

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos**

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS E  
MICROESFERAS PARA APLICAÇÃO NA TERAPIA POR  
DESSENSIBILIZAÇÃO DE REAÇÃO ALÉRGICA.**

**Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque, M.Sc.**

Aluna

**Profª Drª Maria Helena Andrade Santana**

Orientadora

**Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner**

Co-orientador

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

**Campinas, Fevereiro de 2005**

200509245

UNIDADE	BC
CHAMADA	T/UNICAMP
	AL150
EX	
MBQ BC/	63563
OC/	6.00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
EÇO	R\$ 11,00
DATA	10-5/05
CPD	51102349202

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

AL15p

Albuquerque, Elaine Christine de Magalhães Cabral  
Preparação, caracterização de lipossomas e  
microesferas para aplicação na terapia por  
dessensibilização de reação alérgica / Elaine Christine de  
Magalhães Cabral Albuquerque.--Campinas, SP: [s.n.],  
2005.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana,  
Ricardo de Lima Zollner

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

1. Lipossomos. 2. Partículas. 3. Polímeros na  
medicina. 4. Alergia respiratória. I. Santana, Maria  
Helena Andrade. II. Zollner, Ricardo de Lima. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Química. IV. Título.

Titulo em Inglês: Preparation and characterization of liposomes and microspheres useful  
for desensitization therapy of allergic reaction

Palavras-chave em Inglês: Liposomes, Particles, Biomedical polymers e Respiratory  
allergy

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Stephen Hyslop, Maria Helena Bueno da Costa, Francisco  
Benedito Pessine e Anselmo Gomes de Oliveira

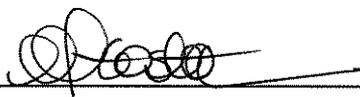
Data da defesa: 02/02/2005

Tese de Doutorado defendida por Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque e aprovada em 02 de fevereiro de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



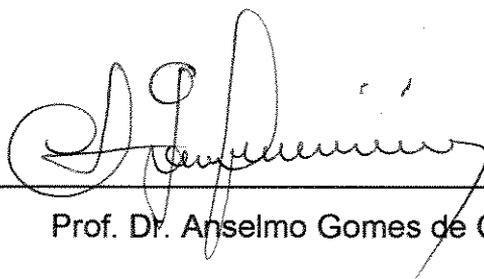
---

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



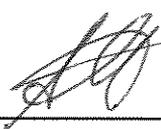
---

Dr.<sup>a</sup> Maria Helena Bueno da Costa (Titular)



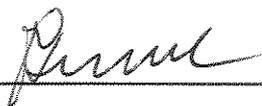
---

Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira (Titular)



---

Prof. Dr. Stephen Hyslop (Titular)



---

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (Titular)



Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de doutorado em Engenharia Química defendida por **Elaine Christine de Magalhães Cabral Albuquerque** e aprovada pela comissão julgadora em 02 de fevereiro de 2005.



---

Profª Drª Maria Helena Andrade Santana



**Ao meu maravilhoso Deus  
pela vida abençoada que tenho!**

**Aos meus pais, exemplos de força,  
dignidade humana e amor. A minha primeira grande dádiva divina.**

**Ao meu marido pelo ser humano maravilhoso que Deus me  
permitiu conhecer e conviver. A minha segunda grande dádiva divina.**



## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Helena Andrade Santana pela amizade, apoio, paciência, incentivo, confiança, oportunidades e preciosos ensinamentos nesses 7 anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Ricardo Zollner pela co-orientação, confiança e a imensa colaboração necessária para a realização deste trabalho.

A Prof. Maria Helena Bueno da Costa pela ajuda, incentivo e importante contribuição para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos pela simples presença em minha vida: Denise, Mardonny, Maria Helena Zanin e Luciana.

Aos meus amigos e colegas do LDPB: Raquel, Giuliana, Fernanda, Classius, Christiane, Amós, Tatiana, Lucimara, Christine e Reinaldo.

Ao Gilson jr. pelo importante apoio durante a tese.

Aos meus colegas do DPB: Vinícius, Moysés, Ana Paula, Érica, Geórgia, Isa, Mariana, Cristiane, Fabiana, Ivanildo, Carol e Leonardo.

A Rhubia pelo companheirismo, amizade e indispensável ajuda nos ensaios imunológicos.

A Jocimara Namur pela amizade e apoio na preparação das microesferas e ao Elias Jr. pela presteza com o liofilizador.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana, pela utilização de preciosos equipamentos em seu laboratório.

À professora Eneida de Paula (IB) e Prof. Antônio José (FEA) pelo uso do liofilizador.

A Natura pelo uso do Zetasizer, em especial ao Dr. Paulo de Tarso Hennies.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização e enriquecimento deste trabalho.



## RESUMO

Os problemas alérgicos respiratórios afetam grande parte da população mundial e 10-40% da população brasileira. Atualmente, o tratamento dessas desordens respiratórias consiste na imunoterapia convencional e na farmacoterapia. Embora a imunoterapia convencional apresente boa eficiência no tratamento de alergias respiratórias, o longo tempo de tratamento e a presença de reações sistêmicas adversas constituem grandes desvantagens, uma vez que o alérgeno é administrado na sua forma livre. Uma alternativa para reduzir ou eliminar essas desvantagens seria a encapsulação do alérgeno em sistemas de liberação controlada. Dentre esses sistemas, lipossomas e microesferas poliméricas apresentam-se promissores, uma vez que são capazes não somente de proteger e reduzir a toxicidade do composto ativo encapsulado, mas também de aumentar seu tempo de circulação *in vivo*. Os lipossomas são biocompatíveis, não imunogênicos, potentes adjuvantes imunológicos e apresentam a capacidade única de interagir com as células. As microesferas, no entanto, vem sendo extensivamente usadas em sistemas de liberação devido a sua capacidade de atuar como reservatório, capaz de liberar as macromoléculas por dias, meses ou anos. O objetivo deste trabalho foi a preparação e encapsulação do extrato alergênico obtido da biomassa fúngica de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* em lipossomas e microesferas. Lipossomas convencionais e furtivos e microesferas de ácido poli-lático-co-glicólico foram usados neste trabalho. Os efeitos *in vivo* da administração seqüencial de ambos veículos contendo ovoalbumina foram também avaliados através dos níveis de imunoglobulina G e imunoglobulina E presente no plasma de animais. Os lipossomas foram preparados através do método da desidratação-reidratação usando trealose como crioprotetor. As microesferas foram preparadas pelo método da evaporação do solvente através de dupla emulsão, usando álcool polivinílico como tensoativo. Os sistemas foram caracterizados por diâmetro médio e distribuição de tamanhos, razão de encapsulação, estabilidade e perfil de liberação *in vitro*. O diâmetro médio dos lipossomas encapsulando proteínas alergênicas foi de 200nm, enquanto as microesferas apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 7 $\mu$ m. A razão de encapsulação dependeu significativamente do tipo de proteína. A suspensão aquosa de lipossomas foi estável por até 3 meses quando estocados a 4°C. As microesferas perderam 80-90% da sua massa em 60 dias quando incubadas em tampão PBS. A proteína foi lentamente liberada das microesferas, indicando a difusão como mecanismo predominante durante 40 dias. Os resultados de avaliação imunológica mostraram que não houve diferença nos níveis de IgG e IgE quando lipossomas convencionais ou furtivos com microesferas foram usados na administração seqüencial. Os níveis de IgG mantiveram-se próximos àqueles do animal sensibilizado por até 60 dias. Neste período, os níveis de IgG e IgE dos veículos vazios ou com OVA encapsulada foram semelhantes. Os resultados apontam potencialidade do uso destes veículos na imunoterapia de alergia.

**Palavras-chave:** Lipossomas, Microesferas, Alergia, ovoalbumina, extrato alergênico.

## ABSTRACT

Respiratory allergic disorders affect a great number of individuals throughout the world. Nowadays, conventional therapies for atopic individuals comprise specific immunotherapy and pharmacotherapy. In general, the immunotherapy using free allergens produces adverse systemic reactions of varying intensity and frequency. In order to circumvent these problems, several approaches have been explored. Among them, liposomes and microspheres have been studied as promising vehicles as carriers of allergens for desensitization immunotherapy in allergy. Liposomes are small phospholipid vesicles composed of nontoxic, biodegradable, and naturally occurring lipids. They have been shown to act as potent immunologic adjuvants, inducing immune response and producing a pronounced depot effect after subcutaneous injection. Microspheres have also been widely investigated in drug delivery studies due to their capability of presenting antigens to the immune system over a long time. A large number of natural and synthetic polymers are potentially suitable for production of the wall-forming polymer. Synthetic biodegradable poly(lactide-co-glycolide) copolymers are among the primary candidates due to their excellent tissue biocompatibility, biodegradability and regulatory approval. The aim of this work is to prepare and characterize liposomes and microspheres entrapping allergenic extract from *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* and ovoalbumin. The *in vivo* effects of the sequential administration of both adjuvants containing ovoalbumin were also evaluated by analysis of Immunoglobulin G (IgG) and Immunoglobulin E (IgE) levels. Conventional and PEGylated liposomes and poly(lactide-co-glycolide) microspheres were used in this work. The liposomes were prepared by dehydration-rehydration method using trehalose as cryoprotector. The microspheres were prepared by water in oil in water emulsification solvent evaporation technique using poly(vinylalcohol) as stabilizer. Both systems were characterized by mean diameter and size distribution, encapsulation ratio, *in vitro* stability and release profile. The mean diameter of liposomes entrapping allergenic proteins was 200nm whereas microsphere size was approximately 7 $\mu$ m. The encapsulation ratio of allergenic proteins in liposomes and microspheres strongly depended on protein type. Liposomes stored in powder state were more stable than aqueous suspension (3 months). The weight loss of microspheres by degradation in PBS buffer was 80-90% during 60 days. Analysis of ovoalbumin release profiles from microspheres pointed out to diffusion as predominant mechanism along 40 days. Immunological evaluation of sequential administration of OVA into conventional or pegylated liposomes with microspheres showed no significant difference between the two groups. The specific IgG levels to OVA encapsulated in liposomes and microspheres remained high for 60 days and similar to IgG levels to soluble OVA in the sensitized animals. Up to 2 months, it was not observed the IgG and IgE levels to OVA into liposomes and microspheres and empty microspheres. The results suggest that liposomes and microspheres may be a suitable delivery system for antigen in the desensitization therapy against allergy.

**Keyword:** Liposomes, Microspheres, Allergy, Desensitization therapy, Ovoalbumin.

## ABREVIATURA

**A/O/A:** água/óleo/água

**DCM:** diclorometano

**D<sub>h</sub>:** diâmetro hidrodinâmico

**DMPC:** dimistoilfosfatidilcolina

**DRV:** dehydration-rehydration vesicles (vesículas obtidas por desidratação e reidratação).

**DSC:** differential scanning calorimetry

**DSPE-PEG<sup>2000</sup>:** distearoilfosfatidiletanolamina

**FDA:** Food and Drug Administration

**FDELS:** freeze-drying empty liposomes

**IgE:** imunoglobulina E

**IgG:** imunoglobulina G

**IV:** infravermelho

**LUV:** large unilamellar vesicles (vesícula unilamelar grande)

**ME:** microesferas

**ME-502:** microesferas preparadas com o polímero RG 502

**ME-502H:** microesferas preparadas com o polímero RG 502H

**ME-503:** microesferas preparadas com o polímero RG 503

**ME-503H:** microesferas preparadas com o polímero RG 503H

**ME-504:** microesferas preparadas com o polímero RG 504

**ME-504H:** microesferas preparadas com o polímero RG 504H

**MEV:** microscopia eletrônica de varredura

**MLV:** multilamellar vesicle (vesicular multilamelar)

**MPS:** sistema fagocítico mononuclear

**OVA:** ovoalbumina

**PEG:** polietileno glicol

**PLGA:** ácido poli-lático-co-glicólico

**PVA:** álcool polivinílico

**QLS:** quasielastic light scattering (espalhamento de luz quasi elástico)

**RES:** sistema retículo-endotelial

**REV:** evaporação em fase reversa

**SUV:** small unilamellar vesicles (vesícula unilamelar pequena)

**T<sub>g</sub>:** temperatura de transição vítrea

**T<sub>m</sub>:** temperatura de transição de fases de lipídios

## ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
3.1. ALERGIA E ALÉRGENOS	5
3.1.1 – Tipos de alérgenos	6
3.1.1.1 – Alérgenos fúngicos	7
3.1.2 – Reações alérgicas	9
3.1.3 – Tratamento da Alergia	11
3.2 – LIPOSSOMAS	13
3.2.1 - Histórico e Aplicações	13
3.2.2 – Estrutura e Tipos	14
3.2.3 – Métodos de Produção	20
3.2.3.1 – Método da Desidratação e Reidratação	20
3.2.4 – Estabilização de Lipossomas e Proteínas por Açúcares	23
3.2.4.1 – Influência dos Açúcares como Crioprotetores em Lipossomas Preparados por Desidratação – Reidratação.	26
3.2.5 – Lipossomas em Aplicações Imunológicas	28
3.2.5.1 – Lipossomas em Vacinas	30
3.2.5.2 - Lipossomas como Veículos de Alérgenos	32
3.3 – MICROESFERAS	36
3.3.1 - Histórico e Aplicações	36
3.3.2 – Polímeros Biodegradáveis	37
3.3.3 - Ácido Poli(Lático-co-Glicólico) - PLGA	38
3.3.4 – Microesferas de PLGA para Liberação Controlada de Peptídeos e Proteínas	40
3.3.5 – Métodos de Produção	45

3.3.5.1 – Método da Evaporação do Solvente	46
3.3.6 – Microesferas de PLGA em Aplicações Imunológicas	48
3.3.6.1 - Microesferas como veículos de alérgenos	49
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>53</b>
4.1 – CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ALERGÊNICO	53
4.1.1 – Material	53
4.1.2 – Métodos	54
4.1.2.1 - Identificação das Proteínas do Extrato Alergênico	54
4.1.2.2 - Ponto isoelétrico das proteínas do extrato protéico fúngico determinada por focalização isoelétrica (IEF).	55
4.2 – LIPOSSOMAS	55
4.2.1 – Material	55
4.2.2 – Métodos	56
4.2.2.1 – Preparação	56
4.2.2.2 - Encapsulação de Proteínas Alergênicas	57
4.2.3 – Caracterização Físico-Química	57
4.2.3.1 - Teor de Fosfato	57
4.2.3.2 – Comportamento Osmótico	58
4.2.3.3 – Raio Hidrodinâmico	59
4.2.3.4 – Carga Superficial	60
4.2.3.5 – Transição de Fases	61
4.2.3.6 – Morfologia	62
4.2.3.7 – Cristalinidade	62
4.2.3.8 – Interações Trealose/Fosfolipídios	63
4.2.3.9 - Estabilidade em Plasma	63
4.2.3.10 - Separação das Proteínas Alergênicas	63
4.2.3.11 - Determinação do Teor Protéico	64
4.2.3.12 - Identificação das proteínas encapsuladas em lipossomas	65
4.2.4 - Liberação das proteínas Alergênicas	65
4.3 - MICROESFERAS	66
4.3.1 – Material	66
4.3.2 – Métodos	66
4.3.2.1 - Preparação	66
4.3.2.2 – Incorporação das Proteínas	67

4.3.2.3 - Planejamento Fatorial 23	68
4.3.3 - Caracterização Físico-Química	69
4.3.3.1 - Análise da Taxa de Evaporação do Solvente	69
4.3.3.2 - Morfologia das Partículas Secas	70
4.3.3.3 - Degradação in vitro	70
4.3.3.4 - Eficiência de Incorporação	70
4.3.3.5 - Carga Superficial	71
4.3.3.6 - Transição vítrea	71
4.3.4 - Liberação das Proteínas	71
4.4 - ENSAIOS IN VIVO	75
4.4.1 - Material	75
4.4.2 - Métodos	75
4.4.2.1 - Protocolo de Sensibilização	75
4.4.2.2 - Protocolo de imunização	76
4.4.2.3 - Análise da expressão de anticorpos das classes IgE e IgG anti-OVA através da técnica de imuno ensaio em placas ELISA	77
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
5.1 - CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ALERGÊNICO	79
5.1.1 - Identificação das Proteínas	79
5.1.2 - Ponto isoelétrico das proteínas	80
5.2 - LIPOSSOMAS	81
5.2.1 - Reconstituição por Rehidratação	81
5.2.1.1 - Lipossomas Convencionais e Furtivos	82
5.2.2 - Caracterização Físico-Química	87
5.2.2.1 - Lipossomas Vazios	87
5.2.2.1.1 - Teor de Fosfato	87
5.2.2.1.2 - Comportamento Osmótico	87
5.2.2.1.3 - Raio Hidrodinâmico	88
5.2.2.1.4 - Transição de Fases	91
5.2.2.1.5 - Interação Trealose/Fosfolipídios	95
5.2.2.1.6 - Morfologia	96
5.2.2.1.7 - Cristalinidade	98
5.2.2.1.8 - Estabilidade física dos lipossomas durante estocagem	100
5.2.2.2 - Lipossomas contendo Proteínas Alergênicas	101

5.2.2.2.1 – Eficiência de Encapsulação	101
5.2.2.2.2 – Liberação in vitro das Proteínas	103
5.2.2.2.3 – Estabilidade em Plasma	104
5.2.2.2.4 – Identificação das Proteínas do Extrato Alergênico Encapsuladas	107
5.2.2.2.5 - Carga superficial	109
5.2.3 – Conclusões sobre os Sistemas Lipossomais	110
<b>5.3 – MICROESFERAS</b>	<b>112</b>
5.3.1 – Influência das Variáveis Operacionais no Diâmetro Médio	112
5.3.2 – Influência das Variáveis Operacionais na Encapsulação do Corante.	118
5.3.3 – Influência da Massa Molar e Grupos Terminais dos Polímeros de PLGA na Liberação do Corante	120
5.3.3.1 – Eficiência de Encapsulação	120
5.3.3.2 - Análise da Remoção do Solvente	120
5.3.3.3 – Morfologia	125
5.3.3.4 – Liberação in vitro	127
5.3.3.5 – Erosão	131
5.3.4 – Efeito do Grupo Carboxil livre e Carboxil Esterificado do polímero na encapsulação e liberação de proteínas alergênicas de microesferas de PLGA	134
5.3.4.1 – Eficiência de encapsulação	134
5.3.4.2 – Morfologia e análise de superfície	135
5.3.4.3 - Carga Superficial	137
5.3.4.4 - Temperatura de Transição Vítreá (Tg)	138
5.3.4.5 – Degradação in vitro	140
5.3.4.6 - Liberação in vitro	141
5.3.4.7 – Morfologia e análise de superfície	146
<b>5.4 - ANÁLISE DOS EFEITOS IMUNOLÓGICOS DA ADMINISTRAÇÃO SEQUENCIAL DE LIPOSSOMAS E MICROESFERAS</b>	<b>149</b>
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>157</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>158</b>

<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>172</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>176</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>177</b>



# 1. INTRODUÇÃO

---

Avanços significativos em biotecnologia têm conduzido a descobertas de um grande número de sistemas de liberação controlada capazes não somente de proteger, melhorar a eficiência terapêutica e reduzir a toxicidade do composto ativo encapsulado, mas também de aumentar seu tempo de circulação *in vivo*.

Dentre os veículos carreadores, os lipossomas e microesferas constituem opções relevantes em aplicações onde a encapsulação e liberação controlada de substâncias ativas é requerida. Esses veículos apresentam como sistemas promissores para a veiculação de proteínas, peptídeos e DNA, devido a sua biodegradabilidade, não imunogenicidade e biocompatibilidade. O sucesso dos lipossomas em aplicações de liberação controlada *in vivo* de macromoléculas está diretamente relacionado a sua capacidade de interagir com as células. Os lipossomas convencionais e furtivos são os mais citados e usados em aplicações imunológicas. As microesferas, no entanto, vem sendo extensivamente usadas em sistemas de liberação devido a sua capacidade de atuar como reservatório, capaz de liberar as macromoléculas por dias, meses ou anos. Um grande número de polímeros sintéticos e naturais tem sido usado em sistemas de liberação controlada, no entanto, as microesferas de ácido lático e glicólico destacam-se pela biocompatibilidade do material e propriedades físico químicas que permitem projetar micropartículas com tamanhos e propriedades adequadas para as aplicações específicas. Atualmente, esses sistemas são aplicados na terapia de várias doenças,

como câncer, difteria, malária, tuberculose, hepatite, diabetes e no tratamento da alergia.

As doenças alérgicas podem ser desencadeadas por alérgenos de natureza alimentícia, medicamentosa, epidérmica ou respiratória. Destes, os alérgenos respiratórios ou aeroalérgenos são os causam maior desconforto e influenciam significativamente a qualidade de vida das pessoas. Os fungos estão entre os principais aeroalérgenos, cujos antígenos são proteínas obtidas da biomassa fúngica, as quais são usadas na forma de extratos alergênicos no tratamento convencional das doenças alérgicas. Na região de São Paulo, os principais gêneros de fungos responsáveis pela alergia respiratória são: *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Phoma*, *Alternaria*, *cândida*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium* e *Drechslera*. Estudos prévios mostraram que entres esses fungos, o extrato de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* é o que apresenta maior positividade em relação à reação cutânea em pacientes asmáticos da cidade de São Paulo.

Uma alternativa que tem sido considerada e em alguns casos com alta eficácia é a dessensibilização antigênica ou imunoterapia. A imunoterapia é constituída de uma série de injeções do alérgeno para o qual o paciente é sensível, até atingir um controle dos sintomas alérgicos. Um dos principais obstáculos a essa imunoterapia, considerada convencional, é a utilização de alérgenos livres com o potencial de desencadear reações adversas sistêmicas. Dentre as abordagens mais recentes com o objetivo de contornar os efeitos adversos da imunoterapia convencional, está a redução da toxicidade e da frequência de administração do alérgeno, através da sua encapsulação com liberação controlada. Portanto, a administração desses alérgenos na forma encapsulada constitui alternativa de grande relevância para a terapia de doenças alérgicas.

O objetivo deste trabalho foi estudar a encapsulação do extrato alergênico obtido da biomassa fúngica de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* em sistemas de liberação controlada. A ovoalbumina foi usada como modelo de proteína purificada para encapsulação. Lipossomas convencionais e furtivos e microesferas

de ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) de diferentes massas molares e grupos terminais foram os veículos analisados e caracterizados neste trabalho.

A avaliação da potencialidade desses sistemas para a aplicação na terapia por dessensibilização em alergia foi verificada em ensaios *in vivo* usando camundongos do tipo BALB/c e ovoalbumina como proteína modelo. A ovoalbumina foi escolhida como proteína modelo devido a sua extensa literatura em reações alérgicas e protocolos de dessensibilização bem estabelecidos. O esquema de injeção foi baseado na administração seqüencial de lipossomas, sistemas de liberação rápida, e microesferas, sistemas de liberação lenta.

O estudo é composto por três partes principais, enfocando na primeira a produção de lipossomas convencionais e furtivos pelo método da desidratação-reidratação com caracterização desses veículos vazios e com proteínas encapsuladas. Em uma segunda etapa é apresentada a produção de microesferas de PLGA pelo método da evaporação do solvente de emulsão múltipla e sua caracterização na presença e ausência de proteínas encapsuladas. E na última etapa são apresentados os resultados dos testes *in vivo*, baseados na administração seqüencial de lipossomas e microesferas, e a avaliação da potencialidade destes sistemas como imunoterápico para a terapia por dessensibilização da reação alérgica.

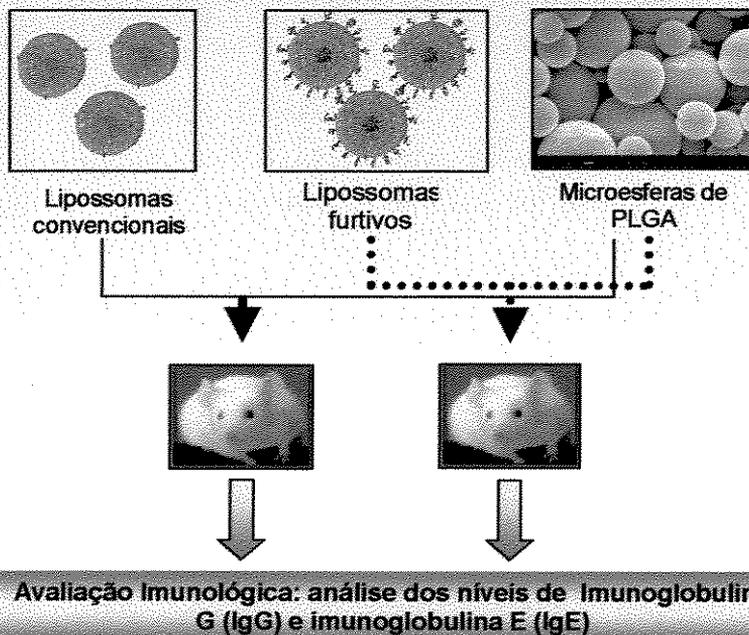
## 2 . OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é a preparação e caracterização de lipossomas e microesferas encapsulando o extrato alergênico do fungo *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* e ovoalbumina, bem como a avaliação imunológica desses veículos contendo ovoalbumina (proteína modelo purificada) na terapia por dessensibilização, através do esquema de injeção seqüencial de lipossomas e microesferas.

### Preparação e caracterização físico-química de Lipossomas e Microesferas

#### Encapsulação e Liberação de Proteínas

#### Esquema Seqüencial de Injeções em Animais



# 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

## 3.1. Alergia e Alérgenos

Alergia pode ser entendida como a resposta imunológica (hipersensibilidade) exagerada do organismo, quando este entra em contato com determinadas substâncias exógenas (alérgenos). Toda substância natural ou artificial, capaz de provocar reações de hipersensibilidade, pode ser considerada como alérgeno.

As doenças alérgicas, de uma maneira geral, têm origem multifatorial e complexa. Acredita-se que, para sua ocorrência, deva haver combinação entre uma predisposição genética do indivíduo e uma situação no ambiente facilitadora para que a doença se manifeste (Male, D., 1988).

Pela diversidade dos fatores causais e dependendo da sua gravidade, as doenças alérgicas são muito difíceis de serem controladas. O grau de intensidade da reação alérgica depende dos aspectos individuais (genéticos), idade do indivíduo, natureza do alérgeno, características da sua apresentação ao organismo (ingerido, inalado, cutâneo), assim como do tempo de exposição e sua concentração (Mendes, E., 1989).

As doenças alérgicas podem ser consideradas como problema de saúde pública mundial. Atingem cerca de 30% da população mundial e 35% dos brasileiros, conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Sociedade Brasileira de Alergia e Imunologia. No Brasil, segundo dados do

Ministério da Saúde em 2002, foram registrados mais de 2500 casos fatais de asma. Neste mesmo ano, a asma também foi a quinta maior causa de internação no Sistema Única de Saúde (SUS) (Boletim SBAI, 26.06.2003). Nos Estados Unidos da América, aproximadamente 35 milhões de pessoas possuem algum tipo de problema alérgico e na França, a asma é responsável por 2000 mortes ao ano.

A alergia tem um significado impactante na qualidade de vida das pessoas, provocando não somente desconforto físico, mas também problemas emocionais e financeiros, tais como faltas freqüentes ao trabalho, baixa produtividade e despesas com tratamentos. Na rede pública de saúde dos Estados Unidos da América são gastos dois bilhões de dólares, anualmente, com tratamentos para indivíduos atópicos, conforme descrito por Stanley Fineman et al. no prefácio dos *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology* (november, part II, 1998).

### **3.1.1 – Tipos de alérgenos**

Os alérgenos são provenientes de várias fontes tais como fungos, pólenes, ácaros, insetos, protozoários, bactérias, medicamentos e alimentos, sendo classificados de acordo com o local de manifestação da reação alérgica em: epidérmicos e respiratórios (Basomba, 1982). Os alérgenos veiculados pelo ar atmosférico são os mais comuns e estão associados a doenças alérgicas respiratórias que podem comprometer significativamente a qualidade de vida das pessoas, sendo, portanto, os mais estudados nos últimos anos.

Desde 1873 tem-se o conhecimento de que esporos de fungos do ambiente, veiculados pelo ar atmosférico, desempenham papel importante como elementos alergizantes das vias respiratórias, ocasionando quando inalados, principalmente, asma brônquica e rinite. Em relação aos fungos, têm-se hoje na literatura, inúmeros relatos que evidenciam esse vínculo. Segundo Yunginger (1988), esporos e fragmentos de micélio de fungos estão entre os aeroalérgenos presentes com maior freqüência na atmosfera.

### 3.1.1.1 – Alérgenos fúngicos

Os alérgenos fúngicos, também chamados de extratos alergênicos, são substâncias brutas extraídas da biomassa desses microrganismos. Esses extratos constituem-se de misturas heterogêneas de diferentes proteínas (maior importância), carboidratos, lipídios e outras substâncias não identificadas (Basomba, 1982).

Nos Estados Unidos há em torno de 200 extratos fúngicos produzidos por várias indústrias e disponíveis comercialmente em vários países, porém sem padronização uniforme (Horner et al., 1995). Por esse motivo, a utilização desses extratos em diagnóstico definitivo pode apresentar restrições e tem motivado os pesquisadores a desenvolverem métodos mais adequados de padronização. Além disso, ressalta-se que, na maioria das vezes, os extratos disponíveis comercialmente para diagnóstico ou imunoterapia não são relevantes em determinadas regiões, simplesmente pela ausência do tipo de fungo ou pela sua baixa frequência no ambiente (Menezes, 1995).

Baseado nessas premissas, em 1973 o Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e o Serviço de Alergia do Hospital das Clínicas da USP iniciaram uma série de trabalhos que permitiram a visualização da microbiota fúngica anemófila mais frequente, sua periodicidade diária, variação sazonal e influência de fatores abióticos em sua frequência. Esses estudos foram realizados com amostras colhidas da grande São Paulo (Gambale et al., 1977; Gambale et al., 1981; Gambale et al., 1983) e outras regiões como Recife (Machado, 1976), Baixada Santista (Purchio et al., 1984) Presidente Prudente (Buck et al., 1985).

Em uma segunda fase dos estudos do mesmo grupo, foi demonstrada a necessidade da utilização de grande número de alérgenos fúngicos na verificação da sensibilização por meio de provas cutâneas, e a identificação dos fungos alergênicos mais importantes em nosso meio e dos seus elementos mais alergênicos (Mohovic et al., 1988). Esses estudos também demonstraram a importância de grupos de fungos não esporulantes em processos asmáticos (Gambale et al., 1988, Croce et al., 1990). A utilização de extratos alergênicos padronizados por local geográfico podem facilitar o diagnóstico das doenças

alérgicas, aumentando a sensibilidade dos mesmos. Mohovic et al. (1988) demonstraram que os extratos alergênicos que apresentavam maior positividade cutânea em pacientes alérgicos da cidade de São Paulo foram os de *Candida*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Curvularia* e *Drechslera*. Verificaram também que desses fungos, o extrato de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* apresentou a maior positividade em relação à intensidade de reação, fato que não é citado em nível mundial.

Na terceira fase da pesquisa, Menezes et al. (1995) avaliaram a composição bioquímica, antigenicidade e alergenicidade de extratos de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtidos por extração com Tris-HCl de várias fases de crescimento do fungo em meio líquido Czapeck modificado. Na continuidade dos trabalhos, os mesmos autores, estudando o fracionamento e caracterização dos extratos, verificaram que as frações mais alergênicas da biomassa fúngica foram compostas de duas proteínas de 60 e 14,4 kDa e uma glicoproteína de aproximadamente 36 kDa.

*Drechslera (Helminthosporium) spp.*, é um fungo filamentoso, que vive como saprófita no solo e está associado a patogenicidade em cereais como aveia, milho e gramíneas, tais como grama, cana de açúcar e outros. O crescimento natural da classe *Helminthosporium* como patógeno de cereais e cana de açúcar induz à possibilidade de utilização desses materiais como substrato para o cultivo desses fungos em meio sólido.

Dentro desse contexto, estudos com o *Helminthosporium* cultivado em meio sólido foram realizados em trabalho conjunto desenvolvido pelos Laboratórios de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química e de Imunologia e Alergia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas, ambos da Unicamp, utilizando linhagem ICB-USP K-1-16 e CBS 154.26 de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* fornecida e mantida pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

O processo de fermentação em estado sólido foi estudado em colunas de Raimbault por Hasan et al.(2003), com meios de cultura constituídos de bagaço de cana, farelo de milho e farelo de trigo. Os resultados mostraram o crescimento do

fungo em todos os substratos, com maior intensidade no farelo de trigo, chegando a cerca de 15 mg de proteína total/g de substrato seco. Os extratos produzidos apresentaram positividade cutânea em testes de puntura realizados em pacientes atópicos.

O tipo de recuperação e purificação de bioprodutos varia com a natureza e a qualidade (pureza) do produto final, o qual é influenciado pela aplicação e requerimentos de mercado. Produtos como proteínas e enzimas utilizadas para aplicações médicas requerem processamentos de purificação extensivos para a sua utilização. Os extratos alergênicos, em particular, não devem conter outros componentes alergênicos além das proteínas na sua composição. O processo de lixiviação das proteínas produzidas pelo cultivo do *Drechslera monoceras* em fermentação em estado sólido foi estudado no nosso grupo por Saraiva (2001), abordando os aspectos de seleção das variáveis importantes e determinação das faixas operacionais que conduzem a maximização da massa protéica total nos extratos. Os melhores resultados foram obtidos usando água como líquido extrator, pH entre 8,35 e 9,0 e relação sólido/solvente de 1:15 e 1:18.

Assim, a quantidade e a qualidade das frações alergênicas obtidas de fungos estão associadas aos substratos, as etapas de crescimento e os líquidos extratores. O estabelecimento criterioso desses parâmetros de processo representa uma condição básica de grande importância para a padronização dos extratos alergênicos de fungos.

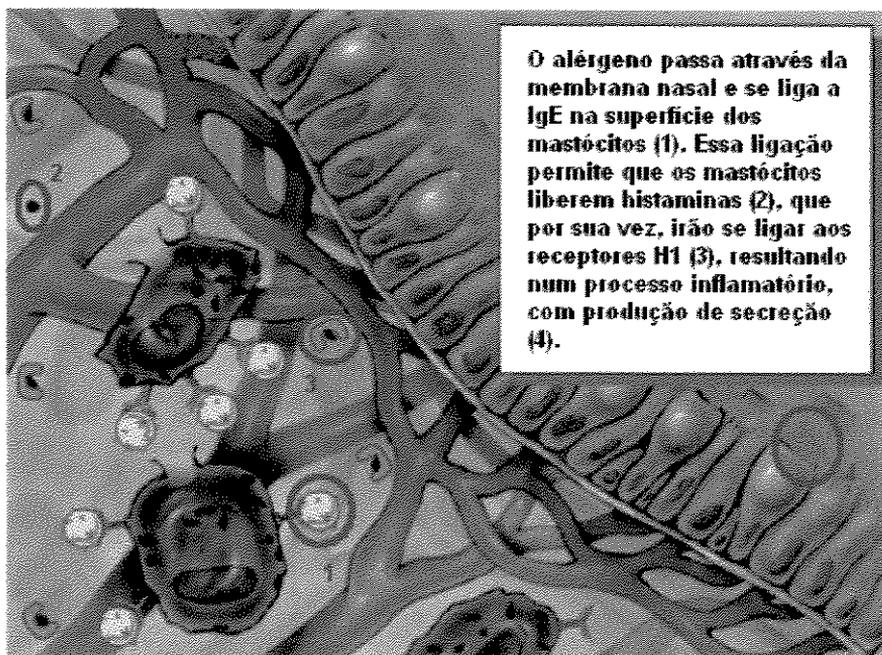
### **3.1.2 – Reações alérgicas**

O sistema imunológico, sistema de defesa do corpo humano, é composto por um conjunto de células que circulam na corrente sanguínea e linfática, bem como nos órgãos. Estas células apresentam como principais funções o reconhecimento e eliminação de elementos estranhos ao organismo.

Genericamente, as células que compõem o sistema imunológico (macrófagos, linfócitos T e B) ao entrar em contato com um alérgeno (substância estranha ao organismo) têm como uma das respostas a produção e síntese de moléculas

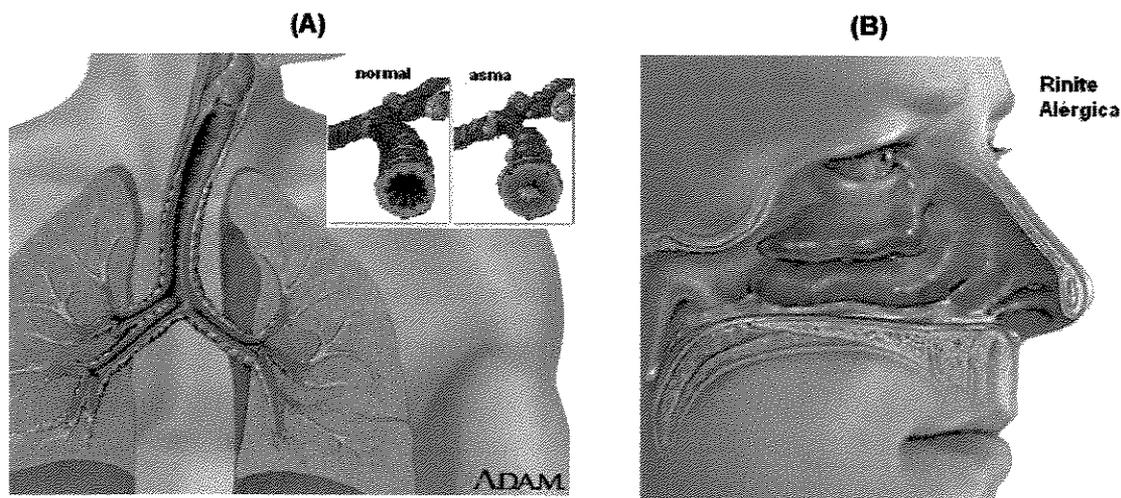
chamadas imunoglobulinas (Ig) com propriedades de anticorpos que se ligarão ao antígeno/alérgeno. A literatura reconhece 5 tipos de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, sendo a imunoglobulina E a mais envolvida em reações alérgicas do tipo I ou em anafilaxia.

Os indivíduos com alergia a uma determinada substância apresentam na superfície dos mastócitos (células do sangue), moléculas de IgE específicas capazes de reconhecer a presença desse alérgeno. Ao entrar novamente em contato com o mesmo alérgeno, desencadeiam a produção de grandes quantidades de IgE específica pelo linfócito B. Assim, a interação do alérgeno com IgE provoca a liberação, por parte destas células, de um grande número de substâncias, como histamina, serotonina, prostranglandinas e outras, que determinam a manifestação da reação alérgica nos diferentes órgãos. O processo de sensibilização com aeroalérgenos é esquematizado na Figura 1.



**Figura 1** – Esquema do processo de sensibilização por aeroalérgenos. (<http://www.rhinocortagua.com/c/treatments/inhaled.asp>, 2003) .

As manifestações mais comuns das doenças alérgicas são: febre, rinite alérgica e asma. A Figura 2 ilustra distúrbios causados em pacientes devido à sensibilização com aeroalérgenos.



**Figura 2** – Distúrbios causados por aeroalérgenos em indivíduos atópicos (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/encyclopedia.htm>, 2003). Inflamação dos bronquíolos (A) e da mucosa nasal (B).

### 3.1.3 – Tratamento da Alergia

O tratamento da alergia é feito preliminarmente com antiinflamatórios sistêmicos ou tópicos, como anti-histamínicos, esteróides, cromonas, entre outros. Os anti-histamínicos inibem a ligação da histamina com o receptor H1. Os esteróides nasais agem nas áreas inflamadas, aliviando o desconforto dos sintomas. O uso crônico desses medicamentos pode promover uma série de efeitos adversos, como sonolência, infecções secundárias e doenças iatrogênicas. Além disto, a terapia necessita da administração regular dos medicamentos por períodos da ordem de dias ou meses para que se obtenha os primeiros sinais de melhora dos sintomas, e ainda pode apresentar baixa eficiência nos casos mais graves de doenças alérgicas.

Outro tratamento utilizado no sentido de controle das manifestações das doenças alérgicas é a imunoterapia ou terapia de dessensibilização. A imunoterapia tem se tornado uma das formas de tratamento das doenças alérgicas mais

estudadas nos diferentes centros de referência, e consiste na administração de doses crescentes do alérgeno até se atingir a dose considerada para a sua manutenção (Norman, 1985). A administração da dose de manutenção pode durar de meses a anos. As principais desvantagens dessa terapia são tratamento prolongado e o aparecimento de reações adversas, tais como febre, choque anafilático, inchaço local e vermelhidão nos olhos, decorrentes da administração do alérgeno na sua forma livre.

Dentre os avanços mais novos na terapia de alergia, destacam-se a redução da frequência de injeção do alérgeno e dos seus efeitos colaterais em consequência da administração dos antígenos na forma encapsulada. Os antígenos encapsulados são liberados de modo controlado, diminuindo a intensidade das reações adversas sistêmicas ou locais, porém mantendo a sua imunogenicidade. A utilização de antígenos encapsulados constitui uma alternativa para as terapias convencionais, com maior eficiência de ação dos antígenos e benefícios para o bem estar dos pacientes. Lipossomas e microesferas poliméricas são os veículos atualmente mais estudados para essa terapia pelas suas propriedades de liberação controlada, biodegradabilidade e biocompatibilidade.

## 3.2 – Lipossomas

### 3.2.1 - Histórico e Aplicações

Lipossomas são conhecidos desde 1964, quando foram descritos por Bangham. Em seus experimentos, Bangham demonstrou que fosfolipídios suspensos em excesso de solução aquosa são capazes de formar bicamadas lipídicas concêntricas e multilamelares, da ordem de nanômetros ou micrômetros, semelhantes a pequenas células ou vesículas. Inicialmente, estas vesículas esféricas foram usadas como modelos de bicamadas lipídicas para estudar o transporte de íons através das membranas celulares, servindo de base para uma série de estudos posteriores em biofísica de membranas (Cevc, 1993).

Durante os anos 70, a pesquisa em lipossomas avançou no campo da física básica de membranas e na área de aplicações terapêuticas, como um sistema vetor capaz de alterar a disposição tecidual de várias macromoléculas *in vivo* e introduzir macromoléculas estranhas dentro das células *in vitro*. Com essa abertura, a pesquisa em sistemas lipossomais abrangeu três diferentes campos: biofísica, biologia celular e medicina (Dean, 1993; Audera et al, 1991). Na medicina, a pesquisa de lipossomas como vetores de liberação controlada de fármacos e agentes bioativos tem aumentado significativamente. Este fato se deve, principalmente, as suas propriedades, tais como, biodegradabilidade, estabilidade e aumento do tempo de meia vida do fármaco na circulação sanguínea.

Atualmente, os lipossomas são aplicados na tecnologia de alimentos, encapsulando enzimas, aromas e corantes, na indústria de cosméticos (mais antiga aplicação), na indústria química como suportes de catalisadores químicos e em aplicações médicas (Lasic, 1993).

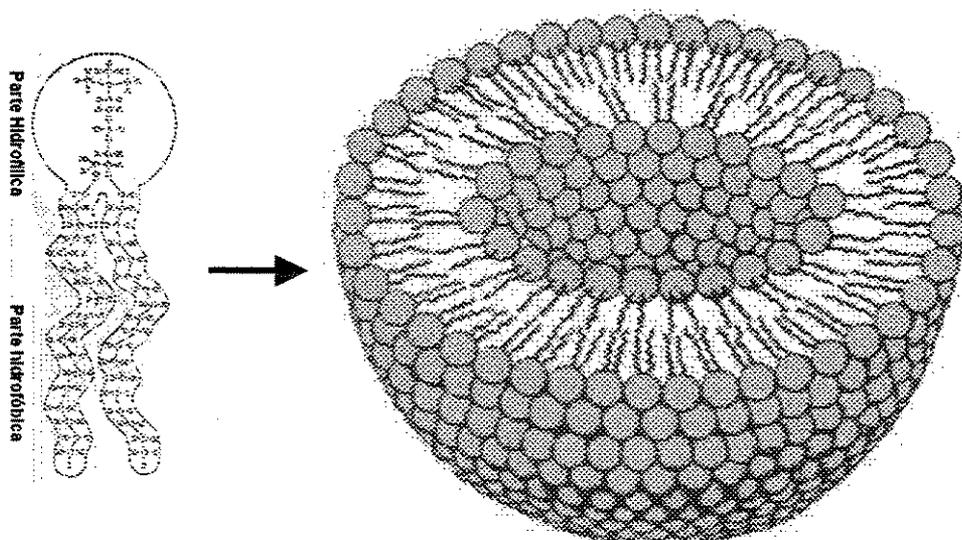
Existem várias formulações lipossomais licenciadas e disponíveis comercialmente, enquanto outras ainda encontram-se em fase final de testes em humanos. Neste último caso destaca-se o Mikasome para o tratamento de infecções bacterianas, C53 com prostaglandina E<sub>1</sub> contra disfunções orgânicas eréteis e HAV/HB<sub>5</sub> para o tratamento da Hepatite A e B (Gregoriadis, 1995). Dentre os

produtos lipossomais disponíveis comercialmente, para uso parenteral, destaca-se o AmBisome®, lipossomas que veiculam o antibiótico anfotericina B, Doxil (doxorubicina) e DaunoXome® (daunorubicina), lipossomas que carreiam fármacos usados na quimioterapia de câncer (Baca-estrada et al, 2000).

### **3.2.2 – Estrutura e Tipos**

Lipossomas ou vesículas de fosfolipídios são estruturas concêntricas, constituídas de um compartimento aquoso central circundado por uma ou várias bicamadas lipídicas separadas por fases aquosas, formando partículas unilamelares ou multilamelares. Essa estruturação deve-se aos fosfolipídios, que em meio aquoso organizam-se na forma de bicamadas, expondo as suas cabeças hidrofílicas à água e interagindo as caudas hidrofóbicas de modo a excluir a água, formando assim estruturas lamelares que, para atingirem estabilidade termodinâmica, curvam-se e fecham-se sobre si mesmas formando vesículas esféricas. Neste processo de formação, os lipossomas podem encapsular no seu interior substâncias, como: peptídeos e proteínas, hormônios, enzimas, antibióticos e agentes antifúngicos, agentes anticancer, DNA e vírus (Lasic, 1993; Farell e Sirkar, 1997).

A Figura 3 ilustra a estrutura típica de lipossomas. As cabeças polares das moléculas anfífilas são expostas ao meio aquoso, enquanto que as caudas apolares formam o interior lipofílico das lamelas, capaz de permear substâncias encapsuladas.



**Figura 3** – Estrutura típica de lipossomas (<http://dadairs.com/liposomes.htm> - 2002)

Os lipossomas podem diferir quanto ao tamanho, organização estrutural e composição lipídica. O tamanho pode variar de 20 nanômetros a 60 micrometros, enquanto que para a organização estrutural, as vesículas podem ser uni, multi ou oligolamelar (Lasic,1993). As vesículas unilamelares são divididas, embora arbitrariamente, em duas classes, conforme o seu tamanho: vesículas com diâmetros maiores que 100nm são consideradas vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas com diâmetros menores que 100nm são consideradas vesículas unilamelares pequenas (SUV). Uma justificativa para esta definição de LUV e SUV é baseada no espectro de ressonância magnética nuclear (NMR). SUV, em geral, fornecem espectros com boa resolução, ao passo que LUV fornecem espectros de baixa resolução, devido ao tombamento lento das vesículas em suspensão (Cevc, 1993).

Fosfolipídios são os maiores componentes das membranas biológicas, e conseqüentemente, dos lipossomas. O fosfolipídio mais comum é a fosfatidilcolina (lipídio zwitteriônico - PC) que pode ser derivada de fonte natural, extraída da gema do ovo e do grão de soja, ou sintética. Outro fosfolipídio zwitteriônico encontrado em membranas e utilizados nas formulações lipossomais é a fosfatidiletanolamina, que sozinha não é capaz de formar bicamadas lipídicas. Fosfolipídios carregados positiva ou negativamente também podem ser incorporados aos lipossomas, dependendo da

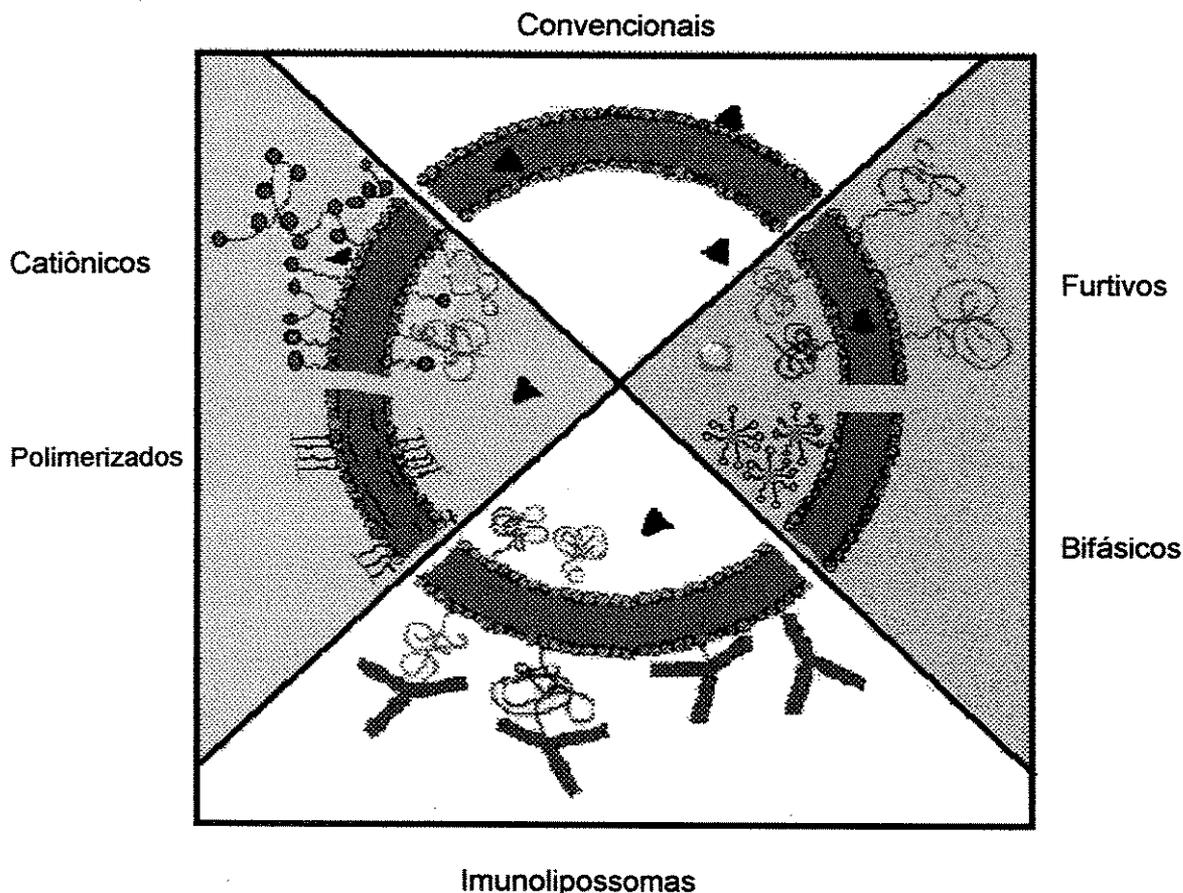
aplicação. Outro componente lipídico presente em lipossomas é o colesterol que influencia significativamente as propriedades estruturais das vesículas, como a fluidez das bicamadas e ainda pode conferir maior estabilidade às mesmas, dependendo da sua concentração, acima da temperatura de transição de fases (New, 1990).

A bicamada lipídica formada é capaz de acomodar moléculas hidrofóbicas encapsuladas e comporta-se como uma membrana semipermeável com relação ao material hidrofílico encapsulado no seu volume aquoso (Lasic, 1993; Crommelin e Scherieier, 1994). A encapsulação de diferentes fármacos pode ser efetuada em lipossomas de tamanhos variados. A Tabela 1 mostra vantagens e desvantagens dos diferentes tamanhos de vesículas existentes.

**Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos diferentes tamanhos de lipossomas.**(adaptado de Dean, 1993 e Shahidi e Han, 1993).

Tipos de lipossomas	Tamanho (nm)	Vantagens	Desvantagens
MLV	0,2 – 2.000	-Preparação rápida e simples; -não exposição do fármaco a condições drásticas, tais como, solvente orgânico ou ondas ultrasônicas.	-Baixa capacidade de encapsulação (5-14%) de substancias hidrofílicas. -População muito heterogênea.
LUV	100 – 250	-Alta capacidade de encapsulação. -Adequado para macromoléculas. -População relativamente homogênea e estável.	-Exposição dos componentes ativos a temperaturas relativamente altas durante o processo de encapsulação.
SUV	20 – 50	-População homogênea - Ótima reprodutibilidade	-Suspensão diluída de lipossomas - Lipossomas instáveis -Baixa capacidade de encapsulação do meio aquoso.

Nos últimos anos, vários tipos de lipossomas foram desenvolvidos para aplicações específicas e diferentes rotas de administração. Dentre os tipos existentes, os mais conhecidos são: lipossomas convencionais, polimerizados, Stealth® ou furtivos, bifásicos, imunolipossomas e lipossomas catiônicos (Storm et al., 1998; Baca-estrada et al, 2000; Cabral et al., 2003). A Figura 4 ilustra alguns dos vários tipos de lipossomas.



**Figura 4** – Tipos de lipossomas quanto à composição lipídica, modificações na superfície e associação com agentes bioativos.

Lipossomas Convencionais podem ser definidos como aqueles que são tipicamente compostos de fosfolipídios naturais ou sintéticos (zwitteriônicos ou carregados negativamente) com/sem colesterol. Os lipossomas convencionais possuem pequeno tempo de circulação na corrente sanguínea. Quando administrado *in vivo*, por uma variedade de rotas parenterais, tendem a acumular rapidamente nas

células fagocíticas do sistema fagocítico mononuclear (MPS) ou sistema retículo-endotelial (RES). Os órgãos de maior acumulação são o fígado e o baço. Devido a essa propriedade, as aplicações terapêuticas mais indicadas para esse tipo de lipossomas são aquelas que envolvem internalização de fármacos por macrófagos (Storm et al., 1998).

Lipossomas Polimerizados são geralmente compostos de lipídios anfifílicos que apresentam insaturações, as quais constituem os grupos polimerizáveis. Essas insaturações nas cadeias de hidrocarbonetos permitem a polimerização do agregado lipídico por irradiação com luz ultravioleta, radiação- $\gamma$  ou radiação térmica. Esses lipossomas apresentam propriedades diferenciadas dos convencionais, tais como: aumento da estabilidade *in vivo* (adequada para via oral) e amplificação das propriedades óticas, como sinal e amplitude do espectro de absorção. As aplicações em biosensores apresentam grande potencial, especialmente no desenvolvimento de sistemas para diagnósticos, devido a alterações colorimétricas produzidas com a polimerização, permitindo o acompanhamento do tratamento (Cabral et al., 2003 e Hennies et al., 2001).

Lipossomas Furtivos ou Stealth<sup>®</sup>: a maneira mais conhecida de produzir lipossomas com circulação prolongada na corrente sanguínea é ligar covalentemente o polímero hidrofílico polietileno glicol (PEG) na superfície externa das vesículas. Em geral, o PEG é acoplado ao lipídio distearoilfosfatidilcolina (DSPE) e, quando incorporado em lipossomas, é mais efetivo (em relação ao tempo de circulação na corrente sanguínea) que os gangliosídeos (GM<sub>1</sub> - gangliosídeo monosialico). Os lipossomas cobertos com PEG são capazes de evadir do sistema fagocítico mononuclear, aumentando o tempo na circulação sanguínea. A estabilização estrutural dessas vesículas é resultado da presença do grupamento PEG, localizado na sua superfície, os quais cria uma barreira estérica altamente hidratada que reduz as interações com componentes celulares e moleculares no meio biológico. Vale salientar que o nome Stealth<sup>®</sup> é uma marca registrada pela empresa SEQUUS Pharmaceuticals.

Lipossomas Bifásicos: Este tipo de lipossomas é adequado para liberação dérmica e mucosal de agentes terapêuticos como proteínas e DNA. Estas vesículas

apresentam como característica marcante, que difere dos outros tipos de lipossomas, sua consistência pastosa. São vesículas multilamelares adequadas para veiculação de material biologicamente ativo (agentes antivirais, vitaminas, proteínas, prostaglandinas), contendo mais de 15 bicamadas lipídicas. Seu compartimento central é ocupado por uma emulsão. As porções lipofílicas da emulsão contem o material biologicamente ativo e/ou o agente de consistência, enquanto que o espaço entre as bicamadas é preenchido com água. Na emulsão, o material biologicamente ativo é circundado por surfactantes. Os agentes de consistência que contribuem para um aumento da viscosidade do meio podem ser metil salicilato, dipalmitoillisina e monolauroillisina. Atualmente, as aplicações potenciais de lipossomas bifásicos estão voltadas para o tratamento de deficiência orgânica sexual (encapsulando prostaglandina E) e de enfermidades genitais (encapsulando interferon  $\alpha$ ) (Foldvari, 1998).

Imunolipossomas: possuem anticorpos específicos ou fragmentos de anticorpos na sua superfície, visando o direcionamento específico e o aumento da especificidade de ligação. Este sistema tem sido usado, principalmente, na liberação de fármacos para terapia de câncer. Pesquisas realizadas com o objetivo de aumentar o tempo de meia vida dos imunolipossomas, após a administração intravenosa, demonstraram que a associação do polímero PEG à sua superfície, além da ligação de anticorpos, aumenta a chance destes veículos alcançarem o órgão alvo específico (Storm et al., 1998).

Lipossomas Catiônicos são formados por um anfifílico catiônico simples (citofectina) ou mais comumente de uma combinação de um citofectina e um lipídio zwitteriônico. Esses sistemas são mais utilizados como vetores para a veiculação de material genético. A maneira na qual essas vesículas mediam a entrega do ácido nucléico é simples: lipossomas catiônicos carregados positivamente interagem eletrostaticamente com a seqüência de ácido nucléico carregado negativamente para formar complexos que são capazes de penetrar na célula. Na célula, as seqüências do ácido nucléico são liberadas lentamente, para serem ou expressadas no núcleo da célula ou para controlar a expressão de gene (Gregoriadis, G., 1995).

O uso desses veículos em sistemas de liberação controlada de macromoléculas, como proteínas, peptídeos e DNA, requer uma tecnologia capaz de fornecer uma eficiência de encapsulação elevada e bem controlada quantitativamente, boa estabilidade e reprodutibilidade. Entretanto, a encapsulação dessas macromoléculas em vesículas lipídicas é difícil e algumas vezes impossível, constituindo o principal desafio no processo de produção dos lipossomas.

### **3.2.3 – Métodos de Produção**

O uso de formulações lipossomais em processos industriais destinados a aplicações clínicas está condicionado a eficiência de encapsulação do fármaco, usando métodos simples, reprodutíveis e inertes.

As propriedades dos lipossomas e sua aplicabilidade vão ser os fatores limitantes na escolha do tamanho e tipo de lipossomas a ser produzido.

O método clássico de produção de vesículas, método de Bangham, leva a formação de MLV que apresentam baixa eficiência de encapsulação de fármacos hidrofílicos e mostram-se inadequadas para a inclusão de componentes lábeis. Visando contornar estes problemas, métodos com alto poder de encapsulação e/ou condições brandas de preparação foram desenvolvidos. Dentre os métodos disponíveis para encapsulação de fármacos, os que conduzem a maiores eficiências de encapsulação de macromoléculas, como peptídeos e proteínas são: remoção de detergente, evaporação em fase reversa e desidratação e rehidratação. Apesar destes métodos fornecerem altas eficiências de encapsulação em escala de laboratório, somente o método da desidratação-rehidratação é facilmente escalonável em circuito fechado. Este método é empregado atualmente em algumas indústrias farmacêuticas com custos relativamente pequenos.

#### **3.2.3.1 – Método da Desidratação e Rehidratação**

Na década de 80, Kirby e Gregoriadis (1984) desenvolveram um método capaz de encapsular macromoléculas em lipossomas com altos rendimentos de

encapsulação do soluto e usando condições brandas de preparação. O método é simples e baseado no uso de desidratação e rehidratação controlada, podendo ser facilmente escalonado. Sua preparação envolve a mistura de uma solução aquosa do soluto com uma suspensão de lipossomas vazios, seguido da secagem por sublimação ou liofilização da mistura resultante (Frézard, 1999). O contato íntimo das estruturas lipossomais secas com as moléculas de soluto facilitam a incorporação do mesmo durante o passo da rehidratação. Vesículas preparadas por esse método são chamadas de Dehydration-Rehydration Vesicles (DRVs).

Uma das vantagens deste método, principalmente quando comparado à evaporação em fase reversa, é a não exposição do soluto a solventes orgânicos e/ou sonicação. Outra vantagem é que a secagem destes materiais, até o momento, constitui uma alternativa eficiente para alcançar a estabilidade de prateleira em longo prazo desejada para formulações farmacêuticas.

Uma desvantagem deste método é que na desidratação pode ocorrer fusão das vesículas, pois a camada de água que circunda os lipossomas é retirada, diminuindo as repulsões superficiais, favorecendo a agregação. A fusão resulta no aumento do tamanho dos lipossomas e na liberação parcial do soluto encapsulado. A liberação antecipada do soluto de lipossomas estocados torna a encapsulação ineficaz, podendo, inclusive, aumentar a toxicidade da formulação quando usada.

Dados da literatura confirmam a alta capacidade de encapsulação de proteínas como albumina bovina (BSA), fator estimulante de granulócitos (rhG-CSF) e enzimas como neutrase e  $\beta$ -galactosidase em lipossomas desidratados-rehidratados (Kirby and Gregoriadis, 1984; Meyer et al., 1994; Kim et al., 1999).

Kirby et al. (1987) estudaram a eficiência de encapsulação da enzima neutrase em diferentes tipos de lipossomas. Esta enzima foi encapsulada em lipossomas com o objetivo de acelerar o período de maturação do queijo cheddar, que normalmente precisa de um ano para atingir sua maturidade ideal. Os lipossomas foram constituídos de fosfatidilcolina de ovo. Os resultados de encapsulação da enzima com os lipossomas zwitteriônicos foram distintos. A eficiência de encapsulação com MLVs foi de  $2 \pm 0.5\%$ , com SUVs foi de  $1\%$ , com vesículas preparadas por evaporação em fase reversa (REVs) foi  $10 \pm 8.6$  e com

DRVs foi de  $33.6 \pm 5.5\%$ . Comparando com as outras vesículas produzidas (SUVs, MLVs e REVs), DRVs exibiram alta eficiência de encapsulação.

Posteriormente, Kirby et al. (1991) também estudaram a encapsulação de ácido ascórbico em lipossomas DRVs constituídos de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e  $\alpha$ -tocopherol. A eficiência de encapsulação média do ácido ascórbico em lipossomas DRVs foi de 54%, portanto bastante alta. A encapsulação deste ácido em lipossomas retardou sua decomposição, quando comparado com o ácido livre. Em solução, o ácido ascórbico decompõe completamente em menos de 20 dias a 4°C, enquanto que em lipossomas são necessários 50 dias para decompor 50% das moléculas encapsuladas à 4°C. Assim, com alta eficiência de encapsulação e lenta decomposição, os lipossomas podem ser usados para melhorar o tempo de prateleira da vitamina C.

Frézard et al. (2000) tentaram encapsular antimoniato de meglumina em lipossomas através das vesículas produzidas pelo método da desidratação - rehidratação. Os lipossomas foram constituídos de DSPC:colesterol:DCP (razão molar 5:4:1). Foram preparadas formulações lipossomais com 3 tipos de vesículas: MLVs (multilamellar vesicles), DRVs (dehydration-rehydration vesicles) e FDELS (*freeze-drying empty liposomes*). Todos os lipossomas foram produzidos, inicialmente, pelo método da hidratação do filme seco de lipídios, seguido nos últimos dois casos por sonicação. A diferença entre os 3 tipos de suspensão lipossomal está relacionada ao tipo de preparação e a adição do fármaco. As vesículas multilamelares foram preparadas sem sonicação e com a adição do fármaco durante a hidratação. DRVs foram preparadas com a adição do fármaco posterior a sonicação e antes da liofilização, enquanto as FDELS foram preparadas adicionando o fármaco na etapa de rehidratação das vesículas após a liofilização.

A rehidratação foi realizada em 3 etapas, adicionando primeiramente 1/10 do volume original de tampão ou da solução contendo o fármaco, seguido de incubação por 30 minutos. As duas etapas posteriores foram realizadas, adicionando, 1/10 e 8/10 do volume original, respectivamente, com tempo de incubação de 30 minutos para cada etapa. O resultado de encapsulação foi de 12.5% para MLVs, 42% para DRVs e 31% para FDELS. Assim, as DRVs apresentaram uma maior eficiência de

encapsulação quando comparadas às outras vesículas. A vantagem das FDELS em relação as DRVs é que no primeiro caso, o fármaco não é exposto ao freeze-drying, portanto, reduzindo o risco de alteração química do mesmo.

Como citado anteriormente, as etapas de secagem por congelamento e rehidratação podem afetar a estabilidade das vesículas, conduzindo a fusão e conseqüente vazamento do conteúdo interno. Visando contornar esse problema, pesquisas realizadas nos últimos anos mostraram que os açúcares e alguns polióis são capazes de inibir a fusão de membranas. Além de inibir, eles preservam a reatividade e imunogenicidade dos grupos funcionais encapsulados e decrescem as temperaturas de transição de fase dos lipídios secos, evitando transições nas membranas. Assim, as recentes preparações lipossomais para uso farmacêutico incluem a presença de açúcares na sua composição.

### 3.2.4 – Estabilização de Lipossomas e Proteínas por Açúcares

Crioprotetores têm sido usados, extensivamente, na preparação de lipossomas para amenizar problemas de fusão e vazamento do soluto encapsulado. Dentre os vários açúcares existentes a trealose, dissacarídeo não redutor, é o mais eficiente, pois apresenta geometria espacial que favorece maior exposição dos seus grupos OH (Figura 5). Crowe et al. (1984) relataram que membranas biológicas, quando desidratadas, alteravam sua integridade estrutural e funcional de maneira irreversível. Porém, quando estas mesmas membranas eram desidratadas na presença de 20% (em peso) de trealose, suas propriedades físicas e estruturais eram mantidas.

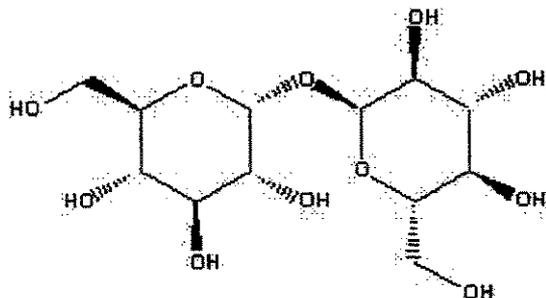


Figura 5 – Molécula de trealose

A eficiência do crioprotetor está relacionada diretamente à estabilidade das vesículas. Fatores como composição lipídica, concentração de trealose e tamanho das vesículas são extremamente importantes para alcançar a máxima eficiência no desempenho do crioprotetor.

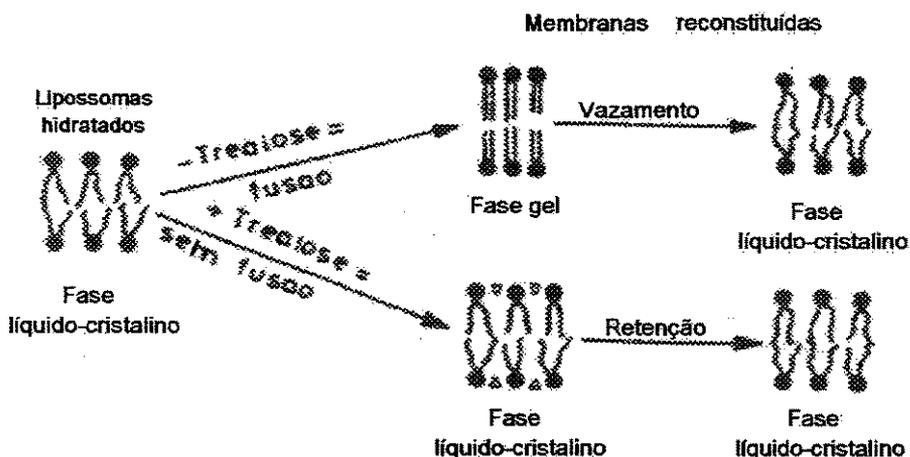
Os lipossomas, quando hidratados, apresentam uma barreira eletrostática na sua superfície, impedindo que outras vesículas se aproximem. Esta barreira é representada pelas ligações de hidrogênio que são formadas entre as moléculas de água e a cabeça polar de cada molécula de fosfolípido. Quando estas vesículas são desidratadas, a densidade no empacotamento dos grupos polares aumenta, favorecendo a aproximação das cadeias acilas e aumentando as interações de van der Waals, acarretando no aumento da temperatura de transição de fases dos lipossomas secos. A fusão também ocorre, pois a barreira de água que oferecia resistência à aproximação de outras vesículas foi retirada (Crowe et al. 1984, 1987).

Alguns açúcares, como a trealose, interagem com o grupo fosfato da cabeça polar da molécula de fosfolípido. Estudos de espectroscopia de infravermelho mostraram que essa interação é do tipo ligações de hidrogênio. Os lipídios secos com trealose apresentam propriedades físicas semelhante àqueles hidratados. Outros carboidratos, como a sacarose, maltose, glicose, lactose e polióis, como o glicerol, não interagem com a parte polar da molécula de fosfolípido tão eficientemente como a trealose, devido à sua conformação espacial. Assim, eles podem reduzir a temperatura de transição de fases do lipídio seco, porém não o fazem com tanta eficiência como a trealose.

Disalvo et al. (2000) estudaram o efeito crioprotetor da trealose e da sacarose em lipossomas unilamelares compostos de DMPC. A trealose decresce em 60% a atividade da água de DMPC, enquanto que a sacarose decresce apenas 10%. O potencial de dipolo do DMPC também diminui com o aumento da concentração de trealose, fato este não observado com a sacarose. Assim, pode-se concluir que a trealose é capaz de deslocar mais moléculas de água da primeira camada de hidratação do que a sacarose. A interação da trealose com a cabeça polar do fosfolípido é muito forte, afetando a permeabilidade da bicamada. Concluiu-se que por molécula de DMPC, 11-14 moléculas de água podem ser deslocadas por três

moléculas de trealose. Em contraste, quatro moléculas de sacarose deslocam somente três moléculas de água por fosfolípido, sem nenhum efeito no potencial de dipolo.

Em geral, é preciso 1g de trealose/g lipídio para inibir fusão e impedir vazamento do conteúdo interno das vesículas, porém essa razão pode variar, dependendo da composição lipídica (Crowe et al, 1988). O vazamento do soluto ocorre porque as vesículas quando desidratadas e rehidratadas sofrem várias transições de fases. O esquema da Figura 6 mostra o mecanismo de estabilização dos lipossomas desidratados pelos açúcares. A trealose impede essas transições de fases das vesículas quando passam do estado líquido cristalino para o estado gel, na desidratação, e do estado gel para o líquido cristalino, na rehidratação.



**Figura 6** – Mecanismo proposto para a estabilização por açúcares de vesículas desidratadas (adaptado de Crowe et al., 1988).

Outra propriedade da trealose é a sua excelente capacidade de vitrificação e não cristalização. Açúcares redutores ou açúcares que cristalizam desfavorecem a estabilização das membranas, tornando ineficazes na crioproteção. A sacarose e o manitol em altas concentrações, em geral, tendem a cristalizar em processos de secagem por congelamento e secagem por aquecimento.

Wolkers et al. (2004) também estudaram o efeito protetor de solução de fosfato com glicose ou sacarose na retenção de solutos em lipossomas preparados por liofilização. Os autores confirmaram que lipossomas que foram secos com ou

glicose ou fosfato sozinho liberaram completamente o soluto após rehidratação. Entretanto, 30% de retenção do soluto foi obtido quando a mistura glicose-fosfato foi usada e 85% quando a mistura fosfato-sacarose foi utilizada na formulação. A perspectiva de usar em escala industrial uma mistura de fosfato-sacarose na preparação de DRVs é interessante, uma vez que o custo destes produtos são inferiores ao custo da trealose. No entanto, os autores reafirmam que a trealose é o crioprotetor mais efetivo.

Açúcares também são estabilizadores de proteínas. Quando estruturas protéicas são desidratadas, seus arranjos moleculares (entropicamente dirigidos) são perdidos. Através de estudos de infravermelho, evidenciou-se que a estabilização das proteínas pelos açúcares envolve ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila dos açúcares e os constituintes da proteína (Crowe et al. 1988). Vários artigos mostram que a adição do açúcar preserva em até 95% a atividade enzimática das proteínas quando submetidas ou à secagem por congelamento ou aquecimento (Branchu et al., 1999; Adler e Lee, 1999; Tzannis et al., 1998).

#### 3.2.4.1 – Influência dos Açúcares como Crioprotetores em Lipossomas Preparados por Desidratação – Rehidratação.

Madden et al. (1985) estudaram a capacidade crioprotetora da trealose usando vesículas unilamelares grandes. Vesículas, constituídas de fosfatidilcolina do ovo (40  $\mu\text{mol/mL}$ ), contendo  $\text{Na}^+$  encapsulado, foram desidratadas (liofilização) na ausência e presença de várias concentrações de trealose. Após a rehidratação, na ausência de trealose, as vesículas exibiram um aspecto leitoso em contraste a aparência translúcida da amostra original. Vesículas desidratadas na presença de 50mM de trealose, sob rehidratação, apresentaram o mesmo tamanho das vesículas originais, porém uma pequena fração de estruturas maiores é também observada. A uma concentração de trealose de 125mM ou maior não se observa diferença estrutural entre as vesículas antes e após a liofilização. Os resultados obtidos na análise de retenção do  $\text{Na}^+$  encapsulado em lipossomas, após rehidratação, mostraram que é necessária a presença de trealose dentro (monocamada interna) e

fora da vesícula (superfície lipossomal) para obter uma maior eficiência de retenção do soluto.

Madden et al. (1985) também comprovaram que o tamanho das vesículas foi outro fator importante que influenciou a retenção do soluto nas membranas. Vesículas de 100nm apresentaram uma retenção de 92% de Na<sup>+</sup> após a rehidratação, contra 87% de vesículas com 200nm e 80% de vesículas com 500nm de diâmetro. A trealose foi o açúcar que mais reteve Na<sup>+</sup> nas vesículas de 100nm. Testes realizados com diferentes açúcares mostraram que a presença de trealose favoreceu a retenção de 88% do material encapsulado após 24 h de liofilização, contra 86% da sacarose e 66% da lactose.

Kim et al. (1999) estudaram a capacidade da  $\beta$ -galactosidase, incorporada a lipossomas secos, digerir a lactose presente no leite. Isto seria útil para pessoas que apresentam deficiência em hidrolisar a lactose. Lipossomas desidratados (PC ovo/colesterol 2:1 mol/mol) foram preparados na presença de trealose (4g/g lipídio) pelo método das vesículas desidratadas-rehidratadas (DRVs), para superar a instabilidade da suspensão de lipossomas convencional. Os resultados mostraram que os lipossomas liofilizados estocados por 60 dias a 4 e 17°C, apresentaram 98 e 93% de eficiência na reconstituição. A atividade da  $\beta$ -galactosidase encapsulada em lipossomas liofilizados foi medida e ao final de 60 dias a 17°C,  $95 \pm 6,1\%$  da sua atividade foi preservada, havendo apenas 8% do seu conteúdo interno despreendido do interior. Assim, os lipossomas preparados pelo método da desidratação e rehidratação apresentaram excelente reconstituição após 60 dias e preservou em 95% a atividade da  $\beta$ -galactosidase.

Quintilio et al. (2000) encapsularam uma proteína recombinante do *Mycobacterium leprae* (18-kDa) em lipossomas unilamelares grandes na presença de 0,4M de trealose. Os lipossomas (200nm) foram compostos por fosfatidilcolina, dicetilfosfato e colesterol (24:13:4), em tampão citrato já com a proteína. Inicialmente, eles foram congelados, liofilizados e reconstituídos. LUVs preparadas na ausência de trealose agregaram-se e tornaram-se multilamelares após a rehidratação, indicando fusão de membranas. Porém, LUVs preparadas na presença de trealose permaneceram unilamelares e monodispersas, sem agregação. Os resultados

mostraram que após 28 dias a 37°C, LUVs retiveram 68,3% da quantidade inicial de proteína encapsulada e após 28 dias a 4°C, somente 2,1% da concentração inicial de proteína vazou.

Diante do exposto, torna-se claro a presença indispensável do crioprotetor na suspensão lipossomal preparada através de DRVs, e que a trealose é o crioprotetor mais eficiente, quando comparado a outros carboidratos e polióis. Sua eficiência está relacionada à sua disposição molecular, tornando acessíveis seus grupos hidroxila, facilitando as ligações de hidrogênio com os grupos fosfatos dos fosfolipídios. Outras moléculas de carboidratos não apresentam tal eficiência em expor seus grupamentos hidroxilas, devido à sua disposição molecular, enquanto os polióis não conseguem interagir com o grupo fosfato, pois se intercalam entre as moléculas fosfolipídicas.

### **3.2.5 – Lipossomas em Aplicações Imunológicas**

Os lipossomas constituem estruturas supramoleculares que mimetizam as membranas celulares devido as suas propriedades materiais, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa imunogenicidade. Além da similaridade com membranas biológicas, são capazes de penetrar nas células eficientemente, liberando o agente bioativo ou agir como carreadores desses fármacos, liberando-o controladamente na corrente sanguínea durante várias horas ou dias.

Numerosos estudos têm demonstrado a imunoadjuvanticidade dos lipossomas para uma ampla faixa de antígenos de diferentes origens (Cevc, 1993). Apesar da abrangência das aplicações lipossomais em vacinas (contra: malária, hepatite A, influenza, difteria, tétano – Gregoriadis, 1995), poucos trabalhos tem sido desenvolvidos sobre os efeitos dos lipossomas incorporando antígenos e sua atuação como imunomoduladores, onde o objetivo não é a obtenção de elevados títulos de anticorpos, como no caso das vacinas convencionais, mas a obtenção e manutenção de determinados níveis de imunoglobulina E (IgE) no organismo (Walls, 1992).

A interação dos lipossomas com células é de grande interesse não somente para a liberação controlada de fármacos, mas também para o entendimento dos mecanismos de interação célula-célula que atuam no processo de reconhecimento de antígenos (Lasic, 1993). Os lipossomas podem interagir com as células através da troca de lipídios ou proteínas com as membranas celulares, por fusão ou por fagocitose<sup>1</sup>.

O principal sítio de desestabilização de material particulado, incluindo vesículas fosfolipídicas, da circulação *in vivo* é o sistema fagocítico mononuclear (MPS), também conhecido como sistema reticuloendotelial (RES). O MPS consiste de monócitos circulatórios e monócitos do fígado (células de Kupffer), baço, nodos linfáticos e da medula óssea. A função primária do MPS é a remoção de partículas estranhas da corrente sanguínea. Esse sistema desempenha funções como: defesa contra microrganismos, parasitas, células neoplásicas, resposta ao choque hemorrágico, a fármacos e a complexos imunes presentes na circulação (Cevc, 1993).

A maioria das pesquisas, que relatam o comportamento de lipossomas *in vivo*, tem sido desenvolvida usando injeção intravenosa. Lipossomas aplicados por via intravenosa, normalmente, interagem com as lipoproteínas de alta densidade do plasma e com as opsoninas<sup>2</sup>, as quais adsorvem na superfície das vesículas, mediando o processo de endocitose pelos macrófagos do MPS, principalmente, pelas células de Kupffer do fígado e pelos macrófagos do baço (Cevc, 1993).

Em geral, as vesículas fluidas são removidas mais rapidamente da corrente sanguínea que as rígidas. Supõe-se que as opsoninas adsorvem preferencialmente em vesículas com bicamadas fluidas. A desestabilização da corrente sanguínea é também influenciada pela carga superficial e pelo tamanho das vesículas. Um tempo de meia-vida maior é obtido quando os lipossomas são relativamente pequenos e não possuem carga superficial. Entretanto, sem considerar o tempo dos lipossomas no sistema vascular, parte da dose injetada é apresentada aos macrófagos do MPS, terminando no compartimento lisossomal da célula. Neste aparato, os lipossomas

---

<sup>1</sup> Fagocitose: processo através do qual as células englobam partículas e microrganismos.

<sup>2</sup> Opsoninas: moléculas que se ligam às partículas a serem fagocitadas e as receptores nos fagócitos.

são rompidos, o soluto é liberado localmente e dependendo da sua natureza, pode permanecer nos lisossomas, ser transferido para o citoplasma ou difundir através da célula. O comportamento das preparações aplicadas via parenteral (intramuscular, intraperitoneal e subcutânea) é influenciada pela distribuição do tamanho das vesículas e pela sua composição lipídica. (Frézard, 1999).

#### 3.2.5.1 – Lipossomas em Vacinas

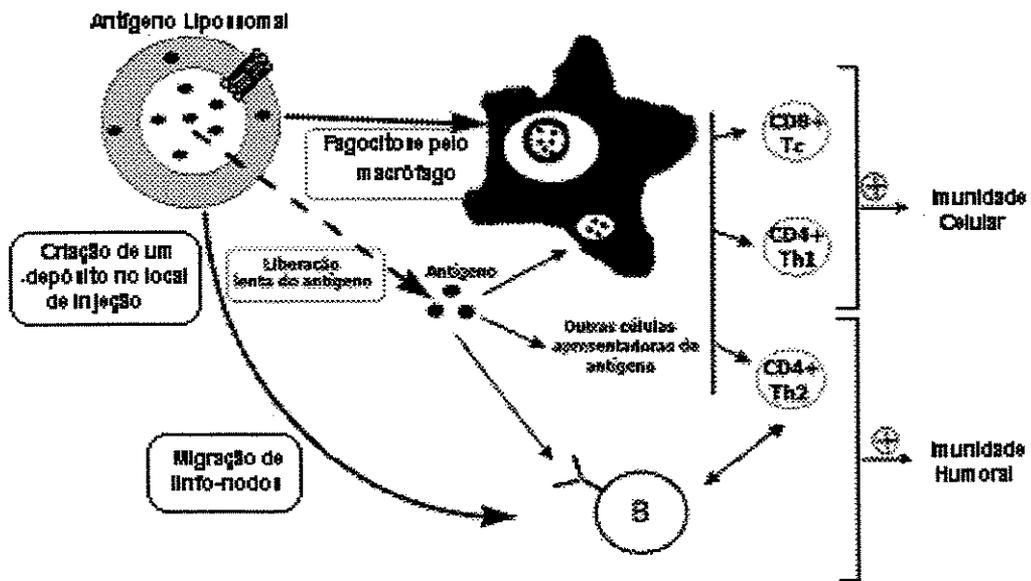
Um requisito essencial para os veículos usados em vacinas é que não sejam imunogênicos, mas tenham efeito adjuvante. Define-se adjuvante imunológico como qualquer agente que não aumente especificamente a resposta imune a um antígeno específico. Esses adjuvantes podem ser lipopolissacarídeos, micobactérias mortas e hidróxido de alumínio. Destes, apenas o último é atualmente licenciado para uso em humanos (Dean, 1993). A maioria dos adjuvantes nem sempre são efetivos pois induzem imunidade humoral (por anticorpos), mas não imunidade celular (mediada por células), além de não poderem ser liofilizados.

Após 2 décadas da descoberta das propriedades imuno-adjuvantes dos lipossomas, esse veículo surgiu como candidato de grande potencial em uma vacina contra hepatite A já licenciada para uso em humanos. O sistema lipossomal é biodegradável, não tóxico, capaz de induzir tanto resposta imune celular como humoral e podem ser preparados sinteticamente. Além destas propriedades, os lipossomas são estruturas altamente versáteis, permitindo manipulação precisa em suas propriedades imuno-adjuvantes (Frézard, 1999). A Figura 7 ilustra uma representação resumida do modo de ação dos lipossomas.

A resposta imune é composta por uma seqüência complexa de eventos, sendo desencadeada pela indução do estímulo (antígeno) e que, geralmente, culmina na sua eliminação. O agente indutor pode ser um microrganismo patogênico, uma proteína ou uma substância presente no meio ambiente. Os macrófagos, linfócitos T e linfócitos B são as células determinantes no processo de resposta imune. O processamento do antígeno e sua apresentação ao sistema imunológico ocorrem por meio de uma seqüência de eventos, os quais ativam ou induzem a produção de

várias substâncias moduladoras que contribuem para a regulação (amplificação ou supressão) da resposta imune (Roitt, 1995).

O aumento da imunidade humoral, devido à incorporação do antígeno em lipossomas, pode ser atribuída à geração de depósito nos sítios de inoculação, o qual prolonga a liberação e interação do antígeno livre ou associado aos lipossomas com as células apresentadoras de antígenos (APCs). Entre os vários tipos de APCs, os macrófagos desempenham importante função, pois possuem habilidade única em fagocitar os lipossomas. Estas células também invadem o depósito de inoculação como resposta à inflamação local. Finalmente, uma fração do antígeno presente nos lipossomas migrará em direção aos nodos linfáticos, contendo células T.



**Figura 7** – Representação esquemática do mecanismo proposto para a ação imunoadjuvante dos lipossomas (adaptado de Frézard, 1999).

Na indução da resposta imune humoral, o conjugado de lipossomas é fagocitado pelos macrófagos e processado, favorecendo a ativação das células T e, na seqüência, as células B (anticorpos). Em alguns casos, as células B são ativadas diretamente. As respostas humorais podem ser aumentadas pela co-inclusão de imunoestimulantes, como já citado anteriormente.

### 3.2.5.2 - Lipossomas como Veículos de Alérgenos

Apesar da abrangência das aplicações lipossomais em vacinas, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos sobre os efeitos dos lipossomas como veículos de alérgenos para utilização na imunoterapia de doenças alérgicas. Nos processos alérgicos, imunoglobulinas do isotipo E estão diretamente envolvidas. Apesar da regulação de sua síntese ainda não ser completamente entendida, vários procedimentos têm sido desenvolvidos para diminuir os níveis de IgE específica em indivíduos alérgicos. O principal obstáculo da imunoterapia na sua forma convencional que utiliza o alérgeno livre, é o desencadeamento imprevisível de reações adversas sistêmicas, quando da injeção do alérgeno. Muitas vezes, os danos produzidos por esses efeitos são maiores que os benefícios obtidos (Lockey et al., 1987).

Há aproximadamente trinta e um anos, Allison e Gregoriadis (1974) demonstraram que a associação de proteínas a lipossomas além de melhorar a resposta imune, reduzia substancialmente as reações de hipersensibilidade no local da injeção. A explicação racional para esse efeito seria a de que devido ao seu caráter hidrofílico, a maioria dos alérgenos estaria localizada no núcleo aquoso dos lipossomas, evitando assim as reações locais. A eliminação das reações anafiláticas do alérgeno, proveniente de gramíneas, associado com lipossomas foi observada posteriormente por Wagner et al. (1984). Os dados sugerem que os lipossomas foram capazes de modular a produção de imunoglobulina G (IgG), aumentando-a e ao mesmo tempo decrescendo os níveis de IgE.

Dada a importância desses efeitos para a imunoterapia da alergia, a partir dessa época, alguns trabalhos foram desenvolvidos no sentido de estudar a incorporação de alérgenos aos vários tipos de lipossomas e seus efeitos na regulação dos níveis de IgE, embora os mecanismos responsáveis pela ação dos alérgenos associados a lipossomas ainda permaneçam obscuros (McWilliam e Stewart, 1989; Audera et al., 1991; Arora e Gangal, 1992; Dean, 1993).

McWilliam e Stewart (1989) estudaram a capacidade de incorporação de extratos alergênicos de ácaro e poeira doméstica em lipossomas multilamelares (MLVs), unilamelares (SUVs) e vesículas preparadas por fase reversa (REVs). SUVs

apresentaram maior capacidade de incorporação do extrato, 36%, quando comparado aos MLVs (29%) e REVs (14%). Somente as vesículas multilamelares não apresentaram exclusão de proteínas, enquanto as demais excluíram uma proteína com propriedade alergênica (MM 43 000 Da).

Genin et al. (1994) otimizaram formulações de lipossomas para três diferentes extratos alergênicos padronizados, e testaram sua alergenicidade *in vitro* e em ensaios pré-clínicos. Os tipos de extratos alergênicos usados foram provenientes de pólen de gramínea (*Dactylis glomerata*), ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*) e de pelo de gato. Os alérgenos foram associados a lipossomas multilamelares carregados positiva ou negativamente. Otimizou-se a associação dos alérgenos com os fosfolipídios tanto em relação à composição quanto ao pH da solução de alérgeno. O método da desidratação-rehidratação com e sem manitol foi utilizado na preparação dos lipossomas. Os autores concluíram que a carga dos lipossomas e o pH da solução influenciaram significativamente a encapsulação e associação das proteínas na superfície das vesículas. Para os três extratos alergênicos testados, a percentagem de proteína associada aos lipossomas hidratados foi idêntica a dos lipossomas desidratados-rehidratados sem crioprotetor (manitol). Na presença do manitol, os lipossomas reconstituídos apresentaram 10-15% menor quantidade de proteínas associadas, quando comparada as vesículas rehidratadas sem manitol. Cerca de um terço das proteínas estavam localizados na superfície. Os autores relataram também que a adição do crioprotetor não foi necessária, uma vez que as proteínas do extrato exerceram a função crioprotetora. Foi observada adsorção dos alérgenos na superfície dos lipossomas, no entanto a atividade imunológica desses alérgenos adsorvidos foi mantida. Esse estudo revelou as propriedades imunoterápicas dos lipossomas capazes de fornecer liberação controlada dos alérgenos para o tratamento de alergia.

Audera et al. (1991) estudaram diferentes métodos de encapsulação de extratos alergênicos (ácaro e pó doméstico) em lipossomas neutros, carregados positivamente e negativamente. Os lipossomas, constituídos de DPPC:colesterol e esterilamina ou dicetilfosfato, foram investigados e a resposta imune provocada em camundongos BALB/c foi comparada com a do alérgeno livre ou com hidróxido de

alumínio. Os animais foram sacrificados 3 dias após a administração dos lipossomas. Os resultados obtidos mostraram que o alérgeno encapsulado nos três tipos de lipossomas produziu um aumento nos níveis de IgG específica maiores que os títulos observados para o alérgeno livre. Entretanto, títulos de IgG específicos e eficiência de encapsulação foram maiores quando lipossomas carregados positivamente foram usados. Níveis de IgE específica para o alérgeno em lipossomas neutros e carregados positivamente apresentaram valores menores quando comparados aos níveis de IgE para o alérgeno em lipossomas carregados negativamente ou associado ao hidróxido de alumínio.

Arora e Gangal (1990, 1992) estudaram a encapsulação do extrato alergênico (pólen de *Artemisia scoparia*) em lipossomas carregados negativamente e observaram a resposta imune do alérgeno em camundongos BALB/c. Os animais foram sacrificados 7, 12, 17 e 25 dias após a administração dos lipossomas, recebendo uma dose reforço (s.c<sup>3</sup>) no 8º dia. Os resultados de distribuição tecidual após injeção intraperitoneal do alérgeno (livre e encapsulado) revelaram que alérgenos encapsulados em lipossomas multilamelares retiveram por um período maior em todos os tecidos, exceto nos rins, quando comparado ao alérgeno livre. Comparando o alérgeno adsorvido em alumina e encapsulado em lipossomas, observou-se que o título de IgG específica foi maior e IgE específica foi menor quando os animais sofreram injeções de doses repetidas do alérgeno encapsulado em lipossomas. O nível de IgG específica para o alérgeno livre foi aproximadamente 30% menor que o nível de IgG obtido para o alérgeno encapsulado. É interessante notar que os autores somente observaram aumento nos títulos de IgG após a administração da segunda dose reforço (s.c.). Da mesma forma, a quantidade de alérgeno administrada foi relativamente baixa, aproximadamente 2,5µg, em comparação a outros trabalhos citados na literatura.

Recente trabalho de Basomba et al. (2002) mostraram que *D. pteronyssinus* encapsulado em lipossomas unilamelares (200nm) foi eficiente, seguro e bem tolerado no tratamento de pacientes alérgicos asmáticos após 12 meses de vacinação. Durante o período de vacinação, foram administradas, semanalmente,

---

<sup>3</sup> s.c. subcutânea

doses crescentes do alérgeno (0,025 a 3,2 $\mu$ g de Der I) encapsulado em lipossomas. A dose de manutenção, administrada mensalmente, foi a mais elevada (3,2 $\mu$ g). Adicionalmente, a encapsulação do alérgeno nos lipossomas permitiu simplificar o número de injeções (13 – imunoterapia convencional - para 8) sem aumentar os efeitos adversos e minimizando significativamente os sintomas causados pela asma. Os autores obtiveram bons resultados clínicos, demonstrado pela redução dos sintomas de 45,8% dos pacientes imunizados com o alérgeno encapsulado (grupo ativo). A percentagem de dias saudáveis (sem crise aguda) desse grupo aumentou de 10,5% (antes do tratamento) para 64,5% (após o tratamento). Os pacientes apresentaram redução de sensibilidade na resposta cutânea ao alérgeno e aumento dos títulos de IgG específica. Nenhuma dessas mudanças foi observada no grupo onde o placebo foi administrado. Os autores ressaltam que os níveis de IgE específica no grupo ativo mantiveram-se elevados no início, decrescendo gradualmente ao longo do tratamento.

Minato et al. (2003) investigaram o efeito da concentração de fosfolipídios nos lipossomas convencionais e peguilados encapsulando ovoalbumina, administrados via oral, na resposta imunológica (IgG e IgA) provocada em camundongos. Os animais foram imunizados no dia 0 e 2 com uma dose reforço no 28º dia. As concentrações de lipossomas avaliadas foram 20 e 50mM. Não houve diferença na resposta imunológica obtida em termos de IgG para lipossomas convencionais e peguilados de menor concentração. Os níveis de IgG de ambos lipossomas (20mM) também foram semelhantes àqueles da ovoalbumina em solução. Considerando a concentração de 50mM, observou-se que os lipossomas convencionais apresentaram resposta imune sistêmica (IgG) três vezes maior que os lipossomas peguilados ou ovoalbumina em solução. Níveis de IgA significativos (8 vezes maior) foram observados para os lipossomas peguilados de baixa concentração quando comparados a ovoalbumina em solução. Os autores sugerem que a dose de lipossomas contendo o antígeno é um dos fatores importantes na obtenção da resposta imune sistêmica.

## 3.3 – Microesferas

### 3.3.1 - Histórico e Aplicações

A tecnologia de produção de dispersões coloidais de polímeros não biodegradáveis teve uma história relativamente curta no setor farmacêutico. No entanto, a descoberta tecnológica de produção de dispersões coloidais de polímeros biodegradáveis causou um forte impacto na indústria médico-farmacêutica. Esta descoberta ocorreu na década de 60 e 70, seguida de pesquisas que revelaram que estas dispersões coloidais poderiam ser usadas como carreadores de fármacos a órgãos específicos, auxiliando pesquisadores a compreender seu comportamento *in vivo* (Alonso, 1996).

As microesferas poliméricas surgiram como alternativa de sistema de liberação controlada que pudesse ser administrado de maneira simples, sem a necessidade de técnicas cirúrgicas, contando apenas com o auxílio de seringa. Microesferas podem ser definidas como partículas de natureza esférica, cujo diâmetro varia aproximadamente entre 1 e 1000 $\mu$ m e constituem um sistema matricial ou reservatório no qual o antígeno está dissolvido, disperso ou encapsulado (Lima et al, 2000). Seu crescente uso em aplicações *in vivo* motivou pesquisadores a desenvolver novas estratégias para otimizar as propriedades físico-químicas dos seus polímeros constituintes, conseqüentemente melhorando seu destino *in vivo* após administração parenteral.

Aplicações recentes desses polímeros estão no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de macromoléculas bioativas, tais como peptídeos e proteínas por via mucosa, intraocular e parenteral (Martinez-Sancho et al., 2004; Tobío et al., 2000; Senel et al., 2000; Delgado et al., 1999). Exemplos de microesferas de PLGA existentes no mercado são: Lupront Depot<sup>®</sup>, Enantone Depot<sup>®</sup> e Decapeptil<sup>®</sup>, usados no tratamento da endometriose e câncer de próstata e Pariodel LA<sup>®</sup> usado como anti-inflamatório (Viswanathan et al, 2001).

### 3.3.2 – Polímeros Biodegradáveis

Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser originários de fonte natural (hidrofílicos) ou sintética (hidrofóbicos). O grupo hidrofílico natural inclui duas categorias de polímeros: proteínas, como albumina e polissacarídeos, como alginato, dextrana, ácido hialurônico e quitosana. Apesar do interesse em explorar o uso de polímeros naturais, esses apresentam algumas desvantagens em relação à reprodutibilidade na sua obtenção, condições de degradação e potencial antigênico. A quitosana, por exemplo, não apresenta hemocompatibilidade, tendo seu uso restrito a rotas não injetáveis de administração. A albumina, no entanto, apesar de ser aceitável para administração parenteral, pode agregar-se e juntamente com a introdução de um agente “cross-linking” durante a preparação das microesferas pode tornar-se imunogênica (Cohen et al, 1996).

Os polímeros sintéticos podem ser divididos em dois grupos: o primeiro inclui poliésteres, como poli(ε-caprolactona) (PECL) e a família do ácido poli-lático e do ácido poli – lático – glicólico (copolímero – PLGA). O segundo refere-se aos poli(alquícianoacrilatos) (PACA). As formulações com poliésteres são seguras e aprovadas para uso em humanos, no entanto o mesmo não acontece com os PACAs, pois seus monômeros (alquícianoacrilato) apresentam toxicidade. É importante saber que estudos realizados indicaram que a degradação de nanopartículas de PACA não produz quantidades significativas de monômeros, mas de oligômeros, os quais não são tóxicos e são facilmente eliminados da corrente sanguínea (Cohen et al, 1996).

Outra família promissora de polímeros sintéticos são os polihidroxicanoatos, como o polihidroxibutirato. Estes polímeros, embora não tenham seu uso aprovado em humanos, são produzidos no Brasil e apresentam custo competitivo quando comparado aos polímeros sintéticos importados geralmente empregados (Maia et al, 2004).

Atualmente, os polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados na fabricação de microesferas, visando aplicações parenterais, são os poliésteres alifáticos derivados dos ácidos lático e glicólico (PLGA) que merecem destaque por

serem aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para utilização na clínica humana e por terem uma longa história de segurança.

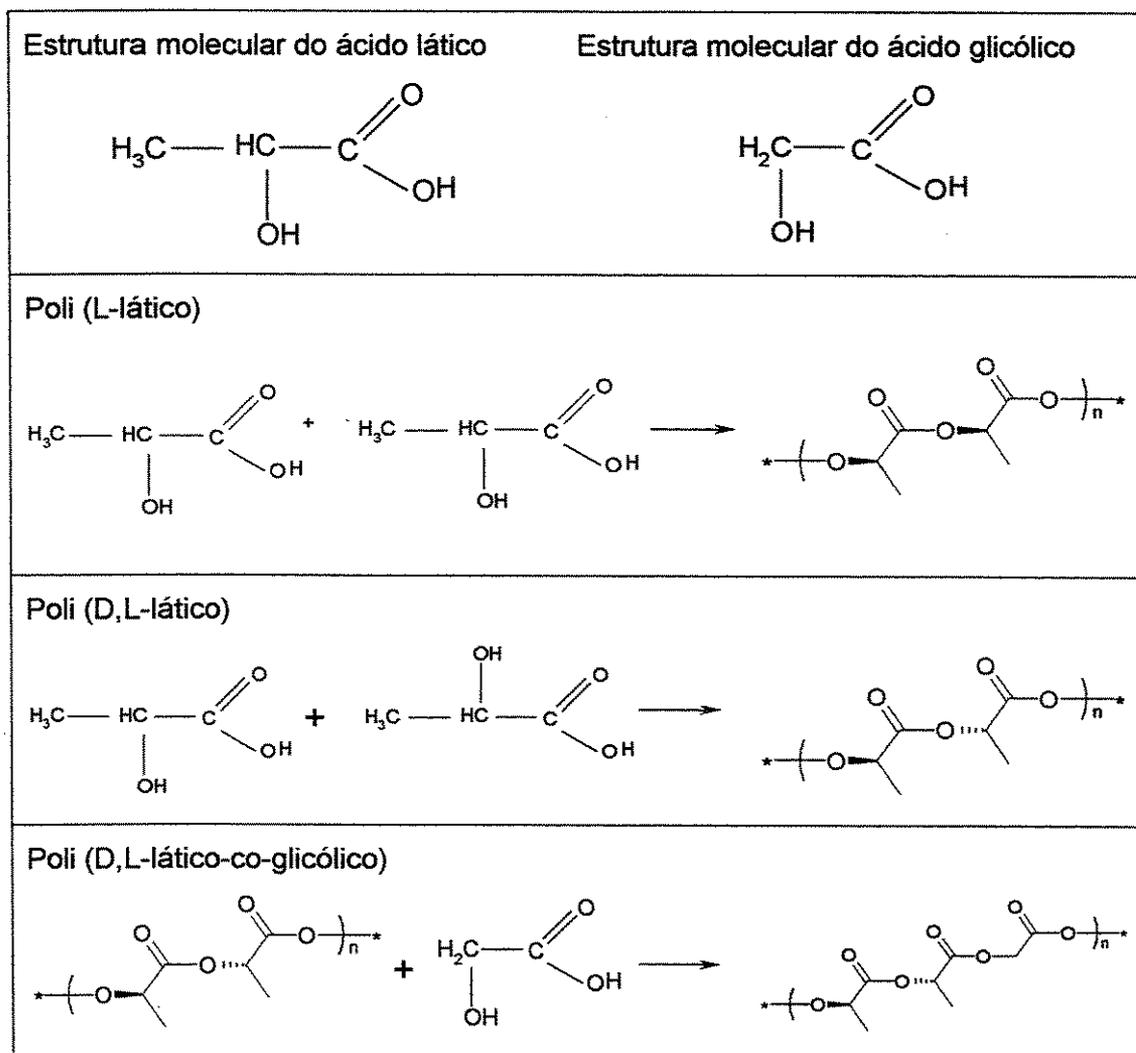
### **3.3.3 - Ácido Poli(Lático-co-Glicólico) - PLGA**

Os homo e co-polímeros do ácido lático e glicólico, poli(L-lático), poli(D,L,-lático) e poli (D,L-lático –co-glicólico) são sintetizados por policondesação ou pela polimerização por abertura do anel de lactonas (Tabela 2).

A policondesação favorece a produção de polímeros de baixa massa molar, aproximadamente 10 000 Da. Porém, estes polímeros de baixa massa molar apresentam uso restrito, principalmente, devido às propriedades mecânicas inadequadas e elevada velocidade de degradação. No entanto, a metodologia de polimerização favorece a produção de polímeros de massa molar elevada (>10.000), devido à abertura do anel de diésteres cíclicos do ácido lático e/ou glicólico (Jain et al., 1998).

O polímero poli-lático é disponível na forma opticamente ativa (L-PLA) e inativa (DL-PLA), enquanto o poli-glicólico não forma mistura racêmica. A organização estrutural da cadeia polimérica do PLA é um fator determinante para o estado físico deste polímero. O D-PLA é encontrado sob a forma cristalina, pois apresenta uma estrutura altamente regular. O DL-PLA é amorfo, devido a maior irregularidade observada em sua estrutura polimérica. O polímero poli-glicólico (PGA) apresenta uma cristalinidade elevada, pois o ácido glicólico apresenta uma cadeia polimérica altamente organizada. A cristalinidade dos co-polímeros do ácido lático e glicólico (PLGA) é dependente da proporção molar dos monômeros na cadeia polimérica (Jain et al, 1998).

**Tabela 2** – Estruturas moleculares dos monômeros e polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico



Quimicamente, estes polímeros podem apresentar diferenças no tamanho das cadeias (massa molar variada) e proporção ácido láctico e glicólico. Estes polímeros também podem apresentar diferentes grupos terminais, como o grupo carboxila livre ou esterificada. Essas diferenças influenciam significativamente as propriedades físico-químicas dos polímeros. Massa molar, razão ácido láctico/glicólico e grupo terminal estão diretamente relacionadas com a degradação, permitindo assim obter diferentes polímeros, cujo tempo de degradação pode variar entre alguns dias e vários meses. O grau de cristalinidade dos polímeros pode influenciar suas

propriedades físicas, tais como resistência mecânica, perfil de intumescimento e sua capacidade de sofrer hidrólise. No organismo, estes polímeros são hidrolisados e uma vez degradados, são gerados o ácido lático e o glicólico que são compostos inócuos ao organismo (Lima et al, 2000).

Outra propriedade importante dos polímeros PLGA é a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Ela influencia diretamente a velocidade de degradação do polímero. A temperatura de transição vítrea indica o grau de cristalinidade e, conseqüentemente, o grau de organização das cadeias poliméricas, onde se pode afirmar que polímeros com maior organização geométrica apresentam maiores valores de  $T_g$  e degradação mais lenta.

A biodegradação dos PLGA ocorre por hidrólise com a ruptura das ligações ésteres que unem os monômeros que compõem o polímero. O ácido lático por ser mais hidrofóbico que o glicólico, absorve menos quantidade de água, apresentando uma degradação mais lenta. A taxa de degradação é uniforme em todo o sistema e alguns trabalhos demonstram que esta degradação ocorre através de hidrólises aleatórias. Viswanathan e et al. (2001) em seu estudo citaram que a hidrólise nas microesferas parece ser mais rápida no centro da partícula que na superfície, confirmando um mecanismo heterogêneo de degradação. O mecanismo de degradação dos polímeros derivados dos ácidos láticos e glicólicos ainda não foi completamente esclarecido. Os subprodutos de degradação destes polímeros são toxicologicamente seguros, sendo eliminados por alguma via metabólica (Jain et al, 1998).

A determinação da proporção do monômero lactato e glicolato no polímero, bem como a influência da massa molar e grupo terminal do polímero são fatores importantes no projeto das microesferas, cuja melhor escolha dependerá da aplicação desejada.

### **3.3.4 – Microesferas de PLGA para Liberação Controlada de Peptídeos e Proteínas**

As microesferas de PLGA têm sido amplamente usadas para a encapsulação e liberação de uma variedade de proteínas terapêuticas e antigênicas sem perda da

sua atividade biológica (Alonso et al, 2002). A liberação de peptídeos e proteínas das microesferas de PLGA pode ser de forma contínua ou não, assim que as microesferas estiverem em contato com fluidos biológicos, onde por difusão ou bioerosão, o fármaco torna-se disponível (Jain et al, 1998). O perfil de liberação dessas proteínas pode apresentar 3 diferentes caminhos: rápida liberação inicial da proteína próxima ou adsorvida a superfície, difusão das proteínas através dos poros da partícula e liberação seguida da biodegradação da matriz polimérica (Jensen, 2000).

Sandor et al. (2001) investigaram o efeito da massa molar da proteína sobre a eficiência de encapsulação e cinética de liberação em microesferas poliméricas de 1 a 3 $\mu$ m de diâmetro. As microesferas de PLGA 50:50 (MM 12068) foram fabricadas pela técnica de inversão de fase. As proteínas analisadas e encapsuladas separadamente foram: lisozima (13,4KDa), anidrase carbônica (29KDa), albumina bovina (66KDa), álcool desidrogenase (150KDa) e a tiroglobulina (669KDa). Foram testadas duas razões mássicas iniciais de encapsulação 2 ou 7,3% (proteína/polímero). Os resultados mostraram que a eficiência de encapsulação das diferentes proteínas variou de 25-80%, quando a razão mássica foi de 2% e entre 65,8 e 94,5%, quando a razão foi de 7,3%. Os resultados indicaram que a liberação da proteína nessas microesferas foi dependente da massa molar da proteína, quando a menor razão mássica foi utilizada. Para razão mássica de 7,3%, o perfil de liberação em microesferas mostrou-se independente da massa molar das proteínas.

Os mesmos autores verificaram que à pequenas concentrações protéicas, a liberação das proteínas de maior massa molar foi dependente da difusão através dos poros no tempo de estudo, enquanto que para proteínas menores foi dependente da difusão através dos poros, apenas inicialmente, e da degradação da microesfera posteriormente. Em todos os casos, observou-se uma rápida liberação inicial da proteína, devido a penetração da água na matriz polimérica, favorecendo a liberação das proteínas próximas a superfície da matriz. Assim, a liberação de microesferas pareceu não ser dependente do tamanho da proteína dentro das microesferas, mas sim da massa molar das mesmas, assim como da distribuição de tamanhos e localização dos poros. Os perfis de liberação obtidos foram diferentes e dependeu da

proteína encapsulada. Os estudos de degradação de microesferas vazias revelaram 85% de perda de massa em 4 semanas.

Genta et al. (2001) estudaram a encapsulação da prolidase em microesferas de PLGA. A prolidase é uma enzima envolvida no processo final do catabolismo protéico e é responsável pela hidrólise de dipeptídios contendo prolina. A prolidase é uma molécula dimérica constituída por 2 subunidades de 53KDa. A inexistência ou baixa atividade desta enzima causa uma disfunção de prolidase (PD), acarretando no individuo sérias complicações, como ulcerações de pele, particularmente de baixo LIMBS. Apesar dos avanços no tratamento desta patologia, a cura ainda não foi alcançada. Uma alternativa para o tratamento seria encapsular em microesferas. As microesferas foram preparadas pelo método da evaporação do solvente, utilizando emulsão múltipla água/óleo/água.

A eficiência de encapsulação da prolidase em microesferas de PLGA foi de aproximadamente  $55,8 \pm 5,7\%$  ( $6\mu\text{g}/\text{microesfera}$ ) e o rendimento médio da preparação do sistema microparticulado foi de aproximadamente 78%. As microesferas apresentaram diâmetro principal em torno de  $50\mu\text{m}$ , distribuição relativamente homogênea, geometria esférica e superfície bastante porosa. A alta porosidade foi atribuída, provavelmente, a eleva taxa de evaporação do solvente. O perfil de liberação desse sistema mostrou-se rápido nas 4 horas iniciais, e controlado, posteriormente, onde se pode comprovar atividade enzimática em até 80 horas depois do início do experimento. Os resultados deste experimento revelaram a possibilidade do uso de microesferas como sistemas estabilizadores de proteínas, úteis para aplicações de uso parenteral.

Viswanathan et al. (2001) investigaram a degradação *in vitro* de microesferas de PLGA, através do monitoramento da perda de massa do sistema, do peso molecular do polímero e de mudanças morfológicas da partícula. Eles também estudaram a correlação entre a matriz polimérica e a liberação de proteínas encapsuladas. As proteínas estudadas foram: albumina bovina, lisozima (proteínas globulares) e gelatina (proteína fibrosa). As microesferas foram preparadas pela técnica de emulsão água;óleo em óleo relatada por Viswanathan (1999). A eficiência

de encapsulação das proteínas em microesferas, tanto de PLA quanto PLGA, foi bastante elevada (aproximadamente 80%).

Os resultados mostraram que para o polímero (DL)PLA, cuja massa molar foi 75200, a liberação de BSA foi lenta, onde 4mg encapsulados foi liberado durante 240 dias. Com o mesmo polímero, porém cuja massa molar foi de 3500, não houve liberação inicialmente, mas posteriormente a taxa de liberação foi lenta. Neste último caso, somente 50% da BSA encapsulada foi liberada. Para as microesferas de PLGA, de todas as composições e massas molares, a liberação de proteínas globulares foi rápida na fase inicial (burst<sup>4</sup> inicial), menor que 10% da quantidade encapsulada e após esse período não foi mais observado perfil de liberação ao longo de 250 dias. No entanto, o perfil de liberação da proteína fibrosa, gelatina, em microesferas de PLGA (80:20) mostrou-se ser multifásico, onde em até 50 dias houve liberação controlada, de 50-170 dias o perfil foi constante e por fim, de 170 a 250 dias, um perfil pulsado de liberação.

Os estudos de degradação dos polímeros, realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores, mostraram que microesferas de PLGA (massas molares de 45000, 74 500 e 80 500) apresentaram uma perda de massa inicial após a fase lag de 40 dias. Os resultados obtidos pelo mesmo grupo foram diferentes dos encontrados na literatura anterior. Não foi observada uma rápida perda de massa de microesferas de PLGA, após a fase lag, e as taxas de perdas de massa após a fase lag foram muito menores para todas as microesferas de PLGA (composição variada). Todas as diferenças encontradas são atribuídas à ausência de agitação no protocolo do experimento, dificultando a desintegração mecânica das partículas.

Jeffery et al. (1993) estudaram a influência da massa de ovoalbumina a ser encapsulada e o volume de PVA na emulsão dupla sobre o tamanho das partículas e eficiência de encapsulação da proteína. As micropartículas de PLGA 50:50 (22KDa) foram preparadas pelo método da evaporação do solvente em emulsão dupla (água em óleo em água). Os resultados indicaram que quanto maior a massa de ovoalbumina a ser encapsulada, maior o tamanho das microesferas e portanto, melhor a eficiência de encapsulação. Eficiência duplicada no processo de

---

<sup>4</sup> Proteína próxima ou adsorvida na superfície da microesfera que é mais rapidamente liberada.

encapsulação e maiores tamanhos de partículas foram obtidas quando o volume da solução de PVA foi aumentado dez vezes. Eficiência de encapsulação de 98% foi alcançada quando o volume da solução de PVA 10% foi 100mL e a concentração do polímero na fase oleosa foi 6%.

Yang et al. (2000) investigaram os principais parâmetros para fabricar microesferas de PLGA (65:35) encapsulando BSA através do método da extração/evaporação do solvente usando emulsão múltipla. Os parâmetros analisados foram: tamanho da microesfera, eficiência de encapsulação, liberação inicial e morfologia em função da temperatura, taxa de remoção do solvente, razão volumétrica óleo/água e concentração do polímero.

Todas as microesferas apresentaram forma esférica. A temperatura influenciou a encapsulação de BSA e o burst inicial da proteína. Os melhores resultados de encapsulação (52 e 48%) e burst (18,8 e 4,9%) aconteceram a 4 e 38°C, respectivamente. Microesferas fabricadas a uma baixa razão volumétrica óleo/água da fase dispersa e a uma baixa concentração de polímero (33,8g/L) tendem a apresentar uma elevada área superficial, baixa densidade, resultando em taxas elevadas de liberação inicial. A razão óleo/água influencia significativamente a morfologia das microesferas. A superfície das microesferas preparadas a uma razão óleo/água 40:1 é menos porosa que àquela a 12:1, sendo, portanto, a liberação protéica mais lenta quando comparada com a de 12:1. Aumentando a concentração do polímero, aumenta-se o tamanho, a densidade e a eficiência de encapsulação, enquanto que decresce a liberação inicial. Microesferas produzidas a uma taxa de adição da fase contínua de 3mL/min parece apresentar baixo burst inicial e liberação lenta da BSA, pois são menos porosas.

Yeh et al. (1995) encapsularam ovoalbumina em microesferas de PLGA (50:50: RG 503) usando o método de evaporação/extração do solvente através da emulsão dupla água em óleo em óleo (a/o/o). Os autores observaram que as microesferas, de 15µm de diâmetro médio, apresentaram superfície pouco porosa e eficiência de encapsulação de 94%. Quando o polímero PEG foi incorporado ao PLGA, o tamanho das microesferas e a eficiência de encapsulação da ovoalbumina foram reduzidos. Os resultados sugeriram ainda que a capacidade de liberação da

microesfera de PLGA foi baixa (< 35%) e o perfil de liberação da proteína das microesferas foi linear e controlado somente pela difusão em 30 dias de análise. A incorporação de PEG melhorou o perfil de liberação, onde em 30 dias, a quantidade liberada de proteína das microesferas de PLGA foi 30ug OVA/mg microesfera, enquanto que PLGA:PEG (1:3) foi de 150ug OVA/mg microesfera.

Shreir and DeLuca (2001) compararam a capacidade de ligação e o perfil de liberação da proteína 2 (recombinant human bone morphogenetic - rhBMP-2) usando uma série de polímeros hidrofóbicos e hidrofílicos da família dos ácidos lácticos e glicólicos (PLGA: RG501H, RG502, RG502H, RG503, RG503H, RG 504, RG504H, RG752, RG752H). Esses polímeros apresentam diferentes razões láctico-glicólico (50:50 and 75:25), diferentes massas molares (8 – 50kDa) e grupos terminais (grupo carboxila livre (H) ou esterificado). Microesferas porosas de tamanhos similares foram produzidas através da dupla emulsão seguida da evaporação do solvente, usando os diferentes polímeros. As microesferas foram caracterizadas quanto a capacidade de ligação e liberação das proteínas adsorvidas e encapsuladas, respectivamente. As microesferas constituídas pelos polímeros com o grupo terminal carboxila livre apresentaram maior capacidade de adsorção das proteínas. Microesferas compostas pelo polímero com o grupo terminal carboxila livre degradou mais rapidamente em relação ao grupo terminal carboxila esterificado. Polímeros de baixa massa molar degradaram mais rápido que os de alta massa molar. As microesferas compostas pelos polímeros PLGA RG503 e RG503H liberaram parcialmente as proteínas em 40 dias, sendo a liberação acumulativa de 75% para RG503 e 30% para RG503H no mesmo período.

### **3.3.5 – Métodos de Produção**

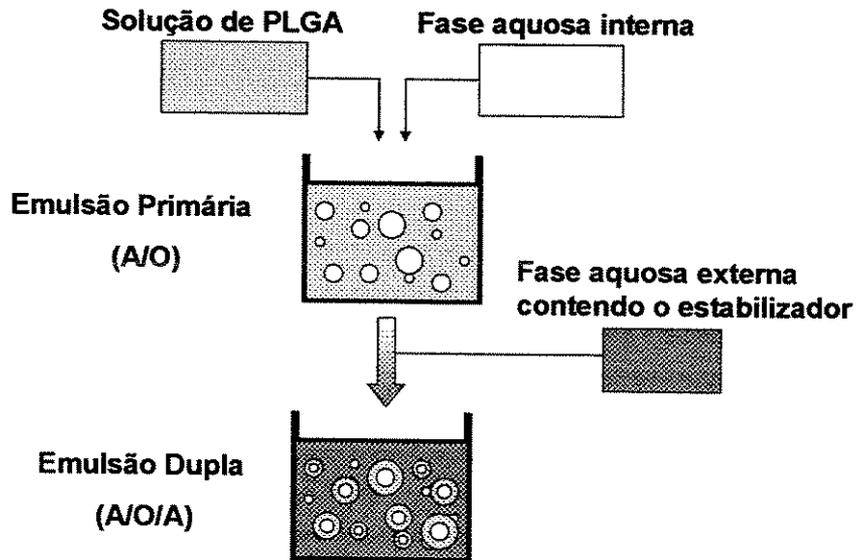
O método desenvolvido para a liberação de proteínas deve assegurar facilidade na produção, qualidade e biodisponibilidade da proteína e não toxicidade da formulação. Alguns métodos encontrados na literatura fornecem todos os requisitos citados acima, com exceção do custo, em geral elevado, além da complexa produção (Cleland et al., 2001).

Vários métodos têm sido descritos na literatura para a obtenção de microesferas. A escolha do melhor método depende de fatores como: natureza do polímero, natureza do fármaco e sua aplicação (via de administração e tempo de liberação). Dentre eles, o mais utilizado para a encapsulação de compostos hidrofílicos, principalmente antígenos protéicos e DNA, é o método da evaporação do solvente em fase aquosa. Esse método é simples, reproduzível, de fácil transposição para escala industrial e cuja realização em condições assépticas garante a esterilidade final e integridade do produto.

#### 3.3.5.1 – Método da Evaporação do Solvente

Neste método estão incluídos todos os processos em que se torna necessário à eliminação do solvente, no qual o polímero está dissolvido. Em todos os casos é preciso, previamente, formar uma emulsão e dependendo da natureza da fase contínua dessa emulsão, o método da evaporação do solvente pode ser em fase aquosa ou oleosa.

Em fase aquosa, as partículas podem ser produzidas por evaporação do solvente a partir de emulsão simples ou emulsão múltipla. A emulsão simples é usada amplamente para encapsulação de agentes lipossolúveis com boas eficiências de incorporação. No entanto, agentes hidrossolúveis são encapsulados com maior eficiência em emulsões múltiplas. A emulsão múltipla forma-se pela adição da fase aquosa interna (contendo o bioativo) sobre a fase orgânica, contendo o polímero. Após as misturas das fases e, sob forte agitação, é produzida uma emulsão primária do tipo água em óleo (A/O). Em seguida, essa emulsão primária é incorporada na fase aquosa externa, sob agitação moderada, visando a formação de emulsão múltipla água em óleo em água (A/O/A). Posteriormente, o sistema é submetido à remoção do solvente orgânico, ocorrendo precipitação do polímero e estruturação das microesferas. O esquema da Figura 8 ilustra a preparação deste método.



**Figura 8** - Representação esquemática do processo de preparação de microesferas pelo método da emulsão múltipla A/O/A .

A etapa de evaporação do solvente nestes processos é extremamente importante. Vale salientar que para aplicações parenterais, o nível residual do solvente na formulação não pode ultrapassar 500ppm. O solvente, além de solubilizar o polímero, deve ser imiscível ou fracamente miscível na fase contínua e volátil (ponto de ebulição menor que a fase contínua). Os mais empregados na produção de microesferas são: o diclorometano e acetato de etila, ambos capazes de formar emulsão tipo A/O/A e facilmente removidos do sistema por evaporação (Jensen, 2000). A Tabela 3 apresenta propriedades físico-químicas de solventes usados na produção de microesferas de PLGA.

**Tabela 3** – Propriedades físico-química de alguns solventes usados na produção de microesferas com o polímero poli-lático-co-glicólico (PLGA) (Adaptado de Jensen, 2000).

Solvente	Ponto de ebulição (°C) <sup>1atm</sup>	Densidade (g/mL) <sup>20°C</sup>	Solubilidade em H <sub>2</sub> O (mL/mL) <sup>25°C</sup>
Acetato de etila	77	0,8980	1/10
Acetona	82	0,7880	Miscível
Clorofórmio	62	1,4840	1/200
Diclorometano	40	1,3255	1/50
Tetrahidrofurano	66	0,8892	miscível

### 3.3.6 – Microesferas de PLGA em Aplicações Imunológicas

A primeira aplicação de microencapsulação na tecnologia de vacinas foi divulgada em 1979 através de um estudo que revelou que os sistemas poliméricos foram capazes de liberar continuamente o antígeno e estimular a resposta imune humoral (Newman et al., 1998). Nos últimos anos, as microesferas de PLGA foram intensamente investigadas como sistemas reservatórios injetáveis para a liberação controlada de moléculas bioativas. A capacidade de liberação contínua do antígeno pelas microesferas com diferentes tempos de degradação mostra-se promissora como estratégia de vacinação.

Microesferas de PLGA possuem a vantagem de serem biodegradáveis e quando injetadas são isentas de reações adversas como a ulceração no sítio de administração. Além disso, sua potencialidade de utilização como adjuvante reside no fato delas formarem, após administração subcutânea ou intramuscular, depósito onde o antígeno é liberado lentamente, de maneira controlada, de acordo com a proporção dos polímeros utilizados na fabricação. Em contato com fluidos biológicos, sofre processo de desintegração ou degradação, que pode durar dias ou meses, liberando o bioativo.

Os sistemas poliméricos, biodegradáveis e atóxicos, podem ser preparados sinteticamente com propriedades capazes de induzir tanto resposta imune celular

como humoral. Além destas vantagens, suas propriedades físico-químicas permitem projetar micropartículas com tamanhos e propriedades adequadas para as aplicações específicas.

Várias características das microesferas de PLGA mostram a sua eficiência como sistemas de liberação para uso em vacinas. Dentre elas, o tamanho das microesferas de PLGA que parece afetar a potencialização da resposta imune, onde a injeção do antígeno em microesferas menores que 10 $\mu$ m, em diâmetro, promove intensa produção de anticorpos circulantes (resposta humoral). Essa propriedade pode ser função do efeito de depósito e rápida fagocitose das microesferas pelas células apresentadoras de antígeno (Eldridge et al., 1991).

Tobío et al. (2000) mostraram que o efeito potencializador das microesferas pode ser alcançado, encapsulando ou adsorvendo adjuvantes, como os sais de alumínio nas microesferas. Esses sais, incorporados nas microesferas, a uma concentração 10 vezes menor que a usada como controle, atraem mais facilmente células do sistema imune que favorecem a captura das microesferas, aumentando a resposta imune.

Apesar da abrangência das aplicações de microesferas em vacinas, contra: câncer, difteria, tétano, tuberculose e patologias oculares (Tobío et al., 2000; Lima et al., 2000, Martinez-Sancho et al., 2004), poucos trabalhos tem empregado antígenos encapsulados em microesferas de PLGA para atuação como imunomoduladores em alergia.

#### 3.3.6.1 - Microesferas como veículos de alérgenos

Batanero et al (2002) estudaram o principal alérgeno do pólen da oliveira, denominado de Ole e 1, encapsulado em micropartículas de PLGA (DL-láctico glicólico) preparadas pela técnica da evaporação do solvente em emulsão dupla. Propriedades físicas das micropartículas, tais como tamanho, morfologia de superfície, eficiência de encapsulação do alérgeno e liberação foram investigadas. As micropartículas obtidas através da técnica foram de natureza esférica, apresentando diâmetro menor que 2  $\mu$ m e eficiência de encapsulação de 60–70%.

SDS-PAGE e imunoblotting da Ole e 1 liberada das micropartículas confirmaram a integridade molecular e as propriedades antigênicas da Ole e 1 que permaneceram inalteradas após o processo de encapsulação e degradação polimérica. Esses resultados mostraram-se promissores para a utilização deste sistema de liberação antigênica na terapia de dessensibilização em alergia.

Sharif et al. (1995) estudaram a encapsulação do alérgeno *Dermatophagoides pteronyssinus* (D.Pt) em microesferas de PLGA 50:50 (RG 505) produzidas pelo método da evaporação dos solvente. A eficiência de encapsulação do D. Pt. foi de 51%. Resultados de focalização isoelétrica revelaram que todos os componentes protéicos do alérgeno foram encapsulados nas micropartículas de 1,0 $\mu$ m de diâmetro e que a atividade de ligação da IgG do maior componente alergênico (Der 1) não sofreu alteração no processo de encapsulação. Os resultados obtidos deste trabalho indicam que o processo de preparação de micropartículas pouco influencia a integridade do alérgeno D. Pt. encapsulado. Este estudo sugere que proteínas alergênicas pouco afetadas pelo processo de produção de microesferas podem ser potencialmente utilizadas em liberação controlada para terapia de dessensibilização em alergia.

Delgado et al. (1999) investigaram a produção de micropartículas de PLGA 50:50 (34kDa, RG 503) encapsulando ovoalbumina para uso em vacinas através da imunização oral. As microesferas foram produzidas pelo método da evaporação do solvente através da emulsão A/O/A, usando polímeros entéricos Eudragit1 L100-55 and carboximetilcelulose (CMEC) como estabilizadores. Microesferas produzidas com PVA foram usadas como controle. Em todos os casos, microesferas com ovoalbumina apresentaram diâmetro menor que 5 $\mu$ m, formato esférico e superfície lisa. A eficiência imunológica das micropartículas encapsulando ovoalbumina foi avaliada em camundongos BALB/c. Foram administrados nos animais 0,1mg de OVA encapsulada nas microesferas por 3 dias consecutivos. Essa série foi administrada novamente (dose reforço) 4 semanas após a série inicial. Os animais foram sacrificados e avaliados quanto aos níveis de IgG após 4, 6 e 8 semanas de imunização. A imunização oral de camundongos com microesferas contendo OVA, estabilizadas por PVA, CMEC ou Eudragit, induziu anticorpos IgG específico do soro

e IgA da saliva por até 8 semanas (período analisado). No entanto, as micropartículas estabilizadas com CMEC produziram níveis de anticorpos IgA da saliva mais elevados. Níveis de IgG maiores foram obtidos somente após a administração da dose reforço na quarta semana de análise.

Newman et al. (1998) investigaram a capacidade de incorporação do peptídeo de ovoalbumina (OVA), formado pelos resíduos de 323–339 com a seqüência de ISQAVHAAHAEINEAGR, em microesferas de PLGA 50:50 e a resposta imune após administração em camundongos. Monofosforil lipídio A (MPLA) foi incorporado nas microesferas, como imunomodulador, para avaliar a especificidade e o tipo de resposta imune Th1. Após imunização s.c, os animais foram sacrificados no 9º dia e os resultados revelaram que a resposta imune para o peptídeo OVA encapsulado com e sem MPLA foi específica para células T. Os perfis de citosina mostraram altos níveis de interferon (IFN- $\gamma$ ) com baixos valores de interleucina (IL-4 e IL-10), sugerindo uma resposta do tipo Th1. A incorporação do MPLA nas microesferas de PLGA resultou no aumento da produção de IFN- $\gamma$ . Os autores concluíram que microesferas carregadas com peptídeo de ovoalbumina são capazes de induzir resposta imune específica do tipo Th1, cujos valores podem ser aumentados com a incorporação de MPLA.

O'Hagan et al. (1993) investigaram a encapsulação de ovoalbumina em microesferas constituídas por PLGA de diferentes razões ácido láctico-glicólico e avaliaram os níveis de IgG dessas partículas administradas subcutaneamente. As microesferas encapsulando OVA foram produzidas pelo método da evaporação do solvente através da emulsão A/O/A, usando PVA como estabilizador. Os polímeros testados foram da série RESOMER: RG 506 (PLGA 50:50, 22kDa), RG 508 (PLGA 50:50, 40kDa) e RG 755 (PLGA 75:25, 18kDa). A resposta imunológica foi avaliada em BALB/c por um ano. Os animais foram imunizados com dose única de 300ug de OVA em tampão PBS ou encapsulada nas microesferas ou adsorvida em hidróxido de alumínio. A partir da 4ª semana, OVA encapsulada em microesferas ou adsorvida em hidróxido de alumínio produziu níveis de IgG significativamente maiores que a OVA solúvel em PBS. Os níveis de IgG para OVA encapsulada em microesferas ou adsorvidas em hidróxido de alumínio foram semelhantes, tendo um pico máximo na

décima semana. Os níveis de IgG para OVA encapsulada e adsorvida em alumina foram mantidos em níveis elevados durante 52 semanas.

Adicionalmente, esses autores estudaram a administração de 100ug de OVA em microesferas de diferentes tamanhos por 12 semanas, com uma dose reforço na sexta semana. Os níveis de IgG foram avaliados a cada 2 semanas. Observou-se que até a sexta semana, os níveis de IgG para OVA solúvel ou encapsulada em microesferas de 1,5um ou 73um foram semelhantes e baixos (50 unidades). Após a administração da dose reforço, os níveis de IgG aumentaram significativamente (> 400 unidades), sendo a resposta para partículas de 1,5um superior a resposta imunológica das partículas de 73um.

Baseado nas considerações dos trabalhos citados anteriormente, pode-se afirmar que a utilização de microesferas encapsulando antígenos no tratamento da alergia é promissora. A capacidade de liberação do antígeno de microesferas por meses ou anos, possibilitando a apresentação contínua do antígeno ao sistema imune e redução da frequência de doses torna as microesferas veículos atrativos para o tratamento de doenças alérgicas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 – Caracterização do Extrato Alergênico

#### 4.1.1 – Material

Extrato alergênico do fungo *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* foi produzido em nosso grupo por Hasan (2003) através de fermentação em estado sólido conduzida em biorreatores de leito fixo do tipo colunas de Raimbault durante 144 horas. A extração das proteínas da biomassa fúngica foi feita conforme trabalho de Saraiva (2001).

A alergenicidade das proteínas do extrato foi caracterizada previamente por testes cutâneos, “dot blotting” e imunoblotting realizados no Laboratório de Imunologia e alergia Experimental da Unicamp como parte do trabalho de Hasan (2003). Nestes testes comprovou-se que 7 proteínas apresentaram caráter alergênico. São elas: 155,9; 104,9; 65,5; 60,0; 50,6; 44,2; e 38,1 KDa.

As eletroforeses foram realizadas com reagentes de pureza analítica, de fornecedores conhecidos. Os marcadores de alta e baixa massa molares foram obtidos da Bio Rad. A focalização isoeétrica foi realizada com gel 3-9 e marcador 3-10, ambos da Pharmacia.

## 4.1.2 – Métodos

### 4.1.2.1 - Identificação das Proteínas do Extrato Alergênico

A análise qualitativa das proteínas, presentes no extrato alergênico foi feita por eletroforese SDS-PAGE (sistema de eletroforese da Bio Rad).

Esse sistema é aplicado no estudo de proteínas desnaturadas na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) sem  $\beta$ -mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT), visando à determinação da massa molar de proteínas. As proteínas desnaturadas se ligam ao tensoativo SDS (4g SDS/g proteína), tornando-se carregadas negativamente. A mobilidade das proteínas no gel é função de suas massas molares.

Foi utilizado gel de poli(acrilamida), formado pela mistura de acrilamida com Bis-acrilamida na presença de persulfato de amônia e tetrametiletilenodiamina (TEMED). O diâmetro dos poros do gel é função das concentrações de acrilamida e Bis-acrilamida. Para separação de moléculas maiores, usou-se gel com menor teor de acrilamida (10%) e de moléculas menores, gel de 15%. Inicialmente, as proteínas, contidas nas amostras, foram desnaturadas com o tensoativo SDS, seguida de aquecimento por 7 minutos a 100°C. Após a polimerização do gel, as amostras e marcadores foram aplicados nas cavidades do gel concentrador. Em seguida, aplicou-se uma tensão elétrica em torno de 200V por 45 minutos. Usou-se Tris-HCL, pH 8,0, como tampão de corrida (Alfenas et al., 1998).

A revelação das proteínas no gel foi feita por fixação PAGE (mistura de etanol, ácido acético e água) e com glutaraldeído, seguida da imobilização das proteínas com ácido tricloroacético. A coloração foi feita com nitrato de prata, usando como solução reveladora uma mistura de formaldeído, etanol e ácido cítrico. Após completa revelação, lavou-se o gel com uma solução inativadora, composta basicamente por ácido acético (Alfenas et al., 1998).

#### 4.1.2.2 - Ponto isoelétrico das proteínas do extrato protéico fúngico determinada por focalização isoelétrica (IEF).

A determinação da faixa dos pontos isoelétricos da mistura de proteínas presentes no extrato alergênico e extrato bruto foi feita em equipamento Phastsystem da Pharmacia, segundo o protocolo de preparação e revelação do fabricante. O gel utilizado foi Phastgel 3-9 e marcador IEF 3-10.

## **4.2 – Lipossomas**

### **4.2.1 – Material**

Os lipídios usados na preparação dos lipossomas foram: L- $\alpha$ -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (SIGMA Chemical Co), Epikuron 200 SH (Lucas Meyer) e distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG2000 – Genzyme).

A trealose e ovoalbumina (OVA) utilizadas no experimento foram obtidas da SIGMA Chemical Co.

Os reagentes usados para a determinação das proteínas foram o azul de Commassie (Bio Rad) para o ensaio de Bradford.

O gel usado no processo de separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas foi o Sepharose CL-6B (Pharmacia).

As eletroforeses foram realizadas com reagentes de pureza analítica, de fornecedores conhecidos. Os marcadores de alta e baixa massa molares foram obtidos da Bio Rad.

Amostras de plasma humano foram obtidas do Hemocentro/UNICAMP.

Água e solução salina (0,9% m/v) injetável, estéril e apirogênicas foram obtidas comercialmente.

## 4.2.2 – Métodos

### 4.2.2.1 – Preparação

Os lipossomas foram preparados em duas etapas: hidratação do filme seco de lipídios (método clássico de Bangham) e a rehidratação das vesículas seca obtidas do processo de liofilização (Gregoriadis e Kirby, 1984).

No método da hidratação do filme seco, os lipídios foram dissolvidos em uma solução de clorofórmio: metanol (8:2 v/v). Posteriormente, os solventes foram evaporados a vácuo em evaporador rotatório (ART LAB; Banho térmico Yamato, modelo RE52) até a formação de um filme seco de lipídios no fundo do balão. Este filme, em seguida, foi hidratado com 10mL de uma solução aquosa de trealose (diferentes concentrações), sob agitação, visando à formação de vesículas multilamelares.

Os lipossomas foram homogeneizados e tornados unilamelares segundo classificação de tamanho, através de extrusão (extrusora de aço-inox Lipex Biomembranes Inc) em membranas de policarbonato (100nm diâmetro de poro), com 15 passagens, à 55°C (acima da temperatura de transição de fases dos lipídios).

Na segunda etapa de produção, conforme metodologia descrita por Gregoriadis e Kirby (1984), os lipossomas unilamelares foram congelados com nitrogênio líquido e submetidos à liofilização (liofilizador Freezone 4,5 da Labconco) por um período de 26 horas (-45°C e 2,3mbar). Após o processo de liofilização, as amostras foram reconstituídas ou reidratadas com tampão PBS (10mM fosfato, 120mM NaCl, pH 7,2) ou salina (0,9% m/v) e mantidas à 55°C durante 1 hora. O volume inicial de reconstituição foi 1/10 do volume original.

Nesta metodologia, foram produzidas formulações lipossomais compostas por fosfatidilcolina sintética (DPPC) ou natural (Epikuron 200SH<sup>5</sup>) e colesterol (8:1 m/m). As concentrações mássicas das preparações variaram de 37 a 225mg de lipídio total por 10mL de solução, numa razão mássica fosfolipídio:colesterol 8:1 e 3:1. A eficiência da trealose como crioprotetor nas formulações foi avaliada a diferentes

---

<sup>5</sup> Fosfatidilcolina hidrogenada natural de soja, designada comercialmente como EPIKURON 200SH

razões mássicas trealose:lipídio (1:1 e 4:1). Os lipossomas furtivos foram preparados com a fosfatidilcolina natural, colesterol e DSPE-PEG2000 (razão mássica 7,8:1,0:1,8), incluindo trealose na formulação como crioprotetor.

#### 4.2.2.2 - Encapsulação de Proteínas Alergênicas

Volumes iguais (5mL) de lipossomas unilamelares vazios, compostos de Epikuron e colesterol (8:1 m/m), e extrato alergênico de *Drechslera monoceras* (1,32mg/mL) foram misturados e homogeneizados em agitador recíproco à 55°C (150 ciclos/min), anterior a etapa de congelamento. Em seguida, as amostras foram então congeladas e liofilizadas por aproximadamente 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para encapsulação de ovoalbumina (2mg/mL).

A rehidratação do material liofilizado foi realizada adicionando exatamente 500uL de tampão PBS (10mM fosfato e 120mM de NaCl, pH 7,2) ou salina às vesículas secas. Em seguida, as amostras foram mantidas à 55°C por meia hora. Posteriormente, adicionou-se mais 500uL da solução aquosa a fim de obter lipossomas com uma concentração cinco vezes maior que a original. Procedimento análogo foi realizado com os lipossomas furtivos.

### **4.2.3 – Caracterização Físico-Química**

#### 4.2.3.1 - Teor de Fosfato

Os fosfolipídios nas formulações lipossomais foram quantificados pela determinação do fósforo inorgânico, segundo o método de Chen (1956), com modificações introduzidas por Moraes (1996) e Ribas (1997). O método consiste na oxidação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dos compostos de carbono a carbono elementar, que é transformado a CO<sub>2</sub> pelo peróxido de hidrôgeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O fósforo é convertido em ortofosfato que forma um complexo com molibdato de amônio, sendo em seguida reduzido pelo ácido ascórbico, fazendo surgir à cor azul. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de fosfolipídio presente na amostra, o qual

é quantificada através da curva de calibração de absorbância versus concentração de fósforo, previamente construída.

Utilizou-se 100µL de solução em cada tubo de ensaio (amostras, padrões, fosfato e o branco), juntamente com 500µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N. Os tubos foram aquecidos em placa térmica (em capela) a 200°C por 30 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 165µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> isento de fosfato, em cada um dos tubos, aquecendo-os por mais 30 minutos em placa térmica a 200°C. Após resfriamento até a temperatura ambiente, adicionou-se 4mL de água deionizada, 500µL de solução de molibdato de amônio e 500µL de uma solução 8% de ácido ascórbico. Os tubos foram, posteriormente, aquecidos em água a 100°C por 7 minutos, favorecendo o aparecimento da cor azul. Em seguida foram resfriados e a intensidade da cor medida a 830nm.

#### 4.2.3.2 – Comportamento Osmótico

O comportamento osmótico dos lipossomas pode ser determinado através de medidas turbidimétricas de uma dispersão equilibrada a várias concentrações osmolares de glicose. Existe uma relação linear entre o volume lipossomal e o inverso da absorbância a 450nm. O gráfico de 1/A(absorbância) versus concentração de glicose não permeante é linear se os lipossomas comportarem-se como osmômetros ideais, obedecendo a lei de Boyle-van't Hoff:

$$1/A = (1/A_0)(1/C) + (1/A_\infty)$$

onde 1/A é proporcional ao volume lipossomal equilibrado, 1/A<sub>0</sub> é proporcional ao volume osmótico determinado pelo volume do tampão no cerne aquoso durante a formação dos lipossomas e 1/A<sub>∞</sub> é proporcional ao volume equilibrado numa concentração de glicose infinita não permeante (Viera et al., 1993).

Nos ensaios uma solução de glicose (50mM) contendo 2mM EDTA em 10mM de tampão fosfato foi adicionada ao filme seco de lipídios e aos lipossomas rehidratados. Após a hidratação ou rehidratação dos lipossomas, 0,5mL da dispersão

lipossomal foi misturada com a solução estoque de glicose de várias concentrações a fim de obter um gradiente de permeação através da bicamada lipídica.  $C_{in}/C_{out}$ , razão entre a concentração de glicose encapsulada em lipossomas e presente no meio externo, variou de 0,4 a 4. A turbidez das suspensões foi medida a 450nm em espectrofotômetro (HITACHI, modelo 2001), após uma hora de incubação. Para evitar qualquer efeito de espalhamento múltiplo, a linearidade entre a absorbância e a concentração de lipossomas foi previamente verificada.

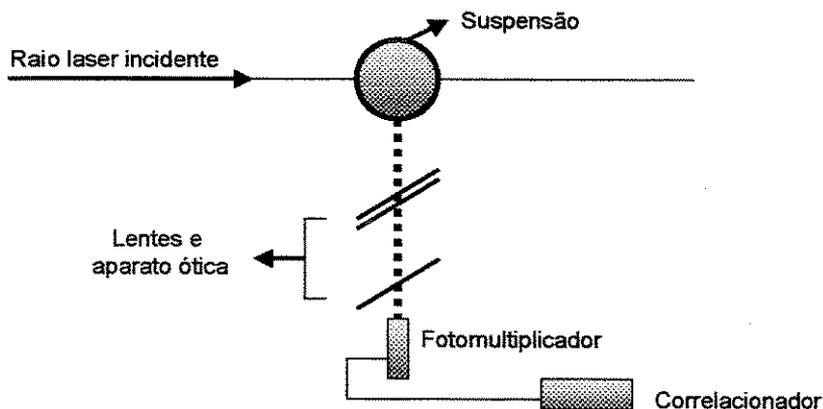
#### 4.2.3.3 – Raio Hidrodinâmico

O diâmetro hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho das vesículas foram determinados por espalhamento elástico de luz laser – Laser Light Scattering – em equipamento de detecção de espectro Malvern Autosizer. A técnica baseia-se na dependência das flutuações de intensidade do espalhamento de luz em função do tempo, devido ao movimento Browniano das partículas em suspensão. Partículas menores difundem-se mais rápido que partículas grandes e a taxa de flutuação da intensidade de luz espalhada varia de acordo com a velocidade de difusão (New, 1990). O coeficiente de difusão médio translacional dos lipossomas em solução diluída pode ser medido e o diâmetro hidrodinâmico médio,  $D_h$ , é calculado pela equação de Stokes-Einstein (Lasic et al, 1993):

$$D_h = (kT)/(6D\mu)$$

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

O equipamento utilizado foi um Autosizer 4700, acoplado a um sistema de aquisição de dados. A análise dos dados foi efetuada através do software PCS 4700. As medidas foram realizadas em dois ângulos de espalhamento (90 e 135°). A Figura 9 ilustra o esquema do equipamento para a determinação do tamanho das partículas.



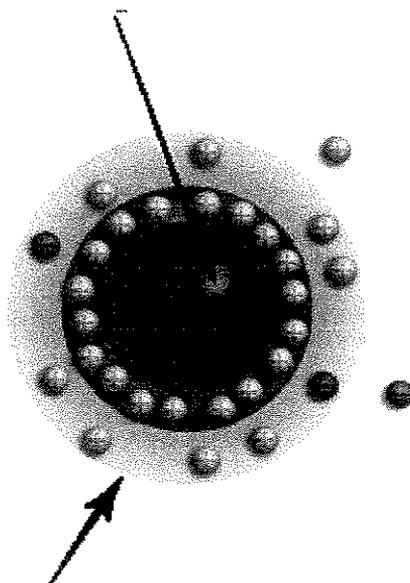
**Figura 9** - Esquema do equipamento para a determinação de medidas de tamanho das partículas por espalhamento de luz (adaptado de Ostrowsky, 1993).

#### 4.2.3.4 – Carga Superficial

A característica essencial às dispersões coloidais é a grande relação área/volume para as partículas envolvidas. Nas superfícies de separação entre a fase dispersa e o meio de dispersão há a manifestação de alguns fenômenos de superfície, tais como efeitos de adsorção e dupla camada elétrica. A carga superficial do colóide influencia a distribuição espacial de íons no meio líquido, atraindo os íons de carga oposta (contra-íons) e repelindo os de mesma carga (co-íons). Isso, juntamente com os efeitos do movimento térmico levam a formação da dupla camada elétrica, que consiste de uma região interna – camada de Stern (contra-íons adsorvidos) e uma região difusa, onde os co-íons encontram-se no meio polar (Figura 10).

A análise das forças no sólido ou no líquido pode ser conduzida em termos de carga ou do potencial eletrostático. Neste último caso, o potencial médio na superfície pode ser chamado de potencial zeta ou potencial eletrocinético ( $\zeta$ ). O potencial zeta é função do pH e da força iônica do meio. É esperado que o potencial zeta diminua com o aumento da força iônica, devido a um deslocamento dos íons da camada de Stern, quando a camada difusa é comprimida (Hunter, 1981).

## Carga negativa



**Camada de Stern – região do potencial zeta**

**Figura 10** – Distribuição do potencial na região da dupla camada de uma partícula carregada, mostrando a posição do potencial zeta.

A carga superficial dos lipossomas vazios e incorporando proteínas, medidas como potencial zeta ( $\zeta$ ), foram determinadas em tampão PBS (pH 7.2) e água (pH 6.0), a 25°C, por espalhamento de luz Doppler (equipamento Malvern Autosizer 3000). O método usado baseia-se em uma função de autocorrelação a luz espalhada numa solução coloidal (medida por um sistema de contagem de fótons), o qual é convertido em um espectro de frequência. As frequências são convertidas em velocidades, mobilidade eletroforética e por fim em potencial zeta.

### 4.2.3.5 – Transição de Fases

A temperatura de transição de fases dos lipossomas convencionais e furtivos vazios, formados por epikuron:colesterol (8:1 m/m) e trealose foi determinada por

microcalorimetria diferencial de varredura (microcalorímetro VP-DSC, MicroCal Inc.). Nessa técnica, as temperaturas da amostra e da referência aumentam linearmente com o tempo e a diferença entre elas é mantida igual a zero. À medida que a amostra sofre uma transição endotérmica, uma certa quantidade de energia é fornecida, de maneira que sua temperatura mantenha-se igual à da referência. Essa quantidade de energia representa a entalpia de transição de fase. Na ausência de eventos térmicos, obtém-se uma linha de base.

Nos procedimentos dos ensaios, utilizou-se 0,5mL de amostra líquida e a mesma quantidade de água como referência. Para as amostras liofilizadas foram usadas aproximadamente 12 mg e como referência um capilar de aço inox vazio. Várias varreduras de 20 a 110°C foram realizadas a uma taxa de 30°C/hora.

#### 4.2.3.6 – Morfologia

A morfologia e tamanho dos lipossomas liofilizados (pó) foram observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todas as micrografias foram obtidas usando o microscópio produzido pela LEICA, modelo LEO 440i equipado com detector secundário de elétrons. A voltagem de aceleração usada variou de 3 – 5kV. Inicialmente, as amostras foram fixadas em um porta-amostra através de fita adesiva dupla-face. Posteriormente, essas amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e analisadas. As imagens foram salvas em arquivos TIFF a 16 ou 32 bit.

#### 4.2.3.7 – Cristalinidade

As partículas resultantes da liofilização dos lipossomas foram caracterizadas quanto ao grau de cristalinidade através da técnica de difração de raios-X. Essa propriedade está relacionada com a área superficial das partículas secas e com a facilidade de hidratação para a produção dos lipossomas. O equipamento utilizado foi fabricado pela Philips, modelo XPERT, cuja fonte de raios-X é de cobre (Cu). As varreduras foram realizadas a 2° por minuto, entre 5 e 80° (2 $\theta$ ) e os ensaios à

temperatura ambiente com as amostras lipossomais (convencional e furtivo) secas com e sem trealose.

#### 4.2.3.8 – Interações Trealose/Fosfolipídios

Os ensaios de interação entre os grupos OH da trealose e P=O dos fosfolipídios foram realizados por espectroscopia de infravermelho. Conforme trabalhos de Crowe et al. (1987,1989), o efeito crioprotetor da trealose sobre as membranas desidratadas se deve a capacidade da trealose formar ligações de hidrogênio com o grupo fosfato dos lipídios desidratados. Assim, espectros de infravermelho (equipamento Boomem MB series Hartmann & Braun – Michelson) das amostras preparadas em pastilhas de KBr foram coletados fazendo-se varreduras de 4000 a 400nm.

#### 4.2.3.9 - Estabilidade em Plasma

Os ensaios de avaliação da estabilidade de lipossomas, convencional e furtivos, foram realizados com plasma humano à 37°C. Adicionou-se a 1mL de plasma, 200µL de lipossomas unilamelares vazios (6mg/mL de lipídio total). A amostra foi incubada por 24 horas. A cada 2 horas, medidas de absorbância a 340nm foram realizadas em espectrofotômetro (Hitachi 2010).

#### 4.2.3.10 - Separação das Proteínas Alergências

O método de escolha para a separação das proteínas alergênicas que não foram encapsuladas em lipossomas foi cromatografia em gel por "Spin Column". Esse método é bastante usado na separação de fármacos não encapsulados em lipossomas, como descrito por New (1990) e Dipali (1996), por não diluir a suspensão lipossomal a ser separada, como acontece na cromatografia em gel convencional.

Neste procedimento foram usadas seringas de 5mL empacotadas com o gel Sepharose CL-6B, utilizando lã de vidro como suporte. As seringas foram colocadas em tubos de coleta e submetidas à centrifugação. Inicialmente, o gel foi equilibrado com tampão PBS (10mM fosfato, 120mM NaCl, pH 7,2) e posteriormente saturado com lipossomas unilamelares vazios. Após a saturação, efetuou-se dez lavagens para remoção dos lipossomas não adsorvidos. Em seguida, 1mL de amostra foi aplicado, centrifugado e recolhido. A coluna foi lavada dez vezes com o mesmo tampão e as amostras de cada lavagem recolhidas para posterior análise da concentração protéica em cada fração. A velocidade de rotação usada foi de 3000rpm durante 1minuto para cada ciclo.

Para a separação da ovoalbumina não encapsulada em lipossomas, utilizou-se a cromatografia de permeação em gel com Sepharose CL-6B (8cm x 1,5cm). Inicialmente, o gel foi equilibrado com solução salina e posteriormente saturado com lipossomas unilamelares vazios. Após lavagem (50mL salina), 1mL de amostra foi aplicado. Frações de eluição equivalentes a 1mL foram recolhidas e analisadas quanto ao teor protéico.

#### 4.2.3.11 - Determinação do Teor Protéico

Neste trabalho, o método de Bradford foi utilizado para determinação do teor protéico.

#### Ensaio Bradford

O azul de comassie apresenta uma absorção máxima à 465nm, porém quando ligados a proteínas essa absorção é deslocada para 595nm. Inicialmente, diluiu-se a solução de Bradford (azul de Commassie) com água deionizada na proporção 1:4, respectivamente. Após a diluição, a solução foi filtrada em papel de filtro watmann nº1.

Em tubos de ensaio, adicionou-se a 1,5mL do reagente, 30µL da amostra. No caso do branco, utilizou-se 30µL de água. A curva de calibração foi construída com BSA a diferentes concentrações, partindo de uma solução mãe de 2,25mg/mL. Para

as amostras com proteínas encapsuladas, os lipossomas foram submetidos previamente a uma extração com clorofórmio:metanol (9,5:0,5 v/v), visando a separação dos lipídios (migração para a fase apolar) das proteínas (fase aquosa), uma vez que os lipídios são interferentes deste método.

#### 4.2.3.12 - Identificação das proteínas encapsuladas em lipossomas

A identificação qualitativa da massa molar das proteínas encapsuladas em lipossomas foi feita por eletroforese SDS-PAGE (sistema de eletroforese da Bio Rad), para verificação da exclusão durante o processo de encapsulação. Os lipossomas foram previamente rompidos através da extração líquido-líquido com clorofórmio:metanol (9,5:0,5 v/v), visando à liberação das proteínas encapsuladas ou incorporadas para o meio aquoso. A metodologia usada para a realização da eletroforese SDS-PAGE está descrita no item 4.1.2.1.

#### **4.2.4 - Liberação das proteínas Alergênicas**

Várias alíquotas de 1mL de lipossomas convencionais e furtivos rehidratados, contendo as proteínas encapsuladas foram deixados em agitador recíproco a 37°C sob agitação (150 ciclos/min). Nos tempos, 0, 5, 10, 15, 30, 45 min., 1, 2, 4, 6, 8 e 24h, cada tubo de eppendorf referente ao tempo estudado eram retirados. As alíquotas foram filtradas em membranas de 100nm de poro, visando à separação da proteína liberada da encapsulada, e posteriormente analisadas quanto ao teor protéico.

## 4.3 - Microesferas

### 4.3.1 – Material

PLGA 50:50 [poly(DL-lactide-co-glycolide)] (LactelBP 0100. MM 45000-75000), Ponceau S, trealose e ovoalbumina foram obtidos da Sigma Chemical Co e álcool polivinílico (PVA - MM 49000) da Aldrich Chemical company Co.

PLGA 50:50 [poly(DL-lactide-co-glycolide)] de várias massas molares e diferentes terminações foram obtidos da Boehringer Ingelheim – Alemanha. Os polímeros usados foram RG502 (MM 12000), RG503 (MM34000) e RG504 (MM 63000) com o grupo terminal carboxila esterificado e RG502H (MM 12000), RG503H (MM 34000) e RG504H (MM 63000) com o grupo terminal carboxila livre. Neste trabalho, os polímeros serão referenciados por seus códigos comerciais.

Os solventes utilizados na preparação de microesferas apresentaram grau de pureza elevado e foram obtidos da Aldrich Chemical Co. Água e solução salina estéril e aprirogênica (uso injetável) foi obtida comercialmente.

### 4.3.2 – Métodos

#### 4.3.2.1 - Preparação

As microesferas de PLGA 50:50 foram preparadas pelo método da evaporação do solvente baseada na formação de uma emulsão dupla água/óleo/água (A/O/A). A emulsão primária consistiu de uma fase oleosa formada pelo polímero PLGA 50:50 (400mg) dissolvido em 4mL de diclorometano (DCM) e uma fase aquosa (250 µL água ou salina), contendo Ponceau S a ser encapsulado. Essa emulsão foi agitada por 2min a 24000rpm (Ultraturax®). Posteriormente, a emulsão primária foi vertida em 20mL de uma solução de PVA e agitada a 19000rpm (Ultraturax®) por 2 min. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente. A emulsão A/O/A foi agitada a 1000rpm por 3 horas a temperatura ambiente, visando à evaporação do solvente.

As microesferas foram coletadas por centrifugação (2000rpm/10min.), lavadas três vezes com água, resuspensas em PVA 1% e liofilizadas por 24 horas.

Para avaliar a influência da massa molar e grupos terminais dos polímeros sobre o tamanho, morfologia e liberação do Ponceau S das microesferas, diferentes PLGA 50:50 foram usados na preparação das micropartículas. A Tabela 4 mostra os seis tipos de polímeros estudados na preparação de microesferas encapsulando Ponceau S com suas propriedades importantes para o processo.

**Tabela 4** – Polímeros de diferentes massas molares e grupos terminais usados nos experimentos. PLGA 50:50 da Boehringer Ingelheim: RG502, RG503 e RG504 (terminação hidrofóbica) e RG502H, RG503H e RG504H (terminação hidrofílica).

Polímeros	MM	Ácido láctico/ácido glicólico	v.i. (dl/g)
RG502	12 000	50:50	0,16-0,24
RG502H*	12 000	50:50	0,16-0,24
RG503	34 000	50:50	0,32-0,44
RG503H*	34 000	50:50	0,32-0,44
RG504	63 000	50:50	0,45-0,60
RG504H*	63 000	50:50	0,45-0,60

MM – massa molar

v.i. – viscosidade inerente

\* RG' (H): identifica polímeros que apresentam ácido carboxílico livre na sua terminação. Os outros RG's apresentam grupo carboxila esterificado na sua terminação.

#### 4.3.2.2 – Incorporação das Proteínas

O extrato alergênico (24mg/mL) ou ovoalbumina (38mg/mL) foi incorporado as microesferas na fase aquosa (250µL) da emulsão primária.

#### 4.3.2.3 - Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup>

O planejamento estatístico de experimentos foi realizado visando determinar a influência das variáveis do processo no diâmetro das microesferas. Para este experimento, preparou-se microesferas com o polímero PLGA (LactelBP 0100) de proporções equimolares, encapsulando Ponceau S.

O planejamento fatorial utilizado foi 2<sup>3</sup> com três pontos centrais para o cálculo do erro, o qual requereu um total de 11 experimentos. As variáveis investigadas foram: concentração de álcool polivinílico (PVA, MW 49000, Aldrich), agitação (RPM) da segunda emulsão e razão fase contínua/fase dispersa (FC/FD). Os níveis escolhidos para as variáveis do processo, determinados a partir dos limites de operação do equipamento, são apresentados na Tabela 5, e as combinações usadas para cada experimento são listadas na Tabela 6. O polímero PLGA 50:50 utilizado neste experimento foi o LactelBP 0100®.

**Tabela 5 - Variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com os seus respectivos níveis.**

Variável	Nível: -1	Nível: 0	Nível: +1
Concentração de álcool polivinílico, PVA (%)	0,5	2	3,5
Agitação, (RPM)	13000	16000	19000
Razão fase contínua/fase dispersa, (FC/FD)	1:5	1:12,5	1:20

**Tabela 6** - Planejamento fatorial  $2^3$  com três pontos centrais para o cálculo do erro.

Ensaio	Variáveis		
	PVA	RPM	FC/FD
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória e todos os cálculos dos efeitos estatísticos e do erro, assim como a estimativa do modelo e as superfícies de resposta, foram obtidos do programa computacional "STATISTICA® 5.0 - Development Environment software".

### **4.3.3 - Caracterização Físico-Química**

#### **4.3.3.1 - Análise da Taxa de Evaporação do Solvente**

A evaporação do solvente das microesferas foi acompanhada por microscopia ótica. Durante a etapa de evaporação do solvente, alíquotas das diferentes amostras foram retiradas nos tempos 0, 20, 40, 60 e 120 min. E observadas em microscópio ótico (NIKON Eclipse TS100F com câmera CCD optronics LE-D). A presença de um software específico acoplado ao microscópio ótico permitiu analisar o diâmetro de cada microesfera presente nas fotomicrografias através de contagem automática.

#### 4.3.3.2 - Morfologia das Partículas Secas

A morfologia e tamanho das microesferas liofilizados (pó) foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todas as micrografias foram obtidas usando o microscópio LEICA, modelo LEO 440i equipado com detector secundário de elétrons. A voltagem de aceleração usada variou de 5 – 10kV. Inicialmente, as amostras foram fixadas em um porta-amostra através de fita adesiva dupla-face. Posteriormente, essas amostras foram recobertas com ouro e analisadas. As imagens foram salvas em arquivos TIFF a 16 ou 32 bit.

O tamanho das microesferas foi determinado através de contagem automática do diâmetro  $D[1,0]$  usando software Image Tool versão 3.0 (University of Texas, San Antonio, Texas, USA, <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>).

#### 4.3.3.3 - Degradação *in vitro*

A degradação das microesferas foi analisada através da perda de massa das microesferas (hidrólise do polímero). Amostras de microesferas de PLGA 50:50 foram devidamente pesadas (25mg) e adicionadas a 1mL de tampão PBS (pH 7.2, 10mM). As amostras foram incubadas à 37°C em agitador recíproco (150 ciclos/min.) por vários dias (30 - 60 dias). Em intervalos de tempo pré-determinados, as amostras foram coletadas, centrifugadas, secas (dessecador a vácuo) e pesadas.

A morfologia estrutural das microesferas degradadas, após pesagem, foi também monitorada por microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.3.3.4 - Eficiência de Incorporação

A eficiência de incorporação do Ponceau S ou das proteínas alergênicas foi determinada dissolvendo 5 mg of microesferas em uma solução 0,1 M de NaOH contendo 0.1% SDS (2mL) (Sharif and O'Hagan 1995). A mistura foi incubada sob agitação branda durante 24 h a 37°C. Após centrifugação e filtração em membranes de 0,22  $\mu\text{m}$ , as proteínas ou Ponceau S no sobrenadante foram analisadas. O

ponceau S foi quantificado através de uma curva de calibração previamente construída a 492nm. A massa do extrato alergênico ou ovoalbumina encapsulada por massa seca de microesferas foi também determinada.

Assim, a eficiência de encapsulação foi calculada como:

$$E.I. = \frac{\text{massa de proteína ou Ponceau S encapsulado}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

#### 4.3.3.5 – Carga Superficial

Microesferas vazias e contendo as proteínas encapsuladas foram analisadas em equipamento Zeta Sizer 3000 (Malvern, USA) para determinação da carga líquida total das partículas, nas mesmas condições descritas no item caracterização físico-química dos lipossomas.

#### 4.3.3.6 – Transição vítrea

As microesferas poliméricas constituídas pelos polímeros RG503 e RG503H com extrato alergênico foram caracterizadas por calorimetria diferencial de varredura, na tentativa de comparar os valores de transição vítrea ( $T_g$ ) para os polímeros puros e as microesferas obtidas. A faixa de temperatura usada foi de 5-100°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

### **4.3.4 – Liberação das Proteínas**

Para a determinação do perfil de liberação *in vitro* do Ponceau S, várias alíquotas de microesferas (25mg) em tampão PBS (1mL, pH 7.2, 10mM), correspondente a intervalos de tempo pré-determinados, foram submetidas à 37°C em agitador recíproco (150 ciclos/min.) durante 5 dias. No intervalo de tempo específico a amostra foi coletada, centrifugada e o sobrenadante analisado quanto a concentração de Ponceau S, utilizando curva de calibração previamente construída.

As amostras contendo proteínas (50mg) foram suspensas em 2mL de salina à 37°C sob agitação (150 ciclos/min.) e analisadas durante 40 dias. Em intervalos de tempo pré-determinados, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para posterior análise do teor protéico. Todo o volume do sobrenadante era retirado e substituído por um novo volume de solução salina (liberação com troca de solução). Em seguida, a amostra foi homogeneizada e retornada ao agitador recíproco.

A permeação dos compostos encapsulados através das microesferas foi representada matematicamente pelo modelo físico de difusão de solutos no interior de esferas sólidas, descrito pela lei de Fick. No modelo, não foi considerada a liberação por erosão das microesferas.

Em coordenadas esféricas e considerando somente a difusão na direção do raio das partículas, tem-se a equação (1) para representar o modelo:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{1}{D} \frac{\partial c}{\partial t} \quad (\text{Eq. 1})$$

A equação (1) foi resolvida considerando as seguintes condições de contorno:

cc1 → (condição inicial)  $t = 0$  e  $0 \leq r \leq R \Rightarrow c(r,t) = c_{\text{int}}$

cc2 →  $t > 0$  e  $r = R \Rightarrow c(R,t) = c_{\infty} = 0$

cc3 →  $c(r,t)$  é um valor finito para  $0 \leq r \leq R$

A solução da equação (1) gera uma série de Fourier de senos, a qual fornece a seguinte expressão para o perfil de concentração no interior das partículas representada pela equação (2):

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

A quantidade total do soluto difundido no solvente (considerando N partículas) é representada pela equação (3):

$$c(t) = N \int_0^R c(r,t) 4\pi r^2 dr = N \left[ -2c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 D\theta\right]}{\frac{n\pi}{R}} \int \frac{\text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right)}{r} 4\pi r^2 dr \right] \quad (\text{Eq. 3})$$

De onde o perfil de concentração em função do tempo pode ser calculado pela equação (4):

$$\frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (\text{Eq. 4})$$

Expressando esse perfil em termos do fármaco liberado na solução, que é a variável medida experimentalmente, tem-se,  $\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{c(t)}{c_{\text{int}}}$ , logo:

$$\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde  $c^*(t)$  é a concentração do fármaco difundida para o meio aquoso num tempo  $t$ ,  $c_{\text{int}}$  a quantidade liberada após um tempo infinito, o que corresponde à quantidade total de fármaco incorporado nas partículas 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 das partículas.

A partir do modelo proposto e dos dados experimentais obtidos foi ajustado o parâmetro de difusão  $k$  pelo método da máxima verossimilhança, utilizando um software desenvolvido pelos pesquisadores Leonardo Machado de Rosa e José Roberto Nunhez (LCPD/FEQ/Unicamp). Neste método as incertezas de todas as medidas experimentais são levadas em conta no ajuste.

Os dados ajustados referem-se ao modelo de difusão e consiste matematicamente em uma função representada por uma série, onde o parâmetro a ser obtido,  $k$ , pertence a todos os termos dessa 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 1000 termos da série.

Este valor foi muito maior que o necessário, visto que após algum tempo ocorria a convergência da série, bastando apenas o primeiro termo para representar a função. O único ponto crítico é quando  $t$  tende a zero. Neste caso a série apresenta problemas de oscilação. Entretanto, no limite quando  $t$  tende a zero, a série é representada pela função:

$$\frac{M(t)}{M_{\infty}} = 3 \left( \frac{2(kt)^{\frac{1}{2}}}{\pi^{\frac{1}{2}}} - kt \right) \quad (\text{Eq. 6})$$

Deve-se notar que a equação (6) é a própria série do limite de  $t$  tendendo a zero, e não uma aproximação da mesma conforme GUY et al. (1982).

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

$$P = \frac{J}{\Delta c} \quad (\text{Eq. 7})$$

Em termos da constante  $k$  usada no modelo (equação (5)), a permeabilidade pode ser expressa considerando o comprimento característico de uma esfera, ou seja, a razão  $V/A$ :

$$P = \frac{kV}{A} \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde  $V$  e  $A$  são o volume e a área superficial das partículas, respectivamente. Nos cálculos, considerou-se o diâmetro médio das microesferas.

## **4.4 – Ensaios *in vivo***

### **4.4.1 – Material**

Solução salina injetável e seringas descartáveis (estéreis e apirogênicas) foram obtidas comercialmente.

IgG anti-rato conjugada com peroxidase, soro fetal bovino, polioxietileno sorbitan monolaurato (Tween-20) obtidos da Sigma Chemical Co.

IgE purificada de camundongo foi obtida da Ambriex.

Placas de poliestireno de fundo chato (96 poços – BD Falcon™) e substrato TMB (tetrametil benzidina) foram obtidos da BD Bioscience Pharmingen.

Animais: foram empregados camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas de 6-8 semanas de idade, adquiridas do Biotério Central da Unicamp (CEMIB) e mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental, sob condições sanitárias livres de patógenos conhecidos, controle de luz e temperatura, recebendo água e ração *ad libitum*.

Demais reagentes usados apresentaram grau de pureza elevado e foram obtidos dos principais fabricantes.

### **4.4.2 – Métodos**

#### 4.4.2.1 – Protocolo de Sensibilização

Os ensaios foram realizados com camundongos BALB/c, fêmeas, de 6-8 semanas. Foi administrado nos animais, via s.c., 10ug de OVA em 200ul de solução salina:adjuvante completo de Freund (1:1 v/v), conforme esquema 1. Doses reforços foram aplicadas, via intraperitoneal, no 21º dia (10uL de OVA em 200uL de solução salina) e no 28º dia (50ug de OVA em 200uL de solução salina).

Todos as soluções e vidrarias utilizadas neste protocolo foram estéreis e apirogênicas.

#### 4.4.2.2 – Protocolo de imunização

A imunização dos animais foi realizada através da injeção seqüencial de lipossomas (sistemas de liberação rápida) e microesferas (sistemas de liberação lenta). Para a imunização com OVA, os animais devidamente sensibilizados foram divididos em dois grupos. Cada grupo foi composto por 20 animais. Os lipossomas foram aplicados 48h após a última dose reforço e as microesferas administradas nos animais 48h após a injeção dos lipossomas.

No primeiro grupo, injetou-se, via intraperitoneal, 100uL lipossomas convencionais (10ug de OVA) e após 48h, procedeu-se a administração das microesferas com Ova (50ug OVA). O sangue dos animais foi coletado no 15º, 30º, 45º e 60º dia após a administração das amostras para posterior análise dos níveis de IgG e IgE. O sacrifício dos animais para a coleta de sangue foi realizada anestesiando os animais com tiopental.

No segundo grupo foi realizado o mesmo procedimento, substituindo os lipossomas convencionais pelos furtivos. Um grupo controle foi também avaliado, através da administração seqüencial de lipossomas e microesferas vazias. Vale salientar que nesse protocolo foram utilizadas condições estéreis.

Protocolo	Dias
<u>Sensibilização</u> →	0 (s.c.) → OVA + ACF 21° (i.p.) → OVA 28° (i.p.) → OVA
<u>Imunização</u> →	30° (i.p.) → Lipossomas (convencionais ou furtivos) 32° (i.p.) → Microesferas (ME-503)
<u>Sacrifício</u> →	após injeção dos lipossomas 15° (análise de IgG e IgE) 30° (análise de IgG e IgE) 45° (análise de IgG e IgE) 60° (análise de IgG e IgE)

**Esquema 1** – Protocolo de sensibilização e imunização dos animais com lipossomas e microesferas encapsulando ovoalbumina via administração seqüencial. s.c.: via subcutânea e i.p.: via intraperitoneal.

#### 4.4.2.3 – Análise da expressão de anticorpos das classe IgE e IgG anti-OVA através da técnica de imuno ensaio em placas (ELISA)

Os níveis de IgG e IgE específicos para ovoalbumina no soro dos animais foram determinados por ELISA.

A solução de ovoalbumina foi ajustada para a concentração de 10µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato e adicionada (50µL) a 96 poços de placa de poliestireno (Corning Inc, Costar, EUA), as quais foram mantidas durante a noite em câmara úmida a 8° C. Após este período, as placas foram lavadas (solução de lavagem: tampão fosfato-PBS , pH 7,3 e Tween 20 0,05%) 3 vezes com intervalos de 10 minutos entre elas, seguido da adição de solução bloqueio (1% de soro bovino fetal em PBS) para os sítios livres, e mantidas em câmara úmida durante 2 horas sob temperatura ambiente. A seguir eram lavadas conforme descrito acima. Após padronização das melhores condições de diluição dos soros e conjugados, eram

adicionadas aos poços soros dos animais dos vários protocolos experimentais. As diluições séricas utilizadas eram 1:500 para detecção de IgG e 1:100 para IgE. Após adição dos soros diluídos aos poços, as placas eram incubadas durante 4 horas para procedimentos com IgG e durante a noite (16 horas) para IgE. Para detecção de IgG anti-OVA, após os períodos de incubação, as placas foram lavadas conforme descrito anteriormente e adicionados anticorpos de rato anti-IgG conjugado a peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1:5000 e mantidas sob temperatura ambiente em câmara úmida durante 2 horas. A seguir, as placas foram lavadas conforme descrito anteriormente e adicionados substrato TMB (3,3',5,5' tetrametil benzidina, BD Biosciences, EUA). Para os procedimentos com IgE, anticorpo de rato anti-IgE na diluição de 1:250 eram adicionados às placas e mantidas sob temperatura ambiente durante 2 horas em câmara úmida. Após este período, as placas foram lavadas conforme descrito anteriormente e adicionados aos poços um segundo anticorpo de coelho anti-IgG de rato conjugado a peroxidase, na diluição de 1:50000 e incubadas durante 2 horas sob temperatura ambiente em câmara úmida. A seguir, as placas eram lavadas conforme descrição anterior, adicionadas de TMB e mantidas sob temperatura ambiente durante 30 minutos. As reações eram interrompidas com adição de 50 µl de ácido sulfúrico 1N. As reações colorimétricas eram analisadas através de leituras de espalhamento de luz em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. As diluições dos soros foram previamente ajustadas para que fornecessem leituras que pudessem ser comparadas com os soros dos animais controles não imunizados (condições basais). As unidades de anticorpos anti-OVA foram estabelecidas em Unidades Arbitrárias de Densidade Óptica.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

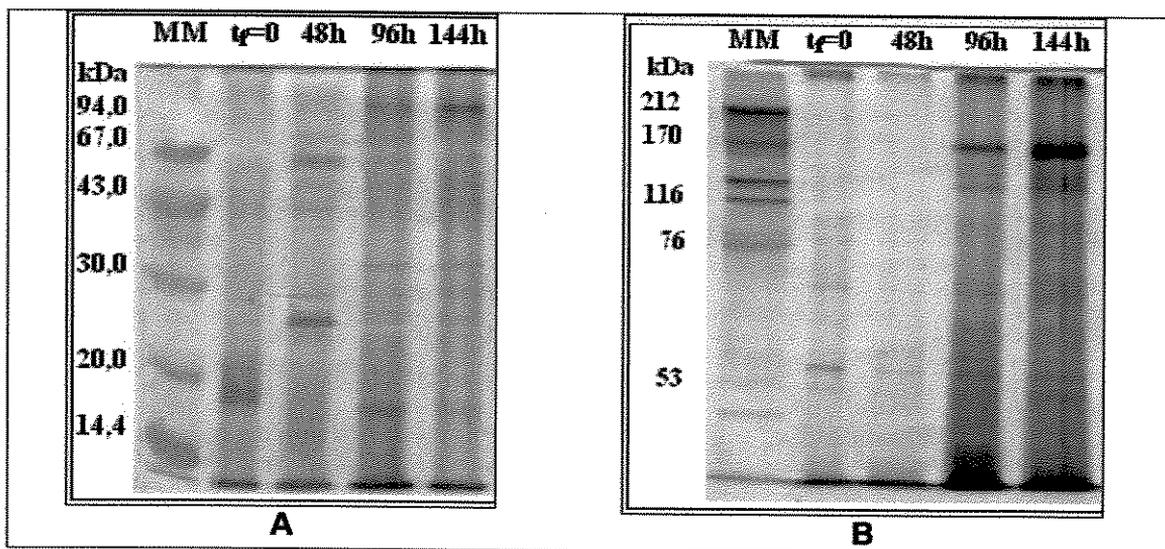
---

### 5.1 – Caracterização do Extrato Alergênico

#### 5.1.1 – Identificação das Proteínas

O extrato alergênico de *Drechslera monoceras* utilizado neste trabalho foi produzido em 144h de fermentação e apresentou proteínas na gama de baixa e alta massa molar. A Figura 11 apresenta uma fotografia dos géis e letroforese, nos quais pode ser identificado um espectro de massas molares das proteínas na faixa de 14 a 170kDa aproximadamente.

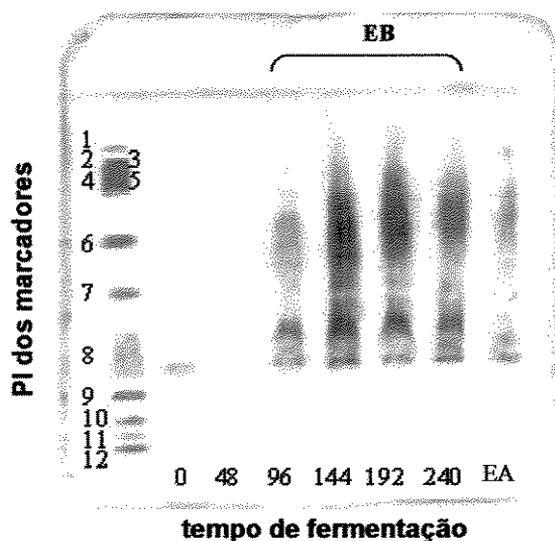
O extrato bruto assim caracterizado foi submetido à remoção de polifenóis por diálise (apresentando ainda uma baixa concentração), obtendo-se o que chamamos de extrato alergênico, ou extrato semi-purificado, o qual foi usado nos ensaios de encapsulação em lipossomas e microesferas.



**Figura 11** – Análise eletroforética em gel de poliacrilamida A)15% B) 10% (SDS-PAGE), onde MM representa a raia do marcador de baixa (A) e alta (B) massa molar. As raias t = 0 e t = 240h representam os extratos semi-purificados.

### 5.1.2 – Ponto isoelétrico das proteínas do extrato alergênico

A análise de focalização isoelétrica realizada com o extrato bruto obtido em diferentes tempos da fermentação, e com o extrato alergênico está mostrada na Figura 12. A determinação do ponto isoelétrico é importante no processo de encapsulação, uma vez que maiores rendimentos são obtidos com as proteínas no seu ponto isoelétrico.



**Figura 12** – Ensaio de focalização isoeletrica para determinação do ponto isoeletrico das proteínas contidas no extrato bruto (EB) nos vários tempos de fermentação e no extrato alergênico (EA) ao final de 240h de fermentação.

Pode-se observar que não há uma definição do ponto isoeletrico (PI) de cada proteína presente no extrato bruto e alergênico, mas uma banda característica. Provavelmente, a natureza da amostra não permite tal definição, visto que existem várias proteínas de massas molares muito próximas e possivelmente pontos isoeletricos bem semelhantes. Porém, percebe-se que a maioria das proteínas presentes no extrato alergênico possui ponto isoeletrico entre 5,0 e 7,0.

## 5.2 – Lipossomas

### 5.2.1 – Reconstituição por Rehidratação

Visando obter uma formulação de fácil reprodução após a reconstituição por rehidratação dos lipossomas previamente liofilizados, foram analisadas diferentes preparações, variando a composição lipídica e frações mássicas de cada componente.

### 5.2.1.1 – Lipossomas Convencionais e Furtivos

#### ❖ Lipossomas convencionais de fosfatidilcolina sintética

A avaliação da influência da velocidade de agitação e a utilização de esferas de vidro na reconstituição do diâmetro de lipossomas, compostos de fosfatidilcolina sintética, previamente liofilizados e rehidratados em agitador recíproco a 55°C são apresentados na Tabela 7. As designações LUV (unilamelar grande) e MLV (multilamelar) foram baseadas na medida do raio hidrodinâmico e não no número de lamelas.

A reconstituição de lipossomas unilamelares (LUVs) foi sensível à velocidade de agitação e à presença de esferas de vidro na dispersão. No entanto, a reconstituição dos lipossomas multilamelares (MLVs) não foi influenciada pelos mesmos parâmetros.

**Tabela 7** – Influência da velocidade de agitação e utilização de esferas de vidro no diâmetro de lipossomas reconstituídos (rehidratados após liofilização).

Lipossomas		Agitação		Alta	
		Média	Média	D <sub>m</sub> : antes	D <sub>m</sub> : depois
		D <sub>m</sub> : antes	D <sub>m</sub> : depois	D <sub>m</sub> : antes	D <sub>m</sub> : depois
LUV <sup>original</sup>	sem esferas	148nm	158nm – 89% <sup>P1</sup> 771nm – 11% <sup>P2</sup>	148nm	184nm – 92% <sup>P1</sup> 2136nm – 8% <sup>P2</sup>
	com esferas	148nm	82nm – 15% <sup>P1</sup> 165nm – 75% <sup>P2</sup> 895nm – 10% <sup>P3</sup>	148nm	93nm – 20% <sup>P1</sup> 195nm – 69% <sup>P2</sup> 2180nm – 11% <sup>P3</sup>
MLV <sup>original</sup>	sem esferas	150nm 2500nm	Várias populações	150nm 2500nm	Várias populações
	Com esferas	150nm 2500nm	Várias populações	150nm 2500nm	Várias populações

D<sub>m</sub>: diâmetro hidrodinâmico médio ou das principais populações na amostra; valores médios de 2 preparações.

P1, P2 e P3 correspondem as percentagens populacionais na amostra.

Os dados experimentais mostram que a presença das esferas de vidro, durante a reconstituição, aumentou o número de populações dos lipossomas unilamelares. A agitação média mostrou-se melhor que a agitação alta, reconstituindo vesículas com diâmetros próximos aos originais, embora a reconstituição não tenha alcançado eficiência de 100%, pois em ambos os casos se observa que 10% da população apresentou diâmetro em torno de 800nm.

Em relação ao tamanho, as dispersões lipossomais reconstituídas apresentaram distribuição bimodal (duas populações), quando não foram usadas esferas no processo, ou multimodal (três populações) quando foi realizada com esferas de vidro. Em relação à homogeneização, observou-se a presença de duas fases em todas as dispersões lipossomais, durante a etapa de reconstituição, gerando agregação e confirmando o baixo rendimento dos lipossomas rehidratados obtidos.

#### ❖ Lipossomas convencionais de fosfatidilcolina natural

Nesses experimentos foi usado o fosfolípido natural comercial Epikuron 200SH, cuja composição contém predominantemente distearoilfosfatidilcolina. A Tabela 8 mostra os resultados obtidos com diferentes composições fosfolípido/colesterol, sendo a razão mássica lipídio/trealose 1:1.

Observa-se que a razão molar ou mássica dos lipídios não influenciou significativamente na reconstituição dos lipossomas. Porém, as vesículas com 40% de colesterol na sua composição apresentaram dificuldades no processo de extrusão. No entanto, a reconstituição dos lipossomas foi levemente influenciada pela concentração de lipídio. É interessante ressaltar que os lipossomas mais concentrados apresentaram-se mais homogêneos e com distribuição menor de tamanhos após a reconstituição (cerca de 93% na faixa de 150nm), ao contrário dos menos concentrados, onde somente 86% da população retornou ao tamanho original.

**Tabela 8 – Influência da composição e concentração de lipídio total na reconstituição dos lipossomas.**

	Diâmetro	D <sub>m</sub> :antes (nm)	D <sub>m</sub> : depois (nm)
	Composição		
Razão mássica e molar de cada formulação	33mg PL – 11mg Col 3:1 m/m 60:40 mol/mol (7,05mM)	145	174 – 86% <sup>P1</sup> 4480 – 14% <sup>P2</sup>
	33mg PL – 04mg Col 8:1 m/m 80:20 mol/mol (5,30mM)	160	166 – 86% <sup>P1</sup> 4049 – 14% <sup>P2</sup>
	200mg PL – 25mg Col 8:1 m/m 80:20 mol/mol (25,00mM)	161	150 – 93% <sup>P1</sup> 1647 – 8% <sup>P2</sup>

PL: fosfolipídio; Col: colesterol; m/m: razão mássica.

P1, P2 e P3 correspondem as percentagens populacionais na amostra.

Os resultados indicam que uma razão mássica trealose:lipídio 1:1 não foi suficiente para reconstituir 100% dos lipossomas ao tamanho original, impedindo a fusão, como descrito por Crowe (1988). Porém, Disalvo e colaboradores (2000) mostraram que o lipídio utilizado na produção dos lipossomas influencia significativamente na habilidade crioprotetora da trealose.

A Tabela 9 mostra a influência da concentração de trealose na reconstituição de lipossomas unilamelares com concentração 5,3mM de lipídios. Estes resultados indicam que a preparação de formulações lipossomais com uma razão mássica lipídio:trealose 1:4 produziram uma maior porcentagem de lipossomas reconstituídos com diâmetro médio semelhante ao original, embora a eficiência de reconstituição não tenha alcançado 100%.

Observa-se que as vesículas de Epikuron/colesterol (8:1 m/m) e trealose (lipídio/trealose 1:4 m/m), preparadas pela técnica de hidratação do filme seco de lipídios, seguido de extrusão em membranas de 100nm de poro, são unilamelares em sua maioria (96%) e apresentam estreita distribuição de tamanhos na faixa de 100 a 300nm.

**Tabela 9 – Influência da concentração de trealose na reconstituição de lipossomas unilamelares vazios. Solução de reconstituição: tampão PBS ou salina.**

33mg Epikuron 200SH/4,25mg Colesterol		
	D <sub>m</sub> antes (nm)	D <sub>m</sub> depois (nm)
Lipossomas sem trealose	140 (2)	2 857 – 77% <sup>P1</sup>
	P<0,1	10 700 – 23% <sup>P2</sup>
Lipossomas com 37mg trealose (lipídio:trealose 1:1 m/m)	145 (3)	174 – 86% <sup>P1</sup>
	P< 0,1	4 480 – 14% <sup>P2</sup>
Lipossomas com 150mg trealose (lipídio:trealose 1:4 m/m)	140 (8)	176 – 96% <sup>P1</sup>
	P<0,1	3 070 – 4% <sup>P2</sup>

D<sub>m</sub> : diâmetro médio principal. As dispesões reconstituídas apresentaram polidispersidade entre 0,2-0,4. Exceto a dispersão sem trealose, cuja polidispersidade foi 1,0.

P1, P2 e P3 correspondem as percentagens populacionais na amostra.

Vale salientar que o diâmetro hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho dos lipossomas reconstituídos aumentam cerca de 30-40nm em relação aos lipossomas originais. Um exemplo de relatório completo da análise de diâmetros encontra-se no anexo I.

Diante dos resultados obtidos, optou-se trabalhar com a formulação lipossomal composta por Epikuron/colesterol (8:1 m/m) e trealose (lipídio total/trealose 1:4 m/m). A escolha foi baseada em três aspectos: a fosfatidilcolina de soja (Epikuron) é aprovada pelo FDA para uso em humanos, o baixo custo do lipídio natural em relação ao sintético (DPPC) e esta formulação lipossomal apresentou-se homogênea antes e após a liofilização com boa reconstituição de tamanho dos lipossomas após a rehidratação.

#### ❖ Lipossomas furtivos de fosfatidilcolina natural

A escolha do DSPE-PEG<sup>2000</sup> foi baseada em dois fatores, conforme citado por Nicholas e colaboradores (2000): melhor estabilidade física das vesículas, devido à presença do PEG e maior quantidade de fármaco encapsulado em relação às vesículas compostas de DSPE-PEG<sup>5000</sup>. Sabe-se ainda que a presença de PEG

restringe o espaço interno do cerne aquoso e que 4% de PEG<sup>2000</sup> nas vesículas é suficiente para mudar a conformação do PEG na superfície, de cadeias depositadas (mushroom) para a conformação estendida (brush). A trealose, mais uma vez, foi escolhida como crioprotetor, por reconstituir os lipossomas mais eficientemente e por ser não tóxica e segura para uso parenteral.

Tomando como base os lipossomas convencionais, incorporou-se 5% mol de DSPE-PEG<sup>2000</sup> nas vesículas. Foram realizados vários testes de reconstituição dos lipossomas furtivos. A Tabela 10 mostra os efeitos da trealose na reconstituição desses lipossomas contendo PEG.

**Tabela 10** - Influência da concentração de trealose na reconstituição de lipossomas furtivos vazios. Solução de reconstituição: tampão PBS ou salina.

<b>33mg Epikuron 200SH/4mg Colesterol/5% mol DSPE-PEG2000</b>		
	<b>D<sub>m</sub> antes (nm)</b>	<b>D<sub>m</sub> depois (nm)</b>
Lipossomas com 13mM trealose (lipídio:trealose 1:1 m/m)	126 (1) P<0,1	3 300 – 100%
Lipossomas com 100mM trealose (lipídio:trealose 1:8 m/m)	130 (8) P< 0,1	25 – 5,5% <sup>P1</sup> 241 – 80% <sup>P2</sup> 2 000 – 14,5% <sup>P3</sup>
Lipossomas com 250mM trealose (lipídio:trealose 1:21 m/m)	137 (2) P<0,1	45 – 16,5% <sup>P1</sup> 201 – 72,5% <sup>P2</sup> 2 111 – 9% <sup>P3</sup> 6 118 – 2% <sup>P4</sup>

D<sub>m</sub> : diâmetro principal de cada população (média das preparações)

P1, P2, P3 e P4 correspondem as percentagens populacionais na amostra.

A partir desses resultados, e considerando o custo elevado da trealose, adotou-se a concentração de 100mM nas formulações deste trabalho, devendo-se separar por centrifugação os lipossomas multilamelares presentes após a reconstituição.

## 5.2.2 – Caracterização Físico-Química

### 5.2.2.1 – Lipossomas Vazios

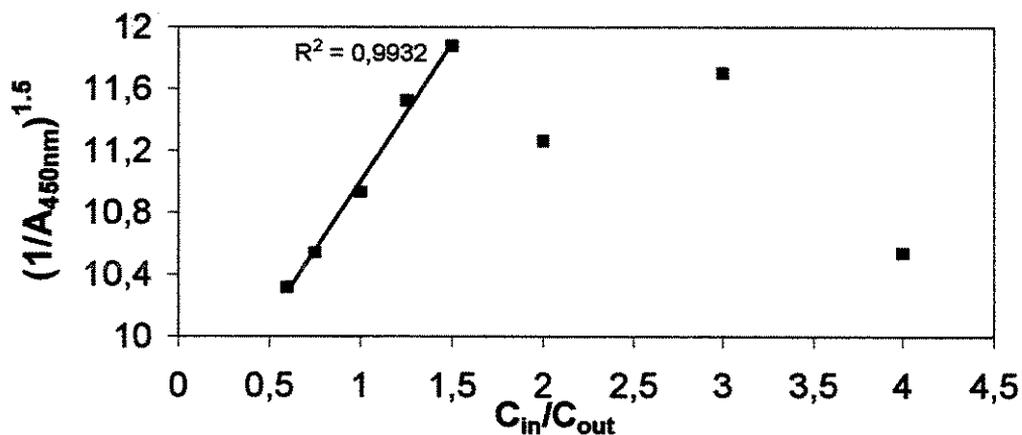
#### 5.2.2.1.1 - Teor de Fosfato

O rendimento médio das preparações lipossomais (convencionais e furtivos) com composição previamente selecionada, conforme descrito no item 5.1.1, foi de aproximadamente 91%. As perdas no processo não ultrapassaram 6%.

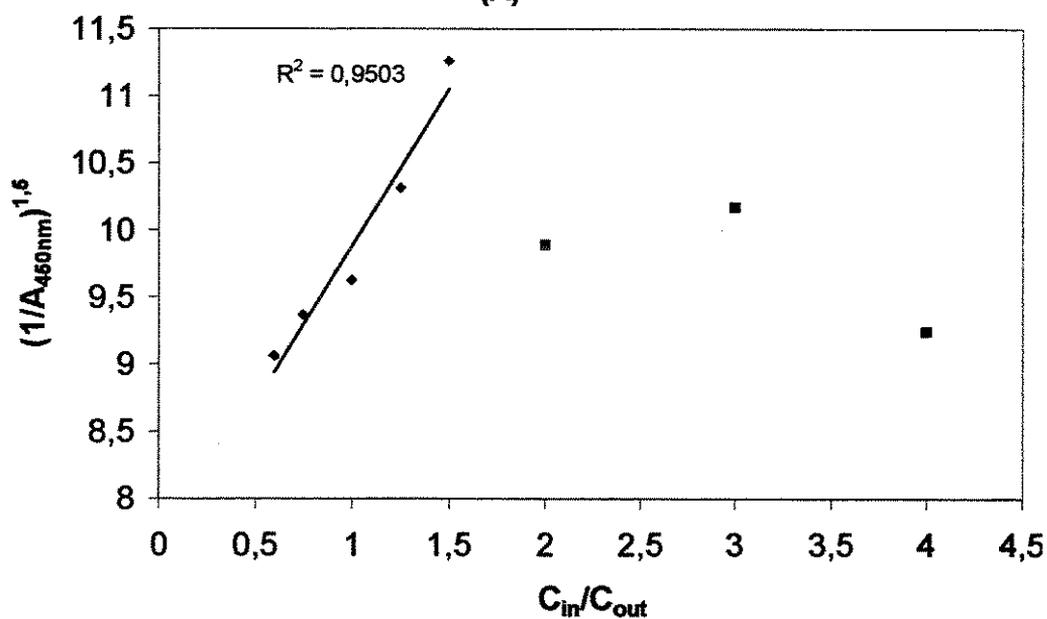
#### 5.2.2.1.2 - Comportamento Osmótico

Os lipossomas convencionais hidratados e rehidratados responderam ao gradiente osmótico como osmômetros ideais. A Figura 13 (A e B) mostra a boa relação linear entre  $C_{in}/C_{out}$  e  $(1/A)^{1,5}$ , implicando que a membrana lipossomal funciona como uma barreira.

Em ambos os gráficos é possível observar a linearidade nos valores de  $C_{in}/C_{out}$  entre 0,6 e 1,5. Sob condições mais hipotônicas com  $C_{in}/C_{out}$  maior que 1,5, a relação linear é perdida, devido ao inchamento das vesículas com conseqüente ruptura da mesma, perdendo sua propriedade de barreira. Sob condições hipertônicas com  $C_{in}/C_{out}$  menor que 0,6, os lipossomas sofrem um processo de contração (murchamento), perdendo suas características membranares, comprovado pela não linearidade no gráfico.



(A)



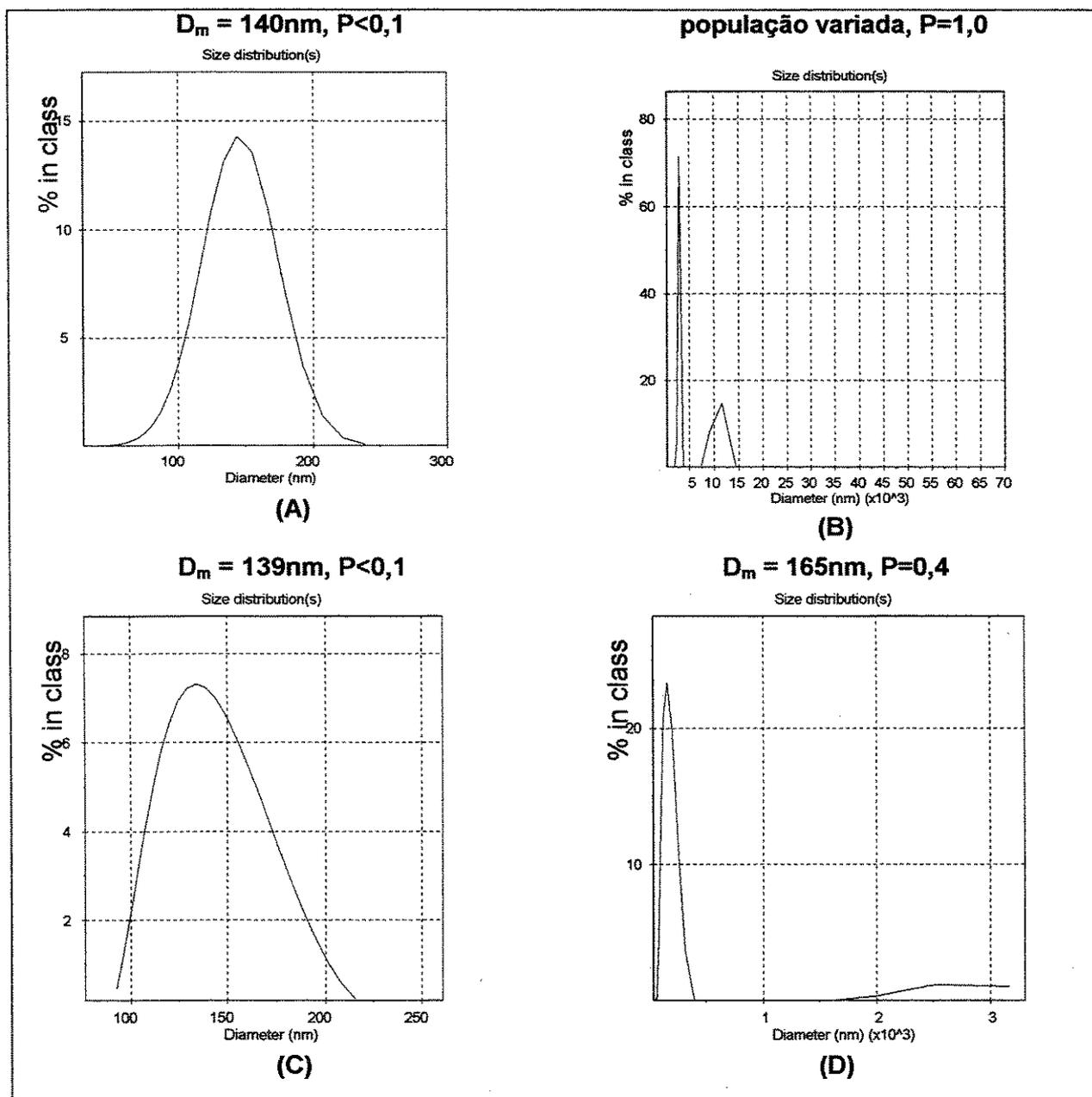
(B)

**Figura 13** – Comportamento osmótico de lipossomas unilamelares convencionais hidratados (A) e reidratados (B), demonstrando a barreira da membrana lipossomal.

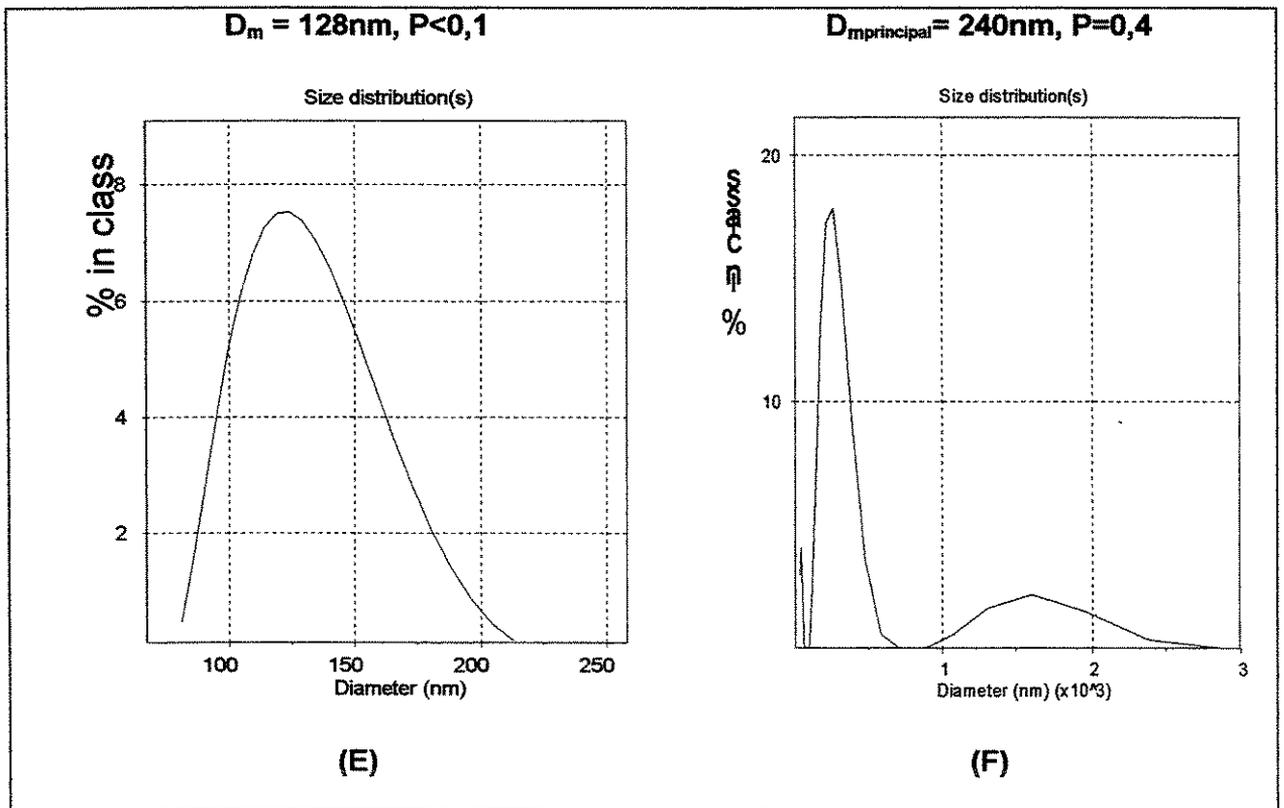
### 5.2.2.1.3 - Raio Hidrodinâmico

Os resultados mostram que o diâmetro médio das vesículas foi próximo ao diâmetro dos poros das membranas (100nm), usados na extrusão. O diâmetro médio das vesículas antes da liofilização foi de  $130 \pm 10$ nm. A distribuição de tamanhos permaneceu entre 100 e 300nm. Após a liofilização, o diâmetro médio da população principal e a distribuição de tamanhos aumentou em média 30-

40nm, exceto para os lipossomas liofilizados sem trealose, que o diâmetro aumentou significativamente para valores acima de 2000nm. Nas Figuras 14 e 15 são ilustrados os gráficos de distribuição de tamanhos para lipossomas antes e após a liofilização, na presença ou ausência de trealose.



**Figura 14** – Polidispersidades e distribuição de tamanhos de lipossomas unilamelares vazios antes (A) e depois (B) da liofilização sem trealose, antes (C) e depois (D) com trealose.



**Figura 15** – Polidispersidades e distribuição de tamanhos de lipossomas furtivos (5% mol PEG2000) vazios antes (E) e depois da liofilização (F) com trealose .

A análise da distribuição populacional mostrou que os lipossomas antes da liofilização apresentaram valores de polidispersidade menores que 0,1. Lipossomas reconstituídos na presença de trealose apresentam polidispersidade entre 0,2-0,4. Em todas as medidas, os valores de confiabilidade foram maiores que 96%. Lipossomas reconstituídos na ausência de trealose, apresentaram polidispersidade de 1,0, indicando a heterogeneidade das partículas em suspensão.

Vários experimentos foram realizados, obtendo-se boa reprodutibilidade dos resultados. Em geral, as vesículas retornam ao tamanho original depois da liofilização. A reconstituição porém não foi de 100%, com a presença de uma população de tamanho muito maior que o original (4-5% convencionais e 14-15% furtivo), resultante da fusão. A eficiência na reconstituição de lipossomas, convencionais e furtivos, é atribuída a presença do crioprotetor, neste caso a

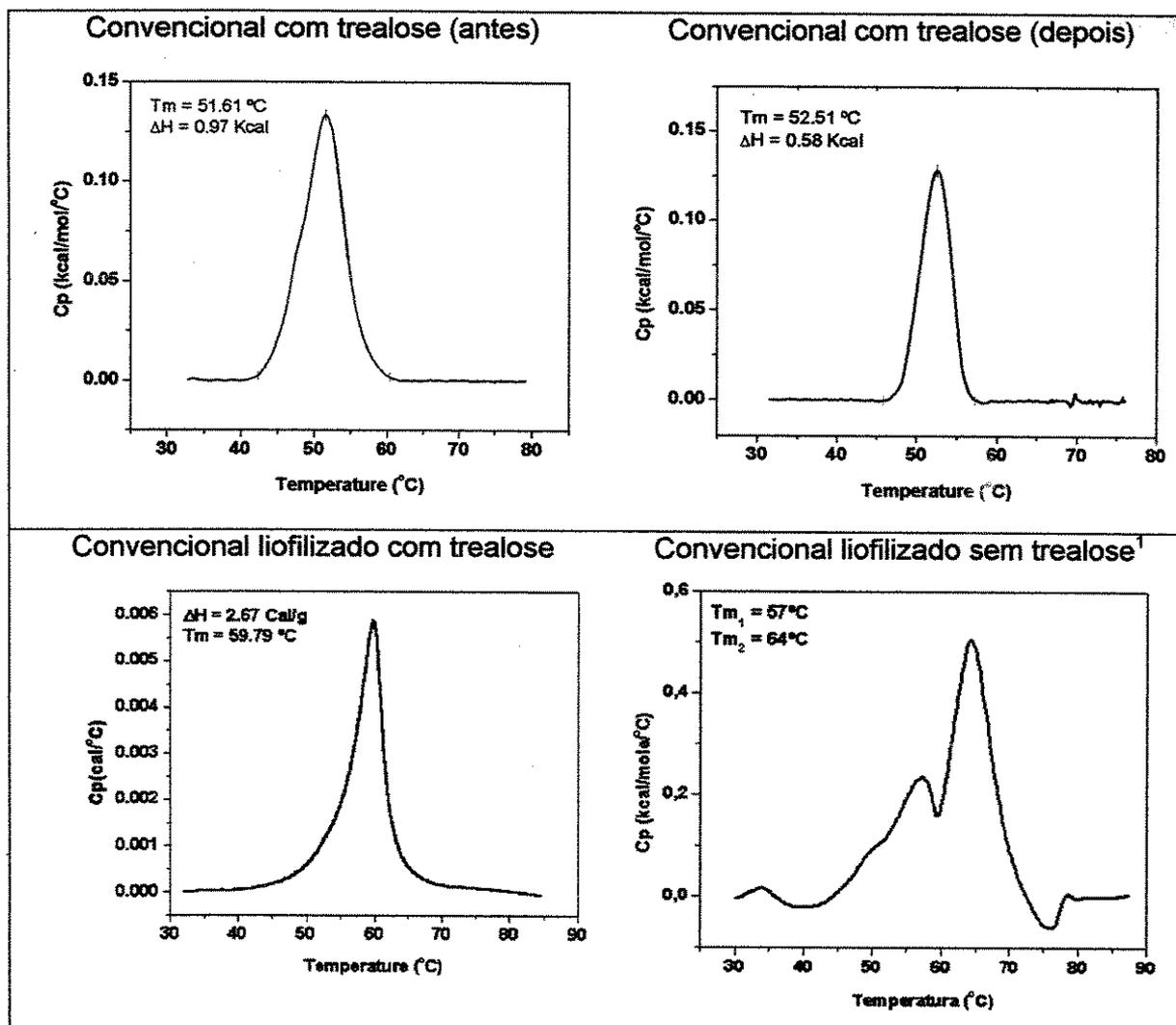
trealose, que impede fusão das vesículas durante o processo de secagem e rehidratação. Essa eficiência está também relacionada a razão mássica lipídio total:trealose usada, 1:4 e 1:8, para os lipossomas convencionais e furtivos, respectivamente.

#### 5.2.2.1.4 - Transição de Fases

A transição de fases está relacionada com as interações hidrofóbicas existentes entre as cadeias de hidrocarbonetos das moléculas fosfolipídicas. Quanto mais próximas essas moléculas estiverem, maior será a força que as une (interações hidrofóbicas) e maior energia será requerida para romper essas interações, favorecendo uma mudança conformacional destas cadeias de all-trans (fase gel) para trans-gauche (líquido-cristalino).

A análise das curvas obtidas por microcalorimetria exploratória de varredura (DSC) de lipossomas unilamelares convencionais, constituídos de Epikuron/colesterol (8:1 m/m) e trealose (lipídio/trealose 1:4 m/m), revelou a presença de uma transição endotérmica antes e depois da liofilização, como mostrado na Figura 16.

A área sob a curva representa a energia fornecida ao sistema para haver transição de fases endotérmica. Observa-se uma maior área sob a curva para os lipossomas convencionais antes da liofilização, enquanto que a temperatura de transição mostra-se praticamente igual, tanto para lipossomas antes, como depois da liofilização. Esses resultados indicam que após a liofilização, os lipossomas convencionais não apresentaram a mesma organização molecular, ou seja, suas moléculas não se mantiveram no mesmo arranjo estrutural ordenado original (antes da liofilização). Isso pode ser comprovado pelos valores de entalpia gastos para ocorrer à transição de fases de lipossomas convencionais antes e depois da liofilização. A etapa de congelamento na presença de trealose deve perturbar o empacotamento das moléculas, deixando-as mais distantes uma das outras, logo menos energia torna-se necessário para romper as interações hidrofóbicas entre as moléculas de fosfolipídio.



**Figura 16** – Curvas de DSC obtidas através de microcalorimetria exploratória diferencial (microDSC) de lipossomas convencionais na presença e ausência (controle) de trealose. A razão mássica lipídio/trealose para os lipossomas convencionais foi de 1:4.

Para os lipossomas convencionais, observa-se também um aumento da temperatura de transição das amostras liofilizadas em relação à formulação líquida. No primeiro caso, a ausência de água resulta em um decréscimo da área ocupada pela cabeça polar, favorecendo um aumento na densidade de empacotamento das cadeias apolares e conseqüentemente nas interações do tipo van der Waals. Essas mudanças refletem-se no aumento da temperatura na qual

<sup>1</sup> A amostra não foi tratada pelo software. Assim, não são fornecidos dados de entalpia.

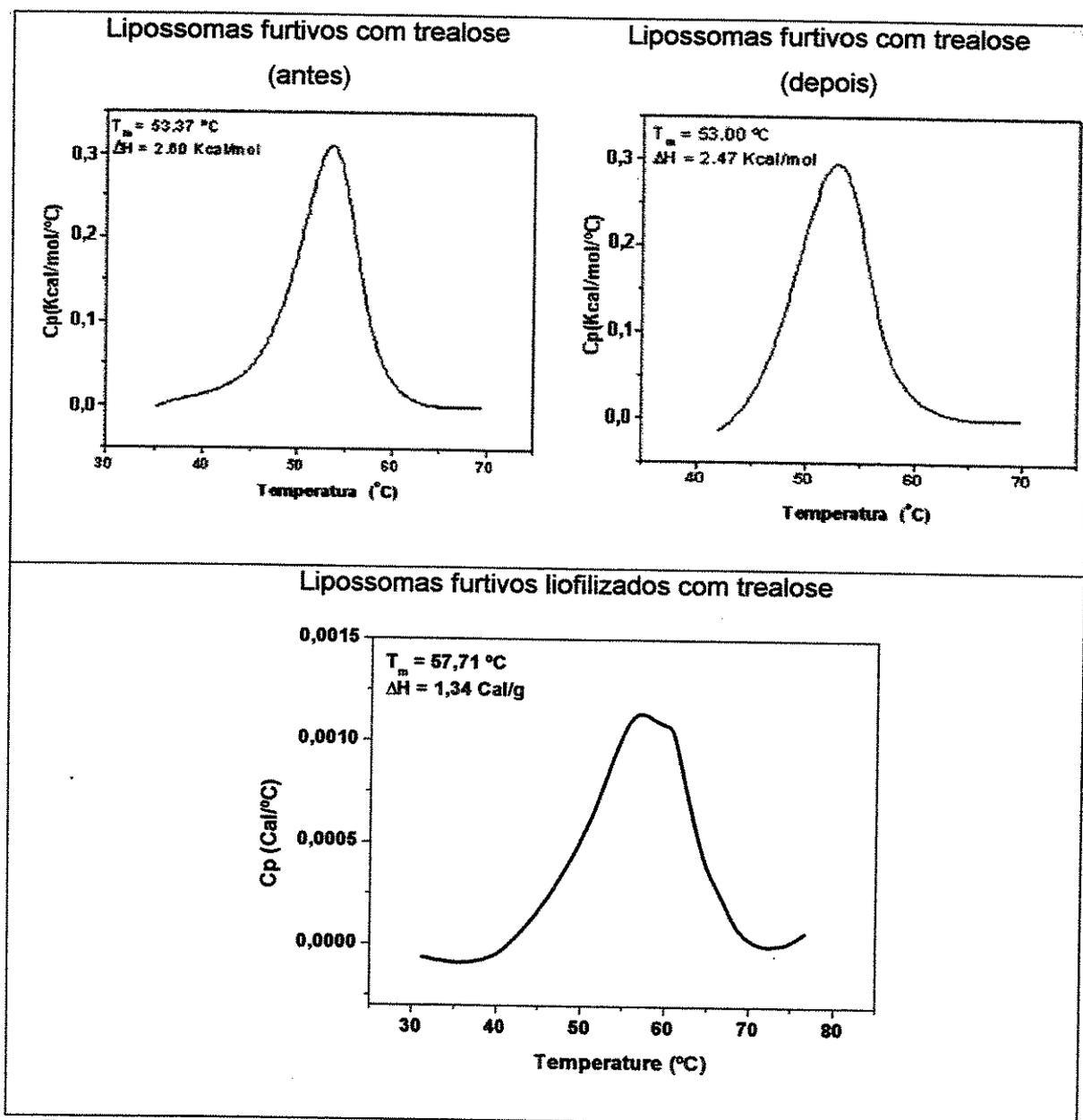
a transição da fase gel a líquido cristalino ocorre. Tal fato pode ser comprovado através da temperatura de transição de fases dos lipossomas convencionais liofilizados sem trealose ( $T_{m1}$  57°C e  $T_{m2}$  64°C). A presença do primeiro pico encontrado para os lipossomas convencionais sem trealose pode ser atribuída a uma acomodação inicial da estrutura, similar a uma pré-transição, ou mesmo a mistura de componentes presentes na amostra de fosfolípido original (Epikuron).

No entanto, lipossomas convencionais liofilizados na presença de trealose parecem apresentar maior distância entre as cabeças polares, menores interações do tipo van der Waals entre as caudas apolares, favorecendo um decréscimo na temperatura de transição de fases. A temperatura de transição de fases dos lipossomas convencionais liofilizados com trealose foi 59°C.

Como a trealose substitui as moléculas de água, a formulação lipossomal liofilizada parece estar hidratada e na fase líquido cristalino a temperaturas que normalmente estariam na fase gel. Nossos resultados são similares aos resultados encontrados por Crowe e colaboradores em estudos semelhantes com DPPC e POPC:PS (Crowe et al., 1985; Crowe et al, 1988).

Como observado nas análises de QELS, a reconstituição dos lipossomas ao tamanho original não é 100%, comprovado pelos termogramas, na qual se vê uma temperatura de transição dos lipossomas liofilizados maior que a dos lipossomas hidratados. Se a eficiência da trealose fosse 100%, impedindo fusão e agregação, o tamanho dos lipossomas reconstituídos seriam iguais aos originais e a temperatura de transição dos lipossomas liofilizados seria igual ou menor as dos lipossomas hidratados.

Na Figura 17 são mostradas as curvas de transição de fases para os lipossomas furtivos constituídos de Epikuron/colesterol/DSPE-PEG-2000(7,8:1:1,8 m/m/m) e trealose (lipídio/trealose 1:4 m/m). Foram analisadas preparações líquidas e seu correspondente na forma liofilizada.



**Figura 17** – Curvas de DSC obtidas através de microcalorimetria exploratória diferencial (microDSC) de lipossomas furtivos na presença de trealose. A razão mássica lipídio/trealose para os lipossomas furtivos foi de 1:8.

Os lipossomas furtivos apresentaram resultados semelhantes aos lipossomas convencionais. A temperatura de transição de fases dos lipossomas hidratados foi semelhante a dos lipossomas rehidratados e a temperatura de

transição dos lipossomas liofilizados foi maior em relação aos lipossomas hidratados.

Comparando os lipossomas convencionais e furtivos, observa-se que a temperatura de transição de fases dos lipossomas furtivos hidratados e rehidratados foi maior que a temperatura de transição dos lipossomas convencionais. O aumento na temperatura pode ser atribuído ao balanço de forças existentes entre a cadeia do polímero (5% mol PEG) na superfície dos lipossomas e as interações hidrofóbicas. Sabe-se da literatura que as forças eletrostáticas existentes na superfície lipossomal contribuem com o aumento da temperatura de transição de fases dos lipossomas (Warren, 1987). No entanto, a temperatura de transição de fases dos lipossomas furtivos liofilizados (57,71°C) foi menor que a temperatura dos lipossomas convencionais (59,79°C). A explicação para tal fato pode estar relacionada a quantidade de trealose presente na formulação de lipossomas furtivos, que é cerca de 2,3 vezes maior (em massa) que a encontrada na preparação de lipossomas convencionais. Segundo Crowe e colaboradores (1985, 1986, 1988) a temperatura de transição de fases dos lipossomas liofilizados decresce à medida que se aumenta a quantidade de trealose na formulação.

#### 5.2.2.1.5 - Interação Trealose/Fosfolipídios

Com o objetivo de comprovar a interação da trealose com o grupo fosfato dos lipossomas, realizaram-se análises através de espectroscopia de infravermelho. Os espectros encontram-se disponíveis no anexo II. A relação mássica lipídio:trealose nos lipossomas convencionais é de 1:4 e nos lipossomas furtivos é de 1:8.

Nos espectros, as bandas correspondentes aos grupos OH disponíveis da molécula de trealose (trealose pura) estão numa frequência de 1241, 1355 e 1457 $\text{cm}^{-1}$ . A banda correspondente ao grupamento fosfato da cabeça polar está localizada numa frequência de 1236 $\text{cm}^{-1}$ . Quando a trealose está presente na preparação lipossomal liofilizada, percebe-se que as bandas referentes a deformação do grupo OH da molécula de açúcar sofre um deslocamento e

decréscimo na intensidade. Este deslocamento e redução de intensidade sugerem uma interação entre os grupos OH da molécula de trealose e o grupo fosfato da molécula de fosfolípido. A Tabela 11 mostra as diferenças ocorridas entre as amostras e os espectros de infravermelho obtidos.

**Tabela 11** – Frequências das bandas do grupo OH da molécula de trealose e do grupo fosfato dos fosfolípidos em diferentes amostras.

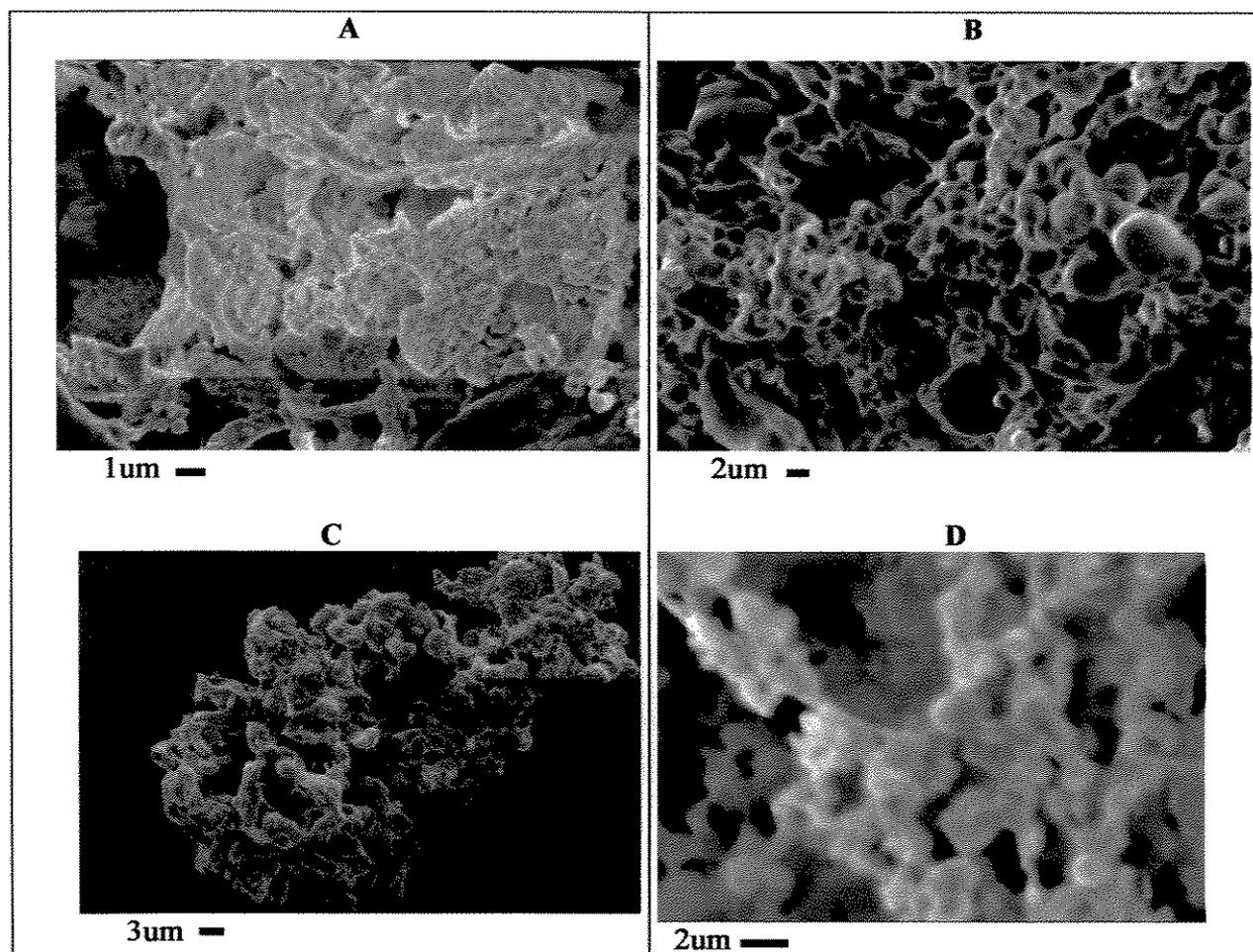
Amostras	Intensidade			
	OH <sub>1</sub>	OH <sub>2</sub>	OH <sub>3</sub>	P=O
Trealose pura	0,4674	0,4878	0,5293	-
Lipossomas sem trealose	-	-	-	0,2750
Lipossomas convencional com trealose	0,3306	0,2983	0,3338	ND
Lipossomas Furtivos com trealose	0,3707	ND	0,3867	ND

ND: não detectável; pico tão baixo que não foi identificado.

Destes resultados, pode-se concluir que os grupos OHs da trealose interagem com o grupo fosfato da molécula de fosfolípido. Resultados semelhantes são apresentados nos trabalhos de Crowe (1987) e Disalvo (2000).

#### 5.2.2.1.6 - Morfologia

A forma e características de superfície dos lipossomas convencionais e furtivos vazios e liofilizados são apresentadas nas fotomicrografias obtidas através de microscopia eletrônica de varredura da Figura. 18.



**Figura 18** – Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura de lipossomas convencionais liofilizados na ausência (A) e presença de trealose (B) e lipossomas furtivos liofilizados sem (C) e com trealose (D).

Através das fotomicrografias apresentadas, pode-se observar que os lipossomas convencionais liofilizados, preparados com trealose, formaram estruturas esféricas de aproximadamente 2 a 3  $\mu\text{m}$  em sua maioria. Quando preparados sem trealose e liofilizados, apresentaram estrutura mais agregada de esferas menos definidas. Provavelmente, a presença da trealose melhora a estruturação do pó, tomando-o menos agregado, facilitando a visualização.

Os lipossomas furtivos sem e com trealose apresentaram estruturação semelhantes. No entanto, nesse caso, não foi possível obter boas fotomicrografias na presença de trealose devido à grande instabilidade da amostra diante do feixe de luz durante a análise.

Vale salientar que o pó de lipossomas convencionais e furtivos (5% mol PEG<sup>2000</sup>) liofilizados apresentou aspecto levemente gorduroso e alta higroscopicidade. Sabe-se que o estado físico da trealose influencia a propriedade de hidratação das partículas secas para a produção de lipossomas e incorporação de ativos. Assim, a presença da trealose na formulação liofilizada facilita consideravelmente a sua reconstituição (fácil rehidratação).

#### 5.2.2.1.7 - Cristalinidade

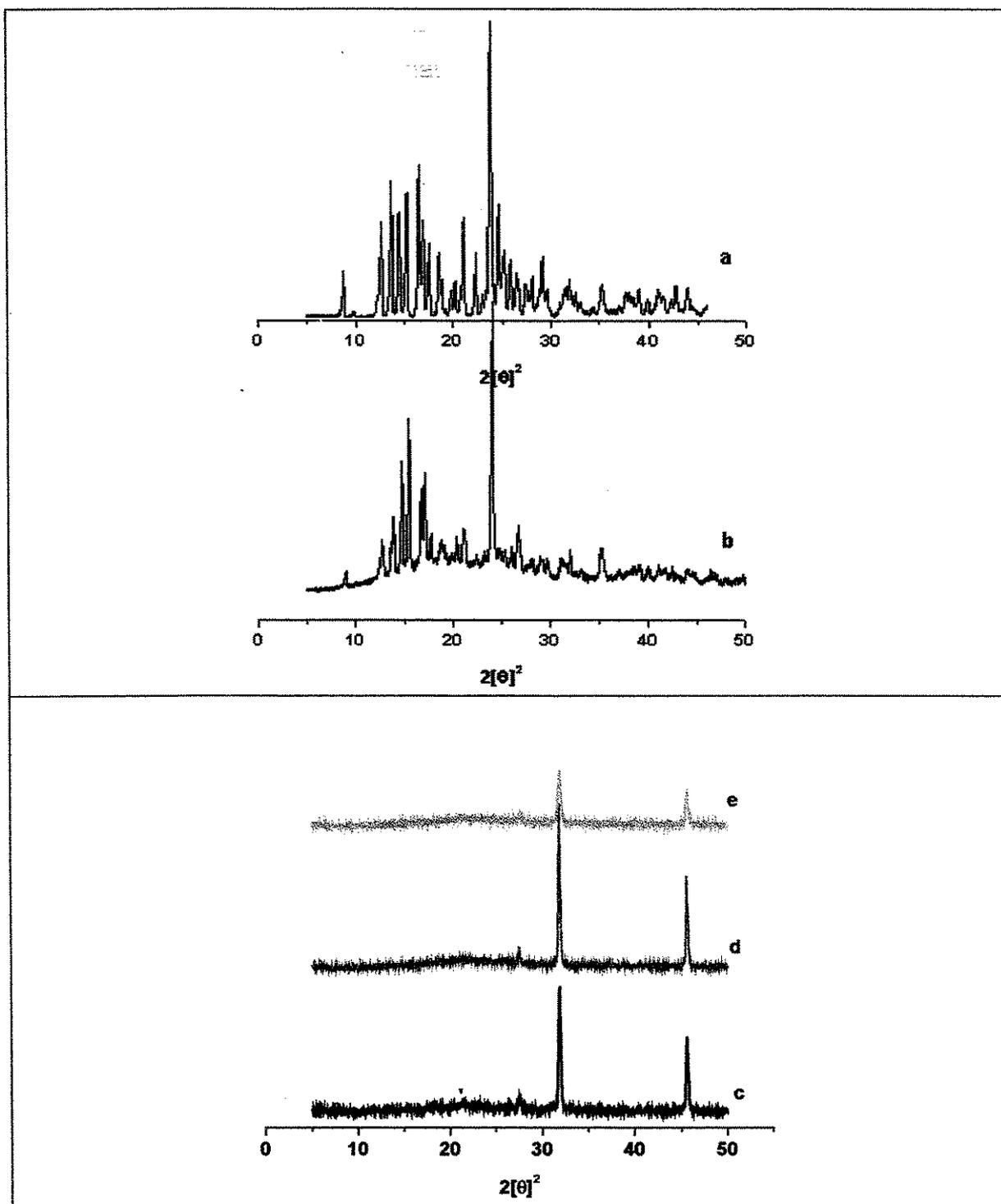
Na Figura 19 são mostrados os espectros de raios-X obtidos da trealose pura e das amostras lipossomais.

Através dos difratogramas, pode-se observar que as amostras de lipossomas convencionais e furtivos não apresentaram picos característicos, sugerindo caráter amorfo para as preparações. Vale salientar que os picos observados nos espectros das amostras lipossomais são correspondentes a estrutura cristalina do NaCl presente no tampão PBS (10mM-fosfato, 120mM NaCl).

Outra informação importante é que a ausência dos picos característicos da trealose na preparação dos lipossomas liofilizados, indica a total incorporação ou interação deste açúcar com os lipossomas secos. Tal fato pode ser comprovado, comparando a amostra liofilizada de lipossomas convencionais sem trealose e com trealose.

A trealose comercial processada (liofilizada) apresentou um menor grau de cristalinidade comparado a trealose comercial. Este estudo confirma os resultados previamente relatados na literatura que o processo de liofilização na presença de açúcares contribui para a produção de estruturas amorfas (Cortes e Caekenberghe, 1997; Ortiz, 2002).

É importante citar que estruturas amorfas liofilizadas interagem mais facilmente com a água, favorecendo sua dispersão (fácil rehidratação), no entanto, requer condições de estocagem livre de umidade para alcançar maior estabilidade de prateleira.



**Figura 19** – Espectros de difratometria de raios-X obtidos de diferentes amostras: (a) trealose comercial (b) trealose comercial processada (liofilizada); lipossomas convencionais reconstituídos (DRVs) (c) sem trealose, (d) com trealose; (e) lipossomas furtivos reconstituídos (DRVs) com trealose. A matriz lipídica dos lipossomas foi composta de Epikuron:colesterol (razão mássica 8:1).

### 5.2.2.1.8 – Estabilidade física dos lipossomas durante estocagem

Os lipossomas rehidratados, convencionais e furtivos, apresentaram boa estabilidade física quando estocados a 4°C. A estabilidade foi monitorada através da análise do diâmetro dos lipossomas ao longo do tempo, como mostrado na Tabela 12.

**Tabela 12 – Diâmetros das populações principais presentes durante o período de estocagem a 4°C dos lipossomas convencionais e furtivos rehidratados.**

Tempo (dias)	Estado de estocagem	Lipossomas Convencionais	Lipossomas Furtivos
0 : antes da liofilização	-	$D_h : 139\text{nm}^{100\%}$	$D_h : 137\text{nm}^{100\%}$
0 : depois da liofilização	-	$D_h : 167\text{nm}^{93\%}$	$D_h : 240\text{nm}^{77\%}$
13	Líquido	$D_h : 182\text{nm}^{93\%}$	$D_h : 248\text{nm}^{86\%}$
30	Líquido	$D_h : 173\text{nm}^{95\%}$	$D_h : 269\text{nm}^{90\%}$
50	Líquido	$D_h : 182\text{nm}^{96\%}$	$D_h : 252\text{nm}^{90\%}$
100	Líquido	$D_h : 137\text{nm}^{71\%}$ e $323\text{nm}^{24\%}$	$D_h : 236\text{nm}^{96\%}$
180	Líquido	-	$D_h : 308\text{nm}^{95\%}$
180	Liofilizado	$D_h : 147\text{nm}^{84\%}$ , $40\text{nm}^{7\%}$ , $1122\text{nm}^{5\%}$ e $6200\text{nm}^{4\%}$	$D_h : 164\text{nm}^{87\%}$ , $1100\text{nm}^{10\%}$ e $5600\text{nm}^{3\%}$

\* $D_h$ : diâmetros das principais populações, que estão mostradas em percentagem.

Observa-se que os lipossomas rehidratados mostraram-se bastante estáveis até 3 meses, não apresentando alteração significativa no diâmetro. Observa-se também que os lipossomas furtivos foram mais estáveis que os convencionais, provavelmente devido à presença do PEG na superfície.

Os lipossomas convencionais liofilizados foram rehidratados após 6 meses de estocagem a 4°C e apresentaram diâmetro principal (147nm) semelhante ao pó lipossomal recém liofilizado (167nm). No entanto, a porcentagem da população principal foi menor (84% versus 93%). Os lipossomas furtivos rehidratados após 6

meses apresentaram uma diferença de 1,6 vezes no seu diâmetro principal (164nm versus 262nm das vesículas recém preparadas). Melhores condições de estocagem e o uso de septo especial de vedação podem melhorar significativamente a estabilidade física dos lipossomas.

Os relatórios da análise de tamanho encontram-se em anexo III. Portanto, pode-se concluir que os lipossomas estocados na forma liofilizada, rehidratados após seis meses, apresentaram maior estabilidade física que os lipossomas rehidratados estocados na forma líquida.

A estocagem de lipossomas na forma liofilizada constitui uma alternativa importante para aumentar a estabilidade das formulações, uma vez que na forma líquida os lipossomas são mais susceptíveis a agregação, fusão e contaminação.

#### 5.2.2.2 - Lipossomas contendo Proteínas Alergênicas

##### 5.2.2.2.1 – Eficiência de Encapsulação

Realizou-se um estudo da eficiência de encapsulação de proteínas do extrato alergênico em lipossomas convencionais, fixando a sua concentração (1,32mg/mL) e variando a concentração lipídica. A Tabela 13 mostra a eficiência de encapsulação obtida para os lipossomas convencionais em função da concentração de lipídio. A Tabela 15 mostra a eficiência de encapsulação para os lipossomas furtivos em função da concentração de PEG.

**Tabela 13 – Eficiência de encapsulação de proteínas alergênicas em função da concentração de lipídios. Em todas as preparações a razão mássica Epikuron/colesterol foi 8:1 e lipídio:trealose 1:4.**

<b>Composição Lipídica</b>	<b>Razão (D/L)<sub>i</sub></b>	<b>Eficiência de Encapsulação</b>
Epikuron/colesterol (8:1) (33 mg/4 mg)	0,1611	82%
Epikuron/colesterol (8:1) (80 mg/10 mg)	0,0730	80%
Epikuron/colesterol (8:1) (120 mg/15 mg)	0,0490	78%
Epikuron/colesterol (8:1) (160 mg/20 mg)	0,0370	70%
Epikuron/colesterol (8:1) (200 mg/25 mg)	0,0266	89%

(D/L)<sub>i</sub>: razão mássica proteína/lipídio inicial

$$EE(\%) = \frac{\text{massa proteína encapsulada}}{\text{massa proteína total adicionada}} \times 100$$

Observa-se que em todas as situações, a eficiência de encapsulação foi independente da concentração de lipídio total usada.

**Tabela 14 – Eficiência de encapsulação de proteínas alergênicas em lipossomas do tipo furtivos com diferentes razões molares de PEG<sup>2000</sup>.**

<b>Lipossomas Furtivos ou Stealth®</b>	<b>Eficiência de encapsulação (EE (%))</b>
Furtivos (PEG <sup>2000</sup> – 2,5%)	41,6
Furtivos (PEG <sup>2000</sup> - 5,0%)	38,7
Furtivos (PEG <sup>2000</sup> – 10,0%)	35,5

$$EE(\%) = \frac{\text{massa proteína encapsulada}}{\text{massa proteína total adicionada}} \times 100$$

Observa-se que os lipossomas furtivos apresentaram eficiências de encapsulação em torno de 50% dos valores obtidos para os convencionais (80%), devido à resistência oferecida pelas cadeias de PEG<sup>2000</sup> a encapsulação.

Para a ovoalbumina, os resultados mostraram que a eficiência de encapsulação da proteína modelo em lipossomas convencionais foi de aproximadamente 45% ou  $0,625 \pm 0,20$  mg OVA/mg lipídio. Para os lipossomas furtivos, a eficiência de encapsulação foi de 39% ou  $0,49 \pm 0,09$  mg OVA/mg lipídio.

#### 5.2.2.2.2 – Liberação *in vitro* das proteínas

O ensaio de liberação da ovoalbumina em lipossomas convencionais e furtivos foi monitorado durante 24h. No período analisado não foi observada qualquer liberação dessa proteína nas alíquotas analisadas da solução.

Esse resultado mostra que a proteína apresenta uma grande dificuldade de transpor a bicamada lipídica e solubilizar-se no meio. Essa dificuldade pode ser devida a interações com a bicamada as quais necessitam de caracterização adequada para identificá-las.

Minato et al. (2003) também relatam que a ovoalbumina não foi liberada de lipossomas multilamelares compostos por DSPC e colesterol (razão molar 10:5) em meio ácido (pH 2.0). A liberação parcial (<20%) de ovoalbumina dos lipossomas somente foi observada quando foi introduzido 10mM de taurocolato de sódio no tampão, evidenciando assim a dificuldade dessa proteína em transpor a bicamada lipídica original. É interessante notar que esses pesquisadores observaram que a liberação de ovoalbumina foi maior em lipossomas furtivos (20%) quando comparado aos lipossomas convencionais (<10%).

Assim, pode-se sugerir que o mecanismo de liberação da ovoalbumina somente ocorre quando as vesículas são desestruturadas ou desestabilizadas em solução. Resultado semelhante foi observado para as proteínas alergênicas do extrato fúngico.

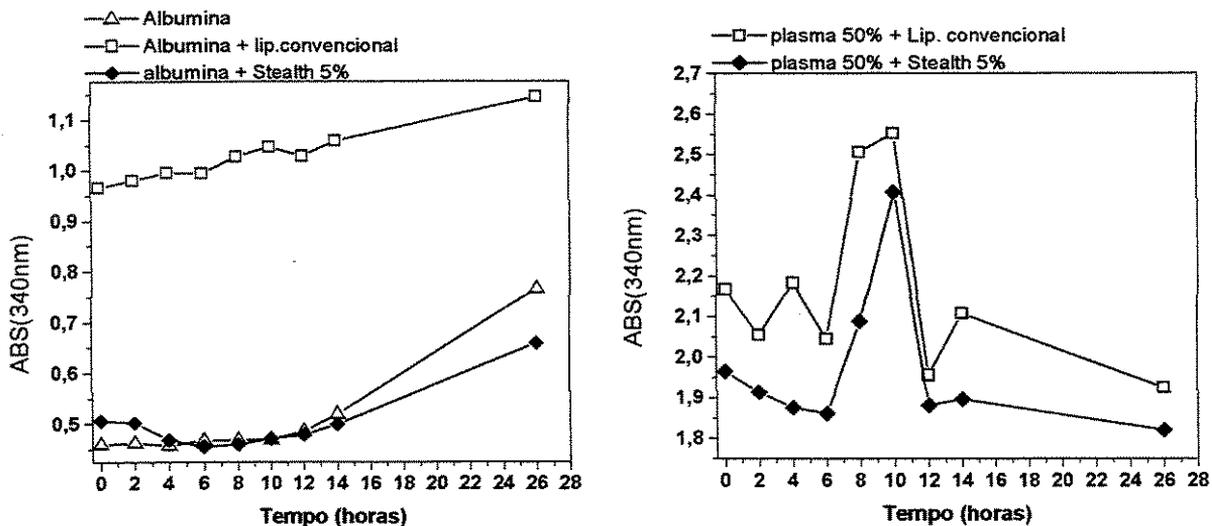
### 5.2.2.2.3 – Estabilidade em Plasma

#### - Lipossomas encapsulando proteínas alergênicas

A integridade dos lipossomas incubados em plasma humano ou em solução de albumina humana foi analisada através de medidas de espalhamento de luz, e os dados interpretados com base no perfil típico de desestabilização de lipossomas em presença de tensoativos. Para uma mesma concentração de lipossomas em solução, o espalhamento de luz a um comprimento de onda pré-determinado é diretamente proporcional ao tamanho das partículas coloidais presentes no meio. Assim, o aumento da turbidez do meio indica o crescimento das vesículas seguido de fusão e a sua redução indica a presença de estruturas micelares menores, decorrentes da sua desestruturação (Edwards e Almgren, 1990; 1992; Lichtenberg, 1985; Lichtenberg et al., 1983). Os resultados obtidos são mostrados na Figura 20.

Os resultados experimentais mostram que não houve aumento significativo no espalhamento de luz (0,1 Unidades Arbitrárias) das soluções contendo os lipossomas convencionais e furtivos com extrato alergênico incubados em solução de albumina humana. Portanto, pode-se considerar que esses lipossomas são bastante estáveis na presença de albumina humana (concentração sérica), não apresentando qualquer desestruturação em 26 horas de incubação. A albumina humana foi escolhida para o teste de desestabilização, porque é a proteína majoritária encontrada no plasma e esses resultados sugerem que essa proteína não interfere na desestabilização estrutural das vesículas.

Porém, quando os lipossomas foram expostos ao plasma humano (50% v/v), houve aumento expressivo da absorbância indicando o crescimento e fusão das vesículas na faixa de 8-10h horas, seguido de desestruturação, evidenciada pelo abaixamento drástico da absorbância das soluções. Pode-se observar apenas uma pequena diferença entre os lipossomas furtivos e convencionais, onde os convencionais apresentaram-se íntegros até 8h, enquanto os furtivos mantiveram sua estrutura até 10h.



**Figura 20** – Estabilidade de lipossomas unilamelares (~5mM) em albumina humana (40mg/mL) (esquerda) e plasma humano (direita), a 37°C, na proporção de 1:5, respectivamente. Os lipossomas foram constituídos de Epikuron/colesterol (8:1 m/m) com e sem DSPE-PEG<sup>2000</sup> (5% mol). Todas as preparações continham trealose numa razão mássica lipídio/trealose 1:4 (convencional) ou 1:8 (furtivos) e extrato alergênico.

Esses resultados confirmam estudos da literatura, onde os lipossomas convencionais são facilmente desestabilizados quando entram em contato com os componentes plasmáticos e nem sempre se tem maior estabilidade para os lipossomas contendo PEG (Schneider et al., 1996).

A literatura relata que lipossomas furtivos apresentam maior tempo de circulação *in vivo* (circulação prolongada) quando comparado aos convencionais, devido a sua estabilidade estrutural (Lasic e Martin, 1995; Srinath, 1994; Lasic e Woodle, 1992). Os mecanismos de aumento dessa estabilidade se devem à presença do PEG nas membranas, conferindo à sua superfície uma camada altamente hidratada capaz de repelir os componentes do sangue (Lasic e Martin, 1995). No entanto, em recente trabalho, Moghimi e Szebeni (2003) sugerem que a circulação prolongada de lipossomas furtivos pode não estar relacionada à adsorção de proteínas ou repulsão estérica imposta pelas cadeias de PEG entre

vesículas e componentes plasmáticos. Os autores relatam também que houve adsorção significativa das proteínas plasmáticas nos lipossomas furtivos.

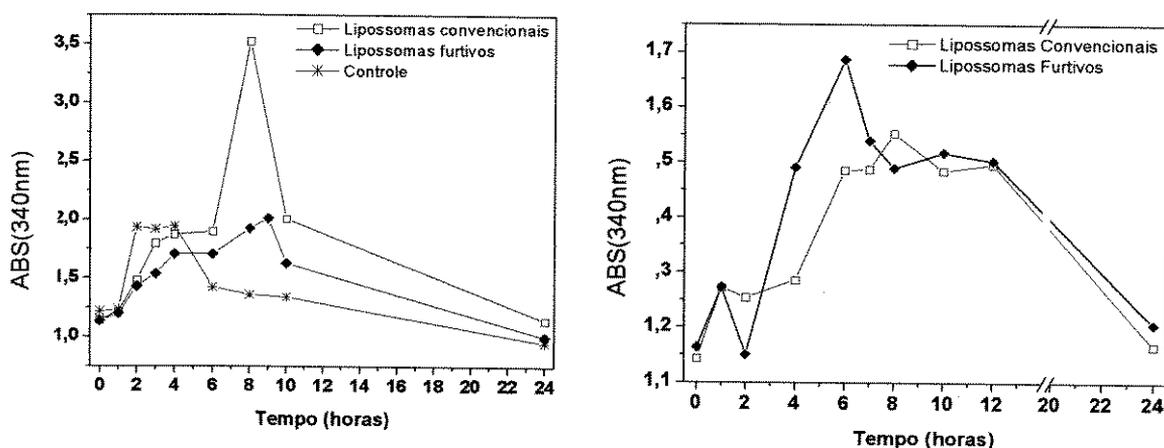
Em outro trabalho, Schneider et al. (1996) mostraram também que lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja, colesterol, fosfatidilglicerol de soja e DSPE-PEG<sup>2000</sup> (5% mol) apresentavam baixa estabilidade em plasma. Em 4 horas, 70% do seu conteúdo encapsulado vazou. A variação molar de DSPE-PEG<sup>2000</sup> incorporado nas vesículas não melhorou a estabilidade, sendo igual aos lipossomas convencionais quando 1% mol de PEG foi usado e pior quando 10% mol PEG foi incorporado.

Baseado nos trabalhos da literatura, conclui-se que a integridade de vesículas furtivas diante dos componentes plasmáticos depende do tipo de lipídio, fração molar de cada componente e das proteínas adsorvidas que podem favorecer a desestabilização estrutural (rompimento ou agregação) das vesículas.

#### - Lipossomas encapsulando OVA

A estabilidade em plasma dos lipossomas encapsulando ovoalbumina também foi investigada. Os resultados são mostrados na Figura 21.

Embora com estabilidades semelhantes, pequenas diferenças podem ser observadas, tais como: os lipossomas furtivos hidratados mantiveram-se íntegros até 9 horas quando expostos ao plasma 80%, enquanto os lipossomas convencionais apresentaram-se menos estáveis, rompendo em 8h de exposição. Comportamento oposto foi observado para os lipossomas rehidratados. Os lipossomas convencionais rehidratados foram mais estáveis que os lipossomas furtivos que se desestruturaram em 6 horas de exposição ao plasma 80% (v/v). As diferenças observadas podem ser explicadas ou pela mudança no empacotamento da bicamada após o processo de liofilização ou pela mudança na interação da proteína com lipossomas furtivos rehidratados.

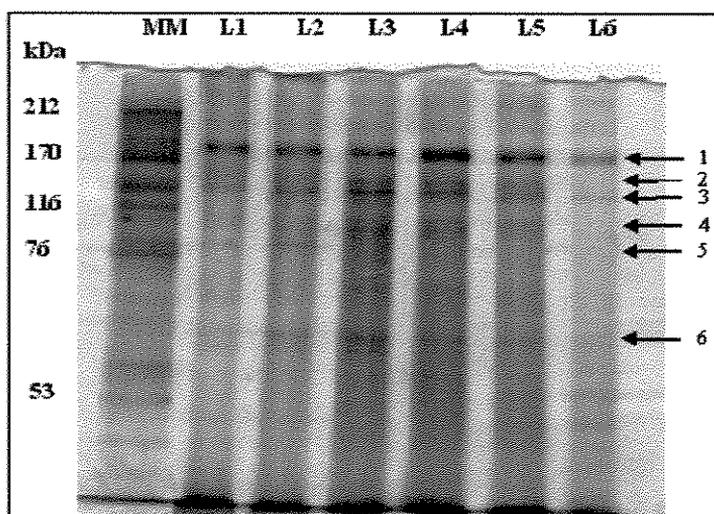


**Figura 21** - Estabilidade de lipossomas hidratados vazios (esquerda) e rehidratados contendo OVA (direita), a 37°C, em plasma 80% (v/v). A proporção lipossomas:plasma foi de 1:5. Os lipossomas foram constituídos de Epikuron/colesterol (8:1 m/m) com e sem DSPE-PEG2000 (5% mol). Todas as preparações continham trealose numa razão mássica lipídio/trealose 1:4 (convencional) ou 1:8 (furtivos). Controle refere-se à análise com o tempo do plasma somente.

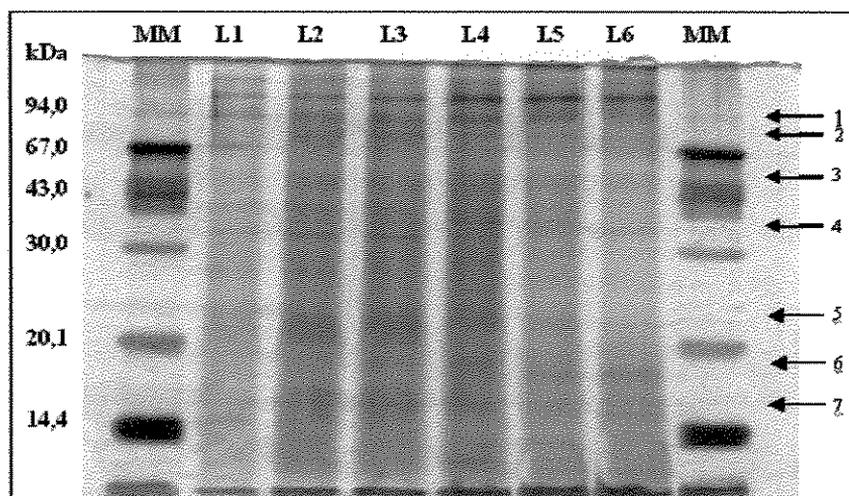
#### 5.2.2.2.4 – Identificação das Proteínas do Extrato Alergênico Encapsuladas

A análise qualitativa das proteínas encapsuladas em lipossomas convencionais foi feita com as amostras de lipossomas previamente rompidos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 22 e 23 .

A gama de proteínas encapsuladas (L1 a L4) nos lipossomas convencionais foi bem semelhante à do extrato alergênico puro e a gama de proteínas livres obtidas das frações de eluição da cromatografia (L5 e L6).



**Figura 22** - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), das proteínas que foram encapsuladas em lipossomas unilamelares (5,3 mM) após rompimento com solvente orgânico. MM representa a raia do marcador de alta massa molar. As raias L1 a L6 referem-se às proteínas das respectivas frações obtidas da cromatografia, onde L2, L3 e L4 estavam encapsuladas em lipossomas e L5 e L6 estavam livres. As setas indicam as bandas das diferentes proteínas presentes no extrato alergênico fúngico.



**Figura 23** - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), das proteínas que foram encapsuladas em lipossomas unilamelares (5,3 mM) após rompimento com solvente orgânico. MM representa a raia do marcador de baixa massa molar. As raias L1 a L6 referem-se as proteínas das respectivas frações obtidas da cromatografia, onde L2, L3 e L4 estavam encapsuladas em lipossomas e L5 e L6 estavam livres. As setas indicam as bandas das diferentes proteínas presentes no extrato alergênico fúngico.

As proteínas encapsuladas, de baixa e alta massa molar, identificadas em eletroforese foram: 15,3, 18,2, 23,7, 39, 50,2, 54,92, 78,2, 94,4, 107,9, 123,4, 156,5 e 179kDa.

Observou-se que apenas a proteína de 65kDa (presente no extrato alergênico) não foi identificada nos lipossomas. Destes resultados, pode-se concluir que praticamente não houve exclusão de proteínas do extrato alergênico em lipossomas unilamelares de aproximadamente 160nm de diâmetro. Alguns trabalhos da literatura reportam que, em geral, as proteínas hidrofílicas de massas molares menores que 100kDa são encapsuladas com maior eficiência em lipossomas unilamelares grandes. Adrian & Huang (1979) realizaram um estudo de encapsulação de uma mistura de proteínas (lisozima,  $\alpha$ -chymotripsinogênio, peroxidase, conalbumina e  $\alpha$ -amilase) com massas molares variando de 14 a 97kDa. Eles comprovaram, através de eletroforese, cromatografia e cálculos teóricos, que todas as proteínas da mistura eram encapsuladas eficientemente em lipossomas unilamelares grandes e multilamelares.

#### 5.2.2.2.5 - Carga superficial

Os resultados de carga superficial determinados através de medidas do potencial zeta para os lipossomas furtivos e convencionais são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14** – Potencial zeta para os lipossomas convencionais e furtivos rehidratados (5% mol - PEG), vazios e com proteínas. meio: tampão PBS, pH 7,2.

Amostra	Potencial zeta (mV)
Lipossomas Furtivos vazios	-15,3 $\pm$ 0,1
Lipossomas Furtivos com proteína alergênica	-38,1 $\pm$ 2,0
Lipossomas convencionais vazios	-17,4 $\pm$ 0,5
Lipossomas convencionais com proteína	-20,3 $\pm$ 0,6

Lipossomas convencionais vazios compostos de fosfatidilcolina natural e colesterol na presença de trealose, a pH 7,2, apresentaram potencial zeta de  $-17,4 \pm 0,5\text{mV}$ . Esses mesmos lipossomas com proteínas encapsuladas, pH 7,2, apresentaram potencial zeta de  $-20,3 \pm 0,6\text{mV}$ . A diferença de potencial entre lipossomas com e sem proteínas na formulação foi de aproximadamente 2mV. Esse resultado indica que a carga superficial dos lipossomas praticamente não foi aumentada quando o extrato alergênico foi adicionado ao meio, ou seja, provavelmente as proteínas presentes no extrato alergênico foram encapsuladas, não aparecendo na superfície dos lipossomas.

No entanto, os lipossomas furtivos vazios e com proteínas encapsuladas, no mesmo pH, apresentaram uma diferença de potencial zeta de 22,8mV. Esse resultado indica que a carga superficial dos lipossomas furtivos foi aumentada quando o extrato alergênico foi adicionado ao meio, ou seja, provavelmente proteínas presentes no extrato alergênico não estão presentes apenas no interior dos lipossomas, mas também adsorvidas na sua superfície, contribuindo para o aumento da carga superficial.

Através da carga superficial dos lipossomas, pode-se ainda afirmar que estes se encontram numa faixa apontada como instável para soluções coloidais, favorecendo agregação e fusão das partículas ao longo do tempo. Somente os lipossomas furtivos com proteínas incorporadas apresentaram estabilidade coloidal com o tempo, pois apresentaram carga inferior a -30mV. Esta análise é útil para prever estabilidade física (agregação ou fusão de lipossomas) na estocagem das formulações lipossomais.

### **5.2.3 – Conclusões sobre Sistemas Lipossomais**

Através dos resultados obtidos sobre o estudo de sistemas lipossomais, pode-se concluir que:

- É factível a preparação de vesículas lipossomais unilamelares desidratadas-rehidratadas estéreis e com diâmetro reprodutível.

- A trealose interage eficientemente com os lipossomas, preservando a estrutura membranar durante o processo de congelamento e impedindo fusão das vesículas durante a etapa de rehidratação.
- Os lipossomas liofilizados são amorfos, sendo facilmente rehidratados.
- Os lipossomas liofilizados após 6 meses de estocagem em geladeira apresentaram diâmetro principal e distribuição de tamanhos semelhante a amostra recém preparada.
- As proteínas alergênicas foram encapsuladas em lipossomas com 80% de eficiência para os convencionais e 39% de eficiência para os furtivos (5mol% PEG).
- Aparentemente não houve exclusão das proteínas contidas no extrato alergênico quando encapsuladas em lipossomas.
- Houve adsorção das proteínas alergênicas na superfície dos lipossomas furtivos, sugerindo que há proteínas encapsuladas e adsorvidas. Tal fato não foi observado para os lipossomas convencionais.
- Os lipossomas convencionais e furtivos com proteínas alergênicas foram estáveis por 10 horas quando incubados com plasma humano 50% (v/v). Não foram observadas diferenças significativas em termos de estabilidade estrutural entre os lipossomas convencionais e furtivos.
- A eficiência de encapsulação da ovoalbumina em sistemas lipossomais foi de 45% para os convencionais e 39% para os furtivos.
- Não foi observada liberação da ovoalbumina dos veículos lipossomais, indicando forte interação da proteína com as vesículas.
- Os lipossomas convencionais e furtivos com ovoalbumina foram estáveis por 6-8 horas quando incubados com plasma humano 80% (v/v). Não foram observadas diferenças significativas em termos de estabilidade estrutural entre os lipossomas convencionais e furtivos.

Os lipossomas apresentam-se como veículos promissores na terapia de alergia para liberação rápida da proteína, promovendo em um primeiro contato do sistema imune com o alérgeno, favorecendo o desencadeamento da resposta imune.

## 5.3 – Microesferas

### 5.3.1 – Influência das variáveis Operacionais no Diâmetro Médio

Os diâmetros médios obtidos para as microesferas nas condições operacionais do planejamento fatorial  $2^3$ , apresentadas no capítulo de Material e Métodos são apresentados na Tabela 15. As variáveis operacionais analisadas foram: concentração de PVA (PVA), agitação da fase aquosa externa (AGIT) e razão fase contínua:fase dispersa (FCFD). A variável resposta foi o diâmetro médio das microesferas. Os resultados mostram uma ampla variação no diâmetro médio das microesferas, na faixa de 4 a 15  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 15** – Diâmetro médio das microesferas produzidas através da técnica de evaporação do solvente – emulsão múltipla (a/o/a). As condições operacionais usadas nos experimentos foram descritas no capítulo de Material e Métodos.

Experimento	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )
1	15,0
2	12,0
3	15,0
4	13,0
5	10,0
6	4,0
7	12,0
8	6,0
9	8,0
10	9,0
11	8,5

Os parâmetros estatísticos calculados: média, efeito, erro puro, erro padrão,, fator de distribuição de probabilidade, p, e interações de primeira ordem são mostrados na Tabela 16.

**Tabela 16-** Valores de média, dos efeitos e das interações de primeira ordem, estimados para o diâmetro médio das microesferas como variável resposta no planejamento fatorial  $2^3$ .

	Efeito	Erro padrão	p
Média	10,22727*	0,1507*	0,0002*
PVA(%)	-4,25000*	0.3535*	0,0068*
FCFD	1,25000	0.3535	0,0715
AGIT (rpm)	-5,75000*	0.3535*	0,0038*
PVA/FCFD	0,25000	0.3535	0,5527
PVA/AGIT	-1,7500*	0.3535*	0,0385*
FCFD/AGIT	0,7500	0.3535	0,1679

\*significativos em nível de confiança de 0,95

"p" é parâmetro estatístico da distribuição de probabilidade t com 2 graus de liberdade.

R2=0,90; Erro puro=0,50

A análise dos resultados foi feita a partir dos efeitos principais e das interações de primeira ordem entre essas variáveis. Os parâmetros assinalados com um asterisco são os significativos a um nível de confiança de 0,95. Nesse nível de confiança, tem-se que o parâmetro estatístico de distribuição de probabilidade t com dois graus de liberdade, p é 0,05, e assim são significativos somente os efeitos e interações que apresentem valores absolutos maiores que  $p=0,05$ . Portanto, pode-se concluir que as variáveis que exercem influencia significativa no diâmetro médio das microesferas são: concentração de PVA e velocidade de agitação.

O gráfico de Pareto na Figura 23 confirma esses resultados. As barras correspondentes à concentração de PVA e velocidade de agitação estendem-se expressivamente à direita do parâmetro de probabilidade  $p=0,05$ , indicando que o aumento na concentração de PVA na fase aquosa externa e agitação da segunda emulsão favorecem a redução do diâmetro das partículas obtidas. Observa-se também uma interação de primeira ordem entre estas duas variáveis: PVA e AGIT.

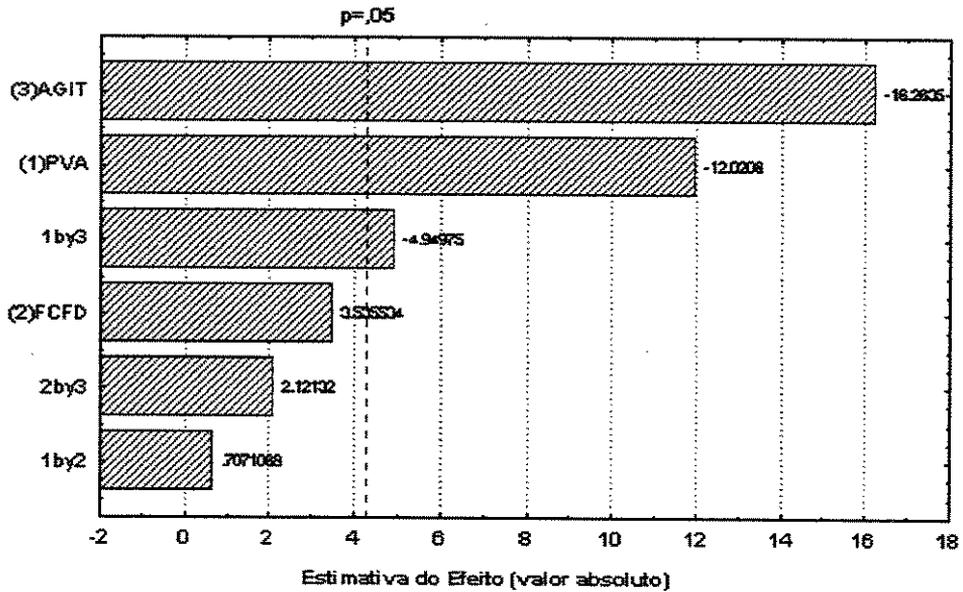


Figura 23: Gráfico de Pareto ao nível de 0,95 de confiança;  $p=0,05$ .

A Tabela 17 apresenta a análise de variância do processo, e a equação (9) o modelo linear proposto para a faixa de processo estudada.

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) da resposta diâmetro das microesferas para o planejamento fatorial  $2^3$ .

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	$F_{CALC}$	$F_{TAB(0,95,3;7)}$ ou $F_{TAB(0,95,5;2)}$
Regressão	112,75	3	37,58	20,34	4,35
Resíduos	12,93	7	1,85		
Falta de ajuste	12,43	5	2,48	9,94	19,3
Erro puro	0,50	2	0,25		
Total	125,68	10			

$R^2 = 0,90$  e  $F_{CALC} / F_{TAB} = 4,68$

$$D = 10,22 - 2,12PVA - 2,90AGIT - 0,87PVA \times AGIT \quad (\text{Eq. 9})$$

A análise estatística da validade de um modelo é baseada nos seguintes critérios: (a) razão entre a média quadrática da falta de ajuste e do erro puro, obtida através da análise de variância, deve ser menor que o respectivo valor tabelado ao nível de 0,95 de confiança e os respectivos graus de liberdade para a falta de ajuste e o erro puro; (b) o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) deve ser alto (máximo 1); (c) a razão entre o  $F_{calc}$  e o  $F_{tab}$  deve ser maior que 4 (Barros Neto et al., 1996). Um modelo é considerado válido quando não há falta de ajuste.

Os resultados da Tabela 17 mostram que a variância explicada do modelo é 90%. Portanto, aplicando os critérios de validade ao modelo proposto observa-se que: (a) o valor tabelado, 19,3, é maior que o valor calculado, 9,9 (b) o valor do coeficiente de determinação, 0,90, é razoavelmente alto e a (c) relação entre o  $F_{calc}$  e o  $F_{tab}$  é 4,67, valor maior que 4. Assim, levando em consideração os critérios de validação do modelo, pode-se concluir que o modelo proposto se ajusta aos dados experimentais na faixa estudada. Tal fato também pode ser observado pelo gráfico da Figura 24 que mostra boa correlação entre os valores previstos pelo modelo e observados experimentalmente.

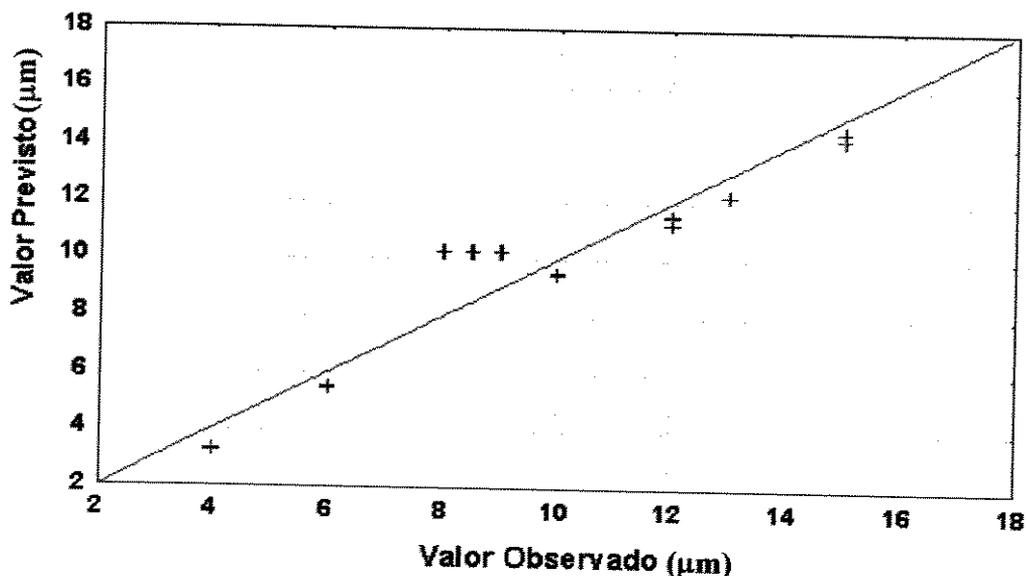
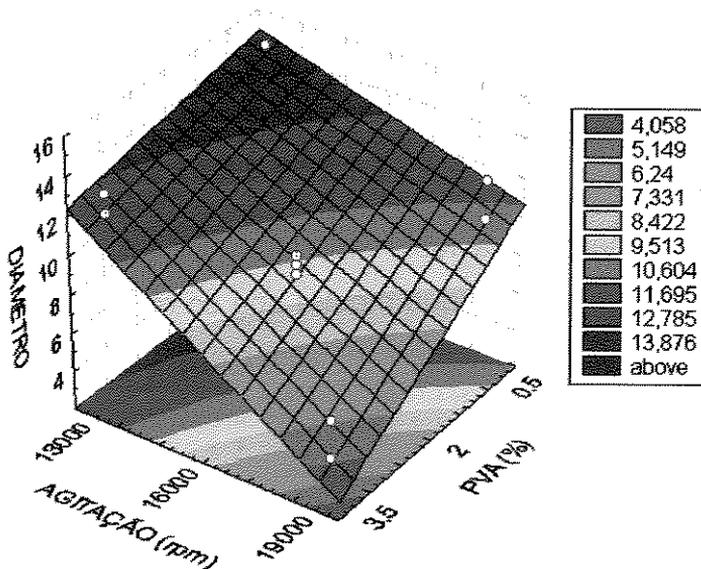


Figura 24 – Valores previstos pelo modelo vs. valores observados experimentalmente para o diâmetro das microesferas em função da agitação e da concentração de PVA na emulsão dupla.

A Figura 25 apresenta a superfície de resposta para o diâmetro das microesferas em função da velocidade de agitação e da concentração de PVA na emulsão dupla. Pode-se observar que o diâmetro diminui com o aumento da agitação e concentração de PVA. A inclinação máxima do modelo proposto, 1,37, calculada através da razão entre o terceiro e o segundo coeficientes da equação (9), indica que para cada unidade avançada no eixo correspondente à variável operacional agitação deve-se avançar 1,37 unidades ao longo do eixo correspondente à variável operacional concentração de PVA.



**Figura 25** - Superfície de resposta para o diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) das microesferas em função da velocidade de agitação e da concentração de PVA na emulsão dupla.

A redução da velocidade aumenta o tamanho das gotas da emulsão, resultando na formação de partículas maiores (Covreur et al., 1997). No entanto, é menos provável que o tamanho dependa do volume da fase contínua, uma vez que a velocidade de agitação da emulsão primária foi mantida constante e o tempo de emulsificação usado foi pequeno (2 minutos) e o volume da segunda emulsão ajustado para permitir agitação uniforme. Portanto, nenhuma correlação entre diâmetro e razão fase contínua:fase dispersa foi observado.

Vários estudos (Covreur et al., 1997; Jeffery et al., 1993; Vandervoot et al., 2002) mostraram que o aumento da concentração de PVA na fase aquosa externa, reduz o tamanho das partículas. Em altas concentrações do agente estabilizante, a taxa de difusão das moléculas de PVA na interface fase aquosa-gota pode aumentar, resultando em uma maior presença das moléculas de PVA na superfície das gotas. Conseqüentemente, as gotas estariam mais estáveis, evitando coalescência, produzindo partículas menores após a evaporação do solvente e solidificação das microesferas (Vandervoot et al., 2002). Portanto, esse fato explica porque o tamanho das microesferas é dependente do tamanho e estabilidade das gotas formadas durante a segunda emulsificação.

Se analisarmos separadamente o efeito da concentração de PVA no tamanho das microesferas, observamos que quando a concentração aumentou, as menores partículas foram produzidas (4  $\mu\text{m}$ ). Para a menor concentração de PVA (0,5%), microesferas de maiores tamanhos são produzidas (15  $\mu\text{m}$ ) (Tabela 15). Mas, se combinarmos a concentração de PVA e velocidade de agitação, observamos que esse efeito é mais pronunciado (Figura 25). Estes resultados confirmam a importância do planejamento fatorial para se obter informações mais precisas sobre o sistema, que analisando os parâmetros individualmente.

Do exposto, pode-se concluir que é possível modular o tamanho das microesferas de acordo com a aplicação desejada, através das variáveis operacionais do processo de produção: agitação e concentração de PVA.

O tamanho das microesferas é uma propriedade importante e pode influenciar as propriedades biofarmacêuticas da formulação. Por exemplo, partículas menores tem maior área superficial, podendo conduzir a uma liberação mais rápida do composto encapsulado. Por outro lado, a biodistribuição e uma possível endocitose e interação com as membranas de mucosas são particularmente dependentes do tamanho das partículas. No desenvolvimento de novas formulações para antígenos solúveis usados em vacinas, o tamanho das microesferas de PLGA pode também influenciar nas suas propriedades como adjuvante.

### 5.3.2 – Influência das Variáveis Operacionais na Encapsulação do Corante

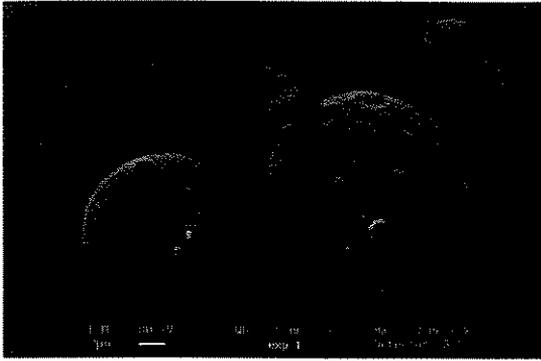
Na Tabela 18 são apresentadas os resultados obtidos nas várias condições operacionais usadas no planejamento fatorial, incluindo o rendimento do processo e encapsulação do corante Ponceau S nas microesferas.

**Tabela 18** – Diâmetro médio e eficiência de encapsulação (E.E.) do corante Ponceau S em função das variáveis operacionais, em microesferas produzidas através da técnica de evaporação do solvente – emulsão múltipla (a/o/a). Os experimentos foram realizados nas condições operacionais descritas no item 4.3.2.3.

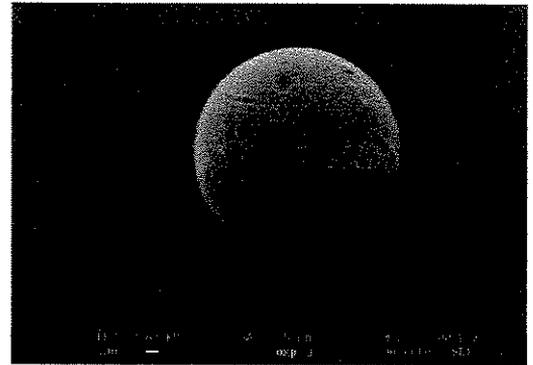
Exp.	PVA (%)	DP/CP	Velocidade de Agitação da Segunda Emulsão (rpm)	Diâmetro Médio ( $\mu\text{m}$ )	E.E. (%)
1	0,5	1:5	13 000	15,0	38,1
2	3,5	1:5	13 000	12,0	41,9
3	0,5	1:20	13 000	15,0	49,9
4	3,5	1:20	13 000	13,0	40,9
5	0,5	1:5	19 000	10,0	35,5
6	3,5	1:5	19 000	4,0	36,5
7	0,5	1:20	19 000	12,0	44,8
8	3,5	1:20	19 000	6,0	33,6
9	2,0	1:12,5	16 000	8,0	44,1
10	2,0	1:12,5	16 000	8,0	49,3
11	2,0	1:12,5	16 000	8,0	38,1

Observa-se na Tabela 18 que não há correlação entre o tamanho das microesferas e a eficiência de encapsulação do corante Ponceau S.

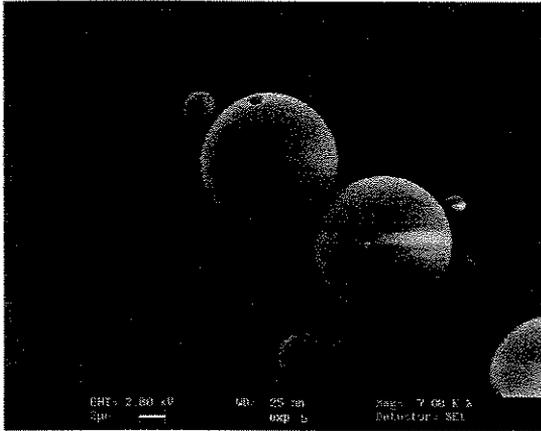
As microesferas produzidas contendo Ponceau S encapsulado apresentaram morfologia esférica e superfície lisa pouco porosa. A Figura 26 mostra as fotomicrografias das microesferas obtidas nos experimentais do planejamento  $2^3$ .



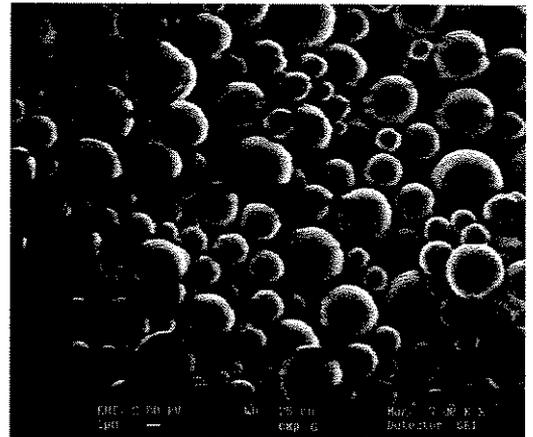
EXP 1



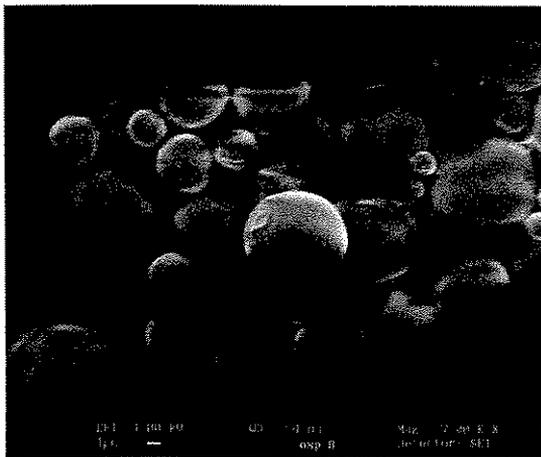
EXP 3



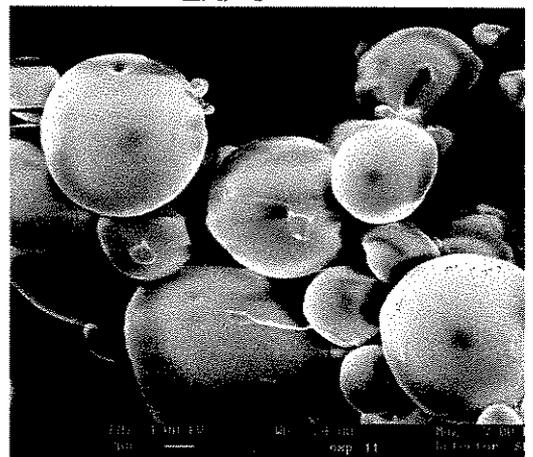
EXP 5



EXP 6



EXP 8



EXP 11

Figura 26 – Fotomicrografias de microesferas de PLGA 50:50 contendo Ponceau S produzidas nas diferentes condições do planejamento fatorial  $2^3$ . Aumento: 7000X.

### **5.3.3 - Influência da massa molar e grupos terminais dos polímeros de PLGA na liberação do corante**

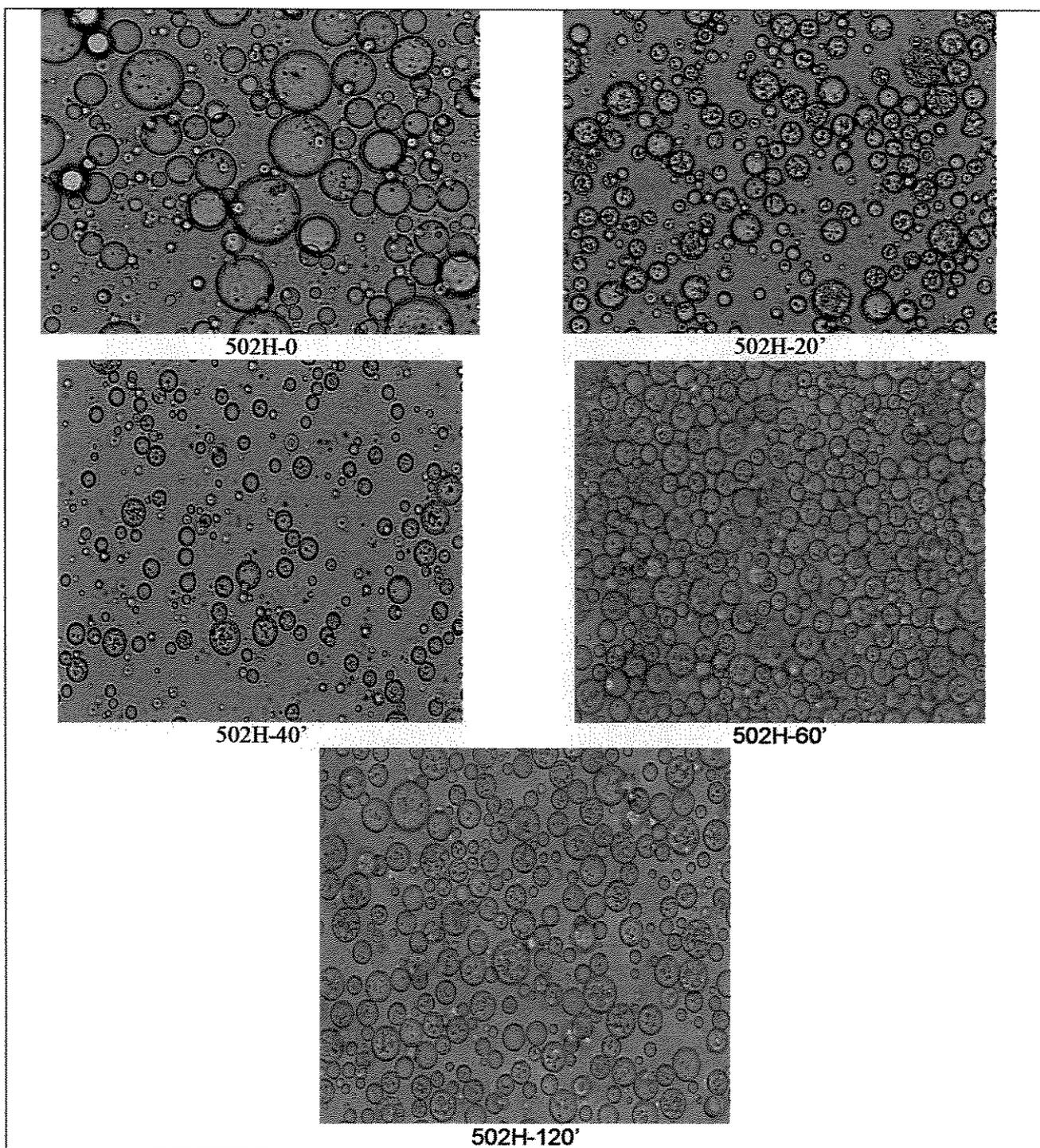
A influência da massa molar e grupos terminais do PLGA 50:50 foi estudada com polímeros do tipo Resomer, de massas molares 12kDa, 36kDa e 63kDa, com terminações de carboxila livre ou esterificada. As microesferas foram caracterizadas pela taxa de evaporação do solvente durante a preparação, morfologia, erosão e liberação do corante Ponceau S.

#### **5.3.3.1 – Eficiência de Encapsulação**

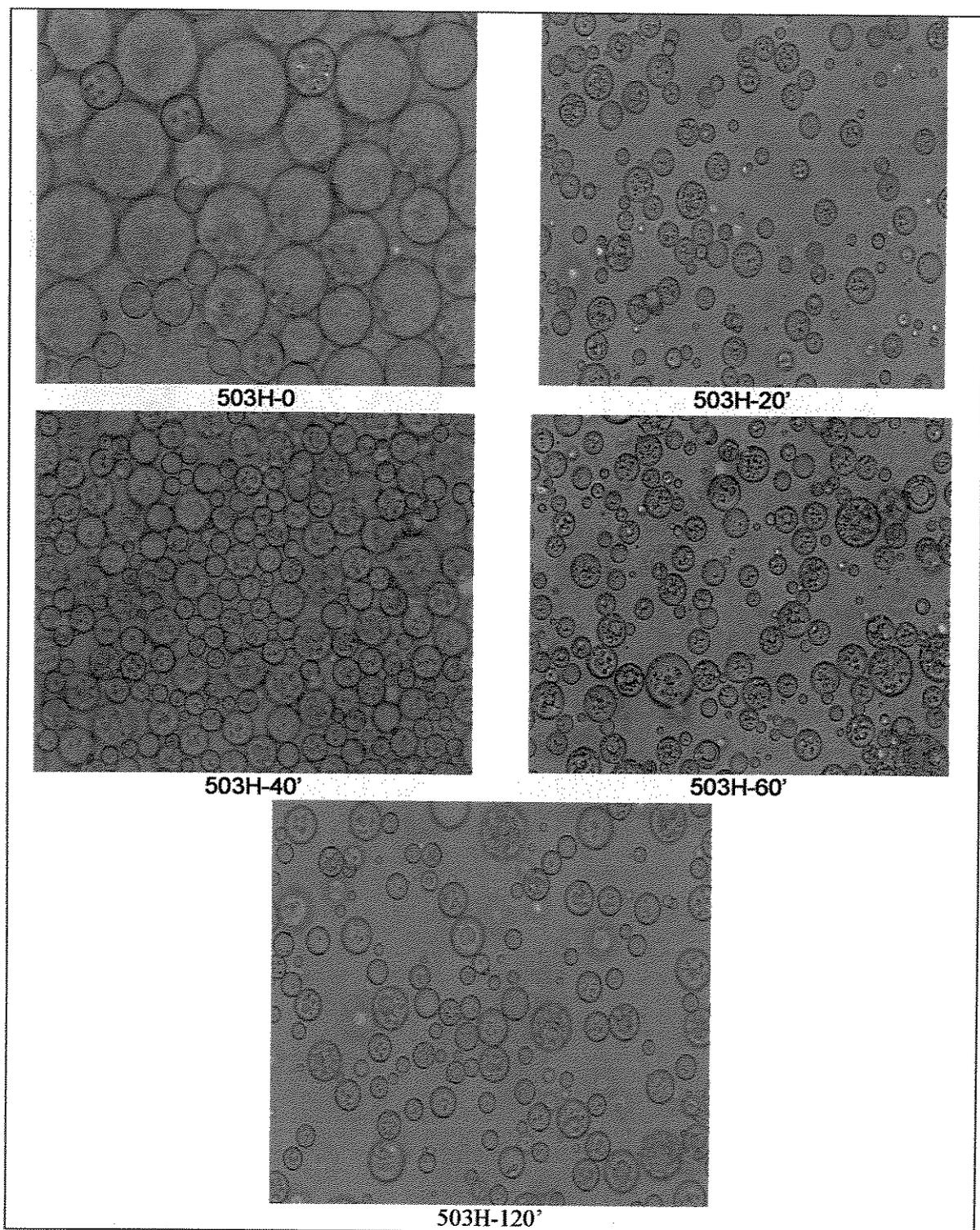
Não foi observada variação significativa na eficiência de encapsulação do Ponceau S para os seis conjuntos de microesferas. A eficiência de encapsulação média foi de  $46,02 \pm 6.56$  %. O valor médio obtido para a encapsulação do Ponceau S em microesferas usando polímeros Resomer foi semelhante ao obtido com as microesferas constituídas pelo polímero Lactel BP0100 ( $41 \pm 5$  %) de massa molar 45-75 kDa, usado nos experimentos do item 5.3.1.

#### **5.3.3.2 - Análise da Remoção do Solvente**

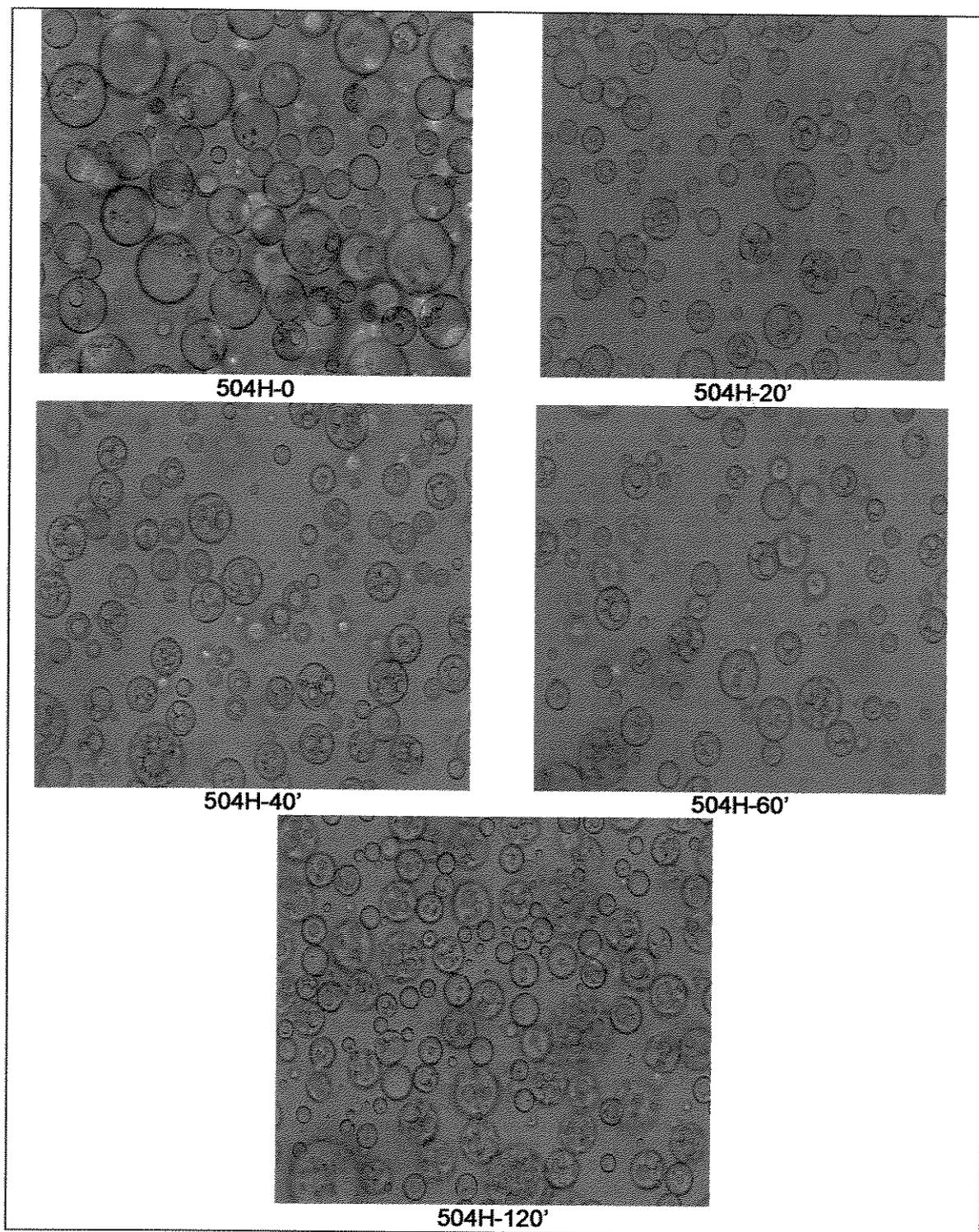
No processo de emulsificação/evaporação de solvente, após a adição da fase orgânica à fase aquosa, o solvente diclorometano foi removido do interior das gotas para a fase aquosa através da evaporação na interface gás-líquido. A velocidade de evaporação depende da sua solubilidade na fase aquosa, bem como da velocidade do processo de transferência de massa. Quando o solvente é removido das microesferas, o volume das gotículas diminui, podendo-se estimar a taxa de evaporação do solvente através da redução do tamanho das microesferas. A redução do tamanho das gotículas se deve a solidificação das microesferas e foi acompanhado através de imagens obtidas por microscopia ótica. As Figuras 27, 28 e 29 mostram a variação do diâmetro ao longo do tempo para microesferas compostas pelos polímeros RG 502H, 503H e 504H (63kDa) com carboxila livre.



**Figura 27** – Redução de tamanhos das microsferas do polímero RG502H durante o processo de evaporação do solvente (diclorometano) a temperatura ambiente. Aumento: 400X.

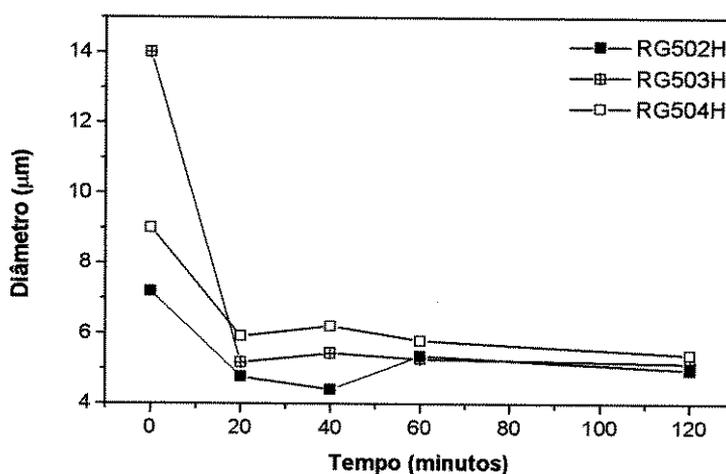


**Figura 28** – Redução de tamanhos das microsferas do polímero RG503H durante o processo de evaporação do solvente (diclorometano) a temperatura ambiente. Aumento: 400X.



**Figura 29** – Redução de tamanhos das microsferas do polímero RG504H durante o processo de evaporação do solvente (diclorometano) a temperatura ambiente. Aumento: 400X.

Através das fotomicrografias, pode-se observar que há uma redução no tamanho das gotículas. Após 20 minutos, não é observada alteração significativa do tamanho das microesferas resultantes. Isto indica que a transferência de massa tanto do solvente para a fase aquosa quanto na interface gás-líquido ocorre em poucos minutos, propiciando a solidificação das microesferas. A Figura 30 mostra a variação de tamanhos das microesferas durante a evaporação do solvente ao longo do tempo.



**Figura 30** – Variação do diâmetro médio das microesferas de PLGA 50:50 (constituídas pelos polímeros RG502H, 503H e 504H) ao longo do tempo.

Observa-se que o perfil de redução de tamanho das microesferas compostas pelos polímeros RG502H e RG504H são semelhantes (desvios nas medidas da ordem de 8%). Pode-se inferir que a taxa inicial de evaporação do solvente nas microesferas constituídas pelo polímero RG503H é mais rápida que nas microesferas formadas pelos polímeros RG502H e RG504H. Duas regiões são observadas no gráfico da Figura 30, fase rápida redução do tamanho seguida por uma fase descontínua. Foi observada uma redução de 41% no diâmetro original ( $t=0$ ) das microesferas ME-504H durante 20 minutos de remoção do solvente, enquanto as microesferas ME-502H mostraram 37% de redução do

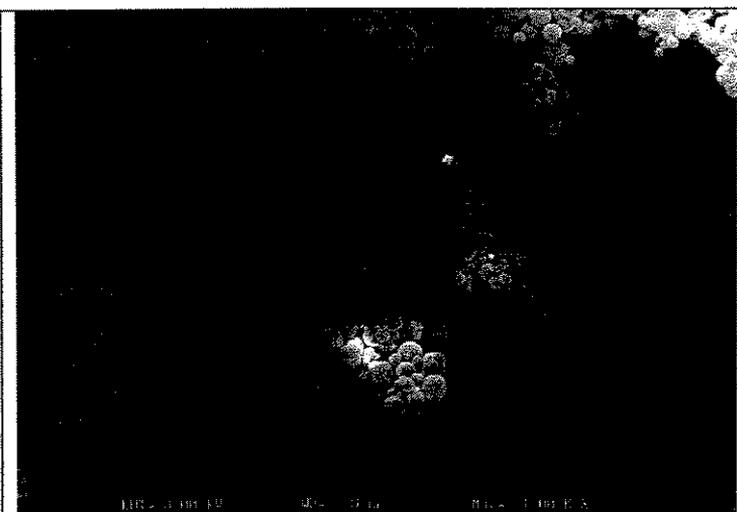
diâmetro original. As microesferas ME-503H exibiram 59% de redução no diâmetro no mesmo período de análise.

Portanto, as formulações demonstraram diferentes taxas de evaporação e redução de tamanho, dependendo das características do polímero usado. Em todas as preparações, observou-se que o solvente disponível foi evaporado em 20 minutos, onde não mais foi observada variação no tamanho das vesículas.

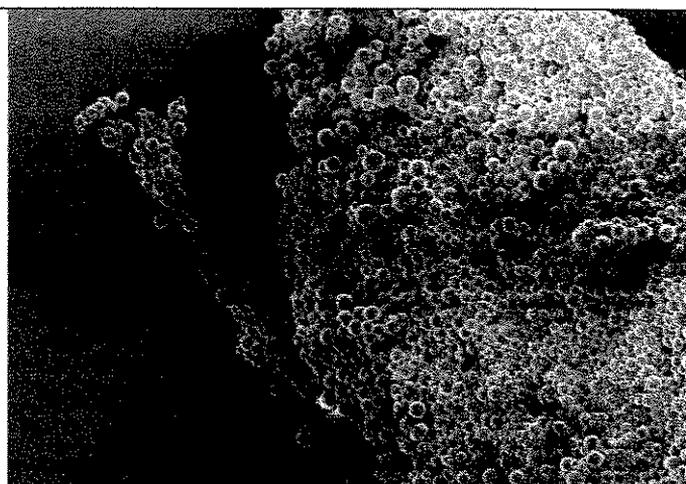
### 5.3.3.3 - Morfologia

Todas as microesferas contendo Ponceau S (molécula pequena) apresentaram morfologia esférica com superfície lisa e pouco porosa (Figura 31). É possível observar que o tipo de polímero não influencia a morfologia e tamanho das microesferas. As seis preparações produziram microesferas com diâmetro médio entre 6-7 $\mu$ m (contagem automática dos diâmetros das partículas, a partir das fotomicrografias, usando software específico).

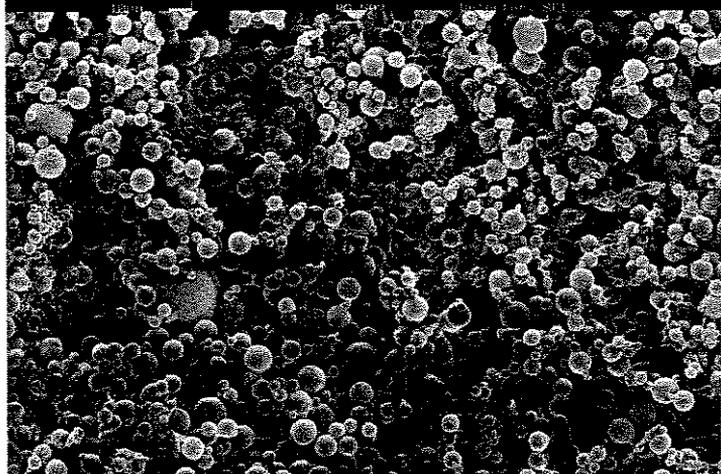
Utilizando esta técnica podemos afirmar que não há macro-poros na superfície das partículas, no entanto nada podemos afirmar sobre a presença de nanoporos, pois não seria possível visualizá-los através desta técnica (Faisant et al., 2002).



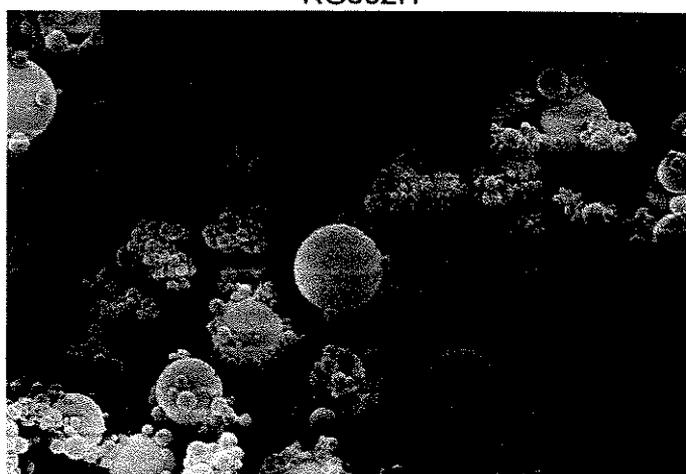
RG503



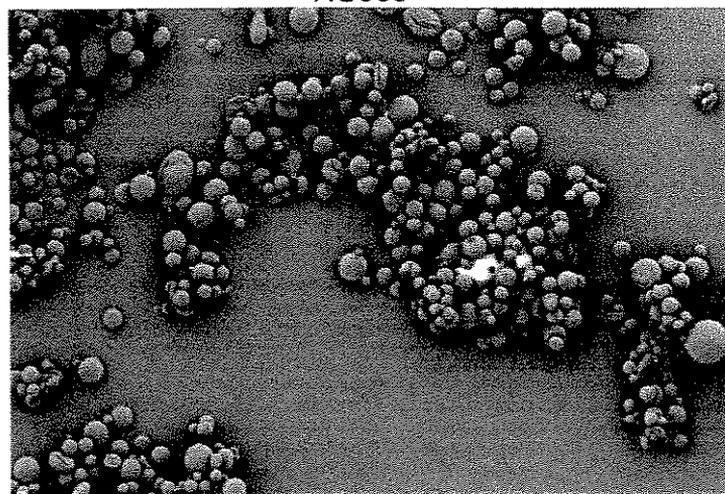
RG502H



RG504



RG503H



RG504H

Figura 31 – Fotomicrografias (SEM) de microsferas de PLGA 50:50 (RESOMER) de diferentes massas molares e grupos terminais. Aumento 1000X.

Se compararmos o diâmetro destas microesferas com aquelas produzidas pelo polímero LactelBP 0100® (MM 45000-75000), percebemos que para 2% de PVA e 19000rpm de agitação, a equação 9 (extrapolada para polímeros RG) fornece diâmetro médio de aproximadamente 7µm, portanto semelhante ao obtido experimentalmente com os polímeros da série "RG".

#### 5.3.3.4 – Liberação *in vitro*

Os resultados para a liberação *in vitro* do Ponceau S das microesferas de PLGA 50:50 após 10, 20 e 30 dias de imersão em tampão PBS estão apresentados na Figura 32.

As microesferas mostraram diferentes quantidades de Ponceau S liberado durante 30 dias, dependendo do tipo de polímero usado na preparação. Em todos os casos, observou-se liberação incompleta do soluto durante o tempo de análise. Alguns fatores, como micro-ambiente ácido, devido a degradação do polímero, e interações polímero-soluto pode ter contribuído para a liberação incompleta do corante. Em geral, à medida que a massa molar do polímero aumenta, a quantidade de soluto liberada decresce. Pode-se acrescentar também que microesferas compostas pelos polímeros com o grupo carboxil livre (grupo terminal) liberam uma maior quantidade de corante em 30 dias quando comparadas àquelas constituídas pelo grupo carboxila esterificada.

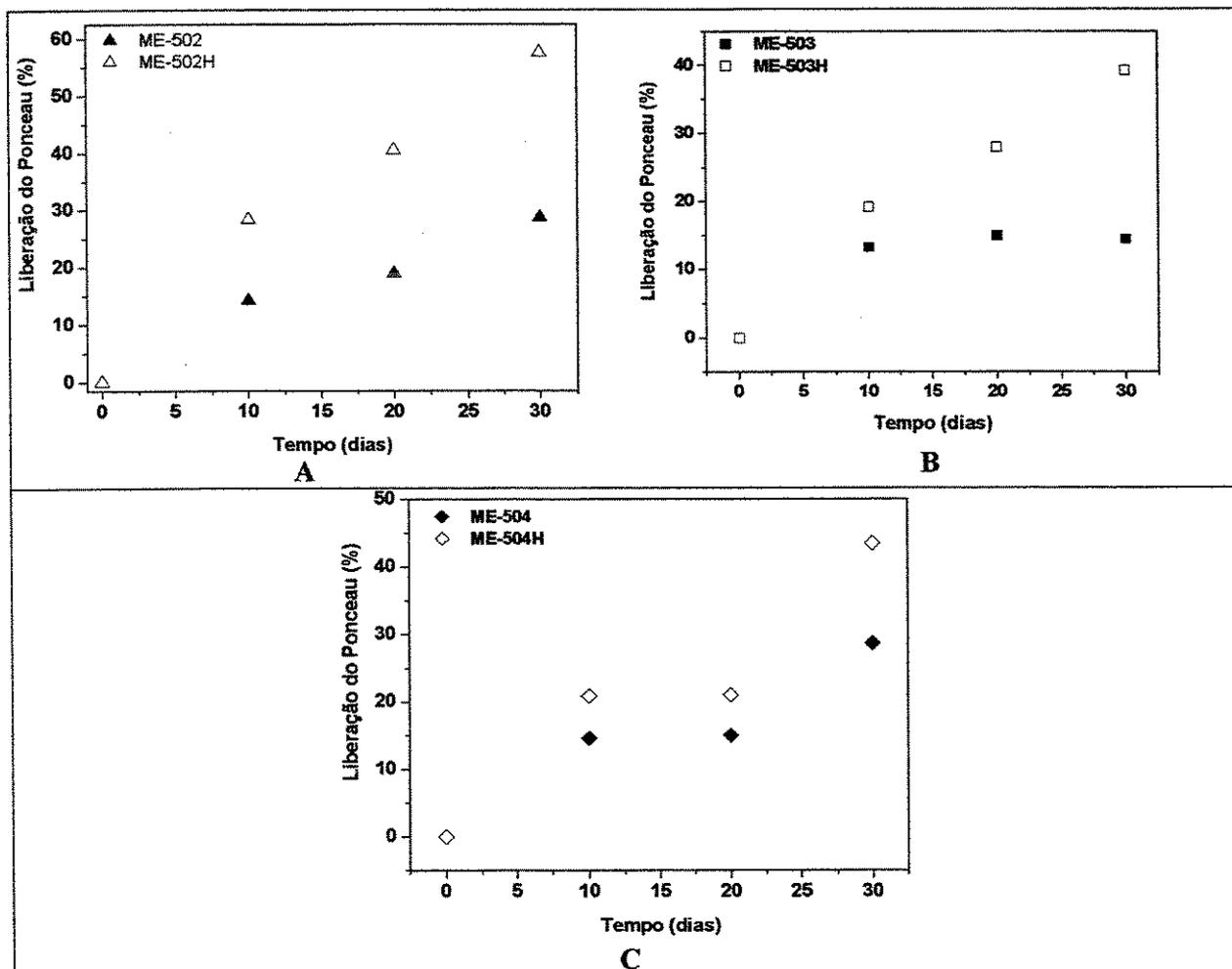
A menor quantidade de corante liberada foi observada para ME-503 e a maior para ME-502H. Schrier e DeLuca (2001) encontraram comportamento oposto para a liberação de proteína 2 de microesferas compostas por polímeros similares. Embora, os autores também tenham observado liberação incompleta da proteína das microesferas constituídas por polímeros de mesma massa molar, a maior quantidade de proteína liberada foi alcançada pelas microesferas com o grupo terminal carboxila esterificada. Estes resultados mostram a influência de interações entre solutos e polímeros no perfil de liberação das microesferas. Vale ressaltar que Sandor et al. (2001) também mostraram que diferentes perfis de

liberação de proteínas podem ser obtidos usando microesferas constituídas pelo mesmo polímero.

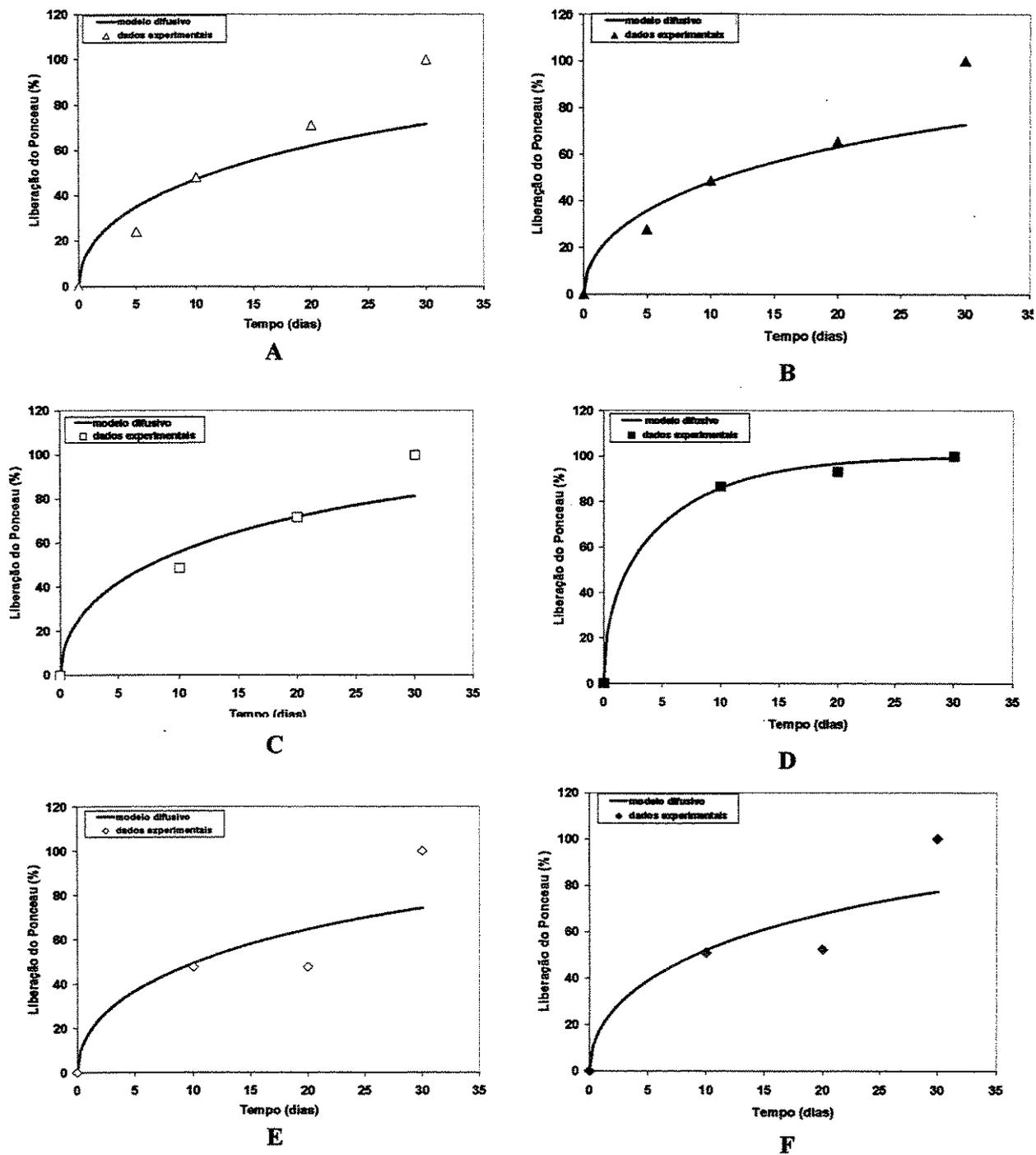
Exceto para ME-503 e ME-503H, a liberação parece ter duas fases: a primeira até 20 dias, com menor velocidade, seguida por uma segunda fase, onde a velocidade de liberação é maior. Estes resultados confirmam o estudo obtido por Faisant et al. (2002) que estudaram a liberação do composto 5-fluorouracil encapsulado em microesferas. Eles obtiveram perfil de liberação em dois estágios e relatam que microesferas de PLGA 50:50 apresentam mecanismo de liberação baseado na difusão e erosão das microesferas a partir do 20º dia de incubação. Para ME-503 e ME-503H a liberação parece estar ainda na sua fase inicial, mesmo durante os 30 dias.

Na Figura 33 são apresentadas as curvas de liberação calculadas através do modelo de difusão em esferas sólidas (Eq. 6), cujos dados foram usados para a determinação dos coeficientes de difusão das microesferas (Tabela 19). Observe-se que nessas curvas a porcentagem liberada (variando de 0 a 100%) foi calculada em relação às máximas concentrações liberadas para cada tipo de polímero, apresentada na Figura 32.

O melhor ajuste foi obtido para a liberação do Ponceau S das ME-503, indicando a predominância da difusão como mecanismo de liberação do corante durante 30 dias. No caso dos outros polímeros, o modelo de difusão ajustou-se bem aos dados experimentais somente até 20 dias. Os desvios observados indicam que para tempos maiores, outros mecanismos, como a erosão e degradação, concorreram também para a liberação do corante. Os coeficientes de difusão efetivos (Tabela 19) estimados mostram baixas permeabilidades das microesferas preparadas usando polímeros do tipo Resomer®. O menor valor de permeabilidade obtido foi para ME-503. Os coeficientes de difusão para ME-504 e ME-504H não foram calculados, pois foi considerado que os dados experimentais desviaram do modelo difusivo no período analisado.



**Figura 32** – Liberação de Ponceau das microsferas de PLGA 50:50, compostas pelos polímeros A: 502 e 502H; B: 503 e 503H; C: 504 e 504H, em função do tempo (tampão PBS, pH 7,2, 37°C).



**Figura 33** – Modelo teórico vs dados experimentais dos perfis de liberação de Ponceau das microsferas de PLGA 50:50 compostas pelos polímeros A: 502H; B: 502; C: 503H; D: 503; E: 504H e F: 504 (meio: tampão PBS, pH 7,2, 37°C).

**Tabela 19** – Coeficientes de difusão efetivos estimados para várias preparações de microesferas.

Microesfera	Coeficiente de difusão efetivo ( $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )
ME-502	* $1,51 \times 10^{-6}$
ME-502H	* $1,08 \times 10^{-6}$
ME-503	** $1,47 \times 10^{-8}$
ME-503H	* $1,14 \times 10^{-6}$

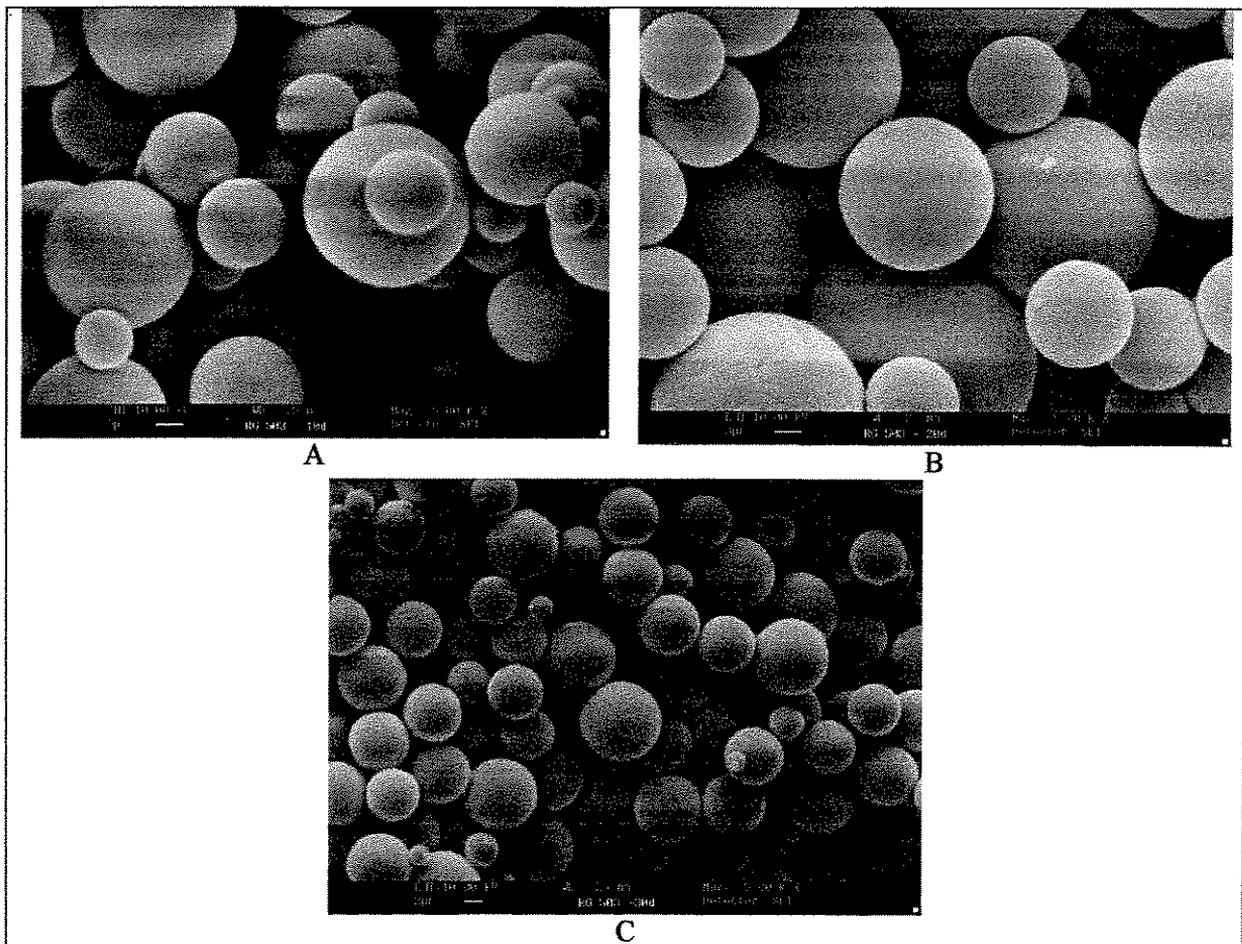
Coeficiente de difusão estimado para \*20 dias e \*\* 30 dias.

O diâmetro médio utilizado para o cálculo do coeficiente de difusão foi  $7\mu\text{m}$ .

### 5.3.3.5 – Erosão

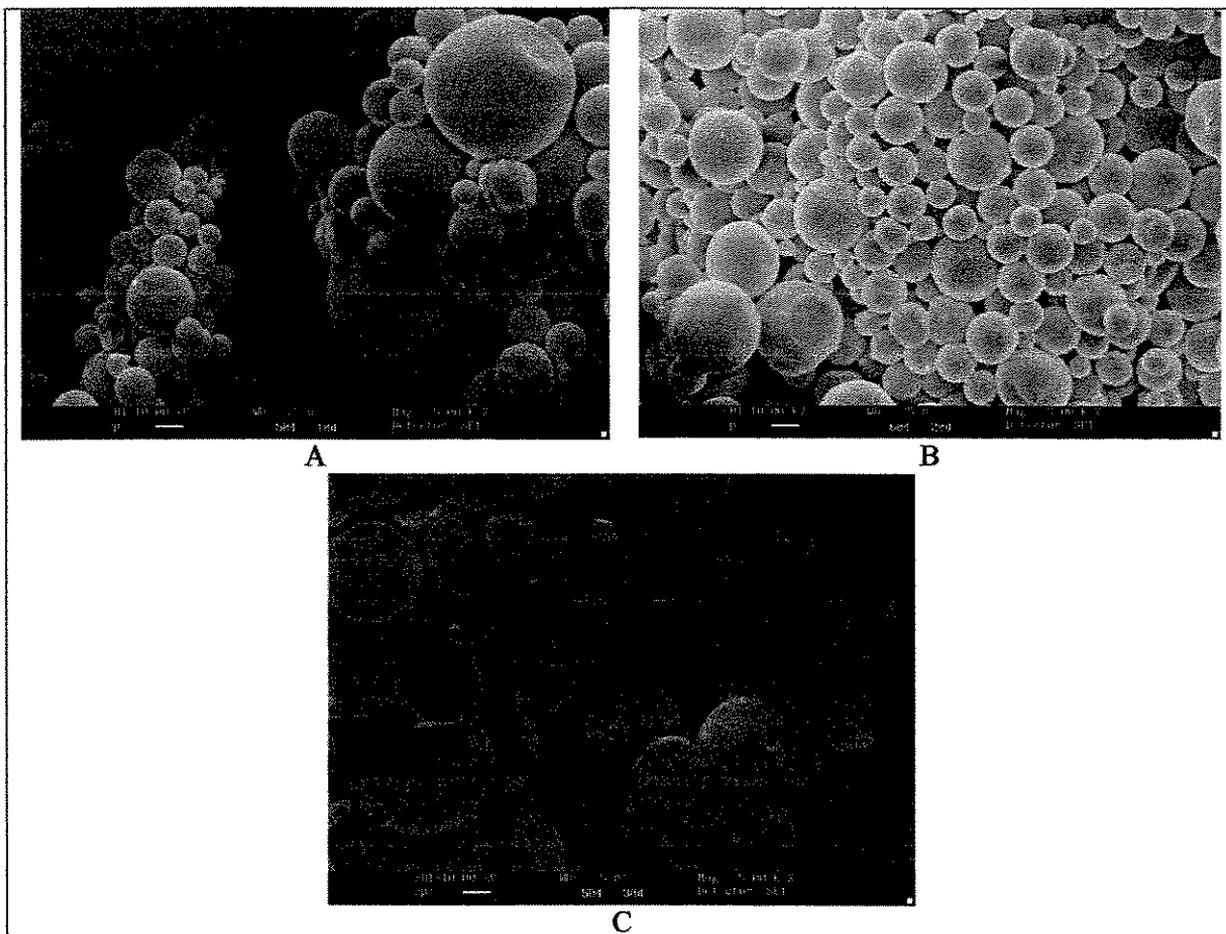
A erosão de microesferas é um processo complexo e envolve degradação (hidrólise do polímero), intumescimento, dissolução e difusão dos oligômeros e monômeros e mudanças morfológicas das partículas. A erosão pode ser classificada como interna e de superfície. A erosão de superfície é visualizada por uma redução no volume da partícula, enquanto a erosão interna é acompanhada de um aumento da porosidade, decorrente da degradação química do polímero. No caso da erosão interna, não é observada uma redução de superfície (Gopferich, 1996).

As microesferas poliméricas foram, portanto, analisadas quanto a sua capacidade de erosão *in vitro* através de mudanças morfológicas. As Figuras 34 e 35 mostram as fotomicrografias das microesferas incubadas em tampão PBS por 10, 20 e 30 dias.



**Figura 34** – Fotomicrografias de microsferas de PLGA 50:50, constituídas pelo polímero RG503, incubadas em tampão PBS por A) 10 B) 20 e C) 30 dias. Aumento: 5000X

Microesferas permaneceram esféricas durante o período analisado de liberação do corante. As fotomicrografias revelam que as microsferas constituídas pelo polímero RG503 não apresentaram maior porosidade (macro-poros) quando incubadas por 30 dias em tampão PBS. Estes resultados indicam mudanças na estrutura interna das microsferas como consequência da erosão do centro da partícula para a sua superfície. As mudanças parecem ser progressivas com pouca porosidade, pois como visto no item anterior, o perfil de liberação por erosão parece não ocorrer para ME-503.



**Figura 35** – Fotomicrografias de microsferas de PLGA 50:50, constituídas pelo polímero RG504, incubadas em tampão PBS por A) 10, B) 20 e C) 30 dias.

As microsferas constituídas pelo polímero RG504 também não apresentaram maior porosidade (macro-poros) quando incubadas por 30 dias em tampão PBS. Não foi possível realizar microscopias das microsferas constituídas pelos polímeros RG 502H, RG 502, RG 504H e RG 503H, visto que as amostras apresentavam consistência de gel quando secas, dificultando a metalização com ouro e a obtenção de imagens.

Esses resultados sugerem que as microsferas analisadas não apresentaram mudanças morfológicas significativas, como aumento de porosidade e irregularidades na superfície, quando imersas em meio aquoso a 37°C por até 30 dias, sugerindo erosão uniforme nas microsferas.

A partir destes resultados, selecionou-se para a utilização nas etapas seguintes do trabalho o polímero RG-503 e seu análogo RG-503H. Esses polímeros atendem as propriedades exigidas para a terapia de dessensibilização em alergia, pois apresentaram perfis lentos de liberação e erosão. Essas duas características tornam promissora a utilização das microesferas como imunoterápico para alergia, pois a apresentação contínua do antígeno ao sistema imune por um período prolongado, reduz a frequência das injeções, proporcionando maior conforto e qualidade para os pacientes alérgicos.

### **5.3.4 – Efeito do Grupo Carboxil livre e Carboxil Esterificado do Polímero na Encapsulação e Liberação de Proteínas Alergênicas de Microesferas de PLGA.**

#### **5.3.4.1 – Eficiência de encapsulação**

A eficiência de encapsulação das proteínas alergênicas em microesferas de PLGA 50:50 compostas do polímero RG503 (ME-503) e RG503H (ME-503H) está mostrada na Tabela 20.

**Tabela 20** – Eficiência e capacidade de encapsulação do extrato alergênico (EA) e ovoalbumina (OVA) em ME-503 e ME-503H.

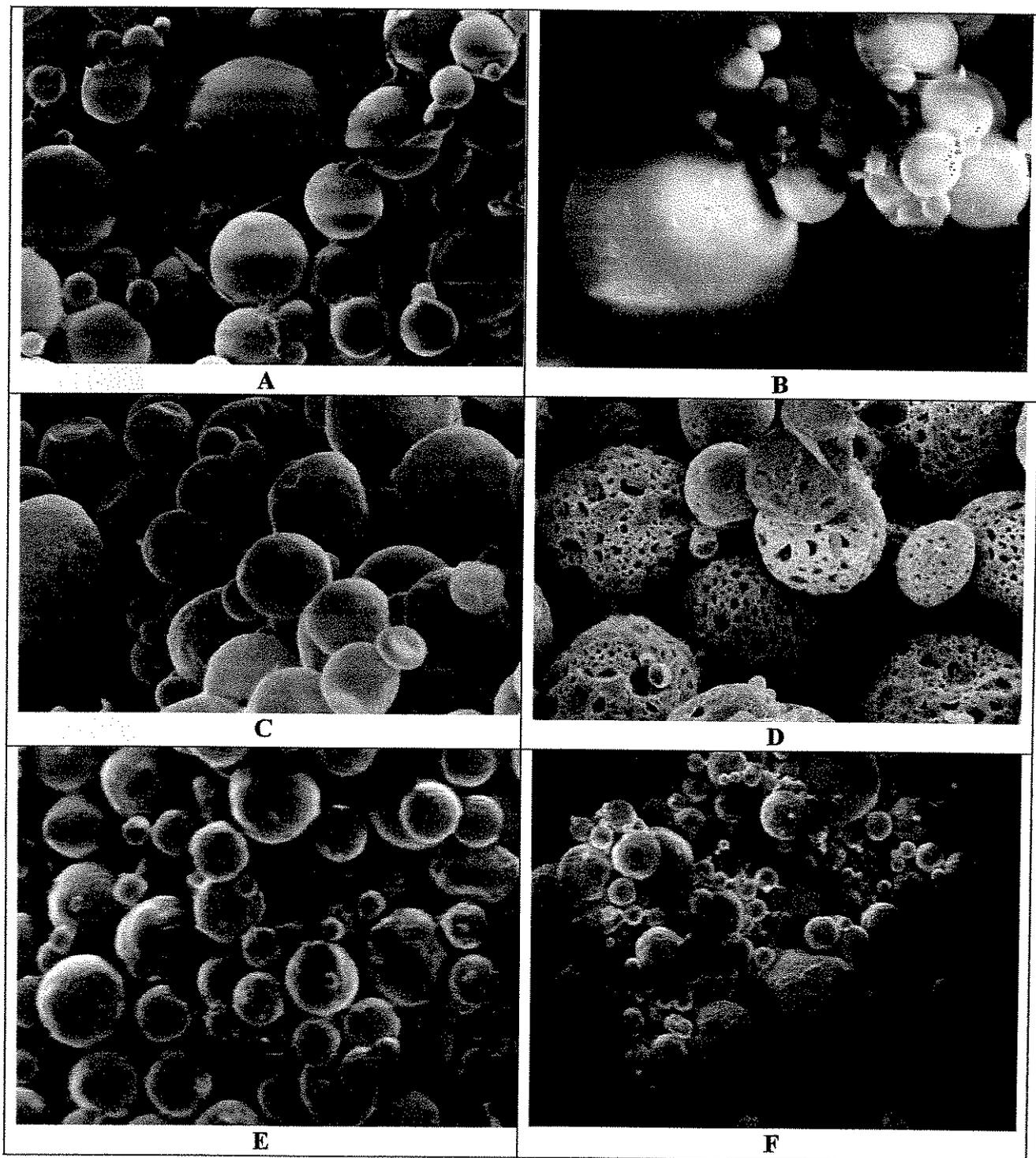
Microesfera PLGA (proteína)	Eficiência de Encapsulação (%)	Massa proteína/massa microesferas (µg/mg)
ME-503 (EA)	64	11,8
ME-503H (EA)	53	10,7
ME-503 (OVA)	86	26
ME-503H (OVA)	90	28

ME-503: microesferas compostas por PLGA RG503 (carboxila esterificada)

ME-503H: microesferas compostas por PLGA RG503H (carboxila livre)

### 5.3.3.2 – Morfologia e análise de superfície

Fotomicrografias de microesferas vazias compostas de RG503 (ME-503) e RG503H (ME-503H) são mostradas na Figure 36. As micropartículas apresentaram formato esférico e mostraram-se uniformes. O diâmetro médio das microesferas de PLGA foi de aproximadamente 7,5 $\mu$ m com ampla distribuição de tamanho (2-30  $\mu$ m). Microscopias das microesferas de PLGA ME-503 e ME-503H encapsulando extrato alergênico e ovoalbumina são também mostradas na Figura 36. Micropartículas esféricas uniformes de superfície lisa foram observadas para ambas microesferas encapsulando ovoalbumina e ME-503 encapsulando extrato alergênico. Entretanto, ME-503H encapsulando o extrato alergênico mostrou superfície macro porosa. Vale ressaltar que a superfície lisa das microesferas observadas por microscopia de varredura somente indica a ausência de macroporos (tamanho >100nm). Nanoporos (tamanho <100nm) são dificilmente visualizados por esta técnica. É interessante perceber que devido ao grupo terminal do polímero, ME-503 (carboxila esterificada) pode ser mais hidrofóbica que ME-503H (carboxila livre). Assim, o resultado está coerente, se considerarmos que partículas compostas de polímeros mais hidrofóbicos são mais resistentes à penetração da água no seu interior através dos canais formados na matriz polimérica pelas proteínas a etapa de evaporação do solvente.



**Figura 36.** Fotomicrografias de microsferas de PLGA: vazias A. ME-503 B. ME-503H, encapsulando extrato alergênico C. ME-503 D. ME-503H e encapsulando ovoalbumina E. ME-503 F. ME-503H. (aumento: 5000X)

### 5.3.4.3 - Carga Superficial

Através de medidas de potencial zeta, determinou-se a carga superficial das microesferas vazias e com proteínas do extrato alergênico encapsuladas. A Tabela 22 mostra os valores obtidos.

**Tabela 22** – Potencial zeta de microesferas, vazias e com proteínas, compostas pelos polímeros RG503 e RG503H a pH 7,2.

<b>Amostra</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>
ME-503 vazia	$-5,2 \pm 0,5$
ME-503 com proteína	$-10,4 \pm 0,4$
ME-503H vazia	$-4,1 \pm 0,4$
ME-503H com proteína	$-4,0 \pm 0,6$

Estes resultados mostram que as proteínas presentes no extrato alergênico não estão adsorvidas na superfície das microesferas ME-503H. Entretanto, a variação de carga na superfície das microesferas ME-503 na ausência e presença das proteínas, indica a adsorção das mesmas na superfície das partículas. É importante ressaltar que esses dados esclarecem o aumento observado na eficiência de encapsulação das microesferas ME-503, sugerindo que nem toda proteína está encapsulada, mas incorporada a matriz polimérica.

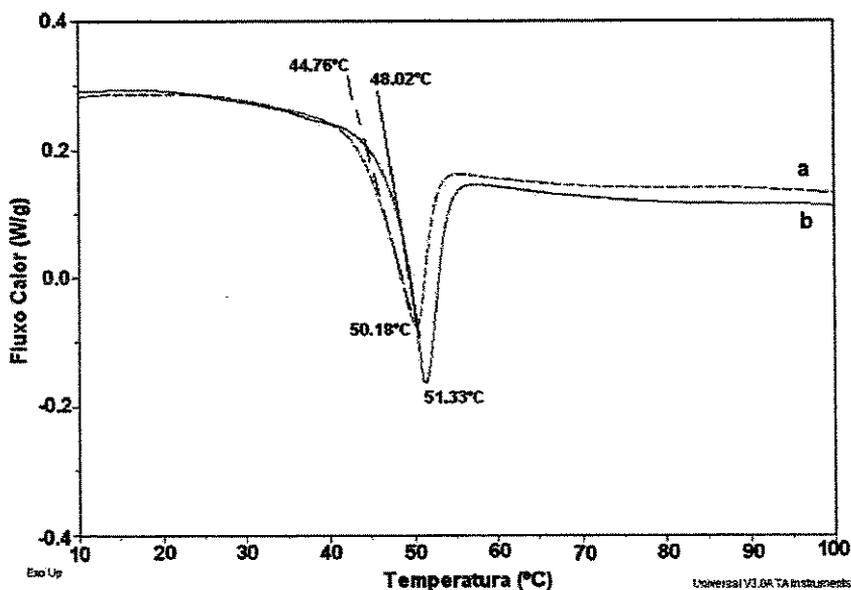
Os valores de carga superficial (próximos ao zero) indicam que as microesferas estão numa fase instável (-30 - +30mV) de estabilidade coloidal, podendo agregar ao longo do tempo. Entretanto, a estocagem das partículas na forma liofilizada (mais estáveis) constitui uma alternativa eficiente para contornar esse problema.

#### 5.3.4.4 - Temperatura de Transição Vítrea ( $T_g$ )

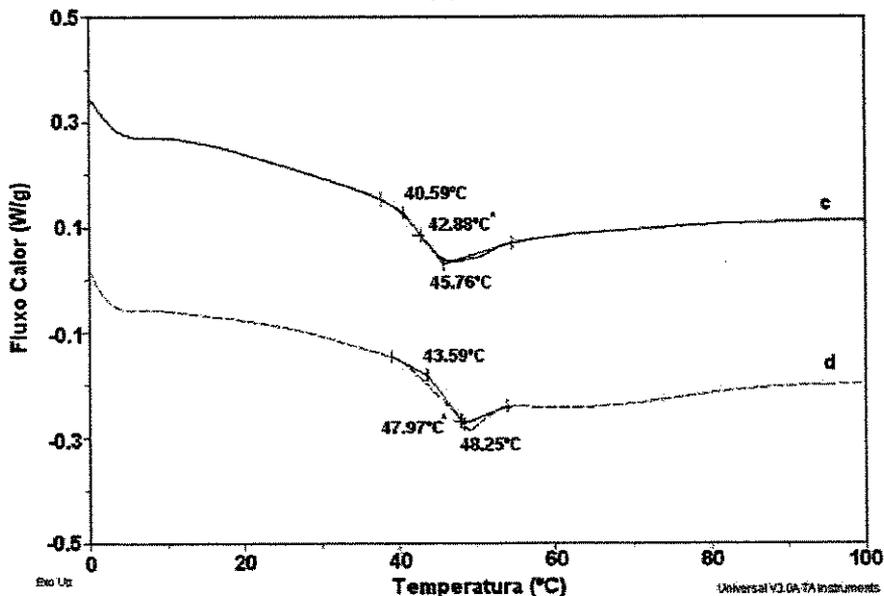
A temperatura de transição vítrea do polímero e das microesferas é um parâmetro importante que influencia a liberação do antígeno e a degradação das microesferas. Se o polímero está no estado vítreo ( $T < T_g$ ), a mobilidade das macromoléculas é muito baixa, resultando em uma taxa lenta de difusão do antígeno através da matriz polimérica. No entanto, se o polímero está no estado "rubbery" ( $T > T_g$ ), as macromoléculas apresentam maior mobilidade e os coeficientes de difusão do antígeno são significativamente maiores (Faisant et al., 2002).

A velocidade de degradação dos polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico está relacionada à temperatura de transição vítrea, cristalinidade, massa molar e razão de monômeros do ácido láctico e glicólico. Assim, polímeros com alto valor de  $T_g$  são mais cristalinos e portanto, degradam mais lentamente (Jensen, 2000).

As curvas de DSC obtidas, através de calorimetria exploratória diferencial, com os polímeros comerciais e as microesferas poliméricas correspondentes contendo proteínas alergênicas estão na Figura 37. As curvas de DSC mostram a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) dos polímeros e microesferas seguidas de relaxação entálpica.



A



B

**Figuras 37** – Curvas de DSC dos (A) polímeros comerciais RG-503H<sup>a</sup> e RG-503<sup>b</sup> e das (B) microesferas poliméricas ME-503H<sup>c</sup> e ME-503<sup>d</sup>. As microesferas apresentam em sua composição as proteínas alergênicas encapsuladas.

Através das curvas de DSC, observamos que a  $T_g$  para os polímeros RG-503 e RG-503H foi 48,02°C e 44,76°C, respectivamente. As microesferas contendo proteínas alergênicas, apresentaram valores de  $T_g$  de 47,97°C para ME-503 e 42,88°C para ME-503H.

Os resultados indicam que os valores de temperatura de transição vítrea do polímero RG-503 e das microesferas correspondentes foram semelhantes, sugerindo que as propriedades do polímero não foram alteradas com a preparação das microesferas. Esse resultado também permite afirmar que não há presença significativa de solvente residual na amostra, uma vez que a presença de solvente ou umidade decresce o valor da  $T_g$ . Tal comportamento não foi observado para as microesferas ME-503H que apresentaram valor de  $T_g$  inferior ao do polímero. Nesse caso, a produção de microesferas alterou as propriedades do polímero, ou pela presença do solvente residual ou pela presença das proteínas na amostra.

É importante citar que é permitido solvente residual na formulação injetável para uso em humanos, desde que não ultrapasse o limite de 500ppm.

As curvas de DSC dos polímeros e microesferas, obtidos experimentalmente, também mostram que as microesferas ME-503 apresentam maior valor de  $T_g$  e portanto maior cristalinidade, degradando mais lentamente que as microesferas ME-503H. Esses resultados confirmam os dados de degradação (perda de massa) obtidos para as microesferas ME-503 e ME-503H apresentados no próximo item.

#### 5.3.4.5 – Degradação *in vitro*

A degradação das microesferas contendo extrato alergênico ou ovoalbumina foi avaliada em termos de percentagem de perda de massa (PPM) durante sua incubação em tampão PBS. Os resultados são apresentados na Figura 38. Após 30 dias, a PPM para ME-503 com extrato alergênico foi de 15.0%, enquanto que para ME-503 com ovoalbumina foi de 45.0%. No mesmo período, a PPM para ME-503H com extrato alergênico foi de 72.0% e 56.0% com ovoalbumina. Entretanto, após 60 dias, a PPM para ambas ME-503 e ME-503H contendo extrato alergênico encapsulado ou ovoalbumina foi similar. Estes resultados confirmam a análise de superfície para ME-503H encapsulando extrato alergênico. Considerando que antes da degradação, ME-503 e ME-503H

apresentavam a mesma massa molar média, (34 kDa), esses resultados mostram que a taxa de degradação depende do grupo final do polímero e da proteína encapsulada. Degradações mais lentas foram observadas para ME-503 encapsulando ambas proteínas. Esses resultados concordam com os obtidos por Schrier e Deluca (1995), onde as microesferas de polímeros com o grupo terminal carboxila livre degradam mais rapidamente em relação às mesmas constituídas pelo grupo carboxila esterificada.

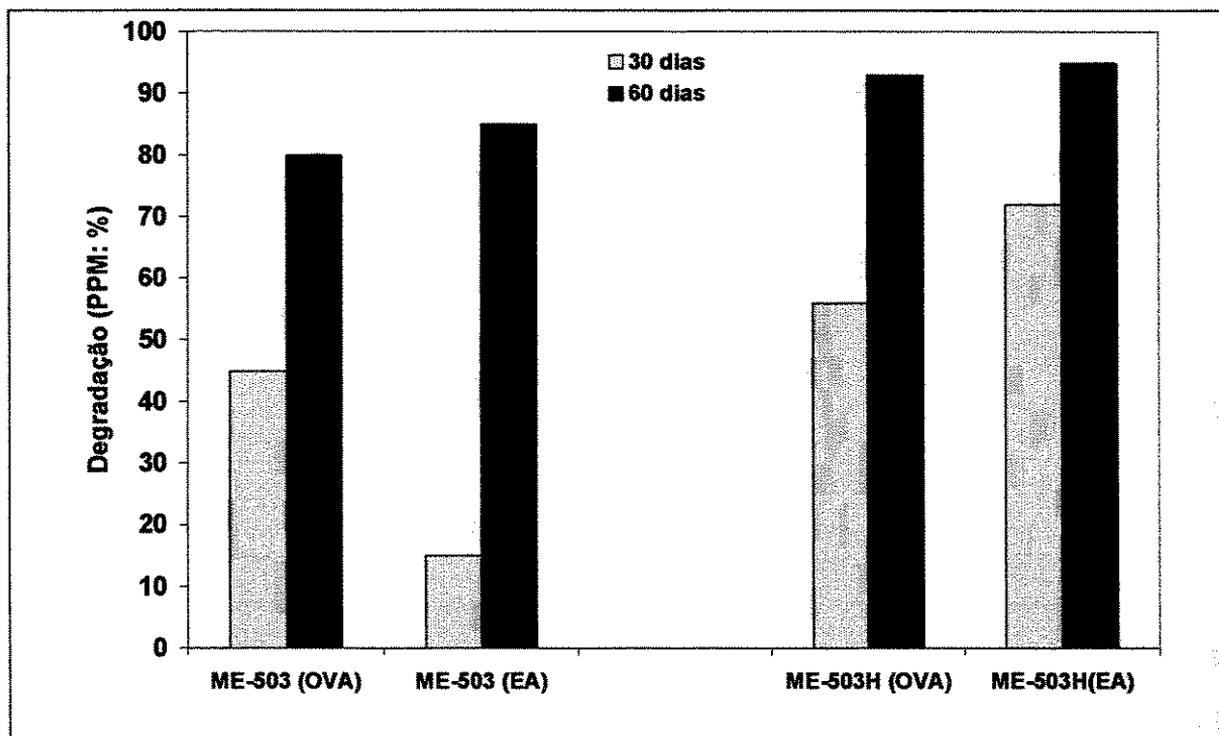
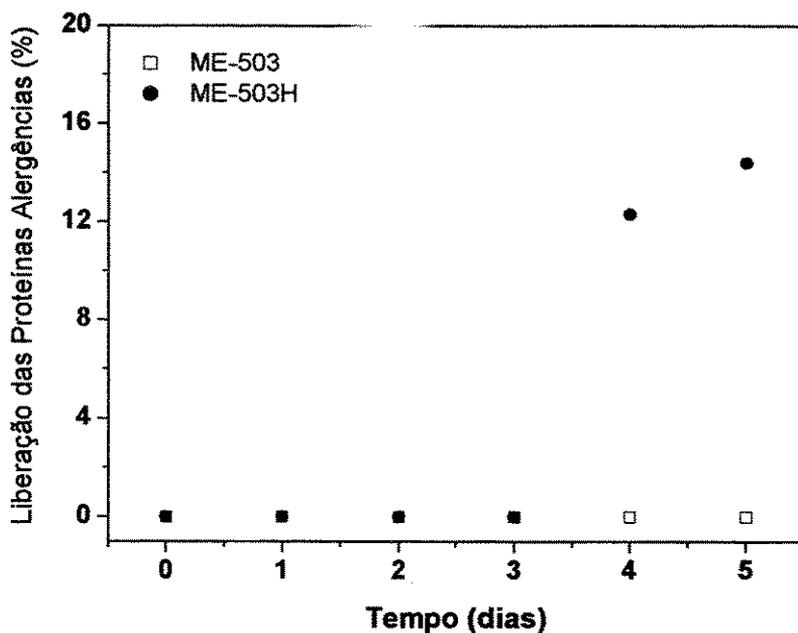


Figura 38 – Perfil de degradação de microesferas ME-503 e ME-503H encapsulando proteínas alergênicas em 30 e 60 dias de incubação. Meio aquoso: tampão PBS, pH 7.4, 37°C. Percentagens calculadas em relação à massa inicial das microesferas: 25 mg.

#### 5.3.4.6 - Liberação *in vitro*

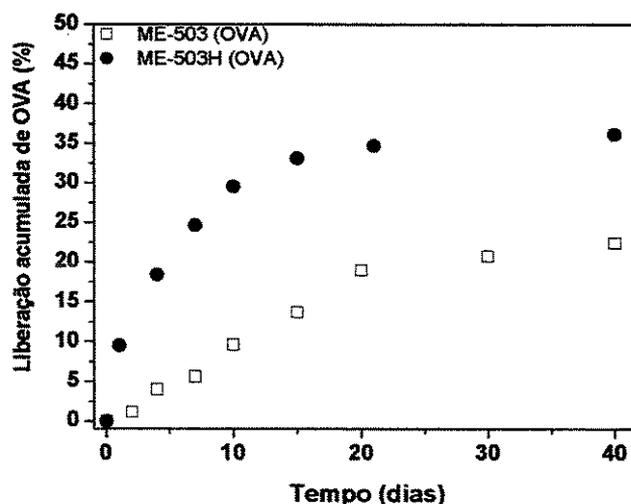
A liberação das proteínas contidas no extrato alergênico foi monitorada durante 5 dias. Os perfis de liberação das proteínas nas microesferas ME-503 e ME-503H são mostrados na Figura 39.



**Figura 39** – Perfis de liberação das proteínas alergênicas em microesferas de PLGA 50:50 durante 5 dias. Percentagens calculadas em relação à massa total de proteína encapsulada: 25 mg.

Observa-se que durante os primeiros 5 dias não houve liberação significativa das proteínas das microesferas ME-503 enquanto que aproximadamente 14% das proteínas foram liberadas das microesferas ME-503H. Esses resultados revelaram que as microesferas compostas pelo polímero RG503 libera mais lentamente que as mesmas constituídas pelo seu análogo RG 503H. Não foi possível obter perfil de liberação por longos períodos, devido à baixa concentração do extrato alergênico encapsulado.

A liberação da OVA das microesferas poliméricas ME-503 e ME-503H nos ensaios conduzidos *in vitro* foi caracterizada a partir dos perfis de concentração da proteína com o tempo, os quais refletem a taxa de liberação e a permeabilidade das partículas poliméricas. As curvas de porcentagem de liberação acumulada de OVA versus tempo são mostrados na Figura 40.



**Figura 40** – Perfis de liberação cumulativa da OVA de microesferas ME-503 e ME-503H. Percentagens calculadas em relação à massa inicial de OVA: 50 mg.

Perfis graduais de liberação foram obtidos para ambas microesferas. Após 40 dias, aproximadamente 25% da ovoalbumina encapsulada foi liberada das microesferas ME-503 e 36% das microesferas ME-503H. Esses resultados mostram o efeito do grupo final do polímero na liberação da proteína. Em ambos os casos, houve liberação incompleta da ovoalbumina das microesferas. Fatores, como meio interno ácido devido à degradação do polímero e interações proteína-polímero podem contribuir para a incompleta liberação da proteína.

Observa-se também que a liberação da ovoalbumina das microesferas poliméricas ME-503 e ME-503H é baixa, atingindo somente 16 e 21% da capacidade, respectivamente. Se há forte interação entre a proteína e as microesferas, a liberação é desfavorecida (Namur et al., 2004). O fato dos polímeros apresentarem hidrofobicidades diferentes pode influenciar a interação e conseqüentemente a liberação da proteína.

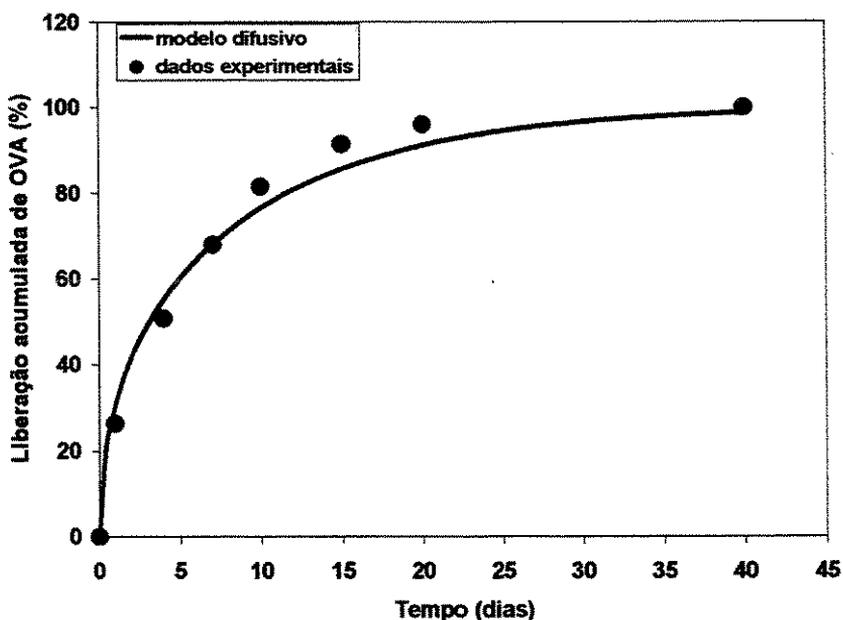
As proteínas são liberadas das microesferas como resultado do mecanismo de difusão através dos poros da matriz, degradação da matriz e eventual colapso. Os dados experimentais mostram tendência predominante para o mecanismo de difusão. Yeh et al. (1995) investigaram o perfil de liberação da ovoalbumina de microesferas de PLGA 50:50 (RG503) produzidas pela emulsão dupla A/O/A e evaporação do solvente. Em 30 dias, eles demonstraram que a liberação da

ovoalbumina foi incompleta (33%) e seu perfil de liberação mostrou uma tendência linear controlada por difusão, semelhante aos dados obtidos nesse trabalho.

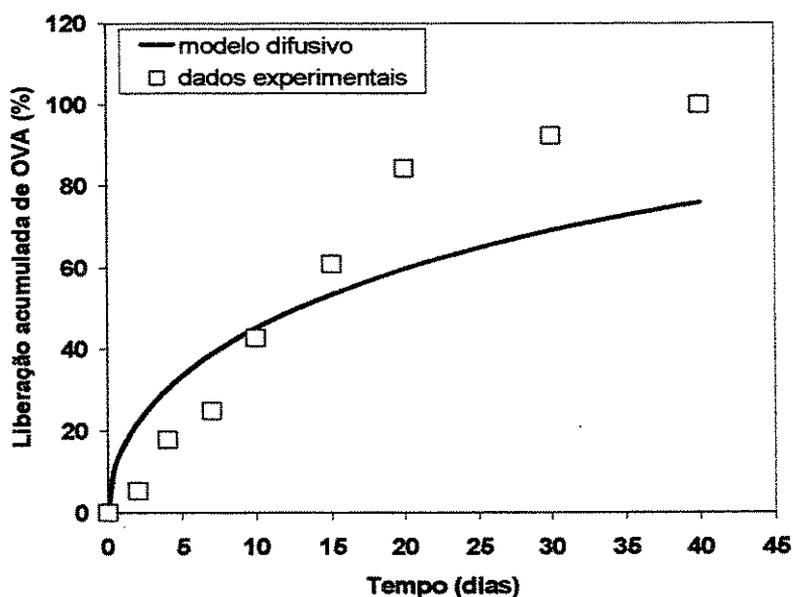
Schreir e DeLuca (2001) estudaram a liberação da proteína 2 (rhBMP-2) em microesferas compostas pelo polímero PLGA (50:50) RG 503 e 503H e encontraram uma tendência oposta para a liberação em comparação aos nossos resultados. A liberação acumulativa da proteína nas microesferas RG503 foi de 75%, enquanto as microesferas compostas por RG503H liberaram somente 30% em 40 dias de análise. Os autores ainda relatam que as microesferas produzidas pela emulsão dupla foram porosas e a liberação da proteína das microesferas foi incompleta.

Baseado nos trabalhos disponíveis na literatura, concluímos que a interação proteína-polímero influencia diretamente a capacidade de liberação, velocidade de degradação e assim, o perfil de liberação. Siepmann e Gepferich (2001) relataram que a difusão do soluto de microesferas depende significativamente da natureza do polímero, tipo do soluto, tamanho e forma do soluto, o que observamos nesse trabalho.

As curvas de liberação foram também analisadas através do modelo de difusão baseado na lei de Fick para esferas sólidas com distribuição homogênea de soluto em todo o seu volume. (Eq. 6) , para determinação do coeficiente de difusão da proteína nas microesferas. A concentração máxima liberada foi considerada como a concentração no tempo infinito. Os gráficos da Figura 41 mostra o nível de concordância entre os dados experimentais e o modelo difusivo considerado.



A



B

**Figura 41** – Perfis de liberação da OVA obtidos de microesferas A) ME-503H e B) ME-503 durante 40 dias. Os símbolos referem-se aos dados experimentais e as linhas aos modelos teóricos calculados.

Observa-se que o modelo difusivo apresentou bom ajuste aos dados experimentais durante todo o tempo de liberação para as microesferas ME-503H. No caso das microesferas ME-503, observa-se desvios significativos do modelo

em relação aos dados experimentais, tanto no início (até 10 dias) quanto após 15 dias. A liberação inicial muito rápida (perfil quase linear) pode ser considerada como decorrente de efeito “burst” das proteínas localizadas próximo ou na superfície das microesferas. Após 15 dias a liberação se dá por outros mecanismos além da difusão.

A Tabela 22 apresenta os valores da constante “*k*” e dos coeficientes de difusão estimados pelo modelo.

**Tabela 22** – Constante “*k*” do modelo cinético difusivo e coeficiente de difusão efetivo, *D*, para as microesferas ME-503 e ME-503H.

	<b>*ME-503</b>	<b>**ME-503H</b>
<b><i>k</i> [s<sup>-1</sup>]</b>	6,70*10 <sup>-10</sup>	1,13*10 <sup>-7</sup>
<b><i>D</i> [µm<sup>2</sup> . s<sup>-1</sup>]</b>	9,42*10 <sup>-9</sup>	1,59*10 <sup>-6</sup>

Utilizou-se como diâmetro principal das microesferas 7,5µm.

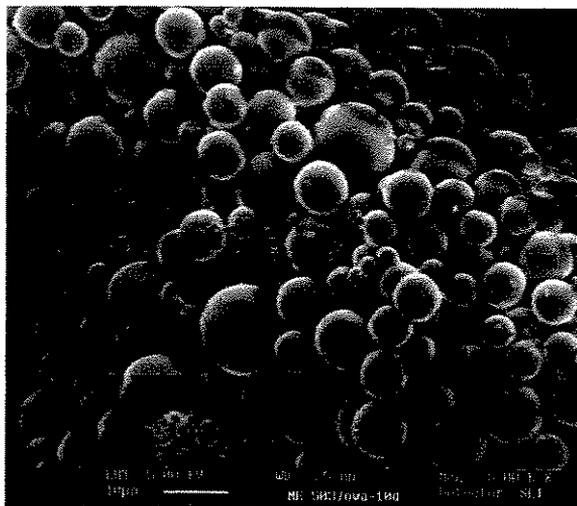
Coefficiente de difusão calculado para \*15 dias e \*\* 40 dias.

Embora através de mecanismos diferentes, ambas microesferas mostraram perfis contínuos de liberação por longos períodos, os quais são desejados para aplicações em imunoterapia.

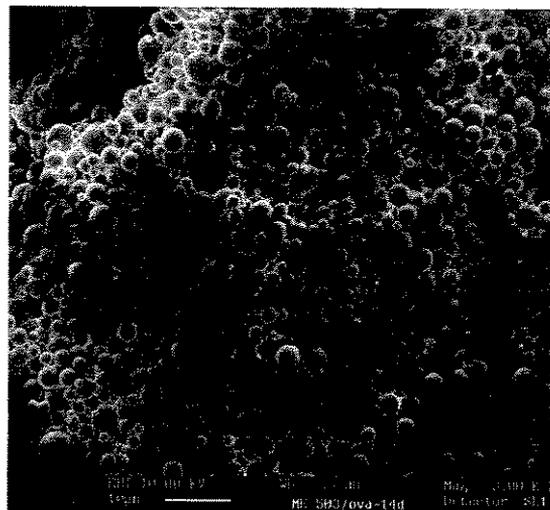
#### 5.3.4.7 – Morfologia e análise de superfície

Através de microscopia eletrônica de varredura, foi possível analisar a morfologia e superfície das microesferas ME-503 e ME-503H contendo ovoalbumina encapsulada durante o período de incubação em tampão PBS a 37°C (análise de degradação). As fotomicrografias das microesferas ME-503 e ME-503H com ovoalbumina estão mostradas na Figura 42 e 43.

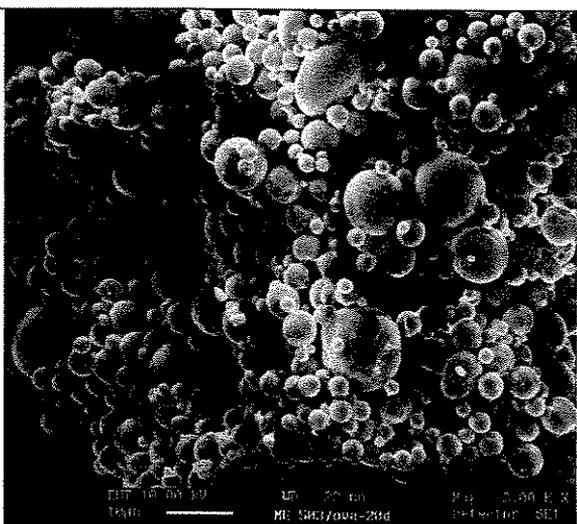
Não foi possível obter fotomicrografias das microesferas ME-503H, com OVA, incubadas durante 20 e 30 dias, devido a consistência da amostra seca (degradada) após o período de incubação.



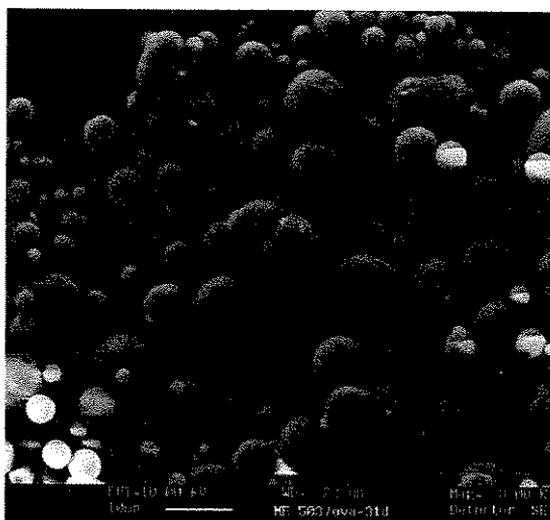
A



B



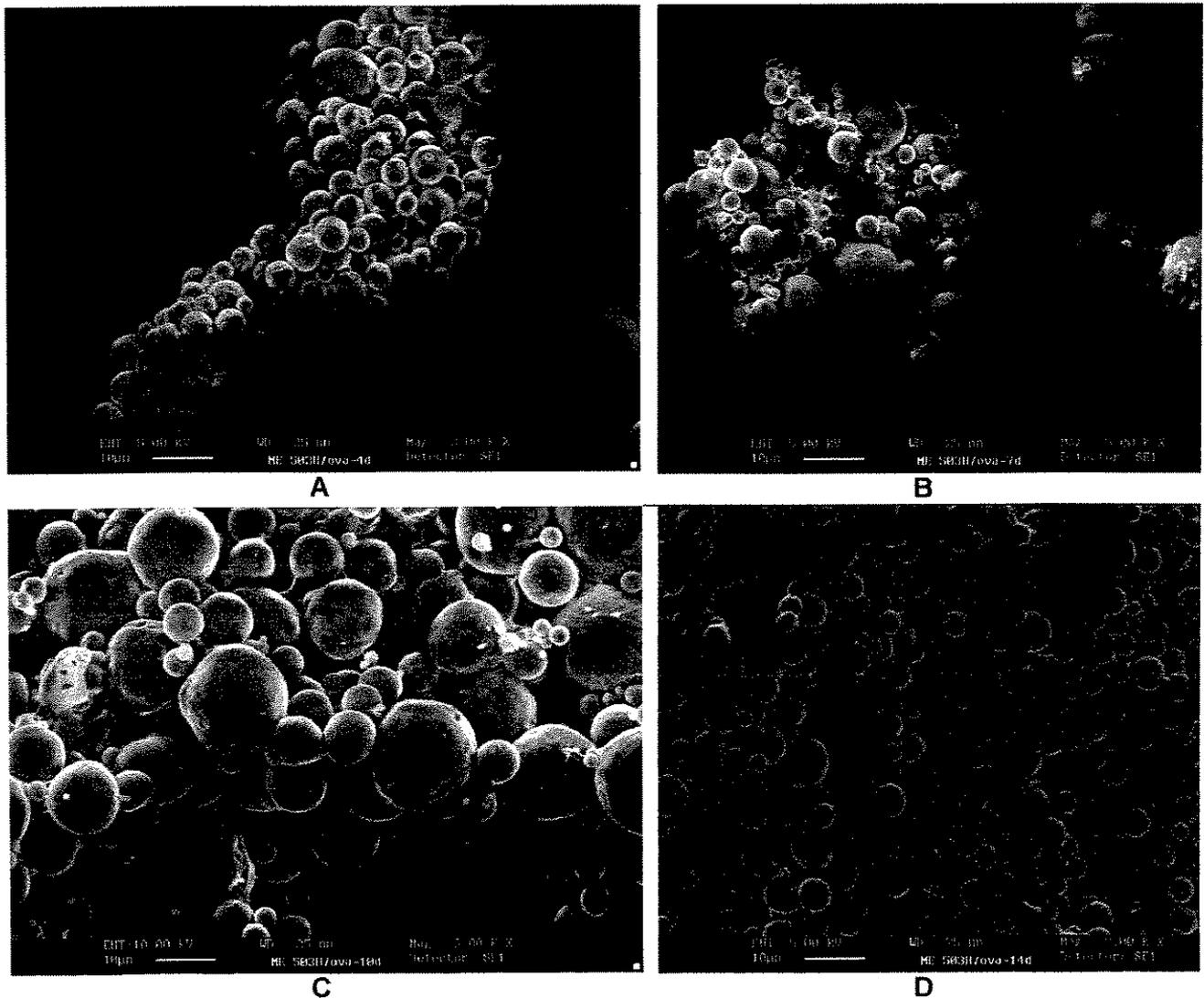
C



D

**Figura 42** - Morfologia das microsferas ME-503, contendo OVA encapsulada, incubadas em meio aquoso durante A: 10; B: 14; C: 20; D:30 dias. Aumento: 3000X.

Não foram observadas irregularidades (macro poros) para ambas microsferas encapsulando ovoalbumina em 30 dias (Figuras 42 e 43). É importante ressaltar que a ausência de macro-poros não descarta a possibilidade das partículas apresentarem nanoporos, os quais são difíceis de visualizar através de microscopia eletrônica de varredura.

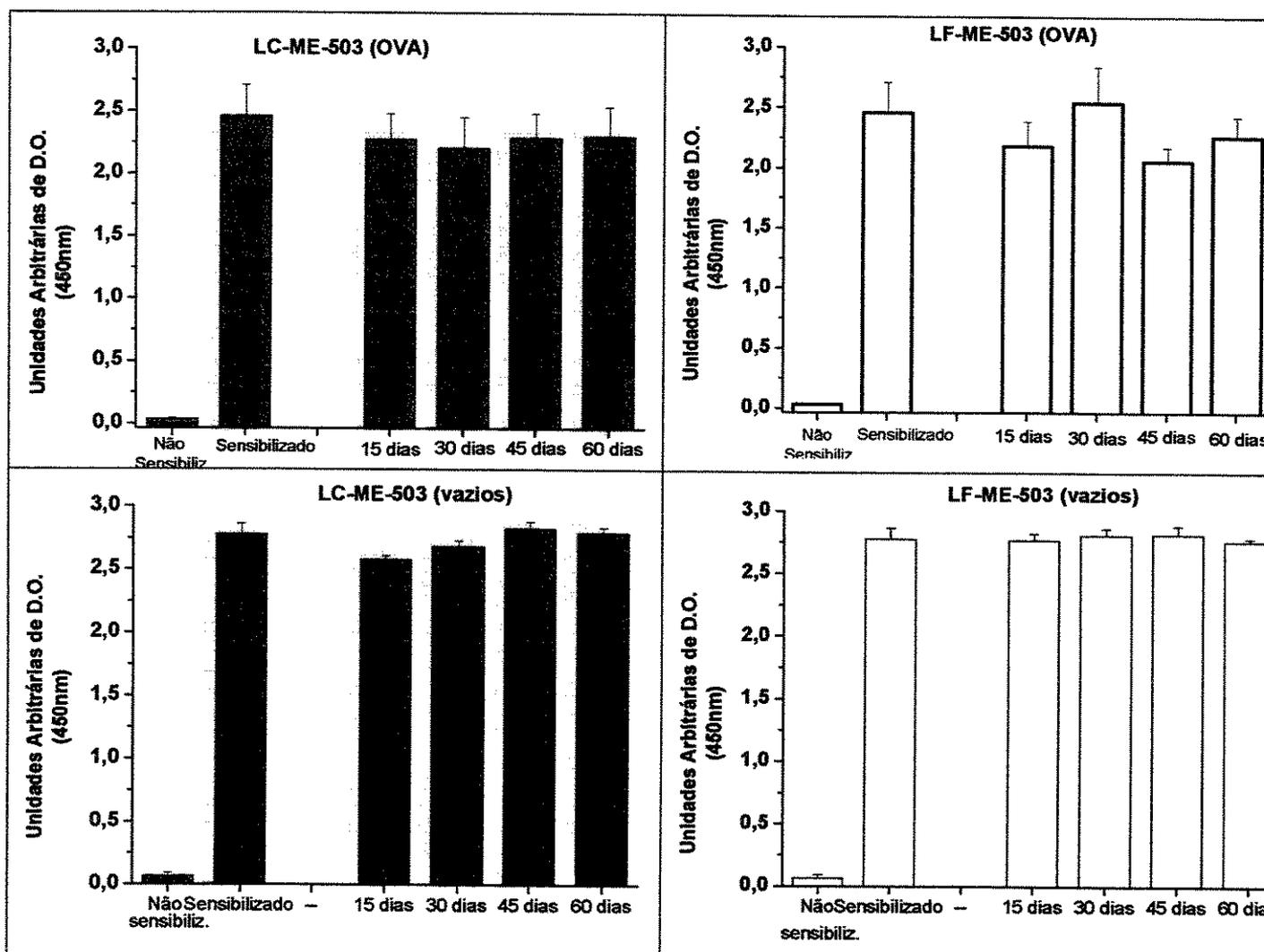


**Figura 43** - Morfologia das microsferas ME-503H, contendo OVA encapsulada, incubadas em meio aquoso durante A: 4; B: 7; C: 10; D: 14 dias. Aumento: 3000X.

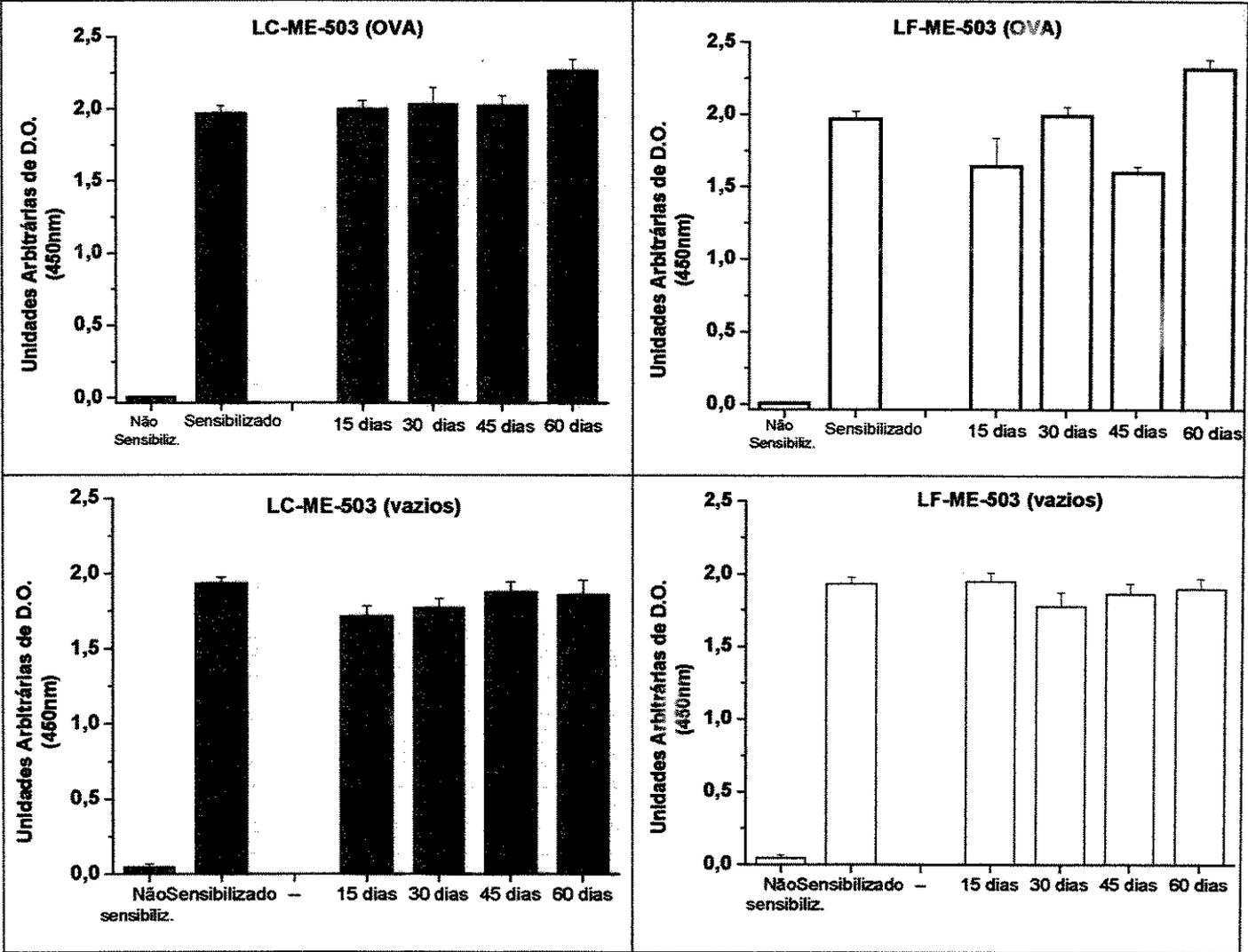
Outra importante informação obtida das fotomicrografias é que não foi observada redução de tamanho das partículas. Essa informação pode ser um indicativo de que os efeitos autocatalíticos da degradação do polímero não são significativos. Provavelmente, a difusão dos íons hidróxidos do meio para o interior das microsferas é suficientemente mais rápida, sendo capaz de neutralizar os monômeros ácidos gerados pela clivagem do polímero.

## 5.4 - Análise dos Efeitos Imunológicos da Administração Sequencial de Lipossomas e Microesferas

Os níveis de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina E (IgE) específicas determinadas no plasma dos animais após a administração sequencial de lipossomas e microesferas com OVA durante 60 dias de análise são mostrados nas Figuras 44 e 45.



**Figura 44** – Níveis de IgG específico para OVA após administração sequencial (parenteral) de lipossomas convencionais (LC) ou furtivos (LF - 5% mol PEG<sup>2000</sup>) e microesferas de PLGA (ME-503) vazias ou contendo ovoalbumina encapsulada.



**Figura 45** – Níveis de IgE específico para OVA após administração seqüencial (parenteral) de lipossomas convencionais (LC) ou furtivos (LF - 5% mol PEG<sup>2000</sup>) e microesferas de PLGA (ME-503) vazias ou contendo ovoalbumina encapsulada.

A ovoalbumina foi escolhida para a imunização devido à extensa descrição na literatura da sua ação em reações alérgicas e protocolos experimentais de dessensibilização bem estabelecidos. O extrato alergênico por ser constituído de mistura heterogênea de proteínas, das quais somente algumas apresentam caráter alergênico, poderia dificultar a interpretação dos resultados.

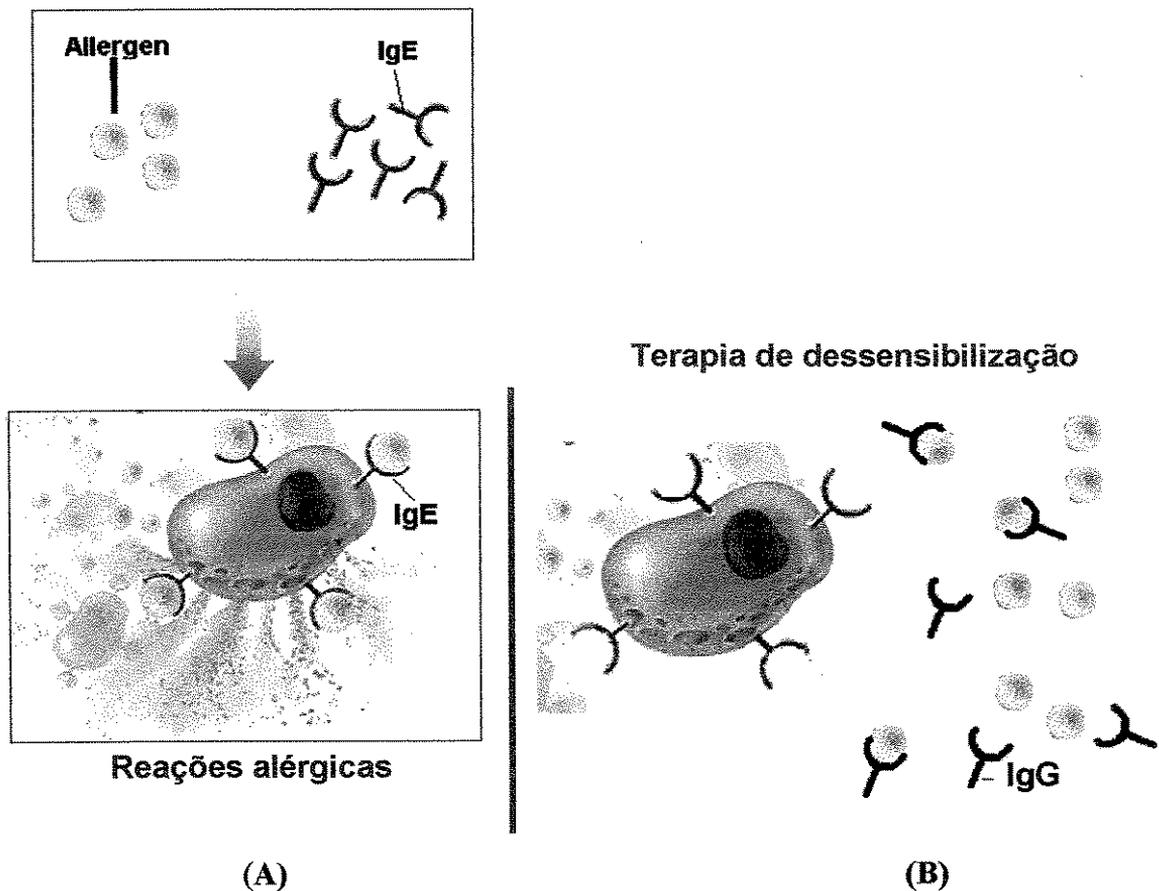
Através da análise gráfica dos dados, observamos que não houve diferenças nos níveis de IgG e IgE quando lipossomas convencionais ou furtivos foram usados na administração seqüencial. Este resultado era esperado, uma vez que a estabilidade em plasma e os resultados de liberação destes lipossomas foram semelhantes, portanto, a apresentação da proteína ao sistema imune pelos veículos são similares e ocorre por desestruturação do veículo. Minato et al. (2003) também estudaram a resposta imunológica de OVA encapsulada em lipossomas convencionais e furtivos (6% mol PEG<sup>2000</sup>) quando administrados, via oral, em animais a duas concentrações (20 ou 50mM). Os resultados do teste *in vivo* mostraram que não houve diferença nos níveis de IgG, até 42º dia, quando ou lipossomas convencionais ou furtivos (20mM) encapsulando OVA foram administrados nos animais. Os autores observaram também que os níveis de IgG não aumentaram quando a OVA foi encapsulada em lipossomas convencionais e furtivos de 20 mM, uma vez que os valores obtidos foram semelhantes à solução de OVA livre. Aumento de três vezes nos níveis de IgG em relação à solução de OVA livre foi obtido somente quando a proteína foi encapsulada em lipossomas convencionais de 50mM. A massa de OVA administrada nos lipossomas de 20mM foi de 0,8mg e 1,1mg para os lipossomas de 50mM. Vale ressaltar que os animais receberam duas imunizações (0 e 2º dia) seguida de uma dose reforço no 28º dia.

Assim, pode-se concluir que os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com o estudo de Minato et al (2003). O fato dos níveis de IgG de lipossomas convencionais, lipossomas furtivos e solução de OVA apresentarem valores semelhantes pode estar relacionado com a concentração dos lipossomas injetados e a dose de OVA administrada.

Os nossos resultados apresentados através dos gráficos das Figuras 44 e 45 mostram que durante 15, 30, 45 e 60 dias, os lipossomas convencionais e furtivos com microesferas mantiveram os níveis de IgG e IgE próximos daqueles do animal sensibilizado. Os tempos estudados foram insuficientes para mostrar diferenças nos níveis de IgG para os lipossomas e microesferas vazios ou com OVA encapsulada.

Embora os níveis de IgE tenham sido constantes, a manutenção dos níveis de IgG com única dose é satisfatória para a terapia de dessensibilização, pois as IgGs

podem competir com as IgEs da superfície dos mastócitos pelo alérgeno. A captura do alérgeno pelas imunoglobulinas G, impede ou reduz a ligação IgE-alérgeno, reduzindo ou eliminando o desencadeamento das reações alérgicas (Esquema 2). A manutenção dos níveis de IgG pode não impedir completamente a reação inflamatória, porém deve atenuar significativamente os sintomas provocados pelas reações alérgicas.



**Esquema 2** – Ligação antígeno-imunoglobulina E, desencadeando reação inflamatória (A) e competição de IgG pelo alérgeno (B), eliminando ou reduzindo a ligação alérgeno-IgE (superfície dos mastócitos).

Basomba et al (2002) sugerem em seu trabalho que os níveis de IgE levaram meses para decrescer. Enquanto os autores realizaram estudos em humanos por um

ano e seis meses, nós estudamos apenas por um período de dois meses, provavelmente tempo insuficiente para verificarmos a redução dos níveis de IgE. Basomba et al obtiveram bons resultados clínicos com atenuação dos sintomas em 60% dos pacientes tratados com o alérgeno *D. pteronyssinus* encapsulado em lipossomas convencionais. Os autores conseguiram reduzir o número de aplicações da terapia de dessensibilização de 13 para 8, usando alérgeno encapsulado. Os autores relatam que os níveis de IgG dos pacientes aumentaram significativamente no período de tratamento, mas cita que os níveis de IgE aumentaram inicialmente e decresceram gradualmente até valores normais somente após alguns meses.

Um fator importante que também pode influenciar os níveis de IgE é a dose de alérgeno a ser administrada nos animais. Esse fato foi comprovado por Fattal et al (2002) que estudaram a resposta imunológica de beta-lactoglobulina (BLG) encapsulada em microesferas de PLGA (75:25) após administração oral em camundongos BALB/c. Os resultados dos autores mostraram que os níveis de IgE humoral de BLG em salina (0.5ug/g animal), BLG encapsulada em microesferas de PLGA (500ug/g animal) e de microesferas vazias foram semelhantes após 28 dias de análise. Os autores ainda testaram várias doses e concluíram que quando BLG encapsulada em microesferas na concentração 0,5ug/g animal foi administrada, os níveis de IgE humoral foram reduzidos.

Outros trabalhos da literatura mostraram resultados similares aos obtidos nesse trabalho, como o de Challacombe et al. (1997), que relatam níveis semelhantes de IgG de antígenos encapsulados em microesferas e em solução. Esses autores estudaram a resposta imunológica de OVA encapsulada em microesferas (3µm) de PLGA 50:50 (RG506) após administração oral em camundongos BALB/c. Os animais foram imunizados no primeiro dia com dose reforço na quarta semana. A dose de OVA administrada variou de 100 a 800ug. Os resultados mostraram que os níveis de IgG anti-OVA foram baixos e iguais tanto para OVA encapsulada em microesferas quanto para OVA em solução salina até a quarta semana. Na sexta semana, após a administração da dose reforço (4ª semana), é que os níveis de IgG de OVA encapsulada em microesferas aumentaram a valores significativamente maiores que os níveis de OVA em solução. Na oitava semana,

período final de análise, os níveis de IgG para OVA encapsulada e OVA em salina foram semelhantes.

O'Hagan et al. (1993) foi um dos autores que mostraram que os níveis de IgG de OVA encapsulada em microesferas são semelhantes aos níveis de OVA adsorvida em hidróxido de alumínio. Os autores estudaram a resposta imunológica, IgG, de OVA encapsulada em microesferas de PLGA formadas pelos polímeros RG 506, RG 508 e RG 755 através da administração subcutânea em BALB/c. A massa de OVA administrada em hidróxido de alumínio ou microesferas foi de 300µg. Os resultados indicaram que, em comparação com OVA adsorvida em hidróxido de alumínio, os níveis de IgG de OVA em microesferas foi maior a partir da segunda semana. Esses níveis alcançaram um valor máximo na décima semana e a partir da 12ª semana, os valores de IgG para OVA encapsulada ou adsorvida em hidróxido de alumínio foram semelhantes, mantendo-se elevados até a 52ª semana. Os mesmos autores estudaram também o efeito do tamanho da partícula na resposta imunológica e concluíram que não há variação nos níveis de IgG quando 100ug de OVA é encapsulada em microesferas de 1,5um ou 73um ou adsorvida em hidróxido de alumínio. O período de observação foi de 6 semanas.

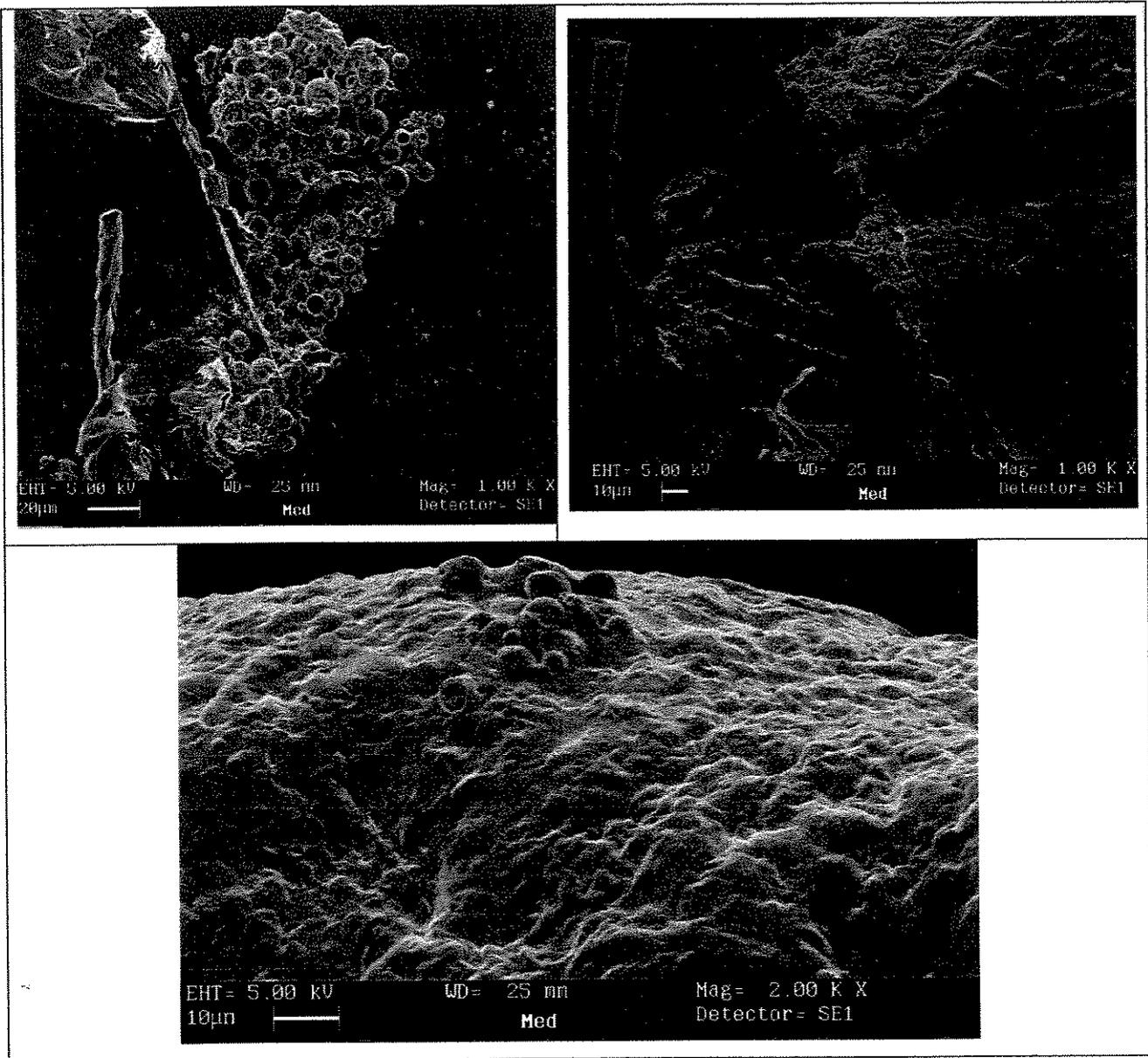
A maioria dos artigos disoníveis na literatura, com alérgenos encapsulados em lipossomas, relata a utilização de sub-doses nos testes *in vivo* (quantidades pequenas – 2,5-10ug). A dose utilizada em nosso trabalho, 10ug OVA com lipossomas e 50ug OVA com microesferas, assegura o desencadeamento de reações alérgicas e foi baseada no protocolo clássico da terapia de dessensibilização. Outro ponto relatado na literatura é que os trabalhos com lipossomas para o tratamento da alergia utilizam doses reforço, enquanto que o protocolo utilizado neste trabalho através da administração seqüencial somente utiliza duas aplicações, eliminando a necessidade de doses reforços ao longo do tratamento.

Comparando com outros trabalhos, os nossos resultados apresentam-se promissores, pois com a administração seqüencial de lipossomas (10 µg OVA) e microesferas (50 µg OVA) sem dose reforço, conseguimos manter satisfatoriamente, por 60 dias, os níveis de IgG, embora os níveis de IgE também tenham se mantido.

Os trabalhos da literatura abordam, em geral, que a manutenção de níveis elevados de IgE pode estar relacionada à massa de OVA, concentração de lipossomas e rota administrada. Se a dose de OVA a ser administrada for variada, melhores resultados podem ser obtidos. Não há na literatura disponível, trabalhos que abordem a administração seqüencial (via parenteral) de OVA em lipossomas e microesferas de PLGA (RG 503) com avaliação imunológica dos níveis de IgG e IgE por dois meses.

Como os efeitos da produção de IgE podem permanecer por meses, a constatação da diminuição dos seus níveis nos protocolos de dessensibilização serão visualizados após um período mínimo de 120 dias. Assim, novos ensaios de dessensibilização devem ser realizados e prosseguirem por até 90 ou 120 dias, para que os resultados sejam conclusivos.

Os animais que foram sacrificados ainda apresentavam depósitos no sítio de injeção, conforme mostrado nas fotomicrografias na Figura 46. Esta análise sugere que as microesferas utilizadas neste trabalho não apresentaram degradação total *in vivo* no período de análise (60 dias), podendo ainda haver OVA para ser liberada. Este fato reforça a justificativa de melhor avaliar a resposta imunológica por um período superior a 60 dias.



**Figura 46** – Fotomicrografias de microesferas de PLGA (ME-503) coletadas dos animais (*in vivo*) após 60 dias de imunização.

## 6 – Conclusões Gerais

---

- A produção de lipossomas e microesferas poliméricas encapsulando proteínas alergênicas é factível e os processos usados podem ser escalonados.
- Ambos veículos foram estáveis quando estocados na forma liofilizada.
- As preparações puderam ser esterilizadas por filtração, permitindo as aplicações *in vivo*.
- A ação conjunta dos sistemas lipossomais (liberação rápida) e poliméricos (liberação lenta) na administração sequencial permitiu a apresentação contínua de proteínas alergênicas ao sistema imunológico com a liberação variando de horas a meses.
- Apesar dos níveis de IgE, a manutenção dos níveis de IgG específica elevados sugerem o uso potencial desses veículos na terapia de dessensibilização da reação alérgica.

## 7 – Sugestões para Trabalhos Futuros

---

Para a seqüência desta linha de pesquisa são sugeridos os seguintes temas para próximos trabalhos:

- Estender para 90 e 120 dias o período de análise dos testes *in vivo*, a fim de verificar o comportamento do sistema até a total degradação das microesferas.
- Estudar a adição de polietileno glicol (PEG<sup>2000</sup>) na formulação polimérica de PLGA 50:50 a fim de melhorar a liberação do alérgeno.
- Preparar e caracterizar microesferas bioadesivas com alérgeno e avaliar a resposta imunológica dessas partículas administradas via nasal.
- Investir na separação das proteínas alergênicas do fungo *Drechslera monoceras* para posterior avaliação em testes *in vivo*.

## 8 – Referências Bibliográficas

---

- ADLER, M., LEE, G. **Stability and surface activity of lactate dehydrogenase in spray dried trehalose**. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, v.88, p.199-208, 1999.
- ADRIAN, G., HUANG, L. **Entrapment of protein in phosphatidylcholine vesicles**. *Biochemistry*, v.18, p.5610-5614, 1979.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzima e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Editora UFV: Viçosa. 574p., 1998.
- ALLISON, A.C., GREGORIADIS, G. **Liposomes as immunological adjuvants**. *Nature*, v.252, p.252, 1974.
- ALKHALAF, W., PIARD, J.C., ELSODA, M., GRIPON, J.C., DESMAZEAUD, M., VASSAL, L. **Liposomes as proteinase carriers for the accelerated ripening of Saint-Paulin type cheese**. *Journal of Food Science*, v.53, p.1674-1679, 1988.
- ALONSO, M.J. **Nanoparticulate Drug Carrier Technology**, Chapter 7, in: COHEN, C., BERNSTEIN, H. *Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines*, Marcel Dekker Inc., New York, 1996.
- ALONSO, M.J., VILA, A., SÁNCHEZ, A., TOBIO, M., CALVO, P. **Design of biodegradable particles for protein delivery**. *Journal of controlled Release*, v. 78, pp.15-24, 2002.
- ARORA, N., GANGAL, S.V. **Allergen entrapped in liposomes reduce allergenicity and induce immunogenicity on repeated injections in mice**. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, v.91, p.22-29, 1990.

- ARORA, N. & GANGAL, S.V. **Efficacy of liposome entrapped allergen in down regulation of IgE response in mice.** *Clinical and Experimental Allergy*, v.32, p.35-42, 1992.
- AUDERA, C., RAMIREZ, J., SOLER, E., CARREIRA, J. **Liposomes as carriers for allergy immunotherapy.** *Clinical Experimental Allergy*, v.21, p.139-144, 1991.
- BACA-ESTRADA, M.E., FOLDVARI, M., BABIUK, S.L., BABIUK, L.A. **Vaccine delivery: lipid-based delivery systems.** *Journal of Biotechnology*. v.83, p.91-104, 2000.
- BANGHAM, A.D., HORNE, R.W. **Negative staining of phospholipids and their structured modification by surface active agents as observed in the electron microscope.** *Journal of Molecular Biology*, v.8, p. 660-668, 1964.
- BARROS NETO, B., SCARMINO, I.S, BRUNS, R.R. **Planejamento e Otimização de Experimentos.** Campinas: Editora da Unicamp, 1996.
- BASOMBA, A. **Situación actual del empleo de antígenos en alergia.** In: *Purificación y estandarización de alérgenos*, Madrid, 1982.
- BASOMBA, A., TABAR, A.I., DE ROJAS, D.H., GARCIA, B.E., ALAMAR, R., OLAGUIBEL, J.M., PRADO, J.M., MARTIN, S., RICO, P. **Allergen vaccination with a liposome-encapsulated extract of *Dermatophagoides pteronyssinus*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in asthmatic patients.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 109, p. 943-948, 2002.
- BATANERO, E., BARRAL, P., VILLALBA, M., RODRIGUEZ, R. **Biodegradable poly(dl-lactide-co-glycolide) microparticles as a vehicle for allergen-specific vaccines: a study performed with Ole e 1, the main allergen of olive pollen.** *Journal of Immunological Methods*, v. 259, pp.905-911, 1999.
- BRADFORD, M.M. **Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

- BRANCHU, S., FORBES, R.T., YORK, P., PETREN, S., NYQVIST, H., CAMBER, O.  
**Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inhibits spray-drying-induced inactivation of  $\beta$ -galactosidase.** Journal of Pharmaceutical Science, v.88, p.905-911, 1999.
- BRANNON-PEPPAS, L. <http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>, 2003.
- BUCK, N., GAMBALE, V., GAMBALE, W., PAULA, C.R. **Airborne fungi of presidente-prudente SP, Brazil.** Revista de Microbiologia, v.16, p.9-14, 1985.
- CABRAL, E.C.M., HENNIES, P.T., CORREIA, C.R.D., ZOLLNER, R.L., SANTANA, M.H.A.  
**Preparation and characterization of diacetylene polymerized liposomes for detection of autoantibodies.** Journal of Liposome Research. , v.13, p.199-211, 2003.
- CEVC, G. **Phospholipid Handbook.** New York:Marcel Dekker, 1993.
- CHALLACOMBE, S.J., RAHMAN, D., O'HAGAN, D.T. **Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable microparticles.** Vaccine, v. 15, p.169-175, 1997.
- CHEN, P.S., TORIBARA, T.Y., WARNER, H. **Microdetermination of phosphorous.** Analytical Chemistry, v.28, p.1756-1758, 1956.
- CLELAND, J.L., DAUGHERTY, A., MRSNY, R. **Emerging protein delivery methods.** Current Opinions in Biotechnology, v.12, p. 212-219, 2001.
- COHEN, C., BERNSTEIN, H. **Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines,** Marcel Dekker Inc., New York, 1996.
- CORTES, F.V., CAEKENBERGHE, D.V. **Freeze Drying: past, present and future.** Annual of Medical Milit Belg., v.11, p. 10-13, 1997.
- COUVREUR, P., BLANCO-PRIETO, M.J., PUISIEUX, F., ROQUES, B. AND FATTAL, E.  
**Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides.** Advance Drug Review. v. 28, p. 85-96, 1997.
- CROCE, J. et al. **Provocation of asthma by non-sporulating molds.** In: Kobayashi, S. & Bellanti, J. A. (ed.) Advances in Asthology. Amsterdam: Excerpta Médica, p. 401-404, 1990.

- CROMMELIN, D.J.A., SCHEREIR, H. **Liposomes** In: Kreuter, Journal of Colloid Drug Delivery, New York: editora Marcel Dekker, p. 73-190, 1994.
- CROWE, J.H., CROWE LM. **Factors affecting the stability of dry liposomes.** Biochimica et Biophysica Acta, v.939, p. 327-334, 1988.
- CROWE, J.H., CROWE, L.M., CARPENTER, J.F., RUDOLPH, A.S., WISTROM, C.A., SPARGO, B.J., ANCHORDOGUY, T.J. **Interactions of sugars with membranes.** Biochimica et Biophysica Acta, v.947, p. 367-384, 1988.
- CROWE, J.H, CROWE LM, CARPENTER JF, WISTROM CA. **Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars.** Biochemical Journal, v.242, p.1-10,1987.
- CROWE, L.M., WOMERSLEY, C., CROWE, J.H., REID, D., APPEL, L., RUDOLPH, A. **Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates.** Biochimica et Biophysica Acta, v.861, p.131-140, 1986.
- CROWE, L.M., CROWE, J.H., RUDOLPH, A., WOMERSLEY, C., APPEL, L. **Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v.242, p.240-247, 1985.
- CROWE, J.H., CROWE, L.M., CHAPMAN, D. **Preservation of membranes in Anhydrobiotic organisms: the role of trehalose.** Science, v.223, p.701-703, 1984.
- DEAN, T. **Liposomes in allergy and immunology.** Clinical Experimental in Allergy, v.23, p.557-561, 1993.
- DELGADO, A., LAVELLE, E.C., HARTSHORNE, M., DAVIS, S.S. **PLG microparticles stabilised using enteric coating polymers as oral vaccine delivery systems.** Vaccine, v.17, p.2927-2938, 1999.
- DIPALI, S.R., KULKARNI, S.B., BETAGERI, G.V. **Comparative study of separation of non-encapsulated drug from unilamellar liposomes by various methods.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.48, p. 1112-1115, 1996.
- DISALVO, E.A. **Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers.** Biophysical Journal, v.78, p.2452-2458, 2000.

EDWARDS, K., ALMGREN, M. **Kinetics of surfactant-induced leakage and growth of unilamellar vesicles.** Progress on Colloid & Surface Science, v. 82, p.190-197, 1990.

EDWARDS, K.; ALMGREN, M. **Surfactant-induced leakage and structural change of lecithin vesicles: effect of surfactant headgroup size.** Langmuir, v. 8, p.824-832, 1992.

Enciclopédia médica, Medline Plus,  
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/encyclopedia.htm>, setembro, 2003.

FAISANT, N., SIEPMANN, J., BENOIT, J.P. **PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model for quantifying drug release.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, v.15, p.355-366, 2002.

FARRELL, S., SIRKAR, K.K. **Controlled release of liposomes.** Journal of Membrane Science, v.127, p. 223-227, 1997.

FATTAL, E., PECQUET, S. COUVREUR, P., ANDREMONT, A. **Biodegradable microparticles for the mucosal delivery of antibacterial and dietary antigens.** International Journal of Pharmaceutics, v. 242, p.15-21, 2002.

FEINBERG, S. M. & LITTLE, H. T. **Mould Allergens: Its importance in Asthma and hay fever.** Wis Medical Journal, v.34, p. 254, 1935.

FOLDVARI, M. **Biphasic multilamellar lipid vesicles.** US Patent nº 5,853,755 ; 29 de dezembro de 1998.

FRÉZARD F, MICHALICK MSM, SOARES CF, DEMICHELI C. **Novel methods for the encapsulation of meglumine antimoniate into liposomes.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 33, p.841-846, 2000.

FRÉZARD, F. **Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.32, p.181-189, 1999.

FRIEDE, M., VANREGENMORTEL, M.H.V., SCHUBER, F. **Lyophilized liposomes as shelf items for the preparation of immunogenic liposome-peptide conjugates.** Analytical. Biochemistry, v.211, p.117-122, 1993.

- GAMBALE, W., PURCHIO, A., CROCE, J. **Airborne fungi of grande-São-Paulo area (Brazil)**. *Revista de Microbiologia*, v.8, p.74-79, 1977.
- GAMBALE, W., PURCHIO, A., PAULA, C.R. **Daily periodicity of airborne fungi from São-Paulo city, Brazil**. *Revista de Microbiologia*, v. 12, p. 176-181, 1981.
- GAMBALE, W., PURCHIO, A., PAULA, C.R. **Influência de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de São Paulo, Brasil**. *Revista de Microbiologia*, v. 14, p. 204-214, 1983.
- GENIN, I., BARRATT, G., THAO, T.X., DELATTRE, J., PUISIEUX, F. **Otimization and characterization of freeze-dried multilamellar liposomes incorporating different standardized allergen extracts**. *Allergy*, v. 49, p.645-652, 1994.
- GENTA, I. et al. **Enzyme loaded biodegradable microspheres in vitro ex vivo evaluation**. *Journal of Controlled Release*, v.77, p.287-295, 2001.
- GREGORIADIS, G. **Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems** Gregoriadis, *Trends in Biotechnology*, v. 13, p. 527-537, 1995.
- GREGORIADIS, G. **Gene Delivery in Liposomes**. Boca Raton: CRC Press, 1995.
- GOPFERICH, A. **Mechanisms of polymer degradation and erosion**. *Biomaterials*, v.17, p. 103-114, 1996.
- GUY, R.H., HADGRAFT, J., KELLAWAY, I.W., TAYLOR, M.J. **Calculations of drug release rates from spherical particles**. *International Journal of Pharmaceutics*, v.11, p.199-207, 1982.
- HASAN, S.D.M., GAMBALE, W., ZOLLNER, R. L., SANTANA, M. H. A. **Fungi allergens produced by solid-state fermentation process optimization and allergen characterization**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105-08, p.403 - 412, 2003.
- HENNIES, P.T., SANTANA, M.H.A., CORREIA, C.R.D. **Synthesis of the diacetylenic phospholipids 1,2-bis(10',12'-heptadecadiynoil)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine and 1,2-bis(4',6'-tricosadiynoil)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.12, p.64 - 72, 2001.

- HORA, M.S., RANA, R.K., NUNBERG, J.H., TICE, T.R., GILLEY, R.M., HUDSON, M.E. **Release of human serum albumin from poly(lactide co-glycolide) microspheres.** *Pharmaceutical Research*, v.7, p. 1190-1194, 1990.
- HORNER, W.E., HELBLING, A., SALVAGGIO, J.E., LEHRER, S.B. **Fungal allergens.** *Clinical Microbiology Reviews*, v.8, p.161-179, 1995.
- How to treat the respiratory allergy, <http://www.rhinocortagua.com/treatments/inhaled.asp>, junho, 2003.
- HUNTER, R.J. **Introduction to Modern Colloid Science.** Oxford University Press, 1993.
- HWANG, S.H., MAITANI, Y., TAKAYAMA, K., NAGAI, T. **High entrapment of insulin and bovine serum albumin into neutral and positively-charged liposomes by the remote loading method.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 48, p.325-329, 2000.
- JAIN, R et al. **Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches.** *Drug Device and Industrial Pharmacy*, v.24, p.703-727, 1998.
- JEFFERY, H., DAVIS, S.S. AND O'HAGAN, D.T. **The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil-in-water) emulsion solvent evaporation technique.** *Pharmaceutical Research*, v.10, p. 362-368, 1993.
- JESSEN, C.E.M. **Encapsulamento de insulina em microesferas de PLGA 50:50: desenvolvimento e caracterização físico-química.** Belo Horizonte:FAFAR, UFMG, 2000. Tese de Mestrado – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
- KAGAWA, Y., RACKER, E. **Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. Reconstitution of vesicles catalysing Pi-adenosine triphosphate exchange.** *Journal of Biological Chemistry*, v.246, p. 5477-5487, 1971.

- KIM, C.K, CHUNG, H.S, LEE, M.K, CHOI, L.N, KIM, M.H. **Development of dried liposomes containing  $\beta$ -galactosidase for the digestion of lactose in milk.** International Journal of Pharmaceutics, v.183, p.185-193, 1999.
- KIRBY, C.J., BROOKER, B.E., LAW, B.A. **Accelerated ripening of cheese using liposome-encapsulated enzyme.** International Journal of Food Science and Technology, v.22, p.355-375, 1987.
- KIRBY, C.J, WHITTLE, C.J, RIGBY, N, COXON, D.T, LAW, B.A. **Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes.** International Journal of Food Science and Technology, v.26, p.437-449, 1991.
- KIRBY, C., GREGORIADIS, G. **Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes.** Biotechnology, v.2, p.979-984, 1984.
- LASIC, D. D. **Liposomes, from Physics to Applications**, Amsterdam: Elsevier, 1993.
- LASIC, D.D., MARTIN, F. **Stealth Liposomes**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1995.
- LEHNINGER. **Principles of Biochemistry**, New York, 1998.
- LICHTENBERG, D., ROBSON, R.J., DENNIS, E.A. **Solubilization of phospholipids by detergents – Structural and kinetic aspects.** Biochimica et Biophysica acta, v. 737, p. 285-304, 1983.
- LICHTENBERG, D. **Characterization of the solubilization of lipids bilayers by surfactants.** Biochimica et Biophysica acta, v. 821, p. 470-478, 1985.
- LIMA, K. SILVA, C.L., JUNIOR, J.M.R. **Microesferas Biodegradáveis: Uma nova alternativa para administração de vacinas de DNA.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n.12, Jan/Fev, p.10-13, 2000.
- Lipossomas em Cosméticos, <http://dadairs.com/liposomes.htm>, Outubro, 2002.
- LOCKEY R.F, BENEDICT L.M, TURKELTAUB P.C, BUKANTZ S.C. **Fatalities from immunotherapy (IT) and skin testing (ST).** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.79, p.660-677, 1987.

- MACHADO, G M R. **Fungos Anemófilos de Áreas da Grande Recife**. Recife: UFPE, 1976. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, 1976.
- MADDEN, T.D. **Protection of large unilamellar vesicles by trehalose during dehydration: retention of vesicles contents**. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.817, p.67-74, 1985.
- MALE, D. **Imunologia**, 3ª edição, São Paulo: editora Manole LTDA, 1988.
- MARTÍNEZ-SANCHO, C., HERRERO-VANRELL, R., NEGRO, S. **Optimization of aciclovir poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for intravitreal administration using a factorial design study**. *International Journal of Pharmaceutics*, v.273, p.45-56, 2004.
- MCWILLIAM A.S, STEWART G.A. **Production of multilamellar, small unilamellar and reverse phase liposomes containing housedust mite allergens: potential adjuvants in the immunotherapy of allergic disease**. *Journal of Immunological Methods*, v.121, p.53-60, 1989.
- MENDES, E. **Alergia no Brasil: alérgenos regionais e imunoterapia**. São Paulo: editora Manole LTDA, 1989.
- MENEZES,E.A. **Fracionamento e caracterização alergênica do extrato de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras***. São Paulo: ICB, USP, 1995. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, 1995.
- MEYER, J., WHITCOMB, L., COLLINS, D. **Efficient encapsulation of proteins within liposomes for slow release *in vivo***. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.199, p. 433-438, 1994.
- MINATO, S., IWANAGA, K., KAKEMI, M., YAMASHITA, S., OKU, N. **Application of polyethyleneglycol (PEG)-modified liposomes for oral vaccine: effect of lipid dose on systemic and mucosal immunity**. *Journal of Controlled Release*, v. 89, p. 189-197, 2003.

- MOGHIMI, S.M., SZEBENI, J. **Stealth liposomes and long-circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties.** Progress in Lipid Research, v.42, p. 463-478, 2003.
- MOHOVIC J, GAMBALE W, CROCE J. **Cutaneous positivity in patients with respiratory allergens to 42 allergenic extracts of air bone fungi isolated in São Paulo, Brasil.** Allergologia et Immunopathologia, v. 16, p. 397-402, 1988.
- MORAES, A.A. **Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade de lipossomas contendo o-carboranilpropilamina, L-p-boronofenilalanina e doxorubicina.** Campinas: FEQ, UNICAMP, 1996. Tese (doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- NAMUR, J.A.M., TAKATA, C.S., MORO, A.M., POLITI, M.J., SOARES DE ARAUJO, P., CUCCOVIA, I.M., BUENO DA COSTA, M.H. **Lactic acid triggers, *in vitro*, thiomersal to degrade protein in the presence of PLGA microspheres.** International Journal of Pharmaceutics, v.273, p. 1-8, 2004.
- NEW, R.R.C. **Liposomes: a Pratical Approach.** New York: IRL press, 1990.
- NEWMAN, K.D., SAMUEL, J., KWON, G. **Ovalbumin peptide encapsulated in poly(D,L lactic-co-glycolic acid) microspheres is capable of inducing a T helper type 1 immune response.** Journal of Controlled Release, v.54, p.49-59, 1998.
- NICHOLAS, A.R., SCOTT, M.J., KENNEDY, N.I., JONES, M.N. **Effect of grafted polyethylene glycol (PEG) on the size, encapsulation efficiency and permeability of vesicles.** Biochimica et Biophysica Acta, v.1463, p. 167-178, 2000.
- NORMAN, PS. **Role of immunotherapy in asthma.** Chest, 87S, p. 62S-64S, 1985.
- NUNHEZ, J.R., REIS, L.M.  
<http://www.feq.unicamp.br/~nunhez/download/19313/19313.pdf>, Junho, 2004.
- O'HAGAN, D.T., JEFFERY, H., DAVIS, S.S. **Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles.** Vaccine, v.11, p. 965-969, 1993.

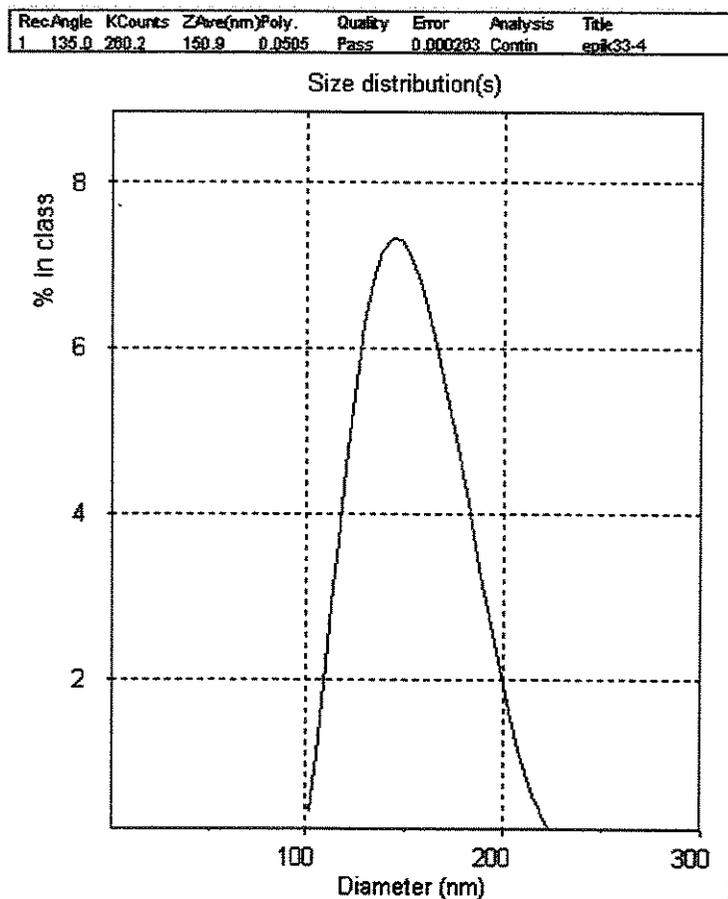
- ORTIZ, G.P.T. Estado cristalino e vítreo em açúcares e sua influência nas propriedades funcionais de alimentos. <http://www.tgvitrea.htm>, Maio, 2002.
- OSTROWSKY, N. Liposome size measurements by photon correlation spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.64, p.45-64, 1993.
- PURCHIO A, GAMBALE W, PAULA C.R, UGOLINI C, REMIE C.A. Airbone fungi of Baixada Santista, State of São Paulo, Brazil. *Revista de Microbiologia*, v. 15, p. 258-265, 1984.
- RIBAS, A.M. Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. Campinas:FEQ, UNICAMP, 1997. Tese Mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Immunology*, London: Mosby, 1995.
- QUINTILIO W, SATO R.A, SANT'ANNA O.A, ESTEVES M.I, SESSO A, DE ARAUJO P.S, DA COSTA M.H.B. Large unilamellar vesicles as trehalose-stabilised vehicles for vaccines: storage time and *in vivo* studies. *Journal of Controlled Release*, v.67, p.409-413, 2000.
- SANDOR, M., ENSCORE, D., WESTON, P., MATHIOWITZ, E. Effect of protein molecular weight on release from micron-sized PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, v.76, p. 297-311, 2001.
- SARAIVA, C.P. Extração de proteínas com potencial alergênico da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* produzida por fermentação em estado sólido. Campinas: FEQ, UNICAMP, 2001. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- SHAHIDI F, HAN X.Q. Encapsulation of food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 33, p. 501-547, 1993.
- SCHRIER, J. A., DELUCA, P.P. Porous bone morphogenetic protein-2 microspheres: polymer binding and *in vitro* release. *AAPS PHARMSCITECH*, v.2, artigo 17, 2001.

- SCHNEIDER, T., SACHSE, A., LEIKE, J., ROSSLING, G., SCHMIDTGEN, M., DRECHSLER, M., BRANDL, M. **Surface modification of continuously extruded contrast-carrying liposomes: effect on their physical properties.** *International Journal of Pharmaceutics*, v.132, p.9-21, 1996.
- SHARIF, S. AND O'HAGAN, D.T. **A comparison of alternative methods for the determination of the levels of protein entrapped in poly(lactide-co-glycolide) microparticles.** *International Journal of Pharmaceutics*, v.115, p.259, 1995.
- SHEW, R.L.; DEAMER, D.W. **A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v.816, p.1-8, 1985.
- SIEPMANN, J. GOPFERICH, A. **Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 48, p.229-247, 2001.
- SINGH, B.P., SRIDHARA, S., ARORA, N., GANGAL, S.V. **Evaluation of protein assay methods for pollen and fungal spore extracts.** *Biochemistry International*, v.27, p. 477-484, 1992.
- Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia, <http://www.sbai.com.br>, Boletim 26.06.2003.
- SRINATH, P., DIWAN, P.V. **Stelath liposomes – an overview.** *Indian Journal of Pharmacology*, v.26, p. 179-184, 1994.
- STORM, G.; CROMMELIN, J.A. **Liposomes: quo vadis?** *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v.1, p.19-31, 1998.
- VAN DER WERF, P. J. **Mould Fungi in Bronchial Asthma.** H. E. Sterfert Kroese, N. V. Leiden, 1958.
- VIERA, L.I., ALONSO-ROMANOWSKI, S., BOROVYAGIN, V., FELIZ, M.R, DISALVO, E.A. **Properties of gel phase lipid-trehalose bilayers upon rehydration.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1145, p.157-67, 1993.
- VANDERVOORT, J., LUDWIG, A. **Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles : a factorial design study.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 238, p. 77-92, 2002.

- VISWANATHAN, N.B., PATIL, S.S., PANDIT, J.K., LELE, A.K., KULKARNI, M.G., MASHELKAR, R.A. **Morphological changes in degrading PLGA and P(DL-LA microspheres: implications for the design of controlled release systems.** Journal of Microencapsulation, v.18, p.783-800, 2001.
- TZANNIS S.T, PRESTRELSKI S.J. **Activity-stability considerations of trypsinogen during spray drying: effects of sucrose.** Journal of Pharmaceutical Science, v. 88, p.351-359, 1999.
- TZANNIS S.T, PRESTRELSKI S.J. **Moisture effects on protein-excipient interactions in spray dried powders. Nature of destabilizing effects of sucrose.** Journal of Pharmaceutical Science, v. 88, p.360-369, 1999.
- YEH, M. JENKINS, P.G., DAVIS, S.S., COOMBES, A.G.A. **Improving the delivery capacity of microparticle systems using blends of poly(DL-Lactide co-glycolide) and poly(ethylene glycol).** Journal of Controlled Release, v.37, p.1-9, 1995.
- YUNGINGER, J.W. **Allergens: recent advances.** Pediatric Clinics of North America, v. 35, p. 981-93, 1988.
- WAGNER, W., BECKMAN, K., EDINGER, M.G., DEODHAR, S., BATTISTO, J.R. **Immunotherapy with allergen sequestered in liposomes.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, v.73, p.118-121, 1984.
- WALLS, A.F. **Liposomes for allergy immunotherapy?** Clinical Experimental Allergy, v.22, p.1-2, 1992.
- WARREN, R.C. **Physics and the Architecture of Cell Membranes.** IOP Publishing Ltd., Bristol, 1987.
- WOLKERS, W.F., OLDENHOF, H., TABLIN, F., CROWE, J.H. **Preservation of dried liposomes in the presence of sugar and phosphate.** Biochimica et Biophysica Acta, v.1661, p. 125– 134, 2004.
- WOODLE, M.C., LASIC, D.D. **Sterically stabilized liposomes.** Biochimica et Biophysica Acta, v.1113, p. 171-199, 1992.

# Anexo I

## Diâmetro hidrodinâmico médio e Distribuição de tamanhos de Lipossomas Convencionais (antes do processo de liofilização)



Size(nm)	Intensity	Volume	Number
102.2	0.4	0.6	0.6
105.7	1.1	1.1	1.1
109.4	1.9	2.0	2.0
113.1	2.9	2.9	2.9
117.0	3.9	3.8	3.8
121.1	4.8	4.8	4.8
125.2	5.6	5.6	5.6
129.5	6.3	6.3	6.3
134.0	6.8	6.8	6.8
138.6	7.2	7.1	7.1
143.4	7.3	7.3	7.3
148.3	7.3	7.3	7.3
153.4	7.1	7.1	7.1
158.7	6.8	6.7	6.7
164.2	6.3	6.2	6.2
169.8	5.6	5.6	5.6
175.7	4.9	4.9	4.9
181.7	4.1	4.1	4.1
188.0	3.3	3.3	3.3
194.4	2.6	2.6	2.6
201.1	1.8	1.8	1.8
208.0	1.2	1.2	1.2
215.2	0.6	0.6	0.6
222.8	0.2	0.3	0.3

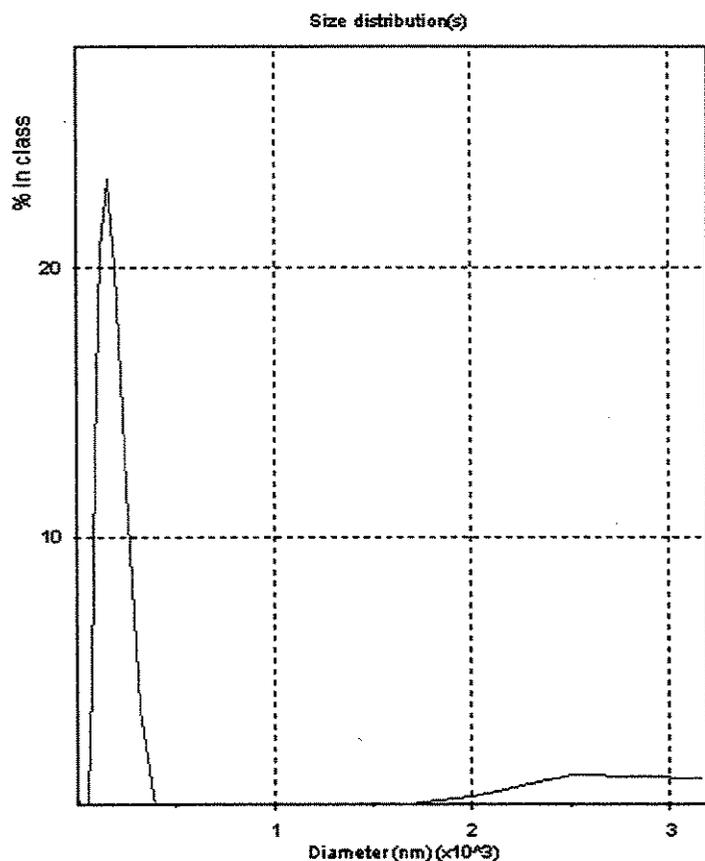
Peak Analysis by intensity			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	149.6	69.2

Peak Analysis by volume			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	149.6	69.4

Peak Analysis by number			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	149.6	69.4

## Diâmetro hidrodinâmico médio e Distribuição de tamanhos de Lipossomas Convencionais – DRVs

RecAngle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.	Quality	Error	Analysis	Title
1	90.0	280.9	223.9	0.446	Pass	0.000151	None conv/treal



Size(nm)	Intensity	Volume	Number
15.8	0.2	0.2	0.2
19.9	0.0	0.1	0.1
25.1	0.0	0.0	0.0
31.6	0.0	0.0	0.0
39.8	0.0	0.0	0.0
50.1	0.0	0.1	0.1
63.1	0.2	1.3	1.3
79.4	4.6	5.6	5.6
100.0	13.0	12.8	12.8
125.9	20.7	19.4	19.4
158.5	23.3	21.8	21.8
199.5	19.9	18.8	18.8
251.2	11.8	11.8	11.8
316.3	3.7	4.8	4.8
398.2	0.0	0.9	0.9
501.4	0.0	0.0	0.0
631.3	0.0	0.0	0.0
794.8	0.0	0.0	0.0
1000.7	0.0	0.0	0.0
1259.9	0.0	0.0	0.0
1586.3	0.0	0.1	0.1
1997.2	0.3	0.5	0.5
2514.6	1.2	0.9	0.9
3166.0	1.0	1.1	1.1

Peak Analysis by intensity			
Peak	Area	Mean	Width
1	97.3	165.4	155.7
2	2.5	2709.8	363.9

Peak Analysis by volume			
Peak	Area	Mean	Width
1	97.3	167.6	165.0
2	2.5	2662.7	439.0

Peak Analysis by number			
Peak	Area	Mean	Width
1	97.3	167.6	165.0
2	2.5	2662.7	439.0

## Diâmetro hidrodinâmico médio e Distribuição de tamanhos de Lipossomas Furtivos (antes do processo de liofilização)

RecAngle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.	Quality	Error	Analysis	Title
1	90.0	141.1	131.8	0.0772	Pass	0.000376	Contin

Size(nm)	Intensity	Volume	Number
81.5	0.5	0.7	0.7
84.9	1.3	1.3	1.3
88.6	2.2	2.3	2.3
92.4	3.3	3.3	3.3
96.3	4.4	4.3	4.3
100.4	5.3	5.3	5.3
104.7	6.1	6.1	6.1
109.2	6.8	6.7	6.7
113.8	7.3	7.2	7.2
118.7	7.5	7.4	7.4
123.8	7.5	7.5	7.5
129.1	7.4	7.3	7.3
134.6	7.0	7.0	7.0
140.3	6.5	6.5	6.5
146.3	5.9	5.9	5.9
152.6	5.2	5.2	5.2
159.1	4.4	4.4	4.4
165.9	3.6	3.6	3.6
173.0	2.8	2.8	2.8
180.4	2.1	2.1	2.1
188.1	1.4	1.4	1.4
196.1	0.9	0.9	0.9
204.5	0.4	0.5	0.5
213.2	0.1	0.2	0.2

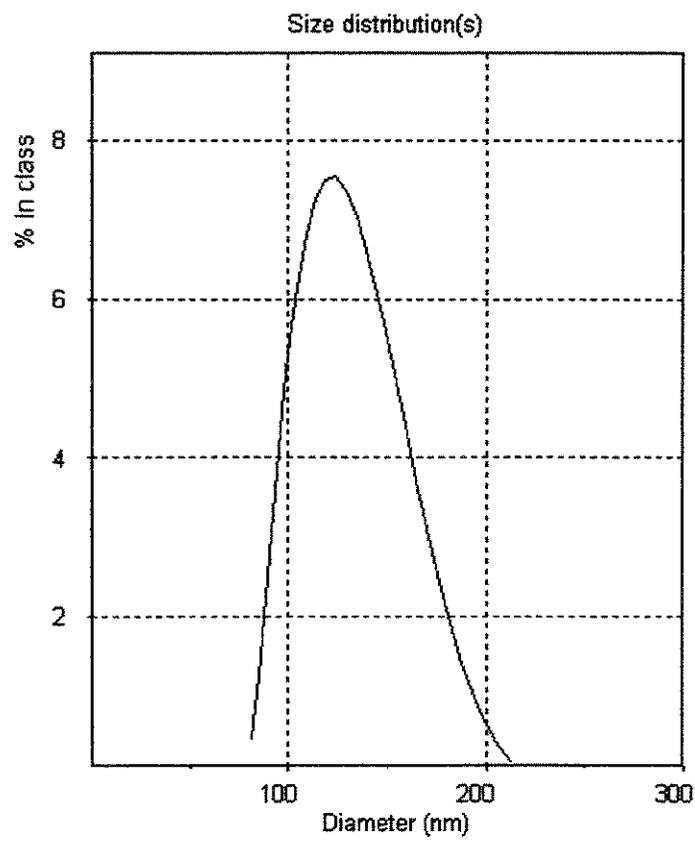
Peak Analysis by intensity			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	128.3	70.4

Peak Analysis by volume			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	128.3	70.7

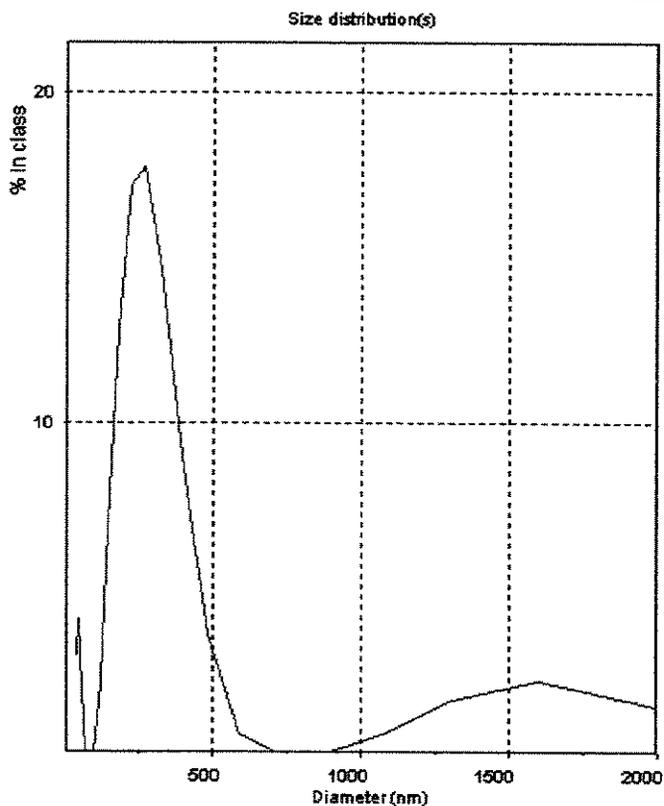
  

Peak Analysis by number			
Peak	Area	Mean	Width
1	100.0	128.3	70.7



## Diâmetro hidrodinâmico médio e Distribuição de tamanhos de Lipossomas Furtivos – DRVs

RecAngle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.	Quality	Error	Analysis	Title	
1	90.0	78.3	355.8	0.493	Pass	0.000143	None	stealthDRV



Size(nm)	Intensity	Volume	Number
36.6	3.0	3.3	3.3
43.5	4.1	3.3	3.3
53.1	2.0	2.0	2.0
64.9	0.0	0.6	0.6
79.3	0.0	0.0	0.0
96.9	0.0	0.5	0.5
118.3	2.1	2.8	2.8
144.5	6.9	7.2	7.2
176.5	12.8	12.4	12.4
215.7	17.2	16.3	16.3
263.5	17.8	16.9	16.9
321.9	14.7	14.0	14.0
393.3	9.0	9.1	9.1
480.4	3.6	4.2	4.2
586.9	0.6	1.2	1.2
717.1	0.0	0.1	0.1
876.0	0.0	0.1	0.1
1070.2	0.6	0.7	0.7
1307.4	1.6	1.5	1.5
1597.3	2.2	1.9	1.9
1951.4	1.5	1.4	1.4
2383.9	0.4	0.6	0.6
2912.4	0.0	0.1	0.1
3558.0	0.0	0.0	0.0

Peak Analysis by intensity			
Peak	Area	Mean	Width
1	9.1	43.0	9.5
2	84.7	262.6	240.0
3	6.2	1604.4	913.7

Peak Analysis by volume			
Peak	Area	Mean	Width
1	9.1	44.0	12.6
2	84.7	266.3	252.5
3	6.2	1620.5	1038.2

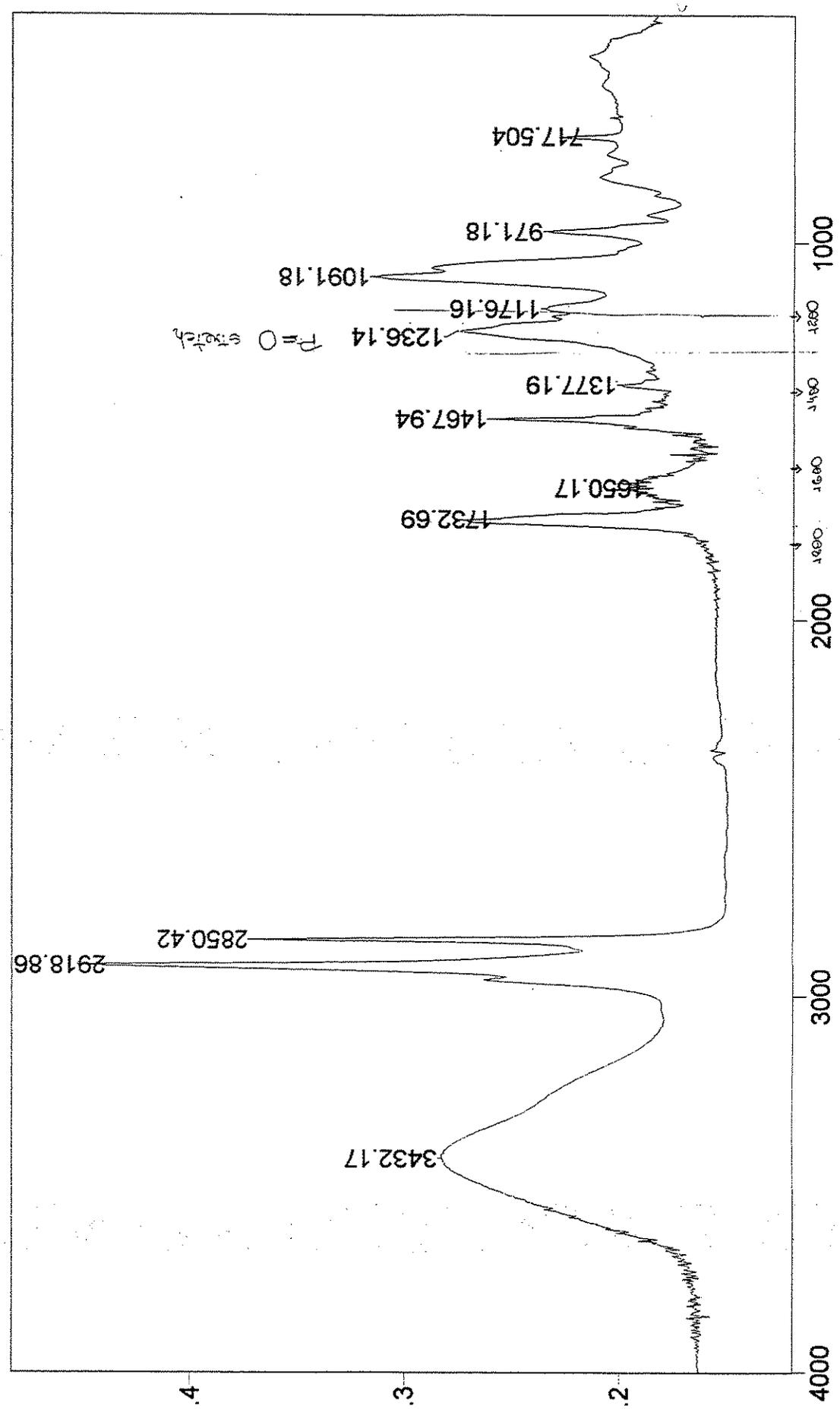
Peak Analysis by number			
Peak	Area	Mean	Width
1	9.1	44.0	12.6
2	84.7	266.3	252.5
3	6.2	1620.5	1038.2

## **Anexo II**

---

Sample Description: Elaine KBr

Scans = 32 Res = 4 cm-1 20 scans/min Apod = Cosine

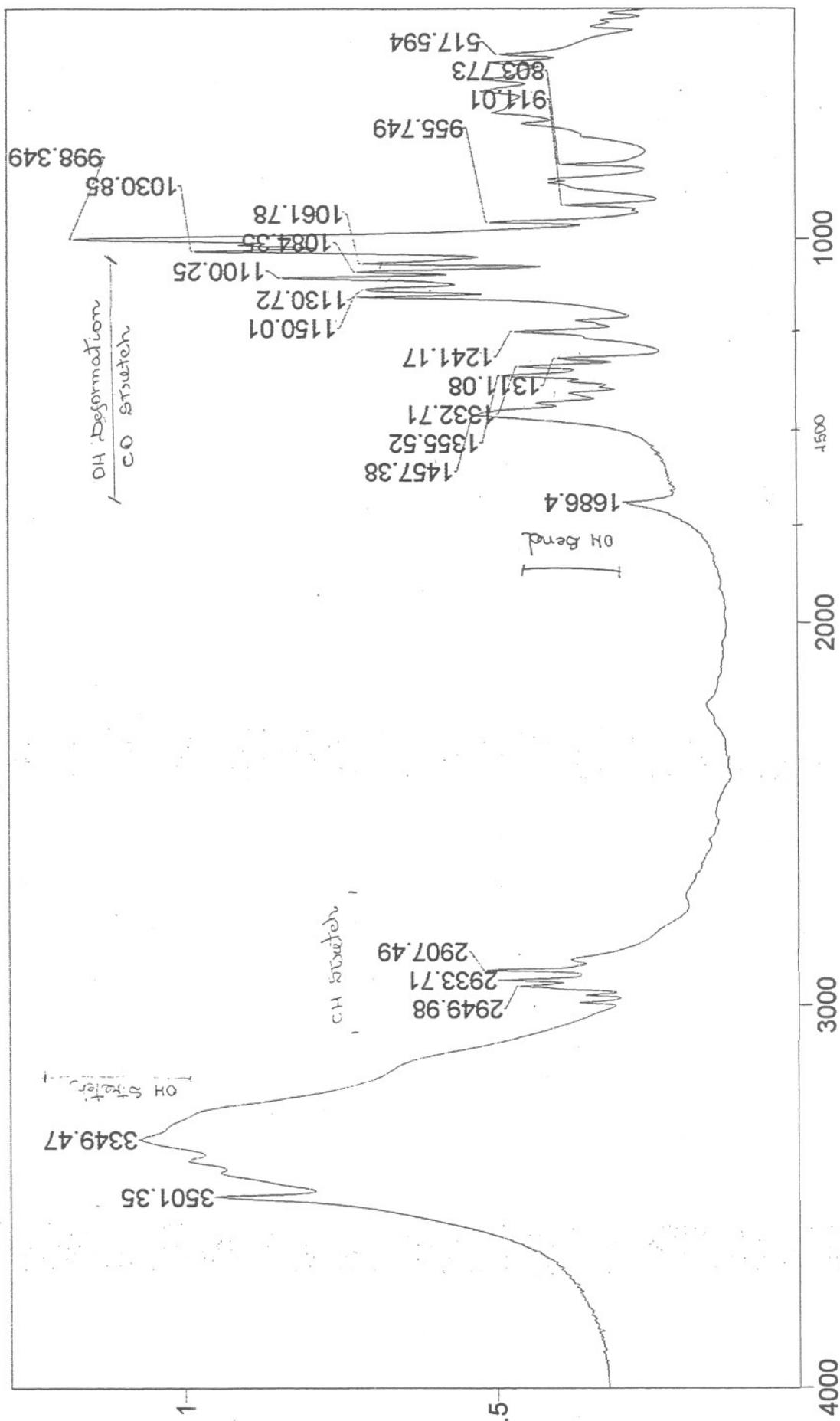


Sample Description: Elaine KBr

Apod = Cosine

Res = 4 cm-1 20 scans/min

Scans = 32



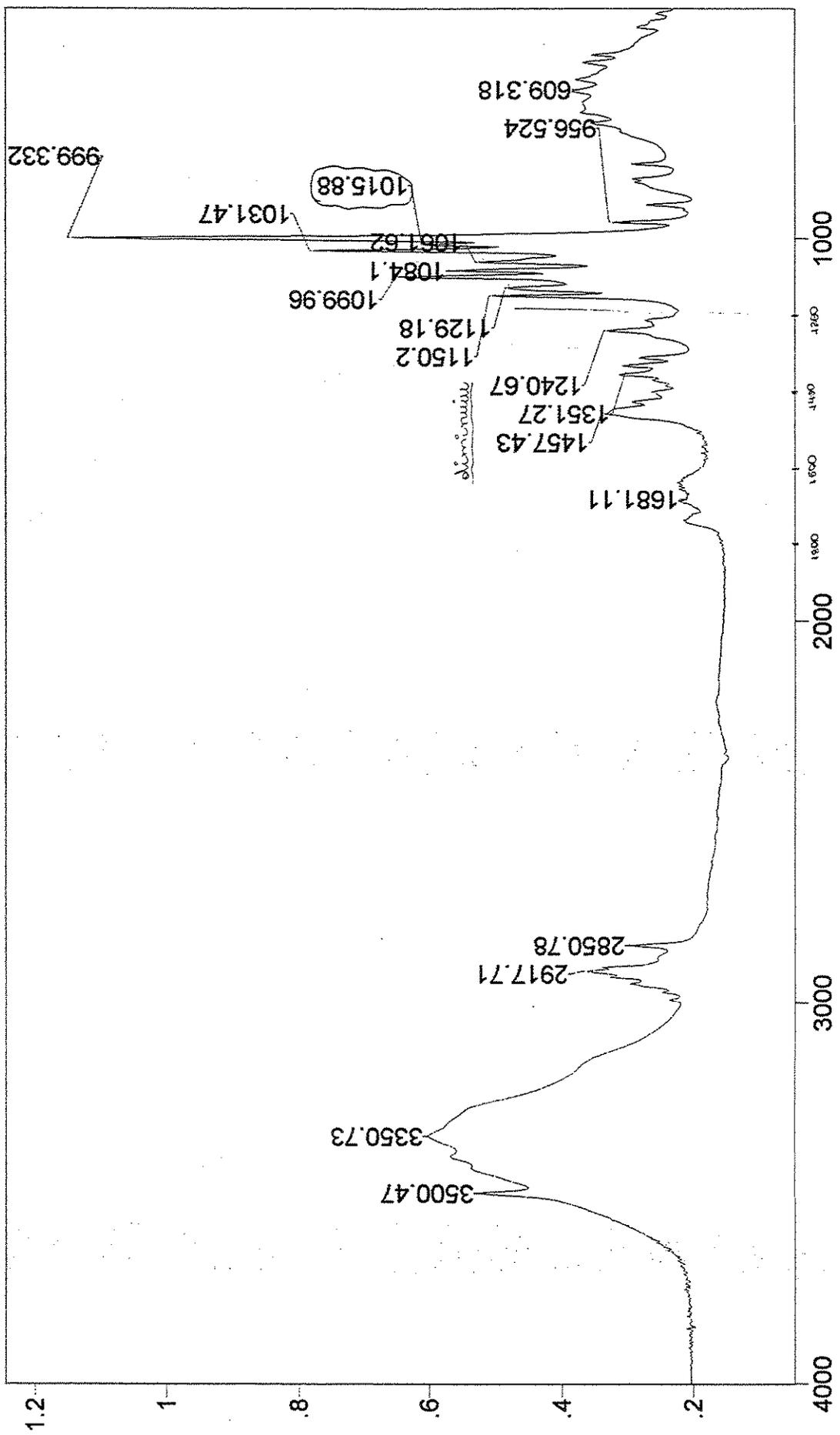
Absorbance / Wavenumber (cm-1)

Sample Description: Elaine KBr

Apod = Cosine

Res = 4 cm-1 20 scans/min

Scans = 32



20/04/02 14:57

Mode = 2 (Mid-IR)

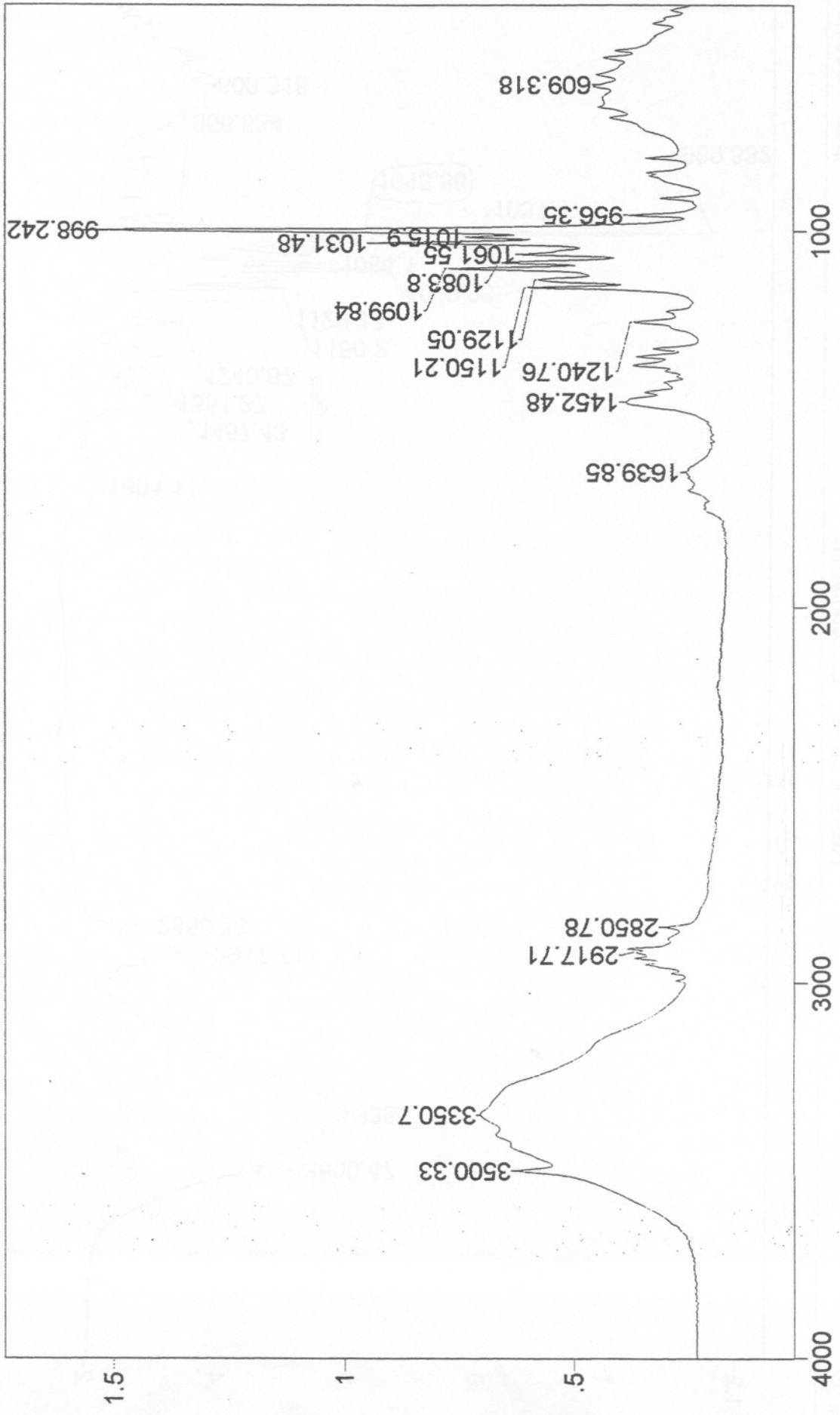
File # 2 : 314 LIP. FURTINOS C/  
TREALOSE

Sample Description: Elaine KBr

Res = 4 cm-1 20 scans/min

Scans = 32

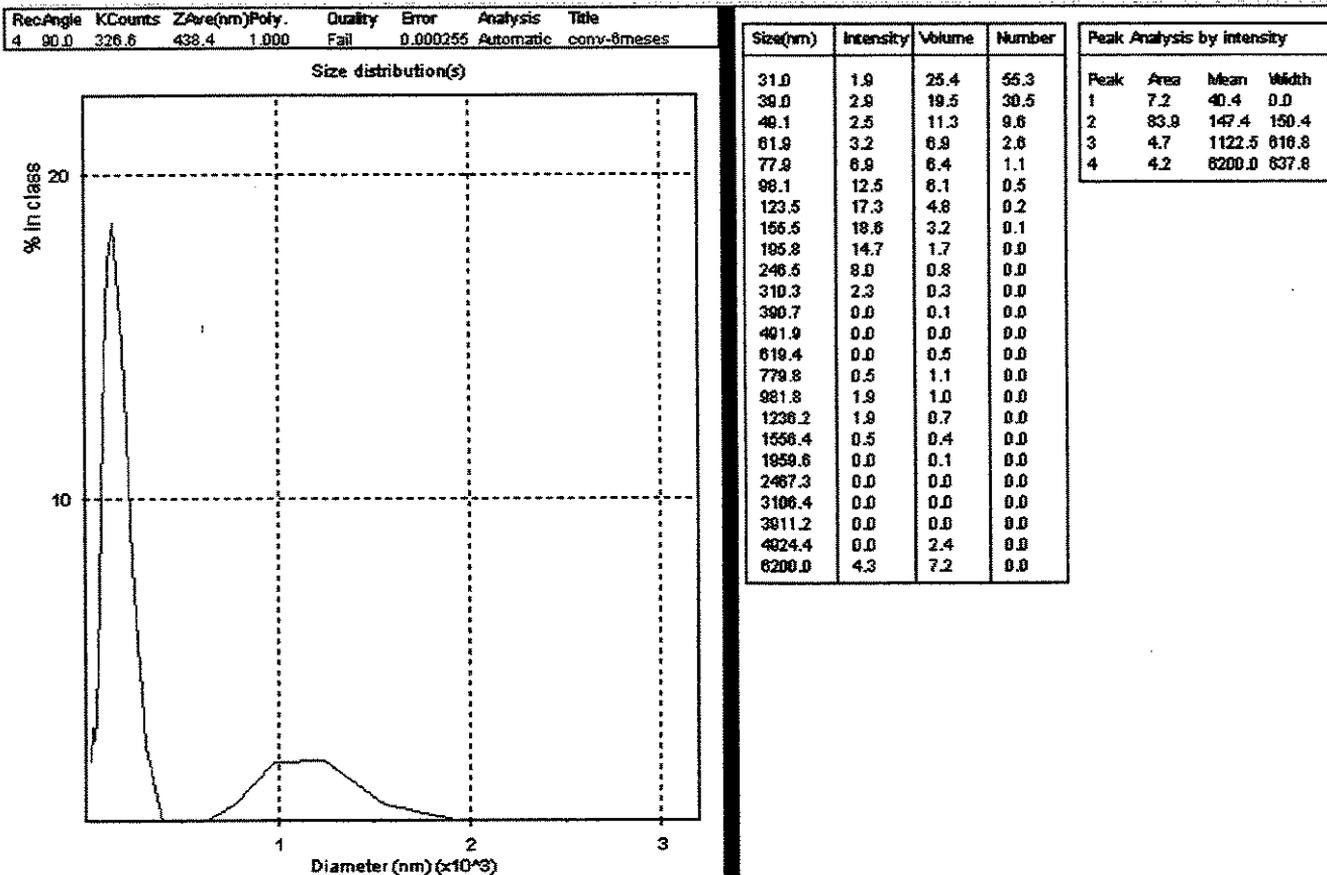
Apod = Cosine



Absorbance / Wavenumber (cm-1)

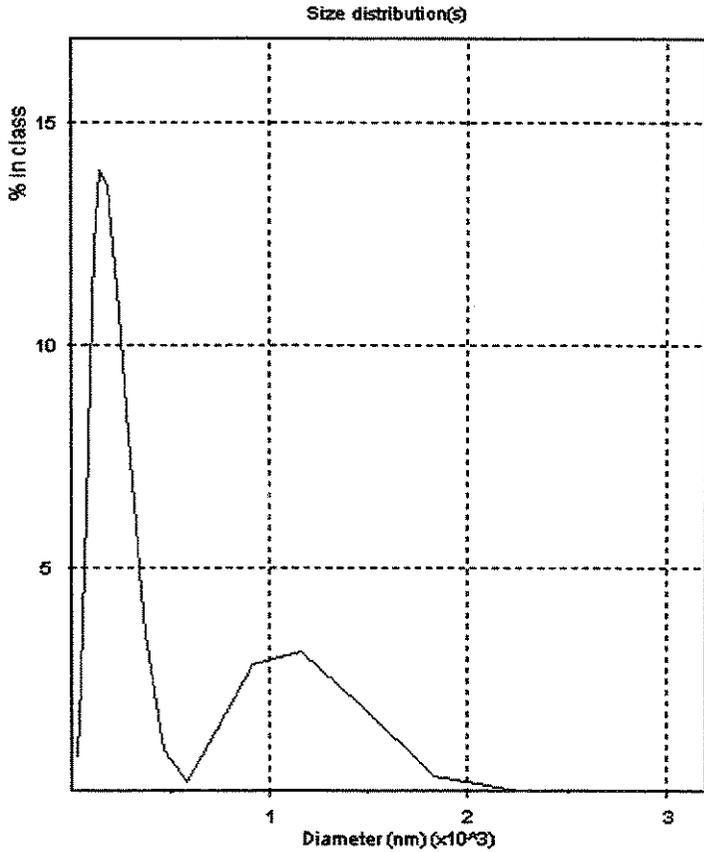
# Anexo III

**Diâmetro hidrodinâmico médio e Distribuição de tamanhos de Lipossomas Convencionais DRVs reconstituídos após estocagem por 6 meses a 4°C na forma liofilizada.**



**Diâmetro hidrodinâmico médio e Distribuição de tamanhos de Lipossomas Furtivos DRVs reconstituídos após estocagem por 6 meses a 4°C na forma liofilizada.**

RecAngle KCounts ZAre(nm)Poly. Quality Error Analysis Title  
 1 90.0 514.1 411.0 1.000 Fail 0.000224 Automatic estoque-po PEG



Size(nm)	Intensity	Volume	Number
29.1	0.8	13.7	47.7
36.6	1.7	13.1	30.3
46.1	2.5	10.9	13.4
58.0	3.8	8.6	5.2
73.0	6.3	6.9	2.1
91.9	9.3	5.4	0.8
115.8	12.2	3.8	0.3
145.8	13.9	2.5	0.1
183.5	13.6	1.6	0.0
231.0	11.3	1.0	0.0
290.9	7.5	0.8	0.0
366.3	3.6	0.8	0.0
461.1	0.9	0.6	0.0
580.6	0.2	0.8	0.0
731.0	1.4	1.3	0.0
920.4	2.9	1.1	0.0
1158.8	3.1	0.7	0.0
1459.0	2.0	0.5	0.0
1837.0	0.4	0.2	0.0
2312.9	0.0	0.0	0.0
2912.0	0.0	0.0	0.0
3666.4	0.0	0.4	0.0
4616.2	0.5	6.8	0.0
5812.0	2.1	18.5	0.0

Peak Analysis by intensity			
Peak	Area	Mean	Width
1	87.4	163.6	223.1
2	10.0	1102.8	789.7
3	2.8	5571.8	397.1