

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**UNICAMP**

**BIBLIOTECA CENTRAL**

**SEÇÃO CIRCULANTE**

**Estudo da Encapsulação de Fármacos de Primeira Linha no  
Tratamento da Tuberculose em Lipossomas e Ciclodextrinas**

**Heron Oliveira dos Santos Lima**

*Autor*

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Helena Andrade Santana**

*Orientadora*

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gisella Maria Zanin**

*Co-orientadora*

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.**

**Campinas – São Paulo**

**março/2001**

21/01/12

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP
	L628e
V.	Ex.
TOMBO BC/	44928
PROC.	16.392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PRECº	R\$ 11,00
DATA	26/10/2001
N.º CPD	

CM00158109-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

L628e      Lima, Heron Oliveira dos Santos

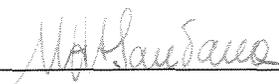
Estudo da encapsulação de fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose em lipossomas e ciclodextrinas / Heron Oliveira dos Santos Lima. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadoras: Maria Helena Andrade Santana, Gisella Maria Zanin.

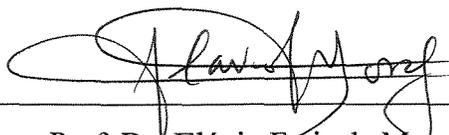
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Tuberculose - Tratamento. 2. Lipossomos. 3. Ciclodextrinas. 4. Microencapsulação. 5. Medicamentos - Biodisponibilidade. I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Zanin, Gisella Maria. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

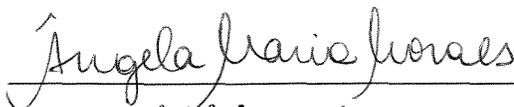
Tese de Doutorado defendida por Heron Oliveira dos Santos Lima e aprovada em 23 de março de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



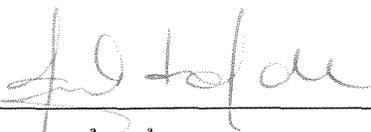
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Andrade Santana



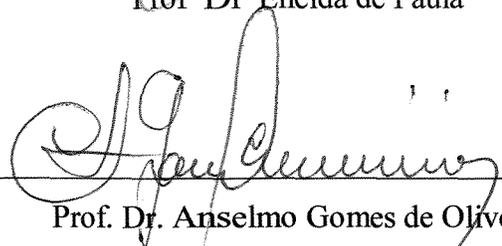
Prof. Dr. Flávio Faria de Moraes



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ângela Maria Moraes

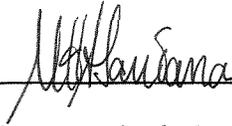


Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eneida de Paula



Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. H. Santana', is written over a horizontal line.

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Helena Andrade Santana (Orientadora)**

*Deus,  
Obrigado pela possibilidade de  
estudar e aprender.*

*Dedico*

*À minha esposa Mirela, pelo amor, compreensão e  
incentivo constante. Ao meu filho Leonardo,  
pela existência e inspiração.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão:

- À Prof<sup>ª</sup> Dra. MARIA HELENA ANDRADE SANTANA, não apenas pela orientação segura e objetiva, mas também pela amizade e incentivo, onde ao longo desses anos de trabalho, principalmente nos momentos mais difíceis, esteve sempre ao meu lado;
- À Prof<sup>ª</sup> Dra. GISELLA MARIA ZANIN pela co-orientação, sugestões e, sobretudo, pela amizade sólida;
- À Prof<sup>ª</sup> Dra. ÂNGELA MARIA MORAES pelo apoio e valiosa colaboração durante todo o curso, e que dentro das possibilidades sempre esteve à disposição;
- À Prof<sup>ª</sup> Dra. ENEIDA DE PAULA do Laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela disponibilidade para realização dos ensaios de toxicidade, bem como pelas sugestões e observações da Qualificação;
- Ao Prof. Dr. FRANCISCO PESSINE, pela amizade e valiosas observações nos seminários de grupo;
- Ao Prof. Dr. FLÁVIO FARIA DE MORAES, pelas observações e sugestões no decorrer do trabalho.
- À doutoranda LUCIANA A. DE MATOS PINTO do Laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo auxílio absolutamente indispensável na realização dos ensaios de toxicidade;
- À Prof<sup>ª</sup> Dra. MARIA CECÍLIA BARISSON VILLARES do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela realização dos ensaios de atividade antimicobacteriana, sugestões e cooperação;
- À técnica DALVA CONCEIÇÃO GOMES FLORENCIO da Seção de Microbiologia Clínica da Divisão de Patologia Clínica HC/UNICAMP, pela disponibilidade na realização dos testes antimicobacteriano, sobretudo, nos plantões de finais de semana;

- Ao Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO NUNHEZ da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP pela valiosa contribuição no desenvolvimento do modelo matemático para os testes de liberação dos compostos, bem como pela sugestão do método de ajuste dos pontos experimentais;
- Ao Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, pela concessão das instalações e dos equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho;
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro para conclusão deste trabalho;
- Aos meus Pais, WALDECY e MARGARIDA, que mesmo muito longe, não mediram esforços para tornar este sonho uma realidade, onde mais que o incentivo, prevaleceu o amor, o carinho, o exemplo e, principalmente, a herança da capacidade de luta para a conquista do meu objetivo;
- Aos amigos CÁSSIO OLIVEIRA e ALBERTO NOGUEIRA pelos momentos de lazer.
- Aos meus COLEGAS da pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, pela simpatia, compreensão e proporcionarem o bom ambiente de trabalho;
- A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para o êxito deste trabalho.

## RESUMO

A tuberculose é uma doença produzida pelo Bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*) ao se instalar no organismo humano e tem sido considerada um problema de saúde pública mundial dado o número de óbitos observados nos últimos tempos. A falência do tratamento deve-se principalmente ao abandono por parte dos pacientes, causado pelos efeitos colaterais dos fármacos na forma livre. As ações de combate à tuberculose incluem tanto o desenvolvimento de novos medicamentos, limitado pelos elevados custos, quanto a busca de novas formas de administração que proporcionem o aumento do índice terapêutico. Nesse último aspecto, tanto a encapsulação de fármacos em lipossomas (vesículas lipídicas) como a complexação em ciclodextrinas (oligosacarídeos cíclicos) representam alternativas viáveis para a melhoria do tratamento da Tuberculose.

Considerando o grande potencial das aplicações de lipossomas e ciclodextrinas destinados à administração e liberação controlada de fármacos, neste trabalho estudou-se os processos de associação e liberação dos fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose, Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz), nesses suportes. Os lipossomas usados foram dos tipos convencional e com superfície modificada com polietileno glicol ("Stealth"). Os fármacos foram associados aos lipossomas nas formas livre ou complexados em  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD). As preparações foram caracterizadas em relação à complexação em ciclodextrinas, eficiência de encapsulação ou associação dos complexos de ciclodextrinas em lipossomas, diâmetro e distribuição de tamanhos dos lipossomas, estabilidade física, cinética de liberação dos fármacos, hemólise de células e ação contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

As eficiências máximas de encapsulação em lipossomas convencionais obtidas para os fármacos na forma livre foram 14,2% para Pz e 10,0% para Iz correspondendo às razões fármaco/lipídio (F/L) finais 0,019 e 0,013, respectivamente. Para os fármacos complexados em  $\beta$ -ciclodextrinas foram 11,3% para Pz: $\beta$ -CD e 9,0% para Iz: $\beta$ -CD à razões (F/L) finais 0,015 e 0,012, respectivamente. Em lipossomas do tipo "Stealth", as eficiências de encapsulação para os fármacos livres foram 7,5% para Pz e 8,3% para Iz, relativas às razões (F/L) finais 0,010 para ambos os fármacos, e 11,2% para Pz: $\beta$ -CD e 7,5% para Iz: $\beta$ -CD relativas às razões (F/L) finais 0,015 e 0,010, respectivamente. Os estudos de liberação dos compostos mostraram que para uma mesma razão (F/L) inicial, a taxa de liberação total foi maior para os lipossomas convencionais (24h) seguidos dos "Stealth" (36h) e, finalmente dos complexos  $\beta$ -CD associados a lipossomas "Stealth" (48h).

**Palavras-chaves:** tuberculose, lipossomas, ciclodextrinas, pirazinamida, isoniazida, etambutol.

## ABSTRACT

Tuberculosis is a disease produced by the Koch Bacillus (*Mycobacterium tuberculosis*) when installed in the human organism. It has been considered a world health problem due to the number of deaths observed lately. The failure in the treatment is mainly due to the poor adherence by patients caused by the side effects of the drugs in free form. The fighting actions against Tuberculosis include both the development of new medicines, limited by the high costs, and the new ways of administrating, which provide the increase in the therapeutic index. In this latter aspect, both the encapsulation of drugs in liposomes (lipid vesicles) and the complexation in cyclodextrins (cyclic oligosaccharides) represent feasible alternatives for the improvement of tuberculosis treatment.

Considering the great potential of applications of liposomes and cyclodextrins in the administration and controlled release of medicines, in this work the association and delivery of Pyrazinamide (Pz) and Isoniazid (Iz), in these supports were studied. The liposomes used were of the conventional and Stealth types. The drugs were associated to liposomes in free form or complexed in  $\beta$ -cyclodextrins ( $\beta$ -CD). The preparations were characterized in terms of the complexation in cyclodextrins, encapsulation efficiency or association of cyclodextrin complexes in liposomes, diameter and size distribution of liposomes, physical stability, drug delivery kinetic, cell hemolysis and action against the *Mycobacterium tuberculosis*.

The maximum efficiencies of encapsulation in conventional liposomes obtained for free drugs were 14.4% for Pz and 10.0% for Iz related to the final drug-lipid ratio (F/L) 0.019 and 0.013, respectively. For drug: $\beta$ -cyclodextrin complexes they were 11.3% for Pz: $\beta$ -CD and 9.0% for Iz: $\beta$ -CD at (F/L) final ratio 0.015 and 0.012, respectively. For Stealth liposomes efficiencies of encapsulation for the free drugs were 7.5% for Pz and 8.3% for Iz, related to (F/L) final rates 0.010 for both drugs, and 11.2% for Pz: $\beta$ -CD and 7.5% for Iz: $\beta$ -CD related to the (F/L) final rates 0.015 and 0.010, respectively. The studies about drug delivery showed that for the same (F/L) initial ratio, the delivery rate was greater for conventional liposomes (24 h) followed by the Stealth (36h) and, finally by  $\beta$ -CD complexes associated to Stealth liposomes (48h).

**Key-words:** tuberculosis, liposomes, cyclodextrins, pyrazinamide, isoniazid, ethambutol.

## SUMÁRIO

---

<i>Assunto</i>	<i>Página</i>
Resumo	xv
Abstract	xvii
Índice de Figuras	xxv
Índice de Tabelas	xxix
Abreviações	xxxii
Nomenclatura	xxxiii
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II	5
OBJETIVO	5
CAPÍTULO III	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 A Tuberculose e o seu tratamento	7
3.2 Quimioterapia da Tuberculose	11
3.3 Considerações Gerais sobre Lipossomas	16
3.3.1 Estrutura dos Agregados Anfifílicos	18
3.3.2 Classificação dos Lipossomas	21
3.3.3 Mecanismos de Formação de Lipossomas	22
3.3.4 Preparação dos Lipossomas	24
3.3.5 Aplicações dos Lipossomas na Farmacologia e Medicina	26
3.3.6 Comportamento dos Lipossomas em Sistemas Biológicos	27
3.3.7 Lipossomas Estericamente Modificados	29
3.3.8 Incorporação de Compostos em Lipossomas	30

3.3.9 Aplicação dos Lipossomas na Terapia da Tuberculose	31
3.4 Considerações Gerais sobre Ciclodextrinas	34
3.4.1 Propriedades Físicas e Químicas das Ciclodextrinas	36
3.4.2 Produção e Aplicações das Ciclodextrinas	37
3.5 Modelos difusionais para a liberação controlada de fármacos	42
CAPÍTULO IV	45
MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Material	45
4.1.1 Reagentes analíticos	45
4.1.2 Equipamentos	46
4.2 Métodos	46
4.2.1 Predição teórica da encapsulação dos fármacos em $\beta$ -CD	46
4.2.2 Caracterização dos fármacos e da $\beta$ -CD	47
4.2.2.1 Solubilidade dos fármacos e da $\beta$ -CD	47
4.2.2.2 Determinação dos coeficientes de partição dos fármacos e da $\beta$ -CD	48
4.2.3 Preparação e caracterização dos complexos de inclusão fármaco: $\beta$ -CD	48
4.2.3.1 Caracterização dos complexos de inclusão fármaco: $\beta$ -CD	49
4.2.4 Síntese do DMPE-PEG para modificação da superfície de lipossomas	53
4.2.4.1 Primeira Etapa - Formação do Intermediário	54
4.2.4.2 Segunda Etapa - Preparação do DMPE-PEG	55
4.2.4.3 Purificação do DMPE-PEG	55
4.2.4.4 Caracterização do DMPE-PEG	56
4.2.5 Preparação e caracterização dos compostos encapsulados em lipossomas	57
4.2.5.1 Preparação dos lipossomas	57
4.2.5.2 Caracterização dos lipossomas	60

4.2.6 Testes de hemólise induzida dos fármacos e dos complexos com $\beta$ -CD	65
4.2.7 Suscetibilidade bacteriana às formulações em $\beta$ -CD e lipossomas	66
4.2.8 Estudo de liberação dos fármacos <i>in vitro</i> nos vários tipos de lipossomas	69
4.2.9 Determinação dos parâmetros do modelo de encapsulação utilizando-se o método da máxima verossimilhança	71
<b>CAPÍTULO V</b>	73
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	73
<b>5.1 Complexação dos fármacos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) em <math>\beta</math>-ciclodextrinas (<math>\beta</math>-CD)</b>	74
5.1.1 Predição teórica da encapsulação dos fármacos em $\beta$ -CD	74
5.1.2 Caracterização dos fármacos e da $\beta$ -CD	76
5.1.2.1 Solubilidade em meios aquosos	76
5.1.2.2 Coeficientes de partição em sistemas hidrofóbico/hidrofílico	77
5.1.3 Caracterização dos complexos de inclusão fármaco: $\beta$ -CD	78
5.1.3.1 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons $^1\text{H-NMR}$	79
5.1.3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	82
5.1.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	84
5.1.3.4 Espectrofotometria UV/visível	87
5.1.3.5 Avaliação da dissolução dos complexos em meio aquoso	91
5.1.3.6 Ensaio de fotoestabilidade e estabilidade oxidativa	92
<b>5.2 Encapsulação e liberação dos fármacos Pirazinamida e Isoniazida de lipossomas</b>	93
5.2.1 Síntese, purificação e caracterização do DMPE-PEG	93
5.2.2 Preparação e caracterização dos lipossomas	95

5.2.2.1 Remoção dos fármacos não encapsulados nos lipossomas	96
5.2.2.2 Encapsulação dos fármacos em lipossomas	99
5.2.3 Estabilidade das vesículas lipídicas	103
5.2.3.1 Estabilidade das vesículas em tensoativo não-iônico C <sub>12</sub> E <sub>5</sub>	103
5.2.3.2 Estabilidade à estocagem dos lipossomas	105
5.2.4 Liberação dos fármacos encapsulados em lipossomas	107
5.3 Associação dos complexos fármaco:β-CD com lipossomas	113
5.3.1 Capacidade de associação dos complexos de β-ciclodextrina com lipossomas	114
5.3.2 Estabilidade da associação fármaco: β-CD com lipossomas em tensoativo não-iônico C <sub>12</sub> E <sub>5</sub>	117
5.3.3 Liberação dos complexos fármaco:β-CD de lipossomas	120
5.4 Testes <i>in vitro</i> de hemólise celular e atividade antimicobacteriana	123
5.4.1 Testes de hemólise induzida	123
5.4.2 Suscetibilidade bacteriana	125
CAPÍTULO VI	127
6.1 CONCLUSÕES	127
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	127
CAPÍTULO VII	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
Apêndice I - Modelo da difusão de solutos no interior de esferas porosas	147
Apêndice II - Espectros de <sup>1</sup> H-NMR dos complexos fármaco:β-CD	155

<b>Apêndice III- Modelo cinético de formação dos complexos</b>	<b>159</b>
<b>Apêndice IV - Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas lipídicas</b>	<b>165</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

- Figura 1 - Estrutura dos principais fármacos usados no tratamento da Tuberculose. Para fluorquinolonas ( $X = -CH, -CF_2, -N$ ; -R1, -R2 e -R3 podem ser qualquer átomo ou grupo). 14
- Figura 2 - Representação esquemática de lipossomas como veículos para a encapsulação de compostos hidrofílicos no interior do cerne aquoso (representados pela cor amarela), ou ligados a superfície interna/externa (azul e branca), hidrofóbicos no interior da bicamada (verde) ou de natureza anfifílica (vermelha) (adaptado de LASIC, 1993). 16
- Figura 3 - Estrutura de uma molécula de fosfolipídio. 18
- Figura 4 - Modelo de empacotamento geométrico de moléculas anfifílicas baseado no parâmetro P, adaptado de ISRAELACHVILI et al., (1994). 20
- Figura 5 - Classificação dos lipossomas quanto à estrutura morfológica: (a) vesícula unilamelar pequena (VUP); (b) vesícula unilamelar grande (VUG); (c) vesícula multilamelar (VML); (d) vesícula oligolamelar (VOL); (e) vesícula multivesicular (VMV) (adaptado de BARENHOLZ & CROMMELIN, 1994). 21
- Figura 6 - Estrutura das ciclodextrinas (SZEJTLI, 1988). 35
- Figura 7 - Representação esquemática da formação do complexo de inclusão na ciclodextrina. A molécula hóspede é o p-Xileno e os pequenos círculos representam as moléculas de água (SZEJTLI, 1988). 41
- Figura 8 - Representação esquemática do procedimento experimental para a preparação dos complexos de inclusão fármaco:  $\beta$ -CD. 49
- Figura 9 - Representação esquemática do equipamento utilizado nos estudos de dissolução pelo método USP (Farmacopéia Americana, 1985). 52
- Figura 10 - Rota de síntese do DMPE-PEG. 54
- Figura 11 - Estruturas propostas dos complexos de inclusão para Pirazinamida (a), Isoniazida (b) e Etambutol (c) em  $\beta$ -Ciclodextrina. 76

- Figura 12 - Estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina e seus prótons nas respectivas posições de blindagem 79
- Figura 13 - Estruturas dos fármacos Pirazinamida (a), Isoniazida (b) e Etambutol (c) e seus prótons nas respectivas posições de blindagem. 81
- Figura 14 - Diagramas de calorimetria diferencial de varredura para  $\beta$ -CD livre (traço superior), Pz, Iz e Et livres (traço médio) e, seus respectivos complexos em  $\beta$ -CD (traço inferior). Pz (a), Iz (b) e Et (c). Razão molar fármaco:  $\beta$ -CD 1:1. 84
- Figura 15 - Micrografia eletrônica de varredura: (a)  $\beta$ -CD livre, (b) Pz livre, (c) Iz livre, (d) Et livre, (e) Pz: $\beta$ -CD, (f) Iz: $\beta$ -CD, e (g) Et: $\beta$ -CD; aumento de 1500 vezes. 86
- Figura 16 - Comportamento cinético da encapsulação de Pirazinamida (a) e Isoniazida (b) encapsuladas em  $\beta$ -CD 87
- Figura 17 - Cinética de complexação dos fármacos Pz (a) e Iz (b) em  $\beta$ -CD. Os pontos experimentais representam as complexações nas razões molares 1:1, fármaco:  $\beta$ -CD. As curvas representam o comportamento predito pelo modelo (Eq. 29). 90
- Figura 18 - Perfis de dissolução de tabletes contendo Pz e Iz livres e os complexo Pz: $\beta$ -CD e Iz:  $\beta$ -CD, em água desionizada a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . 91
- Figura 19 - Perfil de fotodegradação de: (a) Pz livre e Pz: $\beta$ -CD (1mM) e (b) Iz livre e Iz: $\beta$ -CD (1 mM). 92
- Figura 20 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG<sub>2000</sub> sintetizado e purificado usando gradiente descrito na Tabela 6. A primeira amostra refere-se ao padrão de PEG e as demais são as frações eluídas de 8 a 16. 94
- Figura 21 - Perfis de eluição das soluções de lipossomas a 7,5 mM e de Pirazinamida (Pz) a 25, 50, 75 e 100 mM em tampão HEPES (10 mM)/NaCL (120 mM), através de gel Sepharose CL-6B em coluna de diâmetro D = 2,6 cm e comprimento L = 45 cm. 97
- Figura 22 - Perfis de eluição das soluções de lipossomas a 7,5 mM e de Isoniazida (Iz) a 25, 50, 75 e 100 mM em tampão HEPES (10 mM)/NaCL (120 mM), através de gel Sepharose CL-6B em coluna de diâmetro D = 2,6 cm e comprimento L = 45 cm. 98

- Figura 23 - Influência da razão molar inicial (Pz ou Iz/Lipídio) no desempenho do processo de encapsulação passiva para lipossomas convencional e “Stealth”.  
Concentração de lipídios 7,5 mM. 100
- Figura 24 - Perfis de solubilização de lipossomas convencionais em presença do tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>. Condições de incubação: concentração de lipídios: 1 mM; 25 °C; tempo: 2 horas. 104
- Figura 25 - Perfis de solubilização de lipossomas do tipo “Stealth” em presença do tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>. Condições de incubação: concentração de lipídios: 1 mM; 25 °C; tempo: 2 horas. 105
- Figura 26 - Perfis de liberação do fármaco Pirazinamida de lipossomas convencionais e com PEG. 110
- Figura 27 - Perfis de liberação do fármaco Isoniazida contidas de lipossomas convencionais e com PEG. 111
- Figura 28 - Associação dos complexos Pz:β-CD ou Iz:β-CD com lipossomas pela da encapsulação passiva. 114
- Figura 29 - Efeito da razão molar inicial e final para a associação com lipossomas convencionais de Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) livres e complexadas em β-CD. 115
- Figura 30 - Efeito da razão molar inicial e final para a associação com lipossomas “Stealth” de Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) livres e complexadas em β-CD. 116
- Figura 31 - Efeito da estabilidade dos lipossomas convencionais em surfatante C<sub>12</sub>E<sub>5</sub> para os vários sistemas. Condições de incubação: concentração inicial de lipídios de 1 mM; 25 °C; 2 horas. 118
- Figura 32 - Efeito da estabilidade dos lipossomas “Stealth” em surfatante C<sub>12</sub>E<sub>5</sub> para os vários sistemas. Condições de incubação: concentração inicial de lipídios de 1 mM; 25 °C; 2 horas. 119
- Figura 33 - Perfis de liberação do fármaco Pz complexado em β-CD e associado a lipossomas convencional ou “Stealth”. 120

- Figura 34 - Perfis de liberação do fármaco Iz complexado em  $\beta$ -CD e associado a lipossomas convencional ou “Stealth”. Razão molar 5:7,5 mM Iz: $\beta$ -CD/lipídio. 121
- Figura 35 - Efeito de hemólise induzida por  $\beta$ -CD livre em meio isotônico. Volume de hemácias = 0,15% em tampão PBS. Tempo de incubação 30, 45, 60 e 90 minutos a temperatura ambiente. 124
- Figura 36 - Efeito protetor dos complexos fármaco: $\beta$ -CD contra a hemólise hipotônica. Volume de hemácias = 0,15% em tampão PBS com 78 mM NaCL, pH 7,4 e 22 °C. a) Pz: $\beta$ -CD e Iz: $\beta$ -CD; b) Et: $\beta$ -CD. 125
- Figura 37 - Modelo físico de difusão de solutos no interior de esferas sólidas 148
- Figura 38 - Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de  $\beta$ -CD em tampão salino (HEPES 10 mM/NaCL 120 mM), 25°C: (a)  $\beta$ -CD (1 mM) e (b) Pz (1 mM) +  $\beta$ -CD (1 mM). 156
- Figura 39 - Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de  $\beta$ -CD em tampão salino (HEPES 10 mM/NaCL 120 mM), 25°C: (a)  $\beta$ -CD (1 mM) e (b) Iz (1 mM) +  $\beta$ -CD (1 mM). 157
- Figura 40 - Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de  $\beta$ -CD em tampão salino (HEPES 10 mM/NaCL 120 mM), 25°C: (a)  $\beta$ -CD (1 mM) e (b) Et (1 mM) +  $\beta$ -CD (1 mM). 158
- Figura 41 - Ajuste dos dados da cinética de complexação de Pz (a) e Iz (b) em  $\beta$ -CD,  $Y=(S_t-S_\infty)/(S_0-S_\infty)$ . 164

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1 - Classificação dos lipossomas quanto o tamanho (adaptada de BARENHOLZ & CROMMELIN, 1994).	22
Tabela 2 - Métodos de preparação de lipossomas e os diferentes tipos de vesículas obtidos. Vesícula unilamelar pequena (VUP); vesícula unilamelar grande (VUG); vesícula multilamelar (VML); vesícula oligolamelar (VOL). (adaptado de CROMMELIN & SCHERJER, 1994).	25
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas das CDs (LE BAS & RYSANEK, 1987; SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991).	36
Tabela 4 - Soluções para a equação diferencial da Segunda lei de Fick para o modelo teórico de GUY (1982) para a taxa de liberação de fármacos de partículas esféricas com ou sem condição de contorno (adaptada de ELORZA, 1993).	43
Tabela 5 - Composição dos tabletes utilizados nos testes de dissolução.	51
Tabela 6 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG <sub>2000</sub> .	56
Tabela 7 - Composição dos lipossomas.	59
Tabela 8 - Faixa de concentração mínima inibitória dos fármacos Pz, Iz e Et em meio Lowenstein (adaptado de VESPAL, 1981)	68
Tabela 9 - Disposição geral dos ensaios realizados para o estudo da complexação de Pz, Iz e Et em $\beta$ -CD.	74
Tabela 10 - Comprimentos equivalentes dos fármacos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) e as dimensões da cavidade das ciclodextrinas (SZEJTLI, 1988).	75

Tabela 11 - Solubilidade dos fármacos e da $\beta$ -CD em meios aquosos à 25°C.	76
Tabela 12 - Coeficientes de partição (P) dos compostos Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) e $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) em sistemas 1-Octanol ou n-Dodecano/solução tampão HEPES 10 mM/NaCL 120 mM, pH 7,4.	78
Tabela 13 - Deslocamento químico dos sinais de prótons da $\beta$ -CD e das soluções de Pirzinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) em $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD).	80
Tabela 14 - Deslocamento químico dos sinais de prótons dos fármacos livres e complexados e $\beta$ -CD.	82
Tabela 15 - Parâmetros cinéticos da complexação de Pz e Iz em $\beta$ -CD: constante cinética de pseudo-primeira ordem, $k_{obs}$ , e tempo necessário para atingir metade da saturação, $t_{1/2}$ .	90
Tabela 16 - Disposição geral dos ensaios realizados para o estudo da encapsulação e liberação de Pz e Iz de lipossomas.	93
Tabela 17 - Resultados quantitativos da derivatização do DMPE com PEG de peso molecular 2000 Da.	95
Tabela 18 - Caracterização da encapsulação passiva dos fármacos Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) em lipossomas convencionais.	101
Tabela 19 - Caracterização da encapsulação passiva dos fármacos Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) em lipossomas “Stealth”.	102
Tabela 20 - Diâmetros médio dos lipossomas convencionais e “Stealth” contendo Pz e Iz, em função do tempo de estocagem a 5 °C em refrigerador durante 12 semanas.	106
Tabela 21 - Constante k do modelo cinético (eq. 37) e coeficiente de permeabilidade para lipossomas dos tipos convencional e “Stealth”.	112
Tabela 22 - Disposição geral dos ensaios realizados para a associação dos complexos em $\beta$ -CD com lipossomas.	113
Tabela 23 - Características dos fármacos complexados em $\beta$ -CD encapsulados em lipossomas convencional e “Stealth”.	117

Tabela 24 - Valores da constante k e do coeficiente de permeabilidade obtidos para ambos os tipos de lipossomas.	122
Tabela 25 - Disposição geral dos ensaios realizados para os testes <i>in vitro</i> de hemólise celular e atividade antimicobacteriana.	123
Tabela 26 - Atividade antibacteriana de três linhagens do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> aos fármacos nos vários sistemas estudados.	126

## ABREVIACÕES

---

Pz: Pirazinamida

Iz: Isoniazida

Et: Etambutol

CDs: ciclodextrinas

C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>: pentaetilenoglicol n-dodecil mono eter

Col: colesterol

DSPC: distearoilfosfatidilcolina

DMPE: dimiristoilfosfatidiletanolamina

DMPE-PEG: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[poli(etilenoglicol)2000]

HEPES: N-[2-hidroxi etil]piperazina-N'-[2- cido etanosulfônico]

PEG: polietileno glicol

RES: sistema reticuloendotelial

CMC: concentra o micelar crítica

F/L: razão molar fármaco/lipídio

VOL: vesícula oligolamelar

VMV: vesícula multivesicular

VUP: vesícula unilamelar pequena

VUG: vesícula unilamelar grande

VUGI: vesícula unilamelar gigante

HIV: Virus de Imunodeficiência Humana

AIDS: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

 -CD: beta-ciclodextrina

TB-MDR: tuberculose multiresistente

## NOMENCLATURA

---

p: Parâmetro de empacotamento

v: volume molecular da porção hidrofóbica do fosfolípido

$a_0$ : área superficial ótima

$l_c$ : comprimento crítico da cadeia ou cadeias de hidrocarbonetos

E: eficiência de encapsulação

$R_h$ : raio hidrodinâmico médio

k: constante de Boltzman

T: temperatura absoluta

$T_m$ : temperatura de transição

D: coeficiente de difusão médio da vesícula

r: raio da esfera

$\mu$ : viscosidade do solvente

% $C_{12}E_5$ : Porcentagem de tensoativo

A: absorvância a diferentes concentrações de tensoativo

$A_0$ : absorvância na concentração de tensoativo igual zero

P: coeficiente de partição aparente

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que apresenta evolução crônica e elevada taxa de mortalidade quando não tratada. Dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), apontam a tuberculose como a segunda causa principal de morte em todo mundo, registrando em 1997, mais de 7 milhões de novos casos, e aproximadamente 3 milhões de casos fatais (WHO, 1998). A América Latina, Ásia e África detêm a maioria dos casos de tuberculose em todo mundo. No Brasil, especificamente no estado de São Paulo, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica, registra-se aproximadamente 20.000 novos casos/ano, totalizando 1.500 mortes/ano. Quando associada com doenças como a AIDS e/ou diabetes, o problema agrava-se ainda mais, levando a 5.000 óbitos/ano (Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 1998).

As terapias usadas no tratamento da tuberculose baseiam-se na inativação e/ou eliminação do bacilo do organismo humano. Diversos fármacos de ação já comprovada são classificados como agentes de primeiro e segundo tratamento, dependendo da resposta do paciente à terapia. Os fármacos usados são capazes de agir como bacteriostáticos ou bactericidas no combate ao *Mycobacterium tuberculosis*, porém em certas condições, podem resultar totalmente ineficazes.

Atualmente enfoca-se a necessidade de mudança de paradigmas no tratamento da tuberculose tendo em vista que o abandono do tratamento e a presença de cepas resistentes aos medicamentos conhecidos estão entre as principais causas do recrudescimento da doença. A química fina pode interferir diretamente neste processo, pois se pode antever um decréscimo do abandono do tratamento com o desenvolvimento de medicamentos que reduzam o tempo de tratamento, o número de doses ou apresentem menor toxicidade.

Nos últimos anos, as terapias da tuberculose têm despertado um grande interesse em nível mundial, pois embora já existam fármacos eficazes para o seu tratamento, a taxa de mortalidade continua muita elevada. As principais razões devem-se às características do tratamento, tais como longo tempo de tratamento, efeitos colaterais, toxicidade a células normais, resistência dos microorganismos aos medicamentos, doses freqüentes e necessidade de obtenção de concentrações adequadas de fármacos nos compartimentos intracelulares onde o *Mycobacterium tuberculosis* se aloja. Essas características indicam a necessidade premente do desenvolvimento de novos medicamentos baseados na compreensão, em nível molecular, dos mecanismos de ação e sítios alvo (DAVID et al., 1989; DOUGLAS & STEYN, 1993; OLIVEIRA et al., 1997), bem como de desenvolver formulações mais adequadas para os fármacos já existentes, a fim de aumentar a sua eficiência terapêutica (CYNAMON & KLEMENS, 1994; CYNAMON et al., 1992). Nesse último aspecto, a pesquisa em tecnologia farmacêutica tem orientado seus objetivos, enfatizando principalmente o estudo do direcionamento de fármacos a alvos específicos após a administração *in vivo*, reforçando o conceito de biodisponibilidade. Assim, surgiram novos sistemas de veiculação de fármacos, entre os quais os “Sistemas de Liberação Controlada” (Controlled Drug Delivery Systems), cuja preocupação fundamental inclui o estudo cinético de liberação do fármaco no sítio de administração e a velocidade com que essas substâncias atravessam as barreiras biológicas, penetram na circulação e atingem o alvo farmacológico (OLIVEIRA et al., 1997).

Lipossomas (vesículas lipídicas) e Ciclodextrinas (oligossacarídeos cíclicos) constituem opções relevantes em aplicações onde a encapsulação e a proteção de substâncias são requeridos, principalmente para a liberação controlada de compostos terapêuticos *in vivo*. Estes veículos têm sido testados com sucesso, como transportadores de fármacos, material genético, enzimas e outras macromoléculas para o interior das células vivas. Entretanto, as características estruturais dos dois sistemas, o mecanismo de encapsulação e retenção de moléculas e, sobretudo, o comportamento *in vivo* diferem radicalmente (SZEJTLI, 1988; DUCHENE, 1988; LASIC, 1992, 1993; McCORMACK & GREGORIADIS, 1994).

Descoberto no ano de 1961 pelo cientista inglês Alec D. Bangham, o potencial de aplicação dos lipossomas nas áreas médica e farmacêutica só foi evidenciado na década seguinte e, somente no final da década de 70, os lipossomas passaram a despertar interesse dos pontos de vista científico e comercial (LASIC, 1992).

O uso de lipossomas como veículos para a encapsulação e liberação controlada de fármacos e outras substâncias para as células é baseado em diversas características de importância farmacológica. A estrutura e propriedades das vesículas lipídicas conferem-lhes a capacidade de encapsular substâncias de natureza hidrofílica, hidrofóbica ou anfifílica. Essas vesículas são biocompatíveis devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade reduzida ou inexistente, além de proporcionarem uma maior interação com as células, devido à semelhança de composição com a membrana celular. Os lipossomas podem ser utilizados para a liberação controlada de fármacos tanto em fluidos corpóreos quanto no interior de células, reduzindo a exposição de tecidos à ação de fármacos tóxicos, fazendo com que o seu uso seja bastante atrativo em aplicações clínicas (LASIC, 1993).

Devido à sua versatilidade de composição, tamanho, lamelaridade e propriedades de superfície, os lipossomas podem ser projetados para a administração pelas vias pulmonar, oral, intramuscular, subcutânea, tópica e intravenosa. (LASIC, 1992, 1993).

As ciclodextrinas (CDs) por sua vez, já são conhecidas há mais de um século, desde 1891. Na indústria farmacêutica as ciclodextrinas são utilizadas para vários fins. A inclusão de uma molécula de fármaco na ciclodextrina pode alterar consideravelmente suas características, principalmente no plano farmacocinético, tais como: modificação da solubilidade e biodisponibilidade, redução de certos efeitos secundários, conversão de substâncias voláteis e líquidas em formulações sólidas, melhoria da estabilidade no estado sólido ou às vezes em meio líquido, correção do odor e sabor desagradáveis do fármaco, redução da ação irritante dos fármacos sobre as mucosas gástrica e intestinal e de outros efeitos adversos, como por exemplo, hemólise (SZEJTLI, 1988).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa têm demonstrado em estudos pré-clínicos a potencialidade do uso de diferentes fármacos encapsulados em lipossomas e em

ciclodextrinas ou em ambos, tanto como agente terapêutico no tratamento de diversas doenças (tuberculose, câncer, artrite, leishmaniose, malária, etc.), como estabilizantes de moléculas lábeis, ou ainda, como carreadores de material genético para o desenvolvimento das chamadas vacinas gênicas ou de DNA, consideradas de terceira geração (OSTRO, 1987a, 1987b; LASIC, 1992; LASIC & MARTIN, 1995; LOUKAS et al., 1995; AGARWAL et al., 1994, KURUNOV et al. 1995; SILVA et al., 1999).

O sucesso destes sistemas em aplicações médico-farmacêuticas está diretamente associado às suas características físico-químicas, projeto da partícula e metodologia de preparação. A grande variedade de métodos usados na obtenção desses sistemas tem permitido dimensionar estruturas de diferentes tipos, tamanhos e estabilidade, possibilitando uma infinidade de aplicações. Esses sistemas quando adequadamente idealizados, podem ser capazes de determinar o destino do fármaco no organismo, evitando assim os tecidos não específicos, muitas vezes caracterizados como locais potencialmente tóxicos, proporcionando dessa forma alta concentração de fármaco diretamente no local onde devem exercer seu efeito farmacológico.

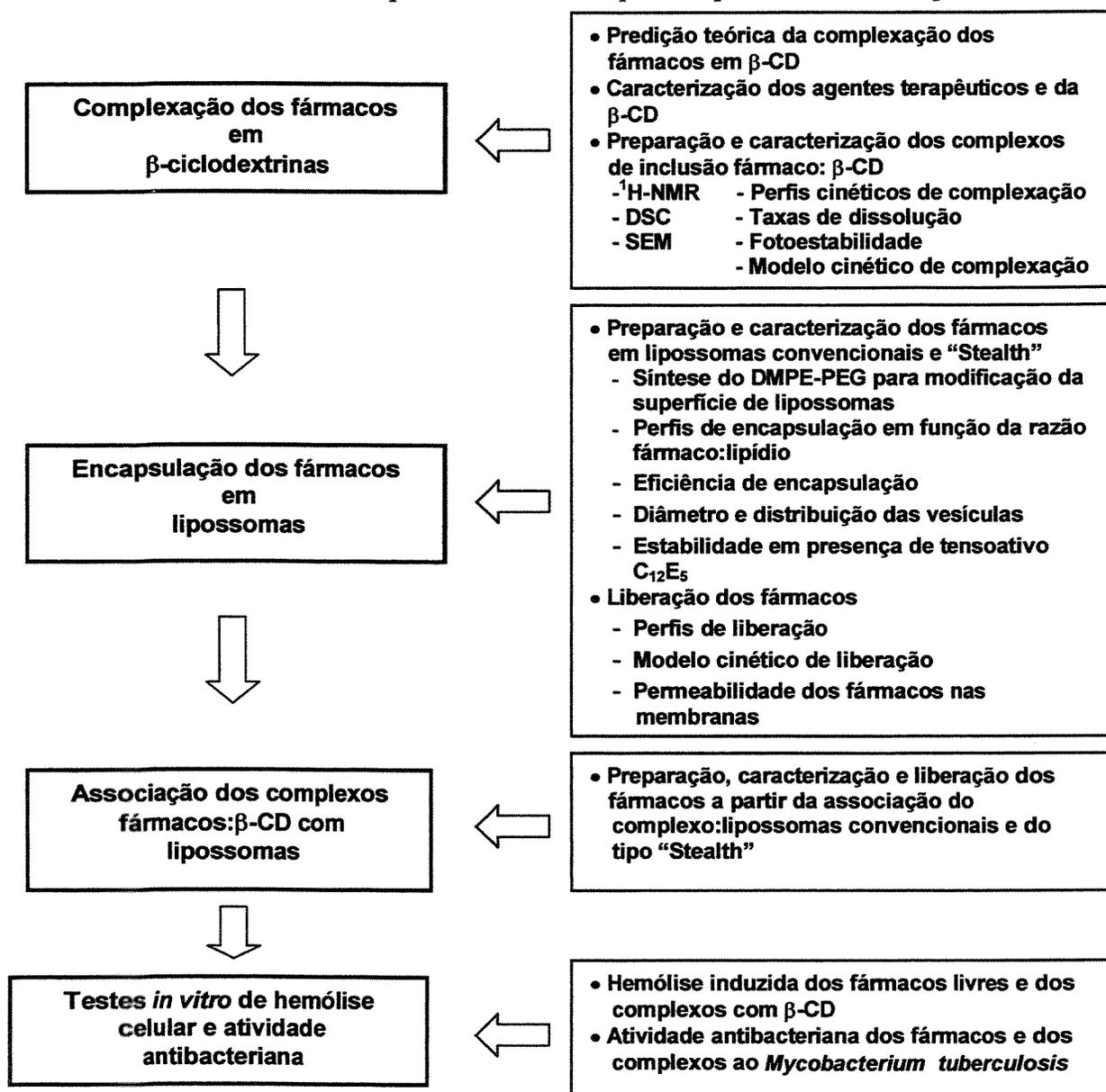
Neste trabalho, descreve-se a preparação e caracterização de lipossomas e complexos de inclusão com ciclodextrinas projetados para a encapsulação de fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose, tais como Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et). A relevância deste estudo reside no fato de que o desenvolvimento da tecnologia de novos tuberculostáticos envolvendo fármacos de ação já conhecida representa uma contribuição importante para as ações de combate à tuberculose, por meio das quais se busca erradicação da doença em um futuro não muito distante.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é estudar a complexação dos fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose: Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) em  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD), a encapsulação e liberação de Pz e Iz de lipossomas, e a sua associação com os complexos de  $\beta$ -CD, visando contribuir para o desenvolvimento de formulações com maior índice terapêutico para o tratamento da tuberculose.

O assunto foi abordado pelo estudo dos aspectos apresentados no diagrama abaixo:



## CAPÍTULO III

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A tuberculose e o seu tratamento

Atualmente, cerca de 100 anos depois da identificação, por Robert Koch, do microorganismo causal, o quadro epidemiológico da tuberculose, considerado em nível mundial, não é tranquilizante. Nos últimos 200 anos a tuberculose foi responsável pela morte de 1 bilhão de pessoas em todo mundo. Com o surgimento dos fármacos antibacterianos, a epidemia vinha sendo controlada e, por um período, o número de casos chegou a declinar. Havia previsões que no ano 2020 a doença seria erradicada nos EUA. Por volta do ano de 1986, no entanto, a incidência da tuberculose voltou a aumentar, e passou a ser um grave problema de saúde pública em todo o mundo (REICHMAN, 1991). Em 1993, a Organização Mundial de Saúde a declarou como uma infecção de emergência global e implementou vários programas para o seu controle. Apesar dos esforços em 1995 o número de óbitos causados pela tuberculose foi maior do que em qualquer outro ano na história. Em 1997, houve mais de 7 milhões de novos casos, e o número de óbitos atingiu 3 milhões (WHO, 1998). Vários são os fatores que favoreceram este aumento da incidência. Um dos mais relevantes foi o aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), epidêmica no mundo. Outros fatores também podem ter contribuído tais como o confinamento de indivíduos em presídios e em instituições para idosos, indivíduos que passam por situações de estresse, as baixas condições sócio-econômicas da população e o aumento do uso do álcool e drogas (PERSON et al., 1992; DeRIEMER et al., 1999). Além destes fatores, houve o aparecimento de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* resistentes aos fármacos disponíveis. Esta resistência pode estar associada ao uso inadequado de quimioterápicos, em especial em indivíduos portadores do HIV, dependentes de álcool ou drogas, que não fazem o tratamento de forma apropriada.

O agente etiológico da tuberculose é o *Mycobacterium tuberculosis*, do gênero *Mycobacterium*, pertencente à família *Mycobacteriaceae*. É constituído por bacilos

aeróbios, uma espécie aeróbica restrita, que necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar. É considerado um parasita intracelular facultativo, pois tem a capacidade de sobreviver e se multiplicar tanto no interior de células fagocitárias, como fora delas (KONEMAN et al., 1992). As células são imóveis, não esporulam, medem entre 0,3-0,6 por 0,5-4,0  $\mu\text{m}$ , e são de crescimento lento (a divisão pode ocorrer em períodos que variam de 12 a 24 horas). É uma bactéria que apresenta uma parede rica em lipídeos, superfície hidrofóbica muito resistente à ação de agentes químicos sendo, todavia, sensível à ação de agentes físicos como o calor e radiação ultravioleta. É denominada bacilo álcool-ácido resistente, sendo facilmente detectada quando corada pelo método de Zeehl-Neelsen (KHOMENKO, 1987).

O *M. tuberculosis* pode ser visualizado, principalmente, nas secreções broncopulmonares, através de microscopia direta, a baciloscopia, e pela cultura que permite a sua identificação.

A tuberculose é uma doença infecciosa e granulomatosa, cujo agente infectante tem predileção principalmente pelos pulmões, porém também infecta a pele, ossos, rins, meninges e nódulos linfáticos. Em contraste com estas infecções localizadas, a doença pode assumir a forma de uma infecção generalizada envolvendo um ou mais órgãos, ou ainda, pode aparecer como uma simples bronquite. No paciente com pouca resistência imunológica a tuberculose pode ser fulminante, resultando na destruição dos órgãos afetados em poucos meses (BURNETT et al., 1978).

É conveniente distinguir dois tipos de tuberculose humana: primária e pós-primária (secundária ou re-infecção). A infecção primária ocorre quando o indivíduo entra em contato pela primeira vez com o bacilo e frequentemente resulta da inalação de fluídos ou partículas contaminados com a micobactéria. Esta se estabelece no pulmão e se multiplica no interior dos macrófagos. Uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia resulta na formação de agregados de macrófagos ativados, denominados tubérculos. Em indivíduos com baixa resistência imunológica as micobactérias não são efetivamente controladas e uma infecção pulmonar aguda se instala, causando extensiva destruição dos tecidos do pulmão, disseminação das micobactérias para outras partes do corpo e morte.

Em muitos casos a infecção aguda não se desenvolve, permanece localizada, entrando em latência. Esta infecção inicial hipersensibiliza o indivíduo à micobactéria ou aos produtos do seu metabolismo. Conseqüentemente, uma resposta imunológica imediata é esperada em subseqüentes infecções. No caso da infecção pós-primária o processo será crônico, envolvendo destruição dos tecidos do pulmão, cicatrização parcial e baixa disseminação das lesões dentro dos pulmões (BROCK et al., 1994). Os bacilos ainda podem permanecer viáveis nos tecidos, apresentando baixo metabolismo e conseqüentemente não sendo efetivamente eliminados pelos fármacos ou pelo sistema imune (GRANGE, 1992; 1997). A atividade do sistema imune não acompanha a velocidade de replicação da micobactéria e a tuberculose se instala.

Introduzido em 1921, o processo de imunização com a vacina da BCG (Becille Calmette-Guérin) é utilizado mundialmente na prevenção da tuberculose, mas apresenta algumas limitações. Por exemplo, tem sido demonstrado em estudos clínicos que o nível de proteção alcançado em diferentes populações varia de 0 a 75%. Além disso, a utilização de uma importante ferramenta de diagnóstico, o teste de hipersensibilidade cutânea é dificultado em indivíduos que foram vacinados com BCG (SILVA et al., 1999). Uma nova vacina, com diferentes mecanismos de ação e alvo gênico tem sido testada com o objetivo de conferir imunidade ao indivíduo (BONATO et al., 1998; SILVA et al., 1999). Apesar de todo avanço na tecnologia de desenvolvimento de vacinas, a quimioterapia da tuberculose constitui, ainda, o principal fator no controle da doença, e tem-se estudado também a sua associação com as vacinas (SHAWAR et al., 1997).

Diversos fármacos podem ser utilizados na terapia da tuberculose. Os medicamentos de primeira linha de tratamento compreendem os fármacos: Pirazinamida, Isoniazida, Etambutol, Rifampicina e a Estreptomicina. Os fármacos de segunda linha são: Capreomicina, Canamicina, Etionamida, Ácido p-Amino-salicílico e Ciclosserina. Além destes medicamentos outros fármacos em estado de prospecção tecnológica podem atuar como bacteriostáticos ou bactericidas (GROSSET, 1996; HEYM & COLE, 1997).

Embora no último século tenha havido um grande avanço na obtenção de novos medicamentos, o modo de administração destes fármacos para o tratamento da tuberculose não se desenvolveu significativamente. Os compostos terapêuticos ainda são administrados

ao paciente na forma livre e pouco eficiente, o que geralmente conduz à manifestação de efeitos colaterais indesejáveis e que, em geral, leva o paciente a se desestimular com o tratamento, contribuindo substancialmente para aumento de casos de tuberculose multiresistente.

As ações de combate à tuberculose poderiam ser concentradas principalmente na produção de novos medicamentos de alta eficácia (específicos ou pelo menos mais seletivos). O desenvolvimento de novos fármacos envolve custos elevados, o que tem conduzido à busca de novas formas de administração que proporcionem melhores resultados terapêuticos a custos relativamente menores. Um outro aspecto consideravelmente limitante da terapia convencional da tuberculose, diz respeito ao fato de que os bacilos localizam-se principalmente no interior dos monócitos, células fagocitárias e células gigantes, onde funcionam como reservatórios das micobactérias, dificultando acentuadamente o tratamento e favorecendo a persistência microbiana. A resistência das infecções bacterianas intracelulares à terapia pode ser decorrência da baixa fração de antibiótico capturado pela célula ou da sua reduzida atividade terapêutica no pH ácido dos lisossomas (OLIVEIRA et al., 1997).

Nos últimos anos, os sistemas coloidais de veiculação intracelular de antibióticos, tais como nanopartículas, nanocápsulas, lipossomas e microemulsões têm sido empregados com sucesso na terapia antibacteriana. A possibilidade de liberar substâncias farmacologicamente ativas no interior de células constitui a principal característica destes sistemas (OLIVEIRA et al., 1997).

A encapsulação de compostos terapêuticos para aplicação na terapia da tuberculose, tais como Rifampicina, Isoniazida e Estreptomina, já foi testada por alguns grupos. Os resultados obtidos mostraram que em cultura de macrófagos, agentes antimicobacterianos encapsulados em lipossomas apresentaram maior atividade, quando comparados com fármacos não encapsulados (VLADIMIRSKY & LADIGINA, 1982; KOGA et al., 1994; AGARWAL et al., 1994; KURUNOV et al., 1995; DEOL et al., 1997; DEOL & KLULLER, 1997).

### 3.2 Quimioterapia da tuberculose

Na era pré-quimioterápica o tratamento da tuberculose era baseado no aumento da resistência do paciente por meio de repouso e dietas, e de técnicas cujo objetivo era o de fechar as cavitações, tais como a frenectomia, toracoplastia, etc (GAENSLER, 1982).

Uma nova etapa do tratamento da doença teve início com o advento de fármacos de ação direta sobre o *Mycobacterium tuberculosis*: o ácido *p*-aminosalicílico (1949), a Isoniazida, em 1952, e particularmente a introdução da Estreptomicina (1964), e particularmente (TOMAN, 1980).

Inicialmente os medicamentos eram utilizados como complementos aos métodos terapêuticos já estabelecidos, ministrados isoladamente e por curtos períodos de tempo. No entanto, a característica dos bacilos de sobreviverem em estado dormente, sob ação dos fármacos e o desenvolvimento da caseificação, favorecendo o estado de inatividade metabólica, criava impedimentos à cura da doença em pacientes com lesões extensas, impondo a necessidade de um tratamento prolongado (FOX, 1972; TOMAN, 1980; DANNENBERG, 1994).

Os medicamentos deveriam ser administrados por longo tempo, para prevenir as recidivas e serem empregados em associação para evitar o desenvolvimento de resistência aos fármacos, sobretudo nos pacientes com cavitações, onde a extensa população bacteriana apresentava número elevado de mutantes naturalmente resistentes. Os medicamentos disponíveis proporcionavam o controle da fase ativa da doença necessitando, todavia, de 18 a 24 meses de uso de esquema, o que representava um processo lento de cura (GROSSET, 1979; STEAD & DUTT, 1982).

Apesar dos fármacos utilizados em esquemas de longa duração ou esquemas *padrão* serem eficazes, os resultados na rotina dos serviços de saúde eram desapontadores. A quimioterapia longa curava a tuberculose pulmonar porém, freqüentemente, falhava pela interrupção prematura do tratamento por parte dos pacientes. A necessidade de esquemas de tratamento mais curtos tornou-se então evidente e a utilização da quimioterapia de curta

duração com a associação de fármacos representou um dos maiores avanços no controle da tuberculose (FOX, 1972).

Os primeiros estudos experimentais dessa etapa datam de 1956, quando McCUNE e colaboradores (1956), na Universidade Cornell, obtiveram resultados negativos em culturas de pulmões e baço de ratos, utilizando a associação de Isoniazida e Pirazinamida durante três meses. O fato de as culturas resultarem novamente positivas após o término da quimioterapia evidenciou mais a persistência do bacilo da tuberculose, descredenciando o potencial bactericida da terapia.

Onze anos após GRUMBACH & RIST (1967) no Instituto Pasteur em Paris, mostraram que a Rifampicina e a Isoniazida juntas, poderiam curar a tuberculose murina em seis meses. Estes resultados foram superiores aos alcançados quando se utilizava os fármacos separadamente e aos obtidos com 18 meses de Isoniazida e Estreptomicina.

O desenvolvimento da quimioterapia para o tratamento da tuberculose foi então estruturado considerando o conhecimento sobre as populações bacterianas e os fundamentos bacteriológicos do mecanismo de ação dos medicamentos (GROSSET, 1979, 1996).

Até hoje, a terapia da tuberculose tem sido caracterizada pelo desenvolvimento de resistência dos microorganismos aos diversos antibióticos.

Há vários estudos sobre o desenvolvimento do mecanismo de resistência de agentes antimicobacterianos (REYNAULD et al., 1999) e sobre a prevalência de cepas resistentes (DUVAL et al., 1999). Dentre as principais razões para a ocorrência de resistência aos tuberculostáticos incluem-se a prescrição de quimioterapia inadequada, não adesão dos pacientes aos esquemas de tratamentos e também a deficiência dos programas de controle da tuberculose (MAHMOUDI & ISEMAN, 1993; BURNS et al., 1994).

A emergência de resistência aos agentes antimicobacterianos, se agrava em pacientes infectados com HIV que apresentam a tuberculose multiresistente a drogas (TB-MDR). Pacientes infectados com HIV apresentam 0,2% de probabilidade de desenvolver a tuberculose multiresistente a drogas e o tratamento é extremamente difícil (ISEMAN,

1993). Nos Estados Unidos a eficácia do tratamento da multiresistência está em torno de 50% e apresenta 22% de mortalidade (COHN, 1995).

O *Mycobacterium tuberculosis* infecta principalmente células do sistema retículo endotelial (RES), especificamente macrófagos. Para uma terapia efetiva, os fármacos devem atingir o interior das células em concentrações bacteriostáticas ou bactericidas (OH et al., 1995). A quimioterapia da tuberculose envolve vários compostos que são usados em associação, sem haver alteração das suas propriedades farmacocinéticas (GURUMURTHY et al., 1999). Em condições favoráveis, seis meses de quimioterapia são suficientes para resultar na cura de mais de 98% dos pacientes. Embora grande parte dos bacilos em uma infecção sejam mortos em uma ou duas semanas, a terapia deve ser mantida por pelo menos cinco meses para total eliminação dos bacilos remanescentes (GRANGE, 1992).

Fármacos de primeira linha como Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol são altamente específicos para o tratamento da tuberculose e são utilizados em associação com antibióticos de amplo espectro como Rifampicina e Estreptomicina. A supressão de mutantes resistentes só é possível pela associação dos fármacos disponíveis para a quimioterapia, sendo cada fármaco ativo contra um tipo de mutante resistente. Tanto no Brasil como nos EUA, o esquema terapêutico indicado no tratamento primário da tuberculose é caracterizado pela associação Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida por dois meses, seguido de Isoniazida e Rifampicina por quatro meses (GROSSET, 1996; HEYM & COLE, 1997). As estruturas dos fármacos mais usados no tratamento da tuberculose são apresentadas na Figura 1.

A Isoniazida (hidrazida do ácido nicotínico) é altamente específica para o *M. tuberculosis* e apresenta pouca ou nenhuma atividade sobre as outras micobactérias ou bactérias. É bactericida e atua por inibição da síntese de ácidos micólicos na parede celular (INDERLIED, 1991). É efetiva, menos tóxicas que outros fármacos antituberculose, de baixo custo e facilmente absorvida quando administrada por via oral.

A Pirazinamida, análogo de Nicotinamida, é um pró-fármaco que requer desamidação por enzima micobacteriana endógena, para formar ácido pirazóico (BUTLER & KILBURN, 1983). Introduzida em 1952, seu mecanismo de ação é desconhecido e sabe-

se que há necessidade de pH ácido para sua atividade bactericida no interior de vesículas citoplasmáticas ou lisossomas (HEYM & COLE, 1997).

O Etambutol é um fármaco efetivo e específico com atividade bacteriostática. Não apresenta nenhum efeito sobre a viabilidade e metabolismo de células que não estejam em crescimento. Suspeita-se que o mecanismo de ação atue sobre o metabolismo de ácidos nucléicos, síntese de ácidos micólicos, metabolismo de fosfolípidios e síntese de arabinogalactanas (TAKAYAMA & KILBURN, 1989; BREDA et al, 1996; CHENEVIER et al., 1998).

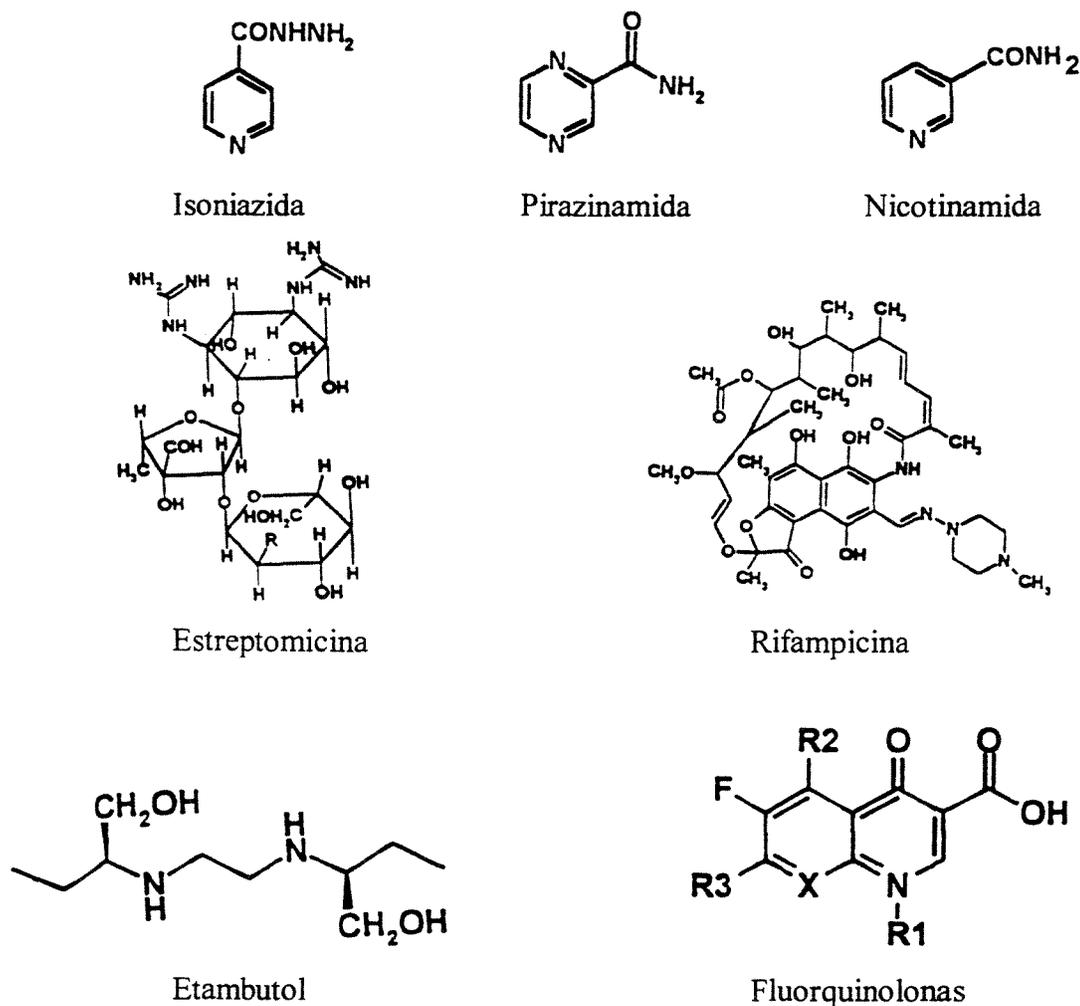


Figura 1 – Estrutura dos principais fármacos usados no tratamento da tuberculose. Para fluorquinolonas (X = -CH<sub>3</sub>, -CF<sub>3</sub>, -N; -R<sub>1</sub>, -R<sub>2</sub> e -R<sub>3</sub> podem ser qualquer átomo ou grupo).

A Estreptomicina foi o primeiro antibiótico usado para o tratamento da tuberculose, pertence à família de aminoglicosídeos. Amplamente usada na monoterapia, é um dos principais fármacos pelo qual o *M. tuberculosis* desenvolveu resistência (CANETTI et al., 1964).

A Rifampicina derivado semi-sintético das Rifamicinas tem caráter lipofílico e é de grande importância na quimioterapia da tuberculose porque reduz o tempo de tratamento da doença. Obtido de *Nocardia mediterranei*, é ativo contra *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* e várias outras espécies de microorganismos patogênicos, principalmente *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Neisseria meningitidis*, *Legionella pneumophila*, *hemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* (grupo A), *S. pneumoniae*, *S. agalatae* (grupo B), inibe a biossíntese do RNA bacteriano por ligar-se fortemente à subunidade beta da RNA polimerase dependente do DNA, impedindo a ligação da enzima ao DNA, bloqueando assim a iniciação da transcrição do RNA e por consequência, a síntese do RNA em bactérias sensíveis (BARRY, 1997).

Um número limitado de fármacos de segunda linha estão disponíveis para o tratamento da tuberculose multi-droga-resistente, dentre elas a Amikacina, Capreomicina, Cicloserina, Etionamida, Kanamicina, Clofazimina e fluorquinolonas. Com exceção das fluorquinolonas, a maioria destes compostos tem eficácia limitada e a administração prolongada é freqüentemente acompanhada por severos efeitos colaterais (HEYM & COLE, 1997).

A toxicidade de fármacos como Isoniazida, Rifampicina e Pirazinamida, foi determinada há duas décadas (GIRLING, 1978) e embora consideradas altamente tóxicas, ainda são atualmente os fármacos mais usados para o tratamento da infecção. Novos fármacos têm sido ensaiados com o objetivo de se estabelecer uma quimioterapia mais efetiva, com menos efeitos colaterais e com um período de tratamento mais curto (BARRY, 1997). Estes são os principais desafios de uma nova quimioterapia para tuberculose e muitas outras infecções (HART et al., 1996).

### 3.3 Considerações Gerais sobre Lipossomas

Lipossomas ou vesículas de lipídios, são estruturas esféricas compostas por bicamadas lipídicas que encapsulam em seu interior parte do meio aquoso em que se encontram. Os lipossomas de fosfolipídios são geralmente biocompatíveis, não tóxicos e não provocam resposta imune, pois sua constituição é semelhante a das membranas celulares. Podem ser compostos de uma ou várias bicamadas concêntricas e apresentam diâmetros que variam da ordem de dezenas de nanômetros a vários micra. Os lipossomas podem ser formados a partir da hidratação de filmes lipídicos secos e devido às propriedades de solubilidade das moléculas que compõem a bicamada lipídica, os lipossomas apresentam a capacidade de alojar substâncias hidrofílicas no interior do cerne aquoso, ou ligadas quimicamente às partes internas ou externas da superfície da bicamada. Substâncias com caráter hidrofóbico localizam-se no interior da bicamada, e substâncias com caráter misto situam-se na interface das regiões polar e apolar, intercaladas entre os lipídios da bicamada (Figura 2).

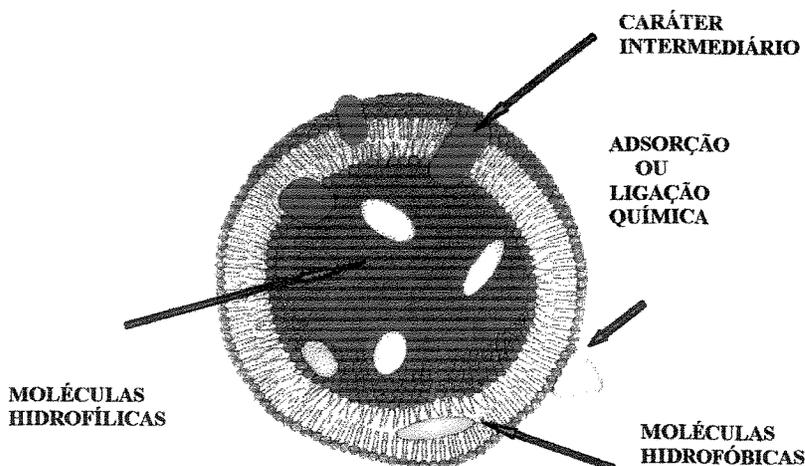


Figura 2 – Representação esquemática de lipossomas como veículos para a encapsulação de compostos hidrofílicos no interior do cerne aquoso (representados pela cor amarela), ou ligados à superfície interna/externa (azul e branca), hidrofóbicos no interior da bicamada (verde) ou de natureza anfifílica (vermelha) (adaptado de LASIC, 1993).

Os lipossomas são constituídos basicamente de moléculas anfifílicas que se caracterizam pela presença de um grupamento hidrofílico (cabeça polar) e outro grupamento hidrofóbico (cauda apolar) em uma mesma molécula. Dentre estas classes de substâncias são os lipídios polares, mais especificamente os fosfolipídios e esfingolipídios, que se encontram presentes na membrana citoplasmática da maioria das células animais e vegetais (LASIC, 1993).

As cabeças polares podem conter cargas positivas, negativas, possuírem caráter zwitteriônico ou serem neutras. O caráter polar é dado por grupos hidroxila, carboxila, amina ou fosfato. A parte hidrofóbica é constituída por uma ou duas cadeias de ácidos graxos que freqüentemente possuem de 14 a 20 carbonos e podem ser saturadas ou insaturadas. As cadeias completamente saturadas podem adquirir diversas conformações devido a liberdade de rotação das ligações simples. Esta liberdade de rotação é restringida para o caso das cadeias insaturadas sendo a conformação trans raramente encontrada entre os lipídios naturais. Estas características estruturais dos lipídios conferem aos lipossomas diferenças nos parâmetros físicos tais como estabilidade, permeabilidade da bicamada e temperatura de transição de fases (LASIC, 1993).

As cadeias de hidrocarbonetos podem estar ligadas diretamente à cabeça hidrofílica como no caso dos lipídios polares de cadeia única ou ligados a uma molécula de glicerol ou esfingosina que atuam como uma espécie de espinha dorsal para os lipídios de uma ou duas cadeias. Os lipídios de cadeia dupla encontrados na natureza podem ser classificados em quatro principais categorias, segundo os grupos de cabeça polar (fosfato ou glicosídeos) e componente de ligação entre a cabeça e a cauda (glicerol ou esfingosina). Assim tem-se os esfingoglicolipídios, esfingofosfolipídios, glicero-glicolipídios e os glicero-fosfolipídios. Os glicero-fosfolipídios, mais comumente chamados de fosfolipídios, são os mais amplamente usados na preparação de lipossomas (LASIC, 1993).

Na Figura 3 é apresentada a estrutura geral da molécula de fosfolipídio onde R1 e R2 são ácidos graxos, saturados ou não, enquanto o grupamento R3 distingue os diversos fosfolipídios, como por exemplo, fosfatidil colina ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ), fosfatidil etanolamina ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ), fosfatidil serina ( $-\text{CH}_2\text{CHNH}_3+\text{COO}^-$ ), fosfatidil glicerol ( $-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ ), etc.

A presença de colesterol na composição da membrana lipídica aumenta sua estabilidade, decresce a mobilidade interna de suas moléculas, reduz a permeabilidade na bicamada, modulando assim a fluidez dessas membranas. Na fase líquido cristalino, a interação do colesterol com as cadeias de hidrocarbonetos fluidos aumenta a ordem e a densidade de empacotamento dentro da membrana. Devido a esta interação, a presença de colesterol suprime a transição de fases e a membrana pode existir em uma ampla faixa de temperatura na fase líquida (LASIC, 1993).

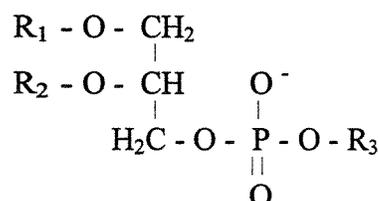


Figura 3 – Estrutura de uma molécula de fosfolipídio.

### 3.3.1 Estrutura dos Agregados Anfífilicos

Os lipossomas pertencem a uma classe especial de cristais líquidos, que são assim designados por possuírem características tanto do estado líquido (como fluidez e tendência em formar bolhas) quanto do estado sólido (como anisotropia mecânica, óptica e elétrica). Nos lipossomas as moléculas de fosfolipídios agregam-se com diferentes tipos de ordem orientacional e posicional formando fases, as quais variam principalmente em função do tipo de molécula, da solubilidade, concentração, temperatura e ainda pH e força iônica para o caso de anfífilicos iônicos (LASIC, 1993).

A agregação das moléculas anfífilicas começa a partir de uma concentração micelar crítica (CMC) que é definida como a concentração mínima necessária para formar um agregado. Na CMC os monômeros e os agregados se encontram em equilíbrio. Com o aumento da concentração de moléculas anfífilicas há a formação de agregados nas formas

lamelar, hexagonal, cúbica ou de micelas. Os lipídios de cadeia dupla, em geral, não formam micelas devido ao grande volume de suas cadeias, agregando-se preferencialmente em bicamadas, formando estruturas lamelares (LASIC, 1993).

A teoria envolvida na agregação das moléculas é complexa, porém, de uma maneira simplificada, ISRAELACHVILI (1994) propõe que o tipo de morfologia das estruturas formadas por moléculas de lipídios e outros compostos anfifílicos em soluções aquosas pode ser predito a partir de suas propriedades geométricas de empacotamento. Tais propriedades podem ser convenientemente representadas pelo parâmetro de empacotamento,  $p$ , de acordo com a equação (1):

$$p = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (1)$$

onde  $v$  é o volume molecular da porção hidrofóbica,  $a_0$  é a área superficial ótima, (definida como a área ocupada pela porção hidrofílica quando a energia de interação entre os lipídios é mínima) e  $l_c$  é o comprimento crítico da cadeia ou cadeias de hidrocarboneto, não podendo ultrapassar o comprimento máximo efetivo que as cadeias podem assumir quando completamente distendidas. Modelos geométricos de empacotamento para valores de  $p$  são apresentados na Figura 4.

Assim, um composto na forma de cone apresentando  $p < 1/3$  poderia formar micelas esféricas em condições apropriadas. Compostos na forma de cone truncado com  $1/3 < p < 1/2$  formariam micelas cilíndricas; com  $1/2 < p < 1$  formariam bicamadas flexíveis ou lipossomas; moléculas cilíndricas com  $p$  próximo à unidade resultariam em bicamadas planas, enquanto compostos com  $p > 1$  na forma de cones truncados invertidos formariam micelas invertidas ou fases hexagonais.

Outros fatores que podem afetar as estruturas formadas pelas moléculas de compostos anfifílicos são a presença de ramificações e insaturações nas cadeias hidrofóbicas, a força iônica do meio aquoso e a temperatura (ISRAELACHVILI, 1994).

Dependendo do tipo de fosfolípido e da temperatura utilizada, as bicamadas podem se encontrar em um estado de gel, com as cadeias de hidrocarbonetos bem organizadas, ou de líquido-cristalino, onde as cadeias de hidrocarbonetos estão menos ordenadas. Esta mudança de fases ocorre na chamada temperatura de transição de fases ( $T_m$ ), a qual é diretamente responsável pela determinação de propriedades como a permeabilidade da bicamada, a fusão e agregação de vesículas e sua interação com proteínas, afetando a estabilidade dos lipossomas e o seu comportamento em sistemas biológicos (NEW, 1990).

Na produção de lipossomas geralmente são selecionadas condições onde as bicamadas se formam no estado de líquido-cristalino. Esta prática reduz o aparecimento de defeitos de empacotamento que podem alterar a estrutura do lipossoma.

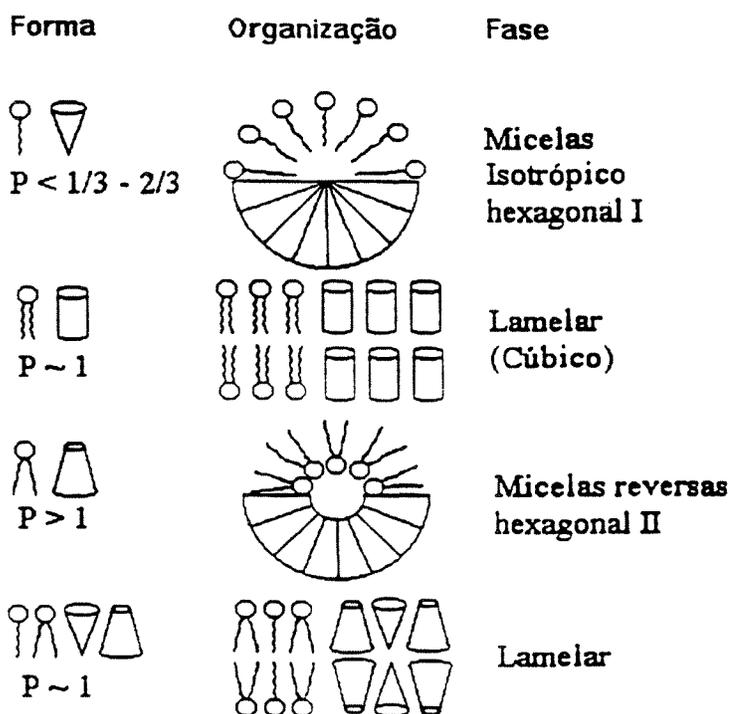


Figura 4 - Modelo de empacotamento geométrico de moléculas anfifílicas baseado no parâmetro  $p$ , adaptado de ISRAELACHVILI et al., (1994).

### 3.3.2 Classificação dos Lipossomas

Além da composição da bicamada, outro fator importante para a definição das características finais dos lipossomas é seu processo de preparação. Os lipossomas podem apresentar diferentes tamanhos e números de bicamadas, conforme ilustrado na Figura 5.

Quanto à estrutura, os lipossomas que são formados por várias bicamadas separadas entre si por um meio aquoso, são chamados vesículas multilamelares (VML), ao passo que, aqueles que possuem no seu interior diversos outros lipossomas de tamanho variado, são denominados como vesículas multivesiculares (VMV). Aquelas vesículas que são compostas por apenas uma bicamada com o interior hidrofílico são chamadas unilamelares, e podem ainda ser grandes ou pequenas (VUG ou VUP).

A classificação dos lipossomas ainda não está totalmente definida, havendo muita discussão, principalmente ao que se refere ao tamanho das vesículas. Porém uma classificação relativamente bem aceita é a feita por Barenholz e Crommelin que se baseia na influência da curvatura da bicamada lipídica sobre as propriedades físicas do lipossoma, que pode ser visualizada na Tabela 1 (CROMMELIN & SCHERIER, 1994).

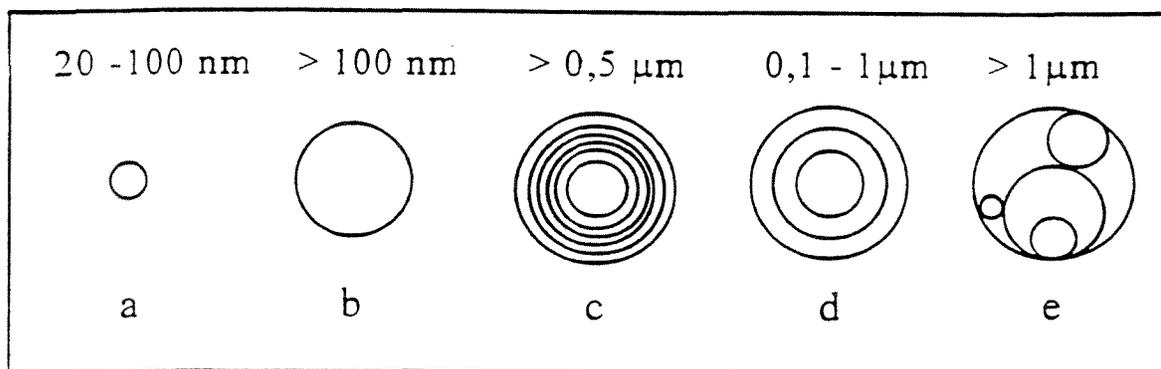


Figura 5 – Classificação dos lipossomas quanto à estrutura morfológica: (a) vesícula unilamelar pequena (VUP); (b) vesícula unilamelar grande (VUG); (c) vesícula multilamelar (VML); (d) vesícula oligolamelar (VOL); (e) vesícula multivesicular (VMV) (adaptado de BARENHOLZ & CROMMELIN, 1994).

Tabela 1 – Classificação dos lipossomas quanto ao tamanho (adaptada de BARENHOLZ & CROMMELIN, 1994).

Tipo de lipossoma	Diâmetro
Vesícula Multilamelar (VML)	> 0,5 $\mu\text{m}$
Vesícula Oligolamelar (VOL)	0,1 a 1 $\mu\text{m}$
Vesícula Unilamelar Pequena (VUP)	20 a 100 nm
Vesícula Unilamelar Grande (VUG)	> 100 nm
Vesícula Unilamelar Gigante (VUGI)	> 1 $\mu\text{m}$
Vesícula Multivesicular (VMV)	> 1 $\mu\text{m}$

### 3.3.3 Mecanismos de Formação de Lipossomas

Os mecanismos de formação dos lipossomas ainda não são completamente entendidos, principalmente pelo fato dos métodos físicos e químicos de análise não conseguirem caracterizar as estruturas intermediárias. Por outro lado, os modelos termodinâmicos não conseguem explicar sozinhos o estado real do sistema, evidenciando a forte influência exercida pelos fatores cinéticos. Os lipossomas são considerados como estruturas cineticamente estáveis e termodinamicamente instáveis (LASIC, 1988, 1993).

A formação das diferentes vesículas (VML, VUP e VUG) é descrita qualitativamente por LASIC (1988, 1993). Quando a preparação dos lipossomas é feita a partir do filme seco, a adição da fase aquosa ao filme lipídico seco conduz à hidratação da monocamada mais externa, provocando aumento do tamanho das cabeças polares. A água de hidratação é capaz de permear a bicamada, permitindo que ocorra também a hidratação das monocamadas mais internas, embora em menor extensão que a monocamada externa. Isto faz com que as bicamadas aumentem sua área superficial externa, provocando a formação de bolhas convexas. As bicamadas crescem a partir destas bolhas, produzindo figuras de mielina na forma de fibrilas tubulares alongadas, de forma a maximizar a exposição das cabeças polares. Essa transformação cessa ao se atingir um certo distanciamento entre as bicamadas, que é função da relação entre as forças estéricas

repulsivas e as forças de Van der Waals. Com a agitação do sistema, os túbulos se desprendem e se fecham em vesículas multilamelares, cuja distribuição de tamanhos é influenciada pela intensidade da agitação aplicada. As vesículas formadas apresentam-se principalmente na forma oval, passando posteriormente para forma esférica a fim de minimizar a energia de curvatura da estrutura. Esta mudança é lenta e provavelmente acontece por meio do rearranjo das moléculas via “flip-flop” ou seja, movimento transversal entre monocamadas (LASIC, 1993).

A partir de bicamadas pré-formadas, os lipossomas unilamelares podem ser gerados pela produção de fragmentos de bicamada ou por um mecanismo de brotamento. No primeiro caso, fragmentos da bicamada são produzidos pela dissipação de energia no sistema (como no caso dos tratamentos mecânicos), sendo que as bordas destes fragmentos ficam expostas ao meio aquoso. Simplificadamente pode-se dizer que a tendência à minimização da exposição da parte hidrofóbica das moléculas ao meio polar leva a um rearranjo do empacotamento das moléculas na região da borda da bicamada, o que gera a curvatura do fragmento de bicamada. Quando o fragmento de bicamada se fecha em si mesmo, a vesícula unilamelar é formada.

A ocorrência do mecanismo de brotamento é provavelmente devida a tensões dentro ou através das membranas, que podem alterar a forma da vesícula. Mudanças de temperatura ou de pressão osmótica podem acarretar em variações de mais de 3% na área superficial, na desestabilização da forma da vesícula e no imediato surgimento de vesículas filhas. Alterações mais lentas também são possíveis devido a alterações assimétricas da bicamada, resultando no brotamento de vesículas filhas externas ou internamente à vesícula mãe. Este processo ocorre tanto nos métodos de preparação de lipossomas por alterações transientes de pH, quanto naqueles onde se adicionam moléculas formadoras de micelas, ocorrendo também durante a formação das figuras de mielina com a hidratação do filme seco (WINTERHALTER & LASIC, 1993).

Nos métodos de preparação de lipossomas iniciados a partir de emulsões de água em óleo (simples ou duplas), os mecanismos propostos envolvem a coalescência das estruturas reversas após a retirada do solvente orgânico, com geração de bicamadas (fase

gel). O gel é rompido pela adição da fase aquosa, formando-se vesículas unilamelares (LASIC, 1993; WINTERHALTER & LASIC, 1993).

#### **3.3.4 Preparação dos Lipossomas**

Existem diversos métodos de preparação dos lipossomas, os quais produzem vesículas com características específicas, adequadas às diferentes aplicações (LASIC, 1993). De uma maneira geral, a diferença entre os vários métodos disponíveis baseia-se na maneira pelas quais as etapas de hidratação dos lipídios, homogeneização das vesículas e remoção do material não encapsulado são conduzidas e combinadas. Estas três fases estão presentes em quase todas as metodologias de preparação de lipossomas descritas na literatura (BARENHOLZ & CROMMELIN, 1994; CROMMELIN & SCHREIER, 1994; LASIC, 1988, 1993).

Os métodos mais comumente utilizados e os tipos de vesículas obtidas estão listados na Tabela 2. Em alguns métodos, algumas destas etapas são alteradas ou até mesmo suprimidas, dependendo da necessidade e dos resultados desejados.

Tabela 2 – Métodos de preparação de lipossomas e os diferentes tipos de vesículas obtidos. Vesícula unilamelar pequena (VUP); vesícula unilamelar grande (VUG); vesícula multilamelar (VML); vesícula oligolamelar (VOL). (adaptado de CROMMELIN & SCHERIER, 1994)

Método	Tipo de Vesícula Produzida
1. Métodos Mecânicos	
1a. Agitação Manual ou vórtice	VML
1b. Microfluidização	VUP
1c. Borbulhamento de gás inerte	VML, VUG
1d. Homogeneização com alto cisalhamento	VUP
2. Métodos por Substituição de Solventes	
2a. Remoção de solventes orgânicos antes da hidratação	VML, VOL, VUP
2b. Evaporação da fase reversa	VUG, VOL, VML
2c. Uso de solventes imiscíveis com água	VML, VOL, VUG
2d. Uso de solventes miscíveis com água	VML, VOL, VUP
3. Métodos por Remoção de Detergente	
3a. Cromatografia de filtração em gel	VUP
3b. Diálise lenta	VUG, VOL, VUP
3c. Diálise rápida	VUG, VOL
3d. Técnicas mistas	VUG, VOL, VUP
4. Métodos por Modificação de Tamanho e Fusão	
4a. Fusão espontânea de VUP na fase gel	VUG
4b. Congelamento/Descongelamento	VML
4c. Liofilização	VML
4d. Desidratação/ reidratação seguida ou não de ajuste de diâmetro	VUP, VUG
4e. Fusão induzida pelo íon Ca <sup>2+</sup>	VUG, VOL, VML
4f. Crescimento de lipossomas induzido por detergente	VUG, VOL
5. Métodos baseados em ajuste de pH	VUP, VUG
Etapa de Redução de Tamanho	
1. Extrusão a alta pressão	VOL, VUP, VUG
2. Extrusão a baixa pressão	VUP, VUG
3. Tratamento ultra-sônico	VUP

Os métodos apresentados na Tabela 2 são aqueles utilizados na produção de lipossomas em escala laboratorial, abrangendo várias técnicas que em escala industrial seriam pouco viáveis. Os métodos usados para formação das vesículas vão desde a dispersão mecânica, remoção de detergente, substituição de solventes orgânicos por soluções aquosas, alteração de pH durante a etapa de hidratação, até mudança de tamanho e fusão das vesículas. Com as vesículas multilamelares formadas, técnicas mecânicas são mais indicadas para homogeneização do tamanho, como a sonicação ou extrusão.

Tendo os lipossomas formados e de tamanho homogêneo, o próximo passo é a remoção do material não encapsulado, o que na maioria dos casos é imprescindível. Em geral há grande diferença entre o tamanho dos lipossomas e o material não encapsulado, e as técnicas mais utilizadas tais como diálise, cromatografia de permeação em gel, ultracentrifugação e ultrafiltração, baseiam-se nessa característica. Em alguns casos pode-se utilizar ainda a separação por troca iônica.

### **3.3.5 Aplicações dos Lipossomas na Farmacologia e Medicina**

A prescrição da dosagem de um medicamento é o resultado de um compromisso entre sua eficiência terapêutica e sua toxicidade. Isso é normalmente expresso como o índice terapêutico, o qual é definido como a razão entre a eficácia do fármaco e os seus efeitos colaterais. Assim os fármacos são prescritos em quantidades elevadas o bastante para controlar o problema do paciente, mas em quantidades baixas o suficiente para evitar danos inaceitáveis aos tecidos saudáveis (OSTRO, 1987a).

O índice terapêutico é uma função complexa de vários parâmetros, dentre os quais os principais são a farmacocinética, farmacodinâmica e biodistribuição de um fármaco particular. Todos esses fatores podem ser influenciados pela administração dos fármacos com sistemas liberadores específicos quando comparados à administração dos fármacos na forma livre. Dessa forma, é de grande importância o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, visando aumentar o índice terapêutico dos medicamentos.

Os lipossomas fazem parte dos sistemas liberadores de fármacos da medicina moderna, ao lado das ciclodextrinas, das microesferas poliméricas, nanopartículas e microemulsões dentre outros. Os lipossomas representam uma opção relevante para o transporte e deposição específica de compostos terapêuticos em células, pois além de apresentar baixa toxicidade, são biodegradáveis e capazes de alterar a farmacocinética e a biodistribuição dos fármacos. Além disso, os lipossomas são capazes de proteger os compostos terapêuticos nele encapsulados da diluição e degradação no sangue, de forma que quando alcançam os tecidos que necessitam de tratamento, podem liberar doses concentradas de medicamento.

As aplicações dos lipossomas na farmacologia e medicina têm crescido notavelmente nos últimos 10 anos. Vários produtos já se encontram comercializados na forma encapsulada em lipossomas, ou estão em fase final de testes clínicos. Dados da literatura mostram o avanço crescente de desenvolvimento dessas novas formulações e o sucesso clínico em várias terapias. Outras aplicações nessa área incluem diagnósticas (imunoensaios, radiologia, ressonância magnética) e o desenvolvimento de sistemas carregadores de material genético.

Dentre as aplicações de lipossomas como sistemas liberadores de fármacos destacam-se as aplicações na terapia do Câncer, ao lado do tratamento de doenças infecciosas, inflamações, doenças do sistema imunológico e cardiovascular (OSTRO, 1987a, 1987b; LASIC, 1992; LASIC & MARTIN, 1995; LOUKAS et al., 1995; AGARWAL et al., 1994, KURUNOV et al. 1995).

### **3.3.6 Comportamento dos Lipossomas em Sistemas Biológicos**

Os lipossomas interagem com praticamente todo tipo de célula. A velocidade com que um fármaco é liberado de um lipossoma adsorvido depende do tamanho e composição da membrana lipídica, do tipo de fármaco encapsulado, bem como da natureza da célula (OSTRO, 1987a). Após a adsorção, as vesículas podem sofrer processos de endocitose (sendo englobadas pelas células), de troca de lipídios com a membrana celular, ou de fusão

à célula (onde a bicamada lipídica dos lipossomas integra-se à membrana celular e o conteúdo aquoso da vesícula é anexado ao fluido citoplasmático) (OSTRO, 1987a).

Outra característica importante do comportamento dos lipossomas *in vivo* é a interação com componentes dos fluidos biológicos, como as proteínas. As opsoninas são proteínas capazes de promover o rápido reconhecimento e remoção das vesículas da corrente sanguínea. Esta remoção é feita por células do sistema fagocitário, também conhecido como sistema reticuloendotelial (RES). Este sistema de defesa, que consiste de macrófagos circulantes e de macrófagos fixos do fígado (células Kupffer), do baço, dos pulmões e da medula óssea, remove material particulado estranho, incluindo os lipossomas, da corrente sanguínea e da linfa, em intervalos de tempo da ordem de minutos. Os lipossomas são removidos da circulação primeiramente pelas células de Kupffer e depois, em menor extensão, pelas outras populações de macrófagos (WOODLE et al., 1992).

Outras proteínas, tais como as lipoproteínas, quando adsorvidas na superfície dos lipossomas desestabilizam a bicamada pela troca de lipídios.

A integridade dos lipossomas é também afetada por sua interação com moléculas que apresentam atividade de superfície. Neste caso, não apenas o tamanho e a estrutura das vesículas são afetados, mas também a sua permeabilidade. Os efeitos dessas interações têm sido bastante estudados, elucidando alguns aspectos da estabilidade dos lipossomas (SUNAMOTO et al., 1978; NILSSON et al., 1987; RUIZ et al., 1988; URBANEJA et al., 1988; EDWARDS et al., 1989; EDWARDS & ALMGREN, 1990; 1991; 1992).

A interação com componentes dos fluidos fisiológicos representa um dos mais importantes fatores que limitam as aplicações de lipossomas como veículo de administração controlada de medicamentos. Ao lado das modificações da superfície dos lipossomas com polietilenoglicol, a busca de alternativa para a produção de bicamadas mais resistentes às agressões dos vários meios a que os lipossomas encontram-se submetidos nas diversas formas de administração, incluindo a via oral, vêm sendo pesquisadas.

### **3.3.7 Lipossomas Estericamente Modificados**

As primeiras abordagens para a modificação da superfície de lipossomas com o propósito de aumentar sua estabilidade no meio biológico, foram feitas por métodos de recobrimento. Lipossomas foram cobertos por meio de ligações covalentes, com produtos naturais tais como proteínas e polímeros anfipáticos (LASIC, 1993). Apesar da proteção da superfície proporcionada por estes materiais, os lipossomas não apresentaram melhorias com relação à estabilidade biológica e tiveram a sua estabilidade física diminuída, o que não atendia às necessidades do seu uso para a liberação controlada de medicamentos (LASIC, 1993). Métodos envolvendo a co-mistura de moléculas anfipáticas com grupos especiais de cabeça polar tais como os gangliosídios ou fosfatidil inositol hidrogenado de soja (HSPI), presentes em baixas razões molares na bicamada lipídica, representaram uma revolução em termos de estabilidade biológica. Particularmente, o uso do gangliosídio GM1 (contendo ácido siálico na sua composição), produziu lipossomas capazes de permanecer por um tempo mais prolongado na corrente sanguínea (ALLEN et al., 1985, 1987; GABIZON & PAPAHAADJOPOULOS, 1992). Uma limitação específica para o uso do gangliosídio GM1 é principalmente o seu custo. Na forma natural, é extraído em pequenas quantidades da massa cinzenta do cérebro, enquanto que a sua síntese é feita em várias etapas com baixo rendimento.

A busca de alternativas menos onerosas capazes de igualar ou superar a estabilidade conferida pela presença de gangliosídios nos lipossomas sugeriu a incorporação de polímeros hidrossolúveis às vesículas fosfolipídicas, uma vez que já havia sido observado anteriormente um decréscimo na imunogenicidade e na antigenicidade de proteínas ligadas covalentemente a poli-oxietilenos.

A partir de 1990, lipídios sintéticos contendo grupos poliméricos resultantes do acoplamento covalente de cadeias de polietileno glicol (PEG) aos fosfolipídios foram incorporados as classes de materiais capazes de aumentar o tempo de circulação de lipossomas, aumentando sua estabilidade. Denominados convenientemente de “Stealth Liposomes” (lipossomas evasivos), com marca registrada pela Liposome Technology Incorporation, estas vesículas estericamente estabilizadas são capazes de se evadir do RES por períodos de tempo relativamente longos (KLIBANOV et al., 1990; BLUMÉ & CEVC,

1990; PAPAHAADJOPOULOS et al., 1991; LASIC et al., 1991; WOODLE et al., 1992; ; LASIC & MARTIN, 1995; MORAES, 1996; KONO et al., 1997; MORIBE et al., 1999).

A estabilização e conseqüente aumento do tempo de circulação dos lipossomas contendo PEG é explicado por um modelo qualitativo que propõe que estas propriedades resultam da concentração superficial de grupos altamente hidratados que inibem estericamente as interações eletrostáticas e hidrofóbicas de uma grande variedade de componentes do sangue com a superfície dos lipossomas, constituindo uma opção relevante na estabilização da estrutura de lipossomas destinados à administração por via intravenosa (KLIBANOV et al., 1990; LASIC et al., 1993).

### **3.3.8 Incorporação de Compostos em Lipossomas**

De uma maneira geral, as características físico-químicas dos compostos, tais como, sua partição entre a bicamada lipídica, a solubilidade e o peso molecular do composto, definem em qual região da vesícula este se localizará (MADDEN et al., 1990).

Outro fator que pode influenciar a eficiência de encapsulação, é a metodologia de incorporação do composto, que deve ser definida de acordo com as características mencionadas anteriormente.

A encapsulação de compostos em lipossomas pode ser feita por incorporação passiva ou ativa. Na incorporação passiva, o composto é encapsulado durante o processo de formação das vesículas, geralmente na hidratação (o filme lipídico é hidratado com uma solução contendo o composto a ser encapsulado), ou em certa fase em que a estrutura da vesícula não está completamente definida. Neste tipo de processo, a eficiência, determinada pela fração de composto terapêutico incorporado na vesícula, é diretamente influenciada pelo volume aquoso retido no cerne da vesícula onde o fármaco encontra-se dissolvido, e que, por sua vez depende do tamanho e do número de lamelas do lipossoma (MAYER et al., 1986). Na incorporação ativa, o composto é adicionado aos lipossomas previamente preparados, e sua encapsulação depende de um estímulo externo para o transporte através da membrana, cuja técnica mais utilizada é de produção de um gradiente de pH entre o

meio externo dos lipossomas e o interior da vesícula. Este mecanismo é utilizado principalmente em compostos do tipo aminas lipofílicas, fundamentado no fato de que um agente ativo não protonado pode transpor a bicamada lipídica do lipossoma. Uma vez no interior do lipossoma, onde há uma concentração excessiva de prótons, este composto tornar-se-ia positivamente carregado, o que impediria a sua volta ao meio externo, pois a bicamada não seria mais permeável ao seu novo estado (MAYER et al., 1990; MADDEN et al., 1990; MORAES, 1986).

### 3.3.9 Aplicação dos Lipossomas na Terapia da tuberculose

Nas últimas décadas, em decorrência da resistência aos antibióticos desenvolvida por diversos agentes infecciosos, entre eles o *Mycobacterium tuberculosis*, intensificaram-se as pesquisas de alternativas terapêuticas que possibilitem o aumento da eficácia dos fármacos já existentes e de novos fármacos.

A terapia de infecções causadas por organismos do gênero *Mycobacterium* é ainda um desafio. Estes microorganismos podem invadir e se multiplicar no interior de células como os macrófagos. Assim, os agentes utilizados na terapia destas enfermidades devem ser capazes de se acumular em concentrações relativamente elevadas no interior das células hospedeiras para que as células patogênicas sejam atingidas.

A administração destes fármacos geralmente é feita por via oral e está associada a diversos efeitos colaterais indesejáveis, como náusea e toxicidade aos tecidos normais, o que leva o paciente a se desestimular com o tratamento, interrompendo-o. A encapsulação destes fármacos em lipossomas poderia reduzir o número e a intensidade dos efeitos colaterais, poupando tecidos saudáveis, como os rins e o fígado.

Aliado aos efeitos colaterais nocivos, há ainda o aspecto de duração do tratamento, que pode chegar a vários meses com a utilização dos fármacos em sua forma livre. A administração de lipossomas poderia diminuir a necessidade de doses freqüentes do medicamento, uma vez que estas vesículas seriam capazes de permanecer na circulação sanguínea, liberando lentamente o fármaco por intervalos de tempo prolongado.

A incorporação dos tuberculostáticos em lipossomas também teria a vantagem de possibilitar sua administração por meio de diversas rotas, incluindo as vias pulmonar, nasal, oral, intramuscular, subcutânea, tópica e intravenosa, de acordo com as características do lipossoma selecionado. A administração por via intravenosa de lipossomas convencionais e estericamente estabilizados com polietileno glicol, por exemplo, poderia combater os bacilos alojados no sistema retículo-endotelial, enquanto a administração de lipossomas nebulizados poderia aumentar o tempo de retenção do fármaco nos pulmões (SHEK et al., 1994).

Embora a encapsulação de tuberculostáticos em lipossomas seja bastante promissora, alguns fatores de importância primordial devem ser levados em consideração no projeto racional das vesículas lipídicas e no controle e indução da liberação do fármaco. Devido ao fato pelo qual alguns organismos, incluindo o *M. tuberculosis*, não são destruídos no interior das células fagocitárias (pela prevenção da fusão fagolisossômica), a probabilidade de que os antibióticos encapsulados em lipossomas possam ser liberados diretamente aos microorganismos patogênicos diminui. Entretanto, a composição dos lipossomas pode ser selecionada de forma que os mesmos sejam capazes de liberar o fármaco encapsulado como uma consequência da alteração das condições ambientais, como temperatura e pH.

O efeito de encapsulação de compostos terapêuticos em lipossomas para aplicação na terapia da tuberculose já foi testado por alguns grupos. VLADIMIRSKI & LADIGINA (1982) trataram camundongos infectados com o *M. tuberculosis* com lipossomas de diâmetro entre 40 e 80 nm encapsulando Estreptomicina. Os autores observaram que os lipossomas foram mais efetivos que o fármaco livre no prolongamento da sobrevivência dos animais e na redução do número de microorganismos no baço, mas não nos pulmões.

KOGA et al. (1994) mostraram maior eficácia no tratamento da tuberculose em camundongos pelo uso de Estreptomicina e de Amicacina encapsulada em lipossomas do que através da administração dos fármacos livres. Similarmente, lipossomas associados aos glicosídeos asiaticosídeo e corcorusina provaram ter efeito microbicida mais efetivo nas células de *M. tuberculosis* que os glicosídeos em suas formas livres em solução (MEDDA et al., 1995).

Resultados promissores foram obtidos por AGARWAL et al. (1994) para o uso de lipossomas constituídos de fosfatidilcolina de ovo encapsulando o agente Rifampicina. Um aumento adicional na atividade tuberculostática dos lipossomas foi obtido pelo acoplamento do tetrapeptídeo ativador de macrófagos tuftsin na superfície das vesículas. A administração intermitente destes lipossomas (2 vezes por semana) foi mais efetiva na redução do número de bacilos localizados nos pulmões de camundongos que o tratamento contínuo, levando a um aumento efetivo do fármaco de pelo menos 2000 vezes em relação ao fármaco livre.

KURUNOV et al. (1995) testaram a inalação de agentes bactericidas livres e encapsulados em lipossomas para a terapia de tuberculose em camundongos. A eficácia de administrações diárias e intermitentes por inalação de fármacos na forma livre em soluções aquosas e encapsuladas em lipossomas foram avaliadas na terapia de ratos BALB/c tuberculosos. Os melhores efeitos foram obtidos com as inalações diárias de fármacos encapsulados em lipossomas. Apesar do fato do regime intermitente dos fármacos encapsulados em lipossomas ter envolvido uma dosagem menor, sua eficácia não foi inferior à terapia diária com as soluções aquosas dos fármacos. A alta eficiência dos lipossomas diminuiu as prolongadas persistências das altas concentrações de Rifampicina no tecido pulmonar.

Em 1997, DEOL & KHULLER, mostraram que Isoniazida e Rifampicina quando encapsuladas em baixas concentrações em lipossomas, exibiram menor toxicidade em macrófagos e camundongos infectados com *M. tuberculosis*, e mostraram-se mais efetivas que na forma livre (DEOL & KHULLER, 1997).

Também em 1997, SILER-MARINKOVIC et al., em um extenso trabalho de revisão, descreveram o uso de lipossomas como carreadores de fármacos antimicrobianos, onde destacam sua potencialidade na terapia de doenças causadas por microorganismos do tipo *Mycobacterium*, relatando que a encapsulação de vários tuberculostáticos nas vesículas lipídicas resultou em maior atividade dos fármacos (SILER-MARINKOVIC et al., 1991).

Estes trabalhos sugerem o desenvolvimento desta estratégia de “rejuvenescimento” de tuberculostáticos cujos efeitos já são conhecidos para possíveis aplicações clínicas.

Além de sua aplicação na terapia da tuberculose, os lipossomas podem também ser utilizados na prevenção e controle desta enfermidade, possibilitando a encapsulação de compostos indutores de resposta imunológica acentuada ao *M. tuberculosis* (SINGH & KHULLER, 1994; KOGA et al., 1994).

### 3.4 Considerações Gerais sobre Ciclodextrinas

A literatura sobre a tecnologia de aplicação e produção das ciclodextrinas (CDs) é bastante vasta, podendo-se citar como exemplo os livros de DUCHÊNE (1987) e de SZEJTLI (1988), além dos inúmeros trabalhos e patentes disponíveis.

As CDs (ciclo-amilose, ciclomaltose, dextrinas de Sharding) têm despertado a curiosidade dos cientistas e pesquisadores desde de sua descoberta por Sharding, em 1903. São produtos oriundos da degradação do amido, ou seja, oligossacarídeos cristalizáveis, que podem ser recristalizados e obtidos na forma pura (CRAMER, 1987).

CDs são polímeros homogêneos derivados da glicose, cristalinos, não-redutores, cíclicos e não higroscópicos. As unidades de glicose são unidas entre si por ligações de tipo  $\alpha$ -1,4 (SZEJTLI, 1988; PREMA et al., 1990; FUJIWARA et al., 1992; LEE et al., 1992). São denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  de acordo com o número de unidades de glicose. A Figura 6 mostra uma representação esquemática das estruturas das ciclodextrinas. A  $\alpha$  - CD, também conhecida como  $\alpha$  - dextrina de Sharding, ciclomaltohexose, ciclohexaglucona, ciclohexamilose, ACD e C6A é constituída por 6 unidades de glicose. A  $\beta$  - CD, ou  $\beta$  - dextrina de Sharding, cicloheptose, cicloheptaglucona, cicloheptamilose, BCD e C7A é formada por 7 unidades de glicose. A  $\gamma$  - CD, também conhecida como  $\gamma$  - dextrina de Sharding, ciclomalto-octose, ciclo-octagluca, ciclo-octamilose, GCD e C8A é formada por 8 unidades de glicose (SZEJTLI, 1988).

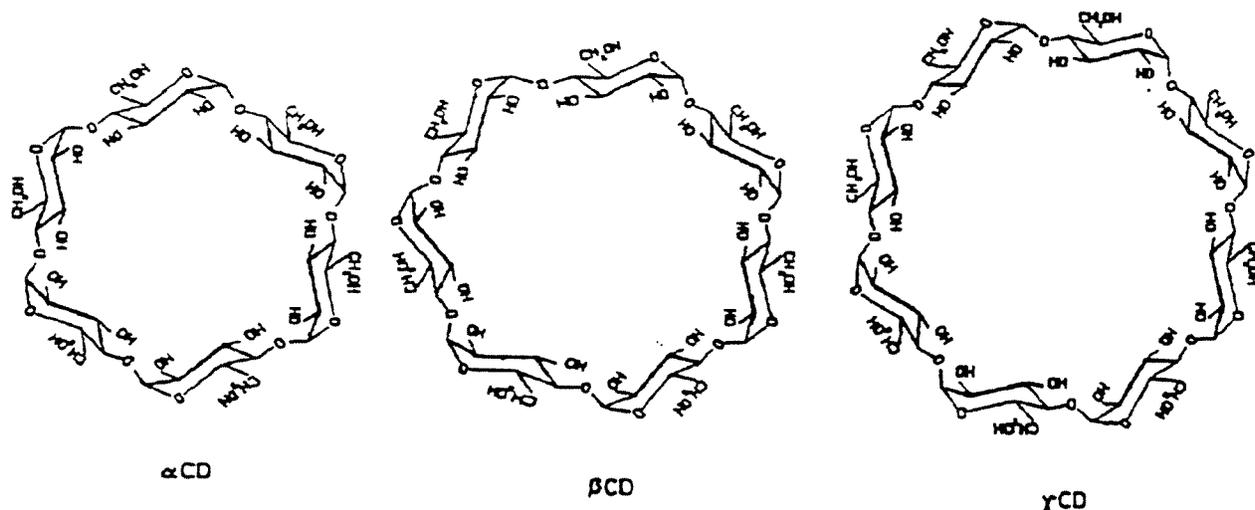


Figura 6: Estrutura das ciclodextrinas (SZEJTLI, 1988).

As CDs são moléculas que apresentam a forma de um tronco de cone invertido com uma cavidade interior cujo tamanho e forma são determinados pelo número de unidades de glicose. Esta forma cônica deve-se à conformação C1 dos resíduos de  $\alpha$ -D-glicopiranosil e à ausência de livre rotação ao redor das ligações glicosídicas. Os grupos hidroxila secundários (nos átomos C2 e C3 das unidades de glicose) estão situados de um dos lados do anel e todas as hidroxilas primárias do outro lado. Isto confere às CDs a propriedade de serem hidrofílicas externamente. O lado das hidroxilas secundárias é mais largo que o lado das hidroxilas primárias (base do tronco de cone). O interior da molécula é composto pelos grupos CH e oxigênio glicosídico, o que o torna relativamente apolar em água (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991; LEE & KIM, 1991). Portanto, o interior da cavidade apresenta um microambiente hidrofóbico, enquanto o exterior mostra uma superfície hidrofílica. Esta característica favorece a inclusão de compostos orgânicos em seu interior, isto é, encapsulação molecular, que tem sido muito estudada devido à importância para a compreensão das interações enzima - substrato e princípio ativo - receptor (TAWARA & KHOURI, 1993).

### 3.4.1 Propriedades Físicas e Químicas das Ciclodextrinas

As principais propriedades físicas e químicas das CDs são mostradas na Tabela 3 (LE BAS & RYSANEK, 1987; SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991). O mais notável nessa tabela é a baixa solubilidade da  $\beta$ -CD na água. Muitas ligações de hidrogênio intramoleculares existem entre os grupos hidroxilas secundários. O grupo C2-OH de uma unidade de glucopiranosídeo pode formar uma ponte de hidrogênio com o grupo C3-OH da unidade glucopiranosídeo adjacente. Estas pontes de hidrogênio estabilizam a molécula de  $\beta$ -CD e a tornam uma estrutura rígida e, provavelmente, atuam no sentido de prevenir a hidratação da molécula, o que pode explicar sua baixa solubilidade (BEKERS et al., 1991). A  $\gamma$ -CD tem uma estrutura não-coplanar, mas flexível, e é a mais solúvel das três CDs. Como regra geral, a solubilidade das CDs em água aumenta com o aumento da temperatura (SZEJTLI, 1988).

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas das CDs (LE BAS & RYSANEK, 1987; SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991).

Propriedade	$\alpha$ - CD	$\beta$ - CD	$\gamma$ - CD	DM - $\beta$ <sup>-1</sup>
número de unidades de glicose	6	7	8	7
Profundidade da cavidade (nm)	0,78 - 0,80	0,78 - 0,80	0,78 - 0,80	10
diâmetro interno (nm)	0,47 - 0,57	0,60 - 0,78	0,75 - 0,95	0,60
diâmetro externo (nm)	1,37 - 1,46	1,53	1,69 - 1,75	
peso molecular	972	1135	1297	1331
solubilidade em água, 25°C (g/100 mL)	14,50	1,85	23,2	57
solubilidade em água, 40 °C (g/100 mL)	28,5	4,40	58,5	
ponto de fusão (°C)	275	280	275	295
pKa 25 °C	12,3	12,2	12,1	

1- DM -  $\beta$  = Heptakis-2,6-di-o-metil-beta-ciclodextrina (DIMEB)

As CDs apresentam sabor adocicado. Uma solução contendo 2,5 % de  $\beta$ -CD é tão doce quanto uma solução contendo 1,7 % de sacarose. Portanto, quando da utilização da  $\beta$ -CD em processamento de alimentos, seu poder adoçante deve ser levado em consideração (SZEJTLI, 1988)

### **3.4.2 Produção e Aplicações das Ciclodextrinas**

Uma das propriedades mais importantes das CDs é sua resistência à hidrólise por parte das enzimas do grupo amilolítico ( $\alpha$  e  $\beta$  - amilase e amiloglicosidase). As CDs naturais são resistentes à ação da enzima  $\beta$ -amilase desde que não apresentem grupos terminais suscetíveis ao ataque dessa enzima. Embora a baixas velocidades, a enzima  $\alpha$  - amilase é capaz de hidrolisar as CDs, uma vez que estas enzimas não requerem grupos terminais livres para sua atuação. A enzima amiloglicosidase também não é capaz de hidrolisar as CDs. Com algumas exceções as CDs não podem ser fermentadas e não são utilizadas pelas leveduras (SZEJTLI, 1988; BEKERS et al., 1991).

A enzima ciclodextrina - glicosil - transferase (CGTase) EC 2.4.1.19 ( $\alpha$ -1,4-glucano-4-glicosiltransferase) é produzida a partir de diversos microorganismos. Esta enzima catalisa a conversão do amido e outras  $\alpha$ -1,4-glucanas formando ciclodextrinas por meio de uma reação de ciclização, também atuam nas reações de acoplamento (abertura do anel da ciclodextrina e transferindo os maltooligossacarídeos formados para aceptores) e desproporcionamento (transferência dos maltooligossacarídeos lineares aos aceptores). Esta enzima é de fundamental importância na produção de CDs (SZEJTLI, 1988).

A preparação das CDs pode ser dividida nas seguintes fases: (i) cultivo do microorganismo produtor da CGTase; (ii) separação da enzima do meio de cultura, e purificação (iii) conversão enzimática do amido pré-hidrolisado ou natural para uma mistura de conversão, purificação e cristalização das CDs (SZEJTLI, 1988).

Uma revisão das principais Patentes de produção de CD foi realizada por SZEJTLI (1988), sendo algumas conclusões apresentadas a seguir:

1. altas concentrações de substrato (amido) resultam em menores custos operacionais, porém o rendimento em CD diminui. Uma concentração ótima de amido (aproximadamente 30% p/v) representa uma meta a ser atingida.

2. quando se trabalha com altas concentrações de amido é necessário reduzir a viscosidade da solução por meio de uma pré-hidrólise parcial, por exemplo com ácidos ou com a enzima  $\alpha$ -amilase, ou ainda com uma pequena quantidade de CGTase. Ainda podem ser utilizados métodos mecânicos de moagem (KIM et al., 1993);

3. a enzima CGTase produz as três formas de CD ( $\alpha$ ,  $\beta$  e/ou  $\gamma$ ). A proporção de cada uma depende do tempo de reação, da linhagem do microorganismo e das condições de reação (pH, temperatura, etc.), bem como da adição de agentes complexantes (solventes). Diversos solventes e surfatantes foram testados como: acetona, etanol, glicerol, propanol, tolueno, Triton-X, entre outros (LEE & KIM, 1991; TOMITA et al., 1993). Um estudo demonstrou que o rendimento em  $\beta$ -CD aumentou 2,4 vezes quando se adicionou 15% de etanol em uma solução a 30% p/v de amido, com uma CGTase de *Bacillus circulans* variedade *alkalophilus* (MATTSSON et al., 1991);

4. na ausência de complexantes orgânicos produz-se uma mistura de CD, e o rendimento em CD cristalina cai em níveis inferiores a 20% em condições industriais típicas, isto é, na presença de altas concentrações de amido. Além disso, há a formação de diversos produtos secundários que contêm as CD acíclicas (não cristalizáveis);

5. a produção de uma mistura de CD não é economicamente viável do ponto de vista industrial, devido aos altos custos de separação e purificação do produto;

6. condições econômicas viáveis para se produzir preferencialmente uma dada forma de CD, só são possíveis quando se utiliza complexantes orgânicos e microorganismos com CGTase que apresentem uma certa especificidade para  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -CD;

7. quando se utiliza complexantes orgânicos para melhorar o rendimento em CD é necessário se empregar métodos de análise do produto bastante sensíveis uma vez que, às vezes, a legislação não permite a presença de solvente no produto em quantidades superiores a ppm ou ppb;

8. a utilização de enzimas desramificadoras (pululanase) aumenta o rendimento em CD pois as ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina atuam como inibidores da CGTase, sendo que nesse caso, de um modo geral, a taxa de produção de CD aumenta em cerca de 4 a 6%;

9. a quantidade de glicose e maltose presentes no meio reacional não podem ser superiores a 5% do amido, e neste caso o rendimento em CD está entre 30 e 70%. Quando a quantidade de glicose e maltose ultrapassa 20% de amido, o rendimento em CD cai a valores próximos a 15%.

Até o presente não se conhece uma CGTase específica para produção de  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ -CD. Sabe-se que *B. macerans* e *K. pneumoniae* produzem, preferencialmente  $\alpha$ -CD, enquanto bactérias alcalofílicas produzem, preferencialmente,  $\beta$ -CD no início da reação (SZEJTLI, 1988). Uma linhagem de *K. oxyloca* 19-1 produziu  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD na proporção de 96,5 : 3,5 : 0, respectivamente (LEE et al., 1992). Uma linhagem de *B. autolyticus* 11149 foi bastante seletiva para  $\beta$ -CD, produzindo traços de  $\alpha$  e  $\gamma$ -CD (TOMITA et al., 1993).

Como as CDs são compostos cíclicos que apresentam uma cavidade relativamente hidrofóbica, esta característica as torna altamente suscetíveis à formação de complexos de inclusão com muitos compostos orgânicos, provocando uma alteração nas propriedades físicas e químicas dessas substâncias (BENDER, 1986; DUCHÊNE, 1987; SZEJTLI, 1988; FUJIWARA et al., 1992; KIM et al., 1993). A formação de complexos entre fármacos e CDs é um aspecto importante e contribui para melhor solubilidade em meio aquoso, estabilidade e biodisponibilidade de muitas substâncias (STELLA & RAJEWSKI, 1997; LOFTSSON & BREWSTER, 1996). Estes complexos de inclusão frequentemente possibilitam a potencialização da atividade biológica e a redução dos efeitos colaterais de fármacos.

Vários trabalhos encontrados na literatura têm detalhado a formação do complexo de inclusão (HORIKOSHI, 1979; NSKK, 1983) e outras dezenas têm mostrado os meios de preparação dos complexos de CDs. Em todas as citações, percebe-se que é essencial a dissolução das CDs e das moléculas hóspedes (fármacos) (SZEJTLI, 1988).

Uma vez hidratadas, as  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ - ciclodextrinas contêm 6, 11 e 17 moléculas de água, respectivamente. Estas moléculas podem ser substituídas por moléculas de compostos apolares ou menos polares que a água. Neste processo em que há ganho de energia, em reação rápida e reversível, formam-se os complexos de inclusão.

Na ausência de molécula hóspede, a cavidade hidrofóbica, que atua como hospedeira, é ocupada por moléculas de água (SZEJTLI, 1988). Contudo uma molécula hóspede específica, quando adicionada à solução de ciclodextrinas, expulsa estas moléculas de água e ocupa esta cavidade. Além da interação hidrofóbica, outras forças, porém menos intensas, também participam deste processo. Após a formação do complexo com a ciclodextrina, na cavidade desta não permanecem moléculas de água, e a molécula hóspede fica presa às paredes por forças de Van der Waals.

A Figura 7 mostra uma representação típica de complexação onde as moléculas de água internas à cavidade da ciclodextrina no início da reação são substituídas pela molécula do p-Xileno.

A complexação de um fármaco em CDs resulta na modificação de suas propriedades físicas e químicas. Modificações estas que normalmente são vantajosas podendo-se citar: (i) na formulação de fármacos para ingestão oral – transformar compostos líquidos para a forma cristalina; mascarar produtos com sabor ou aroma desagradável; reduzir a higroscopicidade, etc.; (ii) melhorar a estabilidade química – diminuição da perda por evaporação de compostos voláteis; proteger contra a oxidação pelo ar; reduzir a sensibilidade à luz, ao calor, aos ácidos gástricos, etc.; (iii) melhor a biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade - aumento da taxa de dissolução; aumento ou redução dos níveis do fármaco na corrente sanguínea; liberação controlada do princípio ativo; (iv) formulação de injeções, soluções oculares, etc. - preparação de soluções de fármacos insolúveis em água sem solventes orgânicos; redução dos efeitos colaterais, irritações locais ou efeitos hemolíticos; e (v) comprimidos - fácil dissolução do comprimido na água (SZEJTLI, 1988; DUCHÊNE, 1988).

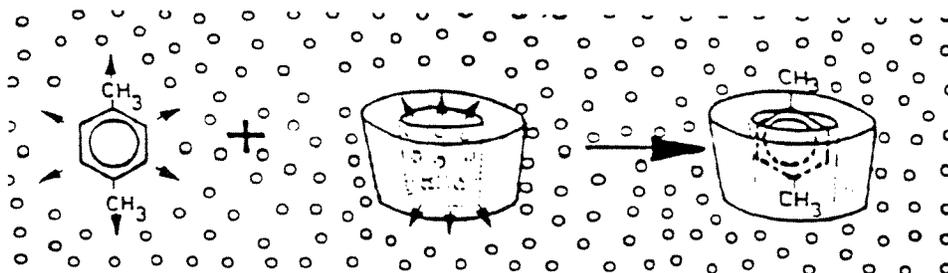


Figura 7 - Representação esquemática da formação do complexo de inclusão na ciclodextrina. A molécula hóspede é o p-Xileno e os pequenos círculos representam as moléculas de água (SZEJTLLI, 1988).

Das três formas de CD obtidas pela enzima CGTase, a mais utilizada comercialmente é a  $\beta$ -CD, pela facilidade de obtenção em forma pura devido à sua baixa solubilidade. A  $\alpha$  e a  $\gamma$ -CD por serem mais solúveis exigem processos de separação e purificação mais complexos.

Para aplicações na forma de complexos de inclusão com moléculas de maior tamanho a  $\gamma$ -CD é a mais promissora, porém para se tornar viável sua aplicação em larga escala, seu custo de produção deve ser reduzido (FRÖMMING, 1982; DUCHÊNE, 1987; SZEJTLLI, 1988).

Estudos sobre o metabolismo, toxicidade e efeitos biológicos das CDs, tanto na forma livre como na forma complexada, foram realizados e demonstraram que: (i) as CDs são metabolizadas pela microflora presente no cólon humano; (ii) somente quantidades insignificantes de CD administrada na forma oral são absorvidas pelo trato intestinal; e, (iii) a administração parenteral da  $\alpha$  e da  $\beta$ -CDs pode causar efeitos hemolíticos e nefrotóxicos, o que restringe seu uso a baixas dosagens (SZEJTLLI, 1988).

Vários grupos de pesquisa têm destacado a potencialidade das CDs nas aplicações farmacêuticas. Por exemplo, a citotoxicidade do complexo violaceína/ $\beta$ -CD foi

significativamente reduzida em células fibroplásticas V-79 em comparação com o fármaco livre (De AZEVEDO et al., 2000) e a formação de um complexo de inclusão de um derivado de naftoquinona com  $\beta$ -CD, também reduziu a toxicidade e acentuou a atividade antitumoral (SINGH & UDUPA, 1997).

### **3.5 Modelos difusionais para a liberação controlada de medicamentos**

Expressões matemáticas têm sido derivadas para descrever as taxas de liberação de fármacos de compartimentos esféricos. GUY et al. (1982) aplicaram o modelo difusivo expresso pela lei de Fick para esferas porosas para descrever os perfis de liberação de compostos do interior de lipossomas. Foram considerados sistemas multifásicos de acordo com os experimentos conduzidos para os estudos da liberação dos compostos, nos quais foram usados sacos de diálise para a separação dos lipossomas do meio de dissolução.

Equações matemáticas foram obtidas para períodos de tempo curto e longos, considerando ou não o limite de fases, ou seja, a transferência de massa na interface da membrana de diálise.

Na Tabela 4 são apresentadas as soluções das equações diferenciais para as várias situações. Comparando os resultados obtidos pelas várias equações, os autores concluíram que para valores de  $k < 1$ , os efeitos do limite de fases são significativos. Para valores de  $k > 1$  a contribuição da cinética interfacial sobre as características de liberação dos compostos pode ser desprezada.

ELORZA et al. (1993) aplicaram as soluções obtidas por GUY et al. (1982) nas várias situações para caracterizar a liberação do composto 5-fluoracil encapsulado em lipossomas. A barreira imposta pela bicamada lipídica ao composto encapsulado, foi caracterizada pelo coeficiente de permeabilidade para lipossomas compostos de esfingomiéline e diestearoilfosfatidilcolina, pelos métodos de evaporação em fase reversa e congelamento e descongelamento seguido de extrusão em membranas de policarbonato.

Tabela 4 - Soluções para a equação diferencial da segunda lei de Fick para o modelo teórico de GUY (1982) para a taxa de liberação de fármaco de partículas esféricas com o seu limite de fases.

Equação	Aplicação
1 $M_t/M_\infty = 6\pi^{1/2}kt^{1/2}$	A. Difusão em uma esfera desconsiderando a membrana interfacial: (1) aproximação para curto período
2 $M_t/M_\infty = (1 - (6/\pi^2) \exp[-\pi^2kt])$	(2) aproximação para longo período B. Difusão de uma esfera considerando a membrana interfacial: - baixa cinética interfacial ( $k \ll 1$ )
3 $M_t/M_\infty = 3Kkt$	(3) aproximação para curto período
4 $M_t/M_\infty = (1 - \exp[-3Kkt])$	(4) aproximação para longo período

Mt - concentração de material liberado no tempo t

M∞ - concentração de material liberado no tempo infinito

## **CAPÍTULO IV**

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Nesta seção, além de apresentar os principais materiais utilizados também descreve-se a metodologia utilizada no desenvolvimento de cada análise.

#### **4.1 MATERIAL**

##### **4.1.1 Reagentes analíticos**

Os agentes terapêuticos de primeira linha de tratamento da tuberculose Pirazinamida, Isoniazida e Etambutol foram adquiridos da Sigma Chemical Company Ltd-UK (P-7136, I-3377 e E-4630), respectivamente

A  $\beta$ -CD utilizada como padrão foi a fornecida pela Sigma Chemical Company Ltd-UK, lote C-4767.

Agente tamponante HEPES, os fosfolipídios Distearoilfosfatidilcolina (DSPC), Dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) e o colesterol (Col) foram fornecidos pela Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

Molibdato de amônio e Cloreto de sódio foram obtidos da ECIBRA.

Hidróxido de sódio foi obtido da Quimibrás Indústrias Químicas S.A.

Os solventes orgânicos clorofórmio e metanol e os reagentes peróxido de hidrogênio e o ácido ascórbico foram obtidos da MERCK.

Ácido sulfúrico foi obtido da Química Especializada Erich Ltda.

O etanol utilizado tinha pureza de 99,3% e a água utilizada em todos os experimentos foi bidestilada e purificada em sistema Milli-Q.

#### 4.1.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento dos ensaios foram:

- (i) - Espectrofotômetro UV-visível, marca HITACHI, modelo U-2001.
- (ii) - Cromatógrafo gasoso modelo HP 6890 – CG System.
- (iii)- Equipamento de dissolução tipo USP XXI da farmacopéia americana com agitador em forma de lâmina ou cesto rotativo.
- (iv)- Liofilizador marca YAMATO, modelo Freeze-Dryer DC41.
- (v)- Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ), modelo INOVA-500, 300 MHz.
- (vi)- Calorímetro diferencial de varredura, DU PONT, modelo 2910, acoplado a um computador modelo 9900.
- (vii)- Microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JXA - 840 com pulverizador catódico SCD 05 BAUTEC.
- (viii)- Extrusora em aço inox de 10 mL de volume, com camisa térmica para circulação de água, modelo T.001 da Lipex Biomembranes Inc.
- (ix) - Laser light scattering, Malven Autosizer, modelo 4700.
- (x) - Leitora de placas do tipo ELISA, modelo ELx 808, da Bio-Tek Instruments Inc.

#### 4.2 MÉTODOS

##### 4.2.1 Predição teórica da encapsulação dos fármacos em $\beta$ -CD

Os testes de predição teórica da encapsulação dos fármacos em  $\beta$ -CD foram desenvolvidos no Instituto de Química (IQ) da UNICAMP.

A predição teórica da capacidade de encapsulação de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD de formar complexos de inclusão com os fármacos: Pirazinamida, Isoniazida e Etambutol foi feita

pela comparação entre o tamanho equivalente da porção mais hidrofóbica dos fármacos e o tamanho da cavidade das ciclodextrinas, obtidos da literatura (SZEJTLI, 1988). O tamanho equivalente da porção mais hidrofóbica das moléculas de drogas foi determinado pelo método de “Monte Carlo” usando o programa Gaussian 94.

## **4.2.2 Caracterização dos fármacos e da $\beta$ -CD**

### **4.2.2.1 Solubilidade dos fármacos e da $\beta$ -CD**

A solubilidade dos fármacos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et), e da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) a 1 mM foi avaliada nos seguintes solventes aquosos e orgânicos: (i) água desionizada de pureza Milli-Q; (ii) tampão salino HEPES/NaCl (10 mM/120 mM), pH 7,4 e; (iii) 1-Octanol e n-Dodecano. Tais solventes foram empregados no estudo do comportamento de partição dos fármacos e da  $\beta$ -CD em sistemas solvente orgânico/solução aquosa.

Inicialmente, pesava-se a massa necessária para a preparação de cerca de 10 mL de solução de droga ou  $\beta$ -CD a 1,0 mM em cada um dos solventes mencionados. Em seguida, promovia-se a solubilização do composto sob agitação magnética (cerca de 100 rpm por 30 segundos). Quando não se observava a dissolução, as amostras eram submetidas a uma etapa de sonicação em um banho do tipo ultra-sônico à temperatura ambiente por 3 minutos. Caso o composto ainda se apresentasse insolúvel, aquecia-se em banho-maria por cerca de 3 minutos a 60 °C. Após serem realizados estes procedimentos, aguardava-se até cerca de 12 horas para observar se havia algum tipo de precipitação. O composto era considerado solúvel quando, realizados estes testes, era obtida uma solução límpida e sem resíduos sólidos depositados.

#### 4.2.2.2 Determinação dos coeficientes de partição dos fármacos e da $\beta$ -CD

Os coeficientes de partição foram determinados com base no protocolo experimental descrito por MORAES (1996). Soluções de fármacos e  $\beta$ -CD a 1mM foram preparadas em tampão HEPES (10mM)/NaCl (120 mM), pH 7,4.

Todas as soluções foram aquecidas a 30°C por cerca de 10 minutos. A seguir, uma alíquota de 2,5 mL de cada uma das soluções foi misturada em um tubo de ensaio a um volume idêntico de n-Dodecano ou de 1-Octanol previamente saturado com água desionizada, pré-equilibrados a 30°C.

Após a mistura, os tubos de ensaio foram tampados e as amostras foram homogeneizadas por inversões repetidas (30 vezes). As amostras foram incubadas a 30°C por 30 minutos, em repouso, com a finalidade de se assegurar uma boa separação de fases. Após a incubação as amostras foram, quando necessário, centrifugadas a 4.500 rpm por 3 minutos.

Amostras da fase aquosa ou da fase hidrofóbica foram coletadas e as concentrações de agentes terapêuticos e  $\beta$ -CD foram determinadas por espectrofotometria na fase onde o composto apresentava maior solubilidade. Em todas as situações, a concentração dos compostos na fase complementar foi estimada como sendo a diferença entre a quantidade originalmente adicionada ao sistema e a quantidade determinada na fase analisada. Calculou-se o coeficiente de partição, P, como a razão entre as concentrações do composto na fase hidrofóbica e na fase aquosa após a incubação.

Todos os ensaios experimentais foram realizados, no mínimo, em duplicata.

#### 4.2.3 Preparação e caracterização dos complexos de inclusão fármacos: $\beta$ -CD

Os complexos de inclusão dos fármacos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) com  $\beta$ -CD foram preparados dissolvendo-se inicialmente os fármacos (1 mM) em 10 mL de tampão salino (HEPES 10 mM/NaCl 120 mM). Em seguida, cada solução de fármaco foi adicionada à solução de  $\beta$ -CD (1 mM para Pz e Iz, e, 2 e 4 mM para Et) originando soluções com razões fármaco: $\beta$ -CD da ordem de 1:1, 1:2 e 1:4,

respectivamente. A partir daí, as soluções foram mantidas sob agitação em ambiente escuro a 25°C por 48 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram submetidas ao processo de liofilização e finalmente estocadas em dessecador. O procedimento experimental para a preparação dos complexos de inclusão está representado na Figura 8.

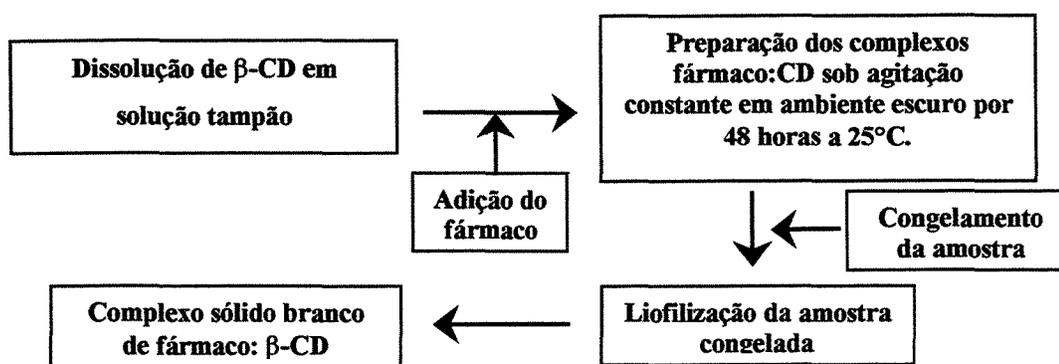


Figura 8 – Representação esquemática do procedimento experimental para a preparação dos complexos de inclusão fármaco: β-CD.

#### 4.2.3.1 Caracterização dos complexos de inclusão fármaco:β-CD

Os complexos de inclusão foram caracterizados em solução e em estado sólido. No primeiro caso, os complexos foram analisados via espectrofotometria UV/visível e ressonância magnética nuclear de prótons (<sup>1</sup>H-NMR). Em estado sólido, no entanto, utilizou-se técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (SEM).

Os testes de <sup>1</sup>H-NMR e DSC foram realizados no Instituto de Química (IQ), ao passo que, os testes de SEM foram feitos na Faculdade de Engenharia Mecânica, ambos da UNICAMP. Os demais testes desta etapa foram desenvolvidos no Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química (DPB/FEQ) da UNICAMP.

### **a) Espectrofotometria UV/visível**

A técnica de espectrofotometria UV/visível foi usada para o acompanhamento da cinética de complexação dos fármacos Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) em  $\beta$ -CD.

Soluções contendo 1mM de fármaco, Pz e Iz, foram preparadas e adicionadas à solução de  $\beta$ -CD (1, 4, 8 e 12 mM) sob agitação a 25°C por 48 horas. Aliquotas de 1 mL foram retiradas, diluídas e analisadas a 260 nm usando espectrofotômetro UV/visível. Como branco uma solução contendo  $\beta$ -CD na mesma concentração foi usada, uma vez que as ciclodextrinas não apresentam absorção neste comprimento de onda. A inclusão do fármaco na cavidade da ciclodextrina produz um aumento de intensidade de coeficiente molar de extinção de luz no sistema permitindo acompanhamento da cinética de formação dos complexos de inclusão pela medida de absorbância das soluções em função do tempo.

### **b) Ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ )**

A ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ) foi utilizada como técnica auxiliar na confirmação da complexação dos fármacos em solução, analisando-se o deslocamento dos sinais referentes aos prótons das ciclodextrinas e dos fármacos.

Espectros de ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ) foram obtidos usando INOVA 500 conectado a um computador Aspect 3000 a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . A referência interna não foi utilizada, uma vez que a possibilidade de complexação não podia ser descartada. Um padrão externo (fosfato de sódio tribásico) dissolvido em água deuterada foi utilizado. Todas as amostras foram dissolvidas em água deuterada.

### **c) Calorimetria diferencial de varredura (DSC)**

No caso dos complexos em estado sólido, a calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi utilizada na confirmação dos complexos de inclusão.

Análises térmicas das amostras sólidas, aproximadamente 3 mg, na forma de termogramas de DSC, foram obtidos em aparelho de calorimetria diferencial de varredura da Du Pont Instruments, modelo 910, acoplado a um computador 9900, também da Du

Pont, sob as condições: a) fluxo de argônio a 100 mL/min.; b) varredura a 10°C/min.; c) faixa de aquecimento de 30 a 300°C.

#### d) Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A morfologia dos fármacos,  $\beta$ -ciclodextrina e dos seus respectivos complexos de inclusão foi caracterizada por técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM), após metalização das amostras com ouro sob alto vácuo (1,3 - 10 mPa), utilizando microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JIA - 840 com pulverizador catódico SCD 05 BAUTEC.

#### e) Estudos de dissolução em meio aquoso

Os estudos de dissolução de comprimidos contendo os fármacos livres e os complexos de inclusão foram conduzidos para avaliação da biodisponibilidade dos fármacos.

Comprimidos de cerca de 350 mg (faces retas 13 mm de diâmetro) foram obtidos por compressão direta de determinada quantidade de fármacos livres ou dos respectivos complexos a 1000 kgf/cm<sup>2</sup> de pressão durante 30 segundos em prensa hidráulica da marca SHIMADZU. Lactose, amido e estearato de magnésio foram utilizados como aditivos. A composição destes comprimidos é simplificada na Tabela 5 (MICARONI, 1994).

Tabela 5 - Composição dos comprimidos utilizados nos testes de dissolução.

Composto	Pirazinamida (mg)		Isoniazida (mg)	
<b>fármaco</b>	-	10	-	10
<b>fármaco:<math>\beta</math>-CD</b>	92,2	-	82,8	-
<b>lactose</b>	180	180	180	180
<b>amido</b>	60	60	60	60
<b>estearato de</b>	30	30	30	30
<b>magnésio</b>				

Os perfis de dissolução dos comprimidos contendo o fármaco livre ou os respectivos complexos de inclusão foram obtidos utilizando um equipamento de dissolução tipo USP XXI operado a  $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . O solvente utilizado foi água desionizada (200 mL) e a velocidade de rotação foi de 100 rpm. Uma representação esquemática do equipamento é mostrada na Figura 9.

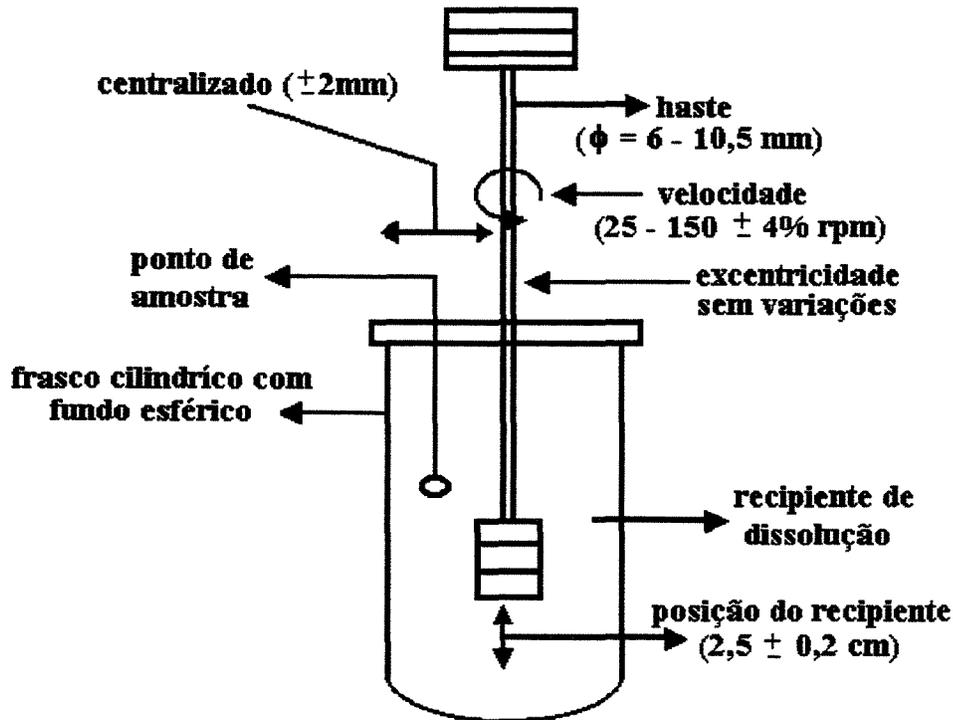


Figura 9 - Representação esquemática do equipamento utilizado nos estudos de dissolução pelo método USP (Farmacopéia americana, 1985).

Alíquotas de 4 mL de solução foram retiradas em intervalos apropriados, em seguida filtradas, e o volume retirado, imediatamente repostado com água desionizada. As amostras foram analisadas em função das concentrações dos fármacos, pelo método colorimétrico da ninhidrina para Pz e Iz usando espectrofotômetro Cary/VARIAN, modelo I-G/UV-visível (HIRAGA & KINOSHITA, 1989).

#### **f) Ensaio de fotoestabilidade e estabilidade oxidativa**

Soluções aquosas dos fármacos livres ou encapsulados em  $\beta$ -CD (1 mM) foram expostas a radiação UV a 25°C durante 4 horas. As amostras (3 mL cada) foram colocadas em cubetas de 1 x 1 x 4 cm<sup>3</sup> (1 cm de caminho óptico) e a fotodegradação das amostras foi monitorada por medidas de absorvância a 260 nm e calculadas em termos de percentual residual para cada solução.

A estabilidade dos complexos de inclusão sob condições oxidantes, foi avaliada também por medidas de absorvância após dissolução em solução aquosa de peróxido de hidrogênio 6% p/v e submetendo-se à luz natural por 48 horas.

#### **4.2.4 Síntese do DMPE-PEG para modificação da superfície de lipossomas**

A busca de preparações mais estáveis levou ao desenvolvimento de lipossomas com a superfície modificada pela conjugação covalente de cadeias de polietilenoglicol (PEG). Lipossomas modificados com PEG, designados como "Stealth", são capazes de evitar a captura pelo sistema retículo endotelial, e permanecerem na circulação por um maior período de tempo, comparados aos lipossomas convencionais (ALLEN et al., 1991; BLUME & CEVC, 1993). O polietilenoglicol, de peso molecular 2000, foi acoplado aos lipossomas convencionais por meio do fosfolípido DMPE, via rota química, usando carbonildiimidazol (CDz) como agente de ligação.

O procedimento usado, baseou-se na patente americana 5.013.556 de 7 de maio de 1991, com modificações introduzidas por RIBAS (1997).

A Figura 10 apresenta um esquema da rota catalítica de preparação do composto derivatizado DMPE-PEG, usando carbonildiimidazol como agente de ligação e trietilamina como catalisador.

A síntese é dividida em duas etapas: na primeira é feito o acoplamento do PEG ao CDz obtendo-se o composto intermediário carbonildiimidazol-polietilenoglicol metil éter, PEG-CDz. Na segunda etapa, o PEG-CDz é acoplado ao DMPE, pela perda de um dos hidrogênios do grupo amina da molécula de DMPE, formando o composto desejado, dimiristoilfosfatidiletanolamina de polietilenoglicol, designado como DMPE-PEG.

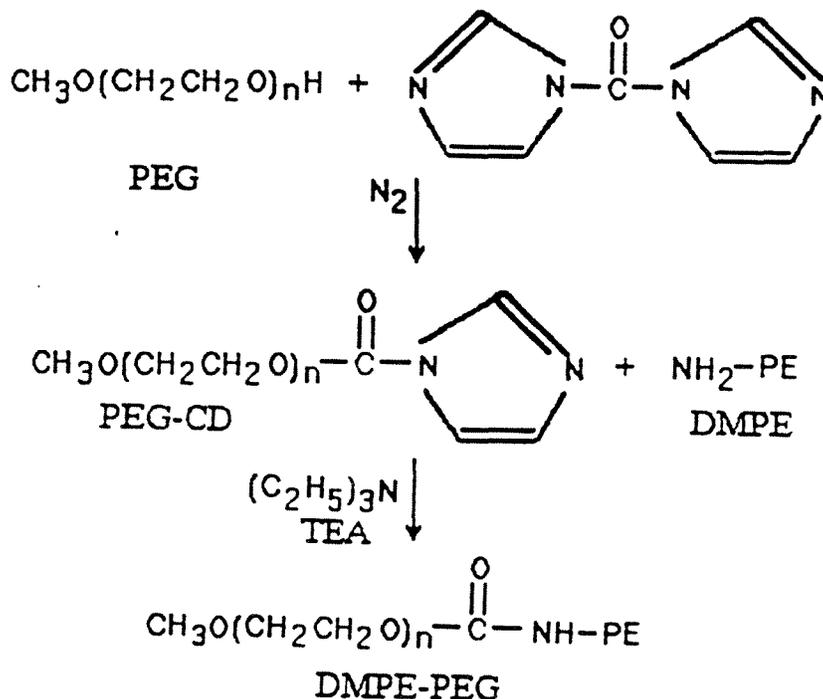


Figura 10 - Rota de síntese do DMPE-PEG.

#### 4.2.4.1 Primeira etapa - formação do intermediário

Inicialmente o polietilenoglicol (PEG<sub>2000</sub>) foi pesado em erlenmeyer com tampa esmerilhada em quantidade correspondente a 0,5 mmol, purgando-se em seguida o frasco com nitrogênio para diminuir o contato com o ar atmosférico para evitar a desativação do carbonildiimidazol.

Para a reação, dissolveu-se o PEG<sub>2000</sub> em benzeno a uma concentração de cerca de 100 µmol/mL. Quando necessário, aqueceu-se a 50 °C para uma dissolução mais efetiva. O CDz foi pesado em frasco com tampa e previamente purgado com nitrogênio como no caso anterior. Em seguida foi adicionado à solução de PEG em benzeno, e o recipiente contendo a mistura foi em seguida purgado com nitrogênio procedendo-se o aquecimento a 50 °C para completa solubilização do CDz.

Esta mistura, na proporção molar de 1,1:1 de PEG:CDz, foi em seguida transferida para microrreatores de vidro de parede grossa, com um volume útil de aproximadamente 1,5 mL por frasco. Os reatores foram purgados com nitrogênio e levados a uma placa de aquecimento a 75 °C por 16 horas, dispostos em um suporte metálico para uniformizar a distribuição de calor. Após 12 horas de reação, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente, e finalmente, estocada em refrigerador como solução do intermediário PEG-CDz.

#### **4.2.4.2 Segunda etapa - preparação do DMPE-PEG**

Na segunda etapa da reação, transferiu-se a quantidade de intermediário correspondente a 0,5 mmol para um balão de fundo redondo de 50 mL acoplado a evaporador rotatório, para a remoção do solvente. Em seguida, adicionou-se a quantidade desejada de DMPE, dissolvido previamente em clorofórmio, na proporção molar de 2:1 de intermediário e DMPE, respectivamente. O clorofórmio foi removido sob vácuo em evaporador rotatório, sendo em seguida adicionados 2 mL de benzeno desidratado e trietilamina (TEA) na proporção molar 1:1 de TEA:DMPE. A solução resultante foi homogeneizada e transferida para reatores de parede grossa para que fosse efetuada a segunda etapa da reação na placa térmica a 95 °C por 6 horas.

Após o tempo de reação, transferiu-se a mistura reacional para um balão de fundo redondo e removeu-se o solvente sob vácuo, adicionando-se em seguida 10 mL de diclorometano. A solução resultante, contendo DMPE-PEG, DMPE e PEG que não reagiram, foi submetida ao processo de purificação.

#### **4.2.4.3 Purificação do DMPE-PEG**

A purificação do DMPE-PEG foi feita por cromatografia em coluna de vidro empacotada com sílica-gel 60 com tamanho de partícula de 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh ASTM); inicialmente lavada com diclorometano.

Para iniciar a purificação, aplicou-se lentamente a solução de DMPE-PEG em diclorometano no topo da coluna, de modo a permitir a formação de uma banda bem

definida, e em seguida iniciou-se a passagem do gradiente de solventes listados na Tabela 6.

Durante a passagem dos solventes pela coluna cromatográfica foram coletadas frações eluídas de aproximadamente 50 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotatório até um volume final de aproximadamente 5 mL. As frações concentradas foram analisadas por cromatografia de camada delgada para a identificação das frações contendo o DMPE-PEG purificado.

As frações contendo o DMPE-PEG purificado foram então misturadas em um balão e levadas ao evaporador rotatório, onde todo o solvente foi removido sob vácuo. Adicionou-se 5 mL de benzeno no balão obtendo-se neste ponto uma solução de DMPE-PEG em benzeno a qual foi posteriormente liofilizada e estocada.

Tabela 6 - Gradiente de solventes usados na purificação do DMPE-PEG<sub>2000</sub>.

Volume (mL)	Volume % de diclorometano	Volume % de metanol com 2% de ácido acético
100	100	0
200	95	5
200	90	10
200	85	15
200	60	40

#### 4.2.4.4 Caracterização do DMPE-PEG

A caracterização do DMPE-PEG foi feita por cromatografia de camada delgada em fase reversa, comparando-se com as respectivas análises dos lipídios tomados como padrão, obtidos da Avanti Polar-Lipids Inc.

A cromatografia de camada delgada faz uso do fato de que o soluto na fase líquida orgânica (fase móvel) tem diferenças de afinidade pela fase sólida hidrofílica (fase estacionária). Diferentes lipídios percorrem diferentes distâncias com a passagem da fase móvel através do sólido (NEW, 1990). Sua identificação é baseada nas diferenças de

velocidade com que eles percorrem a placa, que é expressa em termos da altura relativa alcançada pelo lipídio, ou seja, a razão entre a distância percorrida pelo fosfolipídio e a distância percorrida pela fase móvel *R<sub>d</sub>*.

As placas de cromatografia de camada delgada em fase reversa, usadas neste trabalho, foram obtidas da Whatman (KC18 sílica gel 60 Å), no tamanho 10 x 10 cm, com 200 µm de espessura de camada.

A eluição dos compostos na placa foi feita em cuba de vidro, com uma solução de 8 mL de etanol e 2 mL de água. A câmara foi inicialmente saturada pelo embebedimento de papel de filtro com a referida solução, deixando-a tampada por 15 minutos. Inicialmente procedeu-se a limpeza da placa, com a eluição apenas do solvente até 1 cm do topo da placa. Em seguida a placa foi retirada e deixada em capela com exaustor ligado por 15 minutos para secar.

As amostras foram aplicadas na base da placa, em posições previamente marcadas, através de micro capilares (0,5; 1 e 2 µL). A placa foi novamente inserida na câmara para eluição das amostras com os solventes. Terminada a eluição, a placa foi colocada para secar na capela por 15 minutos, sendo depois borrifada com iodo metálico diluído em álcool etílico para a revelação das amostras.

#### **4.2.5 Preparação e caracterização dos compostos encapsulados em lipossomas**

##### **4.2.5.1 Preparação dos lipossomas**

A preparação dos lipossomas convencional e “Stealth” foi realizada pelo método da hidratação do filme seco de lipídios (NEW, 1990; LASIC, 1992, 1993). Os fármacos individuais na forma livre ou de complexo em β-CD, foram incorporados de forma passiva no interior das vesículas.

Os lipídios foram inicialmente pesados em balança analítica, na composição descrita na Tabela 7, de forma a se obter 10 mL de uma solução a 7,5 mM. Em seguida transferiu-se para um balão de fundo redondo de 50 mL, no qual adicionou-se 10 mL de

uma solução de clorofórmio/metanol (9:1 v/v) para a solubilização dos lipídios. A solução foi levada ao evaporador rotatório ART LAB, modelo Fisatom 802 com apenas a rotação ligada (150 rpm) para homogeneizar a mistura por 5 minutos. A solução foi então submetida à evaporação a vácuo com o balão imerso em banho termostaticado inicialmente à temperatura ambiente por 10 minutos e depois a 65 - 70°C por mais 15 minutos com a mesma rotação. Desta forma, todo o solvente foi evaporado, havendo a formação de um filme seco de lipídios sobre as paredes do balão. Na etapa subsequente, o filme seco de lipídios foi hidratado com um volume de 10 mL de solução tampão HEPES (10 mM)/ NaCl (120 mM) e pH 7,4 ou com 10 mL de solução do composto em tampão HEPES (10 mM)/ NaCl (120 mM) e pH 7,4, quando se desejava encapsular os compostos. A hidratação do filme seco de lipídios foi feita por 30 minutos para os lipossomas convencionais por 1 hora para os “Stealth”, e com temperatura acima da temperatura de transição dos fosfolipídios para a obtenção de uma bicamada mais estável (65 - 70°C). Por este procedimento foram obtidas vesículas multilamelares de vários diâmetros, sendo necessário um tratamento posterior para torná-las unilamelares e com distribuição de tamanhos homogênea. As vesículas com os fármacos ou complexos eram ainda sonicadas por 30 minutos em banho sonicador, modelo Bransonic 2200 da Bransonic e, finalmente deixadas em repouso por cerca de 2 horas para atingirem o equilíbrio. Posteriormente, as vesículas foram submetidas a extrusão através de membranas de policarbonato com poros de 100 nm de diâmetro.

A homogeneização das vesículas foi feita em extrusora de aço inox modelo T. 001 da Lipex Biomembranes Inc., volume de 10 mL com camisa térmica para circulação de água. Foram utilizados um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato Poretics sobrepostas para extrusão. A extrusora foi conectada a um cilindro de nitrogênio, equipado com válvula redutora/reguladora de pressão, para garantir a extrusão das amostras à pressão constante de 10 kgf/cm<sup>2</sup>. Foram extrudadas amostras de 5 mL com 15 passagens pelas membranas, à temperatura de 65°C, sendo que, para cada nova passagem, a amostra permanecia em repouso por aproximadamente 3,5 minutos para que se atingisse o equilíbrio térmico (RIBAS, 1997).

Na Tabela 7 é apresentada a composição dos lipossomas preparados.

Tabela 7 - Composição dos lipossomas

LIPÍDIO	Abreviação	Convencional % molar	Modificado 3% PEG <sub>2000</sub>
Distearoilfosfatidilcolina	DSPC	40	34
Dimiristoilfosfatidiletanolamina	DMPE	20	20
Colesterol	Col.	40	43
Dimiristoilfosfatidiletanolamina/ Polietilenoglicol	DMPE-PEG	0	3

#### 4.2.5.1.1 Remoção dos fármacos e $\beta$ -CD não encapsulados em lipossomas

Após a encapsulação dos fármacos Pz, Iz e Et, e da  $\beta$ -CD nos lipossomas, testou-se a separação dos compostos não incorporados nas vesículas por duas metodologias distintas: a) cromatografia de permeação em gel e, b) ultra-filtração. Ambos os métodos baseiam-se na diferença de tamanho dos compostos os quais se deseja separar (HARRIS & ANGAL, 1989).

##### a) Remoção por cromatografia de permeação em gel

Nestes ensaios, utilizou-se uma coluna de cromatografia de permeação em gel da Sigma com dimensões de 2,4 cm de diâmetro e 40 cm de altura, que foi empacotada com aproximadamente 180 mL de Gel Sepharose CL 6B.

Inicialmente a coluna foi pré-equilibrada pela passagem de 200 mL de tampão HEPES (10 mM)/NaCl (120 mM) e pH 7,4. Em seguida, a coluna foi saturada com uma amostra de lipossomas a 7,5 mM de lipídios.

Os ensaios consistiram em adicionar 2,5 mL de amostra sob eluição simultânea do tampão. Durante o processo de separação, a coluna cromatográfica foi conectada a um coletor de frações modelo Bio-Rad 2110, onde coletou-se alíquotas de 4 mL (aproximadamente 100 gotas) que posteriormente foram analisadas para determinação da concentração de lipídios, fármacos e  $\beta$ -CD.

### **b) Remoção por ultra-filtração**

A exemplo do método anterior, a separação por ultrafiltração foi utilizada para remover os solutos não encapsulados de baixo peso molecular. Neste ensaio, utilizou-se uma célula de ultra-filtração da AMICON, modelo 50 com membrana de polietileno tipo XM 50, com diâmetro de corte 50.000 Da.

Para todos os ensaios, cerca de 3 mL de amostra contendo lipossomas e composto não encapsulado foram adicionados a um volume de 50 mL de tampão salino (HEPES 10 mM/ NaCl 120 mM). As filtrações eram feitas à pressão de 1,5 kgf/cm<sup>3</sup> usando nitrogênio. Em cada ciclo eram retirados 40 mL de solução, e o volume completado a 50 mL com o tampão salino citado. A separação do material não encapsulado foi acompanhada por medidas de absorvância das soluções de filtrado. O processo foi interrompido quando a concentração do fármaco no filtrado foi menor que 1% da concentração inicial.

#### **4.2.5.2 Caracterização dos lipossomas**

Após a remoção do material não encapsulado, os lipossomas foram caracterizados quanto à: a) Concentração de lipídios; b) Concentração de material encapsulado; c) Distribuição de tamanho e diâmetro médio das vesículas; d) Estabilidade das vesículas em tensoativo não-iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>; e, e) Estabilidade de estocagem dos lipossomas.

##### **a) Concentração de lipídios**

A determinação da concentração de lipídios foi feita baseada no método de CHEN et al. (1956) com modificações introduzidas nos trabalhos do grupo (MORAES, 1996 e RIBAS, 1997). O método consiste na oxidação com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dos compostos de carbono (a porção lipídica do fosfolipídio) a carbono elementar, que é transformado em dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O fosfato livre é transformado em ortofosfato, que forma um complexo com molibdato de amônio. Quando este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico há o aparecimento da cor azul cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato na amostra. O mesmo procedimento é feito para soluções padrão com concentração conhecida de fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O a 0,27;

0,54; 1,07 e 2,68 mM), de lipídio (DSPC a 0,39; 0,78 e 1,95 mM) e para solução isenta de fosfato (branco). A concentração de fosfato nas amostras é determinada a partir da curva de calibração previamente construída.

O experimento foi conduzido da seguinte forma: inicialmente toda a vidraria foi lavada com detergente livre de fosfato. Pipetou-se 100 µL de solução em cada tubo de ensaio (amostras, padrões e branco) juntamente com 500 µL de ácido sulfúrico 10 N. Adicionou-se duas esferas de vidro em cada tubo de ensaio para melhorar a distribuição de calor durante o aquecimento. Os tubos foram colocados em suporte metálico e aquecidos em placa térmica a 200 °C por 30 minutos. Retirou-se os tubos do aquecimento e após atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 165 µL de peróxido de hidrogênio isento de fosfato, em cada um dos tubos, para serem aquecidos novamente a 200 °C por mais 30 minutos. A placa de aquecimento foi posicionada no interior de uma capela pois nesta etapa há formação de dióxido de carbono que deve ser retirado pelo exaustor. Após o aquecimento os tubos foram retirados e após atingirem a temperatura ambiente adicionou-se 4 mL de tampão HEPES (10 mM)/NaCl (120 mM), pH 7,4, 500 µL de uma solução de molibdato ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O) e 500 µL de uma solução 8% de ácido ascórbico (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>). Os tubos foram aquecidos em água fervente por 7 minutos, promovendo o aparecimento da cor azul, em seguida foram resfriados, e a intensidade da cor medida espectrofotometricamente a 750 nm.

A partir dos padrões utilizados foi obtida uma curva de calibração para a determinação da concentração de fosfolípidios da amostra. A concentração dos fosfolípidios distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) foi calculada considerando que esses lipídios representam 60% da concentração total de lipídios em lipossomas convencionais e 57% dos “Stealth”.

#### **b) Concentração dos fármacos encapsulados**

Os fármacos encapsulados foram determinados a partir da concentração após o rompimento das vesículas com etanol. No caso dos fármacos Pz e Iz nas formas livres ou na forma de complexos em β-CD, as soluções obtidas após o rompimento das vesículas

eram adequadas para se fazer determinações espectrofotométricas diretas, dado ao coeficiente de extinção molar alto desses compostos.

Para o caso particular do Et, três métodos colorimétricos foram testados: azul de bromotimol (STRAUSS & ERHARDT, 1970), ácido pícrico e diclorofenol indofenol (MAHROUS, 1992), porém nenhum dos métodos mostrou sensibilidade para a quantificação precisa, o que levou à utilização de técnicas mais sofisticadas, como a de eletroforese capilar e cromatografia gasosa.

A determinação do Et por eletroforese capilar demonstrou sensibilidade apenas para concentrações da ordem de 10 mM, o que era inviável para o processo. A partir daí, foi feito um estudo minucioso da técnica de cromatografia gasosa e, mais uma vez, observou-se que em termos quantitativos a determinação foi insatisfatória. Estas dificuldades limitaram a utilização do Et nos ensaios de encapsulação, prosseguindo os experimentos apenas com os fármacos Pz e Iz, e seus complexos em  $\beta$ -CD.

O método de rompimento das vesículas com etanol consistiu em adicionar um volume de 150  $\mu$ L dos lipossomas encapsulando os compostos livres ou complexados em  $\beta$ -CD a 1350  $\mu$ L de etanol. Em seguida, as soluções eram deixadas em repouso por duas horas e, a partir daí, eram determinadas as absorbâncias dos fármacos livres e dos seus complexos. As determinações de Pz e Iz nas formas livres e complexadas em  $\beta$ -CD foram feitas a 260 nm, sempre em duplicata.

A eficiência de encapsulação foi determinada pela relação percentual entre a razão molar fármaco livre/lipídio ou fármaco: $\beta$ -CD/lipídio (F ou F: $\beta$ -CD/lipídio) final e inicial, de acordo com a equação (2):

$$E = 100 \times \left( \frac{(\text{moles F ou F : } \beta - \text{CD/moles Lip.})_{\text{final}}}{(\text{moles F ou F : } \beta - \text{CD/moles Lip.})_{\text{inicial}}} \right) \quad (2)$$

**c) Distribuição de tamanhos e diâmetro médio das vesículas**

A distribuição de tamanhos e o diâmetro médio das vesículas foram determinados por espectroscopia de espalhamento de luz de alta frequência obtida por incidência de raios laser (“quasi-elastic light scattering”, QLS) em equipamento de detecção de espectro Malven Autosizer modelo 4700. Esta técnica baseia-se na dependência das flutuações de intensidade de espalhamento de luz em função do tempo para a determinação do coeficiente de difusão em solução diluída (FORD, 1985). Para partículas esféricas em movimento Browniano, o raio hidrodinâmico médio,  $R_h$ , pode ser determinado pela relação de Stokes-Einstein, segundo a equação (3):

$$R_h = \frac{k T}{6\pi D \mu} \quad (3)$$

onde  $D$  o coeficiente de difusão médio da vesícula,  $k$  é a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura absoluta e  $\mu$  a viscosidade do solvente.

Alguns dos relatórios de análise de tamanho e distribuição de partículas obtidas neste trabalho são apresentados no Apêndice IV.

**d) Estabilidade das vesículas em tensoativo não-iônico  $C_{12}E_5$**

A estabilidade dos lipossomas vazios ou associados aos fármacos (F ou F: $\beta$ -CD) em presença do tensoativo não iônico  $C_{12}E_5$ , foi determinada a partir das mudanças conformacionais sofridas pelas vesículas pela ação do tensoativo, e monitoradas por meio de medidas de turbidez total das soluções a 340 nm.

As medidas de turbidez total das soluções foram feitas em placas de microtitulação de poliestireno (Corning Incorporation), com 96 poços (200  $\mu$ L) de fundo redondo a 340 nm usando leitora de placas do tipo Elisa “Microtiter plate reader”, modelo ELx808, da Bio-Tek Instruments Inc. A aquisição dos dados foi feita à temperatura ambiente em estado de pseudo-equilíbrio, 2 horas após o início da ação do tensoativo sobre as vesículas, com

agitação branda de três segundos para homogeneização antes da leitura. A cada um dos poços da placa, foram adicionados 120 µL de soluções estoque de tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub> de diferentes concentrações dissolvidos em tampão salino HEPES (10 mM)/NaCl (120 mM), pH 7,4, e 80 µL de lipossomas a 2,5 mM, de forma que após a mistura, a concentração final de lipídio fosse 1 mM em 200 µL. As soluções estoque de tensoativo foram preparadas de forma que após a mistura fossem obtidas porcentagens na faixa de 3 a 96%. A porcentagem de tensoativo nas soluções foi definida como sendo a razão entre o número de moles de tensoativo e o número de moles total de lipídios da solução, conforme equação (4) (MORAES, 1996; RIBAS, 1997, STEFFEN, 1993):

$$\% \text{ Tensoativo} = \frac{\text{moles Tensoativo}}{\text{moles Tensoativo} + \text{moles Lip.}} \times 100 \quad (4)$$

As amostras foram preparadas em triplicata e distribuídas na placa. Os valores médios de absorbâncias foram subtraídos das soluções de mesma concentração de tensoativo, isenta de lipossomas (brancos). Os brancos (br) foram constituídos por 120 µL de tensoativo e 80 µL de solução de fármaco livre ou do complexo fármaco:β-CD em substituição aos 80 µL de solução de lipossomas.

Os resultados foram analisados em termos dos perfis de absorbância em função da concentração do tensoativo.

#### **e) Estabilidade à estocagem dos lipossomas**

Lipossomas estocados a 5°C na forma de suspensão aquosa tiveram suas estabilidades avaliadas após quatro, oito e doze semanas por meio de medidas do diâmetro médio das vesículas. A manutenção do diâmetro indica que a dispersão permanece estável sem agregação das vesículas tanto para os sistemas convencionais como para os de superfície modificada com 3% PEG.

#### 4.2.6 Testes de hemólise induzida dos fármacos e dos complexos com $\beta$ -CD

Os testes de hemólise foram realizados no Laboratório de Biomembranas, do Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia da UNICAMP. Os ensaios foram feitos com suspensão de eritrócitos de rato, com os fármacos nas suas formas livres e encapsulados em  $\beta$ -CD.

##### a) Preparo da suspensão de eritrócitos

A suspensão de eritrócitos foi preparada segundo protocolo descrito por MALHEIROS et al. (1998). Utilizou-se ratos Wistar isogênicos com idade de 90 dias obtidos do Biotério Central da UNICAMP, alimentados com ração padrão, água *ad libidum*, e submetidos a jejum 18 horas antes dos experimentos. A coleta do sangue foi feita por punção cardíaca em solução anticoagulante Alsilver (citrato de sódio 0,027 M, NaCl 0,072 M, glicose 0,114 M e ácido cítrico 2,6 mM). As amostras foram centrifugadas 700 xg por 10 minutos a 4°C. O plasma, células da série branca e gorduras, foram removidas por aspiração. As células vermelhas foram suspensas em PBS 5 mM (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3mM e NaCl 0,154 M), pH 7,4, tampão de osmolaridade e pH fisiológico, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após três repetições consecutivas desse processo, obteve-se o concentrado de hemáceas que foi mantido sob refrigeração (4 °C) e usado em até dois dias.

##### b) Testes hemolíticos

A determinação da resistência à hemólise (meio isotônico) foi feita incubando-se as suspensões de eritrócitos em solução isosmótica (PBS) com diferentes concentrações de fármacos,  $\beta$ -CD e dos respectivos complexos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 1500 xg e a concentração de hemoglobina no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm.

O efeito hemolítico medido como percentual relativo de hemólise (%HE) pôde ser determinado com base na liberação da hemoglobina no sobrenadante para todos os sistemas de acordo com a equação (5):

$$\% \text{ HE} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \quad (5)$$

onde:  $A_a$ ,  $A_{c1}$  e  $A_{c2}$  são respectivamente as absorvâncias da amostra e dos controles  $C_1$  (eritrócitos em tampão, controle de hemólise mecânico) e  $C_2$  (eritrócitos em  $H_2O$ , controle de 100% de hemólise) a 540 nm.

#### 4.2.7 Suscetibilidade bacteriana às formulações em $\beta$ -CD e lipossomas.

Os testes de suscetibilidade bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis* foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica, Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Foram usadas três cepas do *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP, catalogados como 315/98, 549/98 e 2087/98. Os fármacos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) foram avaliados utilizando-se o método indireto de suscetibilidade de fármaco a partir de subculturas de três culturas primárias como inóculo (VESPAL, 1981; STRONG, 1981). O objetivo deste ensaio foi comparar o crescimento das linhagens na presença dos fármacos nas formas livre ou complexada em  $\beta$ -CD e encapsulada em lipossomas.

##### a) Preparação do inóculo

Inicialmente o meio de cultura foi preparado adicionando-se 1 mL de Tween 80 em 50 mL de água destilada. A solução foi então autoclavada por 15 minutos a 121 °C, e finalmente, adicionou-se 2,5g de albumina bovina (BSA) (solução A). Para a preparação dos três inóculos estoque, 10 mL/tubo do meio de cultura (solução A) foi distribuído em tubos de ensaio (1 tubo por cepa) e, a partir daí, transferiu-se uma porção representativa de três linhagens distintas do *Mycobacterium tuberculosis* e incubou-se por 7 dias. A concentração inicial das cepas foi acompanhada por medidas de turbidez a partir do método de McFarland nº 1 (HAWKINS et al., 1991). Decorrido o tempo de incubação, o inóculo

foi diluído em água destilada estéril (diluições:  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$ ) para finalmente ser adicionado aos meios contendo os fármacos e os respectivos complexos.

Os resultados foram expressos em termos de percentagem de resistência, calculados como a razão multiplicada por 100, entre o número de colônias/mL presentes nos tubos contendo os fármacos livres, complexados em  $\beta$ -CD, ou encapsulados em lipossomas, e o número de colônias nos tubos de controle. Alta resistência foi caracterizada quando o número de colônias foi maior ou aproximadamente 100 e, alta sensibilidade quando o número de colônias foi menor que cinco.

#### **b) Preparação dos fármacos e dos complexos**

Os fármacos testados foram Pz, Iz e Et, os respectivos complexos com  $\beta$ -CD, e as preparações Pz e Iz em lipossomas convencional e “Stealth”. Todas as preparações foram esterilizadas por filtração com membrana filtrante de 0,22  $\mu$ m (Millipore) antes de serem adicionadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio Löweistein-Jensen. As concentrações finais dos fármacos livres e dos respectivos complexos foram respectivamente: Pz (20  $\mu$ g/mL), Iz (1  $\mu$ g/mL) e Et (4 mg/mL); as razões molares para os complexos fármaco: $\beta$ -CD foram da ordem de 1:1 para Pz e Iz, e 1:4 para Et. Para as preparações em lipossomas os fármacos testados foram Pz e Iz, cujas razões finais fármaco/lipídio era proporcional às concentrações dos fármacos livres. Para cada fármaco ou complexo, foram utilizados no mínimo duplicatas de ensaio, e o material utilizado (tubos de ensaio, ponteiras, pipetas, etc.) foi previamente esterilizado. A parte prática do experimento foi realizada em capela de segurança biológica BII.

Essas concentrações de fármacos foram selecionadas com base na faixa inibitória sugerida pelo método, onde tomou-se como referência os valores intermediários de cada fármaco. A Tabela 8 mostra a faixa de concentração mínima inibitória dos fármacos Pz, Iz e Et em meio Löwenstein-Jensen (VESPAL, 1981)

Tabela 8 - Faixa de concentração mínima inibitória dos fármacos Pz, Iz e Et em meio Löwenstein-Jensen (adaptado de VESPAL, 1981).

Fármaco	Meio
	Löwenstein-Jensen ( $\mu\text{g/mL}$ )
Pz	18 - 22
Iz	0,05 - 1,5
Et	2,0 - 6,0

### c) Preparação do meio de cultura

O meio de Löwenstein-Jensen (L-J) desidratado foi obtido comercialmente e preparado segundo as especificações do fabricante e esterilizado à temperatura de 121°C durante 15 minutos, em balões de vidro de 2000mL. Após o resfriamento à 50°C, foi adicionado asseticamente 1000mL de uma suspensão de ovos inteiros. Os ovos foram obtidos de fornecedores que não utilizam hormônios e antibióticos como elementos da ração. Os ovos foram lavados um a um por escovação com água e sabão, enxaguados em água corrente e imersos em álcool 70% durante 15 minutos. A suspensão de ovos foi filtrada em gaze estéril. Para acrescentar os fármacos livres e os respectivos complexos em  $\beta$ -CD, lipossoma convencional e “Stealth” previamente preparados nas concentrações desejadas e esterilizados por filtração, foram misturados ao meio de cultura com auxílio de uma micropipeta. O momento ideal de se misturar os fármacos ao meio de cultura é após a mistura da suspensão de ovos. A suspensão foi homogeneizada por agitação em batedeira doméstica, com as pás esterilizadas.

Em seguida foram distribuídas em alíquotas de 8mL de meio em tubos de ensaio de vidro de 15 x 150 mm, estéreis e colocados no inspissador (banho de areia com temperatura controlada) à temperatura úmida de 85°C durante 50 minutos. Após o controle de qualidade, os meios foram utilizados.

Para a prova de suscetibilidade aos tuberculostáticos foi usada a metodologia do método indireto das proporções (CANETTI & GROSSET, 1964)

Para determinar a proporção de resistência, foi usado o número de colônias maduras do controle (L-J sem fármacos) e o número de colônias maduras do meio contendo fármacos. O inóculo foi preparado a partir do crescimento em sólido L-J:

- a. Remover aproximadamente 2 - 5mg do crescimento bacteriano em meio L-J;
- b. Transferir para um tubo de ensaio estéril de 16 x 125 mm com tampa de rosca contendo 6 a 8 pérolas de vidro de 1-2 mm de diâmetro e 3 mL de meio líquido de Tween-albumina;
- c. Homogeneizar os tubos em vórtex de 1 a 2 minutos;
- d. Deixar o tubo em repouso para que as partículas se sedimentem. Remover o sobrenadante e ajustar a densidade aproximadamente ao tubo n° 1 da escala de MacFarland, com água destilada estéril ou salina;
- e. Fazer as diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  com o inóculo em água destilada ou salina estéreis;
- d. Com pipeta Pasteur de 1 mL estéril e descartável, inocular três gotas do inóculo diluído nos controles e nos tubos com os fármacos.
- e. Fazer movimentos circulares para que o inóculo se espalhe pela superfície do meio de cultura;
- f. Incubar a 35 - 37 °C.
- g. Fazer a leitura após 3 semanas;
- h. Contar o número de colônias em todos os tubos e fazer o cálculo da resistência como descrito anteriormente.

#### **4.2.8 Estudo de liberação dos fármacos *in vitro* nos vários tipos de lipossomas**

A liberação da Pz, Iz e dos respectivos complexos em  $\beta$ -CD foi estudada pela imersão dos compostos em solução. A força motriz para a liberação é a diluição produzida pelo meio ao qual os lipossomas são expostos. O procedimento experimental e análise dos dados baseou-se no trabalho de SAVOLAINEN et al. (1997).

Para os experimentos de liberação dos fármacos livre ou complexados em  $\beta$ -CD, alíquotas de 3 mL de suspensão fármaco:lipossoma ou complexo:lipossoma, foram colocadas em bolsas de diálise Inlab (tipo envelope), com diâmetro de corte de 20 kDa.

As membranas foram previamente colocadas em água fervente por 30 minutos. Após o término da hidratação, as membranas tiveram uma de suas extremidades fechadas. Adicionou-se 3,0 mL de amostra e fechou-se o outro extremo do envelope, que foi então submerso em erlenmeyer contendo um volume de tampão que variou de 10 ou 100 vezes o volume da amostra, dependendo da razão (F/L) inicial para não ocorrer saturação da solução. Em seguida o frasco contendo a amostra em tampão foi imerso em banho termostatizado a 37 °C. Com a finalidade de homogeneizar o meio de diálise, os frascos foram agitados a 100 rpm. A liberação do composto encapsulado foi monitorada em tempos apropriados. O percentual de liberação foi calculado pela equação (6).

$$\% \text{ liberação} = (\text{Abs}_t / \text{Abs}_m) \times 100 \quad (6)$$

onde: Abs t : Absorbância no tempo t

Abs m: Absorbância máxima obtida após o rompimento da vesícula com etanol.

Os resultados experimentais para a liberação dos fármacos foram analisados considerando o modelo difusivo do composto no interior de esferas sólidas, representado pelos lipossomas, cujo detalhamento matemático é apresentado no Apêndice I.

A partir do modelo de encapsulação desenvolvido, necessita-se de um modelo de ajuste dos dados experimentais. Ao invés de se utilizar o método convencional dos mínimos quadrados, que atribui todo o erro à variável dependente e não considera a influência das incertezas das medidas experimentais, optou-se pela utilização do método da máxima verossimilhança.

#### 4.2.9 Determinação dos parâmetros do modelo de encapsulação utilizando-se o método da máxima verossimilhança.

A obtenção dos parâmetros a partir do método da máxima verossimilhança segue o modelo descrito a seguir.

Dado um conjunto de  $N$  pontos experimentais  $(X_i, Y_i)$ , que se supõe ser representado por um modelo do tipo  $F(x, y; a_1, \dots, a_p) = 0$ , o objetivo do método é a determinação dos parâmetros  $a_j$  do modelo bem como os valores médios de  $x_i$  e  $y_i$ . Assume-se que tanto a variável dependente como a independente estão sujeitas a erros experimentais de distribuição Normal e desvio padrão  $(\sigma_{x_i}, \sigma_{y_i})$ .

O ajuste é feito pela minimização da função  $S$  dada pelas equações (7) a (10):

$$S = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N [W_{x_i} \varepsilon_{x_i}^2 + W_{y_i} \varepsilon_{y_i}^2] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N [W_{x_i} (X_i - x_i)^2 + W_{y_i} (Y_i - y_i)^2] = \text{mínimo} \quad (7)$$

$$W_{x_i} = \frac{1}{\sigma_{x_i}^2} \quad i = 1, \dots, N \quad (8)$$

$$W_{y_i} = \frac{1}{\sigma_{y_i}^2} \quad i = 1, \dots, N \quad (9)$$

$$F(x_i, y_i; a_1, \dots, a_p) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (10)$$

A minimização da função  $S$ , sujeita a  $N$  restrições  $F = 0$ , requer o uso de multiplicadores de Lagrange  $\lambda_i$  (equações 11-14):

$$\left( \frac{\partial S}{\partial a_j} \right) + \sum_{i=1}^N \lambda_i \cdot \left( \frac{\partial F_i}{\partial a_j} \right) = 0 \quad j = 1, \dots, P \quad (11)$$

$$F(x_i, y_i; a_1, \dots, a_p) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (12)$$

$$\left( \frac{\partial S}{\partial x_i} \right) + \lambda_i \cdot \left( \frac{\partial F_i}{\partial x_i} \right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (13)$$

$$\left( \frac{\partial S}{\partial y_i} \right) + \lambda_i \cdot \left( \frac{\partial F_i}{\partial y_i} \right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (14)$$

Considerando  $S$  independente (explicitamente) dos parâmetros  $a_j$  :  $\left(\frac{\partial S}{\partial a_j}\right) = 0$  e considerando que cada ponto  $(x_i, y_i)$  é independente dos demais  $\left(\frac{\partial F_i}{\partial x_j} = \frac{\partial F_i}{\partial y_j} = 0, i \neq j\right)$ , o sistema de equações (11 - 14) toma a forma:

$$\sum_{i=1}^N \lambda_i \cdot \left(\frac{\partial F_i}{\partial a_j}\right) = 0 \quad j = 1, \dots, P \quad (15)$$

$$F(x_i, y_i, a_1, \dots, a_P) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (16)$$

$$-W_{y_i}(Y_i - y_i) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial y_i}\right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (17)$$

$$-W_{x_i}(X_i - x_i) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial x_i}\right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (18)$$

O sistema de equações (15 - 18) para o caso de modelos pode ser colocado na forma explícita,  $F(x, y, a_1, \dots, a_P) = y - f(x, a_1, \dots, a_P) = 0$ , reescritas tomam a forma:

$$\sum_{i=1}^N \lambda_i \cdot \left(\frac{\partial f_i}{\partial a_j}\right) = 0 \quad j = 1, \dots, P \quad (19)$$

$$y_i - f(x_i, a_1, \dots, a_P) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (20)$$

$$\varepsilon_{y_i} - \sum y_i \lambda_i = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (21)$$

$$\varepsilon_{x_i} + x_i \lambda_i \left(\frac{\partial f_i}{\partial x_i}\right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (22)$$

O sistema de equações para a determinação de funções implícitas em relação aos parâmetros (eqs. 15 - 18) ou explícitas em relação aos parâmetros (19 - 22) sempre leva à resolução de um sistema de equações não linear, nem que o modelo seja tão simples como uma reta que contenha apenas o coeficiente angular como parâmetro a ser determinado. Maiores detalhes para a determinação dos parâmetros podem ser encontrados em DRAPPER (1981).

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de melhor orientar o leitor, os Resultados e Discussão serão apresentados em 4 sessões, cada uma das quais antecedida de uma tabela que localiza os ensaios realizados, os itens onde descreveu-se a metodologia utilizada e os resultados obtidos.

As sessões descritas serão as seguintes:

- 5.1 Complexação dos fármacos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) em  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD);
- 5.2 Encapsulação e liberação dos fármacos Pz e Iz em lipossomas;
- 5.3 Associação dos complexos fármacos: $\beta$ -CD com lipossomas;
- 5.4 Testes *in vitro* de hemólise celular e atividade antimicobacteriana.

### 5.1 Complexação dos fármacos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) em $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD)

A complexação dos fármacos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) em  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD) foi estudada conforme disposição dos ensaios apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Disposição geral dos ensaios realizados para o estudo da complexação de Pz, Iz e Et em  $\beta$ -CD.

ENSAIOS REALIZADOS	APRESENTAÇÃO DO ENSAIO NO ITEM
<b>Predição teórica da encapsulação dos fármacos em <math>\beta</math>-CD</b>	Metodologia - 4.2.1
	Resultados - 5.1.1
<b>Caracterização dos fármacos e da <math>\beta</math>-CD</b>	Metodologia - 4.2.2
	Resultados - 5.1.2
<b>Caracterização dos complexos de inclusão fármaco:<math>\beta</math>-CD</b>	Metodologia - 4.2.3
	Resultados - 5.1.3

#### 5.1.1 Predição teórica da encapsulação dos fármacos em $\beta$ -Ciclodextrina

Antes da realização dos experimentos de complexação foi feita uma predição teórica da capacidade das ciclodextrinas dos tipos  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD em formar os complexos de inclusão com os fármacos Pz, Iz e Et. Essa predição teórica foi feita pela comparação entre os tamanhos equivalentes dos fármacos e as dimensões da cavidade das ciclodextrinas obtidas de dados da literatura (SZEJTLI, 1988).

Inicialmente determinou-se o diâmetro de cada estrutura molecular como se fosse esférica, obtendo-se tamanhos superiores à cavidade das ciclodextrinas. A partir daí, decidiu-se por determinar o tamanho equivalente das partes mais hidrofóbicas das estruturas as quais seriam as porções mais propensas à inclusão na cavidade das ciclodextrinas. O comprimento equivalente foi definido como sendo a distância equatorial dos prótons constituintes dos grupamentos mais hidrofóbicos. Desse modo, para o

Etambutol considerou-se o grupamento  $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{OH}$ , e o anel aromático para a Pirazinamida e Isoniazida.

Na Tabela 10 são apresentados os comprimentos equivalentes obtidos para os fármacos e as dimensões da cavidade das ciclodextrinas.

Tabela 10 – Comprimentos equivalentes dos fármacos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) e as dimensões da cavidade das ciclodextrinas (SZEJTLI, 1988).

<b>Fármaco</b>	<b>Comprimento equivalente (nm)</b>	<b>Ciclodextrinas</b>	<b>Dimensão da cavidade (nm)</b>
<b>Pz</b>	0,627	$\alpha$	0,47 – 0,57
<b>Iz</b>	0,613	$\beta$	0,60 – 0,78
<b>Et</b>	0,561	$\gamma$	0,75 – 0,95

Comparando os valores apresentados na Tabela 10, pode-se prever, com base no ajuste geométrico, que a  $\beta$ -CD apresenta a melhor capacidade para inclusão das porções mais hidrofóbicas dos fármacos Pz, Iz e Et.

A Figura 11 mostra as prováveis estruturas dos complexos de inclusão dos fármacos em  $\beta$ -CD.

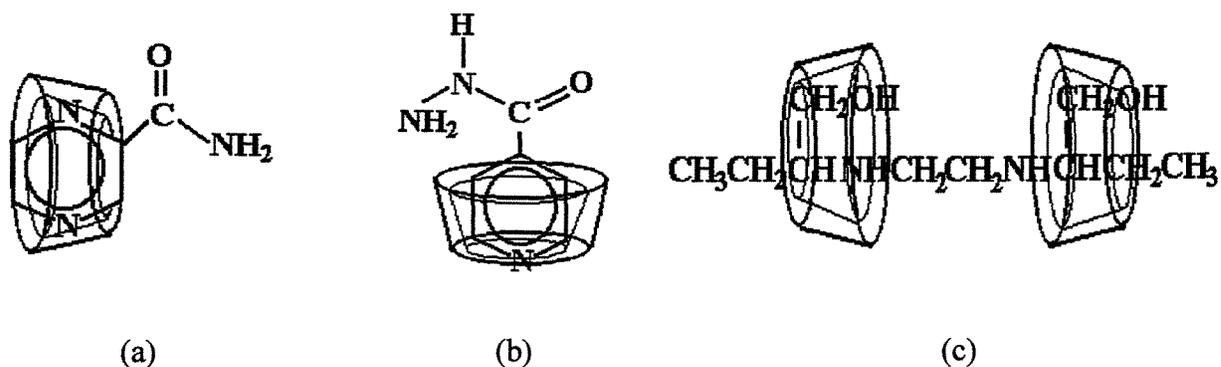


Figura 11 – Estruturas propostas para os complexos de inclusão: Pirazinamida (a), Isoniazida (b) e Etambutol (c) em  $\beta$ -Ciclodextrina.

## 5.1.2 Caracterização dos fármacos e da $\beta$ -CD

### 5.1.2.1 Solubilidade em meios aquosos

A solubilidade dos compostos Pz, Iz, Et e  $\beta$ -CD, foi determinada a 25°C em solução tampão HEPES/NaCL (10 mM/120 mM), pH 7,4 e água desionizada como referência. Esse meio aquoso foi usado nas preparações dos complexos de inclusão em  $\beta$ -CD e posteriormente na preparação de lipossomas. A Tabela 11 mostra os valores de solubilidade obtidos.

Tabela 11 – Solubilidade dos fármacos e da  $\beta$ -CD em meios aquosos a 25°C.

Meio	Solubilidade em g/100 mL			
	Pz	Iz	Et	$\beta$ -CD
Água desionizada de pureza Milli-Q	2,65	14	85	1,85
Tampão HEPES 10 mM/NaCL (120 mM), pH 7,4	1,16	12	85	1,83

Os resultados obtidos foram semelhantes aos apresentados na literatura para a Pz, Iz e Et (FLOREY, 1976, 1977, 1978) e para a  $\beta$ -CD (SZEJTLI, 1988).

#### 5.1.2.2 Coeficientes de partição em sistemas hidrofóbico/hidrofílico

O conhecimento do comportamento de partição dos fármacos Pz, Iz e Et e da  $\beta$ -CD em sistemas hidrofóbico/hidrofílico, permite prever a sua capacidade de complexação em ciclodextrinas, bem como a sua localização mais provável na estrutura dos lipossomas. No primeiro caso, o meio hidrofóbico representa a cavidade das ciclodextrinas, enquanto para os lipossomas representa a bicamada lipídica.

Como fase hidrofóbica foram usados os solventes orgânicos 1-Octanol ou n-Dodecano, e como fase hidrofílica a solução tampão HEPES/NaCl 120 mM/10 mM, pH 7,4. Para todos os casos, a concentração inicial dos fármacos e  $\beta$ -CD foi da ordem de 1 mM;

A Tabela 12 apresenta os valores das concentrações obtidas nas fases orgânicas e aquosa, bem como os coeficientes de partição para os compostos Pz, Iz e  $\beta$ -CD. No caso do Etambutol, a determinação não foi possível devido a não disponibilidade de métodos de análise suficientemente sensíveis.

Os resultados mostram que para os dois sistemas hidrofóbico/hidrofílico usados, o acúmulo tanto dos fármacos Pz e Iz quanto da  $\beta$ -CD, ocorre quase que exclusivamente na fase aquosa. Os baixos valores dos coeficientes de partição obtidos indicam o caráter predominantemente hidrofílico dos compostos. Para os fármacos Pz e Iz, os resultados foram semelhantes aos obtidos por JUSTO (1999) para os mesmos sistemas. Comparando com os resultados de FLOREY (1976 e 1977), para os sistemas n-butanol/água e n-octanol/água, confirma-se o caráter predominantemente hidrofílico para a Iz e Pz no sistema n-octanol/água.

Tabela 12 – Coeficientes de partição (P) dos compostos Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) em sistemas 1-octanol ou n-dodecano/solução tampão HEPES 10 mM/NaCl 120 mM, pH 7,4.

Composto	Solvente Orgânico	$C_f^a$ (mM)	$C_f^b$ (mM)	P	Log P
Pz	1-Octanol	0,230	0,770	0,298	-0,52
	n-Dodecano	0,009	0,991	0,009	-2,04
Iz	1-Octanol	0,135	0,865	0,156	-0,80
	n-Dodecano	0,015	0,985	0,015	-1,82
$\beta$ -CD	1-Octanol	0,260	0,740	0,351	-0,45
	n-Dodecano	0,102	0,898	0,111	-0,96

$C_f^a$  – Concentração final dos compostos na fase orgânica

$C_f^b$  – Concentração final dos compostos na fase aquosa

$$P = \frac{\text{Conc. fase orgânica}}{\text{Conc. fase aquosa}}$$

Com base nestes resultados pode-se prever que a complexação dos fármacos em  $\beta$ -CD pode ser feita no meio aquoso tamponado em questão, e que os anéis aromáticos da Pz e Iz são as porções das moléculas mais propensas à inclusão na cavidade da  $\beta$ -CD, tal como as estruturas propostas na Figura 11. Para o caso da associação com lipossomas, esses resultados sugerem que o método passivo com os fármacos ou seus complexos em  $\beta$ -CD solubilizados na solução de hidratação constitui técnica adequada, e que a mais provável localização dos compostos é nos meios aquosos da estrutura dos lipossomas (no interior e na superfície).

### 5.1.3 Caracterização dos complexos de inclusão fármaco: $\beta$ -CD

Os complexos de inclusão foram caracterizados em solução e em estado sólido para identificação da capacidade hospedeira da  $\beta$ -CD para os fármacos Pz, Iz e Et. Em solução, os complexos foram analisados por espectrofotometria UV/visível e ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ), e em estado sólido utilizou-se as técnicas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (SEM).

### 5.1.3.1 Ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ )

A técnica de ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ) foi utilizada como auxiliar na caracterização dos complexos de inclusão em solução, por meio da análise dos deslocamentos de sinais referentes aos prótons dos compostos em questão (WOOD, 1977; DJEDAINÉ & PERLY, 1990; LOUKAS et al., 1995; NISHIJO et al., 1995, 1997).

Devido ao campo magnético gerado pelas estruturas, os complexos de inclusão Pz: $\beta$ -CD, Iz: $\beta$ -CD e Et: $\beta$ -CD são particularmente suscetíveis à detecção por ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ). A  $\beta$ -CD possui grupos hidroxilas primários e secundários nas regiões terminais da estrutura toroidal. Os prótons H-3 e H-5 são direcionados para o interior da cavidade da molécula, enquanto H-1, H-2 e H-4 estão localizados no seu exterior (Figura 12). Desta forma, é esperado que se a inclusão ocorrer, os prótons localizados no interior da cavidade, ou seja, H-3 e H-5 ou próximo a ela (H-6), devam ser deslocados. Alternativamente, se a associação ocorrer no exterior da estrutura toroidal, H-1, H-2 e/ou H-4 devem ser afetados.

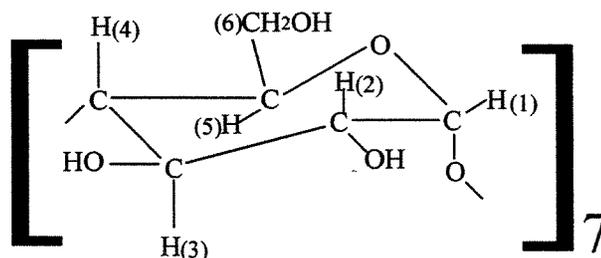


Figura 12 - Estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina e seus prótons nas respectivas posições de blindagem.

Na Tabela 13, são apresentados os resultados obtidos para o deslocamento químico dos sinais dos prótons das soluções de  $\beta$ -CD isolada e em mistura com os fármacos. Os espectros obtidos são mostrados no Apêndice II.

O efeito da complexação nos sinais obtidos dos espectros de  $^1\text{H-NMR}$  de alta resolução da  $\beta\text{-CD}$  em água  $\text{D}_2\text{O}$  pela adição de Pz, Iz e Et é evidente. Para o complexo Pz: $\beta\text{-CD}$  o sinal de H-5, cuja multiplicidade não é diretamente observada nos espectros, é deslocado de sua posição inicial para campos mais altos. Os sinais restantes, não sofrem deslocamentos significativos. Para o complexo Iz: $\beta\text{-CD}$ , o deslocamento dos sinais para campos mais altos de H-3, H-5 e H-6 são claramente observados nos espectros, o que não se observa com os outros sinais da estrutura toroidal. No caso específico do espectro da  $\beta\text{-CD}$  pela formação do complexo de inclusão com Et, percebe-se apenas um pequeno deslocamento nos prótons H-3 e H-5, sugerindo um encapsulamento parcial. Esses resultados indicam também uma maior interação entre a Iz e a cavidade da  $\beta\text{-CD}$ , comparada aos fármacos Pz e Et, sugerindo a produção de complexo mais estável entre Iz e  $\beta\text{-CD}$ .

Tabela 13 - Deslocamento químico dos sinais de prótons da  $\beta\text{-CD}$  e das soluções de Pirazinamida (Pz), Isoniazida (Iz) e Etambutol (Et) em  $\beta\text{-Ciclodextrina}$  ( $\beta\text{-CD}$ ).

Próton	$\delta$			
	$\beta\text{-CD}$ (livre)	Pz: $\beta\text{-CD}$	Iz: $\beta\text{-CD}$	Et: $\beta\text{-CD}$
H1	4,873	4,876	4,881	4,878
H2	3,463	3,464	3,463	3,472
H3	3,756	3,764	3,738*	3,738*
H4	3,384	3,390	3,390	3,385
H5	3,653	3,611*	3,591*	3,641*
H6	3,675	3,679	3,611*	3,681

\* $\delta$  prótons alterados

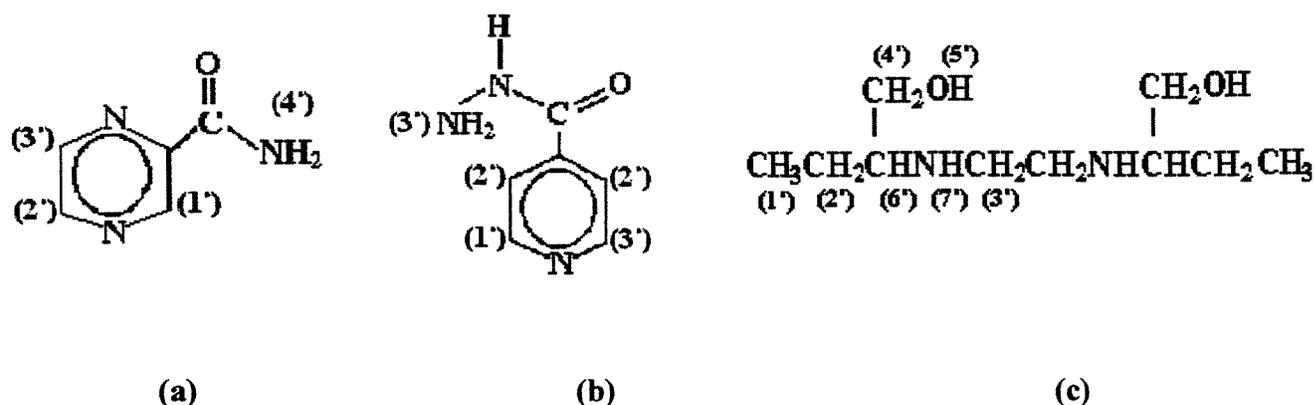


Figura 13 - Estruturas dos fármacos Pirazinamida (a), Isoniazida (b) e Etambutol (c) e seus prótons nas respectivas posições de deslocamento.

Os sinais referentes aos fármacos livres e em mistura com  $\beta$ -CD são apresentados na Tabela 14. A comparação entre a intensidade dos sinais também evidencia a formação dos complexos de inclusão para os três fármacos Pz, Iz e Et.

As estruturas químicas dos compostos Pz, Iz e Et, e os deslocamentos químicos apresentados sugerem que para a Pz e Iz há a formação de complexos de inclusão verdadeiros, nos quais os seus anéis aromáticos localizam-se no interior da cavidade da  $\beta$ -ciclodextrina e a nuvem aromática  $\pi$  provavelmente é a responsável pela blindagem dos prótons das estruturas. Para o Et o deslocamento observado nos prótons H-3, H-4, H-5, H-6 e H-7 do complexo em relação ao fármaco livre, e no próton H-5 da  $\beta$ -CD, sugere a formação parcial do complexo Et: $\beta$ -CD provavelmente por interações específicas, como por exemplo, pela formação de pontes de hidrogênio entre os prótons H-3 e/ou H-5 da  $\beta$ -CD com os grupamentos hidroxila do fármaco.

Tabela 14 - Deslocamento químico dos sinais de prótons dos fármacos livres e complexados em  $\beta$ -CD.

Próton	$\delta$ (Pirazinamida - Pz)	
	Pz (livre)	Pz: $\beta$ -CD
H1'	8,950	8,985*
H2'	8,529	8,552*
H3'	8,586	8,605*
H4'	4,626	4,605
	$\delta$ (Isoniazida - Iz)	
	Iz (livre)	Iz: $\beta$ -CD
H1'	8,392	8,495*
H2'	7,401	7,514*
H3'	4,580	4,550
	$\delta$ (Etambutol - Et)	
	Et (livre)	Et: $\beta$ -CD
H1'	0,806	0,791
H2'	1,540	1,543
H3'	3,117	3,277*
H4'	3,345	3,426*
H5'	3,345	3,426*
H6'	3,607	3,652*
H7'	3,713	3,768*

\* $\delta$  prótons alterados

### 5.1.3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de calorimetria diferencial de varredura foi utilizada para caracterização e quantificação preliminar dos complexos de inclusão em estado sólido. Vários trabalhos encontrados na literatura (LIN & KAO, 1989; ACERBI et al., 1990) têm destacado essa técnica como a mais apropriada para essa finalidade. Segundo SZEJTLI (1988) porém, uma observação deve ser ressaltada: as ciclodextrinas não apresentam ponto de fusão definido e acima de 200°C começam a se decompor. As propriedades termoanalíticas observadas

dependem de pelo menos quatro fatores: teor de água, da estrutura cristalina, taxa de aquecimento e atmosfera gasosa dos ensaios. Os termogramas de DSC representam medidas das taxas de calor envolvidas e absorvidas pela amostra durante um aquecimento programado. Em geral a complexação é verificada pelo desaparecimento do pico endotérmico característico da molécula encapsulada. Esse desaparecimento pode ser atribuído ao estado amorfo, à formação do complexo, ou a ambos (LIN & KAO, 1989; ACERBI et al., 1990). A Figura 14 mostra os termogramas de  $\beta$ -CD livre (superior), dos fármacos livres (médio) e dos complexos Pz: $\beta$ -CD, Iz: $\beta$ -CD e Et: $\beta$ -CD (inferior).

Analisando os termogramas, pode-se observar que para Pz e Iz a formação dos complexos de inclusão é evidente em ambos os sistemas pelo desaparecimento total do pico referente aos fármacos livres sugerindo inclusão completa. Para o complexo Et: $\beta$ -CD, devido à presença de um considerável pico remanescente associado ao Etambutol livre no termograma do complexo, pode-se concluir que a encapsulação foi apenas parcial.

A quantidade de fármaco livre ou encapsulado nas amostras de Etambutol foi estimada utilizando os termogramas correspondentes ao fármaco livre e complexado. Para o caso do Etambutol livre, a transição correspondente ocorreu nas temperaturas de 78,87°C e 203,58°C, consumindo 21,57 J/g e 140,2 J/g respectivamente, o que corresponde a 100% do fármaco. No termograma inferior observa-se dois picos, um relativo à temperatura de 118,74°C, interpretado como correspondente ao complexo, e um outro remanescente, com 129,9 J/g à temperatura de 220,32°C, indicativo da porção do fármaco não complexado. Das energias consumidas na transição correspondente ao Etambutol livre, calcula-se que apenas 15% do fármaco foi complexado com a  $\beta$ -CD. Termogramas obtidos com razões molares 1:2 e 1:4 Et: $\beta$ -CD, mostraram o mesmo comportamento observado para a razão molar 1:1, e não são aqui apresentados.

Esses resultados indicam a total inclusão das moléculas de Pz e Iz na cavidade da  $\beta$ -CD, e com razão estequiométrica 1:1. Para o Etambutol, a inclusão foi apenas parcial, independente da razão molar fármaco: $\beta$ -CD.

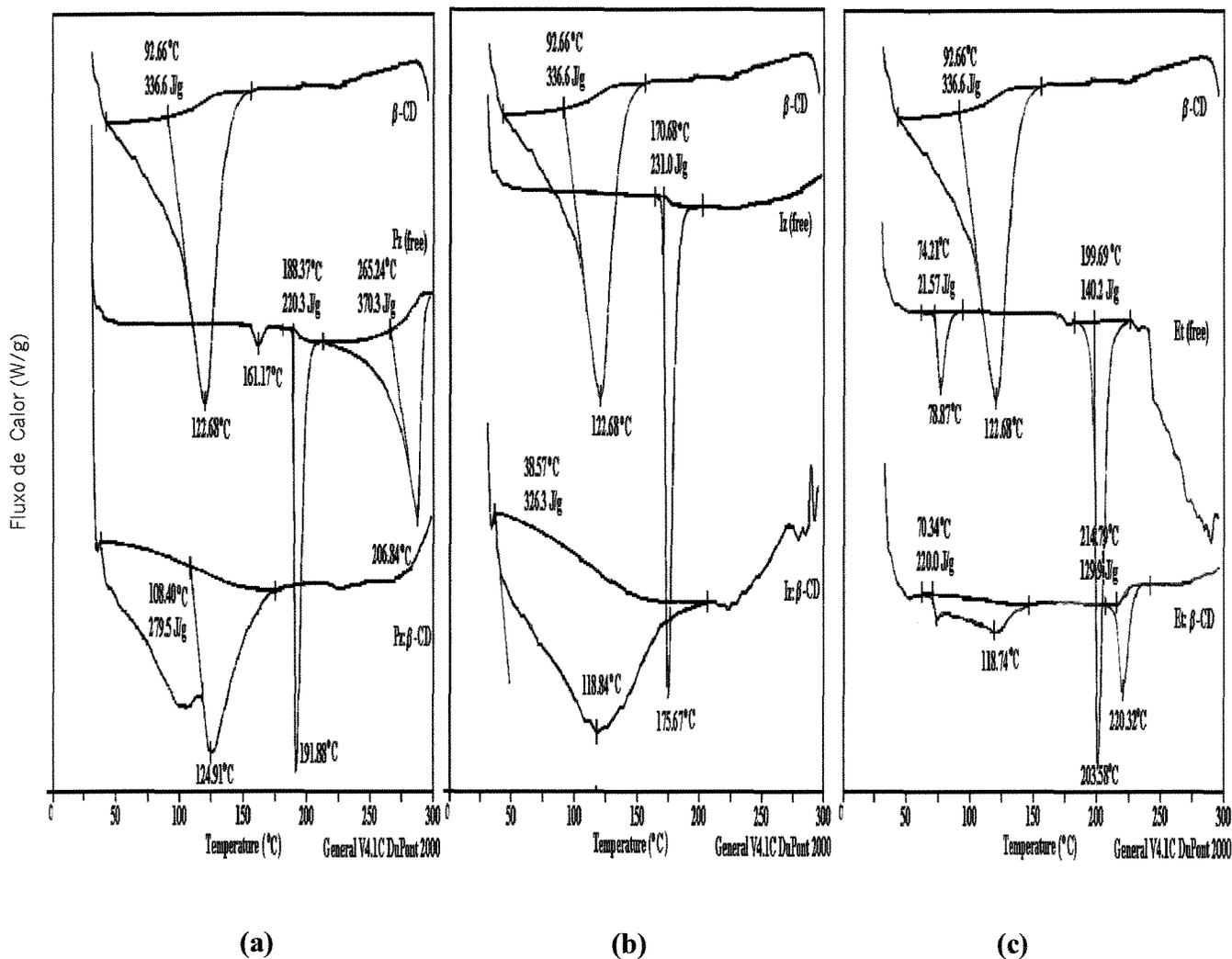


Figura 14 - Diagramas de calorimetria diferencial de varredura para  $\beta$ -CD livre (traço superior), Pz, Iz e Et livres (traço médio) e, seus respectivos complexos em  $\beta$ -CD (traço inferior). Pz (a), Iz (b) e Et (c). Razão molar fármaco: $\beta$ -CD 1:1.

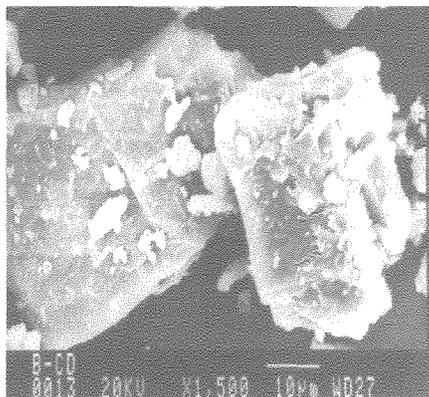
### 5.1.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A morfologia da  $\beta$ -CD, dos fármacos livres e dos seus respectivos complexos de inclusão foi também estudada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM), cujos resultados, vêm corroborar aqueles obtidos na análise de DSC.

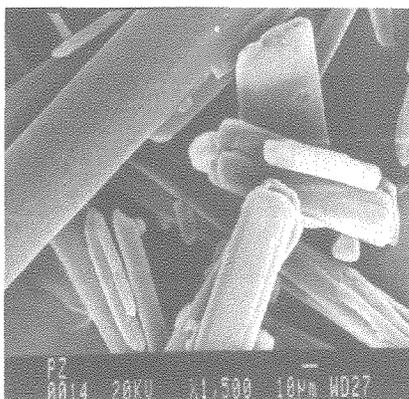
Na Figura 15 são apresentadas as micrografias obtidas por essa técnica para a  $\beta$ -CD livre (a), os fármacos livres (b,c e d) e os complexos fármaco: $\beta$ -CD (e,f e g).

Para a  $\beta$ -CD livre observa-se uma estrutura volumosa bem definida com pequenos fragmentos de cristais aderidos à superfície da estrutura. Por outro lado, em relação à morfologia dos fármacos livres percebe-se em geral estruturas cristalinas em forma de agulhas bem definidas e com uma distribuição de tamanho relativamente estreita. Finalmente, observando-se as micrografias dos três supostos complexos pode-se perceber estruturas semelhantes às obtidas para a  $\beta$ -CD livre, sugerindo a formação dos complexos de inclusão entre os fármacos e a  $\beta$ -CD.

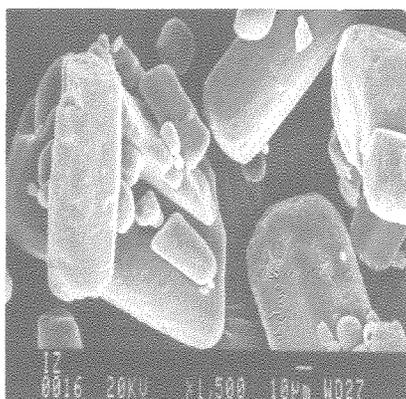
Para o caso específico do complexo Et: $\beta$ -CD, além da presença de estruturas volumosas, típicas de  $\beta$ -CD livre e dos seus complexos, pode-se observar também considerável concentração de fragmentos cristalinos, característicos dos fármacos na forma livre, sugerindo apenas a complexação parcial para o Et.



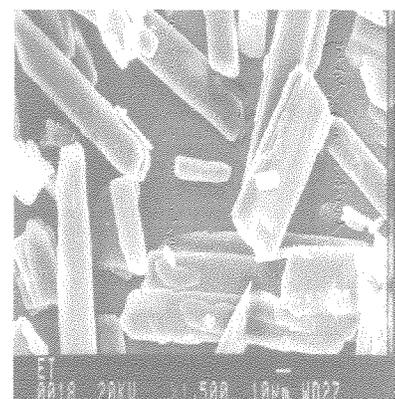
(a)



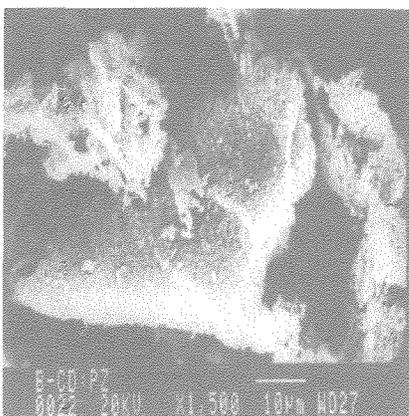
(b)



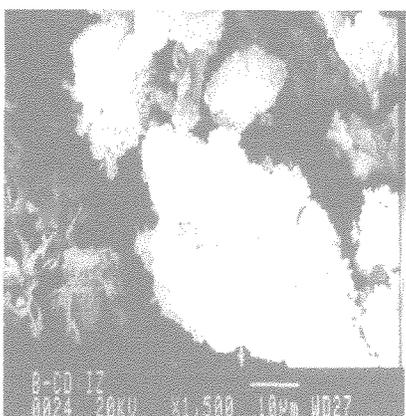
(c)



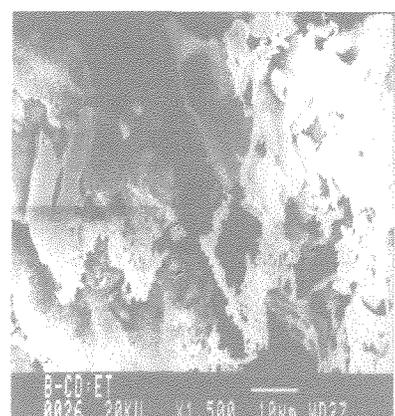
(d)



(e)



(f)



(g)

Figura 15 - Micrografia eletrônica de varredura: (a)  $\beta$ -CD livre, (b) Pz livre, (c) Iz livre, (d) Et livre, (e) Pz: $\beta$ -CD, (f) Iz: $\beta$ -CD, e (g) Et: $\beta$ -CD; aumento de 1500 vezes.

### 5.1.3.4 Espectrofotometria UV/visível

A variação da intensidade de absorção de luz das soluções de Pz e Iz em  $\beta$ -CD a 260 nm com o avanço da complexação, permitiu não somente identificar a presença dos complexos de inclusão em solução, mas também caracterizar a cinética de complexação pelos perfis de absorbância em função do tempo. Para o caso do Etambutol não houve absorção de luz significativa em toda a faixa do espectro, razão pela qual não foi monitorada a cinética de complexação deste.

Na Figura 16, são apresentados os perfis cinéticos obtidos. Embora as diferenças entre as absorbâncias com o tempo sejam pequenas, podem ser consideradas significativas devido à precisão do método. Os perfis mostram que para a Pz, a complexação foi estabilizada em 24 horas, e para a Iz em 35 horas. Em ambos os casos, a complexação foi praticamente independente da concentração de  $\beta$ -CD no meio, confirmando a razão estequiométrica 1:1, observada nos termogramas de DSC.

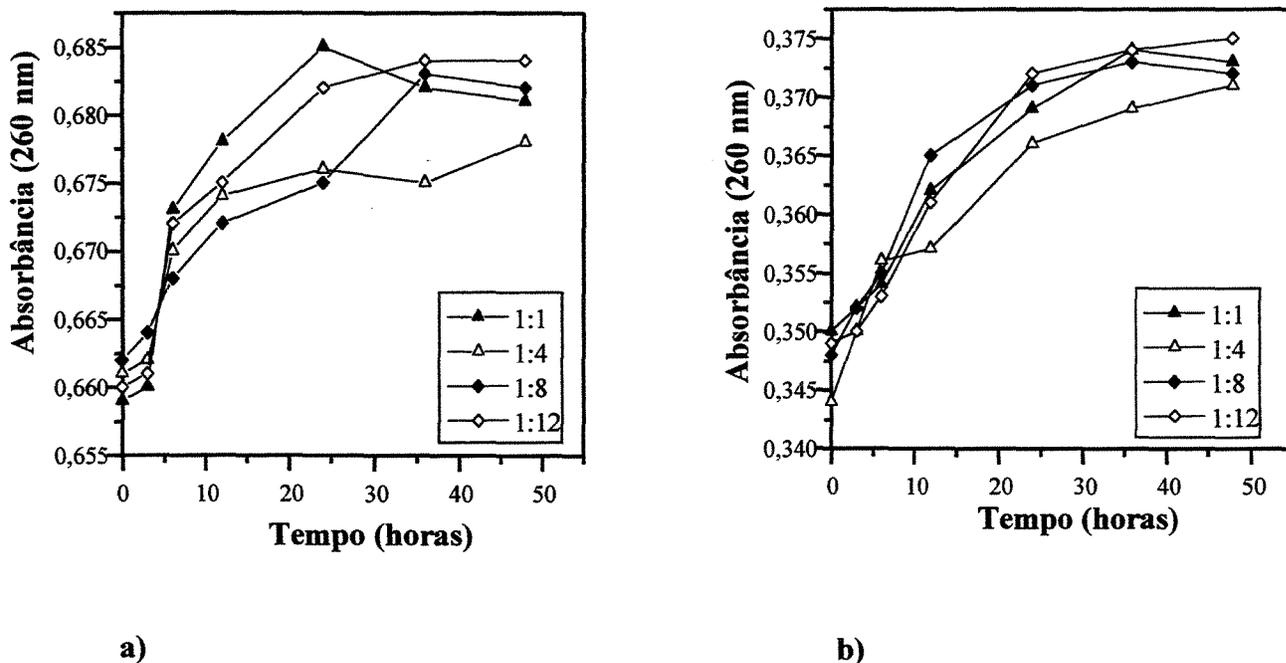
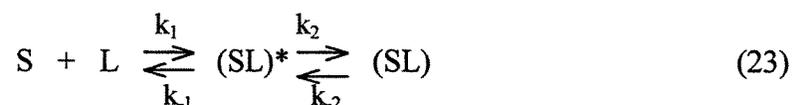


Figura 16 - Comportamento cinético da encapsulação de Pirazinamida (a) e Isoniazida (b) em  $\beta$ -CD.

### Modelo Cinético de Formação dos Complexos de Inclusão

Para representação da cinética de formação dos complexos de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) usou-se o esquema em duas etapas, proposto por CONNORS (1997), para explicar as interações entre o substrato S, o fármaco, e o ligante L, a  $\beta$ -CD.



Substrato e ligante interagem para formar o complexo intermediário  $(SL)^*$ , que rearranja-se dando origem ao complexo estável  $(SL)$ . As constantes  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_{-2}$ , são as constantes das taxas de reação diretas e inversas da primeira e segunda etapa de complexação respectivamente.

As variações das concentrações de S,  $(SL)^*$  e  $(SL)$  no sistema são descritas pelas equações diferenciais (equações 24 – 26):

$$\frac{-\partial S(t)}{\partial t} = k_1 S(t) L(t) - k_{-1} (SL)^*(t) \quad (24)$$

$$\frac{-\partial (SL)^*(t)}{\partial t} = -k_1 S(t) L(t) + k_{-1} (SL)^*(t) + k_2 (SL)^*(t) - k_{-2} (SL)(t) \quad (25)$$

$$\frac{\partial (SL)(t)}{\partial t} = k_2 (SL)^*(t) - k_{-2} (SL)(t) \quad (26)$$

Considerando as seguintes condições iniciais: para  $t = 0$ ,  $S(0) = S_0$ ,  $(SL)^*(0) = 0$ ,  $(SL)(0) = 0$ , e desde que  $-dS/dt = d(SL)/dt$ , ou  $S(t) = -(SL)(t) + k$ , a solução do sistema de equações pode ser escrita em termos de  $SL(t)$ :

$$\ln \left( \frac{(SL)(t) - (SL)_{\infty}}{(SL)_0 - (SL)_{\infty}} \right) = -k_{\text{obs}} t \quad (27)$$

onde  $(SL)_0$  é a concentração inicial do complexo,  $(SL)(t)$  a concentração do complexo no tempo  $t$  e  $(SL)_{\infty}$  representa a concentração do complexo no equilíbrio a  $t \rightarrow \infty$ .

A constante  $k_{\text{obs}}$  representa a constante de pseudo primeira ordem da complexação, definida pela equação (28).

$$k_{\text{obs}} = k_1 L + \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-2} + k_2} \quad (28)$$

Como a complexação causa um aumento na absorbância das soluções, a concentração de  $SL(t)$  é proporcional a variação da absorbância da solução,  $A(t)$ . Portanto, a equação (27) pode ser reescrita em termos de absorbâncias para o cálculo de  $k'_{\text{obs}}$ :

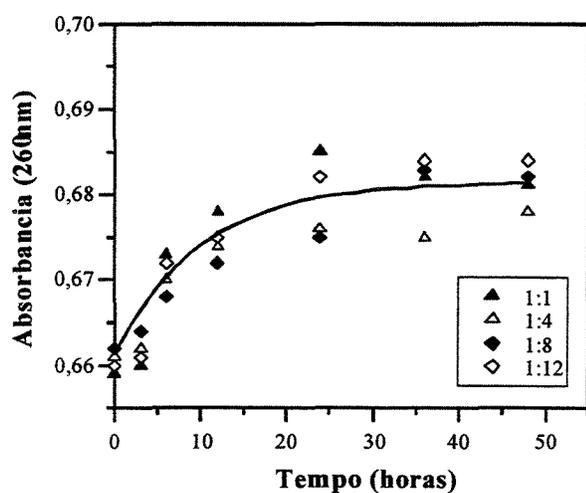
$$\ln \left( \frac{A(t) - A_{\infty}}{A_0 - A_{\infty}} \right) = -k'_{\text{obs}} t \quad (29)$$

A Figura 17 (a e b), apresenta as curvas representativas do modelo cinético e os dados experimentais obtidos para as várias razões molares fármaco: $\beta$ -CD. Pode-se observar que o modelo proposto ajusta-se bem aos dados experimentais. A complexação dos fármacos Pz e Iz na  $\beta$ -CD é um processo lento, cujo equilíbrio é alcançado em cerca de 30 h. A  $k'_{\text{obs}}$  foi determinada a partir de ajuste dos dados experimentais usando o método convencional dos mínimos quadrados.

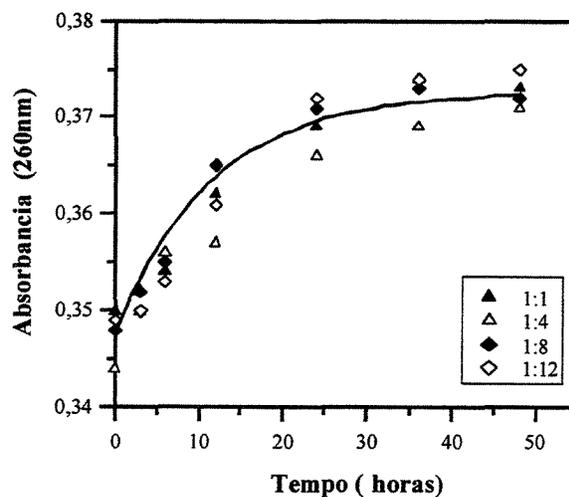
A Tabela 15 mostra os valores calculados para as constantes cinéticas,  $k'_{\text{obs}}$ , e os tempos de meia vida,  $t_{1/2}$ , obtidos para a complexação dos fármacos.

Tabela 15 - Parâmetros cinéticos para a complexação de Pz e Iz em  $\beta$ -CD: constante cinética de pseudo primeira ordem,  $k'_{obs}$ , e tempo necessário para atingir metade da saturação,  $t_{1/2}$ .

	Pz: $\beta$ -CD	Iz: $\beta$ -CD
$k'_{obs}$ (horas <sup>-1</sup> )	0,11	0,07
$t_{1/2}$ (horas)	6,33	9,34



a)



b)

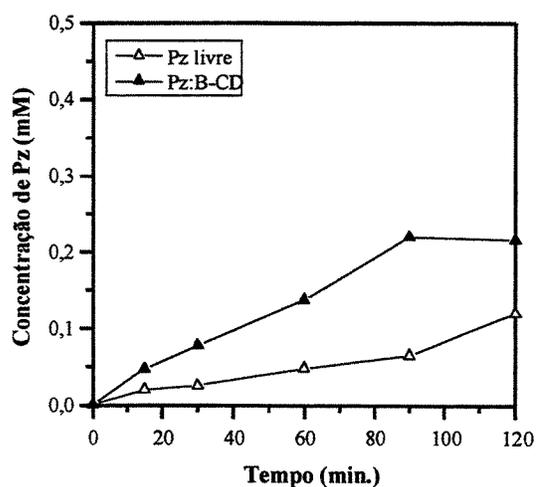
Figura 17 – Cinética de complexação dos fármacos Pz (a) e Iz (b) em  $\beta$ -CD. Os pontos experimentais representam as complexações nas razões molares 1:1, fármaco: $\beta$ -CD. As curvas representam o comportamento previsto pelo modelo (Eq. 29).

No Apêndice III, é apresentada em detalhes a dedução da equação (29), representativa do modelo cinético em duas etapas.

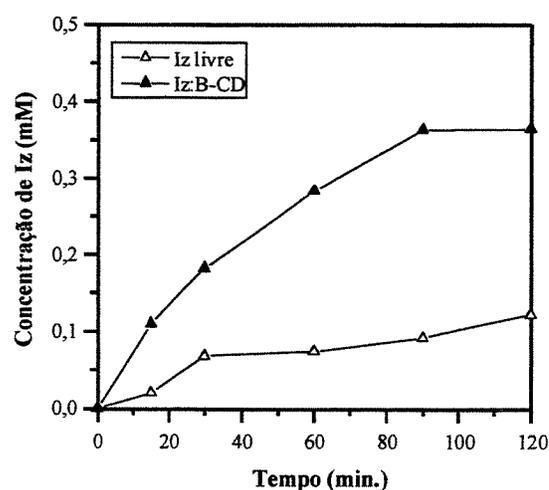
### 5.1.3.5 Avaliação da dissolução dos complexos em meio aquoso

A dissolução em meio aquoso foi a técnica utilizada para avaliar a liberação *in vitro* dos complexos Pz e Iz em  $\beta$ -CD. Comprimidos distintos contendo os fármacos livres e os seus respectivos complexos de inclusão foram dissolvidos em água desionizada e os respectivos valores da concentração de fármaco em função do tempo de dissolução foram plotados, sendo apresentados na Figura 18 (a e b).

Os resultados mostram que o perfil de dissolução dos fármacos livres foi alterado com a complexação. Os comprimidos contendo os complexos de inclusão liberaram os respectivos fármacos em solução mais rapidamente aqueles contendo os fármacos livres indicando uma maior dissolução para os fármacos complexados.



(a)



(b)

Figura 18 – Perfis de dissolução de comprimidos contendo Pz e Iz livres e os complexos Pz: $\beta$ -CD e Iz: $\beta$ -CD, em água desionizada a  $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

### 5.1.3.6 Ensaios de fotoestabilidade e estabilidade oxidativa

Os resultados dos ensaios de estabilidade à fotodegradação dos fármacos Pirazinamida e Isoniazida são apresentados na Figura 19 (a e b). Pode-se observar que apesar da pequena variação das absorvâncias com o tempo, os resultados indicam maior estabilidade dos fármacos na forma de complexos com  $\beta$ -CD em relação aos fármacos livres, sugerindo o efeito protetor da  $\beta$ -CD em presença de irradiação de luz UV.

Os estudos de estabilidade oxidativa dos complexos Pz: $\beta$ -CD e Iz: $\beta$ -CD foram realizados submetendo-se os mesmos a condições drásticas de oxidação. Os testes foram conduzidos expondo os complexos a condições oxidantes (soluções de peróxido de hidrogênio 6% p/v) durante um período de 48 horas, e simultaneamente, à luz natural. Nenhuma alteração significativa foi também observada em relação às absorvâncias originais, tanto para os fármacos nas formas livre quanto complexada, indicando estabilidade à oxidação.

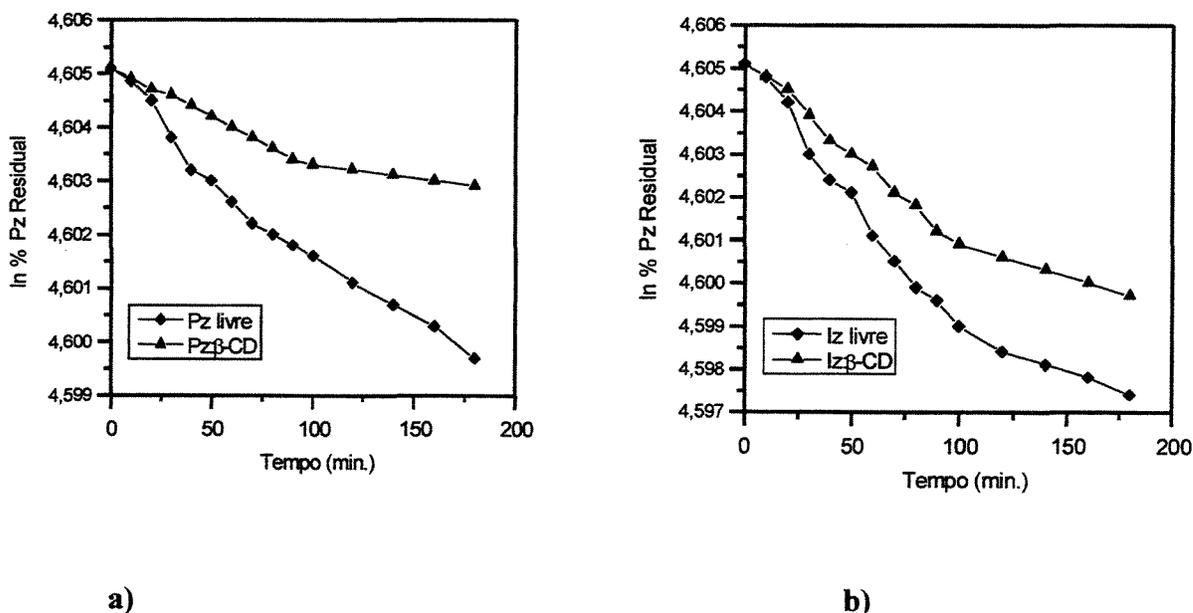


Figura 19 - Perfil de fotodegradação de: (a) Pz e Pz: $\beta$ -CD (1mM) e (b) Iz e Iz: $\beta$ -CD (1 mM).

## 5.2 Encapsulação e liberação dos fármacos Pirazinamida e Isoniazida de lipossomas

A encapsulação e liberação dos fármacos Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) de lipossomas foi estudada conforme disposição dos ensaios apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Disposição geral dos ensaios realizados para o estudo da encapsulação e liberação de Pz e Iz de lipossomas.

ENSAIOS REALIZADOS	APRESENTAÇÃO DO ENSAIO NO ITEM
Síntese, purificação e caracterização do DMPE-PEG	Metodologia – 4.2.4 Resultados – 5.2.1
Preparação e caracterização dos lipossomas	Metodologia – 4.2.5 Resultados – 5.2.2
Estabilidade das vesículas	Metodologia – 4.2.5 Resultados – 5.2.3
Liberação dos fármacos encapsulados em lipossomas	Metodologia – 4.2.8 Resultados – 5.2.4

### 5.2.1 Síntese, purificação e caracterização do DMPE-PEG

O fosfolípido dimiristoilfosfatidilcolina derivatizado com polietilenoglicol de peso molecular 2000 Da, DMPE-PEG<sub>2000</sub>, usado na preparação de lipossomas do tipo “Stealth”, foi identificado por cromatografia de camada delgada (TLC), e quantificado em termos de rendimento do processo de reação e purificação.

Os resultados obtidos das frações eluídas na purificação do composto derivatizado são apresentados na Figura 20.

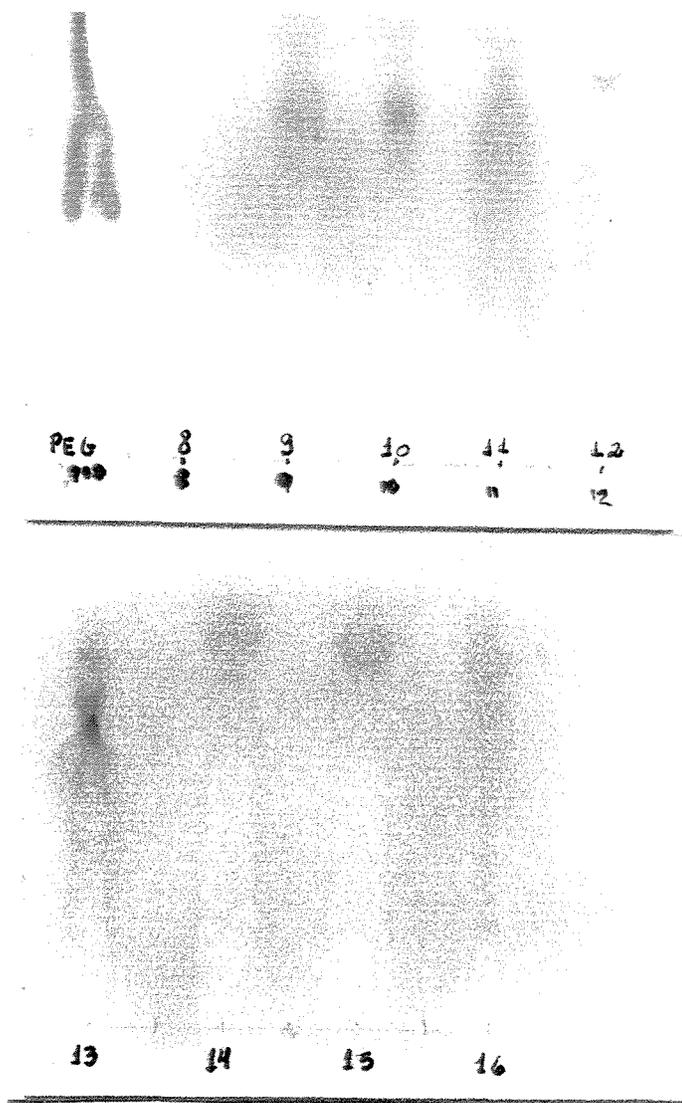


Figura 20 - Cromatografia de camada delgada em fase reversa, com eluição do PEG<sub>2000</sub> sintetizado e purificado usando o gradiente descrito na Tabela 6. A primeira amostra refere-se ao padrão de PEG e as demais são as frações eluídas de 8 a 16.

As análises de cromatografia de camada delgada permitiram a identificação do DMPE-PEG nas frações de 8 a 16. O composto derivatizado DMPE-PEG apresentou uma altura relativa de eluição (Rd) 0,80, semelhante ao padrão obtido da Avanti Polar Lipids.

A Tabela 17 mostra os resultados quantitativos da síntese do DMPE-PEG obtidos neste trabalho em comparação àqueles obtidos na patente americana Avanti Polar Lipids.

Tabela 17 - Resultados quantitativos da derivatização do DMPE com PEG de peso molecular 2000 Da.

<b>Fosfolipídio Derivatizado</b>	<b>Massa final</b>	<b>Rendimento</b>
<b>DMPE-PEG</b>	<b>(g)</b>	<b>(%)</b>
patente	0,5908	52,6
neste trabalho	0,5886	61,0

Comparando-se o rendimento experimental do PEG<sub>2000</sub> obtido neste trabalho com aquele obtido na patente americana, observa-se que melhoramentos introduzidos por RIBAS (1997), elevaram o rendimento para 61%.

### 5.2.2 Preparação e caracterização dos lipossomas

A encapsulação dos fármacos Pz e Iz foi feita em lipossomas dos tipos convencional e “Stealth”. Nesse último tipo a superfície das vesículas foi modificada com 3% de polietileno glicol.

O processo de produção dos lipossomas pelo método da hidratação do filme seco de lipídios seguido de extrusão em membranas de policarbonato apresentou bom rendimento, quantificado pela dosagem do teor de fósforo final presente nas preparações. As perdas foram no máximo de 8% para ambos os tipos de lipossomas.

### **5.2.2.1 Remoção dos fármacos não encapsulados nos lipossomas**

A remoção dos fármacos não encapsulados nos lipossomas foi feita por dois métodos distintos: a) Cromatografia de permeação em gel e, b) Ultrafiltração. A recuperação dos fármacos não encapsulados em ambos os métodos foi da ordem de 94% em relação à massa inicial, indicando que as perdas nos processos foram da ordem de 6%. O monitoramento de possível degradação das vesículas foi feito analisando o teor de fosfato das amostras antes e depois da separação, bem como pela determinação do diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos das vesículas por análises de espalhamento de luz, QLS. Os resultados mostraram que não houve degradação significativa das vesículas em ambos os métodos de separação.

#### **a) Perfis de separação por cromatografia de permeação em gel**

Os perfis de eluição dos fármacos e lipossomas obtidos pela cromatografia de permeação em gel são mostrados nas Figuras 21 e 22. Estes perfis foram obtidos a partir de medidas de absorvância direta ( a 300 nm para os lipossomas e a 260 nm para os fármacos), concentração e volume de cada uma das frações coletadas, para cada ensaio isolado.

De acordo com os cromatogramas obtidos, nota-se uma adequada separação por esse método usando o gel Sepharose CL-6B. Os lipossomas foram eluídos da coluna nas frações 10 a 20, e os fármacos Pz e Iz nas frações 35 a 50. Devido à diluição das amostras, as frações contendo os lipossomas foram concentradas por ultrafiltração para aumentar a sensibilidade do material encapsulado.

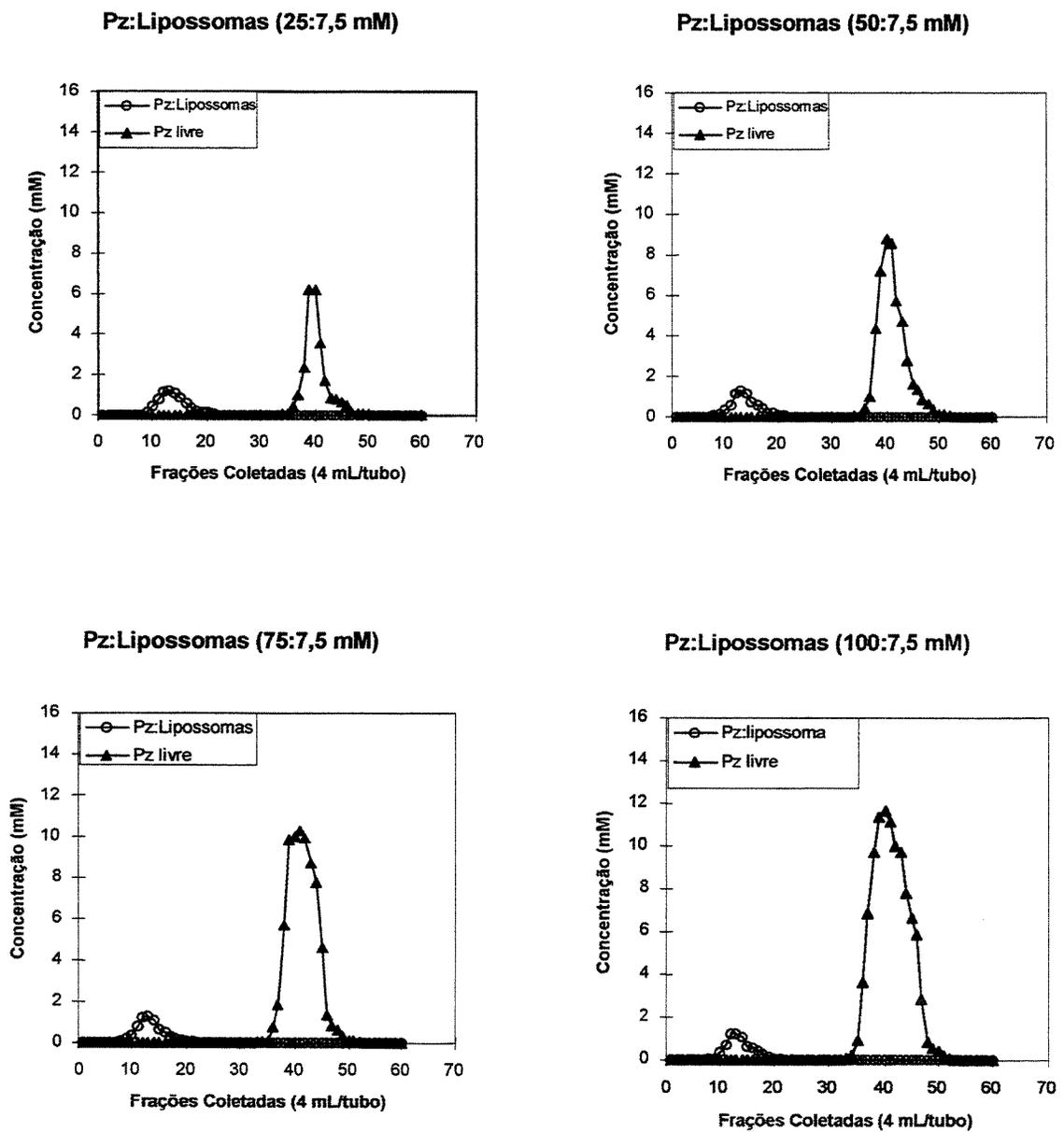


Figura 21 – Perfis de eluição das soluções de lipossomas a 7,5 mM e de Pirazinamida (Pz) a 25, 50, 75 e 100 mM em tampão HEPES (10 mM)/NaCl (120 mM), através de gel Sepharose CL-6B em coluna de diâmetro D=2,6 cm e comprimento L=45 cm.

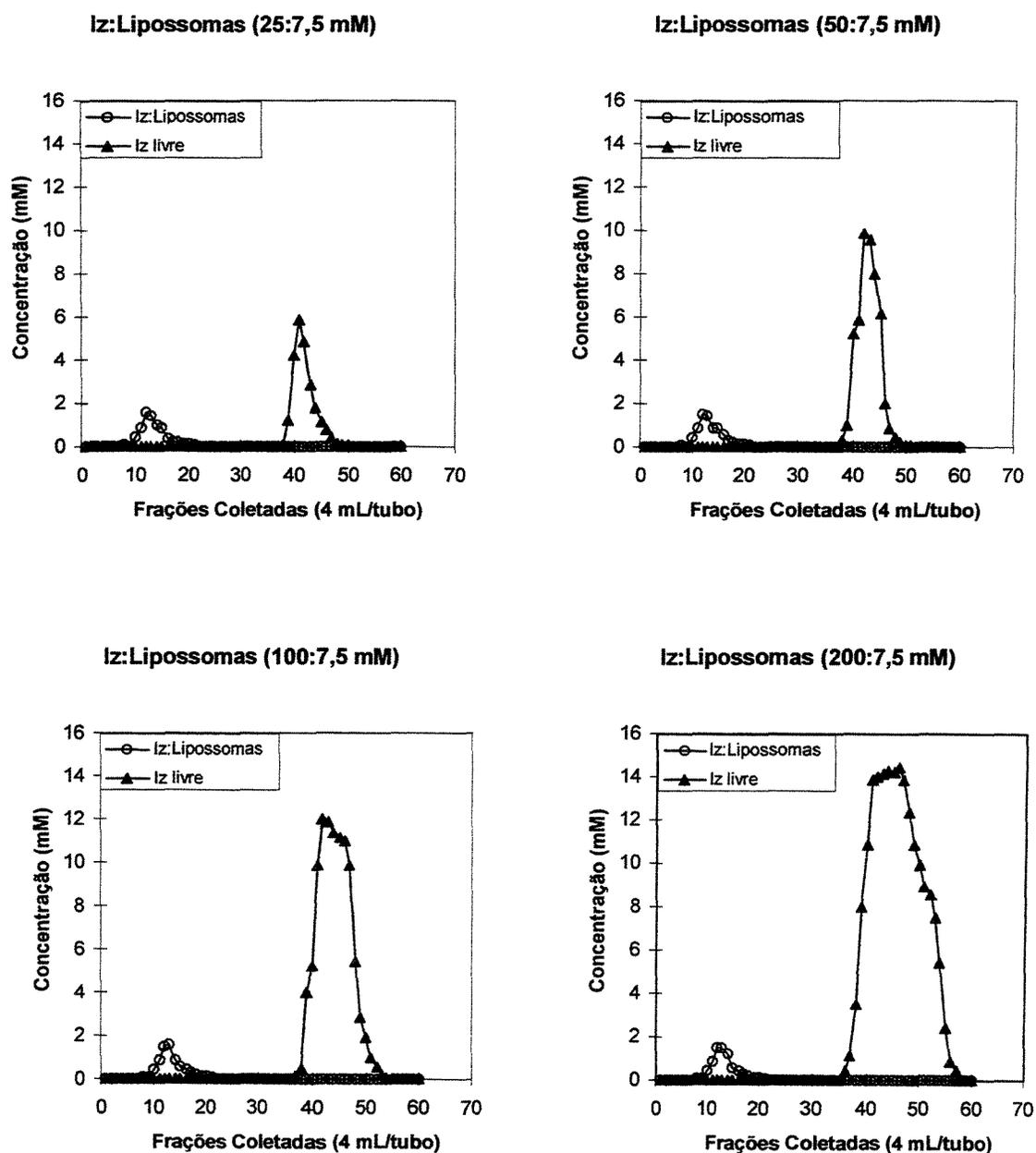


Figura 22 – Perfis de eluição das soluções de lipossomas a 7,5 mM e de Isoniazida (Iz) a 25, 50, 100 e 200 mM em tampão HEPES (10 mM)/NaCL (120 mM) através de gel Sepharose CL-6B em coluna de diâmetro D=2,6 cm e comprimento L=45 cm.

### **b) Separação por ultrafiltração**

A ultrafiltração foi a outra técnica utilizada para a separação do material não encapsulado nos lipossomas. A exemplo da técnica anterior, a recuperação dos fármacos foi da ordem de 94% em relação à massa inicial. O procedimento de ultrafiltração foi conduzido em ciclos consecutivos até se atingir no filtrado uma concentração de fármaco menor que 1% da concentração inicial. Assim, para concentrações iniciais de fármaco menor ou igual a 5 mM adotou-se dois ciclos de ultrafiltração, ao passo que para concentrações acima de 5 mM foram necessárias três passagens.

#### **5.2.2.2 Encapsulação dos fármacos em lipossomas**

O desempenho do processo de encapsulação dos fármacos em lipossomas foi caracterizado a partir da influência da razão molar fármaco/lipídio inicial, eficiência de encapsulação, diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas, e concentração de fármaco/mL de dispersão lipossomal.

Os perfis apresentados nas Figuras 23 ilustram as interações dos fármacos com os lipídios em ambos os sistemas convencional e “Stealth” durante o processo de encapsulação passiva e a influência da razão fármaco/lipídio inicial.

Analisando os perfis pode-se observar que tanto para Pz como Iz, a razão molar fármaco/lipídio final cresce com o aumento da razão inicial para ambos os tipos de lipossomas. Para o caso da Isoniazida, a mudança de inclinação das curvas indica uma tendência de saturação para razões fármaco:lipídio maiores que 0,85. Para a Pirazinamida essa tendência pode ser observada somente para lipossomas do tipo “Stealth”, porém para razões molares inferiores às da Isoniazida. A menor faixa de razões fármaco/lipídio para a Pz deve-se às limitações de solubilidade.

A capacidade máxima de encapsulação para os lipossomas convencionais foi de (Pz/L) final = 0,73, e (Iz/L) final = 0,96, com eficiências de encapsulação da ordem de 5,50 e 3,61%, para Pz e Iz, respectivamente. Para os lipossomas “Stealth” a capacidade máxima de encapsulação foi da ordem de (Pz/L) final = 0,48 e (Iz/L) final = 0,86, com eficiência de encapsulação em torno de 3,56% para Pz e 3,24% para Iz. Para ambos os fármacos, deve-

se considerar que o tempo de hidratação dos lipossomas “Stealth” foi o dobro daquele usado para os convencionais (1 hora), objetivando-se com isso considerar a resistência difusiva imposta pela camada de hidratação formada pela presença de PEG, e explorar a capacidade máxima de encapsulação passiva desse tipo de vesícula.

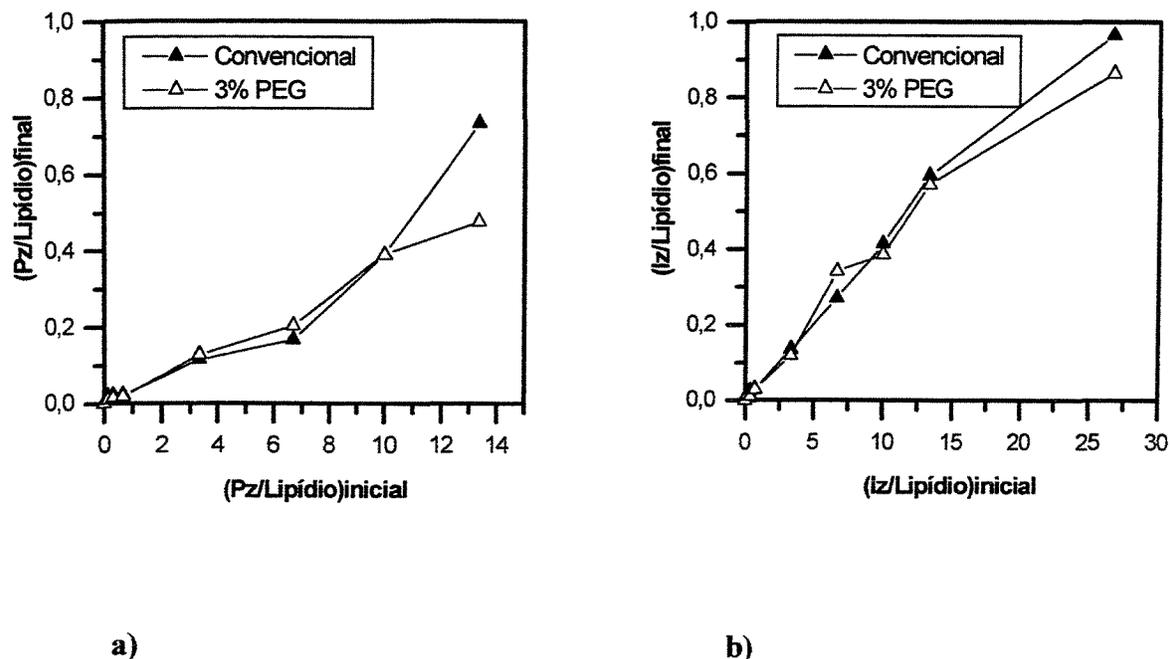


Figura 23 - Influência da razão molar inicial (Pz ou Iz/Lipídio) no desempenho do processo de encapsulação passiva para lipossomas convencionais e “Stealth”. Concentração de lipídios:7,5 mM.

As Tabelas 18 e 19 apresentam os dados de desempenho do processo de encapsulação passivo de lipossomas convencionais e do tipo “Stealth” para os fármacos em questão, os diâmetros médios das vesículas em função da razão inicial fármaco/lipídio, e a concentração dos fármacos/mL de formulação lipossomal. A distribuição de tamanhos das vesículas foi semelhante para as várias situações, e é apresentada no Apêndice IV para a razão fármaco/lipídio 5,0:7,5 mM.

Tabela 18 – Caracterização da encapsulação passiva dos fármacos Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) em lipossomas convencionais.

Lipossomas Convencionais										
Pz						Iz				
(F/L)i	(F/L)f	%E	Ø (nm)	[C] (mg/mL)	(F/V)	(F/L)f	%E	Ø (nm)	[C] (mg/mL)	(F/V)
0,13	0,019	14,2	131,8	0,017	3892	0,013	10,0	120,5	0,013	2092
0,33	0,021	6,36	135,0	0,019	4375	0,023	7,03	121,9	0,024	4043
0,67	0,022	3,28	139,0	0,019	4762	0,027	4,05	123,2	0,027	4616
3,33	0,115	3,45	140,2	0,104	26426	0,133	3,99	133,3	0,133	27586
6,67	0,166	2,49	141,8	0,153	39906	0,269	4,03	128,2	0,270	51821
10,0	0,388	3,88	138,6	0,358	89164	0,413	4,13	126,3	0,411	76593
13,33	0,734	5,5	141,2	0,677	175507	0,593	4,44	125,8	0,603	112462
26,67	-	-	-	-	-	0,964	3,61	133,0	0,987	203844

(F/L) – razão fármaco/lipídio final (f) e inicial (i)

%E – % de encapsulação

Ø – diâmetro médio das vesículas (nm)

[C] – Concentração de fármaco nas formulações mg/mL

(F/V) – moléculas de fármaco/vesícula

Os resultados experimentais mostram que para todas as formulações preparadas de lipossomas convencionais os diâmetros médios diferiram em apenas 10%. Uma observação experimental interessante que pode ser feita comparando-se os resultados dos diâmetros e distribuição de tamanhos das vesículas convencionais e “Stealth” é que para as convencionais, os diâmetros foram 20% superiores em relação ao diâmetro nominal da membrana de extrusão (100 nm), em todas as preparações, enquanto para as vesículas do tipo “Stealth”, essa variação não ultrapassou os 10% em relação à membrana, com uma distribuição menos dispersa, sugerindo que provavelmente na etapa de extrusão, as formulações convencionais tenham sofrido uma pequena deformação, resultando em

estruturas com diâmetros maiores do que os esperados. Para as formulações “Stealth”, a presença das cadeias do polímero provavelmente evitou essa deformação.

Tabela 19 – Caracterização da encapsulação passiva dos fármacos Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) em lipossomas “Stealth”.

Lipossomas “Stealth” (3% PEG)										
Pz						Iz				
(F/L)i	(F/L)f	%E	Ø (nm)	[C] mg/mL	(F/V)	(F/L)f	%E	Ø (nm)	[C] mg/mL	(F/V)
0,13	0,01	7,5	117,8	0,009	1621	0,011	8,27	108,7	0,011	1513
0,33	0,014	4,24	109,0	0,013	1902	0,011	3,33	101,8	0,011	1327
0,67	0,018	2,68	117,3	0,016	2863	0,029	4,33	114,5	0,029	4406
3,33	0,126	3,78	122,0	0,116	22441	0,117	3,51	115,8	0,120	18672
6,67	0,204	3,06	118,9	0,185	33940	0,341	5,11	119,3	0,342	56721
10,0	0,390	3,90	113,6	0,360	60312	0,386	3,86	114,2	0,390	59281
13,33	0,475	3,56	123,3	0,438	86624	0,569	4,26	116,2	0,575	90550
26,67	-	-	-	-	-	0,865	3,24	122,1	0,877	152474

(F/L) – razão fármaco/lipídio final (f) e inicial (i)

%E – % de encapsulação

Ø – diâmetro médio das vesículas (nm)

[C] – Concentração de fármaco nas formulações mg/mL

(F/V) – moléculas de fármaco/vesícula

Como se pode observar a partir dos resultados obtidos, as dosagens de fármacos apresentam valores muito reduzidos se comparados aos requeridos terapeuticamente para o fármaco na forma livre, ou seja, dose diária da ordem de 5 mg/kg com máximo de 300 mg para Iz, e de 15 a 30 mg/kg de Pz. Entretanto, vários trabalhos na literatura registram aumentos na eficiência terapêutica de fármacos encapsulados em lipossomas (AGARWAL et al., 1994; DEOL & KLULLER, 1997).

### **5.2.3 Estabilidade das vesículas lipídicas**

#### **5.2.3.1 Estabilidade das vesículas em tensoativo não-iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>**

Vesículas lipídicas são solubilizadas pela ação de tensoativos. A extensão da solubilização depende da facilidade dos tensoativos de penetrarem na membrana, o que reflete as interações entre lipídios e tensoativo, o grau de empacotamento dos lipídios e a estabilidade da estrutura. Nos trabalhos de EDWARDS & ALMGREN (1990) e LICHTENBERG (1985), são apresentados perfis típicos de solubilização de lipossomas em presença de tensoativos, que relacionam a absorvância das soluções com a concentração de tensoativo. De uma maneira geral esses perfis são constituídos de três estágios: o primeiro, à baixa concentração de tensoativo, no qual a penetração do tensoativo nas partículas não causa significativo aumento no tamanho das vesículas, e com isso a absorvância das soluções permanece praticamente constante. Com o aumento da concentração de tensoativo as vesículas tendem a aumentar de tamanho e fundirem-se entre si, produzindo grandes alterações na absorvância das soluções. Finalmente, em altas concentrações de tensoativo há o rompimento das estruturas e aparecimento de micelas no sistema, e os perfis mostram um decréscimo acentuado da absorvância das soluções. Vesículas mais estáveis produzem perfis com menos distúrbios das absorvâncias iniciais após exposição aos tensoativos.

A Figura 24 mostra os perfis de solubilização obtidos para os lipossomas dos tipos convencionais vazios e após o encapsulamento dos fármacos Pz e Iz. Em ambos os casos observa-se que os perfis são semelhantes para os lipossomas vazios e convencionais, indicando que a presença do fármaco não produz grandes alterações no empacotamento das membranas, o que já era esperado por tratar-se de compostos de natureza predominantemente hidrofílica. O efeito da presença dos fármacos aparece somente em concentrações de tensoativo maiores que 65 % aproximadamente, com o decréscimo mais acentuado das absorvâncias nos seus perfis, indicando a ruptura das vesículas à menor concentração de tensoativo que para os lipossomas vazios.

Para os lipossomas do tipo “Stealth”, os perfis apresentados na Figura 25 também mostram comportamento semelhante para as vesículas vazias e contendo o fármaco encapsulado, com as maiores diferenças entre as absorbâncias para concentrações de tensoativo maiores que 65% aproximadamente. Comparando-se esses perfis com os de lipossomas convencionais verifica-se uma estabilidade bem maior das vesículas até concentrações de tensoativo próximas a 60%, o que reflete a proteção exercida pela camada hidratada formada na superfície das vesículas devido à presença do polietilenoglicol.

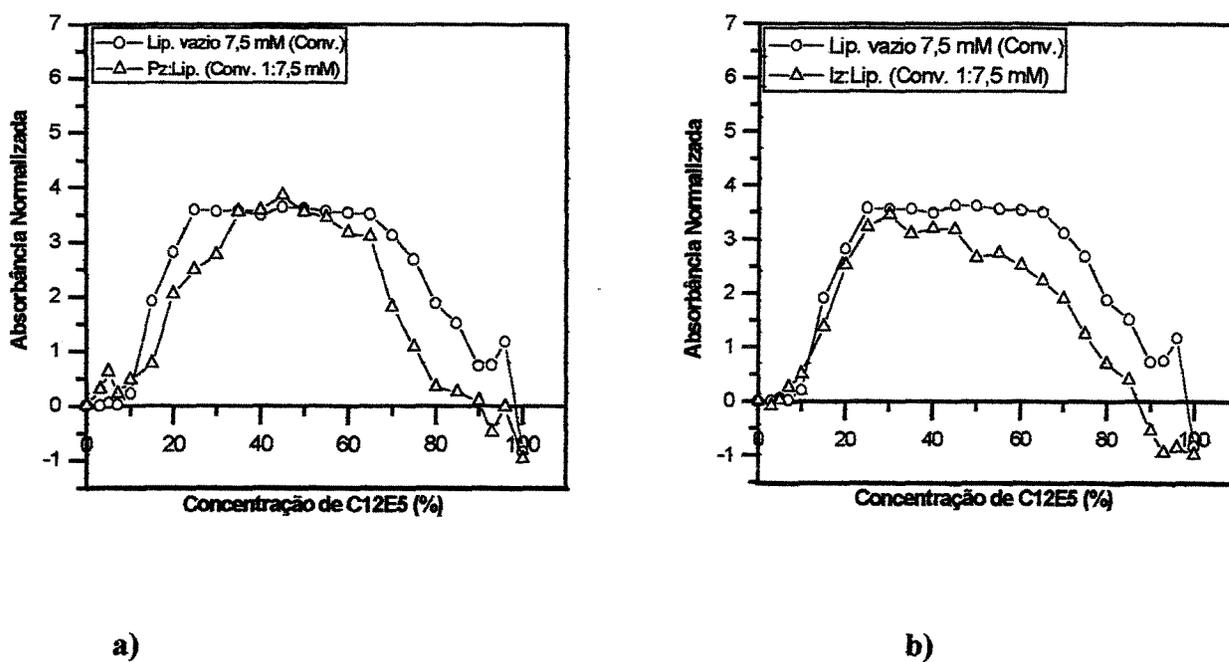


Figura 24 – Perfis de solubilização de lipossomas convencionais em presença do tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>. Condições de incubação: concentração de lipídios: 1 mM; 25 °C; tempo: 2 horas.

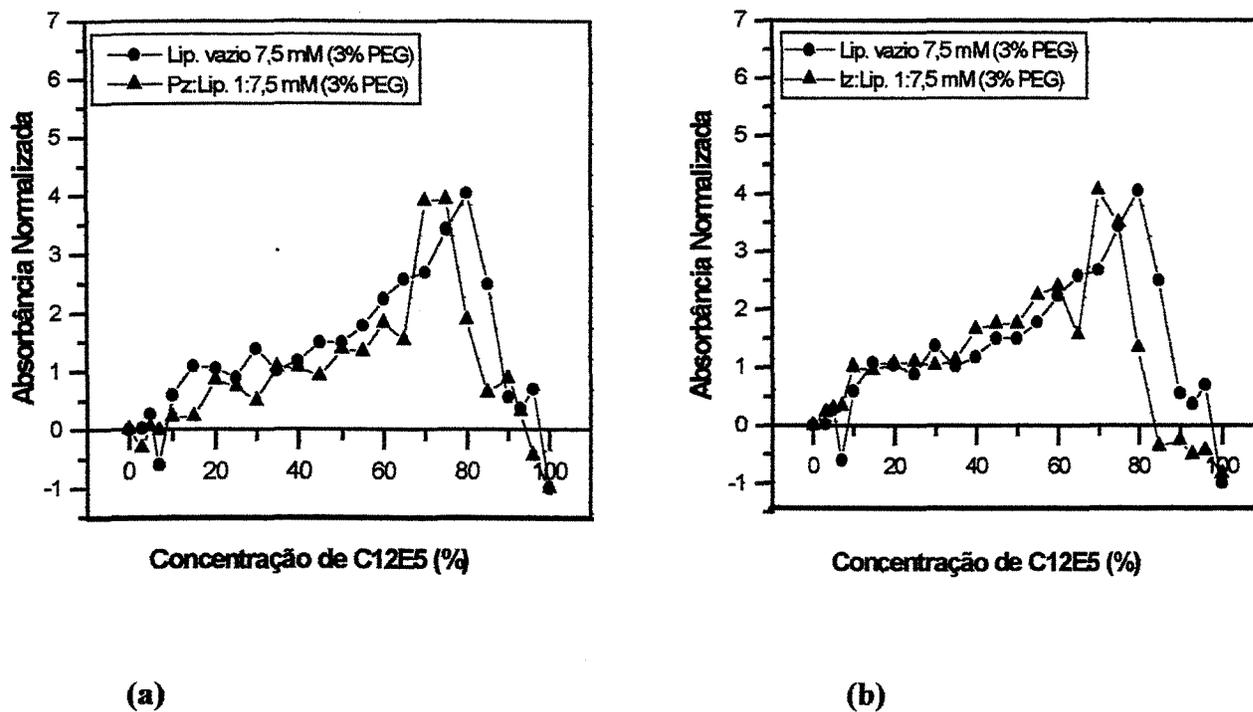


Figura 25 - Perfis de solubilização de lipossomas do tipo “Stealth” em presença do tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>. Condições de incubação: concentração de lipídios: 1 mM; 25 °C; tempo: 2 horas.

### 5.2.3.2 Estabilidade à estocagem dos lipossomas

A estabilidade à estocagem a 5°C dos lipossomas contendo os fármacos encapsulados, foi avaliada pelas medidas do diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas durante quatro, oito e doze semanas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 20. Os valores dos diâmetros relativos aos lipossomas recém preparados foram mostrados nas Tabelas 18 e 19. A partir destes resultados, pode-se observar que os lipossomas não sofreram alterações significativas em seus diâmetros médios durante a estocagem, demonstrando a estabilidade das preparações para as várias razões molares fármaco/lipídio e para ambos os tipos de lipossomas convencional e “Stealth”.

Tabela 20 – Diâmetro médio dos lipossomas convencionais e “Stealth” contendo a Pz e Iz, em função do tempo de estocagem a 5°C em refrigerador durante 12 semanas.

(D/L) <sub>i</sub>	4ª Semana			
	Convencional		“Stealth”(PEG 3%)	
	Diâmetro das vesículas (nm)		Diâmetro das vesículas (nm)	
	Pz/Lip	Iz/Lip	Pz/Lip	Iz/Lip
0,13	133,6	117,5	119,8	118,3
0,33	133,0	122,2	113,9	111,0
0,67	137,8	120,1	119,3	109,5
3,33	138,2	126,7	120,0	118,8
6,67	140,0	126,5	121,9	115,3
10,0	141,6	129,1	118,6	117,2
13,3	142,6	128,8	120,3	119,2
26,6	-	130,0	-	120,6
8ª Semana				
0,13	128,3	120,5	118,9	117,1
0,33	131,8	118,3	116,2	121,0
0,67	133,4	121,6	117,4	115,2
3,33	140,2	121,2	119,1	116,8
6,67	141,0	125,8	122,2	119,3
10,0	139,5	127,4	120,3	122,2
13,3	140,1	130,8	122,5	118,9
26,6	-	129,0	-	119,6
12ª Semana				
0,13	132,2	126,2	122,9	112,8
0,33	133,9	122,3	111,6	111,1
0,67	137,1	125,5	114,5	116,2
3,33	141,5	125,2	121,1	113,9
6,67	136,0	122,7	123,7	115,3
10,0	138,2	124,3	121,4	119,2
13,3	143,1	125,8	125,2	117,2
26,6	-	130,1	-	118,6

#### 5.2.4 Liberação dos fármacos encapsulados em lipossomas

A liberação dos fármacos Pirazinamida e Isoniazida de lipossomas dos tipos convencional e “Stealth” nos ensaios conduzidos *in vitro* foi caracterizada a partir dos perfis de concentração do fármaco liberado com o tempo, os quais refletem a taxa de liberação e a permeabilidade da estrutura lipossomal.

A permeação dos fármacos através dos lipossomas foi representada matematicamente pelo modelo físico de difusão de solutos no interior de esferas sólidas, descrito pela lei de Fick. No modelo, não foram consideradas as limitações interfaciais impostas pela membrana de diálise usada nos experimentos. Esse modelo foi previamente aplicado para a liberação de compostos de lipossomas por GUY (1982) e ELORZA (1993).

Em coordenadas esféricas e considerando somente a difusão na direção do raio das partículas, tem-se a equação (30) para representar o fenômeno.

$$\frac{1}{r^2} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \cdot \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{1}{D} \cdot \frac{\partial c}{\partial t} \quad (30)$$

A equação (30) foi resolvida considerando as seguintes condições de contorno:

$$cc1 \rightarrow (\text{condição inicial}) \quad t = 0, \quad 0 \leq r \leq R \quad c(r, t) = c_{\text{int}} \quad (31)$$

$$cc2 \rightarrow t > 0, \quad t > 0, \quad r = R \quad c(R, t) = c_{\infty} = 0 \quad (32)$$

$$cc3 \rightarrow c(r, t) \text{ é um valor finito para } 0 \leq r \leq R \quad (33)$$

A solução da equação (30) é uma série de Fourier dos senos, que fornece a seguinte expressão para o perfil de concentração no interior das partículas representada pela equação (34):

$$c(r, t) = -2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \cdot \exp \left[ - \left( \frac{n\pi}{R} \right)^2 \cdot Dt \right] \cdot \frac{\text{sen} \left( \frac{n\pi r}{R} \right)}{\left( \frac{n\pi r}{R} \right)} \quad (34)$$

A quantidade total do soluto difundido no solvente (considerando N partículas) é representada pela equação (35):

$$c(t) = N \cdot \int_0^R c(r, t) 4\pi r^2 dr = N \left[ -2 \cdot c_{\text{int}} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \cdot \frac{\exp \left[ - \left( \frac{n\pi}{R} \right)^2 \cdot Dt \right]}{\frac{n\pi}{R}} \cdot \int \frac{\text{sen} \left( \frac{n\pi r}{R} \right)}{r} \cdot 4\pi r^2 dr \right] \quad (35)$$

de onde o perfil de concentração em função do tempo pode ser calculado pela equação (36):

$$\frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cdot \exp \left[ - n^2 \cdot \pi^2 \cdot kt \right] \quad (36)$$

Expressando esse perfil em termos da concentração do fármaco liberado na solução, que é a variável medida experimentalmente, tem-se:

$$\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{c(t)}{c_{\text{int}}}, \quad \text{logo:}$$

$$\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cdot \exp \left[ - n^2 \cdot \pi^2 \cdot kt \right] \quad (37)$$

onde  $c^*(t)$  é a concentração do fármaco difundida para o meio aquoso num tempo  $t$  e  $c_{\text{int}}$  a quantidade liberada após um tempo infinito, o que corresponde à quantidade total de fármaco no interior das vesículas no instante inicial do experimento, e  $k$  é a razão  $D/R^2$ ,

onde  $D$  é o coeficiente de difusão do fármaco na estrutura e  $R$  o raio dos lipossomas. A dedução detalhada da equação do modelo encontra-se no Apêndice I.

Os dados experimentais de  $c(t)$  em função do tempo ( $t$ ) foram ajustados pelo método da máxima verossimilhança, determinando-se os valores de  $k$  para os lipossomas dos tipos convencional e “Stealth”. Neste método, as incertezas de todas as medidas experimentais são levados em conta no ajuste.

Os dados ajustados referem-se ao modelo de encapsulação e que consiste matematicamente em uma função representada por uma série, onde o parâmetro a ser obtido  $k$ , pertence a todos os termos desta série, que varia de um a infinito. Obviamente o número de termos da série é um valor, que para propósitos práticos representa o valor exato da função. Desta forma, utilizou-se 1.000 termos da série. Isto foi muito mais do que o necessário, visto que após algum tempo, devido à serie ser convergente, basta apenas o primeiro termo da série para representar a função. O único ponto crítico é quando  $t \rightarrow 0$ . Neste caso a série apresenta problemas de divergência. Entretanto, no limite  $t \rightarrow 0$ , a mesma é representada pela função (equação 38):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 3 \left[ \frac{2\tau^{1/2}}{\pi^{1/2}} - \tau \right] \quad (38)$$

Deve-se notar que a equação (38) é a própria série no limite de  $t \rightarrow 0$ , e não uma aproximação da mesma conforme GUY et al. (1982).

O coeficiente de permeabilidade das estruturas,  $P$ , é definido pela razão entre o fluxo  $J$  e a diferença de concentração entre as soluções interna e externa  $\Delta c$  (equação 39).

$$P = J / \Delta c \quad (39)$$

Em termos da constante  $k$  usada no modelo (eq.37), a permeabilidade pode ser expressa considerando o comprimento característico de uma esfera, ou seja a razão  $V/A$ .

$$P = k \cdot V/A \quad (40)$$

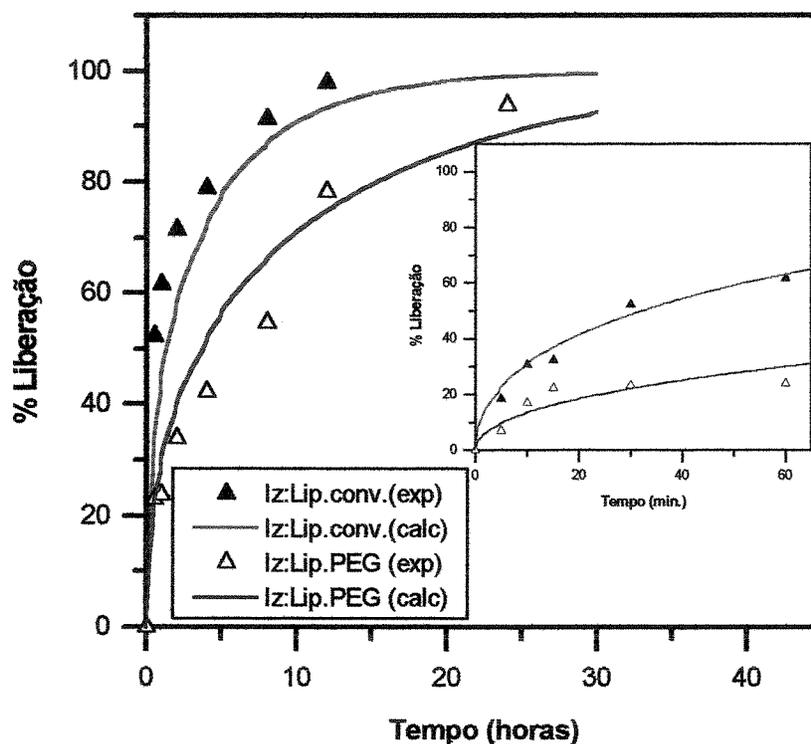


Figura 27 - Perfis de liberação do fármaco Isoniazida contidas de lipossomas convencionais e com PEG.

Os resultados obtidos mostram que para ambos os fármacos o tempo de liberação foi consideravelmente maior nas preparações com 3% de PEG. Para as razões molares iniciais estudadas, correspondentes às máximas quantidades de fármacos incorporados nas vesículas, as taxas iniciais de liberação são maiores para os lipossomas convencionais que para os “Stealth”. Essas características refletem principalmente a resistência à difusão imposta pela camada de água na superfície das vesículas devido à hidroflicidade do PEG.

Nas condições do experimento a liberação total da Pz e Iz dos lipossomas convencionais foi alcançada em aproximadamente 8 horas e para os lipossomas “Stealth” somente no final de 24 horas. As maiores taxas de liberação ocorreram na primeira hora (quadros menores), quando foi liberado cerca de 75% dos fármacos de lipossomas convencionais e 25% dos “Stealth”. Esses tempos de liberação razoavelmente longos, devem-se ao caráter predominantemente hidrofílico dos fármacos que dificulta a sua transposição através da barreira hidrofóbica da bicamada lipídica.

As curvas construídas a partir do parâmetro  $k$  determinado mostram que o modelo difusivo proposto representa bem os dados experimentais. Melhores ajustes poderão ser obtidos considerando as limitações impostas ao sistema pela membrana de diálise usada nos experimentos.

A tabela 21 apresenta os valores da constante  $k$  determinados pelo modelo difusivo e as permeabilidades ( $P$ ) dos fármacos nos lipossomas convencional e “Stealth”.

Tabela 21 - Constante  $k$  do modelo cinético difusivo (eq.37) e coeficiente de permeabilidade ( $P$ ) para ambos lipossomas dos tipos convencional e “Stealth”.

Tipo de Lipossoma	Razões iniciais fármaco/lipídio			
	(Pz/L)=10,0		(Iz/L)=13,3	
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$P$ (cm/s)	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$P$ (cm/s)
Convencional	$5,52 \times 10^{-2}$	$3,54 \times 10^{-11}$	$3,35 \times 10^{-2}$	$6,93 \times 10^{-12}$
“Stealth”	$9,21 \times 10^{-3}$	$4,83 \times 10^{-12}$	$6,79 \times 10^{-3}$	$3,64 \times 10^{-12}$

Apesar do bom ajuste dos dados experimentais ao modelo, como mostrado nas Figuras 26 e 27, os valores de  $k$  obtidos foram em todos os casos menores que a unidade. De acordo com os estudos de GUY (1982), para valores de  $k < 1$ , os efeitos da transferência interfacial através da membrana de diálise tornam-se significativos. Isso justifica a necessidade de utilização de modelos que incluam essa limitação difusiva adicional em estudos posteriores, para comparação com os resultados aqui obtidos.

Os valores de permeabilidade obtidos são da ordem de grandeza das permeabilidades de moléculas carregadas tais como ânions, e de moléculas grandes como glicose e proteínas através de membrana de lecitinas (LASIC, 1993).

Embora sendo moléculas pequenas e sem carga, a dificuldade de  $P_z$  e  $I_z$  para a transposição das membranas dos lipossomas deve-se à presença de colesterol na bicamada lipídica, e ao caráter predominantemente hidrofílico dos fármacos.

### 5.3 Associação dos complexos fármaco: $\beta$ -CD com lipossomas

A associação dos complexos fármaco: $\beta$ -CD com lipossomas foi estudada conforme disposição dos ensaios apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 – Disposição geral dos ensaios realizados para a associação dos complexos em  $\beta$ -CD com lipossomas.

<b>ENSAIOS REALIZADOS</b>	<b>APRESENTAÇÃO DO ENSAIO NO ITEM</b>
<b>Capacidade da associação fármaco:<math>\beta</math>-CD com lipossomas</b>	Metodologia – 4.2.5 Resultados – 5.3.1
<b>Estabilidade da associação fármaco:<math>\beta</math>-CD com lipossomas em tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub></b>	Metodologia – 4.2.5 Resultados – 5.3.2
<b>Liberção dos complexos fármaco: <math>\beta</math>-CD em lipossomas</b>	Metodologia – 4.2.8 Resultados – 5.3.3

A associação dos complexos Pz: $\beta$ -CD ou Iz: $\beta$ -CD com lipossomas pela encapsulação passiva pode ser representado pelo esquema mostrado na Figura 28.

Quando os complexos Pz: $\beta$ -CD ou Iz: $\beta$ -CD são adicionados à solução de hidratação durante a encapsulação passiva de lipossomas, um equilíbrio é estabelecido entre os fármacos livres e complexados. O deslocamento dos fármacos para a solução depende da intensidade de ligação com a cavidade da  $\beta$ -CD. Portanto, os fármacos podem se associar aos lipossomas em ambas as formas: livres ou complexadas em  $\beta$ -CD.

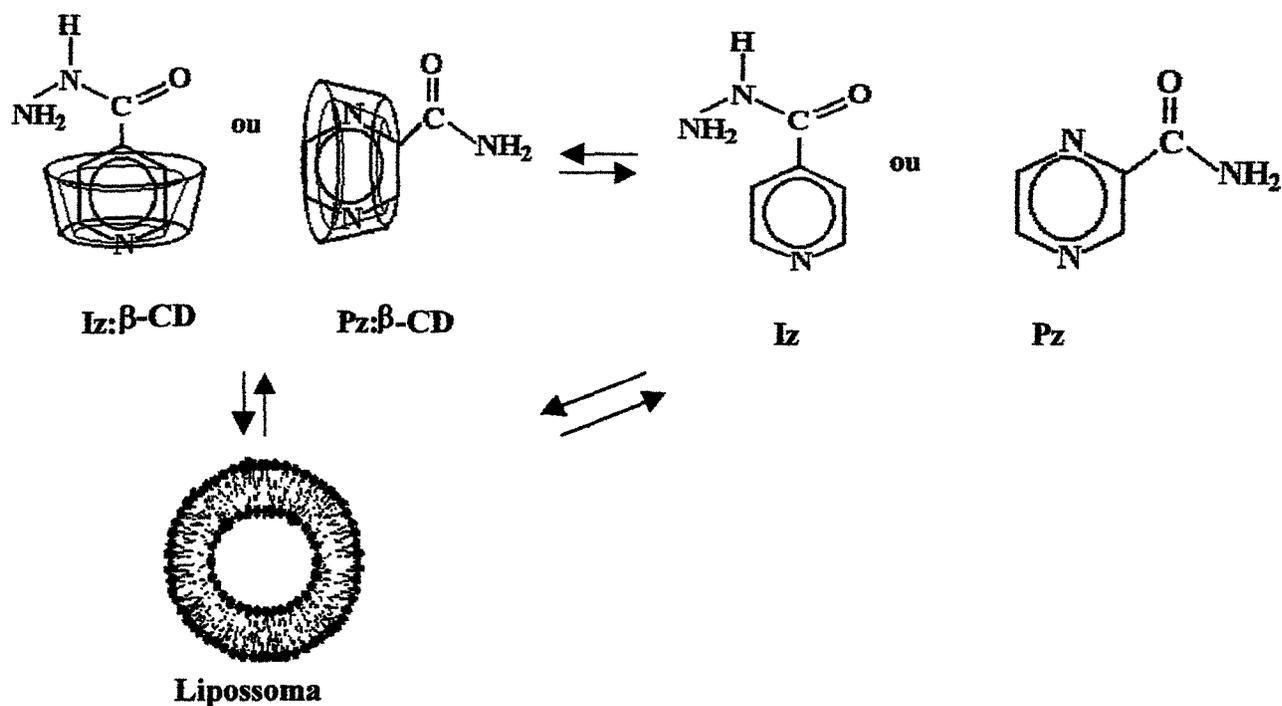


Figura 28 – Associação dos complexos Pz:β-CD ou Iz:β-CD com lipossomas através da encapsulação passiva.

### 5.3.1 Capacidade de associação dos complexos de β-ciclodextrina com lipossomas

Os perfis apresentados na Figura 29 (a e b) ilustram as interações dos fármacos livres ou dos complexos em β-CD com os lipídios durante a associação passiva com lipossomas convencionais. As baixas razões fármaco/lipídio usados nesses ensaios, devem-se às limitações de solubilidade da β-CD na solução tampão utilizada. Apesar das estruturas similares das moléculas de fármacos (Pz e Iz), as interações com a bicamada lipídica foram diferentes, caracterizando melhor associação para a Iz na forma livre. Os perfis de associação dos complexos de β-CD foram similares para ambos os fármacos, apresentando uma saturação na razão molar da ordem de 0,015 complexo/lipídio.

Para a Pz não há diferença significativa entre as capacidades de associação dos lipossomas para Pz livre ou complexada. Estes resultados sugerem que a Pz é mais facilmente dissociada da cavidade da β-CD do que a Iz. Os resultados aqui apresentados

corroboram os obtidos anteriormente nas análises de  $^1\text{H-NMR}$ , confirmando as fracas interações entre Pz e  $\beta\text{-CD}$  comparada com o complexo Iz: $\beta\text{-CD}$ .

É interessante notar também que para os complexos, a associação é pouco sensível às concentrações iniciais na faixa estudada.

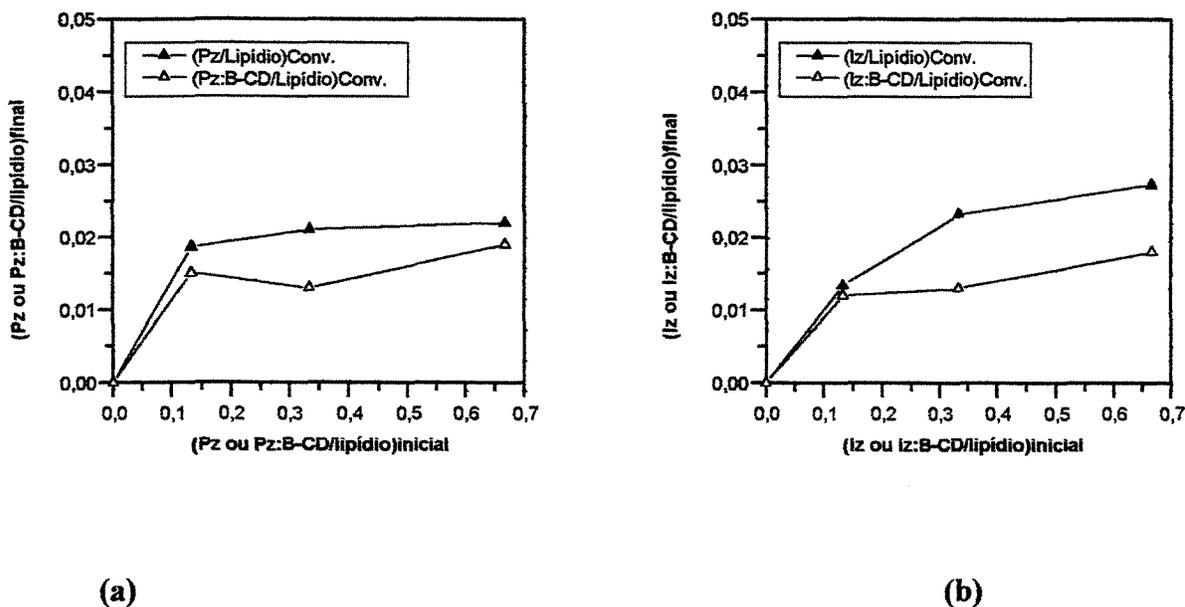


Figura 29 - Efeito da razão molar inicial e final para a associação com lipossomas convencionais de Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) livres e complexadas em  $\beta\text{-CD}$ .

A Figura 30 (a e b) mostra a performance da associação dos fármacos nas formas livres ou complexados em  $\beta\text{-CD}$  nos lipossomas “Stealth” em termos da razão molar fármaco ou complexo fármaco: $\beta\text{-CD}$ /lipídio final e inicial. Em ambos os casos, a associação do fármaco livre e complexado tem comportamento semelhante, indicando o controle da camada hidratada de PEG no processo de associação, ou a liberação dos fármacos da  $\beta\text{-CD}$  durante o processo, em consequência do maior tempo de hidratação. Os níveis de associação dos complexos, razões (F: $\beta\text{-CD}$ ) final foram semelhantes aos obtidos para lipossomas convencionais.

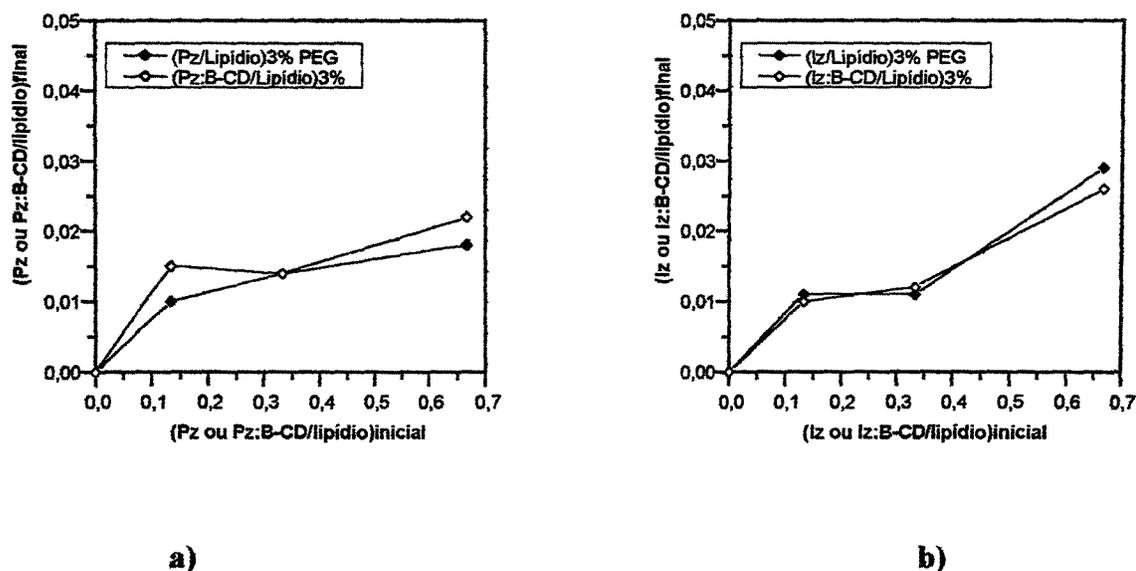


Figura 30 - Efeito da razão molar inicial e final para a associação com lipossomas “Stealth” de Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) livres e complexadas em β-CD.

A Tabela 23 resume os dados de desempenho do processo de encapsulação passivo de lipossomas convencionais e do tipo “Stealth” para os complexos em questão, os diâmetros médios das vesículas em função da razão inicial fármaco:β-CD/lipídio, e a concentração dos fármacos:β-CD/mL de formulação lipossomal. A distribuição de tamanho das vesículas foi semelhante para as várias situações, e são apresentados no Apêndice IV para as razões fármaco:β-CD:lipídio 5,0:7,5 mM.

Os resultados experimentais mostram que a quantidade de fármaco associada aos lipossomas na forma de complexos de β-CD é muito pequena comparada com a encapsulação dos fármacos livres, conforme discutido no item 5.2.2.2, onde se pode explorar uma faixa maior de concentração.

Tabela 23 – Características dos fármacos complexados em  $\beta$ -CD encapsulados em lipossomas convencional e “Stealth”.

Lipossomas Convencionais										
Pz: $\beta$ -CD						Iz: $\beta$ -CD				
(F/L)i	(D/L) f	%E	$\varnothing$ (nm)	[C] mg/mL	(F/V)	(D/L)f	%E	$\varnothing$ (nm)	[C] mg/mL	(F/V)
0,13	0,015	11,3	140,9	0,013	3336	0,012	9,02	129,3	0,012	2141
0,33	0,013	3,87	155,0	0,012	3730	0,013	3,94	117,0	0,013	2081
0,67	0,019	2,80	134,1	0,017	3972	0,018	2,68	129,4	0,018	3484
Lipossomas “Stealth”										
Pz: $\beta$ -CD						Iz: $\beta$ -CD				
(F/L)i	(D/L)f	%E	$\varnothing$ (nm)	[C] mg/mL	F/V	(D/L)f	%E	$\varnothing$ (nm)	[C] mg/mL	F/V
0,13	0,015	11,2	123,5	0,013	2441	0,010	7,52	109,4	0,010	1341
0,33	0,014	4,24	95,8	0,013	1469	0,012	3,63	102,9	0,012	1525
0,67	0,022	3,28	100,7	0,020	2597	0,026	3,88	107,7	0,026	3527

(F/L) – razão droga $\beta$ -CD/lipídio final (f) e inicial (i)

%E – % de encapsulação

$\varnothing$  – diâmetro médio da vesícula (nm)

[C] – Concentração de fármaco: $\beta$ -CD mg/mL

(F/V) – moléculas de fármaco/vesícula

### 5.3.2 Estabilidade da associação fármaco: $\beta$ -CD com lipossomas em tensoativo não iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>

A Figura 31 (a e b) mostra os perfis de solubilização obtidos para lipossomas convencionais vazios e encapsulando a  $\beta$ -CD vazia e, os fármacos Pz e Iz nas formas livres e complexadas em  $\beta$ -CD. A similaridade entre os perfis indica que a encapsulação dos fármacos Pz e Iz nas formas livres não alteram o empacotamento da membrana comparado aos lipossomas vazios. As ciclodextrinas são conhecidas por remover os componentes

lipídicos das membranas pela formação de complexos de inclusão, podendo desestabilizar as membranas na presença de tampão ou sangue (McCOMARCK & GREGORIADIS, 1994). Apesar disto, nenhuma diferença significativa foi observada nos experimentos realizados entre os perfis dos lipossomas vazios e aqueles associados com  $\beta$ -CD vazia, sugerindo uma afinidade preferencial do surfatante pela cavidade da  $\beta$ -CD.

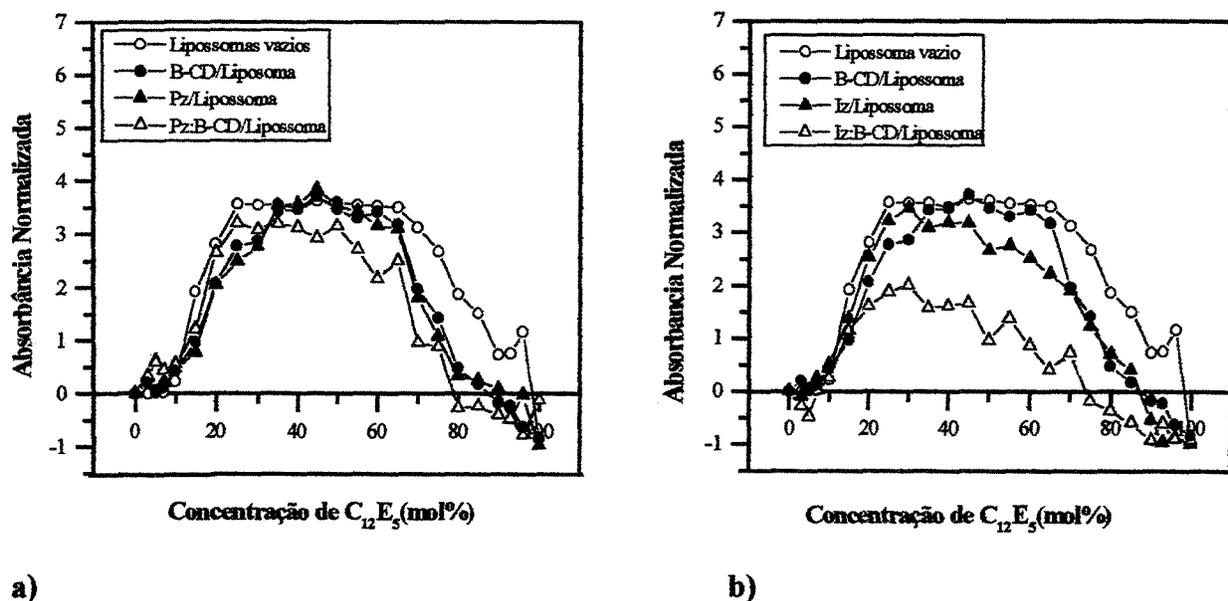


Figura 31 - Efeito da estabilidade dos lipossomas convencionais em surfatante  $C_{12}E_5$  para os vários sistemas. Condições de incubação: concentração inicial de lipídios de 1 mM; 25 °C; 2 horas.

O perfil obtido para o complexo Pz: $\beta$ -CD (Figura 31a) assemelha-se ao obtido para Pz livre, sugerindo que o fármaco é liberado da cavidade da  $\beta$ -CD. Estes resultados concordam com a evidência de interações fracas entre a Pz e a  $\beta$ -CD observados nos dados de  $H^1$ -NMR, cinética de complexação e perfis de encapsulação de Pz livre ou Pz: $\beta$ -CD nos lipossomas. Entretanto, a liberação de Iz (Figura 31b) não é evidente desde que existe diferença significativa entre os perfis de fármaco livre em relação ao respectivo complexo. A forte interação de Iz com  $\beta$ -CD, observada nos testes de  $H^1$ -NMR, cinética de complexação e perfis de associação de Iz livre ou Iz: $\beta$ -CD em lipossomas convencionais

corroboram estes resultados. Como consequência disto, um aumento de estabilidade é observado nos perfis de solubilização para a associação de Iz: $\beta$ -CD com lipossomas.

Para os sistemas contendo 3% PEG, mostrados na Figura 32 (a e b), o aumento da estabilidade é evidente em todas as preparações. Na região de transição entre 25 e 60% de tensoativo, há uma diferença marcante se comparado ao comportamento dos convencionais (Figura 31). Na associação dos complexos Pz: $\beta$ -CD e Iz: $\beta$ -CD com lipossomas “Stealth”, observa-se maior estabilidade das vesículas, evidenciando a maior interação dos complexos Pz: $\beta$ -CD e Iz: $\beta$ -CD com as vesículas e que, neste caso, associada às cadeias de PEG, confere-lhes ainda maior estabilidade, dificultando a penetração do tensoativo e evitando consequente desestabilização dos sistemas, o que é observado apenas em altas concentrações de tensoativo, ou seja, da ordem de 70% de C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>.

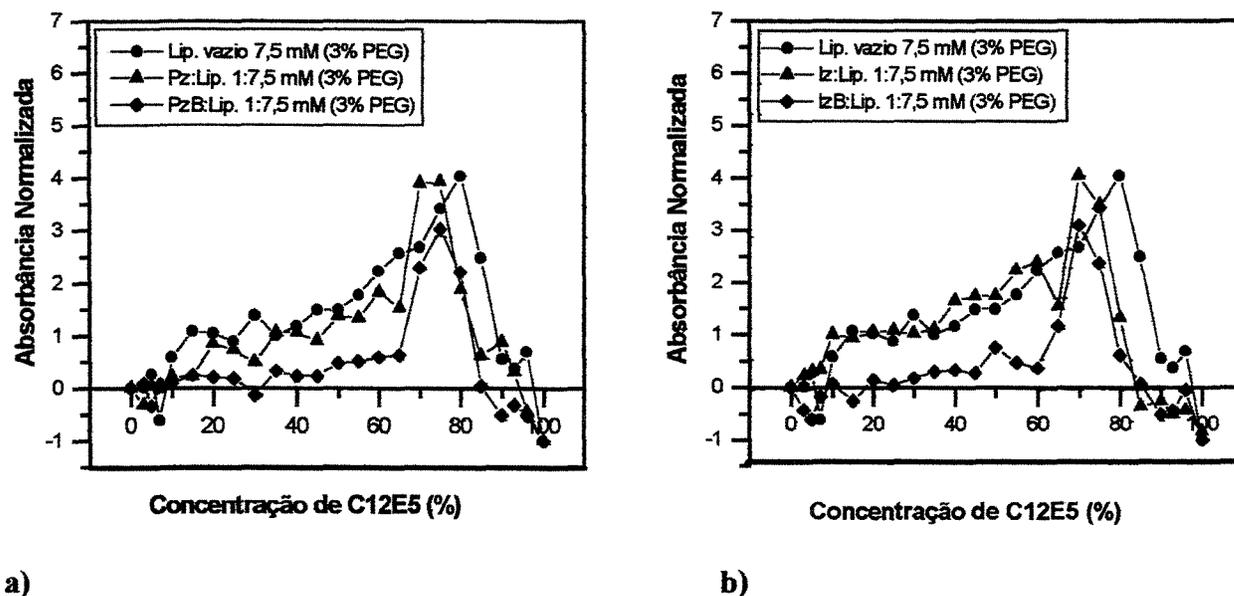


Figura 32 - Efeito da estabilidade dos lipossomas “Stealth” em surfatante C<sub>12</sub>E<sub>5</sub> para os vários sistemas. Condições de incubação: concentração inicial de lipídios de 1 mM; 25 °C; 2 horas.

A maior estabilidade obtida pela associação de complexos de  $\beta$ -CD com lipossomas pode melhorar a estabilidade das vesículas em fluidos biológicos, prolongando o tempo de circulação destas preparações em aplicações *in vivo* e reduzindo a liberação das drogas dos carreadores.

### 5.3.3 Liberação dos complexos fármaco: $\beta$ -CD de lipossomas

As Figuras 33 e 34 representam os dados experimentais obtidos pelo monitoramento da liberação *in vitro* dos fármacos Pz e Iz complexados em  $\beta$ -CD associados aos lipossomas dos tipos convencional e “Stealth”, bem como os respectivos perfis de liberação calculados pelo modelo difusivo usado na seção 5.2.4. Os quadros menores destacam a liberação em 1 hora, onde ocorre a maior taxa de liberação dos fármacos.

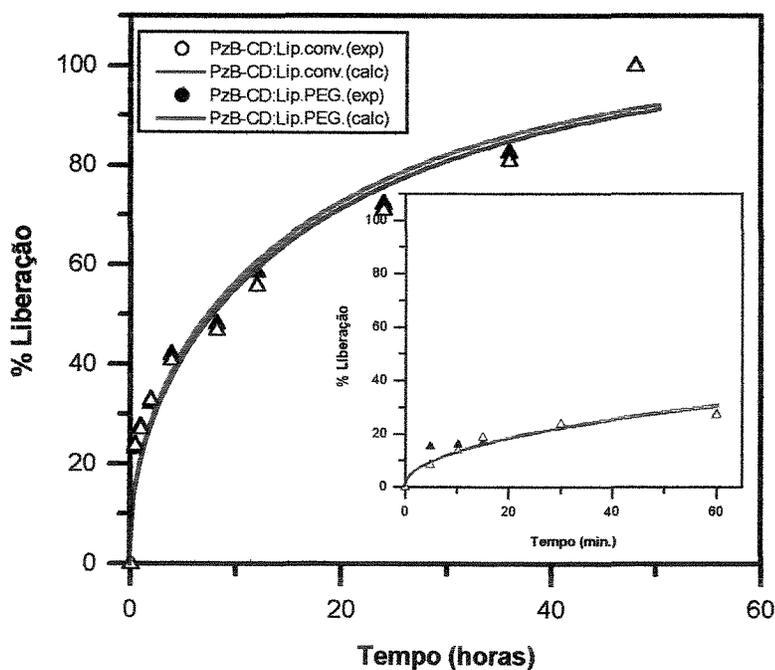


Figura 33 - Perfis de liberação do fármaco Pz complexado em  $\beta$ -CD e associado a lipossomas convencional ou “Stealth”.

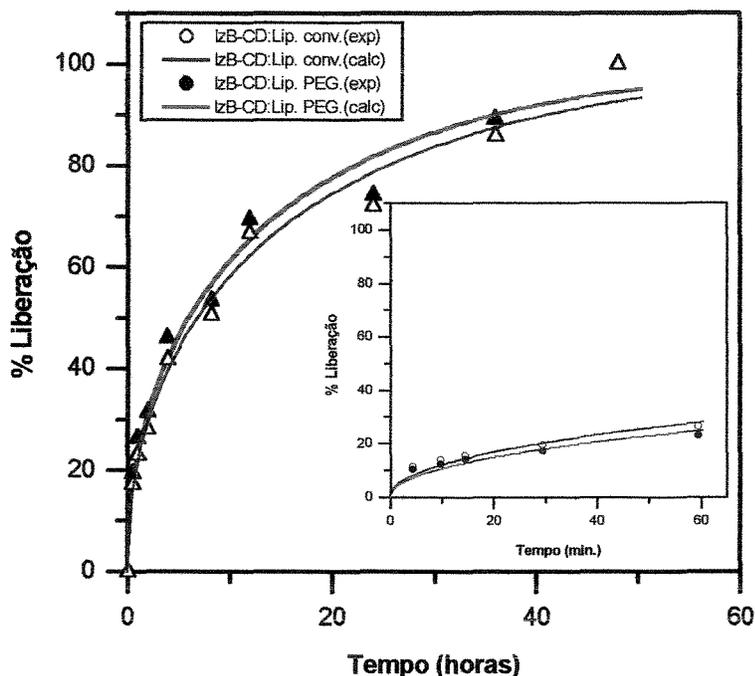


Figura 34 - Perfis de liberação do fármaco Iz complexado em  $\beta$ -CD e associado a lipossomas convencional ou "Stealth". Razão molar 5:7,5 mM Iz: $\beta$ -CD/lipídio.

Dos perfis apresentados nas Figuras 33 e 34, bem como os valores dos coeficientes de permeabilidade, P, mostrados na Tabela 24, pode-se observar que para os fármacos na forma de complexos em  $\beta$ -CD e associados com lipossomas, a taxa de liberação é a mesma para lipossomas convencionais e "Stealth" resultando em coeficientes da mesma ordem de grandeza independente do sistema, e idênticos aos observados para os fármacos livres em lipossomas "Stealth" (Tabela 24). Entretanto, para o caso dos complexos, o coeficiente P representa não a permeabilidade na membrana, uma vez que supõe-se que a  $\beta$ -CD está associada na superfície, mas representa a resistência à liberação do fármaco que, nesse caso, é resultante da liberação da cavidade da ciclodextrina e deslocamento na camada de água adjacente à superfície dos lipossomas.

Tabela 24 - Valores da constante k e do coeficiente de permeabilidade (P) obtidos para ambos os tipos de lipossomas.

Tipos de Lipossomas	Razões (D/L)iniciais			
	(Pz/L)=0,67		(Iz/L)=0,67	
	k (h <sup>-1</sup> )	P	k (h <sup>-1</sup> )	P
Convencional	4,1585 x 10 <sup>-3</sup>	2,56 x 10 <sup>-12</sup>	5,1073 x 10 <sup>-3</sup>	3,03 x 10 <sup>-12</sup>
“Stealth”	3,9319 x 10 <sup>-3</sup>	1,82 x 10 <sup>-12</sup>	4,4671 x 10 <sup>-3</sup>	2,20 x 10 <sup>-12</sup>

(D/L) – Razões droga/lipídio

k – Constante de difusividade da droga

P – Permeabilidade da droga

A formação de uma proteção exercida pela β-CD na superfície dos lipossomas foi anteriormente citada nos resultados da associação dos complexos com lipossomas e da solubilização no tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>. Por outro lado, como comentado no parágrafo anterior, há evidência na literatura que a β-CD não entra no lipossoma reforçando hipótese apresentada neste trabalho (NISHIJO & MIZUNO, 1998).

#### 5.4 Testes *in vitro* de hemólise celular e atividade antimicrobacteriana

Os testes *in vitro* de hemólise celular e atividade antimicrobacteriana foram estudados conforme a disposição dos ensaios apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 – Disposição geral dos ensaios realizados para os testes *in vitro* de hemólise celular e atividade antimicrobacteriana.

ENSAIOS REALIZADOS	APRESENTAÇÃO DO ENSAIO NO ITEM
Testes de hemólise induzida	Metodologia – 4.2.6 Resultados – 5.4.1
Suscetibilidade bacteriana	Metodologia – 4.2.7 Resultados – 5.4.2

##### 5.4.1 Testes de hemólise induzida

Neste experimento foi avaliado o efeito hemolítico dos fármacos Pz, Iz e Et, da  $\beta$ -CD e dos respectivos complexos droga: $\beta$ -CD. Os resultados obtidos mostram que para todos os fármacos na forma livre, o efeito hemolítico em condições isosmóticas e hematócrito 0,15% até o limite das concentrações testadas não existe, ou seja, para Pz < 75 mM, Iz < 90 mM e Et < 0,250 M. Até essas concentrações a membrana eritrocitária é capaz de incorporar os fármacos sem que a lise ocorra. A  $\beta$ -CD livre é lítica em baixas concentrações ( $C^{\text{SAT}} = 1,2$  mM), como mostrado na Figura 35. Concentrações maiores de  $\beta$ -CD levarão à desorganização da estrutura e conseqüente lise celular. Quando a lise celular ocorre, a liberação de hemoglobina causa um brusco aumento das absorvâncias das soluções. Para os complexos fármaco: $\beta$ -CD, verifica-se que o efeito hemolítico da  $\beta$ -CD livre é revertido, e os complexos apresentam efeito protetor como mostrado na Figura 36a. O mesmo efeito é observado para o Et: $\beta$ -CD em razões molares 1:1 e 1:2. Entretanto, o complexo Et: $\beta$ -CD à razão molar 1:4 lisa as células. O efeito protetivo ocorre até a concentração de aproximadamente 1 mM, acima dessa concentração ocorre a lise celular,

provavelmente por causa da concentração elevada de ciclodextrina na razão molar final fármaco:  $\beta$ -CD (Figura 36b).

Uma explicação para a ausência do efeito hemolítico quando a  $\beta$ -CD tem a sua cavidade ocupada com o fármaco, é a inibição da captura dos lipídios da membrana celular, que provavelmente ocorre quando a  $\beta$ -CD está vazia, resultando na lise das células.

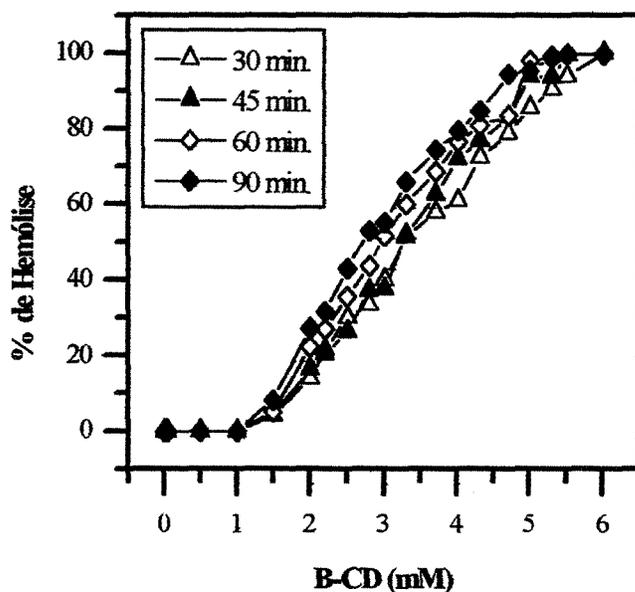


Figura 35 - Efeito de hemólise induzida por  $\beta$ -CD livre em meio isotônico. Volume de hemácias = 0,15% em tampão PBS, pH 7,4. Tempo de incubação 30, 45, 60 e 90 minutos, a temperatura ambiente.

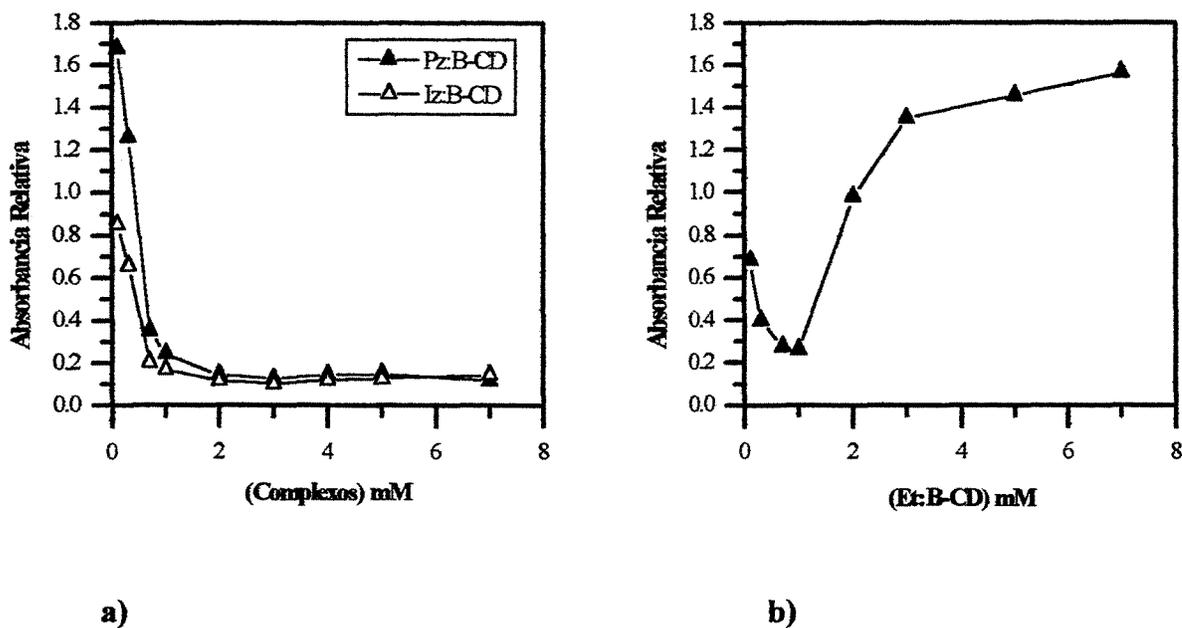


Figura 36 - Efeito protetor dos complexos fármaco:β-CD na a hemólise hipotônica. Volume de hemácias = 0,15% em tampão PBS com 78 mM NaCL, pH 7,4 e 22 °C. a) Pz:β-CD e Iz:β-CD; b) Et:β-CD.

#### 5.4.2 Suscetibilidade bacteriana

Os resultados dos testes de susceptibilidade de três linhagens do *Mycobacterium tuberculosis*, cultivadas em meio sólido para ação dos fármacos livres, complexados em β-CD e encapsulados em lipossomas (convencional e “Stealth”) são ilustrados na Tabela 26.

Os resultados foram obtidos a partir de dois cultivos independentes e representam a média das amostras em duplicata. A sensibilidade ou resistência das três espécies foi similar para todos os sistemas. Estes resultados indicam que a ação dos fármacos ao *Mycobacterium tuberculosis* é independente da encapsulação em β-CD ou em lipossoma (convencional ou “Stealth”), para o caso em estudo.

Tabela 26 - Atividade antibacteriana de três linhagens do *Mycobacterium tuberculosis* aos fármacos nos vários sistemas estudados.

Fármaco (diluições)		Identificação das Espécies											
		Estado do Fármaco											
		315/98				549/98				2087/98			
		Livre	β-CD	Lipos. Conv.	Lipos. Stealth	Livre	β-CD	Lipos. Conv.	Lipos. Stealth	Livre	β-CD	Lipos. Conv.	Lipos. Stealth
Pz	10 <sup>-3</sup>	R30%	AS	R 5%	R 20%	R 30%	R 30%	R 35%	R 30%	R 2%	R 8%	R 12%	R 20%
	10 <sup>-5</sup>	R alta	AS	R 40%	R 25%	R alta	R alta	R alta	R 40%	R alta	R alta	R alta	R alta
Iz	10 <sup>-3</sup>	AS	AS	AS	AS	AS	R 30%	AS	AS	AS	R 36%	AS	AS
	10 <sup>-5</sup>	AS	AS	AS	AS	AS	R 6%	R 3%	R 5%	AS	R 6%	AS	AS
Et	10 <sup>-3</sup>	R 30%	AS	-	-	AS	AS	-	-	AS	AS	-	-
	10 <sup>-5</sup>	R alta	AS	-	-	AS	AS	-	-	AS	AS	-	-

AS – Alta sensibilidade

R – Resistência, percentagem e níveis de susceptibilidade nos meios de dois ensaios independentes.

## CAPÍTULO VI

### 6.1 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A associação dos medicamentos de primeiro tratamento da Tuberculose Pirazinamida (Pz) e Isoniazida (Iz) em lipossomas dos tipos convencional e “Stealth” é efetiva tanto na forma livre como encapsulada em  $\beta$ -CD, produzindo sistemas de liberação controlada.
- Pirazinamida e Isoniazida formaram complexos de inclusão verdadeiros com a  $\beta$ -CD na razão estequiométrica 1:1. A complexação dos fármacos em  $\beta$ -CD foi adequadamente representada por um modelo cinético de duas etapas.
- Pirazinamida e Isoniazida foram encapsulados em lipossomas dos tipos convencional e “Stealth” com eficiências máximas de 14,2% para Pz e 10,0% para Iz correspondendo às razões fármaco/lipídio (F/L) finais de 0,019 e 0,013, respectivamente.
- A encapsulação dos fármacos Pz e Iz nos lipossomas convencionais não produziu alteração significativa no empacotamento da membrana lipídica. Entretanto, a presença de 3% PEG na superfície destas vesículas aumentou consideravelmente a estabilidade da bicamada.
- A liberação total dos fármacos Pz e Iz em ambos os tipos de lipossomas foi verificada em ensaios *in vitro* ser da ordem de 8 h para os lipossomas convencionais e aproximadamente 24 h para o “Stealth”. Os perfis de liberação foram ajustados

satisfatoriamente por modelo matemático de difusão de solutos em esferas porosas. Os coeficientes de permeabilidade,  $P$ , dos fármacos nas membranas foram da ordem de  $3,54 \times 10^{-11}$  para Pz e  $6,93 \times 10^{-12}$  para Iz nos lipossomas convencionais, e cerca de  $4,83 \times 10^{-12}$  para Pz e  $3,64 \times 10^{-12}$  para Iz no “Stealth”.

- Complexos de inclusão fármaco: $\beta$ -CD foram associados aos lipossomas convencionais e “Stealth”. As quantidades máximas de fármacos associados foram 0,017 mg/mL para Pz e 0,018 mg/mL para Iz nos lipossomas convencionais e cerca de 0,020 mg/mL de Pz e 0,026 mg/mL de Iz para os “Stealth”. A associação Iz: $\beta$ -CD/lipossoma convencional aumentou a estabilidade da membrana lipídica ao ataque de tensoativo. Esta estabilidade foi ainda maior para o lipossoma com PEG. Para o complexo Pz: $\beta$ -CD/lipossoma este aumento só foi observado para a associação com PEG, sugerindo provável dissociação do fármaco da cavidade da  $\beta$ -CD.
- Para os fármacos Pz e Iz encapsulados e associados aos lipossomas, as taxas de liberação foram semelhantes, confirmando a hipótese da associação da  $\beta$ -CD na superfície dos lipossomas.
- Os ensaios de hemólise em meio isotônico mostraram que a  $\beta$ -CD induz a hemólise celular em concentrações acima de 1 mM. Os fármacos Pz, Iz e Etambutol (Et) nas formas livres não exerceram efeitos hemolíticos quando tratados nas concentrações terapêuticas. Pz e Iz na forma de complexos em  $\beta$ -CD foram capazes de reverter o efeito hemolítico, ao contrário do que foi observado para Et: $\beta$ -CD (1:4).
- Os resultados de suscetibilidade bacteriana em meio sólido para fármacos livres, encapsulados em  $\beta$ -CD, lipossoma convencional ou “Stealth”, indicaram atividade

antibacteriana semelhantes, sugerindo que a ação dos fármacos independe de eventual liberação dos sistemas.

- O desenvolvimento da tecnologia de associação de medicamentos de primeiro tratamento da tuberculose em lipossomas e ciclodextrinas é promissora, e representa um avanço em relação às formulações convencionais. Os benefícios potenciais desse novo sistema estão no aumento do índice terapêutico dos fármacos e na redução da frequência de sua administração.

## **6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

A seguir são enumerados alguns pontos que poderão ser estudados dando continuidade a este estudo:

- Estudos de preparação, caracterização e liberação de fármacos encapsulados em derivados de  $\beta$ -CD que possibilite trabalhar com faixas de razões (F: $\beta$ -CD/L) iniciais maiores que às utilizadas.
- Avaliação mais efetiva da associação dos complexos fármaco: $\beta$ -CD na superfície dos lipossomas, por exemplo, utilizando análises de ressonância magnética nuclear de fósforo ( $^{31}\text{P}$ -NMR).
- Estudos *in vivo* das formulações desenvolvidas contendo os fármacos Pz e Iz contra o *Mycobacterium tuberculosis*.
- Estudo da encapsulação de fármacos e complexos fármaco: $\beta$ -CD por métodos que possibilitem fácil escalonamento do processo.

## CAPÍTULO VII

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERBI, D., BOVIS, G., CARLI, F., PASINI, M., PAVESI, L. and PEVERI, T. Biopharmaceutical optimisation of  $\beta$ -CD inclusion compounds. *Drug Invest.*, vol, 2 (Suppl. 4), p. 29 - 42, 1990.
- AGARWAL, A., KANDPAL, H., GUPTA, H.P., SINGH, N.B. and GUPTA, C.M. – Tuftisin-bearing liposomes as rifampin vehicles in treatment of tuberculosis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, p. 588-593, 1994.
- ALLEN, T. M., RYAM, J. and PAPAHADJOPOULOS, D. Gangliosides reduce leakage of aqueous - space markers form liposomes in the presence of human plasma. *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 818, p. 205 - 210, 1985.
- ALLEN, T.M., HANSEN, C., MARTIN, F., REDEMAN, C. and YAU-YOUNG, A. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly (ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1066, p. 29 – 36, 1991.
- BARENHOLZ, Y. and CROMMELIN, D. A. Liposomes as pharmaceutical dosage forms. In: Swarbrick, J. and Boylan, J.C. - Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, vol. 9, Marcel Dekker Inc., New York, p. 1 - 39, 1994.
- BARRY, C.E. New horizons in the treatment of tuberculosis. *Biochem. Pharmacol.*, vol. 54, p. 1165-1172, 1997.
- BEKERS, O., UIJTENDAAL, E., BEIJNEN, J. H., BULT, A. and UNDERBERG, W.J.M. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Dev. Ind. Pharmacy*, vol. 17, p. 1503 - 1549, 1991.
- BENDER, H. Production, characterization and application of cyclodextrins. In: LISS, A.R. *Adv. Biotechn. Proc.*, vol. 6, p. 31 - 71, 1986.
- BLUME, G. and CEVC, G. Liposomes for the sustained drug release *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1029, p. 91 - 97, 1990.

- DEOL, P., KHULLER, G.K. and JOSHI, K. – Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, p. 1211-1214, 1997.
- DeRIEMER, K., RUDOY, I., SCHECTER, G.F., HOPEWELL, P.C., DALEY, C.L. – The epidemiology of tuberculosis diagnosed after death in San Francisco, 1986-1995. *Int. Journal Tuberc. Lung Dis.*, vol.3, p. 488-493, 1999.
- DJEDAINÉ, F. and PERLY, B. Anthraquinone sulphonate as a general purpose shift reagent for the NMR analysis of cyclodextrins. *Magn. Chem.*, vol. 28, p. 372 - 378, 1990.
- DOUGLAS, H.L. and STEYN, L.M. – A ribosomal gene mutation in Streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Infect. Dis.*, vol. 167, p. 1505-1505, 1993.
- DRAPER, N.R. and SMITH, H. Applied regression analysis. John Willey & Sons Inc., 1981. 2<sup>nd</sup> Edition.
- DUCHÊNE, D. New trends in pharmaceutical applications of cyclodextrins inclusion compounds. In: HUBER, O. and SZEJTLI, J. eds. Proceedings of the fourth international symposium on cyclodextrins, *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, p. 265 – 275, 1988.
- DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their industrial uses. Editions de Santé, Paris, 1987.
- DUVAL, P., LEVENES, H. and BOULAHBAL, F. The prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in New Caledonia, 1995 – 1996. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol 3, p. 219 – 223, 1999.
- EDWARDS, K., ALMGREN, M., BELLARE, J. and BROWN, W. Effects of triton X-100 on sonicated lecithin vesicles. *Langmuir*, vol. 5, p. 473 - 478, 1989.
- EDWARDS, K and ALMGREN, M. Kinetics of surfactant-induced leakage and growth of unilamellar vesicles. *Progr. Coll. & Sci.*, vol. 82, p. 190 - 197, 1990.

- EDWARDS, K and ALMGREN, M. Solubilization of lecithin vesicles by C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>. *J. Coll. Interf. Sci.*, Vol. 147, n 1, p. 1 - 21, 1991.
- EDWARDS, K and ALMGREN, M. Surfactant - induced and structural change of lecithin vesicles: effect of surfactant headgroup soze. *Langmuir*, vol. 8, p. 824 - 832, 1992.
- ELORZA, B., ELORZA, M.A., FRUTOS, G and CHANTRES, J.R. Characterization of 5-fluoracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-tawing extrusion methods: study of drug release. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1153, p. 135-142, 1993.
- FLOREY, K. Analytical profiles of drug substances, vol. 5, p. 467-513, 1976.
- FLOREY, K. Analytical profiles of drug substances, vol. 6, p. 183-258, 1977.
- FLOREY, K. Analytical profiles of drug substances, vol. 7, p. 231-249, 1978.
- FORD, N. C. Jr. In: Dynamic light scattering. PECORA, R. (Ed.), *Plenum*, p. 7 - 57, 1985.
- FOX, W. General considerations in the choice and management of regimens of chemotherapy for tuberculosis. *Bull. Int. Tuberc.*, vol. 47, p. 49 - 67, 1972.
- FRÖMMING, K. Cyclodextrin in pharmaceutical industry. In: SZEJTLI, J. (Ed.) The first international symposium on cyclodextrin , D. Riedel Publishing Company, Dordrecht, p. 367 – 376, 1982
- FUJIWARA, S., KAKIHARA, H., WOO, K., LEJEUNE, A., KANEMOTO, M., SAKAGUCHI, K. and IMANAKA, T. Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH<sub>2</sub> - terminal region of the enzyme. *App. Environm. Microb.*, vol. 58, p. 4016 - 4025, 1992.
- GAENSLER, E. A. The surgery for pulmonary tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 125, p. 73 - 84, 1982.
- GABIZON, A. and PAPAHAJIOPOULO, D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1103, p. 94 -100, 1992.

- GIRLING, D.J. Hepatic toxicity of antituberculosis regimes containing isoniazid, rifampicin and pyrazinamide. *Tubercle*, vol. 59, p. 13-32, 1978.
- GRANGE, J.M. – Immunotherapy: a new strategy for tuberculosis control ? *Resp. Med.*, vol. 91, p. 1-4, 1997.
- GRANGE, J.M. – The mystery of the mycobacterial ‘persistor’. *Tuberc. Lung Dis.*, vol. 73, p. 249-251, 1992.
- GROSSET, J.H. Bacteriological basis of chemotherapy of tuberculosis, In Regional Seminar on Tuberculosis Chemotherapy, 3, Washington, 1979. **Proceedings.** Washington, p. 32 – 36, 1979.
- GROSSET, J.H. Current problems with tuberculosis treatment. *Res. Microbiol.*, vol 147, p. 10 –16, 1996.
- GRUMBACH, F. and RIST, N. Activité antituberculeuse expérimentale de la rifampicine, dérivé de la rifamycine. *Rev. Tuberc. Pneum.*, 31, 749, 1967.
- GUIRARDELLO, R. Diagramas de fases de temperaturas e otimização de reatores catalíticos – trocadores de calor por simulação numérica, 1989.
- GURUMURTHY, P., RAMACHANDRAN, G., VIJAYALAKSMI, S., KUMAR, A.R.H. and PRABHAKAR, R. Bioavailability of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in triple drug formulation: comparison of plasma and urine kinetics. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, vol. 3, p. 119-125, 1999.
- GUY, R. H.; HADGRAFT, J.; KELLAWAY, W. and JOAN TAYLOR, M. Calculation of drug release rates from spherical particles. *Int. J. Pharm.*, vol. 11, p. 199 - 207, 1982.
- HART, C.A., BEECHING, N.J. and DUERDEN, B.I. – Tuberculosis into the next century. *J. Med. Microbiol.*, vol. 44, p. 1-34, 1996.
- HARRIS, E.L.V. and ANGAL, S. Protein purification methods: A practical approach. Oxford University Press, New York, 296 – 299, 1989.
- HAWKINS, J. E., WALLACE JR., R. J. and BROWN B. Antibacterial susceptibility testes: Mycobacteria. In: *Manual of Clinical Microbiology* (5th Ed.) 1138 - 1157, 1991.

- HEYM, B. and COLE, S.T. Multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Antimicrob., Ag.*, vol. 8, p. 61-70, 1997.
- HIRAGA, Y. and KINOSHITA, T. Post column derivatization of guanidino compounds in high-performance liquid chromatography using ninhydrin. *Journal of Chromatography*, vol. 226, p. 43 - 51, 1989.
- HORIKOSHI, K. Production and industrial applications of  $\beta$ -cyclodextrin. *Process Biochem.*, vol. 14, p. 26 - 30, 1979.
- INDERLIED, C.B. Antimycobacterial agents: *in vivo* susceptibility testing, spectrums of activity, mechanisms of action and resistance and assays for activity in biological fluids. Em: *Antiotics in laboratory medicine*. Ed. Lorian V. New York. Williams and Wilkins. p. 134-197, 1991.
- ISEMAN, M.D. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, vol. 329, p. 784-791, 1993.
- ISRAELACHVILI, J. *Intermolecular & surface forces - 2ª Edição*, San Diego, 1994.
- JUSTO, O.R. Preparação, caracterização de lipossomas para a administração por inalação de compostos terapêuticos utilizados na terapia da Tuberculose. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, S.P., 1999.
- KHOMENKO, A.G. – The variability of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with cavitory pulmonary tuberculosis in the course of chemotherapy. *Tubercle*. vol 68, p. 243-253, 1987.
- KILBURN, J.O. and GREENBERG, J. Effect of ethambutol on the viable cell count in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 11, p. 534-540, 1977.
- KIM, T., LEE, Y. and KIM, H. Enzymatic production of cyclodextrins from milled corn starch in an ultrafiltration membrane bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 41, p. 89 - 94, 1993.

- KLIBANOV, A. L., MARUYAMA, K., TORCHILIN, V. P. and HUANG, L. Amphipatic polyethyleneglycol effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*, vol. 268, n 1, p. 235 - 237, 1990.
- KOGA, H., MIYAZAKI, Y., KOHNO, S. and HARA, K. A drug delivery system and biological response modifiers for the treatment of Mycobacterial infection. *Kekkaku*, vol. 69, n 2, p. 113 - 118, 1994.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANOLA, W.N., SCHRECKENBERG, P.C. and WINN, W.C.J. – Mycobacteria. In: KONEMAN, E.W. & ALLEN, S.D. eds. 1992. *Diagnost microbiology*, Lippincott, Philadelphia. p. 703-755, 1992.
- KONO, K., IGAWA, T. and TAKAGISHI, T. Cytoplasmic delivery of calcein mediated by liposomes modified with a pH-sensitive poly(ethylene glycol) derivative. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1325, p. 143 –154, 1997.
- KURUNOV, I.U.N., URSOV, I.G., KRASNOV, V.A., PETRENKO, T.I., IAKOVCHENKO, N. N., SVISTELNIK, A.V. and FILIMONOV, P.A. Effectiveness of liposomal antibacterial drugs in the inhalation therapy of experimental tuberculosis. *Probl. Tuberk.*, p. 1, 38 - 40, 1995.
- LASIC, D. D. , MARTIN, F.J., GABIZON, A., HUANG, S.K. and PAPAHADJOPOULOS, D. - Sterically stabilized liposomes: a hipotesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1070, p. 187 - 192, 1991.
- LASIC, D. D. and MARTIN, F. *Stealth lipossomes*, CRC Press Inc., Boca Raton, 1995.
- LASIC, D. D. *Liposomes: from physics to applications*. Amsterdam: Elsevier. Elsevier Science Publishrs B. V., 1993.
- LASIC, D. D. *Lipossomes*. *Am. Sci.*, vol. 80, p. 20 - 31, 1992
- LASIC, D. D. The mechanism of vesicle formation. *J. Biochem.*, vol. 256, p. 1 - 11, 1988.
- LE BAS, G. and RYSANEK, N. Structural aspects of cyclodextrins. In: DUCHÊNE, D. *Cyclodextrins and their industrial uses*, Editions de Santé, Paris, p. 107 – 130, 1987.

- LEE, J., CHOI, K., CHOI, J., LEE, Y., KNOW, I. and YU, J. Enzymatic production of  $\alpha$ -cyclodextrin with the cyclomalto-dextrin glucotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19 - 1. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 14, p. 1017 -1020, 1992.
- LEE, Y. and KIM, H. Enhancement of enzymatic production of cyclodextrins by organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 13, 499 - 503, 1991.
- LICHTENBERG, D. Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 821, p. 470 – 478, 1985.
- LIN, S. Y. and KAO, Y. H. Solid particulates of drug- $\beta$ -CD inclusion complexes directly prepared by a spray-drying technique. *Int. J. Pharm.*, vol. 56, p. 249 - 259, 1989.
- LOFTSSON, T. and BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.*, vol. 85, p. 1017-1025, 1996.
- LOUKAS, Y., GREGORIADIS, G. and JAYASEKERA, P. Characterization and photoprotection studies of a model  $\gamma$  - cyclodextrin - included photolabile drug entrapped in liposomes incorporating light absorbers. *J. Phys. Chem.*, vol. 99, 11035 - 11040, 1995.
- MADDEN, T.D., HARRIGAN, P.R., TAI, L.C.L., BALLY, M.B., MAYER, L.D., REDELMEIER, T.E., LOUGHREY, H.C., TILCOCK, C.P.S., REINISH, L.W. and CULLIS, P.R. The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey. *Chem. Physic. Lipids*, vol. 53, p. 37 – 46, 1990.
- MAHMOUDI, A. and ISEMAN, M.D. Pitfalls in the care of patients with tuberculosis: common errors and their association with the acquisition of drug resistance. *J. Am. Med.*, vol. 270, p. 65-68, 1993.
- MAHROUS, M. E. Sensitive spectrophotometric methods for determination of non UV absorbing ethambutol. *Analyt. Lett.*, vol. 25, p. 269 - 280, 1992
- MALHEIROS, S. V. P., DE PAULA, E. and MEIRELLES, N.C. Contribution of trifluoperazine/lipid and drug ionization to hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1373, p. 332 - 340, 1998.

- MATTSSON, P., KORPELA, T., PAAVILAINEN, S. and MÄKELÄ, M., Enhanced conversion of starch to cyclodextrins in ethanolic solutions by *Bacillus circulans* var *alkalophilus* cyclomaltodextrin glucanotransferase. *Appl. Biochemistry Biotechnol.*, vol. 30, p. 17 - 28, 1991.
- MAYER, L.D., TAI, L.C.L., BALLY, M.B., MITILENES, G.N., GINSBERG, R.S. and CULLIS, P.R. Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1025, p. 143 – 151, 1990.
- MAYER, L.D., BALLY, M.B., HOPE, M.J. and CULLIS, P.R. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, vol 40, p. 333 – 345, 1986.
- McCOMARCK, B. and GREGORIADIS, G. – Drugs-in-Cyclodextrins-in Liposomes: A novel concept in drug delivery. *Int. J. Pharm.*, vol.112, p. 249-258, 1994.
- McCUNE, R. M., TOMPSETT, R. and McDERMOTT, W. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissue as determined by the microbial enumeration technique II. The conversion of tuberculosis infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J. Exp. Med.*, vol. 104, p. 763 - 802, 1956.
- MEDDA, S., DAS, N., MAHATO, S. B., MAHADEVAN, P. R. and BASU, M. K. Glycoside-bearing liposomal delivery systems against Macrophago-Associated disorders involving *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J. Biochem. Biophys.*, vol. 32, n 3, p. 147 - 151, 1995.
- MICARONI, A. Estudo da inclusão molecular de produtos de interesse farmacológico utilizando ciclodextrinas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, p. 6 - 13, 1994.
- MORAES, Â.M. Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade de lipossomas contendo o-carboranilpropilamina, L-p-boronofenilamina e doxorubicina. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, S.P., 1996.

- MORIBE, K, MARUYAMA, K. and IWATSURU. Molecular localization and state of amphotericin B in PEG liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, vol 193, p. 97 – 106, 1999.
- NEW, R. Liposomes: A practical approach. Oxford University Press, Oxford. 1990.
- NILSSON, K., ALMGREN, M., BROWN, W. and JANSSON, M. Effects of a non-ionic surfactant on small unilamellar lecithin vesicles. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, vol. 152, p. 181 - 203, 1987.
- NISHIJO, J., NAGAI, M., YASUDA, M., OHNO, E. and USHIRODA, Y. Interaction of 6-*p*-Toluidinylnaphthalene-2-sulfonate with  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.*, vol. 84, n 12, p. 1420 - 1426, 1995.
- NISHIJO, J., USHIRODA, Y., OHBORI, H., SUGIURA, M. and FUJII, N. The interaction of 1-naphthalenesulfonate with  $\beta$ -cyclodextrin. Studies by Calorimetry and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 45, n 5, p. 899 - 903, 1997.
- NISHIJO, J. and MIZUNO, H. Interactions of cyclodextrins with DPPC liposomes. Differential Scanning Calorimetry Studies. *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 46, n.1, p. 120 - 124, 1998.
- NSKK - NIHON SHOKUHIN KAKO Co., LTD. CELDEX (cyclodextrins) Technical data. 2 ed. p 13, 1983.
- NUNHEZ, J.R. Método spline modificado: Acoplamento do método spline ao método da máxima verossimilhança, 1990. Campinas – Brasil.
- OH, Y.K., NIX, D.E. and STRAUBINER, R.M. Formulation and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular *Mycobacterium avium* infection. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, vol.39, p. 2104-2111, 1995.
- OLIVEIRA, A.G., SCARPA, M.V. e LEITE, C.Q.F. – Lipossomas: Estratégia biotecnológica para liberação controlada e direcionamento intracelular de fármacos com efeito antimicobacteriano. *Rev. Ciênc. Farmac.*, vol. 18 (1), p. 109-121, 1997.
- OSTRO, M. J. Lipossomes. *Sci. Am.*, vol. 256, n 1, p. 90 - 99, 1987a.

- OSTRO, M. J.(ed.) Lipossomes - from biophysics to therapeutics, Marcel Dekker, NY, 1987b.
- PAPAHADJOPOULOS, D., ALLEN, T.M., GABIZON, A., MAYHEW, E., MATTHAY, K., HUANG, S. K., LEE, K. D., WOODLE, M. C., LASIC, D. D., REDEMANN, C. and MARTIN, F. J. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, p.11460 - 11464, 1991.
- PERSON, M.J., JERED, J.A., FRIEDEN, T.R., CRAWFORD, J.Y., DAVIS, B.J., DOOLEY, S.W. and JARVIS, W.R. – Nosocomial transmission of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann. Int. Med.*, vol. 117, n 3, p. 191-196, 1992.
- PREMA, P., SREEDHARAN, P., RAJA, K. and RAMAKRISHINA, S. Studies on cyclodextrin glycosyltransferase production and characterization. In: DUCHÊNE, D., ed., Minutes of 5th international symposium on cyclodextrins, Editions de Santé, Paris, p. 46 – 49, 1990.
- REICHMAN, L.B. – The U-shaped curve of cancer. *Am. Rev. Respir.*, vol. 144, 741-742, 1991.
- REYNAULD, C, LANEELLE, M.A., SENARATNE, R. H., DRAPER, P., LANEELLE, G. and DAFFE, M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology*, UK, vol 145, p. 1359 – 1367, 1999.
- RIBAS, A. M. Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, S.P., 1997.
- RUIZ, J. , GOÑI, F. M. and ALONSO, A. Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 937, p. 127 - 134, 1988.
- SAVOLAINEN, P., S., JÄRVINEN, T., TAIPALE, H., URTTI, A., Method for evaluating drug release from liposomes in skin conditions. *International Journal of Pharmaceutics.*, vol. 159, p. 27 - 33, 1997.

- SHEK, P. N., SINTRES, Z. E. and BROOKS, J. I. Liposomes in pulmonary applications: Physicochemical considerations, pulmonary distribution and antioxidant delivery. *J. Drug Target.*, vol. 2, n 5, p. 431 - 442, 1994.
- SHAWAR, R. M.; HUMBLE, D.J.; DALFSEN, J.M.V.; STOVER, C.K.; HICKEY, M.J.; STEELE, S.; MITSHER, L.A. and BAKER, W. Rapid screening of natural products for antimycobacterial activity by using luciferase-expressing strains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol.41, p. 570 – 574, 1997.
- SILER-MARINKOVIC, S., MOJOVIC, L., DAVINIC, V. and BUGARSKI, B. Liposomes as carriers of antimicrobial drugs, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 23, p. 483-488, 1997.
- SILVA, C.L., BONATO, V.L.D. and LIMA, V.M.F. – DNA encoding individual mycobacterial antigens protects mice against tuberculosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 32, 231-234, 1999.
- SINGH, A. P. and KHULLER, G. K. Induction of immunity against experimental tuberculosis with *Mycobacterial mannophosphoinositides* encapsulated in liposomes containing lipid A-FEMS. *Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 8, n 2, p. 119 - 126, 1994.
- SINGH, U.V. and UDUPA, N. Reduced toxicity and enhanced antitumor efficacy of beta-cyclodextrin plumbagin inclusion complex in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 41, p. 171-175, 1997.
- STEAD, W. W. and DUTT, A.K. Chemotherapy for tuberculosis today. *Am. Rev. Respir. Dis.*, vol. 125, p. 94 - 101, 1982.
- STEFFEN, D. M. The effect of cholesterol, phosphatidylethanolamine and immobilized horseradish peroxidase on the stability of phosphatidylcholine vesicles when treated with nonionic surfactant. Master Thesis, North Carolina State University, Raleigh, NC, EUA, 1993.
- STELLA, V.J. and RAJEWSKI, R.A. Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.*, vol. 14, p. 556-567, 1997.
- STRAUSS, I. and ERHARDT, F. Ethambutol absorption, excretion and dosage in patients with renal tuberculosis. *Chemotherapy*, vol. 15, p. 148 - 157, 1970.

- STRONG, B.E. and KUBICA, G.P. Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis*: A guide for the level II laboratory. Public Health Service. Atlanta Georgia, 1981.
- SUNAMOTO, J., KONDO, H. and YOSHIMATSU, A. Liposomal membranes I: Chemical damage of liposomal membranes with functional detergent. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 510, p. 52 - 62, 1978.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrin technology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988.
- TAKAYAMA, K. and KILBURN, J.O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 33, p. 1493-1499, 1989.
- TAWARAH, K. and KHOURI, S. An equilibrium study of p - methyl red inclusion complexes with  $\alpha$  and  $\beta$ -cyclodextrins. *Carbohydrate Research*, vol. 245, p. 165 - 173, 1993.
- TERASHIMA, M., HIBI, K. And KATOH, S. Permeability of small hydrophilic solutes in small unilamellar vesicle (SUV). *Biochemical Engineering Journal*, vol. 4, p. 77 - 79, 1999.
- TOMAN, K. Tuberculosis: detección de casos y quimioterapia. WASHINGTON, D. C. Organización Panamericana de la Salud, p. 268, 1980.
- TOMITA, K., MITSUTOSHI, K., KAWAMURA, K. and NAKAMISHI, K. Purification and properties of a cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus autolyticus* 11149 and selective formation of  $\beta$ -cyclodextrin. *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 75, p. 89 - 92, 1993.
- URBANEJA, M. A., GOÑI, F. M. and ALLONSO, A. Structural changes induced by triton X-100 on sonicated phosphatidylcholine liposomes. *Eur. J. Biochem.*, vol. 173, p. 585 - 588, 1988.
- VESPAL, A.L. In: Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Center for Disease Control and Prevention. CDC, p. 8230, 1981.

- VLADIMIRSKI, M. A. & LADIGINA, G. A. – Antibacterial activity of liposome-entrapped streptomycin in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomed. (Paris)*, vol. 36, p. 375 – 382, 1982.
- WINTERHALTER, M. and LASIC, D. D. Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. *Chem. Phys. Lipids*, vol 64, p. 35 -43, 1993.
- WOOD, D. J. <sup>1</sup>H-NMR Study of the inclusion of aromatic molecules in cyclodextrin. *Journal Am. Soc.*, vol. 99, n 6, p. 1735 - 1742, 1977.
- WOODLE, M. C., COLLINS, L. R., SPONSLER, E., KOSOVSKY, N., PAPAHAJIOPOULOS, D. and MARTIN, F. J. Sterically stabilized liposomes: reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophys. J.*, vol. 61, p. 902 - 910, 1992.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION – The World Health Report. Life in 21<sup>st</sup> century. A vision for all. Geneva. p. 92 - 93, 1998.
- ZHANG, J., HEYM, H., ALLEN, B., YOUNG, D. and COLE, S. The catalase-peroxidase gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, vol. 358, p. 591-598, 1992.

**Apêndice I - Modelo da Difusão de Solutos no Interior de Esferas Porosas**

### Modelo da Difusão de Solutos no Interior de Esferas Porosas

Uma ilustração do processo de difusão das drogas do interior de lipossomas é mostrado na Figura 37.

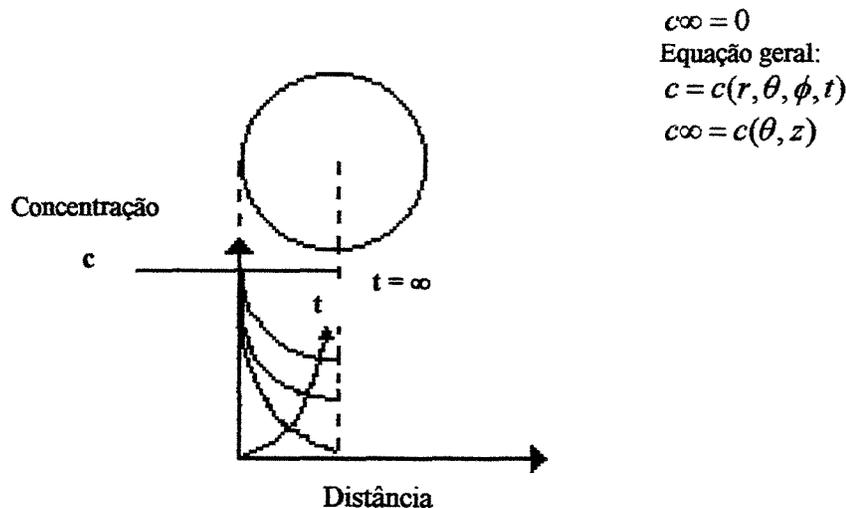


Figura 37 - Modelo físico de difusão de solutos no interior de esferas sólidas.

Nesse modelo, foram feitas as seguintes hipóteses:

- A extração do soluto dentro das esferas ocorre por difusão;
- A concentração do solvente não se altera e é sempre nula:  $c^\infty = 0$ ; (em termos práticos a quantidade de solvente é tão alta que o soluto extraído deixa apenas traços de concentração do soluto no solvente);
- A difusão é do interior das esferas sólidas para o solvente;
- O coeficiente de transferência de massa entre sólido e fluido é muito elevado;
- A concentração no exterior das esferas é igual à concentração do solvente:

$$c(r = R) = c^\infty = 0 \quad (\text{condição de contorno do modelo})$$

- Na prática  $c_{\infty}$  é constante e uniforme para uma certa esfera (e não no trecho da coluna que contém as partículas);
- Existe simetria em  $\theta$  e  $\phi$ ,  $\Rightarrow c = c(r, t)$ ;
- Propriedades físicas permanecem uniformes e constantes.

Como a difusão ocorre no interior das esferas sólidas, a equação geral para a difusão sem reação química é:

$$D \cdot \nabla^2 c = \frac{\partial c}{\partial t} + \text{div}(c \cdot \vec{v}) \quad (41)$$

Como o material é sólido:  $\vec{v} = 0$ , logo :

$$D \cdot \nabla^2 c = \frac{\partial c}{\partial t} \quad (42)$$

Para coordenadas esféricas:

$$\frac{1}{r^2} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \cdot \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{1}{D} \cdot \frac{\partial c}{\partial t} \quad (43)$$

As condições de contorno são:

$$\text{cc1} \rightarrow (\text{condição inicial}) \quad t = 0, \quad 0 \leq r \leq R \quad c(r, t) = c_{\text{int}} \quad (44)$$

$$\text{cc2} \rightarrow t > 0, \quad t > 0 \quad r = R \quad c(R, t) = c_{\infty} = 0 \quad (45)$$

$$\text{cc3} \rightarrow c(r, t) \text{ é um valor finito para } 0 \leq r \leq R \quad (46)$$

Utilizando o método de separação das variáveis:

$$c(r, t) = R(r) \cdot \theta(t) \quad (47)$$

$$\frac{\partial c}{\partial r} = R'(r).\theta(t) \quad (48)$$

$$\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} = R''(r).\theta(t) \quad (49)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = R(r).\theta'(t) \quad (50)$$

Substituindo na Eq. Diferencial Parcial (Eq.(43)), tem-se:

$$\frac{1}{r^2} \cdot \frac{\partial}{\partial r} [r^2 \cdot R'(r).\theta(t)] = \frac{1}{D} \cdot R(r).\theta'(t) \quad (51)$$

$$\frac{1}{r^2} \cdot [2r.R'\theta(t) + r^2.R''(r).\theta(t)] = \frac{1}{D} \cdot R(r).\theta'(t)$$

$$\frac{1}{r^2} \cdot [2r.R'\theta + r^2.R''\theta] = \frac{1}{D} \cdot R.\theta' \quad (52)$$

Dividindo por  $c = R.S \neq 0$ , obtém-se:

$$\frac{1}{r^2} \cdot \frac{1}{R} [2r.R' + r^2.R''] = \frac{1}{D} \cdot \frac{\theta'}{\theta} = -\lambda \text{ (constante)} \quad (53)$$

$\lambda$  é uma constante ( $\lambda > 0$  porque  $\lim_{t \rightarrow \infty} c(t)$  é valor finito)

Pode-se então separar as equações:

$$r^2.R'' + 2r.R' + \lambda^2.r^2.R = 0 \quad (54)$$

$$\theta' + \lambda.D.\theta = 0 \quad (55)$$

A partir da equação (55):  $\theta(t) = A \cdot \exp(-\lambda.D.t)$  ( $\lambda > 0$  pela cc3) (56)

Quando  $\lambda = 0 \Rightarrow \theta(t) = A$  (constante) (57)

A partir da equação (54):  $r^2 \cdot \frac{d^2R}{dr^2} + 2r \cdot \frac{dR}{dr} + \lambda.r^2.R = 0$  (58)

Definir  $y = r.R \Rightarrow R(r) = \frac{y(r)}{r}$  (59)

$$\frac{dR}{dr} = \frac{1}{r} \cdot y' - \frac{1}{r^2} \cdot y \quad (60)$$

$$\frac{d^2R}{dr^2} = \frac{1}{r} \cdot y'' - \frac{2}{r^2} \cdot y' + \frac{2}{r^3} \cdot y \quad (61)$$

Substituindo as equações (59), (60) e (61) na equação (58), tem-se:

$$r^2 \left( \frac{1}{r} \cdot y'' - \frac{2}{r^2} \cdot y' + \frac{2}{r^3} \cdot y \right) + 2r \left( \frac{1}{r} \cdot y' - \frac{1}{r^2} \cdot y \right) + \lambda r^2 \cdot \frac{y}{r} = 0 \quad (62)$$

$$r \cdot y'' - 2 \cdot y' + \frac{2 \cdot y}{r} + 2 \cdot y' - \frac{2 \cdot y}{r} + \lambda \cdot r \cdot y = 0 \quad (63)$$

$$y'' + \lambda \cdot y = 0 \quad (64)$$

Para  $\lambda = 0$ ,  $y = B_0 \cdot r + c_0$  ou  $R \cdot r = B_0 \cdot r + c_0 \Rightarrow R = B_0 + \frac{c_0}{r}$  (65)

$$\lambda > 0, \quad y = B_\lambda \cdot \text{sen}(\sqrt{\lambda} r) + c_\lambda \cdot \text{cos}(\sqrt{\lambda} r) \quad (66)$$

ou  $R = \frac{1}{r} \cdot [B_\lambda \cdot \text{sen}(\sqrt{\lambda} r) + c_\lambda \cdot \text{cos}(\sqrt{\lambda} r)]$  (67)

Pela condição de contorno cc3  $\Rightarrow C(r, t)$  é finita.

$$\lim_{r \rightarrow 0} \frac{1}{r} = +\infty \quad \text{e} \quad \lim_{r \rightarrow 0} \text{sen} \frac{(\sqrt{\lambda} r)}{r} = \sqrt{\lambda} \quad (68)$$

Portanto:  $c_0 = 0$  e  $c_\lambda = 0$  (69)

Logo:

$$c(r, t), \quad A_0 = B_0 \cdot A \quad (\lambda = 0) \quad (\text{solução em regime permanente}) \quad (70)$$

$$A_\lambda \cdot \exp(-\lambda \cdot D t) \cdot \frac{1}{r} \cdot \text{sen}(\sqrt{\lambda} r) \quad (\lambda > 0) \quad (\text{solução em regime transiente}) \quad (71)$$

Como num tempo infinito a concentração no interior da esfera é nula, então  $A_0 = 0$

Pela c.c1,  $t = 0 \quad \forall r \quad c(r, 0) = c_{\text{im}}$  (72)

Pela c.c2,  $t > 0 \quad r = R \quad c(R, t) = 0$  (73)

ou,  $A_\lambda \cdot \exp(-\lambda \cdot D t) \cdot \frac{1}{R} \cdot \text{sen}(\sqrt{\lambda} R) = 0$  (74)

Para solução não trivial, isto só é possível se  $\sqrt{\lambda} R = n\pi$ ,  $n = 1, 2, 3, \dots$  (75)

$$\lambda = \left( \frac{n\pi}{R} \right)^2 \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (76)$$

$$c(r, t) = A_n \cdot \exp \left[ - \left( \frac{n\pi}{R} \right)^2 D t \right] \cdot \frac{1}{r} \cdot \text{sen} \left( \frac{n\pi r}{R} \right) \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (77)$$

A concentração de fármaco difundido ao meio será:

$$c^*(t) = \frac{\frac{4}{3}\pi R^3 [c_{\text{int}} - c(t)]N}{V} \quad (94)$$

A concentração total de fármaco no interior dos lipossomas, expressa por unidade de volume do meio é:

$$c^*_{\text{int}} = c_{\text{int}} \left[ \frac{\frac{4}{3}\pi R^3 N}{V} \right] \quad (95)$$

onde: V = volume do meio contendo os lipossomas, e,

N = número de esferas no meio.

logo:

$$\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cdot \exp[-n^2 \pi^2 kt] \quad (96)$$

Esta equação corresponde ao modelo já calculado por GUY (1982) e citado por ELORZA (1993).

**Apêndice II – Espectros de <sup>1</sup>H-NMR dos Complexos Fármaco:β-CD**

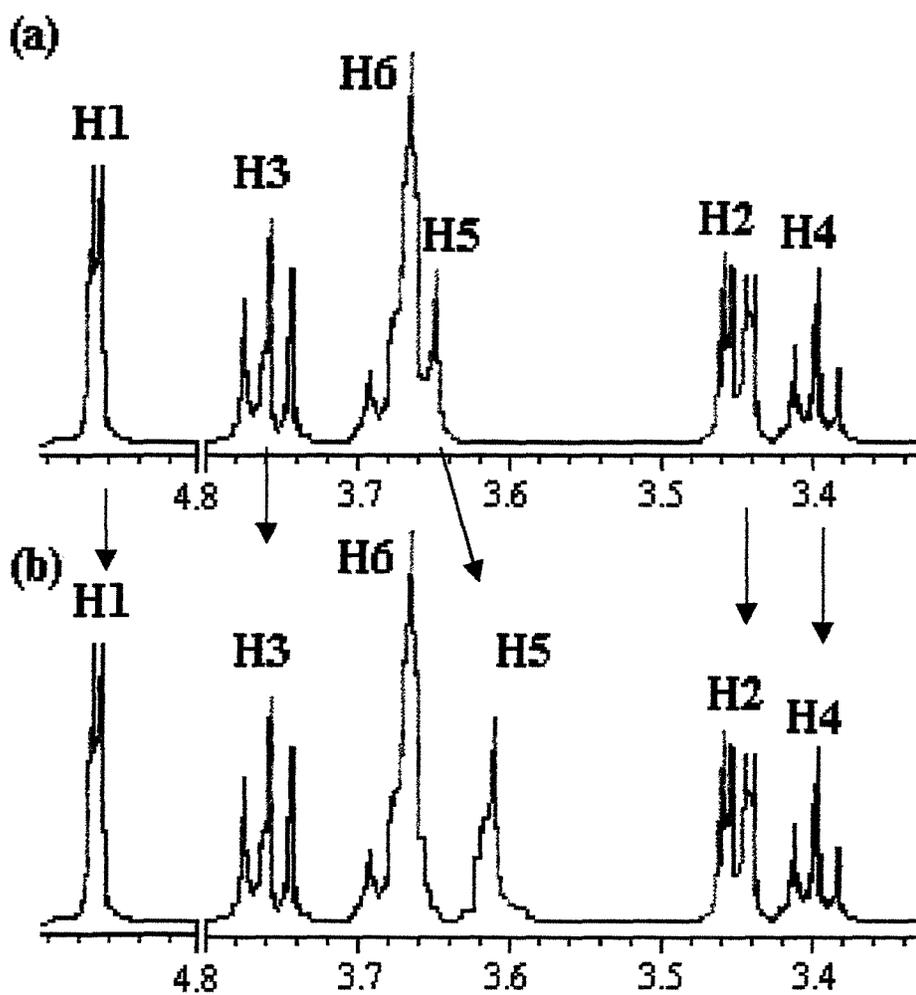
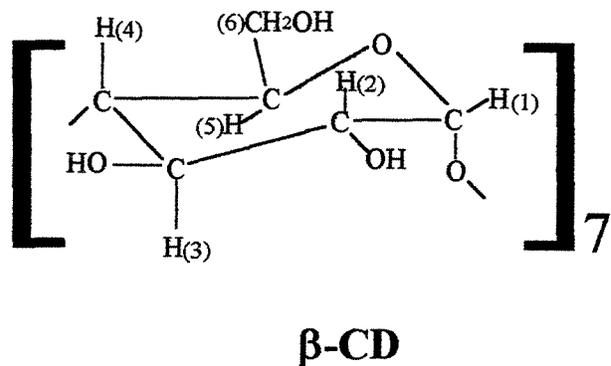


Figura 38 – Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de  $\beta$ -CD em tampão salino (HEPES 10 mM/NaCL 120 mM), 25°C: (a)  $\beta$ -CD (1 mM) e (b) Pz (1 mM) +  $\beta$ -CD (1 mM).

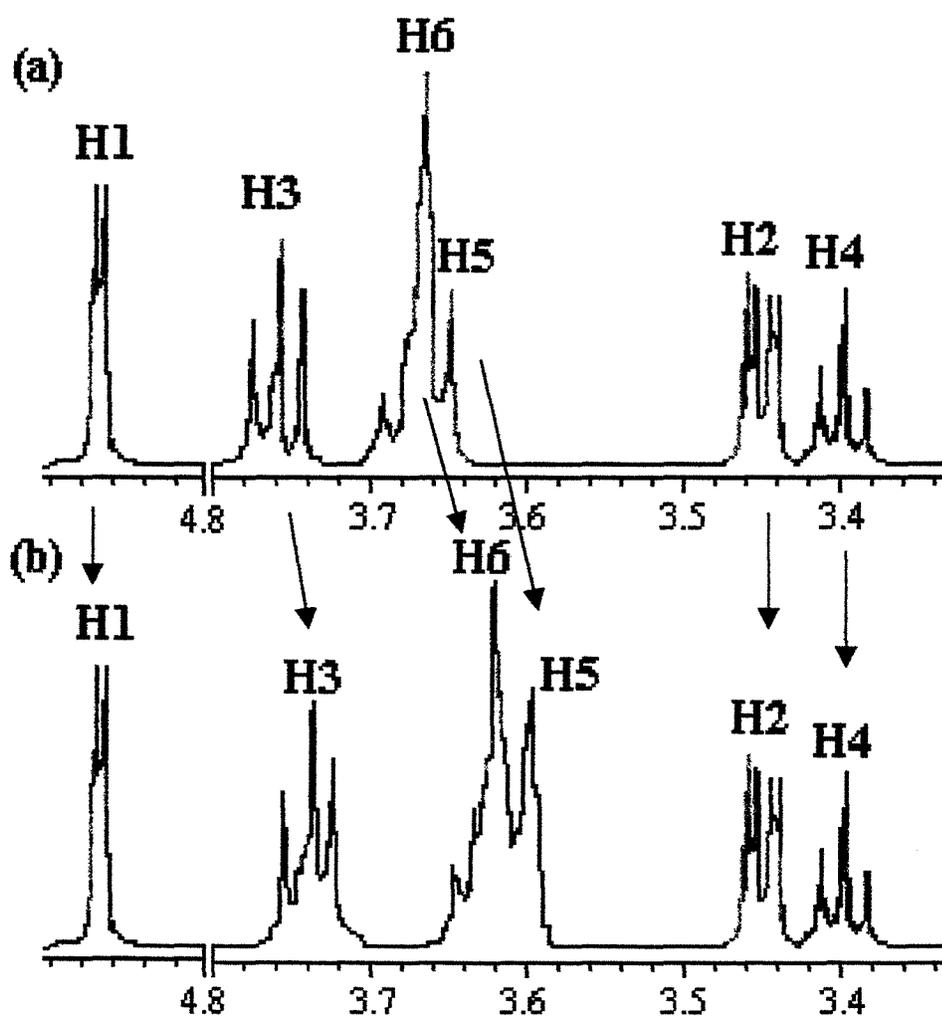
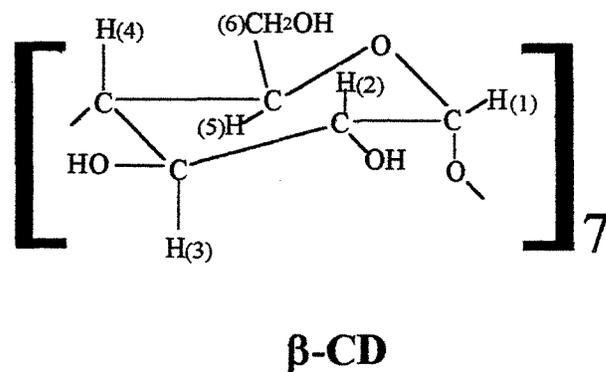


Figura 39 – Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de  $\beta\text{-CD}$  em tampão salino (HEPES 10 mM/NaCl 120 mM),  $25^\circ\text{C}$ : (a)  $\beta\text{-CD}$  (1 mM) e (b) Iz (1 mM) +  $\beta\text{-CD}$  (1 mM).

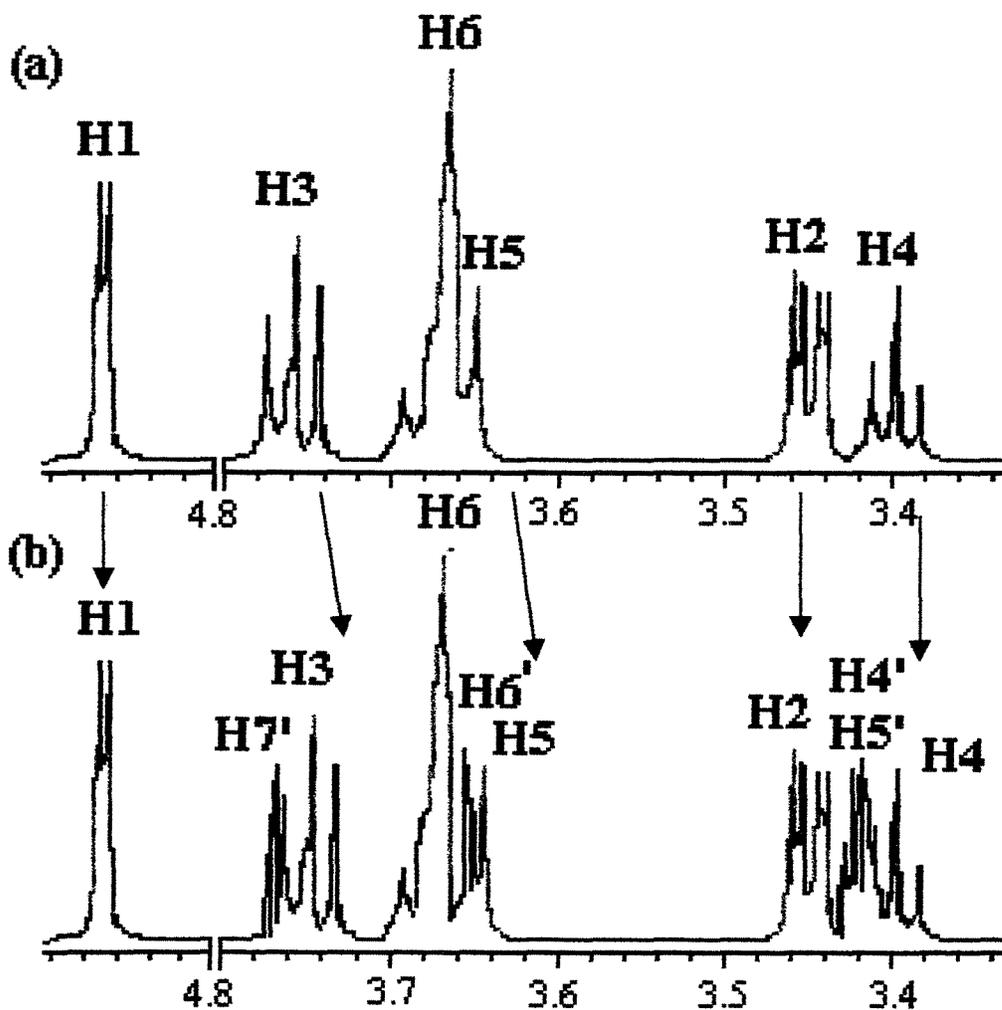
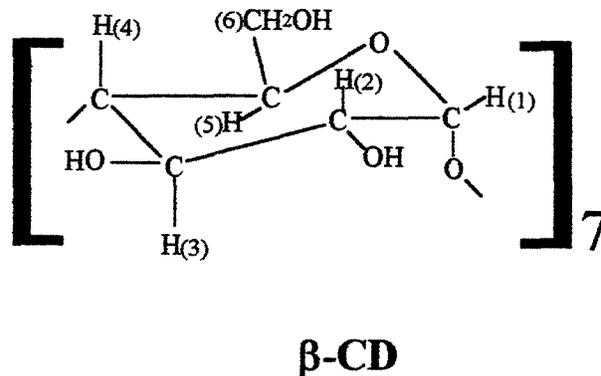
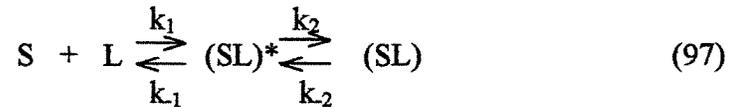


Figura 40 – Espectro de  $^1\text{H-NMR}$  de  $\beta\text{-CD}$  em tampão salino (HEPES 10 mM/NaCL 120 mM),  $25^\circ\text{C}$ : (a)  $\beta\text{-CD}$  (1 mM) e (b) Et (1 mM) +  $\beta\text{-CD}$  (1 mM).

**Apêndice III – Modelo cinético de formação dos complexos de inclusão**

### Modelo cinético de formação dos complexos de inclusão

O esquema de reação em duas etapas, usado para explicar as interações entre substrato e ligante, pode ser representado pelo mecanismo proposto por CONNORS (1997):



onde S, designado como substrato representa a droga, e L é o ligante, ou a ciclodextrina.

Substrato e ligante interagem para formar o complexo intermediário (SL)\*, que rearranja-se originando o complexo SL. Sob condições de pseudo primeira ordem, onde a concentração de ligante é muito maior que a do substrato, ou seja, L é praticamente constante.

As variações das concentrações de S, (SL)\* e (SL) no sistema são descritas pelas seguintes equações diferenciais (98 – 100):

$$\frac{-\partial S(t)}{\partial t} = k_1 (SL) (t) - k_1 (SL)^* (t) \quad (98)$$

$$\frac{-\partial (SL)^* (t)}{\partial t} = -k_1 (SL) (t) + k_1 (SL)^* (t) + k_2 (SL)^* (t) - k_2 (SL) (t) \quad (99)$$

$$\frac{\partial SL(t)}{\partial t} = k_2 (SL)^* (t) - k_2 (SL) (t) \quad (100)$$

Condições de contorno:

$$\text{para } t = 0, \quad S(0) = S_0, \quad (SL)^*(0) = 0, \quad (SL)(0) = 0$$

Admitindo que a segunda reação está em equilíbrio e a primeira é relativamente lenta, tem-se:

$$\frac{\partial SL}{\partial t} = k_2 (SL)^*(t) - k_{-2} (SL)(t) = 0$$

$$(SL)(t) = \frac{k_2 (SL)^*(t)}{k_{-2}} \quad (101)$$

Balço de S:

$$S_0 = S + (SL)^* + (SL) \quad (102)$$

Substituindo (102) em (101):

$$(SL)^*(t) = \frac{(-S_0 + S(t))k_{-2}}{k_{-2} + k_2} \quad (103)$$

Substituindo (103) em (98), obtém-se o perfil analítico de S em função do tempo:

$$\frac{-\partial S(t)}{\partial t} = \left( k_1 L + \frac{k_{-2} k_{-1}}{k_{-2} + k_2} \right) S(t) - \frac{k_{-1} S_0 k_{-2}}{k_{-2} + k_2} \quad (104)$$

No equilíbrio:  $\frac{\partial S}{\partial t} = 0$  e  $S(t) = S_{eq}$ .

$$\frac{k_{-1}S_0k_{-2}}{k_{-2} + k_2} = \left( k_1L + \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{-2} + k_2} \right) S_{eq} \quad (105)$$

Substituindo (105) em (104):

$$\frac{-\partial}{\partial t} ( S(t) - S_{eq} ) = k_1L + \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{-2} + k_2} ( S(t) - S_{eq} ) \quad (106)$$

$$\frac{-\partial}{\partial t} ( S(t) - S_{eq} ) = k_{obs} ( S(t) - S_{eq} ) \quad (107)$$

onde a constante cinética  $k_{obs}$  é igual a:

$$k_{obs} = k_1L + \frac{k_{-1}k_{-2}}{k_{-2} + k_2} \quad (108)$$

e o  $S_{eq}$ , que é  $S(t)$  para  $t \rightarrow \infty$ , ou  $S_{\infty}$ , é igual a:

$$S_{eq} = \frac{k_{-1}k_{-2}S_0}{(k_1L + k_{-1})k_{-2} + k_1Lk_2} \quad (109)$$

A solução da equação diferencial (108) para  $S(0) = S_0$  é:

$$\ln \left( \frac{S(t) - S_\infty}{S_0 - S_\infty} \right) = -k_{\text{obs}} t \quad (110)$$

Como  $-\frac{dS}{dt} = \frac{d(SL)}{dt}$ , ou seja:  $S(t) = -(SL)(t) + k$ , pode-se escrever a solução obtida em termos de  $(SL)(t)$ :

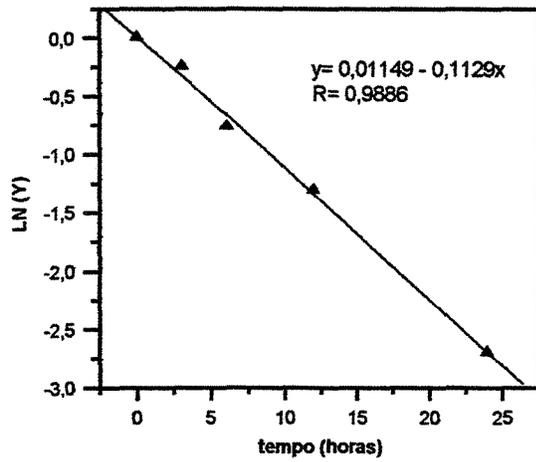
$$\ln \left( \frac{(SL)_\infty - (SL)(t)}{(SL)_0 - (SL)_\infty} \right) = -k'_{\text{obs}} t \quad (111)$$

Como a complexação conduz ao aumento da turbidez da solução com o tempo,

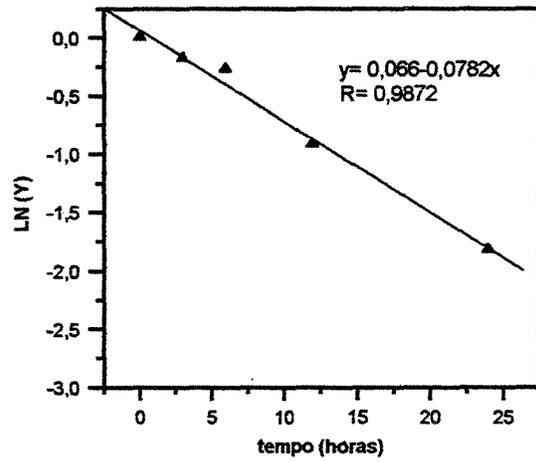
$$A(t) \propto SL(t)$$

E ajustando os dados experimentais de  $A(t)$  à equação (108), obtém-se os valores de  $k'_{\text{obs}}$  para as diversas complexações.

Os resultados mostrados na Figura 41 (a e b) representam o ajuste dos dados linearizados conforme a equação (111). A regressão linear das curvas não incluem os pontos superiores a 24 horas em ambos os sistemas devido a ampliação dos erros na proximidade da saturação.



(a)



(b)

Figura 41 - Ajuste dos dados da cinética de complexação de Pz (a) e Iz (b) em  $\beta$ -CD,  $Y = (S_t - S_\infty) / (S_0 - S_\infty)$ .

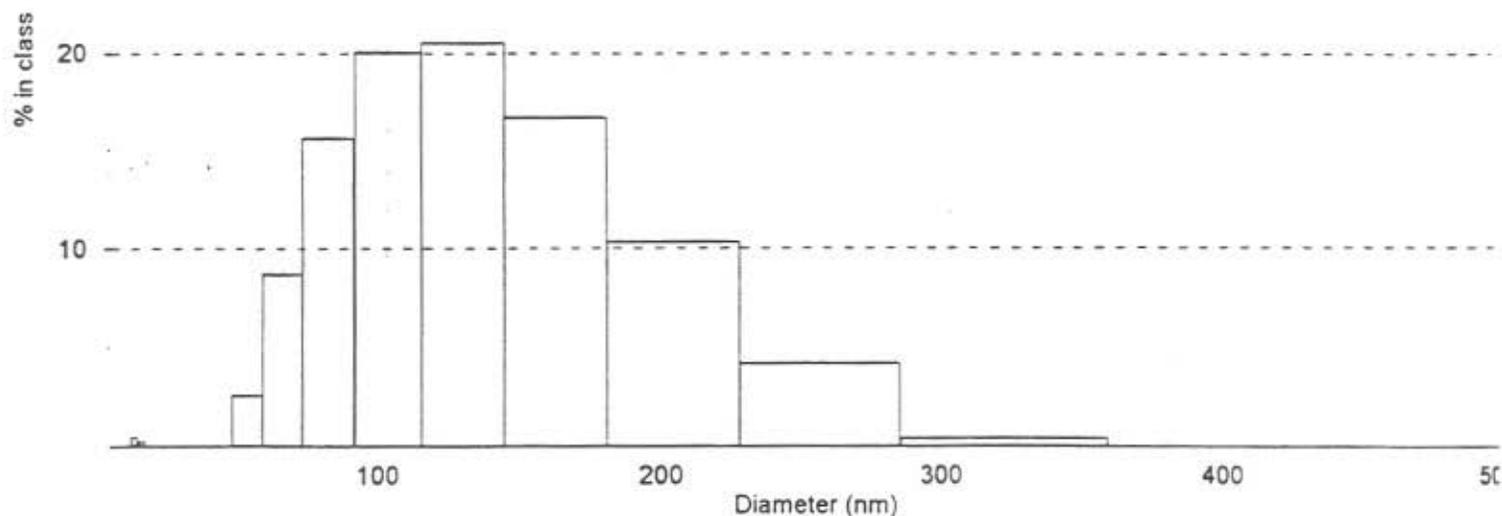
**Apêndice IV – Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanho das Vesículas Lipídicas**

Apêndice IV - Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas lipídicas

Pz:Lipossoma convencional (5,0:7,5 mM)  
 Amostra extrudada em membranas de 100 nm  
 Heron O.S. Lima  
 Live data  
 Autosizer 4700

Size(nm)	Intensity	Volume	Number	Peak Analysis by intensity			
9.9	0.4	0.4	0.4	Peak	Area	Mean	Width
12.5	0.2	0.2	0.2	1	98.9	124.4	132.6
15.7	0.0	0.1	0.1	Peak Analysis by volume			
19.8	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
25.0	0.0	0.0	0.0	1	98.9	126.0	139.6
31.4	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by number			
39.6	0.0	0.7	0.7	Peak	Area	Mean	Width
49.8	2.6	3.5	3.5	1	98.9	126.0	139.6
62.7	8.7	8.9	8.9	Peak Analysis by number			
79.0	15.5	15.0	15.0	Peak	Area	Mean	Width
99.4	20.0	19.0	19.0	1	98.9	126.0	139.6
125.2	20.5	19.4	19.4	Peak Analysis by number			
157.6	16.6	16.0	16.0	Peak	Area	Mean	Width
198.4	10.3	10.4	10.4	1	98.9	126.0	139.6
249.8	4.2	4.8	4.8	Peak Analysis by number			
314.6	0.4	1.3	1.3	Peak	Area	Mean	Width
396.1	0.0	0.1	0.1	1	98.9	126.0	139.6
498.7	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by number			
627.8	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
790.5	0.0	0.0	0.0	1	98.9	126.0	139.6
995.3	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by number			
1253.1	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
1577.7	0.2	0.1	0.1	1	98.9	126.0	139.6
1986.4	0.3	0.2	0.2	Peak Analysis by number			

Size distribution(s)



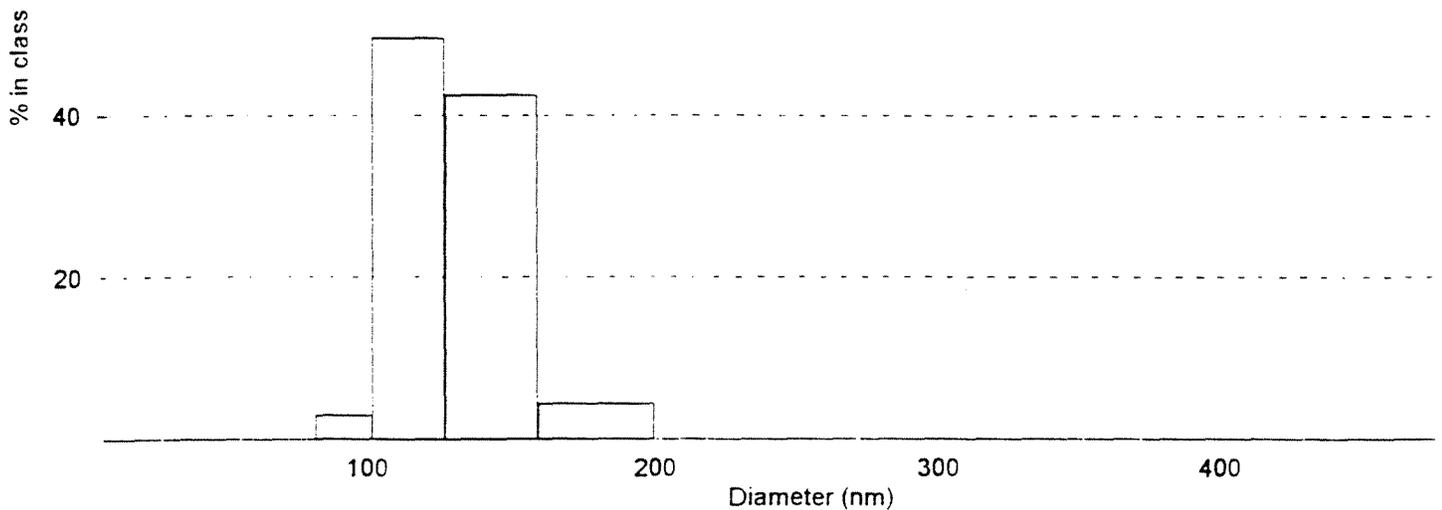
RecAngle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.Index	Quality	Error	In Range	Merit	Analysis	Title
13	90.0	69.7	140.5	0.300	Pass	6.83e-004	91.5	36.8	Auto:CONTIN Pz:L

Apêndice IV - Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas lipídicas

Iz:Lipossoma convencional (5,0:7,5 mM)  
 Amostra extrudada em membrana de 100 nm  
 Heron Lima  
 Live data  
 Autosizer 4700

Size(nm)	Intensity	Volume	Number	Peak Analysis by intensity			
8.7	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
11.0	0.0	0.0	0.0	1	99.4	124.1	57.1
13.8	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by volume			
17.4	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
21.9	0.0	0.0	0.0	1	99.4	125.8	74.1
27.6	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by number			
34.7	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
43.7	0.0	0.0	0.0	1	99.4	125.8	74.1
55.0	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by number			
69.3	0.0	0.8	0.8	Peak	Area	Mean	Width
87.2	3.0	13.9	13.9	1	99.4	125.8	74.1
109.8	49.5	36.1	36.1				
138.3	42.4	34.7	34.7				
174.1	4.4	12.8	12.8				
219.2	0.0	1.1	1.1				
276.0	0.0	0.0	0.0				
347.5	0.0	0.0	0.0				
437.5	0.0	0.0	0.0				
550.9	0.0	0.0	0.0				
693.6	0.0	0.0	0.0				
873.3	0.0	0.0	0.0				
1099.5	0.0	0.0	0.0				
1384.4	0.0	0.2	0.2				
1743.0	0.6	0.5	0.5				

Size distribution(s)



RecAngle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.Index	Quality	Error	In Range	Merit	Analysis	
3	90.0	76.6	123.2	0.193	Pass	9.66e-004	98.1	21.5	Auto:CONTIN

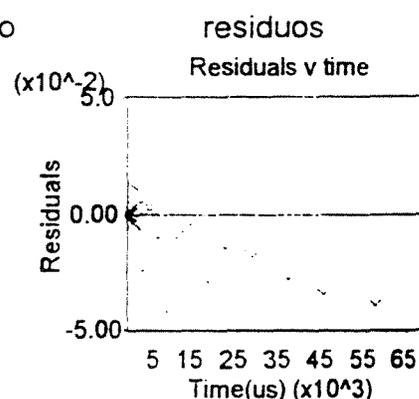
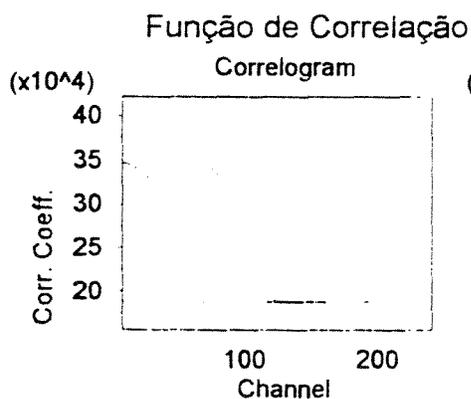
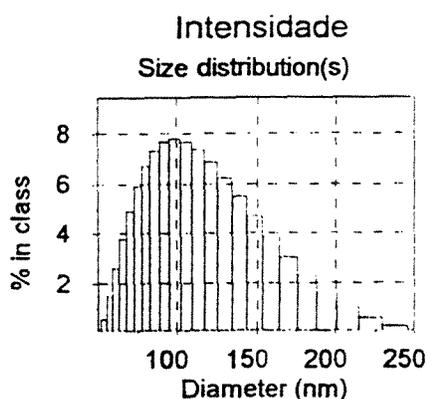
Descrição da Amostra = amostra Pz:Lip.peg (5,0:7,5 mM)

Operador = Heron

Dados Obtidos em 2/03/00 às 11:12:14

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
54.0	0.6	92.7	7.7	158.9	3.9
57.8	1.5	99.1	7.8	170.0	3.1
61.8	2.6	106.0	7.7	181.9	2.3
66.1	3.8	113.4	7.4	194.6	1.6
70.7	4.9	121.3	6.9	208.1	1.1
75.7	5.9	129.8	6.2	222.6	0.6
81.0	6.7	138.9	5.5	238.2	0.3
86.6	7.3	148.6	4.7	254.8	0.1



Cumulants mean (Z Ave) 117.3 Polidispersão 0.200

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633  
 Temperatura = 25.1  
 Ângulo = 90.0  
 Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 96  
 Tipo de Análise = Contin  
 Número de Pontos Ajustados = 39  
 Razão de Espaçamento = 1.2  
 Primeiro Ponto Utilizado = 65

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 1.000  
 pH = N/A  
 Índice de Refração do Dispersante = 1.331  
 Índice de Refração da Amostra = 1.300  
 Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 95.7  
 Razão Sinal/Ruído = 84.3  
 Erro do Ajuste = 0.0006  
 Faixa de Análise = 100  
 Pico 1: Diâmetro Médio = 110.5 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

Tempo de Amostragem (us) = 1.0  
 Fator de Dilação = 2  
 Milhares de Contagens/s = 44.2  
 Calc. far point 187841  
 Meas. far point 188429

Estes Dados Foram Obtidos No Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas  
 DPB/FEQ/UNICAMP

**Apêndice IV - Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas lipídicas**

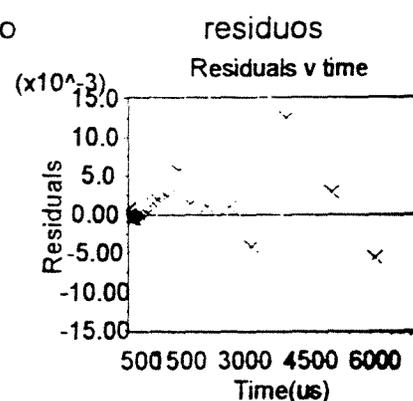
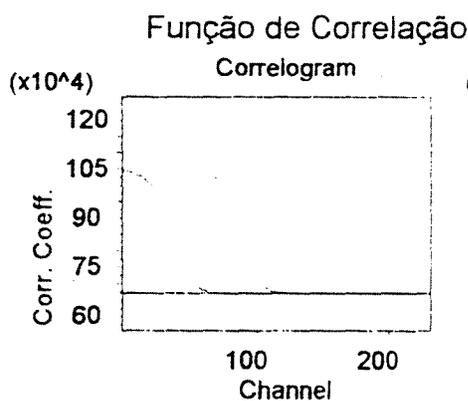
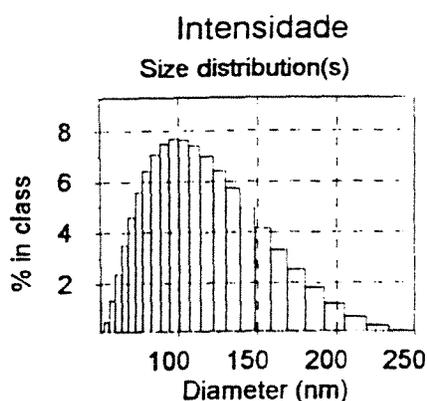
Descrição da Amostra = amostra lz:Lip.peg (5,0:7,5 mM)

Operador = Heron

Dados Obtidos em 2/03/00 às 14:39:49

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
54.2	0.5	91.2	7.5	153.5	4.1
57.8	1.4	97.3	7.7	163.8	3.3
61.7	2.4	103.9	7.7	174.8	2.5
65.9	3.5	110.9	7.4	186.6	1.8
70.3	4.6	118.3	7.0	199.1	1.2
75.0	5.6	126.3	6.4	212.5	0.7
80.1	6.4	134.8	5.7	226.8	0.3
85.5	7.1	143.8	5.0	242.0	0.1



Cumulants mean (Z Ave) 114.5 Polidispersão 0.187

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633  
 Temperatura = 27.4  
 Ângulo = 90.0  
 Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 84  
 Tipo de Análise = Contin  
 Número de Pontos Ajustados = 29  
 Razão de Espaçamento = 1.2  
 Primeiro Ponto Utilizado = 65

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 1.000  
 pH = N/A  
 Índice de Refração do Dispersante = 1.331  
 Índice de Refração da Amostra = 1.300  
 Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 98.3  
 Razão Sinal/Ruído = 55.8  
 Erro do Ajuste = 0.0005  
 Faixa de Análise = 100  
 Pico 1: Diâmetro Médio = 109.8 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

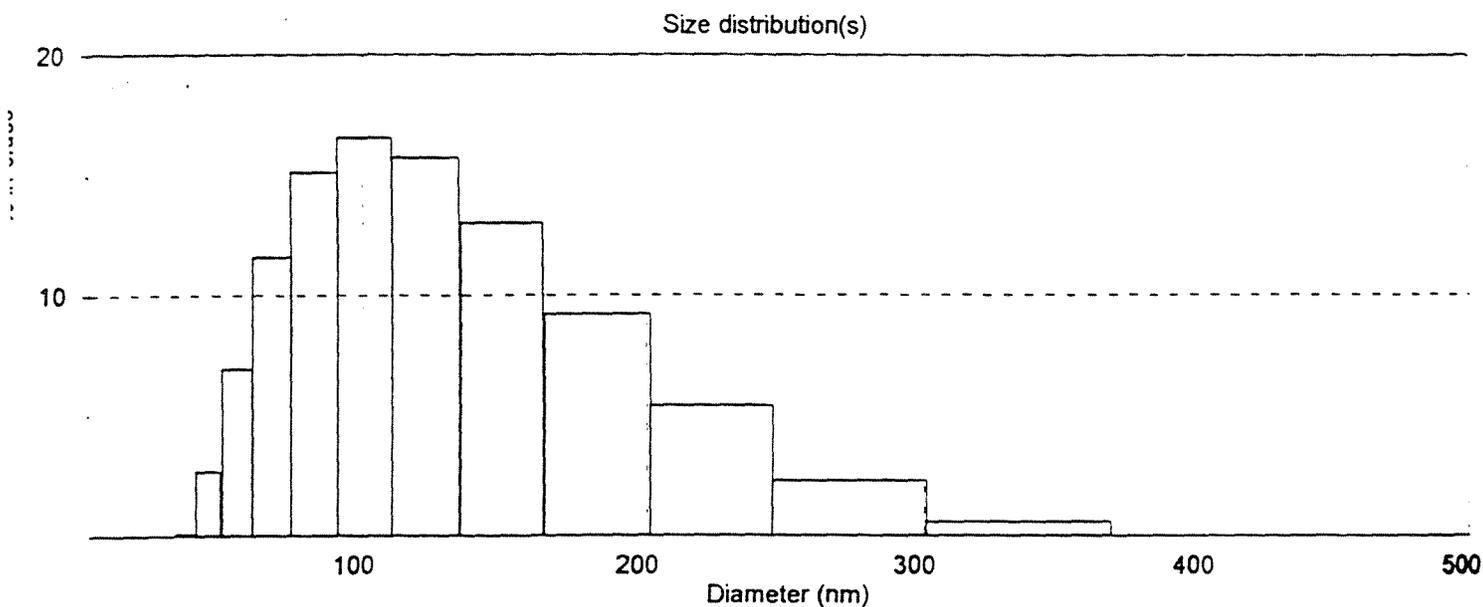
Tempo de Amostragem (us) = 1.0  
 Fator de Dilação = 2  
 Milhares de Contagens/s = 89.5  
 Calc. far point 672227  
 Meas. far point 672002

Estes Dados Foram Obtidos No Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas  
 DPB/FEQ/UNICAMP

Apêndice IV - Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas lipídicas

Pz:B-CD):Lipossoma convencional (5,0:7,5 mM)  
 Amostra extrudada em membranas de 100 nm  
 Heron O.S. Lima  
 Live data  
 Autosizer 4700

Size(nm)	Intensity	Volume	Number	Peak Analysis by intensity			
13.4	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
16.4	0.0	0.0	0.0	1	99.1	117.5	132.8
20.0	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by volume			
24.5	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
29.9	0.0	0.0	0.0	1	99.1	118.7	137.0
36.5	0.1	0.7	0.7	Peak Analysis by number			
44.6	2.6	3.1	3.1	Peak	Area	Mean	Width
54.5	6.9	7.0	7.0	1	99.1	118.7	137.0
66.6	11.6	11.3	11.3	Peak Analysis by number			
81.3	15.1	14.6	14.6	Peak	Area	Mean	Width
99.3	16.6	16.0	16.0	1	99.1	118.7	137.0
121.4	15.8	15.3	15.3	Peak Analysis by number			
148.3	13.0	12.7	12.7	Peak	Area	Mean	Width
181.1	9.2	9.2	9.2	1	99.1	118.7	137.0
221.3	5.4	5.6	5.6	Peak Analysis by number			
270.3	2.3	2.6	2.6	Peak	Area	Mean	Width
330.3	0.6	0.8	0.8	1	99.1	118.7	137.0
403.5	0.0	0.1	0.1	Peak Analysis by number			
492.9	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
602.2	0.0	0.0	0.0	1	99.1	118.7	137.0
735.7	0.1	0.1	0.1	Peak Analysis by number			
898.8	0.2	0.2	0.2	Peak	Area	Mean	Width
1098.0	0.4	0.3	0.3	1	99.1	118.7	137.0
1341.4	0.3	0.3	0.3	Peak Analysis by number			

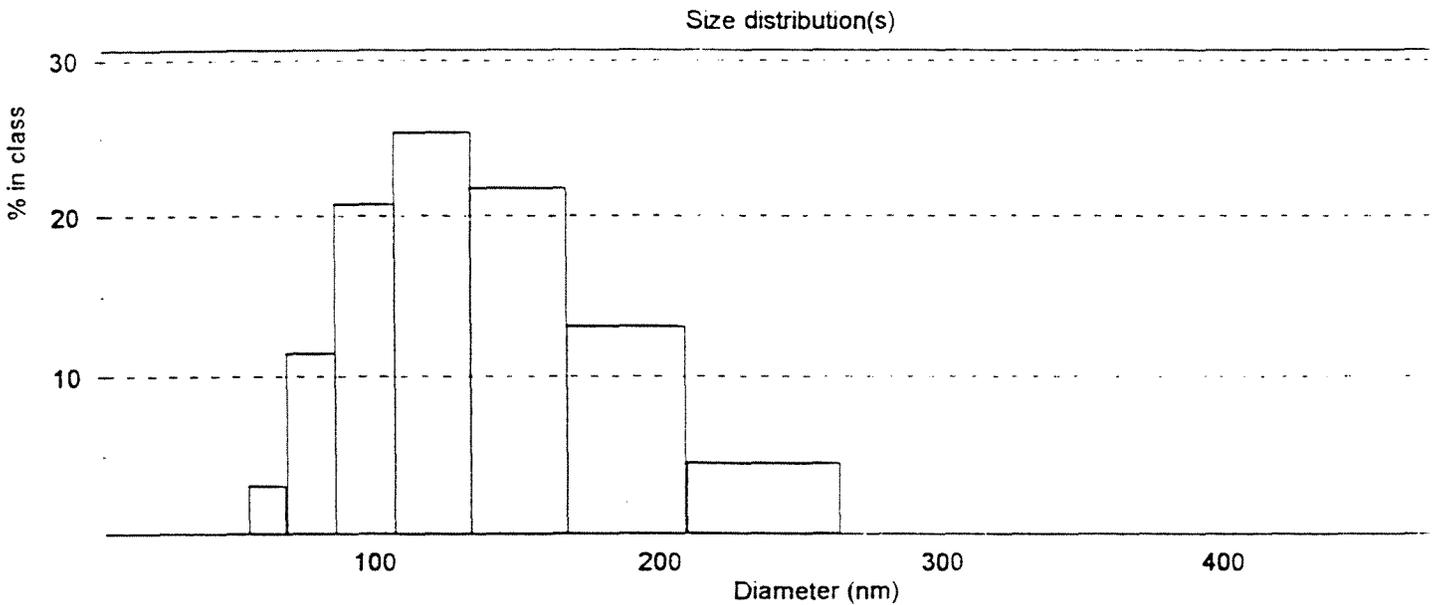


cAngle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.Index	Quality	Error	In Range	Merit	Analysis	Title
90.0	73.2	134.1	0.323	Pass	5.06e-004	91.3	29.8	Auto:CONTIN	(Pz:B-

*Apêndice IV - Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas lipídicas*

z/B-CD:Lipossoma convencional (5,0:7,5 mM)  
 Amostra extrudada em membrana de 100 nm  
 Heron Lima  
 Live data  
 Autosizer 4700

Size(nm)	Intensity	Volume	Number	Peak Analysis by intensity			
9.1	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
11.5	0.0	0.0	0.0	1	100.0	124.2	110.1
14.5	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by volume			
18.3	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
23.0	0.0	0.0	0.0	1	100.0	125.9	119.3
28.9	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by number			
36.4	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
45.9	0.0	0.8	0.8	1	100.0	125.9	119.3
57.8	3.1	4.4	4.4	Peak Analysis by intensity			
72.7	11.4	11.7	11.7	Peak	Area	Mean	Width
91.6	20.8	19.6	19.6	1	100.0	125.9	119.3
115.3	25.3	23.3	23.3	Peak Analysis by volume			
145.2	21.8	20.5	20.5	Peak	Area	Mean	Width
182.8	13.1	13.1	13.1	1	100.0	125.9	119.3
230.2	4.5	5.5	5.5	Peak Analysis by number			
289.8	0.0	1.1	1.1	Peak	Area	Mean	Width
364.9	0.0	0.0	0.0	1	100.0	125.9	119.3
459.4	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by intensity			
578.4	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
728.2	0.0	0.0	0.0	1	100.0	125.9	119.3
916.9	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by volume			
1154.4	0.0	0.0	0.0	Peak	Area	Mean	Width
1453.5	0.0	0.0	0.0	1	100.0	125.9	119.3
1830.0	0.0	0.0	0.0	Peak Analysis by number			



RecAngle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.Index	Quality	Error	In Range	Merit	Analysis	
10	90.0	98.1	129.4	0.153	Pass	5.67e-004	98.4	21.8	Auto:CONTIN

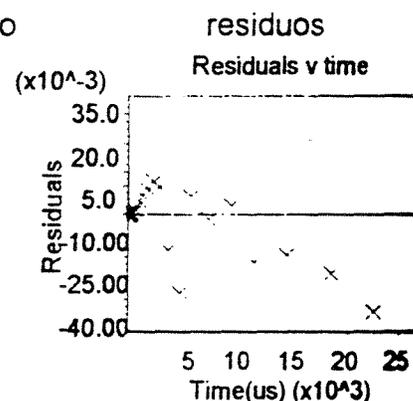
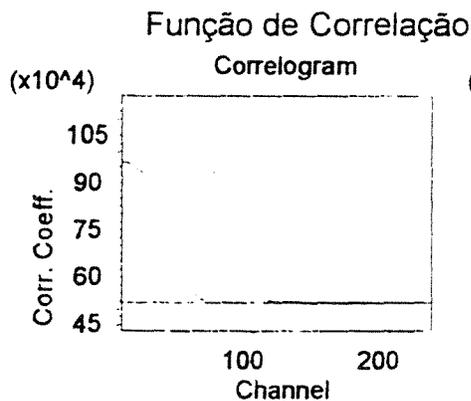
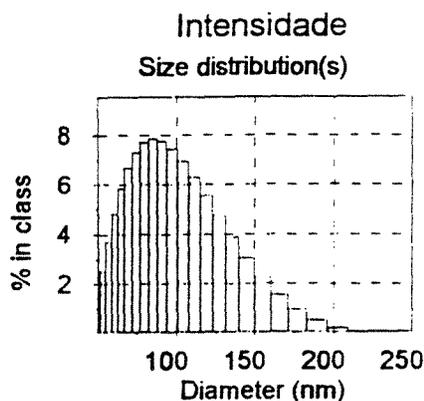
Descrição da Amostra = amostra Pz:B-CD:Lip.peg (5,0:7,5 mM)

Operador = Heron

Dados Obtidos em 2/03/00 às 15:14:35

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
46.8	0.5	79.7	7.7	135.9	3.9
50.0	1.4	85.2	7.9	145.3	3.0
53.5	2.5	91.1	7.8	155.3	2.3
57.1	3.7	97.4	7.5	166.0	1.6
61.1	4.8	104.1	7.0	177.5	1.0
65.3	5.9	111.3	6.3	189.7	0.5
69.8	6.7	119.0	5.6	202.8	0.2
74.6	7.3	127.2	4.7	216.8	0.1



Cumulants mean (Z Ave) 100.7 Polidispersão 0.196

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633  
 Temperatura = 27.6  
 Ângulo = 90.0  
 Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 72  
 Tipo de Análise = Contin  
 Número de Pontos Ajustados = 33  
 Razão de Espaçamento = 1.2  
 Primeiro Ponto Utilizado = 10

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 1.000  
 pH = N/A  
 Índice de Refração do Dispersante = 1.331  
 Índice de Refração da Amostra = 1.300  
 Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 95.6  
 Razão Sinal/Ruído = 85.6  
 Erro do Ajuste = 0.0006  
 Faixa de Análise = 100  
 Pico 1: Diâmetro Médio = 94.8 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

Tempo de Amostragem (us) = 1.0  
 Fator de Dilação = 2  
 Milhares de Contagens/s = 84.9  
 Calc. far point 519208  
 Meas. far point 520901

Estes Dados Foram Obtidos No Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas  
 DPB/FEQ/UNICAMP

Apêndice IV - Diâmetro médio e distribuição de tamanho das vesículas lipídicas

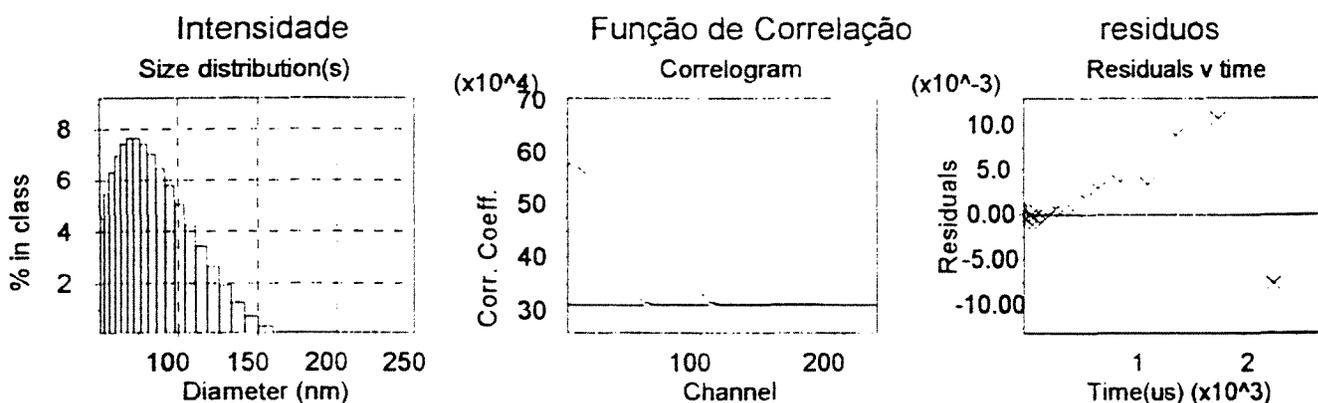
Descrição da Amostra = amostra Iz:B-CD:Lip.peg (5,0:7,5 mM)

Operador = Heron

Dados Obtidos em 2/03/00 às 16:01:06

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
40.3	0.5	65.9	7.4	107.7	4.2
42.9	1.3	70.1	7.6	114.5	3.4
45.6	2.3	74.5	7.6	121.8	2.6
48.5	3.4	79.2	7.4	129.5	1.9
51.5	4.5	84.2	7.0	137.7	1.3
54.8	5.5	89.6	6.5	146.4	0.8
58.3	6.3	95.2	5.8	155.7	0.4
62.0	7.0	101.3	5.0	165.5	0.1



Cumulants mean (Z Ave) 81.7 Polidispersão 0.166

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633  
 Temperatura = 28.2  
 Ângulo = 90.0  
 Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 96  
 Tipo de Análise = Contin  
 Número de Pontos Ajustados = 23  
 Razão de Espaçamento = 1.2  
 Primeiro Ponto Utilizado = 10

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 1.000  
 pH = N/A  
 Índice de Refração do Dispersante = 1.331  
 Índice de Refração da Amostra = 1.300  
 Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 98.9  
 Razão Sinal/Ruído = 85.2  
 Erro do Ajuste = 0.0007  
 Faixa de Análise = 100  
 Pico 1: Diâmetro Médio = 78.8 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

Tempo de Amostragem (us) = 1.0  
 Fator de Dilatação = 2  
 Milhares de Contagens/s = 57.1  
 Calc. far point 313186  
 Meas. far point 313246

Estes Dados Foram Obtidos No Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas  
 DPB/FEQ/UNICAMP