotação molecular, o uso de uma luz de excitação orientada criará uma população de fluoróforos excitados e orientados em uma direção preferencial, sendo o processo chamado de foto-seleção. Porém, o fluoróforo pode sofrer reorientação antes que a emissão ocorra, de modo que a radiação emitida não terá a mesma polarização que a de excitação (Figura 27) [68].

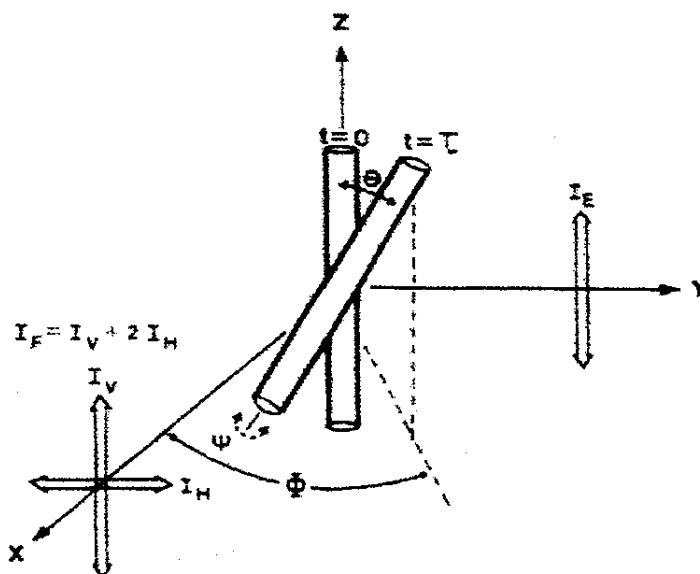


Figura 27 - Esquema ilustrativo de anisotropia de fluorescência de um fluoróforo simétrico cilíndrico cujos dipolos de excitação e emissão são paralelos ao eixo de simetria

Considerando uma medida de fluorescência no estado estacionário, define-se grau de anisotropia (r), pela Equação 5.

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}} \quad (\text{Equação 5}),$$

sendo I_{VV} a intensidade de emissão detectada paralelamente à direção da luz polarizada de excitação e I_{VH} a intensidade de emissão detectada perpendicularmente [45].

Nesta equação nota-se que quanto maior for a extensão da reorientação do fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado eletronicamente excitado, menor será o grau de anisotropia observado, chegando a $r = 0$ quando ocorrer completa reorientação do fluoróforo ($I_{VV} = I_{HH}$).

Desta forma, a determinação de r pôde indicar a inserção do NFX nas bicamadas lipossomais. Os valores de r estão relacionados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de grau de anisotropia de fluorescência (r) de NFX e NFX-MLV obtidos a 25 °C em vários solventes

Soluções de NFX ($1,0 \cdot 10^{-5}$ mol.L^{-1})	r
Água	0,019
Hepes (pH 7)	0,024
Citrato (pH 3)	0,025
Etanol	0,077
Clorofórmio	0,052
SDS (pH 7)	0,086
SDS (pH 3)	0,106
MLV (45 mg PC, NFX $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$)	0,378
MLV (25 mg PC, NFX $1,0 \cdot 10^{-4}$ mol.L $^{-1}$)	0,269

Nota-se que em ambientes hidrofóbicos, como a bicamada lipídica dos lipossomas, têm-se os maiores valores de r , seguidos daqueles para NFX em micelas. Isto mostra que as moléculas desta substância penetram em sistemas micelares, bem como em bicamadas lipossomais. No entanto, em lipossomas, ocorre uma restrição maior à difusão rotacional das moléculas encapsuladas, o que é confirmado pelo aumento no valor de r .

Quando livre em solução, as moléculas de NFX possuem interações mais fortes com etanol e com clorofórmio em relação às soluções aquosas, provavelmente devido à formação de ligações de hidrogênio, reduzindo os movimentos rotacionais e aumentando o valor de r .

Estes resultados mostram de modo inequívoco que as moléculas de NFX estão inseridas na bicamada lipídica dos lipossomas MLV [68].

IV.8 ESTUDO SOBRE INTERAÇÕES LIPOSSOMA-NFX ATRAVÉS DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA

A técnica de supressão de fluorescência foi utilizada com o objetivo de avaliar a localização das espécies na bicamada lipídica e verificar a existência de duas formas de NFX, a zwitteriônica e a neutra, que estão em equilíbrio em meio neutro, sendo a primeira predominante [44]. Por não apresentar carga, esperava-se que a forma neutra se

incorporasse às bicamadas, enquanto que a zwitteriônica estivesse presente na interface lipídio/água[69].

A Figura 28 mostra a diminuição da intensidade de emissão à medida que aumentou a concentração dos agentes supressores I⁻ e acrilamida na presença de lipossomas MLV (25 mg de PC) contendo NFX. O mesmo comportamento foi observado para os lipossomas feitos com 45 mg de PC e para NFX livre em solução.

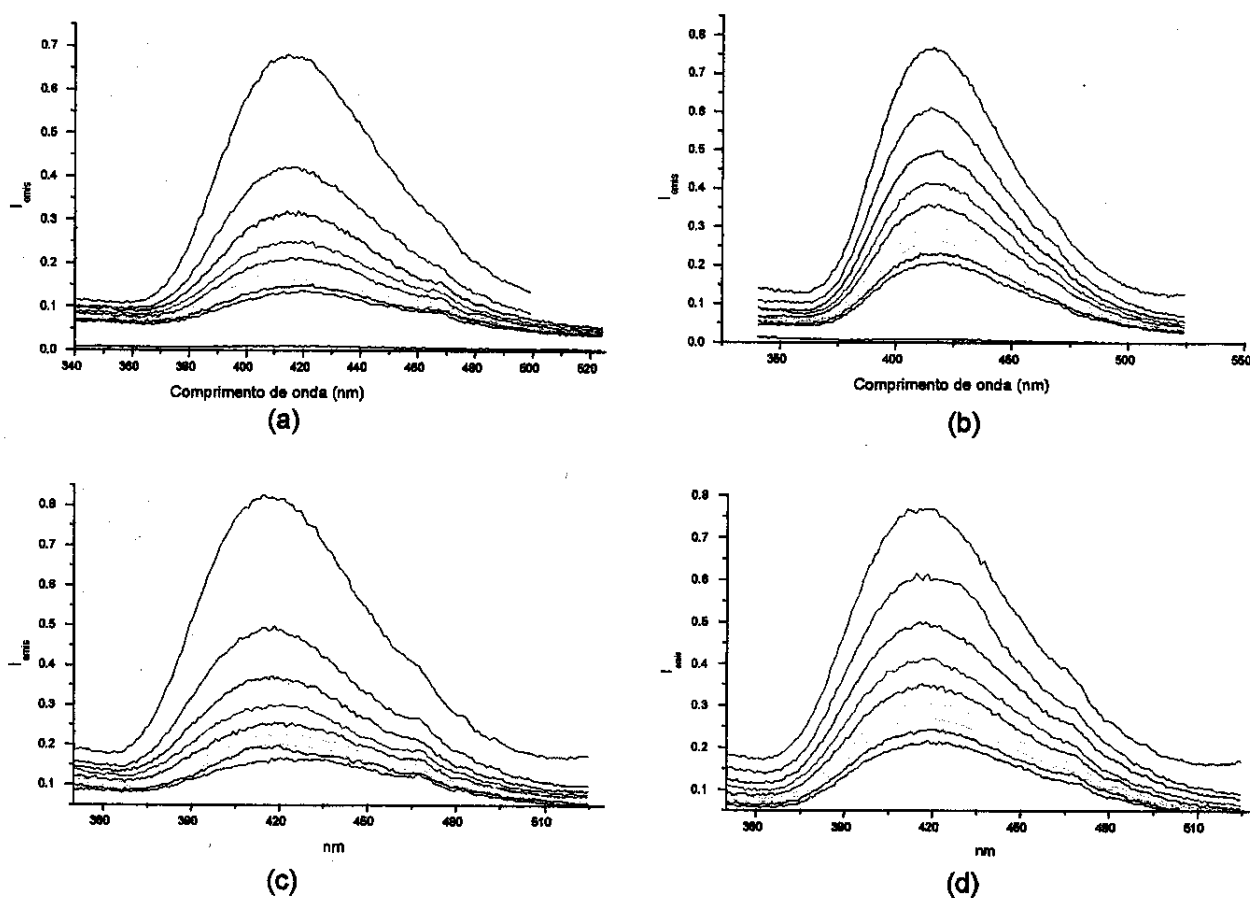


Figura 28 – Espectros de fluorescência do NFX encapsulado em lipossomas MLV 25 mg PC (a,b) e 45 mg PC (c,d) após adições sucessivas de alíquotas de 200 μ L dos agentes supressores KI (a,c) e acrilamida (b,d) a 25 $^{\circ}$ C

No gráfico de Stern-Volmer (Equação 1), relativo a estes dados, como mostra a Figura 29, obtiveram-se curvas desviando da linearidade, indicando a ocorrência de supressão estática e dinâmica. Por apresentarem aspectos muito similares, representou-se os dados somente para os lipossomas MLV contendo 25 mg de PC.

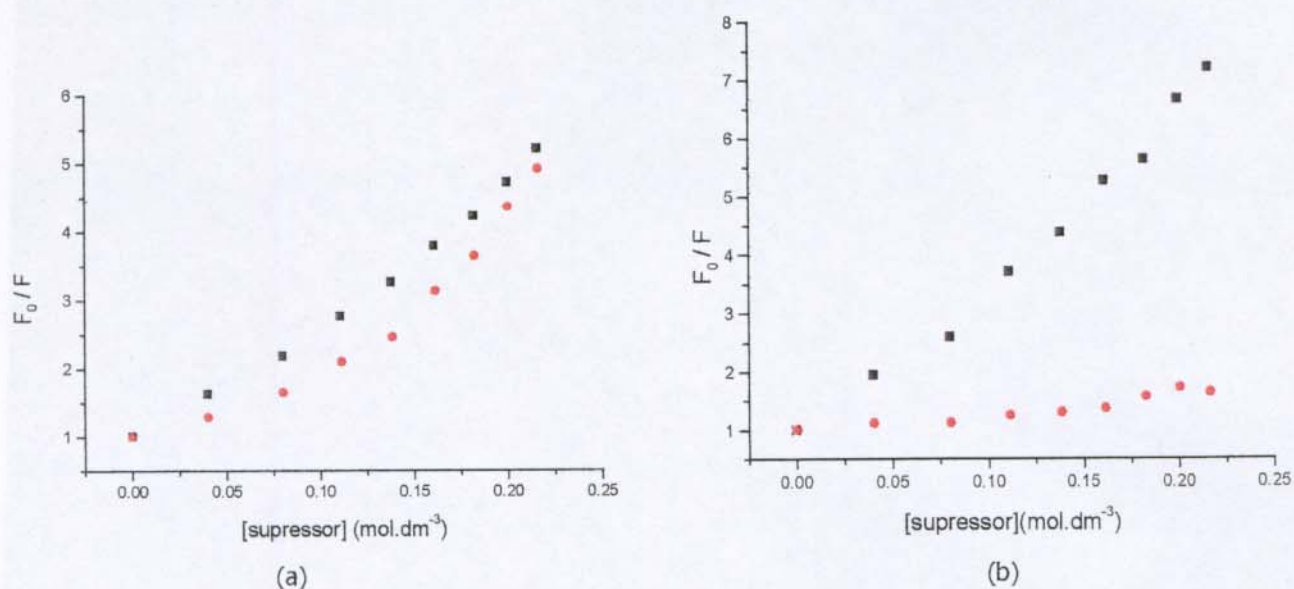


Figura 29 – Gráfico de Stern-Volmer para os valores de intensidade de fluorescência do NFX, obtidos na ausência e na presença dos agentes supressores KI (preto) e acrilamida (vermelho), para (a) lipossomas MLV de 25 mg PC e (b) NFX livre em solução tampão HEPES $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7)

Os espectros de fluorescência, tanto da fluoroquinolona livre como os da encapsulada, foram, então, tratados matematicamente utilizando-se a equação modificada de Stern-Volmer (Equação 2), através da qual se obteve, em cada experimento, os valores da constante de Stern-Volmer (K), indicadas na Tabela 9 (Figura 30).

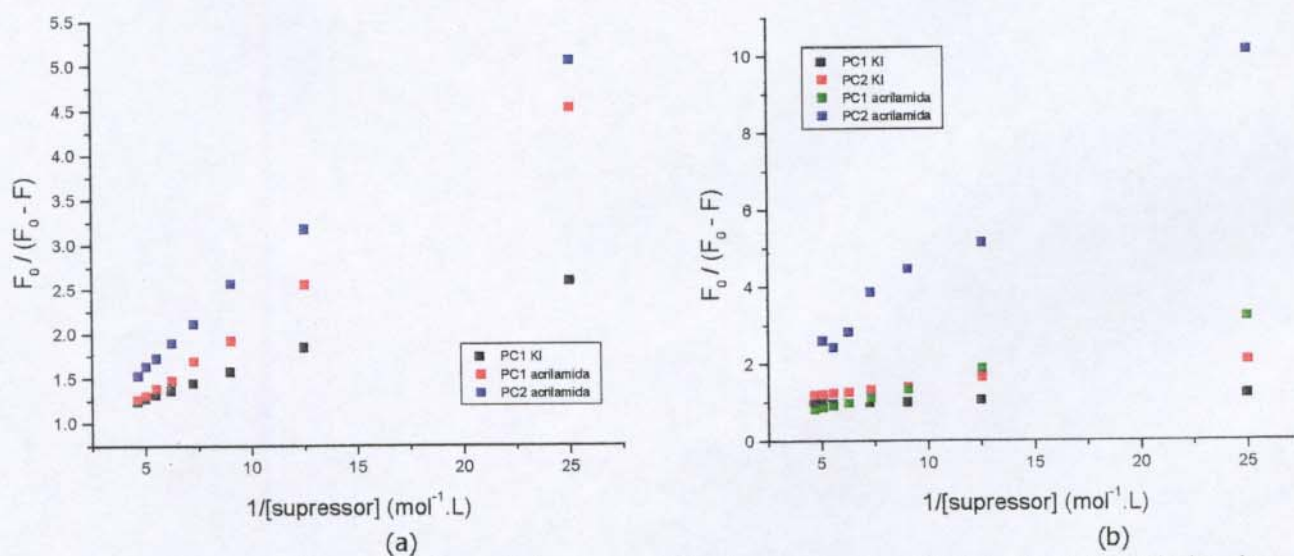


Figura 30 – Gráfico de Stern-Volmer modificado para os valores de intensidade de fluorescência de NFX, obtidos na presença dos agentes supressores I^- e acrilamida para

para (a) lipossomas MLV de 25 mg PC e (b) NFX livre em solução tampão HEPES 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7)

Tabela 9 – Valores das constantes de Stern-Volmer (K) obtidas experimentalmente

Amostra	Supressor	Forma do NFX	K (mol ⁻¹ .L)
NFX	KI	Zwitteriônica	71,8
		Neutra	21,8
NFX-MLV	acrilamida	Zwitteriônica	14,4
		Neutra	-
NFX	KI	Zwitteriônica	2,01
		Neutra	3,32
NFX-MLV	Acrilamida	Zwitteriônica	3,07
		neutra	4,82

Empregando-se o método quimiométrico desenvolvido por Lawton e Sylvestre [46], para tratar os espectros de NFX livre e encapsulado, na presença dos supressores, foi possível verificar a existência, bem como a supressão, de duas populações de fluoróforos nos lipossomas, correspondentes às formas neutra e zwitteriônica, o que concorda com a hidrofobicidade parcial desta classe de fármacos. A Figura 31 mostra a deconvolução espectral obtida com tratamento quimiométrico quando foram adicionados os supressores de fluorescência mencionados.

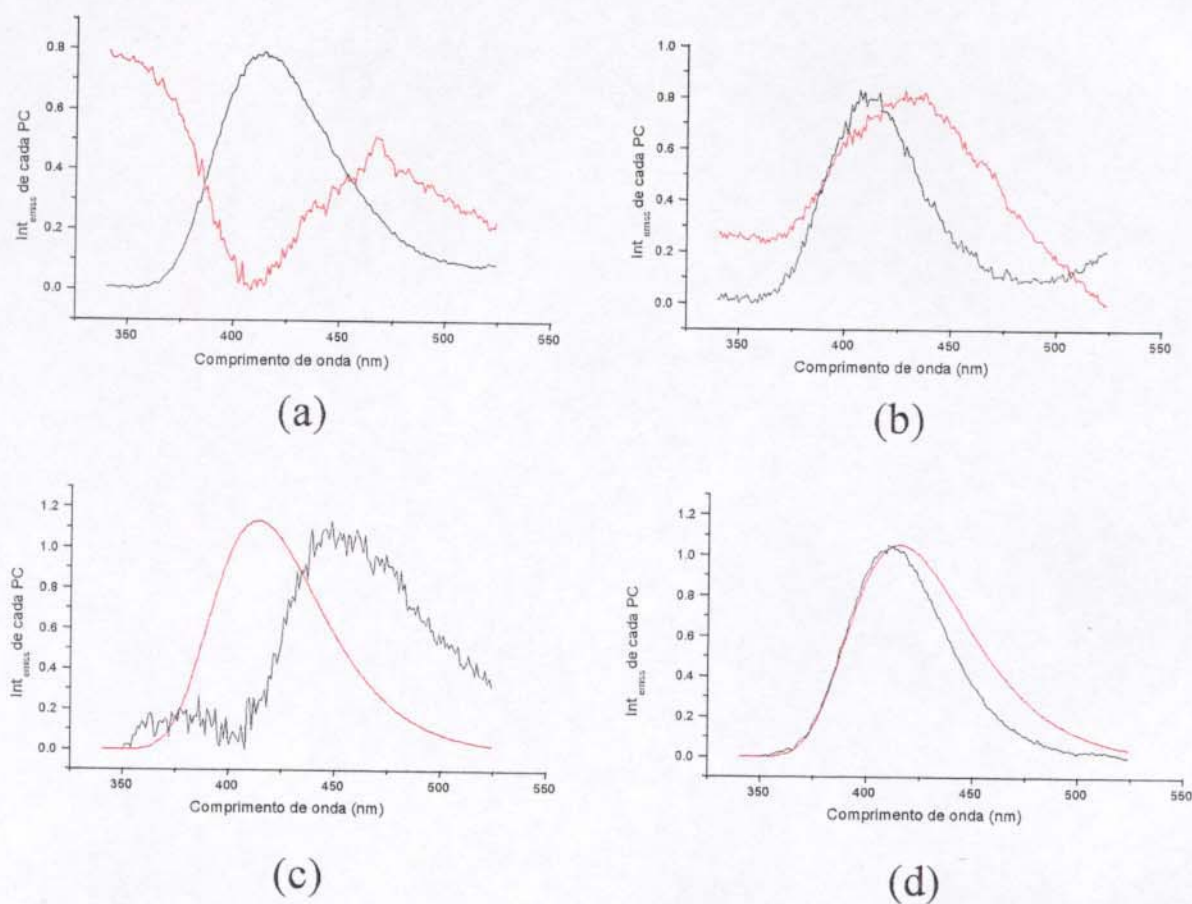


Figura 31 – Espectros de fluorescência de NFX em lipossomas MLV (a, b) e NFX livre em solução (c, d), após obter a deconvolução espectral por quimiometria. Os espectros (a, c) mostram a supressão pelo I^- e os espectros (b, d) a supressão por acrilamida, para duas espécies diferentes representadas por duas Componentes Principais, PC1 (preto) e PC2 (vermelho)

Sabe-se que o íon iodeto suprime a fluorescência do NFX somente quando o fármaco estiver em regiões hidrofílicas, enquanto que a acrilamida, por ser uma molécula hidrofóbica, pode suprimir a fluorescência por permear para dentro do lipossoma atingindo as bicamadas lipídicas mais profundamente [44].

De acordo com os resultados obtidos a partir da deconvolução dos espectros de emissão das amostras sem lipossomas, ambas as formas de NFX tiveram fluorescência suprimida pelo iodeto. Entretanto, em lipossomas MLV somente a forma zwitteriônica estava acessível ao supressor, uma vez que a forma neutra localiza-se no interior das bicamadas, pois moléculas apolares apresentam uma tendência de se concentrar em regiões que possuem um grande volume livre [69, 70]. A curva representada em vermelho representa ruído proveniente da lâmpada.

Quando foi empregada a acrilamida como agente supressor observou-se que, a forma neutra do NFX livre em solução apresentou melhor interação com o supressor em relação à zwitteriônica. Em lipossomas MLV ambas as formas tiveram a fluorescência suprimida, confirmando a existência de duas populações de fluoróforos nas bicamadas lipídicas destes sistemas.

Desta forma, foi possível observar que os estudos sobre supressão de fluorescência, associado ao tratamento quimiométrico puderam revelar a existência de duas populações de NFX (neutra e zwitteriônica) em lipossomas MLV tornando possível analisar a distribuição destas espécies na bicamada lipídica.

Este mesmo experimento foi repetido em HEPES 0,01 mol.L⁻¹ pH 3, pois, de acordo com o diagrama de microespeiação do NFX, em meio ácido existe somente a forma protonada, não havendo espécies em equilíbrio [71]. Os resultados de supressão de fluorescência do NFX com a adição dos agentes supressores KI 0,5 mol.L⁻¹ e acrilamida 0,5 mol.L⁻¹, foram semelhantes aos obtidos em pH 7. No entanto, nota-se que houve uma supressão mais efetiva da fluorescência do NFX livre em solução quando adicionou-se KI em comparação com o decaimento do sinal após adicionar solução de acrilamida (Figura 32).

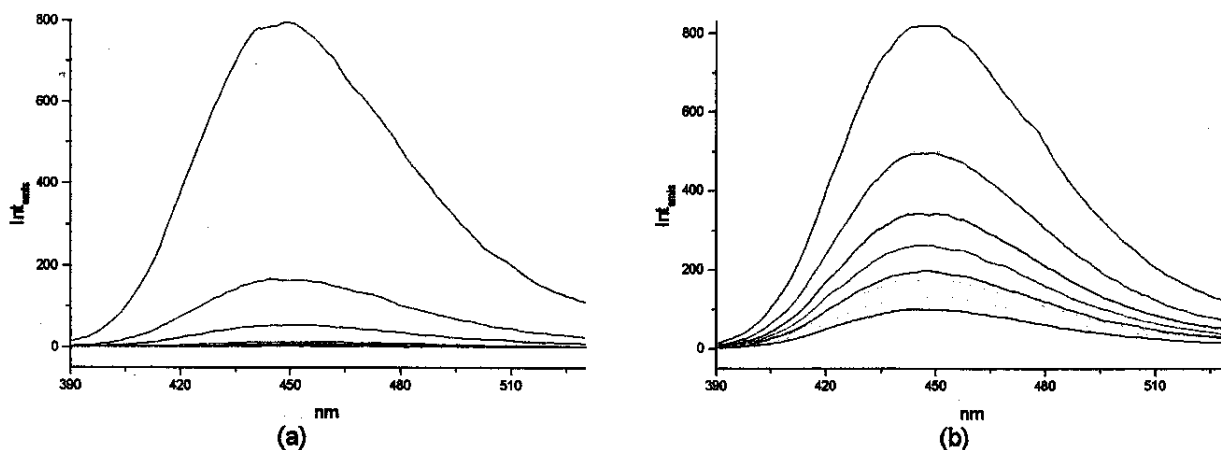


Figura 32 – Espectros de fluorescência do NFX livre em solução tampão HEPES 0,01mol.L⁻¹ pH 3 após adições sucessivas de alíquotas de 200μL dos agentes supressores a) KI 0,5mol.L⁻¹ e b) acrilamida 0,5mol.L⁻¹, a 25°C

Submeteram-se estes espectros de fluorescência ao mesmo tratamento quimiométrico feito em pH 7, através do qual pôde-se observar somente uma banda larga

em ≈ 447 nm referente à espécie protonada descrita pela PC1, enquanto a PC2 permaneceu constante, provavelmente descrevendo ruídos (Figura 33).

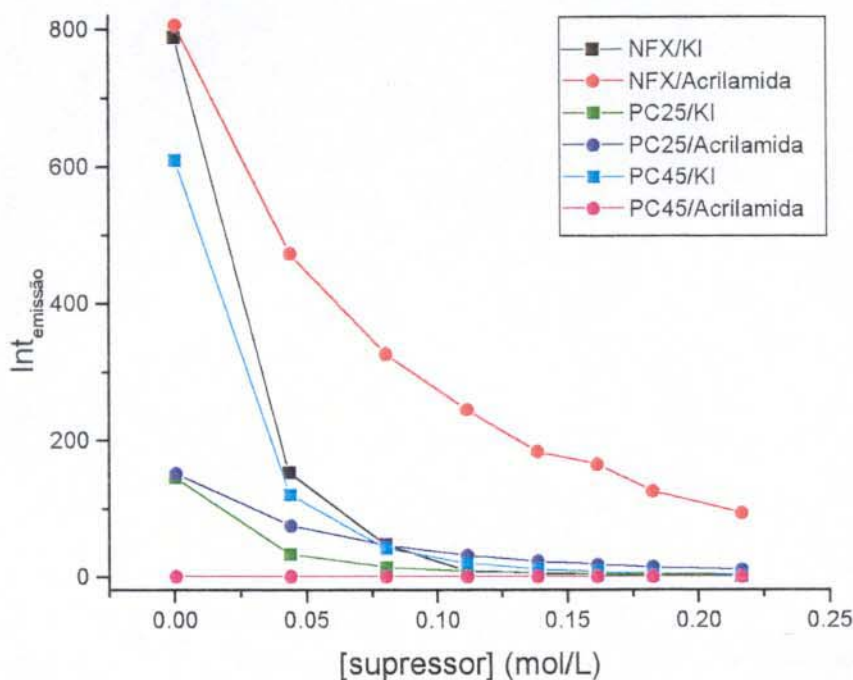


Figura 33 – Decaimento da intensidade de fluorescência do NFX livre e em lipossomas MLV descritos pela PC1, em função da concentração dos supressores KI (quadrados) e acrilamida (círculos)

Os valores de intensidade de fluorescência obtidos a partir da PC1 foram tratados segundo a equação de Stern-Volmer, através da qual foi possível a visualização do desvio da linearidade, novamente indicando a provável ocorrência de supressão estática e dinâmica. Desta forma, aplicou-se a equação modificada de Stern-Volmer, através do que houve o ajuste dos pontos em retas com coeficientes de correlação próximos de 1, e que possibilitou o cálculo dos valores das constantes de supressão K (Figura 34).

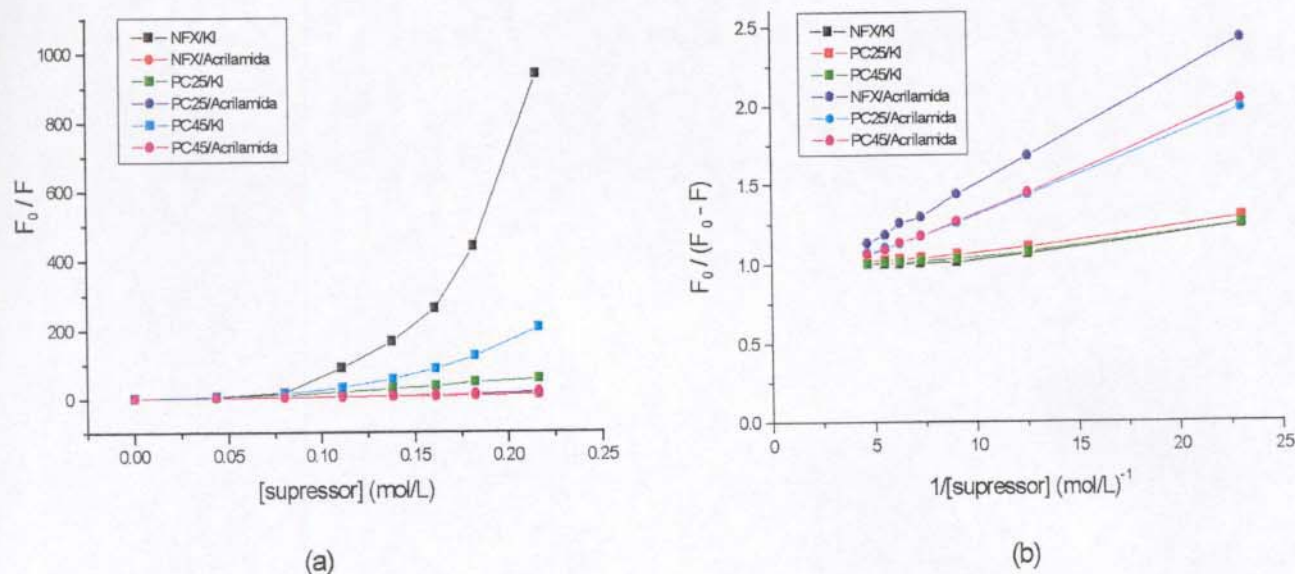


Figura 34 - Gráfico de a) Stern-Volmer e b) Stern-Volmer modificado para os valores de fluorescência do NFX, obtidos na presença dos agentes supressores KI e acrilamida para NFX livre em solução tampão HEPES 0,01mol.L⁻¹ com pH 7 e NFX em lipossomas MLV de 25 e 45mg de PC a 25°C.

Os valores de K estão listados na Tabela 10. Através deles pôde-se inferir que os maiores valores para as constantes ocorreram quando adicionou-se KI, denotando em uma melhor interação entre este agente supressor e a espécie protonada.

Tabela 10 - Valores experimentais das constantes de Stern-Volmer (K) obtidas para NFX livre em HEPES 0,01mol.L⁻¹ pH3 e em lipossomas de 25 e 45mg de PC, após a utilização dos agentes supressores KI e acrilamida

Amostra / Supressor	K (mol ⁻¹ .L)
NFX ^a / KI	67,8
NFX-MLV25 ^b / KI	61,9
NFX-MLV45 ^c / KI	69,3
NFX / acrilamida	11,5
NFX-MLV25 / acrilamida	16,4
NFX-MLV45 / acrilamida	15,2

^a Concentração final de NFX em HEPES 0,01mol.L⁻¹ pH 3: $2,7 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹

^b NFX em lipossomas MLV preparados com 25mg de PC

^c NFX em lipossomas MLV preparados com 45mg de PC

Outro fato importante observado foi o de não ter ocorrido uma diferenciação entre os valores para o NFX livre em solução e em lipossomas, o que mostra que em meio ácido a fármaco estava quase em sua totalidade livre em solução ou na interface lipídio/água,

uma vez que a espécie protonada não apresenta qualquer hidrofobicidade e portanto, nenhuma interação com a bicamada lipídica. Isto contribuiu com a evidência do equilíbrio existente entre as espécies zwitteriônica e neutra em pH 7, as quais foram separadas através do mesmo método quimiométrico que verificou a presença de somente uma espécie em pH 3 [72].

CAPÍTULO V

V. CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho consistiu no estudo espectroscópico de Norfloxacin livre em solução, além da preparação e caracterização físico-química de lipossomas multilamelares contendo este antibiótico.

Os resultados sugerem que a técnica de encapsulamento passivo foi eficiente, mesmo frente à pequena eficácia de encapsulamento, os quais foram obtidos através da quantificação deste fármaco por um modelo de calibração multivariado (via PLS).

O estudo de espectroscopia de absorção e de emissão do NFX em vários pH, aliado ao tratamento quimiométrico desenvolvido por Lawton & Silvestre, permitiu avaliar as diferentes espécies de NFX separadamente (catiônica, zwitteriônica, neutra e aniônica).

Através das análises de Micro-DSC pôde-se observar que o efeito do NFX na diminuição da temperatura de transição da fase gel para a líquido-cristalina da fosfatidilcolina foi um forte indicativo de que ocorreu o encapsulamento desse fármaco nos lipossomas MLV. A presença de pré-transição permitiu inferir, ainda, que a amostra de fosfolípido utilizada nestas suspensões lipossomais tinha uma grande quantidade de DSPC (diestearoilfosfatidilcolina), uma vez que, na literatura, somente esta fosfatidilcolina apresenta "configuração" ondulada durante o processo de transição de fase.

Finalmente, os resultados obtidos através de medidas do grau de anisotropia de fluorescência confirmaram a inserção do NFX nos lipossomas sendo possível, através da técnica de supressão de fluorescência utilizando KI e acrilamida como agentes supressores,

combinada ao tratamento quimiométrico desenvolvido por Lawton & Silvestre, a avaliação da distribuição de duas espécies de NFX, a neutra e a zwitteriônica, nas bicamadas lipídicas em pH 7, e também a identificação somente da espécie catiônica em pH 3.

CAPÍTULO VI

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Tavares, W.; *Manual de antibióticos para o estudante de Medicina*, Ed. Atheneu, 3ª Ed., **1985**
- [2] Goodman, L. S.; Gilman, A. G.; *As bases farmacológicas da terapêutica*, Ed. McGraw-Hill, 9ª Ed., **1996**
- [3] Silva, P.; *Farmacologia*, Ed. Guanabara Koogan, 5ª Ed., **1998**
- [4] Ito, S.; *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1980**, *17*, 103
- [5] Rothlin, R. P.; Historic Overview, *Medicina* **1999**, *59*, 3
- [6] Hussain, M. S.; Obiajunwa, V. C.; Micetich, R. G.; Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for Norfloxacin utilizing fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* **1995**, *663*, 379
- [7] Wise, R.; Honeybourne, D.; Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of fluoroquinolones in the respiratory tract, *Eur. Resp. J.* **1999**, *14*, 221
- [8] Walter, R. C.; The fluoroquinolones, *Mayo Clin. Proc.* **1999**, *74*, 1030

- [9] Djurdjevic, P. T.; Stankov, M. J.; Stankov, D.; Fluorescence reaction and complexation equilibria between Norfloxacin and aluminium (III) ions in chloride medium, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *300*, 253
- [10] Ruiz, T. P.; Lozano, C. M.; Tomás, V.; Carpena, J.; Determination of Norfloxacin in real samples by different spectrofluorimetric techniques, *Analyst* **1997**, *122*, 705
- [11] Belal, F.; Majed, A. A. A.; Obaid, A. M. A.; Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials, *Talanta* **1999**, *50*, 765
- [12] Issopoulou, P. B.; Spectrophotometric determination of trace amounts of Iron(III) with Norfloxacin as complexing reagent, *Analyst* **1989**, *114*, 627
- [13] Son G. S.; Yeo, J. A.; Kim, J. M.; Kim, S. K.; Moon, H. R.; Nam, W.; Base specific complex formation of Norfloxacin with DNA, *Biophys. Chem.* **1998**, *74*, 225
- [14] Urbach, F.; Phototoxicity and possible enhancement of photocarcinogenesis by fluorinated quinolone antibiotics, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, *37*, 169
- [15] Mäkinen, M.; Forbes, P. D.; Stenbäck, F.; Quinolone antibacterials: a new class of photochemical carcinogens, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, *37*, 182
- [16] Johnson, B. E.; Gibbs, N. K.; Ferguson, J.; Quinolone antibiotic with potential to photosensitize skin tumorigenesis, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, *37*, 171
- [17] Traynor, N. J.; Barratt, M. D.; Lovell, W. W.; Ferguson, J.; Gibbs, N. K.; Comparison of an *in vitro* cellular phototoxicity model against controlled clinical trials of fluoroquinolones skin phototoxicity, *Toxicol. In Vitro* **2000**, *14*, 275
- [18] Ouédraogo, G.; Morlière, P.; Santus, R.; Miranda, M. A.; Castell, J. V.; Damage to mitochondria of cultured human skin fibroblasts photosensitized by fluoroquinolone, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *58*, 20
- [19] Vries, H.; Henegouwen, G. M. J. B.; Photochemical decomposition of Lomefloxacin *in vitro* and *in vivo*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *58*, 6

- [20] Burhenne, J.; Ludwig, M.; Spittler, M.; Polar photodegradation products of quinolones determined by HPLC/MS/MS, *Chemosphere*. **1999**, *38*, 1279
- [21] Saniabadi, A. R.; Wada, K.; Umemura, K.; Sakuma, S.; Nakashima, M.; Impairment of phagocytic cell respiratory burst by UVA in the presence of fluoroquinolones: an oxygen-dependent phototoxic damage to cell surface microvilli; *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1996**, *33*, 137
- [22] Hooper, D. C.; Clinical application of quinolones, *Biochem. Biophys. Acta* **1998**, *1400*, 45
- [23] Sacheteli, S.; Khalil, H.; Chen, T.; Beaulac, C.; Sénéchal, S.; Lagacé, J.; Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells, *Biochem. Biophys. Acta* **2000**, *1463*, 254
- [24] Majumdar, S.; Flasher, D.; Friend, D. S.; Nassos, P.; Yajko, D.; Hadley, W. K.; Duzgunes, N.; Efficacies of liposome-encapsulated Streptomycin and Ciprofloxacin against Mycobacterium avium- M. Intracellulare complex infections in human peripheral blood monocyte macrophages, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2808
- [25] Duzgunes, N.; Flasher, D.; Ready, M. V.; Luna Herrera, J.; Gangadharam, P. R. J.; Treatment of intracellular Mycobacterium avium complex infection by free and liposome-encapsulated Sparfloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2618
- [26] Koletar, S. L.; Treatment of Mycobacterium avium in human immunodeficiency virus infected individuals, *Am. J. Med.* **1997**, *102*, 16
- [27] Nagata, L. P.; Wong, J. P.; Saravolar, E. G.; Use of liposome encapsulated Ciprofloxacin as an immunotherapeutic drug, *Canada Minister Defense*, patente nº CA1996217480319960423, **1999**
- [28] Moraes, A. M.; Tese de Doutorado: "Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade de lipossomas contendo o-carboranilpropilamina, L-p-Boronofenilalanina e doxorubicina", FEQ/Unicamp, **1996**
- [29] Gregoriadis, G.; Ryman, B.E.; Liposome as carriers of enzymes or drugs. A new approach to the treatment of storage diseases, *Biochem. J.* **1971**, *124*, 58

- [30] Gregoriadis, G.; Ryman, B. E.; Lysosomal localization of β -fructofuranosidase containing liposomes injected into rats. Some applications in the treatment of genetic disorders, *Eur. J. Biochem.* **1972**, *24*, 485
- [31] Barenholz, Y.; Crommelin, D. A.; Liposomes as pharmaceutical dosage forms – In: Iwarbrick, J. e Boylan, J. C. – *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker Inc., New York, **1994**, *9*, 1
- [32] Cruz, M. E. M.; Lipossomas: vesículas mágicas ou simples utopia?; *Biotecnologia e Saúde* **1992**, *3*
- [33] Lasic, D. D.; The mechanism of vesicle formation, *Biochem J.* **1988**, *256*, 1
- [34] Lasic, D. D.; Liposomes, *Am. Scientist*, **1992**, *80*, 20
- [35] Lasic, D. D.; *Liposomes: from physics to applications*; Elsevier Science Publishers B. V., USA, **1993**
- [36] Storm, G.; Crommelin, D. J. A.; Liposomes: quo vadis?, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **1998**, *1*, 19
- [37] New, R. R. C.; *Liposomes, a practical approach*, IRL Press, New York, **1990**
- [38] Corvo, M. L.; Martins, M. B.; Francisco, A. P.; Morais, J. G.; Cruz, M. E. M.; Liposomal formulations of Cu, Zn-superoxide dismutase: physicochemical characterization and activity assessment in an inflammation model, *J. Control. Release* **1997**, *43*, 1
- [39] Abra, R. M.; Hunt, C. A.; Lau, D. T.; Liposome disposition *in vivo* VI: delivery to the lung, *J. Pharm. Sci.* **1980**, *73*, 203
- [40] Senior, J.; Crawley, J. C. W.; Gregoriadis, G.; Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation after intravenous injection, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *1*, 839
- [41] Piard, J. C.; Alkhalef, W.; El Soda, M.; "Liposomes and agro-food industry", in *Liposomes, new systems and new trends in their applications*, Ed. Piusieux, Paris, Éditions de Santé, **1995**, 735
- [42] Gregoriadis, D.; Liposomes and Anti-aging creams: the facts beneath the face; *The Biochemist.* **1995**, *2*, 8
- [43] Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, New York, **1989**

- [44] Montero, M. T.; Borrell, J. H.; Nag, K.; Keough, K. M. W.; Fluoroquinolone distribution in a phospholipid environment studied by spectrofluorimetry, *Anal. Chim. Acta* **1994**, *290*, 58
- [45] Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, **1983**
- [46] Lawton, W. H.; Sylvestre, E. A., *Technometrics* **1971**, *13*, 617
- [47] Mazuel, C.; Pharmaceutical research and development, *Analytical Profiles of Drug Substances*, France **1991**, *20*, 557
- [48] Novák, K.T.; Józán, M.; Hermecz, I.; Szász, G.; Lipophilicity of antibacterial fluoroquinolones, *Int. J. Pharm.* **1992**, *79*, 89
- [49] Barros, T. C.; Tese de Doutorado: "*Preparação e Caracterização de N-alkilnaftalimidas*", USP, **1996**
- [50] Bilski, P.; Martinez, L. J.; Koker, E. B.; Chignell, C. F.; Influence of solvent polarity and proticity on the photochemical properties of Norfloxacin; *Photochem. and Photobiol.* **1998**, *68*, 20
- [51] Dey, J.; Warner, I. M.; Spectroscopic and photophysical studies of the anticancer drug Camptothecin; *J. Luminescence* **1997**, *71*, 105
- [52] Rendell, D.; *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy*, John Wiley & Sons, New York, **1987**
- [53] Bilsky, P.; Martinez, L. J.; Koker, E. B.; Chignell, C. F.; Photosensitization by Norfloxacin is a function of pH, *Photochem. and Photobiol.* **1996**, *64*, 496
- [54] Montero, M. T.; Saiz, D.; Sitges, R.; Vázquez, J. L.; Borrell, J. H.; Influence of physicochemical properties of fluoroquinolones on encapsulation efficiency in liposomes, *Int. J. Pharm.* **1996**, *138*, 113
- [55] Ross, D. L.; Riley, C. M.; Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials, *Int. J. Pharm.* **1990**, *63*, 237
- [56] Drakopoulos, A. I.; Ioannou, P. C.; Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution, *Anal. Chim. Acta* **1997**, *354*, 197

- [57] Biloti, D. N.; Reis, M. M.; Ferreira, M. M. C.; Pessine, F. B. T.; Photochemical behavior under UVA radiation of β -cyclodextrin Included Parsol® 1789 with chemometric approach, *J. Mol. Struct.* **1999**, *480-481*, 557
- [58] Lang, J. K.; Pelfrey, C. V.; Quality control of liposomal lipids with special emphasis on peroxidation and cholesterol, *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 19
- [59] MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Applications of freezing and thawing in liposome technology, - *Liposome Technology*, **1980**, *1*, 209
- [60] Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Meigo, M. S.; Volpe, P. L. O.; Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial, *Quím. Nova* **1999**, *22*, 724
- [61] Geladi, P.; Kowalski, B. R.; Partial Least-Squares Regression: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* **1986**, *185*, 1
- [62] Puglisi, G.; Fresta, M.; Mazzone, G.; Furneri, P. M.; Tempera, G.; Formulation parameters of fluoroquinolones loaded liposomes and *in vitro* antimicrobial activity, *Int. J. Pharm.* **1995**, *118*, 65
- [63] Scarpa, M. V.; Oliveira, A. G.; Cuccovia, I. M.; Estrutura e Propriedades físico-químicas de lipossomas, *Infarma* **1998**, *7*, 4
- [64] Biltonen, R. L.; Lichtenberg, D.; The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations, *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 99
- [65] Cevc, G.; Lipid properties as a basis for membrane modeling and rational liposome design. In: *Liposome Technology*, Ed. G. Gregoriadis, CRC Press, 2ª Ed., Boca Raton, Florida, 1993, Vol. 1
- [66] Heimburg T.; Biltonen, R. L.; Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c., *Biochemistry* **1994**, *33*, 9477
- [67] Kato, S.; Kubo, T.; Relaxation process after the cooling jump across the pretransition of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers, *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *90*, 31
- [68] Lentz, B. R.; Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers, *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 99

- [69] Borestein, V.; Barenholz, Y.; Characterization of liposomes and other lipid assemblies by multiprobe fluorescence polarization; *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 117
- [70] Kachel, K.; Punzalan, E. A.; London, E.; The location of fluorescence probes with charged groups in model membranes, *Biochem. Biophys. Acta* **1998**, *1374*, 63
- [71] Novák, K. T.; Noszál, B.; Hermecz, I.; Keresztúri, G.; Podányi, B.; Szász, G.; Protonation equilibria of quinolone antibacterials, *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79*, 1023
- [72] Ross, D. L.; Elkinton, S. K.; Riley, C. M.; Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials II – 1-octanol/water partition coefficients and their relationships to structure, *Int. J. Pharm.* **1992**, *88*, 379