

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**Encapsulação de Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina
em Lipossomas para a Administração por Inalação**

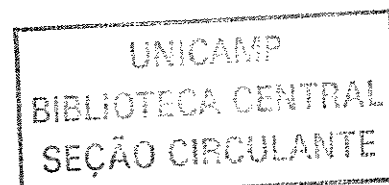
Eng^a Chrissana Santos Calheiros
Autora

Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas-SP
Dezembro/2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL



UNIDADE	BE
Nº CHAMADA	UNICAMP
	C128e
V	
COMBO	48847
PROC.	16-837/02
C	☐ ☒
PREÇO	R\$11,00
DATA	08/05/02
Vº CPL	

CM001671B9-6

IB ID 239682

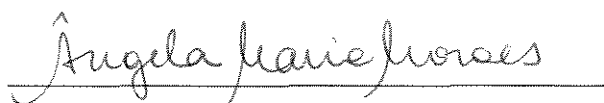
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

C128e Calheiros, Chrissana Santos.
Encapsulação de isoniazida, pirazinamida e
estreptomicina em lipossomas para a administração por
inalação / Chrissana Santos Calheiros.--Campinas, SP:
[s.n.], 2001.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química

1. Lipossomos. 2. Microencapsulação. 3. Tuberculose.
4. Membranas (Tecnologia) I. Moraes, Ângela Maria. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Dissertação de Mestrado defendida por Chrissana Santos Calheiros e aprovada em 13 de dezembro de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

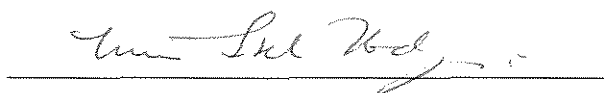


Profª Drª Ângela Maria Moraes

Orientadora



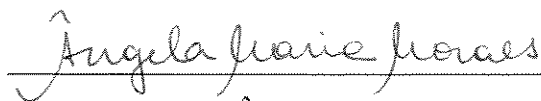
Profª Drª Sônia Maria Alves Bueno



Profª Drª Maria Isabel Rodrigues

5756100

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química.

A handwritten signature in cursive script, reading "Ângela Maria Moraes", is positioned above a horizontal line.

Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes

Orientadora

*A meus queridos pais Audemaro e Cleuda, e a minha irmã Christiane,
pelo amor e apoio incansável durante todos os momentos.*

*A meus anjinhos Deminha, Vikinho e Lipinho,
por serem uma alegria em minha vida.*

Agradecimentos

A Deus, que está sempre presente em minha vida, dando-me proteção e força para enfrentar as dificuldades.

A minha orientadora professora Dr^a Ângela Maria Moraes, pelos ensinamentos, paciência, confiança e dedicação durante a realização desse trabalho.

Aos professores Dr^a Sônia Maria Alves Bueno, Dr^a Maria Helena Andrade Santana, Dr. César Costapinto Santana e Dr. Everson Alves Miranda, pela utilização de seus laboratórios na Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

À amiga Oselys, pelo auxílio fundamental nos experimentos, além do apoio e companheirismo.

Às amigas e colegas de mestrado Adriana e Sindélia, pelo companheirismo e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos e colegas da pós-graduação Victor, Isa, Marco, André, Adriano, Antenor, Luciana, Fernanda, Carla, Salah e Cristiane, pela ajuda, troca de experiências e agradável companhia no laboratório.

Ao Gustavo, que com seu carinho e amor tornou minha vida aqui muito mais feliz.

À amiga Bi, pelo apoio principalmente durante esse último ano.

A minha família, pela oportunidade de estar aqui hoje, e por estar sempre comigo, apesar da grande distância.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“O Senhor é minha luz e minha salvação, a quem temerei?

O Senhor é o protetor de minha vida, de quem terei medo?

Quando os malvados me atacam para me devorar vivo,
são eles, meus adversários e inimigos, que resvalam e caem.

Se todo um exército se acampar contra mim,

não temerá meu coração.

Se se travar contra mim uma batalha,

mesmo assim terei confiança.”

(Salmo 26, 1-4)

“Bem aventurados os que são perseguidos por causa da justiça,

porque deles é o reino dos céus.”

(Mateus 5, 10)

Resumo

A recente reincidência da Tuberculose tem causado grande preocupação, sendo considerada um problema de saúde pública em nível mundial, devido ao alarmante número de casos da doença e elevado número de óbitos. Apesar de sua terapia ser simples, o longo tempo de tratamento, aliado aos efeitos colaterais, muitas vezes leva o paciente a abandonar o tratamento, desenvolvendo resistência aos antibióticos utilizados. Com o intuito de aumentar a eficácia dos fármacos existentes, reduzindo seus efeitos colaterais, vários estudos têm sido realizados. Dentre estes, a encapsulação de fármacos em lipossomas, ou vesículas lipídicas, tem sido testada como alternativa para sua administração.

Neste trabalho foi testada a técnica de encapsulação ativa para a incorporação dos tuberculostáticos isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas de SPC:Col (60:40 mol%) preparados por duas técnicas distintas: a hidratação do filme, seguida de extrusão, e a injeção de etanol. Para cada estudo, foi avaliada a influência das variáveis razão molar inicial fármaco/lipídio (F/L), temperatura e tempo de incubação fármaco/lipossomas na eficiência de encapsulação dos fármacos. Os efeitos das variáveis foram estudados nas faixas de 25 a 60°C para a temperatura, 10 a 60 minutos para o tempo, e 0,16 a 2,0 para a razão F/L inicial, empregando-se a estratégia de planejamento fatorial. Além desta técnica, foi testada a encapsulação passiva dos três fármacos em lipossomas preparados por injeção de etanol.

Para o método de hidratação do filme foram obtidas vesículas com diâmetros médios em torno de 275 nm, sendo esse valor superior ao obtido para a injeção de etanol (139 nm). Observou-se que os diâmetros das vesículas não tiveram seus valores afetados significativamente após a incorporação do fármaco.

Para as condições avaliadas na encapsulação ativa, as eficiências máximas de encapsulação foram de 22,5%, 21,0% e 15,8% para isoniazida, estreptomicina e pirazinamida, respectivamente. Observou-se que a razão molar inicial e a temperatura de incubação tiveram grande influência sobre a incorporação dos fármacos. De maneira geral, os melhores resultados foram obtidos com baixas razões iniciais F/L e elevadas temperaturas. A variável tempo, por sua vez, não se mostrou significativa. Para a encapsulação passiva foram obtidas eficiências de encapsulação de 0,06%, 0,08% e 0,62% para a isoniazida, pirazinamida e estreptomicina, respectivamente. Apesar da baixa eficiência de encapsulação, o resultado para a estreptomicina foi considerado satisfatório pois foi correspondente a uma razão molar final F/L 3,6 vezes maior que a observada na encapsulação ativa.

Palavras-chave: tuberculose, lipossomas, encapsulação, injeção de etanol, extrusão

Abstract

In recent years there has been a resurgence in the incidence of tuberculosis. It has been considered a world health problem due to the high number of disease cases and also deaths. Although simple and effective chemotherapy is available for the treatment of tuberculosis, it is prolonged and associated with undesirable side effects. These characteristics often result in abandonment of the therapy by the patient, which ends up developing resistance to the used drugs. Therefore to improve the therapeutic index in known active drugs has been the goal of several researches. Among these, drugs encapsulated in liposomes or lipid vesicles have been tested.

In this work the active loading approach was employed to incorporate the tuberculostatic drugs isoniazid, pyrazinamide and streptomycin into SPC:Col liposomes (60:40 mol%) prepared by two different techniques: lipid film hydration followed by extrusion and ethanol injection.

For each system the influence of the variables drug/lipid initial molar ratio (D/L), incubation temperature and time in the drug encapsulation efficiency was evaluated. These effects were studied in the 25-60°C temperature range, 10-60 minutes time range and 0.16-2.0 D/L initial ratio using experimental design.

The passive loading technique of all drugs in liposomes prepared by ethanol injection was also tested. For the lipid film hydration technique vesicles with mean diameters around 275nm were obtained. This value was higher than those obtained by ethanol injection (139nm). The diameters of the vesicles did not change significantly after drug encapsulation.

In the active loading approach, the maximum efficiencies were 22.5%, 21.0% and 15.8% for isoniazid, streptomycin and pyrazinamide, respectively. Both the initial molar ratio and incubation temperature had a high influence on drug incorporation. Usually the best results were obtained at low initial molar ratios D/L and high temperature. The incubation time was not significant. For the passive loading, efficiencies of 0.06%, 0.08% and 0.62% were obtained for isoniazid, pyrazinamide and streptomycin, respectively. In spite of the low encapsulation efficiency the streptomycin results were considered satisfactory because the final D/L was 3.6 times higher than that obtained by active loading.

Key-words: tuberculosis, liposomes, encapsulation, ethanol injection, extrusion

Sumário

Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
Lista de Figuras.....	xx
Lista de Tabelas.....	xxiv
Nomenclatura.....	xxviii
Capítulo I: Introdução.....	1
Capítulo II: Objetivos.....	3
Capítulo III: Revisão da Literatura.....	5
3.1. A Tuberculose e sua Terapia Convencional.....	5
3.2. Características dos Agentes Tuberculostáticos Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina.....	9
3.3. Características Gerais dos Lipossomas.....	12
3.4. Comportamento dos Lipossomas em Fluidos Biológicos.....	16
3.5. Mecanismos de Formação dos Lipossomas.....	17
3.6. Técnicas para Preparação dos Lipossomas.....	19
3.7. Encapsulação de Compostos Terapêuticos nos Lipossomas.....	23
3.8. Caracterização dos Lipossomas.....	27
3.9. Aplicações Terapêuticas dos Lipossomas.....	28
3.9.1. Utilização dos Lipossomas na Administração Pulmonar de Medicamentos.....	29
3.9.2. Utilização dos Lipossomas na Terapia da Tuberculose.....	35
Capítulo IV: Materiais e Metodologia.....	41
4.1. Materiais.....	41
4.2. Metodologia.....	41
4.2.1. Preparação de Lipossomas.....	41

4.2.1.1. Método de Hidratação do Filme Lipídico Seco.....	41
4.2.1.2. Método de Injeção de Etanol.....	43
4.2.2. Incorporação Ativa dos Fármacos Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina.....	44
4.2.3. Remoção dos Compostos Terapêuticos não Encapsulados nos Lipossomas.....	46
4.2.3.1. Remoção por Cromatografia de Permeação em Gel.....	46
4.2.3.2. Remoção por Diálise.....	46
4.2.3.3. Remoção por Ultrafiltração.....	47
4.2.4. Caracterização dos Lipossomas.....	47
4.2.4.1. Determinação da Concentração de Lipídios.....	47
4.2.4.2. Determinação da Concentração de Composto Terapêutico e da Eficiência de Encapsulação.....	48
4.2.4.3. Determinação dos Diâmetros Médios dos Lipossomas.....	50
4.2.4.4. Estabilidade de Estocagem dos Lipossomas.....	50
Capítulo V: Resultados e Discussão.....	51
5.1. Estudo Comparativo dos Métodos de Quantificação de Isoniazida.....	51
5.2. Análise das Técnicas de Remoção de Fármaco não Encapsulado em Lipossomas Encapsulando Isoniazida por Incorporação Passiva.....	53
5.3. Preparação e Caracterização de Lipossomas por Hidratação do Filme Lipídico Seco seguida de Extrusão.....	56
5.3.1. Encapsulação Ativa de Isoniazida em Lipossomas Extrudados.....	57
5.3.2. Encapsulação Ativa de Pirazinamida em Lipossomas Extrudados.....	65
5.3.3. Encapsulação Ativa de Estreptomicina em Lipossomas Extrudados.....	70
5.4. Preparação e Caracterização de Lipossomas por Injeção de Etanol.....	77
5.4.1. Incorporação Ativa de Isoniazida em Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol.....	79

5.4.2. Incorporação Ativa de Pirazinamida em Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol.....	83
5.4.3. Incorporação Ativa de Estreptomicina em Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol.....	85
5.4.4. Incorporação Ativa de Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina em Lipossomas preparados por Injeção de Etanol, com Gradiente de pH de 4,0 unidades.....	90
5.4.5. Incorporação Passiva de Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina em Lipossomas preparados por Injeção de Etanol.....	92
5.5. Avaliação da Estabilidade de Estocagem dos Lipossomas Encapsulando Estreptomicina por Incorporação Passiva durante a Injeção de Etanol.....	94
5.6. Comparação dos Métodos de Encapsulação Utilizados para a Incorporação de Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina.....	96
Capítulo VI: Conclusões e Sugestões.....	101
6.1. Conclusões.....	101
6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros.....	103
Capítulo VII: Referências Bibliográficas.....	105
Anexo I: Tabelas de Desvios dos Planejamentos Experimentais.....	115

Lista de Figuras

Figura 3.1: Estrutura do agente tuberculostático isoniazida (fonte: The Merck Index, 1996).....	10
Figura 3.2: Estrutura do agente tuberculostático pirazinamida (fonte: The Merck Index, 1996).....	10
Figura 3.3: Estrutura do agente tuberculostático estreptomicina (fonte: The Merck Index, 1996).....	11
Figura 3.4: Representação esquemática de um lipossoma. Compostos hidrofílicos alojam-se no cerne aquoso (cor amarela), ou ficam ligados à superfície interna/externa (lilás). Compostos hidrofóbicos localizam-se na bicamada lipídica (azul) e os compostos anfifílicos ficam parcialmente imersos na bicamada (verde). Figura adaptada de Ribas, 1997.....	13
Figura 3.5: Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro (D) e à morfologia. (a) VUP: vesícula unilamelar pequena ($20 < D < 100\text{nm}$); (b) VUG: vesícula unilamelar grande ($D > 100\text{nm}$); (c) VML: vesícula multilamelar ($D > 0,5\mu\text{m}$); (d) VOL: vesícula oligolamelar ($0,1 < D < 1\mu\text{m}$); (e) VMV: vesícula multivesicular ($D > 1\mu\text{m}$). Figura adaptada de Crommelin e Schreier, 1994.....	13
Figura 3.6: Estrutura básica de um fosfolípido.....	14
Figura 3.7: Representação esquemática da formação de vesículas multilamelares pelo método de hidratação do filme lipídico seco. As linhas representam as bicamadas lipídicas. Figura adaptada de Lasic, 1988.....	18

Figura 3.8: Esquema da técnica de encapsulação ativa de compostos terapêuticos em lipossomas. (1) Preparação dos lipossomas a pH 4,0; (2) estabelecimento de um gradiente transmembrana; (3) incubação dos lipossomas com o fármaco; (4) incorporação do fármaco (adaptada de Justo, 1999).....24

Figura 4.1: Representação esquemática do método de injeção de etanol para a preparação de lipossomas).....44

Figura 5.1: Curva de calibração para a determinação da concentração lipídica de lipossomas extrudados de SPC:Col (60:40 mol%) em presença de metanol.....52

Figura 5.2: Curva de calibração para a determinação da concentração de isoniazida em presença de metanol.....52

Figura 5.3: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas vazios extrudados, obtidos por hidratação do filme lipídico seco com ácido cítrico, e diluídos com tampão Hepes. O diâmetro médio é de 275 nm.57

Figura 5.4: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col.62

Figura 5.5: Superfície de resposta para a eficiência de encapsulação de isoniazida em função da razão molar inicial fármaco/lípido e da temperatura de incubação.....63

Figura 5.6: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas extrudados, encapsulando isoniazida por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 255 nm, referente ao ensaio 7.....65

- Figura 5.7: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da pirazinamida em lipossomas extrudados de SPC:Col.....68
- Figura 5.8: Superfície de resposta para a eficiência de encapsulação da pirazinamida em função da razão molar inicial fármaco/lipídio e da temperatura de incubação.....69
- Figura 5.9: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas extrudados, encapsulando pirazinamida por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 257 nm, referente ao ensaio 3.....70
- Figura 5.10: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas extrudados de SPC:Col.....73
- Figura 5.11: Superfícies de resposta para a eficiência de encapsulação da estreptomicina em função a) da razão molar inicial fármaco/lipídio e da temperatura de incubação, e b) do tempo e da temperatura de incubação.....75
- Figura 5.12: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas extrudados, encapsulando estreptomicina por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 274 nm (medida referente ao ensaio 3).....77
- Figura 5.13: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas vazios obtidos pelo método de injeção de etanol, apresentando diâmetro médio de 139 nm.....78
- Figura 5.14: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol.....82

- Figura 5.15: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas obtidos pelo método de injeção de etanol, encapsulando isoniazida por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 132 nm, referente ao ensaio 3.....83
- Figura 5.16: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas obtidos pelo método de injeção de etanol, encapsulando pirazinamida por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 127 nm (ensaio 9).....85
- Figura 5.17: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol.....88
- Figura 5.18: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas obtidos pelo método de injeção de etanol, encapsulando estreptomicina por incorporação ativa. As vesículas apresentaram diâmetro médio de 129 nm (ensaio 3).....89
- Figura 5.19: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas vazios obtidos pela injeção de uma solução etanólica de lipídios em uma solução tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4. As vesículas apresentaram diâmetro médio de 104 nm.....94
- Figura 5.20: Variação dos diâmetros médios dos lipossomas encapsulando estreptomicina por incorporação passiva em função do tempo de estocagem a 4°C. O diâmetro médio inicial é de 145,5nm.....95
- Figura 5.21: Variação da retenção de fármaco no interior dos lipossomas e da razão molar final fármaco/lipídio após a remoção da estreptomicina liberada com o tempo de estocagem a 4°C. Os lipossomas foram preparados por injeção de etanol e o fármaco incorporado às vesículas por encapsulação passiva.....96

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Estrutura química do grupo X ligado ao grupo fosfato. ME refere-se ao grupo metil.....	15
Tabela 3.2: Métodos de preparação e tipos de vesículas obtidas (adaptado de Barenholz e Crommelin, 1994).....	20
Tabela 3.3: Características das preparações de lipossomas encapsulando isoniazida, pirazinamida e estreptomicina.....	40
Tabela 5.1: Comparação das eficiências de encapsulação relativas à incorporação passiva de isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col, obtidas empregando-se diferentes técnicas de remoção do fármaco não incorporado e distintos métodos de quantificação da isoniazida.....	54
Tabela 5.2: Razão molar final fármaco/lipídio (F/L), concentrações finais de lipídios e de isoniazida encapsulada em lipossomas extrudados de SPC:Col. Os resultados são relativos à quantificação de isoniazida com metanol, após a separação do fármaco livre através de três técnicas distintas. Os lipídios foram determinados pela detecção de fosfato.....	55
Tabela 5.3: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col.....	58
Tabela 5.4: Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação da isoniazida nos lipossomas extrudados.....	60
Tabela 5.5: Valores de efeito, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial, para a eficiência de encapsulação da isoniazida nos lipossomas extrudados.....	60

Tabela 5.6: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col.....	61
Tabela 5.7: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação da pirazinamida em lipossomas extrudados de SPC:Col.....	66
Tabela 5.8: Valores de efeito, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial, para a eficiência de encapsulação da pirazinamida nos lipossomas extrudados.....	67
Tabela 5.9: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da pirazinamida em lipossomas extrudados de SPC:Col.....	68
Tabela 5.10: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas extrudados de SPC:Col.	71
Tabela 5.11: Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação da estreptomicina nos lipossomas extrudados.....	72
Tabela 5.12: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas extrudados de SPC:Col.....	74
Tabela 5.13: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação de isoniazida em lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol.....	79
Tabela 5.14: Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação da isoniazida nos lipossomas preparados por injeção de etanol.....	81
Tabela 5.15: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas preparados por injeção de etanol.....	81

Tabela 5.16: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação de pirazinamida em lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol.....84

Tabela 5.17: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação de estreptomicina em lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol.....86

Tabela 5.18: Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação da estreptomicina nos lipossomas preparados por injeção de etanol.....86

Tabela 5.19: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas preparados por injeção de etanol.....87

Tabela 5.20: Valores de razão molar final F/L, eficiência de encapsulação e diâmetro médio obtidos para a incorporação ativa de isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas preparados por injeção de etanol apresentando $\Delta pH = 4,0$. Os fármacos foram solubilizados em soluções tampão Hepes (10mM) e Hepes (10mM)/NaCl (120mM) a pH 8,0.....91

Tabela 5.21: Caracterização dos lipossomas encapsulando isoniazida, pirazinamida e estreptomicina por incorporação passiva através do método de injeção de etanol. Concentração lipídica final: 1,0 mM.....93

Tabela 5.22: Melhores resultados obtidos para a encapsulação de isonizida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas de SPC:Col.....97

Tabela A.1: Valores de desvios e de eficiências de encapsulação previstas e observadas experimentalmente no planejamento experimental realizado para a incorporação de isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col.....116

Tabela A.2: Valores de desvios e de eficiências de encapsulação previstas e observadas experimentalmente no planejamento experimental realizado para a incorporação de pirazinamida em lipossomas extrudados de SPC:Col.....116

Tabela A.3: Valores de desvios e de eficiências de encapsulação preditas e observadas experimentalmente no planejamento experimental realizado para a incorporação de estreptomicina em lipossomas extrudados de SPC:Col.....	117
---	-----

Nomenclatura e Abreviações

AIDS: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

Col: colesterol

DCP: dicetilfosfato

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

DMPE: dimiristoilfosfatidiletanolamina

DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina

DMPG: dimiristoilfosfatidilglicerol

DSPC: distearoilfosfatidilcolina

DSPE: distearoilfosfatidiletanolamina

E: eficiência de encapsulação

EPC: fosfatidilcolina de ovo

F/L: razão molar fármaco/lipídio

[H⁺]: concentração de prótons

[HA⁺]: concentração de fármaco protonado

HEPES: N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanossulfônico]

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂S₄: ácido sulfúrico

MAC: *Mycobacterium avium*

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

PC: fosfatidilcolina

PEG: polietilenoglicol

PG: fosfatidilglicerol

PI: fosfatidilinositol

QLS: “quasi elastic light scattering”

SPC: fosfatidilcolina de soja

SRE: sistema reticuloendotelial

T_m: temperatura de transição de fases

VML: vesícula multilamelar

VMV: vesícula multivesicular

VOL: vesícula oligolamelar

VUP: vesícula unilamelar pequena

VUG: vesícula unilamelar grande

VUGI: vesícula unilamelar gigante

Capítulo I

Introdução

Recentemente tem-se observado o ressurgimento de epidemias que já eram consideradas sob controle, dentre elas a tuberculose. O número de casos da doença tem crescido nos últimos anos em associação com a epidemia do vírus HIV. O colapso nos serviços de saúde e a emergência de bacilos resistentes a múltiplas drogas têm contribuído para agravar a situação.

No mundo existem quase 2 bilhões de indivíduos infectados com o bacilo da Tuberculose, a grande maioria vivendo nos países subdesenvolvidos (Ministério da Saúde, 2001). Segundo a OMS, Organização Mundial de Saúde (WHO - World Health Organization), foi estimado que entre 2000 e 2020 aproximadamente um bilhão de pessoas serão infectadas, 200 milhões desenvolverão a doença e 35 milhões morrerão se não houver um controle da epidemia. No Brasil, 90 mil novos casos são notificados anualmente, entretanto, estima-se que a incidência da doença seja em torno de 130 mil casos, uma vez que o índice de sub-notificação ainda é alto (Melo, 1999).

Quando a quimioterapia é utilizada de forma apropriada, apresenta poderoso efeito sobre a mortalidade causada pela Tuberculose. Contudo, a alta taxa de mortalidade deve-se principalmente às características do tratamento, como os efeitos colaterais causados pelos antibióticos, o longo tempo de tratamento, a toxicidade a células normais, a resistência do bacilo aos fármacos, a necessidade de administração de doses freqüentes e de altas concentrações dos medicamentos nos compartimentos intracelulares onde o bacilo se aloja. Esses fatores mostram a necessidade de se desenvolver novas formulações para os fármacos existentes, visando o aumento da sua eficácia terapêutica. Neste sentido, pesquisas de novos sistemas de veiculação de fármacos têm surgido com o intuito de direcionar os medicamentos para alvos específicos no organismo.

Os lipossomas são vesículas lipídicas que fazem parte dos sistemas de liberação controlada de medicamentos, sendo uma opção relevante à medida que podem encapsular e

proteger os compostos terapêuticos, transportando-os para o interior das células vivas, poupando tecidos saudáveis e prolongando os níveis do composto no organismo.

De acordo com alguns estudos, os lipossomas têm apresentado um bom potencial para o carregamento de vários compostos terapêuticos, aumentando a razão entre a eficácia e os efeitos colaterais dos medicamentos, através da alteração da sua farmacocinética e biodistribuição.

O uso bem sucedido destes sistemas para aplicações terapêuticas vai depender basicamente de suas características físico-químicas e da metodologia de preparação das vesículas. A variedade de métodos disponíveis para a preparação destas vesículas possibilita a obtenção de estruturas de diferentes tipos, tamanhos e estabilidade, permitindo sua administração através de várias rotas como as vias pulmonar, oral e intravenosa, entre outras.

Nos últimos anos, pesquisas efetuando-se a administração pulmonar de lipossomas encapsulando fármacos para o tratamento de doenças pulmonares vêm sendo intensificadas (Gilbert et al., 1993; Conley et al., 1997; Suntres e Shek, 1998; Waldrep et al, 1998). Estes estudos têm demonstrado que o uso desses sistemas resultam em ação localizada dos fármacos no trato respiratório, diminuindo os efeitos colaterais sistêmicos.

Para o tratamento da Tuberculose, investigações sobre o transporte dos fármacos diretamente para os pulmões são desejáveis, pois, apesar da Tuberculose ser uma doença sistêmica que pode atingir potencialmente vários órgãos, o pulmão é o principal portal de entrada do bacilo causador da doença, sendo o local de resposta imune inicial, bem como um importante sítio de reativação da doença. Desta forma, a utilização de aerossóis de lipossomas encapsulando os compostos tuberculostáticos poderia ser vantajosa para o tratamento mais efetivo da doença. Uma vez que esse transporte permite a deposição de altas concentrações de fármacos nos pulmões, doses menores poderiam ser administradas aos pacientes.

Inserido nessa linha de pesquisa, o presente trabalho tem como objeto de estudo a preparação e caracterização de lipossomas incorporando isoniazida, pirazinamida, e estreptomicina, fármacos usuais na terapia primária da tuberculose. As formulações empregadas na preparação das vesículas visam sua administração por inalação.

Capítulo II

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo a encapsulação estável dos agentes tuberculostáticos isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas unilamelares de SPC:Col (60:40 mol%), preparados por duas técnicas distintas: a hidratação do filme lipídico, seguida de extrusão, e a injeção de etanol. Como técnicas de incorporação do fármaco, foram utilizadas a encapsulação ativa, através do estabelecimento de gradientes de pH na membrana lipídica, e a passiva.

Planejamentos experimentais completos 2^3 foram empregados como ferramentas para a análise da influência das variáveis razão molar inicial fármaco/lipídio, da temperatura e do tempo de incubação das suspensões fármaco/lipossomas sobre as eficiências de encapsulação dos compostos terapêuticos, durante a encapsulação ativa.

Capítulo III

Revisão da Literatura

3.1. A Tuberculose e sua Terapia Convencional

A Tuberculose é uma doença infecto-contagiosa causada pelo microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*. Existe desde o Egito antigo, séculos antes do alemão Robert Koch anunciar, em 1882, a descoberta do bacilo que hoje leva o seu nome.

A disseminação da Tuberculose ocorre através do ar. O bacilo é transportado pelas gotículas de saliva expelidas pela fala, tosse ou espirro dos doentes, podendo contaminar o ar de locais fechados durante longos períodos. Calcula-se que um novo doente pode infectar de dez a quinze indivíduos por ano. Contudo, os indivíduos infectados não necessariamente desenvolverão a doença, pois o sistema imunológico age como uma barreira, podendo manter o bacilo inativo por muito tempo (WHO, 2000). Os focos de infecção localizados no pulmão ou em outros lugares podem permanecer latentes, mas com risco de ativação durante muitos anos. Os fatores que favorecem essa ativação incluem queda da imunidade e lesão local (Berkow, 1989).

Apesar da Tuberculose ser uma doença muito antiga, os conhecimentos sobre os mecanismos relacionados com o desenvolvimento da doença são escassos. Segundo algumas pesquisas, quando o microrganismo entra nos pulmões, é fagocitado por um macrófago e, como qualquer organismo estranho, fica localizado em um compartimento denominado fagossomo, onde pode se multiplicar. Usualmente, o fagossomo se funde a outro compartimento do macrófago, o lisossomo, que contém enzimas que degradam o conteúdo do fagossomo. Esta fusão não ocorre com o *M. tuberculosis*, que sobrevive dentro do macrófago. Quando a bactéria se multiplica, o macrófago morre, liberando as bactérias que serão absorvidas por outros macrófagos. Dentro de duas ou três semanas, outros macrófagos e algumas células T se aglomeram no sítio infectado, originando um granuloma. Em 5% dos casos, a pessoa não obtém uma resposta imune e a infecção se espalha por outras partes do pulmão (Rouhi, 1999).

A Tuberculose pode atingir outros locais do organismo além dos pulmões. Contudo, a possibilidade de se encontrar grandes populações bacilares fora do pulmão e das vias respiratórias é pequena uma vez que qualquer outro sítio é menos abastecido de oxigênio. As formas mais comuns de Tuberculose extrapulmonar são: Tuberculose pleural, de gânglios linfáticos, renal e de vias urinárias (Ministério da Saúde, 1997).

A velocidade de multiplicação dos bacilos da Tuberculose varia de acordo com sua localização, podendo ser rápida, lenta ou de maneira intermitente. Sob condições ótimas, o bacilo divide-se a cada 16 a 20 horas, motivo pelo qual a infecção se desenvolve lentamente e é crônica (Uehara e Santoro, 1999). Os bacilos localizam-se: no material caseoso liqüefeito que cobre a parede da cavidade, multiplicando-se rapidamente em pH 7,0; no macrófago, onde o pH menor que 7,0 (ambiente ácido) faz com que a multiplicação seja lenta e; no material caseoso sólido, onde multiplicam-se lentamente ou de forma intermitente devido à presença de substâncias tóxicas dos tecidos e à baixa disponibilidade de oxigênio.

Atualmente a Tuberculose ainda é uma das mais importantes doenças infecto-contagiosas do mundo, devido ao aumento significativo do número de casos nos últimos anos. Se até dez anos atrás os casos da doença vinham declinando, sendo considerados quase sob controle, hoje o quadro se agravou nos mais diferentes contextos sócio-econômicos, desde áreas bastante pobres da África até regiões industrializadas como os EUA e vários países da Europa.

Em 1993, a Tuberculose foi declarada como uma doença de emergência mundial pela Organização Mundial de Saúde (OMS), havendo a implementação de vários programas para o seu controle. Segundo esse órgão, 3 milhões de pessoas morreram da doença em todo o mundo em 1995, principalmente nos países em desenvolvimento. Em 1996, o Brasil apareceu em quarto lugar no mundo com maior número de doentes (85.860 notificações), atrás apenas da Índia, China e Filipinas. Dados do Ministério da Saúde sugerem que o número de casos da doença no país supere o patamar dos 90 mil, com 6 mil mortes por ano. A estimativa é de que 16 brasileiros sejam infectados por dia (Melo, 1999).

Em 1998, São Paulo teve o maior índice brasileiro de casos notificados de Tuberculose. De acordo com estatísticas parciais, foram registrados 18.378 casos da doença, com 1.500 mortes (Melo, 1999). Em Campinas, identifica-se uma incidência anual

entre 60 e 80 casos novos por 100 mil habitantes, com taxas de letalidade em torno de 10%, superando a média do Estado nos anos de 1993, 1994, 1996 e 1997 (Secretaria de Saúde de Campinas, 1998).

Este aumento do número de casos da doença é devido, principalmente, a fatores como desnutrição, aglomeração de pessoas, pobreza e ineficiência dos serviços ligados à saúde pública. Além disso, tem-se verificado um crescimento do número de casos de Tuberculose entre os portadores do vírus HIV. Alguns estudos mostraram que o indivíduo co-infectado tem um risco de 6 a 100 vezes maior de adoecer por Tuberculose que o indivíduo HIV negativo, de modo que a médio prazo isto pode configurar uma situação explosiva de Tuberculose na população (Secretaria de Saúde de Campinas, 1998). Estes fatores reforçam as tendências de detecção tardia e abandono precoce do tratamento, intensificando o grave problema da multirresistência aos antibióticos.

A única vacina contra a Tuberculose disponível atualmente é a BCG (Bacilo Calmette-Guérin), que contém bacilos vivos atenuados. Há provas evidentes de que ela tem um papel valioso na prevenção de formas graves de Tuberculose infantil (miliar e meningite), contudo, sua eficácia pode variar de 0 a 80% (Uehara e Santoro, 1999). Pesquisas para a descoberta de uma nova vacina mais eficaz têm sido realizadas, mas ainda estão em fase de desenvolvimento (Agger e Andersen, 2001; Lima et al., 2001).

Classicamente, o tratamento da Tuberculose compreende duas fases: a de ataque e a de manutenção. O primeiro e imediato objetivo a ser atingido pela quimioterapia é controlar a infecção (fase de ataque). Isto é alcançado pela morte da grande população de bacilos existente nas cavidades. O uso de apenas um fármaco ou a administração inadequada de mais fármacos pode levar à seleção de mutantes resistentes, acarretando a falha do tratamento. A existência de bacilos dormentes nos macrófagos e nas lesões caseosas fechadas obriga o prolongamento da terapia (fase de manutenção) para evitar a reativação da doença (Uehara e Santoro, 1999).

Pesquisas laboratoriais e experiências clínicas permitiram o conhecimento de mecanismos de ação dos fármacos que variam conforme o meio. Os fármacos mais efetivos contra os bacilos que se multiplicam em pH 7,0 (na cavidade) são a estreptomicina, a isoniazida e a rifampicina. O etambutol tem apenas ação bacteriostática, ou seja, diminui somente a velocidade de crescimento. Nos bacilos localizados no interior dos macrófagos

(pH < 7,0), a pirazinamida é a que tem melhor atuação, seguida da isoniazida e da rifampicina. Nos bacilos com multiplicação intermitente, a rifampicina é considerada como o único fármaco efetivo. A combinação da rifampicina e isoniazida é eficiente na esterilização das lesões, pela rápida eliminação tanto da população extracelular quanto da localizada nas lesões fechadas ou nos macrófagos (Uehara e Santoro, 1999).

A Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária, através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose, recomenda para novos casos de todas as formas da doença (pulmonar e extrapulmonar), exceto para meningite, o tratamento com isoniazida, pirazinamida e rifampicina durante dois meses, seguido de isoniazida e rifampicina por quatro meses. Em casos de abandono do primeiro tratamento e recidiva, recomenda-se a administração dos três fármacos utilizados anteriormente, além do etambutol. Se houver falência desses tratamentos, são indicados a pirazinamida, a estreptomicina, a etionamida e o etambutol. Ocorrendo falência deste esquema de tratamento, os pacientes são encaminhados para avaliação clínica, testes de resistência e, se possível, identificação da micobactéria. Para esses casos os fármacos utilizados podem ser kanamicina, ofloxacina, clofazimina, ciclosserina, capreomicina, ciprofloxacina, claritromicina, ácido p-amino-salicílico, norfloxacina, sulfato de rifabutina, sparfloxacina, terizidona e tiacetazona (Ministério da Saúde, 1997; Uehara e Santoro, 1999).

Embora a terapia da Tuberculose possa resultar em 100% de eficiência de cura, sérios problemas têm sido observados devido à redução da eficácia da quimioterapia. Um dos problemas mais graves é a presença de mutantes resistentes, que varia de acordo com cada fármaco. Felizmente, a resistência a um fármaco não depende da resistência a outro. A incidência da resistência à associação de dois ou mais fármacos é menor (Uehara e Santoro, 1999). Os pacientes atingidos por esses bacilos são denominados multidroga resistentes e contam com poucas alternativas de tratamento.

Além disso, a falência da quimioterapia pode ser atribuída à degradação dos fármacos antes de atingir o alvo ou ao baixo nível de permeabilidade celular às drogas. Outras razões podem ser atribuídas à dificuldade em atingir o sítio de infecção adequadamente com altas concentrações de fármacos e à inadequada penetração no interior dos macrófagos (Deol et al., 1997). Também é importante ressaltar que a administração dos fármacos usuais no tratamento da Tuberculose, geralmente feita por via oral, está associada

a diversos efeitos colaterais indesejáveis como náuseas, vômitos, icterícia, diarreia, alterações visuais, toxicidade a tecidos normais, entre outros (Ministério da Saúde, 1997), levando o paciente a se desestimular com o tratamento, interrompendo-o.

Desta forma, observa-se uma necessidade de desenvolver novas técnicas de tratamento, visando o aumento da eficácia dos fármacos existentes e a redução dos efeitos colaterais. Nessa tentativa, os lipossomas, ou vesículas lipídicas, têm sido considerados, uma vez que apresentam um bom potencial para o carreamento de antibióticos utilizados na terapia da Tuberculose. Preparações de lipossomas contendo os antibióticos têm a vantagem de serem capazes de transportar altas concentrações desses compostos para o interior dos compartimentos onde a micobactéria está localizada. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* confirmam isso quando comparam os efeitos dos compostos na forma livre e encapsulada em lipossomas (Bermudez, 1994).

3.2. Características dos Agentes Tuberculostáticos Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomomicina

Neste item serão descritas algumas características dos agentes tuberculostáticos estudados neste trabalho.

A isoniazida foi sintetizada em 1912, mas a sua utilização na terapia da Tuberculose só ocorreu em 1952. Este fármaco é facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal e difunde-se para todas as células e fluidos corpóreos (Uehara e Santoro, 1999). É o agente menos tóxico, menos oneroso e mais facilmente administrado (Berkow, 1989). O principal efeito colateral da isoniazida é a hepatite (Uehara e Santoro, 1999). Também podem ocorrer neurite periférica, icterícia, náuseas e vômitos, entre outros.

Este composto está disponível comercialmente na forma de comprimidos de 50, 100 e 300 mg, de xarope (50 mg/mL) e de ampolas (100 mg/mL) para injeção intramuscular (AEGIS, 2001 a).

Sua solubilidade em água a 25°C é de 14,0 g/100mL (1,0 M), e a 40°C é de 26,0 g/100mL (1,9 M); em álcool, a 25°C, é de 2,0 g/100mL; em clorofórmio é de 0,1 g/100mL. Em éter e benzeno, o composto é praticamente insolúvel (The Merck Index, 1989; Brewer, 1977).

A isoniazida possui massa molecular de 137,1 Da, e sua estrutura química está ilustrada na Figura 3.1.

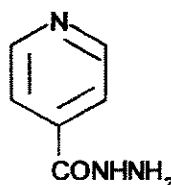


Figura 3.1: Estrutura do agente tuberculostático isoniazida (fonte: The Merck Index, 1989).

A pirazinamida é a pirazina sintética análoga da nicotinamida. Foi introduzida em 1952 e, devido aos seus efeitos colaterais, seu uso foi abandonado. Em estudos posteriores com dosagens menores não foram observados os efeitos relatados anteriormente. Este fármaco possui atividade antituberculose *in vitro* somente em ambiente ácido. É bem absorvida no trato gastrointestinal e distribui-se pelo corpo. Seus principais efeitos colaterais são artralgia, vômitos e náuseas (Uehara e Santoro, 1999). Este fármaco é administrado por via oral, estando comercialmente disponível na forma de comprimidos de 500 mg (AEGIS, 2001 b).

O composto possui uma solubilidade em água de 15 mg/mL (0,12 M), em metanol de 13,8 mg/mL, em etanol absoluto de 5,7 mg/mL, em iso-octano de 0,01 mg/mL e em clorofórmio de 7,4 mg/mL (The Merck Index, 1989). Sua massa molecular é de 123,1 Da, e sua estrutura química está apresentada na Figura 3.2.

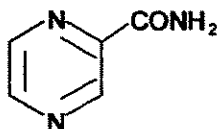


Figura 3.2: Estrutura do agente tuberculostático pirazinamida (fonte: The Merck Index, 1989).

A estreptomicina é membro da família dos aminoglicosídeos. Foi introduzida para uso clínico em 1944, sendo o primeiro agente quimioterapêutico a ser utilizado no tratamento da Tuberculose, permanecendo ainda como um dos mais importantes fármacos

neste sentido. A toxicidade deste composto é o fator limitante do seu uso prolongado (Uehara e Santoro, 1999). Seus principais efeitos colaterais são perda de equilíbrio e diminuição da audição (Ministério da Saúde, 1997).

É um composto pobremente absorvido no trato gastrointestinal, tendo absorção imediata após administração intramuscular, sendo largamente distribuído por todo o organismo. É comercializado em ampolas de sulfato de estreptomicina (1,0 g de fármaco em 2,5 mL) para administração por via intramuscular (AEGIS, 2001 c).

O sulfato de estreptomicina possui massa molecular de 1457,4 Da, apresentando as seguintes solubilidades a 28°C (em mg/mL): >20,0 em água; 0,85 em metanol; 0,30 em etanol; 0,035 em éter (The Merck Index, 1989). A Figura 3.3 ilustra a estrutura química da estreptomicina.

Apesar de serem considerados altamente tóxicos, esses fármacos estão entre os mais usados no tratamento da doença. Dentre os maiores desafios de uma nova quimioterapia para a Tuberculose está a descoberta de novas formulações mais eficazes, com efeitos colaterais reduzidos e que permitam um curto período de tratamento.

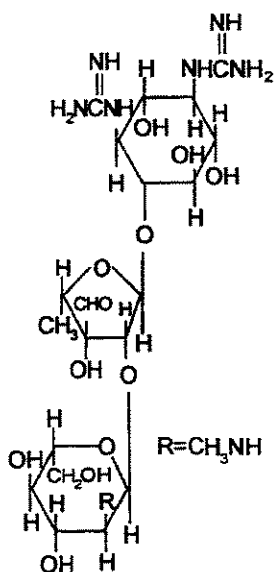


Figura 3.3: Estrutura do agente tuberculostático estreptomicina (fonte: The Merck Index, 1989).

3.3. Características Gerais dos Lipossomas

Os lipossomas fazem parte dos sistemas coloidais de liberação controlada de compostos terapêuticos da medicina moderna, sendo utilizados como transportadores de fármacos na terapia de alguns tipos de câncer, de infecções fúngicas e de leishmaniose (Deol e Khuller, 1997). Essas vesículas são utilizadas como veículos para o transporte de medicamentos porque a sua composição é compatível com os constituintes biológicos.

Lipossomas são vesículas que consistem em uma ou mais bicamadas lipídicas, normalmente constituídas por fosfolipídios e colesterol, separadas por compartimentos aquosos.

Os fosfolipídios possuem um caráter anfifílico, apresentando em sua estrutura regiões polares (grupos fosfato) e apolares (cadeias longas de ácidos graxos). Em soluções aquosas, as regiões hidrofóbicas tendem a se fechar sobre si, enquanto as regiões hidrofílicas ficam em contato com a fase aquosa. A organização estrutural dos compostos anfifílicos depende da contribuição relativa das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas das moléculas envolvidas (Crommelin e Schreier, 1994; Israelachvili, 1994).

Devido a sua estrutura em bicamadas, os lipossomas são capazes de alojar uma grande gama de substâncias: drogas hidrofílicas são dissolvidas em regiões aquosas e drogas hidrofóbicas são associadas com as bicamadas lipídicas (Taylor e Newton, 1992). Se uma droga apresentar caráter tanto hidrofílico quanto hidrofóbico, poderá se acumular em ambas as regiões ou ficar parcialmente imersa na bicamada lipídica. A estrutura básica de um lipossoma e a possível localização das substâncias incorporadas é apresentada na Figura 3.4.

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com suas propriedades estruturais e com seu método de preparação, apresentando tamanhos e número de bicamadas distintos. Vesículas que são compostas por várias bicamadas sucessivamente separadas por compartimentos fluidos são denominadas vesículas multilamelares (VML), enquanto aquelas que possuem outros lipossomas no seu interior são classificadas como vesículas multivesiculares (VMV). Já as vesículas unilamelares apresentam uma única bicamada e uma região aquosa central, podendo ser pequenas (VUP), grandes (VUG) ou gigantes

(VUGI). Os diâmetros destas estruturas podem variar da ordem de dezenas de nanômetros a dezenas de micra (Crommelin e Schreier, 1994). A Figura 3.5 ilustra essa classificação.

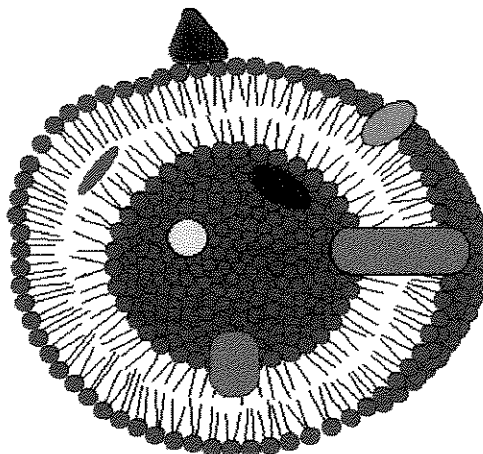


Figura 3.4: Representação esquemática de um lipossoma. Compostos hidrofílicos alojam-se no cerne aquoso (cor amarela), ou ficam ligados à superfície interna/externa (lilás). Compostos hidrofóbicos localizam-se na bicamada lipídica (azul) e os compostos anfifílicos ficam parcialmente imersos na bicamada (verde). Figura adaptada de Ribas, 1997.

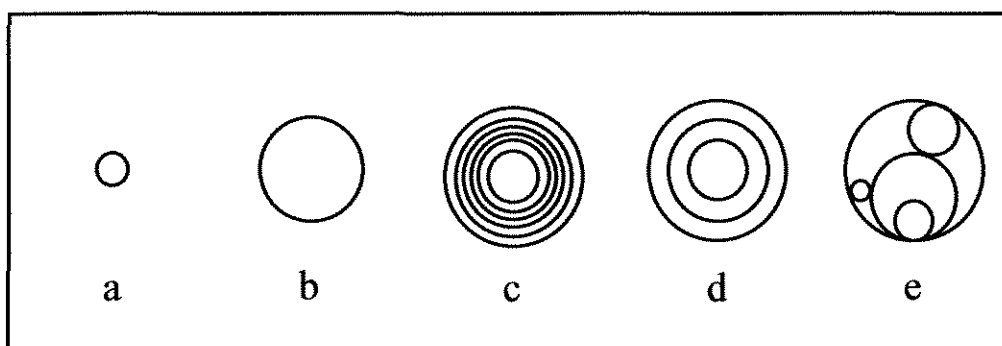


Figura 3.5: Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro (D) e à morfologia. (a) VUP: vesícula unilamellar pequena ($20 < D < 100 \text{ nm}$); (b) VUG: vesícula unilamellar grande ($D > 100 \text{ nm}$); (c) VML: vesícula multilamellar ($D > 0,5 \mu\text{m}$); (d) VOL: vesícula oligolamellar ($0,1 < D < 1 \mu\text{m}$); (e) VMV: vesícula multivesicular ($D > 1 \mu\text{m}$). Figura adaptada de Crommelin e Schreier, 1994.

Além da variação de tamanho, número e posição das lamelas, os lipossomas diferem também em relação à rigidez da bicamada. Dependendo da seleção dos lipídios e da técnica de preparação, esses parâmetros influenciam o comportamento dos lipossomas tanto *in vivo* como *in vitro*. A seleção dos constituintes dos lipossomas deve ser baseada na sua biocompatibilidade e ausência de toxicidade (Crommelin e Schreier, 1994).

Para a formação dos lipossomas, vários tipos de lipídios e outros compostos anfifílicos podem ser utilizados. Os fosfolipídios são os compostos mais comumente utilizados, principalmente se as vesículas são destinadas a aplicações terapêuticas. Eles podem ser classificados em cinco grupos: fosfolipídios de fontes naturais, fosfolipídios naturais modificados, fosfolipídios semi-sintéticos, fosfolipídios completamente sintéticos e fosfolipídios com grupos polares modificados (Crommelin e Schreier, 1994). A estrutura básica de um fosfolipídio é ilustrada na Figura 3.6, e a Tabela 3.1 apresenta alguns grupamentos X e os nomes dos fosfolipídios resultantes.

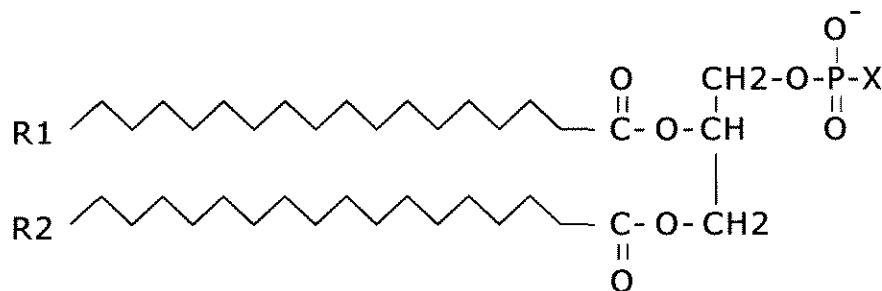
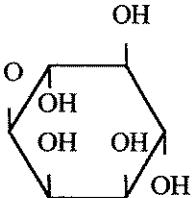


Figura 3.6: Estrutura básica de um fosfolipídio.

Tabela 3.1: Estrutura química do grupo X ligado ao grupo fosfato. ME refere-se ao grupo metil.

Estrutura do Grupo X	Fosfolipídio
$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N} - \text{Me}^+ \\ \\ \text{Me} \end{array}$	Fosfatidilcolina
$\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_3^+$	Fosfatidiletanolamina
$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \diagup \\ \text{O} - \text{CH} \\ \diagdown \\ \text{COO}^- \end{array}$	Fosfatidilserina
$\begin{array}{c} \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	Fosfatidilglicerol
	Fosfatidilinositol

A fosfatidilcolina (PC), também conhecida como lecitina, pode ser obtida de fontes naturais ou sinteticamente. Este composto é extraído da gema do ovo, da soja e, de forma menos comum, do coração e da medula espinhal de bovinos. Como é o principal tipo de fosfolipídio presente em muitas membranas celulares, é freqüentemente empregada como constituinte dos lipossomas. A PC também é muito utilizada devido a seu custo relativamente baixo quando comparado a outros fosfolipídios, além de possuir carga líquida neutra em pH fisiológico e ter baixa reatividade química. A lecitina de fonte naturais é na

verdade uma mistura de fosfatidilcolinas, com cadeias de hidrocarbonetos de diferentes comprimentos e graus de insaturação (New, 1990).

Outros tipos de lipídios que podem ser utilizados na preparação das vesículas são os esteróis. Dentro dessa categoria tem-se o colesterol, que está presente em grandes quantidades nas membranas celulares de mamíferos. Este lipídio, isoladamente, não é capaz de se organizar em bicamadas, mas pode ser incorporado em membranas de fosfolipídios em altas proporções (até 50%), conferindo-lhes maior estabilidade (New, 1990).

Dependendo do tipo do fosfolipídio e da temperatura utilizada, as bicamadas podem se encontrar em um estado de gel (ordenadas), com as cadeias de hidrocarboneto totalmente estendidas e empacotadas bem próximas umas das outras, ou em estado de líquido-cristalino (desordenadas), onde as cadeias estão aleatoriamente ordenadas e fluidas. A mudança de uma fase para outra ocorre na temperatura de transição T_m (New, 1990). Esta temperatura depende da natureza do fosfolipídio como comprimento e grau de saturação das cadeias apolares e tipo de grupamento polar, podendo variar de -15°C para a fosfatidilcolina de ovo, que possui elevado grau de insaturação, até mais de 50°C para a distearoilfosfatidilcolina, que é completamente saturada (Crommelin e Schreier, 1994). As bicamadas em gel tendem a ser mais rígidas e menos permeáveis que as em estado de líquido-cristalino.

3.4. Comportamento dos Lipossomas em Fluidos Biológicos

Os lipossomas podem interagir por adsorção com praticamente qualquer tipo de célula. Após a adsorção, as vesículas podem sofrer processos de endocitose, sendo englobadas pelas células, de troca de lipídios com a membrana celular, ou de fusão à célula, onde a bicamada lipídica dos lipossomas integra-se à membrana celular e o conteúdo aquoso da vesícula é anexado ao fluido citoplasmático (Ostro, 1987).

Outra característica do comportamento dos lipossomas *in vivo* é sua interação com componentes dos fluidos biológicos, como as proteínas. Quando os lipossomas entram no fluxo sanguíneo, há predominantemente interações com as lipoproteínas do sangue e com as opsoninas, proteínas que têm a função de promover o rápido reconhecimento e conseqüente remoção das vesículas da corrente sanguínea. Esta remoção é feita por células

do sistema fagocitário, também conhecido como sistema reticuloendotelial (SRE). As lipoproteínas por sua vez, quando adsorvidas na superfície dos lipossomas, desestabilizam a bicamada pela troca de lipídios (Woodle e Lasic, 1992).

O uso de lipossomas como sistemas de liberação controlada de compostos terapêuticos utilizados em doenças associadas ao SRE pode ser bastante eficiente, uma vez que os lipossomas convencionais são facilmente capturados pelas células desse sistema (Ostro, 1987). Contudo, quando o alvo é um tecido diferente do SRE, a rápida remoção das vesículas lipídicas torna-se um fator limitante para o uso de lipossomas.

Com o propósito de aumentar a estabilidade dos lipossomas no meio biológico, foram desenvolvidas novas vesículas introduzindo na bicamada lipídica grupos especiais como os gangliosídeos (como GM1) ou fosfatidilinositol hidrogenado de soja (HSPI). Contudo, uma limitação para o uso do GM1 é seu alto custo, e no caso do HSPI é a sua reduzida solubilidade em diversos solventes, dificultando a formação de lipossomas uniformes (Allen et al., 1985; Klivanov et al., 1990; Gabizon e Papahadjopoulos, 1992; Lasic, 1993).

Desta forma, buscando-se superar esta limitação, foi avaliada a incorporação de polímeros hidrossolúveis às vesículas lipídicas. Lipídios sintéticos contendo grupos poliméricos resultantes do acoplamento covalente de cadeias de polietilenoglicol (PEG) aos fosfolipídios surgiram como materiais capazes de aumentar o tempo de circulação das vesículas lipídicas, aumentando sua estabilidade. Estes lipossomas estericamente estabilizados são denominados *Stealth* e são capazes de escapar do sistema reticuloendotelial (SRE) por períodos de tempo relativamente longos, sendo uma opção relevante na administração por via intravenosa (Klivanov et al., 1990; Woodle et al., 1992).

3.5. Mecanismos de Formação dos Lipossomas

Apesar do crescente uso dos lipossomas para diversas aplicações, os mecanismos de formação destas vesículas ainda não são completamente conhecidos. Isso se deve ao fato dos métodos de análise disponíveis não serem capazes de caracterizar as estruturas intermediárias no processo de formação das vesículas, pois a instabilidade termodinâmica destas estruturas de vida curta dificulta bastante análises mais detalhadas (Lasic em 1988).

Alguns mecanismos de formação de vesículas foram sugeridos por Lasic em 1988. De acordo com este autor, com adição de uma fase aquosa a um filme lipídico seco, ocorre permeação desta fase através das bicamadas de lipídios, sendo a hidratação da monocamada mais externa maior que a das camadas internas. Desta forma, há formação de bolhas convexas, uma vez que a área superficial das cabeças polares cresce com o aumento da hidratação. A transformação pára de ocorrer quando é atingida uma distância de equilíbrio entre as bicamadas. Agitando-se o sistema, as bicamadas se fecham, formando vesículas multilamelares ovais. Após algum tempo, estas vesículas se transformam em estruturas esféricas que retêm volumes maiores e possuem energias de curvatura menores. Este processo é ilustrado na Figura 3.7.

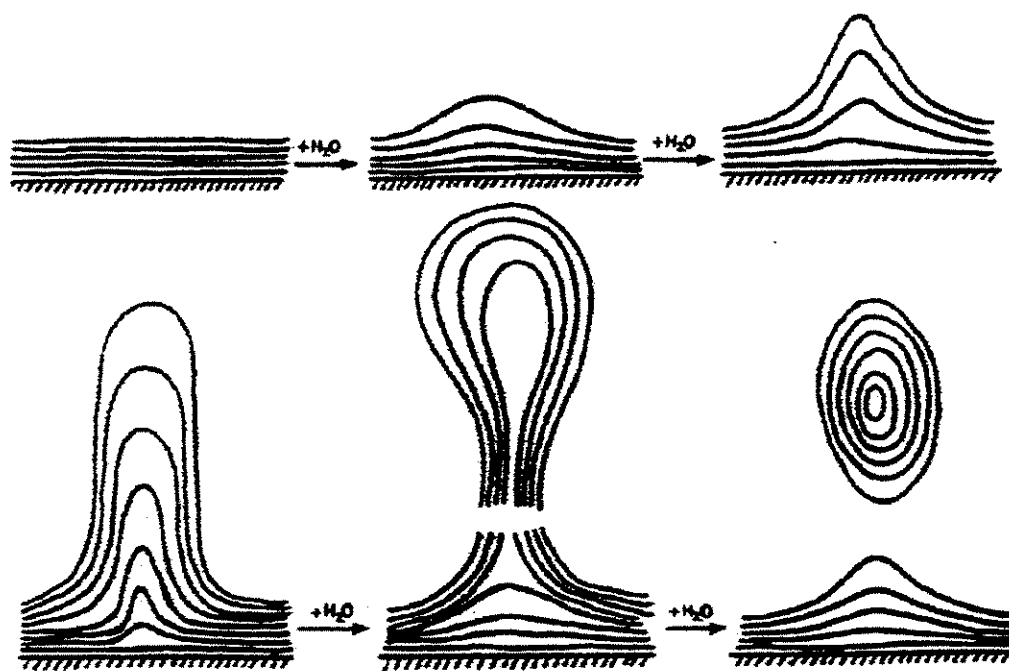


Figura 3.7: Representação esquemática da formação de vesículas multilamelares pelo método de hidratação do filme lipídico seco. As linhas representam as bicamadas lipídicas. Figura adaptada de Lasic, 1988.

Lasic (1988) também propôs a existência de fragmentos da bicamada lipídica como estruturas intermediárias no processo de formação das vesículas. Quando há dissipação de energia no sistema, as bicamadas já existentes são rompidas, havendo formação de fragmentos de bicamada, que são instáveis devido ao contato desfavorável de suas

extremidades apolares com o meio aquoso. O rearranjo das moléculas hidrofóbicas causa um arqueamento da estrutura que acaba se fechando totalmente, formando assim vesículas unilamelares.

Os lipossomas também podem ser formados pelo processo de remoção de detergente. Neste caso, tem-se a princípio uma solução de micelas mistas consistindo de moléculas de detergente e de fosfolipídios. Com a remoção de detergente, as cadeias hidrofóbicas de fosfolipídios ficam expostas à fase aquosa e, em uma tentativa de minimizar essa exposição, fecham-se sobre si, formando as vesículas (Crommelin e Schreier, 1994).

3.6. Técnicas para Preparação dos Lipossomas

Nos últimos anos, as técnicas de preparação de lipossomas têm sido descritas extensivamente em várias bibliografias, como por exemplo New (1990), Talsma e Crommelin (1992), Lasic (1993), Crommelin e Schreier (1994), e Barenholz e Crommelin (1994). Nos diferentes procedimentos de preparação, um padrão geral pode ser discriminado: primeiramente os lipídios devem ser hidratados, os lipossomas têm seu tamanho reduzido e, finalmente, a droga não encapsulada deve ser removida. As principais técnicas para a preparação de lipossomas, juntamente com os tipos de vesículas obtidas são apresentados na Tabela 3.2.

Dentre as principais técnicas que envolvem a preparação das vesículas, pode-se citar técnicas de dispersão mecânica, de substituição de solventes orgânicos por soluções aquosas, de remoção de detergente, de modificação de tamanho e fusão de vesículas, e de variações de pH durante a hidratação dos lipídios (New, 1990). Todas as metodologias apresentam vantagens e desvantagens, não havendo uma metodologia ótima que possa ser usada universalmente.

Os métodos de preparação de lipossomas utilizados neste trabalho são o de hidratação do filme e o de injeção de etanol. Por isto, apenas estes serão detalhados aqui.

Tabela 3.2: Métodos de preparação e tipos de vesículas obtidas (adaptado de Barenholz e Crommelin, 1994).

Método de preparação	Tipo de vesícula
Etapa de Hidratação	
<i>1. Métodos mecânicos</i>	
Agitação manual ou por vórtice	VML
Técnica de microfluidização	VUP
Borbulhamento de gás inerte	VML, VUG
Homogeneização com alto cisalhamento	VUP
<i>2. Métodos baseados na troca de solventes orgânicos por meios aquosos</i>	
Remoção de solvente orgânico antes da hidratação	VML, VOL, VUP
Evaporação de fase reversa	VML, VOL, VUG
Uso de solventes imiscíveis com água	VML, VOL, VUG
Uso de solventes miscíveis com água (injeção de etanol)	VML, VOL, VUP
<i>3. Métodos baseados na remoção de detergente</i>	
Cromatografia de filtração em gel	VUP
Diálise	VML, VOL, VUG
Diálise rápida	VOL, VUG
Técnicas mistas	VML, VOL, VUP, VUG
<i>4. Métodos baseados na mudança de tamanho e fusão</i>	
Fusão espontânea de VUP na fase de gel	VUG
Congelamento-Descongelamento	VML
Liofilização	VML
Desidratação- Reidratação de VUP	VUP, VUG
Fusão induzida por íons Ca^{2+}	VML, VOL, VUG
Crescimento das vesículas induzido por detergente	VOL, VUG
<i>5. Métodos baseados no ajuste de pH</i>	
Etapa de redução de tamanho	
<i>1. Extrusão a alta pressão</i>	VOL, VUP, VUG
<i>2. Extrusão a baixa pressão</i>	VUP, VUG
<i>3. Tratamento ultrassônico</i>	VUP
Etapa de remoção de material não encapsulado	
<i>1. Diálise</i>	
<i>2. Ultracentrifugação</i>	
<i>3. Cromatografia de permeação em gel</i>	
<i>4. Resinas de troca iônica</i>	

O método de hidratação do filme lipídico é baseado no conceito de formação de lipossomas por dispersão mecânica. Neste método, um filme fino de lipídios é depositado nas paredes de um recipiente (balão de fundo redondo, por exemplo) após a evaporação do solvente orgânico. As vesículas são formadas quando a fase aquosa em excesso é adicionada ao sistema, sob agitação.

Mesmo antes da adição da fase aquosa, os lipídios que formam o filme seco já estão dispostos de forma a separar as regiões hidrofílicas das hidrofóbicas, na mesma conformação das bicamadas dos lipossomas. Sob agitação, as camadas de lipídios começam a inchar e, à medida que sofrem agitação, desprendem-se do suporte já na forma de vesículas multilamelares (New, 1990).

Segundo New (1990), na classe de métodos por dispersão de solventes, os lipídios são dissolvidos em uma solução orgânica, a qual é colocada em contato com a fase aquosa, contendo ou não o material a ser encapsulado. A dispersão de solventes subdivide-se em três categorias: a) o solvente orgânico é miscível com a fase aquosa; b) o solvente orgânico é imiscível com a fase aquosa, estando esta em excesso e; c) o solvente orgânico está em excesso e é imiscível com a fase aquosa.

O método de injeção de etanol pertence à categoria na qual o solvente orgânico é miscível com a fase aquosa. Este método foi originalmente descrito por Batzri e Korn (1973) e consiste na injeção rápida de uma solução lipídica de etanol em uma fase aquosa, através de uma fina agulha acoplada a uma seringa. A pressão de injeção é geralmente suficiente para fornecer uma completa mistura, sendo o etanol diluído quase que instantaneamente na fase aquosa, e as moléculas de fosfolipídios dispersas por todo o meio. Esta técnica possibilita a formação de vesículas unilamelares pequenas (diâmetros em torno de 25 nm). Contudo, agregados de lipídios e vesículas maiores podem ser formados se a mistura não for eficiente.

Este método tem como vantagens sua simplicidade e rapidez, além do risco muito menor de causar degradação aos lipídios. As limitações principais deste método são a baixa solubilidade de certos lipídios em etanol (40 mM para fosfatidilcolina de ovo) e o baixo volume de etanol que pode ser injetado no meio (máximo de 7,5% vol/vol_{total}), resultando em uma suspensão de lipossomas geralmente diluída, embora seja possível concentrar a suspensão através de ultrafiltração a baixa pressão. Segundo Lasic (1993), é possível

aumentar a concentração de lipídios na solução, aumentando-se a temperatura do processo. Soluções de lecitina em solventes orgânicos (100 mM de concentração) são normalmente preparadas a temperaturas mais elevadas (60°C), e injetadas em fase aquosa aquecida apropriadamente. Contudo, os lipossomas resultantes são grandes e heterogêneos, com diâmetros médios entre 0,2 e 10 μm . Posteriormente, as amostras devem ser verificadas quanto à possível precipitação do colesterol.

Outras limitações são a baixa eficiência de encapsulação para compostos hidrofílicos e a necessidade de remoção de etanol das bicamadas lipídicas para vesículas destinadas a aplicações terapêuticas. Essa remoção pode ser feita por diálise ou cromatografia de permeação em gel, por exemplo.

Outro fator importante, é a possibilidade de ampliação de escala para a produção de uma maior quantidade de lipossomas (Lasic, 1993). Este fator é importante uma vez que o escalonamento é um fator limitante na tecnologia de lipossomas.

De acordo com Kriftner (1992), a partir de modificações no método de injeção de etanol proposto por Batzri e Korn (1973), foi possível a obtenção de grandes quantidades de lipossomas encapsulando econazol, substância antimicótica com características hidrofóbicas. Foi realizada a incorporação passiva do fármaco, conseguindo-se 90% de eficiência de encapsulação em vesículas com diâmetro entre 115 e 600 nm.

Na etapa de redução de tamanho, pode-se utilizar técnicas de extrusão a alta ou baixa pressão, e sonicação de vesículas multilamelares. Os lipossomas devem ser dimensionados conforme o alvo de destino, por exemplo: vesículas com diâmetro de até 0,1 μm são mais adequadas para aplicação por via intravenosa, enquanto vesículas com diâmetros entre 0,1 e 2,0 μm são adequadas para o transporte pulmonar (Lasic, 1993; Bridges e Taylor, 2000).

Como os lipossomas são muito maiores que o material encapsulado em seu interior, a separação dos compostos não incorporados pode ser realizada com base nas diferenças de tamanho, utilizando-se técnicas como diálise, cromatografia de permeação em gel ou ultrafiltração. Em casos onde proteínas ou DNA estão sendo encapsulados, ou quando o material não incorporado pode formar grandes agregados, a técnica de centrifugação pode

ser empregada, aproveitando-se as diferenças de densidade entre a vesícula e o soluto (New, 1990).

3.7. Encapsulação de Compostos Terapêuticos nos Lipossomas

Geralmente, as características físico-químicas dos compostos terapêuticos definem sua localização nos lipossomas, sugerindo as técnicas mais adequadas a serem utilizadas na sua encapsulação. Dados de solubilidade, massa molecular do fármaco e coeficientes de partição dão indícios das diferenças observadas nas características de encapsulação dos fármacos (Madden et al., 1990).

A encapsulação de compostos terapêuticos em lipossomas pode ser realizada por incorporação ativa ou passiva (Mayer et al., 1986). Na encapsulação passiva, o composto é incorporado no lipossoma durante a sua formação ou em uma etapa do processo de preparação, na qual a estrutura do lipossoma se encontra perturbada, como, por exemplo, durante a hidratação das bicamadas lipídicas com uma solução de fármaco. Nesta técnica, a eficiência de encapsulação de compostos terapêuticos hidrofílicos pode variar com o tamanho do lipossoma devido às mudanças no volume retido no interior da vesícula (Madden et al., 1990, Crommelin e Schreier, 1994). Para compostos com características predominantemente hidrofóbicas, a incorporação pode ser feita diretamente na bicamada lipídica, solubilizando-se os lipídios e os compostos simultaneamente no solvente orgânico. Desta forma, a quantidade de fármaco encapsulado é limitada pela estabilidade da bicamada lipídica formada, pois o número de moléculas do composto acomodado não deve afetar substancialmente o empacotamento das moléculas de lipídios (Justo, 1999).

Na encapsulação ativa, o composto terapêutico é incorporado ao lipossoma que apresenta um gradiente de íons entre as fases aquosas interna e externa, havendo uma diferença de pH entre as fases, sendo, geralmente, o cerne aquoso mais ácido. Esta técnica de incorporação envolve a permeação de espécies neutras (não ionizadas) através da bicamada lipídica, havendo ionização das espécies no interior da vesícula. As moléculas carregadas, por sua vez, não são capazes de atravessar a bicamada, acumulando-se no interior do lipossoma. Assim, para atingir altos níveis de encapsulação, o interior das vesículas deve estar altamente tamponado para manter o gradiente de pH durante o acúmulo do fármaco (Mayer et al. 1990). A capacidade tamponante no interior dos

lipossomas pode ser aumentada através da redução do pH do meio intravesicular. Contudo, um pH muito baixo pode causar hidrólise ácida das cadeias lipídicas (Mayer, 1993).

Segundo Mayer (1993), um tampão que representa uma boa opção quando se deseja um pH menor que 5,0 no interior da vesícula é o ácido cítrico. Esse tampão pode ser empregado porque é largamente utilizado em formulações terapêuticas injetáveis. Além disso, é um tampão triprótico, que exibe uma ampla faixa tamponante (pH 3,0 a 6,5).

Este tipo de encapsulação é especialmente útil para aminas lipofílicas, moléculas constituintes de vários compostos terapêuticos (Mayer et al. 1990). A técnica de encapsulação ativa está representada na Figura 3.8.

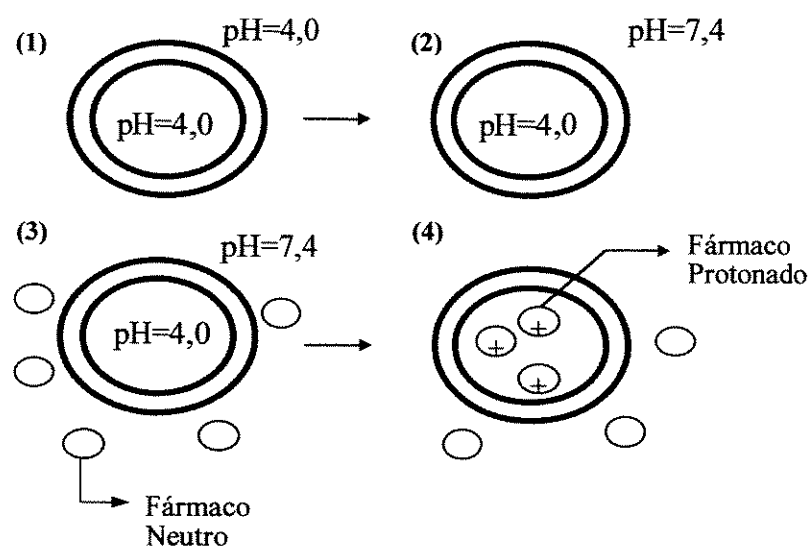


Figura 3.8: Esquema da técnica de encapsulação ativa de compostos terapêuticos em lipossomas. (1) Preparação dos lipossomas a pH 4,0; (2) estabelecimento de um gradiente transmembrana; (3) incubação dos lipossomas com o fármaco; (4) incorporação do fármaco (adaptada de Justo, 1999).

A influência do gradiente de prótons nas concentrações de fármacos nas fases aquosas interna e externa das vesículas pode ser avaliada pela equação de Henderson Hasselbach:

$$\frac{[HA^+]_{\text{interna}}}{[HA^+]_{\text{externa}}} = \frac{[H^+]_{\text{interna}}}{[H^+]_{\text{externa}}} \quad (3.1)$$

onde $[HA^+]$ é a concentração do composto terapêutico ionizado.

Nos últimos anos têm sido realizados alguns estudos sobre a incorporação de compostos terapêuticos em resposta a gradientes de pH. Em 1990, Madden et al. avaliaram a habilidade de fármacos representantes de várias classes (antineoplásicos, anti-histamínicos, anestésicos locais, analgésicos, antidepressivos entre outros) em se acumular no interior de lipossomas unilamelares em resposta a gradientes de pH. Estes autores observaram que o nível e a estabilidade de absorção variam consideravelmente entre os diferentes fármacos, e associaram essas diferenças a fatores como coeficiente de partição, solubilidade e pKa do fármaco em questão. Segundo os pesquisadores, a técnica de encapsulação ativa pode ser largamente utilizada para encapsular agentes terapêuticos em lipossomas, podendo-se obter razões molares fármaco/lipídio muito maiores que com técnicas de encapsulação convencionais. Além disso, quando se utiliza esta técnica, é possível controlar a taxa de liberação da droga por modificações na capacidade tamponante do meio intravesicular.

Uma forma alternativa para gerar um gradiente de pH sobre a bicamada lipídica foi descrita por Haran et al. (1993). Gradientes de sulfato de amônio foram usados para a obtenção de gradientes de pH nos lipossomas, conseguindo-se um acúmulo eficiente e estável de bases anfipáticas, como a doxorrubicina, no interior das vesículas. Nesta técnica, o pH interno cai, pois a passagem da molécula neutra do meio aquoso interno para o externo torna o interior do lipossoma protonado. Este transporte é um resultado da diferença de concentração sobre a bicamada e é dirigido pela difusão. Segundo os autores, os níveis de encapsulação e estabilidade foram dependentes da composição lipídica, qualidade do lipídio, temperatura e magnitude do gradiente de sulfato de amônio, bem como da hidrofobicidade, solubilidade e pKa do fármaco. Este método difere de outras técnicas de encapsulação ativa uma vez que não requer a preparação das vesículas em pH baixo, nem a neutralização do meio aquoso externo às vesículas. A magnitude do gradiente

pode ser controlada facilmente por diluição da dispersão de lipossomas com uma mistura isoosmótica de um soluto não permeável.

Com o intuito de identificar os parâmetros que geram um aumento na absorção e na retenção de fármacos contendo aminas, Maurer-Spurej et al. (1999) avaliaram a incorporação de quatro fármacos (doxorubicina, epirrubicina, ciprofloxacina e vincristina) em VUG, utilizando a técnica de encapsulação em resposta a gradientes de pH induzidos por gradientes de aminas. Os resultados apresentados indicaram que os fatores que conduzem a um aumento na partição do fármaco na bicamada lipídica da vesícula melhoram as propriedades de retenção. As observações que sustentam esta conclusão incluem a absorção muito maior de doxorubicina e epirrubicina em relação a ciprofloxacina e vincristina para vesículas contendo sulfato de diamina, e o aumento na retenção de ciprofloxacina e vincristina com a adição do fosfolipídio carregado negativamente, DSPG, na bicamada da vesícula. Os pesquisadores observaram que para os sulfatos de monoamina, o aumento da hidrofobicidade não afetou a absorção e a retenção de bases fracas empregadas, sugerindo que uma carga superficial positiva na interface água-monocamada mais interna não influencia a absorção e liberação de fármacos carregados positivamente. Contudo, a retenção dos fármacos no interior dos lipossomas foi altamente influenciada pelas características do fármaco em particular. O acúmulo muito maior verificado para doxorubicina e epirrubicina em relação a ciprofloxacina e vincristina foi relacionado aos diferentes coeficientes de partição membrana/água destes fármacos.

Uma outra investigação importante foi realizada por Mayer et al. (1999). Os pesquisadores demonstraram que lipossomas vazios exibindo um gradiente de pH, presentes na circulação, são capazes de encapsular doxorubicina injetada subsequente na forma livre. Lipossomas pequenos constituídos de fosfatidilcolina/colesterol (55:45 mol%) foram administrados por via intravenosa uma hora antes da injeção do fármaco livre, e níveis do fármaco no plasma, toxicidade e eficácia do fármaco foram avaliados. Os resultados mostraram uma alteração nas propriedades farmacocinéticas do fármaco associada através da encapsulação *in vivo*, verificada por um decréscimo na toxicidade e um aumento da atividade do fármaco. De acordo com os autores, este método apresenta vantagens claras no que diz respeito a problemas de

estabilidade química e habilidade de retenção do fármaco nos lipossomas, uma vez que o fármaco não sofre liberação indesejada durante o período de estocagem.

Pode-se dizer, de acordo com os estudos realizados, que a técnica de incorporação ativa de compostos terapêuticos em lipossomas apresenta algumas vantagens como a obtenção de elevadas eficiências de encapsulação, não há necessidade de remoção do material não encapsulado se a eficiência de encapsulação for de 100%, evita-se a exposição do composto encapsulado a solventes orgânicos, detergentes ou a condições onde seja envolvido cisalhamento intenso e, finalmente, permite-se que a encapsulação seja feita imediatamente antes do uso dos lipossomas, evitando-se a degradação dos compostos e a desestabilização da vesícula durante o período de estocagem.

3.8. Caracterização dos Lipossomas

Após a incorporação do composto terapêutico nos lipossomas e a remoção da quantidade não encapsulada, as vesículas podem ser caracterizadas quanto às concentrações de lipídios e de composto terapêutico, ao diâmetro médio, à estabilidade de estocagem e à estabilidade em solução de tensoativos não-iônicos, entre outros.

A determinação da concentração de lipídios pode ser feita por análise quantitativa de íons fosfato em solução. Para a determinação da concentração de composto terapêutico encapsulado, pode-se fazer uma avaliação da absorbância ou fluorescência da amostra, caso o composto incorporado as apresente, após o rompimento das vesículas com solventes orgânicos (etanol ou metanol) ou com detergentes (Triton X-100), por exemplo. A partir dos dados de concentração de lipídios e de composto terapêutico de uma determinada amostra, é possível avaliar a eficiência de encapsulação, pela comparação entre as razões molares inicial e final fármaco/lipídio antes e após a remoção do fármaco não encapsulado.

Normalmente, a distribuição dos tamanhos dos lipossomas formados pode ser obtida por espectroscopia de espalhamento de luz por incidência de raios laser (*quase-elastic light scattering*, QLS).

Como os agentes terapêuticos contidos nos lipossomas só atingirão o paciente após um determinado tempo, as vesículas preferencialmente não devem mudar suas características nem perder os compostos encapsulados durante a estocagem.

A estabilidade de estocagem das vesículas preparadas é muito importante do ponto de vista farmacológico, podendo ser afetada por fatores físicos, químicos ou microbiológicos (Crommelin e Schreier, 1994). A instabilidade física está associada à liberação indesejada do fármaco e às mudanças de tamanho e forma das vesículas, decorrentes de processos de agregação ou fusão dos lipossomas. A instabilidade química por sua vez está relacionada à degradação do fármaco ou dos lipídios. Sob o aspecto microbiológico, os lipossomas constituem um meio bastante atrativo para o desenvolvimento de microrganismos. De acordo com a via de administração, há uma exigência maior ou menor sobre o controle microbiológico. Além disso, deve ser considerado que a interação das vesículas lipídicas com preservativos antimicrobianos pode causar desestabilização física ou química.

3.9. Aplicações Terapêuticas dos Lipossomas

Nos últimos anos, vários novos métodos têm sido propostos para melhorar o transporte dos medicamentos no organismo. Dentre eles, o uso de lipossomas tem sido de grande interesse, uma vez que essas vesículas são capazes de direcionar o composto terapêutico para sítios específicos no corpo, prolongando os níveis do fármaco no organismo.

Estudos utilizando lipossomas como transportadores de fármacos têm mostrado que essas vesículas modificam a farmacocinética e biodistribuição dos compostos terapêuticos, podendo reduzir o número e a intensidade dos efeitos colaterais, poupando tecidos saudáveis como os rins e o fígado. Também possibilitam a diminuição de doses frequentes de medicamentos, pois as vesículas permanecem no organismo, liberando lentamente o fármaco por intervalos de tempo prolongado.

Outra vantagem da incorporação de fármacos em lipossomas é a possibilidade de sua administração através de diferentes rotas como as vias pulmonar, nasal, oral, intravenosa, subcutânea, tópica e intramuscular, conforme as características dos lipossomas preparados. O portal de entrada depende também das propriedades de solubilidade, absorção e estabilidade química do fármaco, bem como dos seus sítios e mecanismos de ação (Lasic, 1993).

3.9.1. Utilização dos Lipossomas na Administração Pulmonar de Medicamentos

Muitas doenças infecciosas, inflamatórias e alérgicas que atingem o pulmão têm sido tratadas com sucesso empregando-se sistemas de transporte com aerossol para o depósito dos fármacos diretamente na superfície pulmonar. Contudo, o uso do aerossol com fármacos hidrofóbicos tem sido limitado, devido à baixa solubilidade desses fármacos. Tentativas de sanar esse problema surgiram com o desenvolvimento de formulações de lipossomas compatíveis com o transporte do aerossol. A utilização dessas formulações tem vantagens potenciais para o tratamento clínico, incluindo: compatibilidade aquosa, liberação pulmonar sustentada para manutenção dos níveis terapêuticos do fármaco, e transporte intracelular facilitado para os macrófagos alveolares e linfócitos pulmonares (Waldrep et al, 1998).

Os lipossomas são particularmente apropriados para transportar fármacos para os pulmões uma vez que podem ser preparados de materiais endógenos aos pulmões, como os componentes do surfatante pulmonar. Este surfatante é uma mistura complexa constituída de, aproximadamente, 85% de fosfolipídios (dipalmitoilfosfatidilcolina e fosfatidilglicerol), além de colesterol, proteínas e carboidratos. O mecanismo para a liberação e reutilização do surfatante pulmonar é de grande importância na determinação do destino dos lipossomas depositados nos alvéolos (Taylor e Newton, 1992). Além disso, o pulmão é um órgão atrativo para a entrada de fármacos, tanto localmente como sistemicamente, pois é facilmente acessível, tem elevada área superficial e alto fluxo sanguíneo (Lasic, 1993).

A profundidade de penetração dos lipossomas administrados por via pulmonar depende do tamanho das partículas administradas. Partículas maiores que 15,0 μm são retidas na garganta e engolidas, enquanto partículas de 0,1 a 1,0 μm podem ser carregadas para os alvéolos. Aquelas que apresentam tamanhos entre esses extremos podem ser depositadas por todo o sistema de vias aéreas (Lasic, 1993). Segundo Bridges e Taylor (2000), para que a deposição nos alvéolos possa ocorrer, as partículas devem ser, preferencialmente, menores que 2,0 μm .

Em um estudo realizado por Thomas et al. (1991) com voluntários saudáveis, foram avaliados os efeitos agudos da administração de lipossomas via inalação. Foi observado que

a inalação de pequenas partículas de lipossomas, constituídas de fosfatidilcolina de soja (SPC), foi bem tolerada, não produzindo alterações na função pulmonar.

O transporte de fármaco para o trato respiratório humano é realizado por três tipos principais de equipamentos. O primeiro tipo compreende os inaladores de dose graduada pressurizada (MDI's), os quais apresentam soluções ou suspensões de fármaco em propelentes liquefeitos, como os clorofluorcarbonos (CFC). Quando dissolvidos em CFC, os fosfolipídios formam vesículas espontaneamente em ambiente aquoso. Contudo, os hidrofluoralcenos, usados em substituição aos CFC's por não prejudicarem a camada de ozônio, são solventes ruins para os fosfolipídios, constituindo um problema para o uso de lipossomas nestes sistemas.

No segundo grupo de equipamentos estão os inaladores de pó seco, a partir dos quais o fármaco é disperso nas vias aéreas do paciente como um pó fino, durante a inalação.

Por fim, os nebulizadores constituem o terceiro grupo de equipamentos para inalação, sendo os mais adequados para o transporte de lipossomas, uma vez que as vesículas utilizadas podem ser preparadas por técnicas convencionais, não necessitando de processamentos posteriores. Estes equipamentos são simples de usar e capazes de transportar um grande volume de aerossol, contendo o composto terapêutico, para os sítios específicos no interior dos pulmões (Bridges e Taylor, 2000).

Em nebulizadores a jato, ar comprimido é usado para converter o líquido em *spray*. O aerossol primário, a pequena proporção do que é gerado, tem um tamanho que é suficientemente pequeno para a inalação, e deixa o nebulizador diretamente. As partículas de aerossol remanescentes são grandes e se chocam com barreiras defletoras estrategicamente posicionadas, ou com as paredes da câmara do nebulizador, sendo recicladas para o reservatório do líquido.

A saída do aerossol é composta por gotículas da solução e vapor de solvente, que saturam o ar de saída. Isto faz com que a concentração de soluto remanescente aumente e a temperatura do líquido diminua com o tempo. A adequação de tais nebulizadores no transporte de lipossomas tem se mostrado dependente da formulação das vesículas. Perdas significativas do fármaco encapsulado nas vesículas podem ocorrer quando os lipídios se rompem durante a passagem pelo nebulizador. Estas perdas podem ser minimizadas quando

o tamanho das vesículas é reduzido antes da nebulização, ou quando são usados lipídios que conferem uma maior rigidez à bicamada, como o colesterol (Bridges e Taylor, 1998).

Um estudo mais detalhado sobre os nebulizadores a jato foi realizado por McCallion et al. (1996). Segundo estes autores, o projeto do nebulizador é um importante fator que influencia o tamanho do aerossol e a taxa de saída do fluido. A velocidade do gás de atomização é o principal delimitante do tamanho do aerossol, havendo uma relação inversa entre o tamanho da gota e a taxa de fluxo, devido ao aumento das forças cisalhantes a altas taxas de fluxos. Durante o uso deste tipo de nebulizador, a temperatura do fluido interior diminui consideravelmente, podendo resultar em precipitação de fármacos pouco solúveis, além de produzir variabilidade no tamanho da gotícula devido a mudanças nas propriedades físico-químicas dos fluidos nebulizados. Os pesquisadores também observaram que os nebulizadores a jato podem causar danos aos lipossomas contendo materiais hidrofílicos encapsulados, causando sua liberação indesejada devido às forças cisalhantes no interior do nebulizador.

Outros tipos de nebulizadores são os ultrassônicos, que geram aerossol através de vibrações de alta frequência de um cristal piezoelétrico, o qual gera pequenas ondas no fluido que, subsequentemente, produzem gotículas de aerossol. A energia em excesso é convertida em calor, podendo inativar materiais sensíveis como proteínas, por exemplo. Em consequência disto, não são frequentemente utilizados para a administração de lipossomas, uma vez que um aumento na temperatura pode induzir a fusão das vesículas e perda do fármaco incorporado (Bridges e Taylor, 1998).

Uma avaliação mais completa dos nebulizadores ultrassônicos para a administração pulmonar de medicamentos foi realizada por Taylor e McCallion, em 1997. Foi descrito o mecanismo de formação do aerossol e foram discutidos os fatores que determinam o tamanho do aerossol e a taxa de saída do fluido. O principal fator determinante dessas características é o projeto do nebulizador. O tamanho da partícula de aerossol e sua taxa de saída do nebulizador são frequentemente maiores que aqueles obtidos com nebulizadores a jato. Estes equipamentos também apresentam uma menor tendência de aumento da concentração de solutos dissolvidos no reservatório de líquido. Suspensões são transportadas de forma menos eficiente do que por nebulizadores a jato, com uma relação inversa entre o tamanho das partículas em suspensão e sua taxa de saída. Como durante o

uso há um aumento da temperatura do fluido remanescente, a utilização de lipossomas cujo material encapsulado é liberado com mudanças de temperatura deve ser evitada. Os autores afirmam que as vesículas lipídicas podem sofrer fusão, o que resultaria em perda de materiais hidrofílicos encapsulados. Contudo, os autores citam um trabalho realizado por Leung et al. (1996), onde a adição de colesterol às bicamadas lipídicas aumenta a estabilidade dos lipossomas, sendo possível o transporte de vesículas grandes através de nebulizadores ultrassônicos.

Em 1998, Bridges e Taylor investigaram o potencial de nebulizadores ultrassônicos e a jato, para a administração de lipossomas. Os autores utilizaram lipossomas extrudados de fosfatidilcolina de ovo (EPC), de EPC/colesterol e de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)/colesterol, em várias concentrações distintas. O tamanho das partículas de aerossol geradas a partir da suspensão de lipossomas foi dependente da concentração de lipídios, particularmente para nebulizadores a jato, o que é provavelmente uma função da mudança na viscosidade do fluido. Fatores como o tamanho da vesícula (estudadas na faixa de 1 a 5 μm) e a composição da bicamada foram insignificantes na determinação do tamanho do aerossol. A geração de aerossol pelos dois tipos de nebulizadores resultou em danos às estruturas das vesículas, com a conseqüente alteração de seus diâmetros. Para nebulizadores a jato, observou-se uma diminuição no tamanho das vesículas remanescentes no reservatório, sendo esta redução mais pronunciada para lipossomas de EPC. Segundo os autores, como a temperatura excedia a temperatura de transição de fases da EPC, as bicamadas relativamente fluidas tornavam os lipossomas mais suscetíveis à ruptura devido às forças cisalhantes. A estabilidade das vesículas durante a atomização também dependia do tamanho da gota de aerossol gerada, uma vez que a produção de gotas menores está associada a forças cisalhantes maiores. A adição de colesterol aos lipossomas de EPC, ou o emprego da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), possibilitou uma maior resistência das vesículas a forças de ruptura durante a nebulização a jato ou ultrassônica.

Como continuação deste estudo, Bridges e Taylor, em 2000, investigaram alguns fatores que influenciaram a nebulização a jato dos lipossomas. Os autores testaram quatro tipos de nebulizadores para o transporte de aerossol de lipossomas multilamelares de EPC com ou sem adição de colesterol, na razão molar (1:1). Foram utilizadas vesículas com diâmetros de 1, 2,5 e 5 μm . Os resultados demonstraram que o importante é a seleção em

conjunto do nebulizador e do lipossoma. Há uma relação entre o tamanho dos lipossomas e a taxa com que são transportados ou retidos nos nebulizadores, sendo determinada pelo projeto do nebulizador em questão. Como já descrito anteriormente, o tamanho das gotículas de aerossol foi bastante influenciado pela concentração de lipossomas. Um aumento nesta concentração resultou em uma maior viscosidade, aumentando o número de bicamadas de lipossomas no sistema. Isto produz um aumento no tamanho do aerossol secundário, o qual pode ser atribuído a vários mecanismos, incluindo um aumento da viscosidade do fluido, agregação de vesículas ou inibição da evaporação da gotícula. O aumento da concentração lipídica causou a redução da taxa de saída do aerossol.

Os resultados obtidos pelos pesquisadores também sugeriram que ocorria uma seleção na liberação de lipossomas no interior do nebulizador. O tamanho da partícula de aerossol estudado foi de 2 μm e, assim, uma população de lipossomas de EPC/Col com 5 μm de diâmetro, sendo relativamente rígida, não pôde ser nebulizada. A utilização de lipossomas menores (1 μm) assegurou que a maioria das vesículas fossem nebulizadas. Este processo foi dependente do tipo de nebulizador utilizado.

Como pôde ser observado, os pesquisadores não explicitaram qual tamanho de vesícula lipídica seria o ideal para a nebulização, apenas indicaram que as vesículas muito grandes, com diâmetro de 5 μm , poderiam sofrer dificuldades para serem nebulizadas, uma vez que partículas de aerossol com até 2 μm são as preferíveis para a deposição nos alvéolos pulmonares (Bridges e Taylor, 2000). Segundo Taylor e Newton (1992), os lipossomas maiores tornam-se mais estáveis quando têm seus tamanhos reduzidos através da extrusão ou sonicação. Em geral, os estudos também sugeriram que o aumento da rigidez da bicamada lipídica pela adição de colesterol, ou o uso de fosfolipídios com altas temperaturas de transição de fases, como o DPPC por exemplo, pode conferir maior resistência dos lipossomas às forças cisalhantes durante a nebulização a jato ou ultrassônica.

O nível de estudo sobre a administração de aerossóis de lipossomas não se limita à adequação dos equipamentos utilizados, incluindo também a avaliação de sua eficácia *in vivo*, conforme discutido a seguir.

Em 1993, Gilbert et al. desenvolveram um estudo na tentativa de aumentar a eficácia do agente imunossupressor ciclosporina A (CsA), administrado a pacientes submetidos a transplantes pulmonar. A CsA, quando administrada sistemicamente, tem apresentado pouco efeito sobre as células T do pulmão, resultando em alto índice de rejeição nos pacientes, além de elevada toxicidade. Os pesquisadores propuseram o uso de aerossóis de lipossomas de fosfatidilcolina de ovo (EPC) encapsulando CsA para aplicação de fármaco diretamente no epitélio respiratório. Foram testadas várias razões molares, tendo-se a maior quantidade de fármaco associado na razão molar inicial 1:12 CsA/EPC. As partículas de aerossóis com 2 μm de diâmetro médio, administradas a ratos durante 15 minutos diários por 4 dias (0,11 mg/kg/dia), permitiram uma distribuição do fármaco por todo o trato respiratório em concentrações equivalentes às aquelas obtidas com a administração de 1,8 mg/kg/dia do fármaco livre por via intravenosa, sem apresentar, contudo, níveis detectáveis no sangue. Segundo os pesquisadores, essa concentração deveria ser suficiente para suprimir a atividade das células T. Os pesquisadores concluíram que, provavelmente, a utilização de aerossóis de pequenas partículas de CsA-lipossomas, em conjunto com a administração de CsA por via intravenosa, poderia ser o tratamento mais eficiente na redução da atividade imunológica pulmonar. Os autores não citaram o tamanho da vesícula lipídica produzida, apesar de ser um dado importante para esta via de administração.

Conley et al.(1997) investigaram o uso de 12 tipos de nebulizadores a jato comercialmente disponíveis para a liberação de ciprofloxacina encapsulada em lipossomas de EPC:Col (1:1 mol%). O fármaco foi incorporado às vesículas pela técnica de encapsulação ativa, com 90% de eficiência de encapsulação, e foi utilizada para o tratamento de ratos infectados com doses letais de *Francisella tularensis*. O nebulizador selecionado produziu partículas de 3,4 a 3,5 μm . Foi observado que todos os ratos tratados com o aerossol do fármaco encapsulado em lipossomas sobreviveram, enquanto os ratos tratados ou não com o fármaco livre morreram. Os resultados sugeriram que o uso do aerossol de lipossomas contendo a ciprofloxacina é possível, sendo provavelmente uma terapia eficiente para o tratamento de infecções respiratórias. Segundo os autores, o aumento da eficácia terapêutica gerado pela administração pulmonar de aerossóis de lipossomas encapsulando ciprofloxacina pode ser, em parte, devido ao transporte intracelular do fármaco realizado pelas vesículas lipídicas.

Waldrep et al. (1998) desenvolveram um sistema otimizado de transporte pulmonar de ciclosporina A, utilizando nebulizadores a jato para o transporte de aerossóis de ciclosporina (CsA)-dilauroilfosfatidilcolina (DLPC). Após inalação contínua por 15 minutos, ratos Balb/c foram sacrificados para análise dos níveis de fármaco nos tecidos. Os níveis do fármaco encontrados nos pulmões foram, aproximadamente, 18 vezes maiores que no fígado e 104 vezes maiores que no sangue, enquanto nada foi detectado nos rins ou no baço. Segundo os autores, o sistema testado apresentou benefícios potenciais como toxicidade sistêmica reduzida e atividade imunossupressora prolongada, além da possibilidade de administração de dosagens menores do fármaco em relação àquelas utilizadas em rotas convencionais (oral e intravenosa).

No tratamento de doenças inflamatórias pulmonares, a dexametasona (DEX) aparece como um glucocorticóide utilizado com sucesso. Todavia, seus benefícios são geralmente complicados pelo aparecimento de efeitos colaterais sistêmicos. Assim, visando a obtenção de altos níveis pulmonares do fármaco, com efeitos sistêmicos indesejáveis mínimos, Suntres e Shek (1998) estudaram o transporte pulmonar de uma nova formulação de DEX encapsulada em lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), com diâmetros médios de 230 nm, na razão molar DPPC/DEX de 9:1. Doses de DEX livre e encapsulada em lipossomas foram administradas intratraquealmente a ratos adultos (800 mg DEX/kg) e uma avaliação foi realizada num período de 72 horas. Com a administração da DEX incorporada a lipossomas, obteve-se os melhores resultados: uma maior retenção do fármaco nos pulmões, efeitos colaterais sistêmicos reduzidos e uma atividade antiinflamatória prolongada. Também foi verificado que os pulmões apresentam potencial para servir como depósito para liberação controlada de fármaco, desde que sejam utilizadas formulações apropriadas. Esses resultados sugerem que a utilização de lipossomas como veículos para o transporte de DEX tem a vantagem de aumentar a atividade antiinflamatória do fármaco e, possivelmente, reduzir a necessidade de administração freqüente.

3.9.2. Utilização dos Lipossomas na Terapia da Tuberculose

A encapsulação em lipossomas de fármacos utilizados na terapia de doenças causadas por microrganismos do gênero *Mycobacterium* já foi estudada por alguns pesquisadores. Em 1991, Gangadharam et al. investigaram o potencial quimioterapêutico

da estreptomicina na forma livre e encapsulada em lipossomas no combate ao *Mycobacterium avium* (MAC), microrganismo causador de graves infecções em pacientes com AIDS. Foram realizados dois tipos de estudos. No primeiro, a suspensão de vesículas multilamelares de fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC) e colesterol (Col), contendo o composto encapsulado, foi administrada a camundongos por via intravenosa (duas doses de 15 mg/kg), comparando-se os resultados com a administração intramuscular do fármaco na forma livre (100 mg/kg por cinco dias/semana) durante quatro semanas. No segundo estudo, comparou-se o efeito da estreptomicina administrada na forma livre (150 mg/kg por cinco dias/semana) durante oito semanas, com a injeção intravenosa de fármaco encapsulado em vesículas unilamelares de PG:PC:Col (4 doses de 15 mg/kg). Em ambos os casos, a encapsulação da estreptomicina em lipossomas resultou no aumento da sua eficácia terapêutica, quando os autores expressaram a resposta por unidade de dose administrada. Segundo os pesquisadores, esta eficácia se deve, provavelmente, ao transporte do fármaco diretamente para o sítio de multiplicação da micobactéria, onde a estreptomicina livre penetra pobremente.

Metha et al. (1993) estudaram as atividades antibacterianas de 19 fármacos para o tratamento da Tuberculose, selecionando 7 deles para incorporação em lipossomas multilamelares de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), preparados na razão molar fármaco/lipídio de 1:10. Foram obtidas eficiências de encapsulação de 62 a 100%, e os resultados mostraram que as atividades antibacterianas de alguns fármacos, particularmente clofazimina e resorcinomicina, foram mantidas após a incorporação dos fármacos em lipossomas.

Seguindo essa linha de pesquisa, Agarwal et al., em 1994, utilizaram lipossomas constituídos de fosfatidilcolina de ovo (EPC) para a encapsulação do agente rifampicina. O fármaco encapsulado em lipossomas e administrado por via intravenosa (10 mg/kg) duas vezes por semana, durante duas semanas, foi 50 vezes mais efetivo na redução do número de bacilos localizados nos pulmões de camundongos que o tratamento com o fármaco livre nas mesmas condições. Segundo os autores, isto foi devido, provavelmente, à habilidade dos lipossomas de se acumularem preferencialmente nos macrófagos, permitindo uma alta concentração intracelular de fármaco. Quando o tetrapeptídeo ativador de macrófagos

tuftsin foi incorporado à bicamada lipídica das vesículas, foi observado um aumento 2000 vezes maior na atividade antituberculose do composto.

Gangadharam et al. (1995) testaram a eficácia da estreptomicina encapsulada em lipossomas, convencionais e com tempo de circulação prolongado, no combate ao *Mycobacterium avium* (MAC). O fármaco foi incorporado a lipossomas de três composições distintas, todas preparadas na razão molar de 9:1:6,7, sendo elas: a) fosfatidilcolina de ovo (EPC)/fosfatidilglicerol (PG)/colesterol (Col); b) distearoilfosfatidilcolina (DSPC)/distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE)-polietilenoglicol (PEG)/colesterol (Col) e; c) distearoilfosfatidilcolina (DSPC)/fosfatidilinositol (PI)/colesterol (Col). A técnica de encapsulação passiva, seguida de extrusão, permitiu a obtenção de vesículas com diâmetros médios de 172 nm, com razões molares finais F/L variando de 0,129 a 0,204. A estreptomicina encapsulada nos lipossomas de EPC:PG:Col e DSPC:PI:Col, administrada a camundongos por via intravenosa (15-30 mg/kg duas vezes/semana, durante duas semanas), gerou uma redução da quantidade de bacilos do fígado similar àquela observada quando da administração do fármaco livre em quantidades 25 a 50 vezes maior (150 mg/kg cinco dias por semana durante quatro semanas). Não foram observadas diferenças significativas na redução dos bacilos do baço para os três tipos de lipossomas estudados. No pulmão, o efeito do fármaco foi menor, porém, também causou a redução dos níveis de MAC. Neste estudo, os lipossomas estericamente estabilizados não apresentaram vantagens sobre as vesículas convencionais.

Oh et al. (1995) investigaram formulações dos antibióticos ciprofloxacina e azitromicina em lipossomas e avaliaram suas atividades antibacterianas contra o *M. avium*. Foram obtidas pequenas eficiências de encapsulação para a ciprofloxacina através da incorporação passiva, enquanto eficiências superiores a 90% foram adquiridas com a técnica de encapsulação utilizando gradientes de pH. Os lipossomas de azitromicina foram preparados pelo método do congelamento-descongelamento para evitar instabilidade química durante a estocagem, conseguindo-se uma razão molar final fármaco/lipídio de 0,33. Ambos os fármacos apresentaram maior eficácia na erradicação do *M. avium* no interior dos macrófagos quando encapsulados em lipossomas.

Em 1997, Deol et al. estudaram a eficácia e a toxicidade dos fármacos isoniazida e rifampicina encapsuladas em lipossomas estericamente estabilizados, *Stealth*, constituídos

de fosfatidilcolina (PC), colesterol (Col), discetilfosfato (DCP), distearoilfosfatidiletanolamina acoplada a polietilenoglicol (DSPE-PEG), na razão de PC:Col:DCP:DSPE-PEG de 2:1,5:0,2:0,2. Os fármacos na forma livre e encapsulados foram injetados em ratos infectados com o *M. tuberculosis* duas vezes por semana, durante seis semanas. A eficácia dos fármacos foi avaliada em termos de eliminação do microrganismo dos órgãos dos ratos infectados. A redução de colônias nos pulmões, fígado e baço foi significativamente maior com a utilização dos fármacos incorporados nas vesículas, mesmo com concentrações inferiores às dosagens terapêuticas usuais. Os fármacos associados aos lipossomas também se mostraram superiores aos fármacos livres na análise de hepatotoxicidade, pois verificou-se que os fármacos encapsulados causaram uma menor toxicidade.

Ainda em 1997, Deol e Khuller realizaram a modificação da superfície de lipossomas *Stealth* por adição de o-estearoilamilopectina (O-SAP), visando aumentar a eficácia da quimioterapia contra a Tuberculose. Formulações de lipossomas contendo PC de ovo, colesterol, dicetilfosfato, O-SAP e GM1/DSPE-PEG 2000 foram as mais estáveis e apresentaram uma maior afinidade pelos tecidos pulmonares de ratos, onde se acumularam em maior quantidade que no sistema reticuloendotelial. Os lipossomas encapsulando os fármacos foram administrados por via intravenosa. A estabilidade *in vivo* destes lipossomas possibilitou uma liberação lenta e controlada do seu conteúdo retido. Para os fármacos isoniazida e rifampicina associados aos lipossomas foi observada uma toxicidade reduzida *in vivo* em comparação aos fármacos livres.

Em um trabalho realizado por Adams et al. (1999), a eficácia terapêutica da clofazimina encapsulada em lipossomas, constituídos de DMPC:DMPG na razão molar 7:3, foi estudada em ratos Balb/c infectados com o *Mycobacterium tuberculosis*. Os ratos foram tratados com o fármaco na forma livre (F-CLF) e encapsulado em lipossomas (L-CLF), administrado por via intravenosa, duas vezes por semana, após 1 dia de infecção (forma aguda da doença), 21 dias (forma estabelecida) e 90 dias (forma crônica) pós-infecção. Os tratamentos com a dosagem requerida de F-CLF não se mostrou eficiente, enquanto o uso de doses 10 vezes maiores de L-CLF permitiu redução significativa no número de células do microrganismo em todos os tecidos analisados (fígado, baço e

pulmões), sem apresentar efeitos tóxicos. Os autores consideraram o sistema L-CLF eficiente no tratamento da Tuberculose, independente do estágio de infecção.

Dentre as pesquisas desenvolvidas por nossa equipe, um importante estudo foi realizado por Justo (1999). Foi investigada a encapsulação em lipossomas de fármacos utilizados na terapia primária e secundária da Tuberculose, para sua administração por inalação. Os fármacos isoniazida, pirazinamida e etionamida foram incorporados nos lipossomas de distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e Colesterol (Col) (60:40 mol%) por encapsulação passiva, obtendo-se vesículas com diâmetros médios de 286 a 329 nm e eficiências de encapsulação de 2,5%, 2,2% e 42%, respectivamente. Também foi utilizada a encapsulação através de gradientes de pH para os mesmos fármacos, além da rifampicina e estreptomicina. Para estas vesículas, os diâmetros médios variaram de 322 a 404 nm e as eficiências de encapsulação foram de 20% para a rifampicina e 100% para os outros compostos. Os resultados obtidos indicaram que a encapsulação estável dos fármacos é possível e que, apesar da realização de poucos experimentos utilizando a técnica de encapsulação ativa, esta resultou em eficiências de encapsulação bem maiores que a incorporação passiva, mostrando-se como uma técnica mais vantajosa, devendo ser mais explorada.

Outro trabalho desenvolvido na FEQ/UNICAMP foi realizado por Lima (2001). O autor estudou a associação e liberação de isoniazida e pirazinamida em lipossomas convencionais de DSPC:DMPE:Col (40:20:40 mol%), e estericamente estabilizados, *Stealth*, de DSPC:DMPE:Col:DMPE-PEG (34:20:43:3 mol%). Os fármacos foram associados às vesículas lipídicas nas formas livres ou complexados em ciclodextrinas (oligossacarídeos cíclicos). As eficiências máximas de encapsulação para a pirazinamida e isoniazida, para os dois tipos de lipossomas, foram de 14,2% e 10,0%, correspondendo a razões molares finais fármaco/lipídio de 0,019 e 0,013, respectivamente. A presença de PEG aumentou consideravelmente a estabilidade da bicamada lipídica.

A Tabela 3.3 resume os principais dados encontrados na literatura com referência à encapsulação de isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas.

Como pode-se observar, de acordo com as pesquisas realizadas nos últimos anos, a utilização de lipossomas como carregadores de fármacos antituberculose pode apresentar vantagens sobre o tratamento quimioterapêutico convencional da Tuberculose, mostrando-

se como tecnologia promissora capaz de elevar o índice terapêutico de fármacos já existentes. Ressalta-se, no entanto, que a literatura é escassa no tocante a estudos enfocando a avaliação da eficácia *in vivo* de fármacos encapsulados em lipossomas, administrados por inalação, no combate a esta doença.

Tabela 3.3: Características das preparações de lipossomas encapsulando isoniazida, pirazinamida e estreptomicina.

Fármaco Encapsulado	Composição Lipídica	Diâmetro médio (nm)	Eficiência (%)	(F/L) final	Métodos Preparação/ Incorporação	Referência
Isoniazida	DSPC:Col (60:40)	286,0	2,5	0,33	Hidratação/ Passivo	Justo, 1999
		404,0	100	0,2	Hidratação/ Ativo	
Isoniazida	DSPC:DMPE:Col (40:20:40)	120,5	10,0	0,013	Hidratação/ Passivo	Lima, 2001
	DSPC:DMPE:Col :DMPE-PEG (34:20:43:3)	108,7	8,3	0,011		
Pirazinamida	DSPC:Col (60:40)	329,0	2,2	0,29	Hidratação/ Passivo	Justo, 1999
		402,0	100	0,2	Hidratação/ Ativo	
Pirazinamida	DSPC:DMPE:Col (40:20:40)	131,8	14,2	0,019	Hidratação/ Passivo	Lima, 2001
	DSPC:DMPE:Col :DMPE-PEG (34:20:43:3)	117,8	7,5	0,010		
Estreptomicina	DSPC:Col (60:40)	322,0	100	0,2	Hidratação/ Ativo	Justo, 1999
Estreptomicina	EPC:PG:Col (9:1:6,7)	172,0	n.m.	0,129 a 0,204	Hidratação/ Passivo	Gangadharam et al., 1995
	DSPC:PI:Col (9:1:6,7)					
	DSPC:Col:DSPE-PEG (9:6,7:1)					

n.m.: não mencionado

Capítulo IV

Materiais e Metodologia

4.1. Materiais

Os compostos terapêuticos isoniazida (ácido isonicotínico), pirazinamida e estreptomicina, o lipídio colesterol (Col), o agente tamponante Hepes, o ácido cítrico, o gel Sephadex G-50, o detergente Triton X-100 reduzido, o solvente metanol, a ninidrina e o hidróxido de sódio foram adquiridos da Sigma Chemical Company. A fosfatidilcolina de soja (SPC) foi obtida da Lucas Meyer Co. O solvente orgânico clorofórmio e o peróxido de hidrogênio foram obtidos da Merck. O solvente etanol, o molibdato de amônio e o ácido ascórbico foram obtidos da Synth. O ácido sulfúrico foi adquirido da Química Especializada Erich Ltda. As membranas de polycarbonato utilizadas na extrusão foram obtidas da Poretics e as de diálise da Inlab. A água utilizada foi destilada e deionizada em sistema Milli-Q da Millipore.

4.2. Metodologia

4.2.1. Preparação de Lipossomas

Foram preparados lipossomas compostos de 60% de fosfatidilcolina de soja (SPC) e 40% de colesterol (Col) (mol/mol) por dois métodos distintos: hidratação do filme lipídico seco e injeção de etanol. A seguir as duas metodologias serão apresentadas detalhadamente.

4.2.1.1. Método de Hidratação do Filme Lipídico Seco

O método de hidratação do filme lipídico seco, seguido por extrusão através de membranas de polycarbonato, foi utilizado para preparar lipossomas encapsulando isoniazida por incorporação passiva, bem como lipossomas vazios destinados à incorporação ativa de

isoniazida, pirazinamida e estreptomicina, de acordo com o procedimento utilizado por Justo (1999).

As vesículas incorporando isoniazida pela técnica de encapsulação passiva foram utilizadas em um estudo preliminar para a escolha dos métodos mais adequados, a serem empregados nos ensaios posteriores, para a remoção do fármaco não encapsulado nos lipossomas e para a sua detecção quantitativa.

O método de hidratação do filme lipídico seco permitiu o preparo de vesículas multilamelares que, em seguida, foram transformadas em lipossomas unilamelares grandes pela técnica de extrusão com membranas de policarbonato.

Inicialmente, os lipídios foram pesados em uma balança analítica da Quimis Aparelhos Científicos Ltda, modelo LAC 214, visando a obtenção de 10mL de suspensão de lipossomas com concentração final total de lipídios de 7,5 mM.

As massas pesadas foram colocadas em um balão de fundo redondo de vidro de 50mL de capacidade, e adicionou-se então 10mL de uma solução dos solventes orgânicos clorofórmio/metanol (9:1 v/v) para a solubilização dos lipídios. O balão foi colocado primeiramente por 20 minutos, à temperatura ambiente, em um evaporador rotatório Art Lab, modelo Fisatom 802, sob vácuo, com rotação de 150 rpm, e em seguida por mais 15 minutos a 65 °C. Nesta etapa, a solução de solventes orgânicos foi evaporada, havendo a formação do filme lipídico seco, que foi posteriormente hidratado com 10mL de uma solução de 100 mM de isoniazida em tampão Hepes (10 mM a pH 7,4) por 30 minutos a 65°C, na mesma rotação.

Deixou-se a suspensão em repouso por 30 minutos para que fosse atingido o equilíbrio e, em seguida, realizou-se a etapa de sonicação em banho sonicador da Branson durante 10 minutos.

As vesículas multilamelares foram então homogeneizadas através de 15 passagens por uma extrusora de aço inox, modelo T. 001 da Lipex Biomembranes Inc., provida de um sistema de aquecimento de camisa térmica para manutenção da temperatura a 65 °C. Para a extrusão foram utilizados um disco de drenagem e duas membranas de policarbonato

sobrepostas, com diâmetro de poro de 400nm. O equipamento era acoplado a um cilindro de nitrogênio, onde a pressão era mantida entre 2 e 5 kgf/cm².

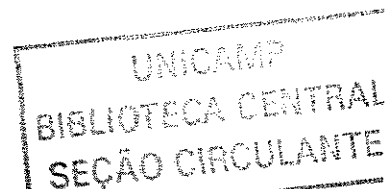
Para o preparo das vesículas vazias destinadas à encapsulação ativa, o método utilizado foi semelhante. Contudo, após a etapa de evaporação dos solventes orgânicos, ao invés da adição da solução de composto terapêutico, o filme seco de lipídios foi hidratado com uma solução de ácido cítrico a 300 mM a pH 4,0 (Madden et al., 1990). Os lipossomas formados foram estocados em geladeira a 5°C, sendo submetidos posteriormente ao processo de incorporação dos fármacos.

4.2.1.2. Método de Injeção de Etanol

A técnica de injeção de etanol foi baseada na metodologia descrita por Batzri e Korn (1973) e Costa (2000). Os volumes de solução tampão e solução lipídica injetada foram calculados para que não fosse ultrapassado o valor de 5% (em volume) de etanol na suspensão final de lipossomas.

Primeiramente, uma solução de 100 mM de lipídios (SPC/Col) em etanol foi preparada. Em seguida, uma alíquota de 3,0 mL desta solução foi injetada rapidamente em um béquer de 100 mL de capacidade, contendo 57,0 mL de solução de ácido cítrico a 300 mM e pH 4,0, imerso em um banho ultrassônico a 65°C. A formação das vesículas ocorreu instantaneamente, sendo estas sonicadas durante três minutos. A injeção foi realizada com uma seringa de vidro de 3,0 mL de capacidade, com uma agulha de aço inoxidável de 10 cm de comprimento e 4 µm de diâmetro. Um esquema representativo do sistema experimental está ilustrado na Figura 4.1. Estes lipossomas vazios, contendo ácido cítrico em seu interior, foram destinados à incorporação ativa, conforme será descrito posteriormente.

Para os ensaios de incorporação passiva dos fármacos, um volume de 0,5 mL da solução lipídica em etanol foi injetado em 9,5 mL de uma solução de 100 mM de fármaco em tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4. Assim, a razão molar fármaco/lipídio inicial era de 95:5. Para a isoniazida também foi testada uma razão F/L inicial de 475:5, e para a estreptomicina de 166,3:5, mantendo-se as mesmas condições operacionais.



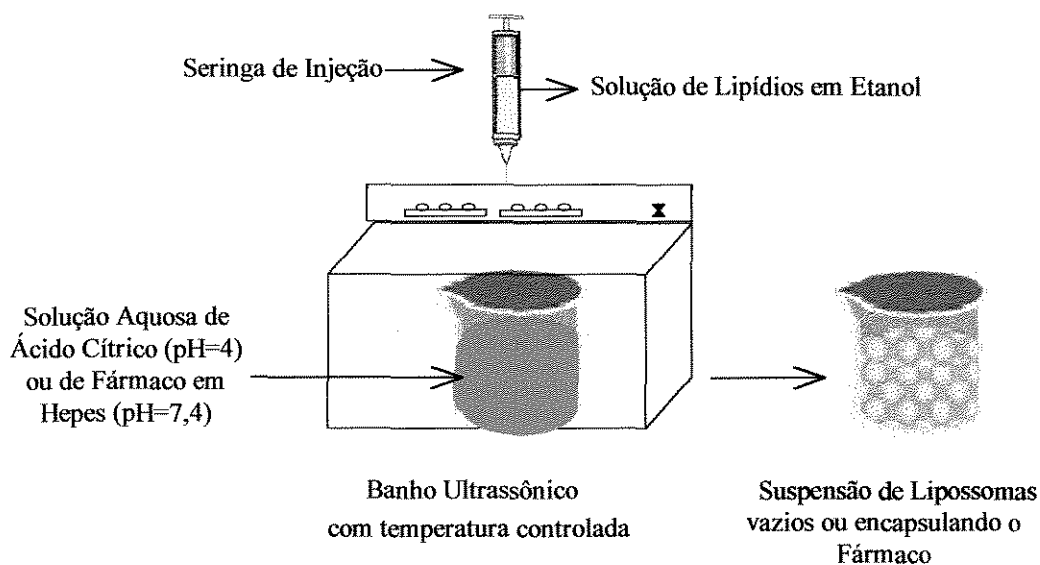


Figura 4.1: Representação esquemática do método de injeção de etanol para a preparação de lipossomas.

4.2.2. Incorporação Ativa dos Fármacos Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina

Na técnica de incorporação ativa utilizada neste trabalho, os compostos foram encapsulados nos lipossomas devido à existência de gradientes de pH entre as regiões aquosas interna e externa das vesículas. Para os lipossomas extrudados, o estabelecimento destes gradientes foi efetuado pela passagem da suspensão de vesículas, preparadas em tampão ácido cítrico a pH 4,0, através de uma coluna cromatográfica da Sigma, de 2,5 cm de diâmetro e 50 mL de volume de leito, empacotada com gel de Sephadex G-50. Uma solução tampão Hepes preparada a 10mM a pH 7,4 foi utilizada tanto no equilíbrio prévio da coluna, como na eluição das vesículas pela mesma. Desta maneira, um gradiente de pH de 3,4 unidades foi estabelecido nos lipossomas.

Para os lipossomas preparados por injeção de etanol, o gradiente de pH foi gerado pela titulação da suspensão com NaOH. Optou-se pela titulação uma vez que o método de injeção de etanol é associado à formação de uma suspensão de lipossomas mais diluída, o que resultaria em uma concentração lipídica ainda menor caso fosse utilizada a

cromatografia. Nesta etapa poderia ter sido utilizada a ultrafiltração, entretanto, esta técnica foi preterida devido ao longo tempo de processamento.

Para a encapsulação, as vesículas foram devidamente diluídas e misturadas com soluções dos fármacos em tampão Hepes (10mM com pH 7,4) a diferentes razões molares fármaco/lipídio. As misturas foram colocadas em frascos erlenmeyer de 50 mL e incubadas a 200 rpm a temperaturas distintas, em agitador orbital modelo 624 da New Brunswick Scientific Co.

Para cada composto terapêutico, isoniazida, pirazinamida e estreptomicina, foi realizado um planejamento experimental 2^3 com duplicata nos pontos centrais, com o objetivo de verificar a influência das variáveis razão molar inicial fármaco/lipídio $(F/L)_{\text{inicial}}$, temperatura e tempo de incubação das amostras na eficiência de encapsulação do fármaco nos lipossomas. Devido a limitações experimentais, as condições dos ensaios realizados nem sempre foram idênticas para a $(F/L)_{\text{inicial}}$, onde os limites inferior e superior variaram de 0,16 a 2,0, respectivamente. O limite inferior foi escolhido a fim de que fosse possível a detecção do fármaco. A maior $(F/L)_{\text{inicial}}$ foi de 2,0 pois, para a técnica encapsulação ativa, razões molares muito altas podem gerar menores eficiência de encapsulamento, uma vez que causam a diminuição do gradiente de pH. A temperatura mínima utilizada foi de 25°C, por ser a temperatura ambiente, o que implicaria em baixos dispêndios energéticos quando do escalonamento do método, e a máxima foi de 60°C por ser superior à temperatura de transição da SPC. Não se empregou temperaturas superiores a 60°C para minimizar a degradação dos fármacos. Os tempos de incubação variaram de 10 a 60 minutos.

Nos ensaios onde se empregou as soluções tampão Hepes a 10 mM e pH 8,0 e Hepes/NaCl a 10 mM/120 mM e pH 8,0, os lipossomas vazios foram preparados pelo método de injeção de etanol e o procedimento para a geração do gradiente de pH foi o mesmo do realizado para os lipossomas extrudados, variando-se apenas as soluções tampão usadas na eluição. Assim, o gradiente de pH estabelecido nos lipossomas foi de 4,0 unidades. Para a encapsulação, as vesículas foram misturadas com as soluções dos fármacos preparadas com o respectivo tampão que estava sendo testado, empregando-se razões molares iniciais F/L de 0,16, temperatura de incubação de 60°C e tempo de incubação de 10 minutos.

Após a incorporação dos fármacos às vesículas, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e, em seguida, foram submetidas à remoção dos compostos não encapsulados, conforme descrito a seguir.

4.2.3. Remoção dos Compostos Terapêuticos não Encapsulados nos Lipossomas

Os fármacos não encapsulados foram removidos empregando-se três técnicas distintas: cromatografia de permeação em gel, diálise e ultrafiltração, sendo o primeiro deles o mais freqüentemente utilizado.

4.2.3.1. Remoção por Cromatografia de Permeação em Gel

Neste método, utilizou-se uma coluna cromatográfica da Sigma, de 2,5 cm de diâmetro e 10 cm de altura de leito, empacotada com gel de Sephadex G-50 de massa molecular de exclusão de 1,5 a 30 kDa.

Primeiramente, a coluna foi pré-equilibrada com 50mL de tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4. Aliquotas de até 3,0 mL da suspensão de lipossomas encapsulando o fármaco foram adicionadas à coluna, seguidas do tampão de eluição Hepes. As amostras eluídas ricas em lipossomas foram combinadas.

4.2.3.2. Remoção por Diálise

Na remoção por diálise, foram utilizadas membranas tipo envelope (Inlab) com massa molecular de corte entre 12.000 e 16.000 Da. As membranas, que mediam 2,5 cm x 30 cm, foram cortadas pela metade para se obter novas membranas com 2,5 cm x 15 cm.

Inicialmente, realizou-se a hidratação das membranas em água deionizada fervente, durante 30 minutos. Em seguida, adicionou-se um volume de 2,5 mL de amostras e colocou-se o envelope em um béquer contendo 100mL de solução tampão Hepes a 10mM e pH 7,4. O sistema foi mantido sob refrigeração a 5°C, trocando-se a solução tampão quatro vezes no intervalo total de 40 horas.

4.2.3.3. Remoção por Ultrafiltração

Nos ensaios para a remoção do fármaco livre por ultrafiltração, utilizou-se uma célula de ultrafiltração Amicon modelo 50, com uma membrana de polietileno do tipo XM 50, com massa molecular de corte de 50.000 Da.

À célula de ultrafiltração, adicionou-se 4mL de amostra, seguidos de 46mL de solução tampão Hepes 10mM a pH 7,4. O sistema foi mantido a uma pressão de cerca de 2,5 kgf/cm² de nitrogênio, sob agitação magnética constante, sendo realizadas 4 etapas de separação nas mesmas condições.

4.2.4. Caracterização dos Lipossomas

Após a separação dos fármacos não incorporados aos lipossomas, as amostras foram caracterizadas quanto às concentrações de lipídios e de fármacos e ao diâmetro médio, obtendo-se dessa forma as eficiências de encapsulação dos fármacos em cada ensaio realizado.

4.2.4.1. Determinação da Concentração de Lipídios

A concentração de lipídios nas amostras foi determinada pela quantificação de íons fosfato em solução, baseada na técnica proposta por Chen Jr. *et al.* (1956). Neste método, ocorre a digestão do fosfolipídio a fosfato inorgânico e CO₂ por H₂SO₄ e H₂O₂. O ortofosfato forma então um complexo com o molibdato de amônio que, quando reduzido por ácido ascórbico, forma um complexo azul detectável espectrofotometricamente a 830 nm.

Para a realização do ensaio, amostras de padrões, com concentrações conhecidas de fosfato, orgânico (SPC) e inorgânico (monofosfato de sódio hidratado), foram preparadas na faixa de 0,5 a 2,0 mM. Em cada tubo de ensaio, além de duas esferas de vidro para melhorar a distribuição de calor, foram adicionados 500 µL de ácido sulfúrico (10 N). Em seguida, foram colocados 100 µL dos padrões, das amostras e do branco (tampão Hepes), todos em duplicata. Os tubos foram submetidos a aquecimento a 200°C por meia hora, em

um suporte metálico acoplado a uma placa aquecedora. Após a retirada dos tubos do aquecimento, esperou-se seu resfriamento para então serem adicionados 165 μL de peróxido de hidrogênio em todas as amostras. Os tubos foram aquecidos novamente nas mesmas condições. Após a segunda etapa de aquecimento, os tubos foram resfriados novamente, e em seguida adicionou-se 4,0 mL de água deionizada, além de 500 μL de solução de molibdato de amônio a 2,5% (m/v) e 500 μL de ácido ascórbico a 10% (m/v). As amostras foram agitadas e colocadas em banho-maria a 100°C por sete minutos. Após o resfriamento, foram realizadas medidas das absorvâncias das amostras a 830 nm.

Dispondo das absorvâncias referentes aos padrões, obteve-se uma curva de calibração que foi utilizada para o cálculo das concentrações molares de lipídios das amostras. Para levar em consideração a presença do colesterol, dividiu-se os valores de concentração obtidos por 0,6, fração molar correspondente à fosfatidilcolina nos lipossomas.

4.2.4.2. Determinação da Concentração de Composto Terapêutico e da Eficiência de Encapsulação

A determinação da concentração de isoniazida encapsulada nos lipossomas foi feita através de avaliação espectrofotométrica após o rompimento das vesículas com os solventes orgânicos metanol e etanol, ou com o detergente Triton X-100 reduzido, com a finalidade de escolher o método de quantificação mais eficiente a ser utilizado nos ensaios posteriores.

Visando avaliar a interferência dos lipídios nas medidas de absorvância do fármaco, foram obtidas curvas de calibração para o fármaco livre e para os lipossomas vazios.

Quando se empregou o metanol como solvente para o rompimento das vesículas, um volume de 2 mL de solvente foi adicionado a 0,5 mL de suspensão de lipossomas contendo o fármaco. As medidas de absorvância foram realizadas no comprimento de onda de 260 nm, 10 minutos após a adição do solvente.

Nos ensaios com etanol, foi utilizado um volume de 1350 μL do solvente para um volume de amostra de 150 μL . As absorvâncias das amostras foram medidas também a 260nm, imediatamente após a adição do solvente.

Para as análises com o detergente Triton X-100 reduzido, adicionou-se a 3 mL de amostra, um volume de 30 μ L de uma solução aquosa do detergente, preparada a 20% (m/m). Após a adição do detergente, a amostra foi agitada em agitador de vórtice por um minuto e foi realizada a medida da absorbância no mesmo comprimento de onda.

Para a quantificação da pirazinamida encapsulada nos lipossomas, utilizou-se metanol para o rompimento das vesículas, efetuando-se as medidas de absorbância das amostras a 260 nm, 10 minutos após a adição do solvente.

Devido à baixa absorção de luz apresentada pela estreptomicina nos espectros ultravioleta e visível, sua determinação foi feita após sua reação com ninidrina, baseada na metodologia descrita por Gangadharam *et al.* (1991). Primeiramente, um volume de 3,1 mL de metanol foi adicionado a 360 μ L de amostra contendo até 1,0 mM do fármaco, para o rompimento das vesículas lipídicas. Em seguida, adicionou-se 240 μ L de uma solução aquosa de ninidrina a 1,5% (m/v) preparada a fresco, além de 300 μ L de NaOH a 1N. A mistura foi aquecida em banho-maria a 50°C por 25 minutos. As amostras foram então resfriadas e suas absorbâncias medidas após 30 minutos, a 310 nm.

Dispondo dos dados de concentração de lipídios e de fármaco encapsulado em cada amostra, foi possível calcular as eficiências de encapsulação obtidas em todos os ensaios, através da relação entre a razão molar fármaco/lipídio inicial e final, conforme a seguinte equação:

$$E (\%) = 100 \times \frac{(\text{moles de fármaco} / \text{moles de lipídio})_{\text{final}}}{(\text{moles de fármaco} / \text{moles de lipídio})_{\text{inicial}}} \quad (4.1)$$

A concentração interna de fármaco por vesícula foi estimada através do diâmetro médio dos lipossomas e das concentrações finais de lipídio e fármaco na suspensão. A área da seção transversal de uma molécula de lecitina foi considerada como sendo 71 $\text{\AA}^2$, enquanto a de colesterol foi de 19 $\text{\AA}^2$ (Israelachvili e Mitchel, 1975). Assim, para 60% de lecitina e 40% de colesterol, tem-se uma área de 50,2 $\text{\AA}^2$. Considerando-se que 60% das moléculas de lipídio que constituem um lipossoma se localizam na parte externa da bicamada

(Powers et al., 1990), foi possível calcular o número de moléculas de lipídio por lipossoma, o número de vesículas por volume de amostra, o volume de solução capturada, o número de moléculas de fármaco encapsulado por vesícula e a concentração interna de composto encapsulado.

A eficiência de captura foi definida como a razão percentual entre a concentração interna de fármaco na vesícula e a concentração de fármaco inicialmente em solução.

4.2.4.3. Determinação dos Diâmetros Médios dos Lipossomas

O tamanho médio dos lipossomas foi obtido através da medida dos raios hidrodinâmicos por espectroscopia de espalhamento de luz por incidência de raios laser (*Quase-Elastic Light Scattering* - QLS), em equipamento da Malvern Instruments modelo Autosizer 4700.

Para a realização das medidas, as amostras de lipossomas foram diluídas com tampão Hepes para a obtenção de concentrações inferiores a 1 mM de lipídios.

4.2.4.4. Estabilidade de Estocagem dos Lipossomas

As vesículas contendo estreptomicina, incorporada pela técnica de encapsulação passiva durante a injeção de etanol, a uma razão molar F/L inicial de 166,3:5, foram avaliadas quanto a sua estabilidade de estocagem a 4°C, observando-se se as mesmas apresentavam agregação, fusão ou liberação indevida do composto encapsulado. Os lipossomas estocados na forma de suspensão aquosa foram monitorados através de medidas de diâmetro médio e de concentração de fármaco retido na vesícula após a realização de cromatografia de permeação em gel para a remoção do composto liberado em um período de até um mês.

Capítulo V

Resultados e Discussão

5.1. Estudo Comparativo dos Métodos de Quantificação de Isoniazida

Após a remoção do agente não encapsulado nas vesículas, é necessário fazer o rompimento destas antes da determinação espectrofotométrica direta da concentração de fármaco incorporado. Este rompimento é importante devido à interferência das vesículas nas medidas de absorbâncias dos compostos, resultante do espalhamento de luz pelos lipossomas. Além disto, a blindagem feita pelos lipossomas intactos pode dificultar a penetração da luz nas moléculas de fármaco encapsuladas no seu interior. Desta forma, com a dissolução dos lipossomas por solventes orgânicos ou detergentes, é possível a obtenção de sistemas mais homogêneos, onde a determinação da concentração do agente encapsulado pode ser feita de forma mais adequada.

Justo (1999), empregando etanol para a dissolução das vesículas, verificou que este solvente pode não apresentar solubilização adequada. Desta forma, no presente trabalho, o uso do etanol foi comparado ao do metanol e do detergente Triton X-100 reduzido.

Com a finalidade de definir o tempo mínimo necessário para a estabilização das medidas de absorbância a 260 nm, foi realizado um acompanhamento destas medidas com o tempo, durante meia hora, para amostras de lipossomas vazios de SPC:Col extrudados e para a isoniazida, após a adição de metanol às amostras. As curvas de calibração para os lipossomas vazios e para a isoniazida com metanol estão mostradas nas Figuras 5.1 e 5.2, respectivamente. Na primeira curva, observou-se boa linearidade até uma concentração de lipossomas de 0,3 mM, verificando-se uma discreta tendência à redução nos valores de absorbância com o tempo, sendo estas pouco significativas no intervalo de meia hora. Assim, decidiu-se efetuar as medidas 10 minutos após a adição deste solvente (melhor correlação obtida). A curva da Figura 5.2 mostra as medidas de absorbância para concentrações de isoniazida de 0 a 1,0 mM, realizadas 10 minutos após a adição do metanol.

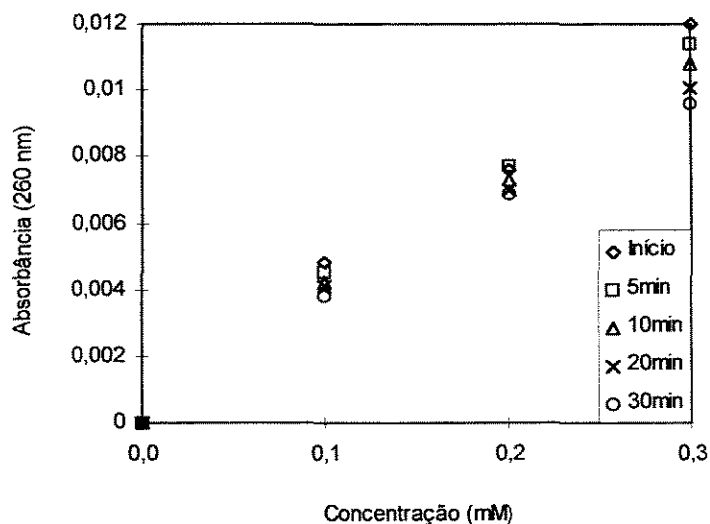


Figura 5.1: Curva de calibração para a determinação da concentração lipídica de lipossomas extrudados de SPC:Col (60:40 mol%) em presença de metanol.

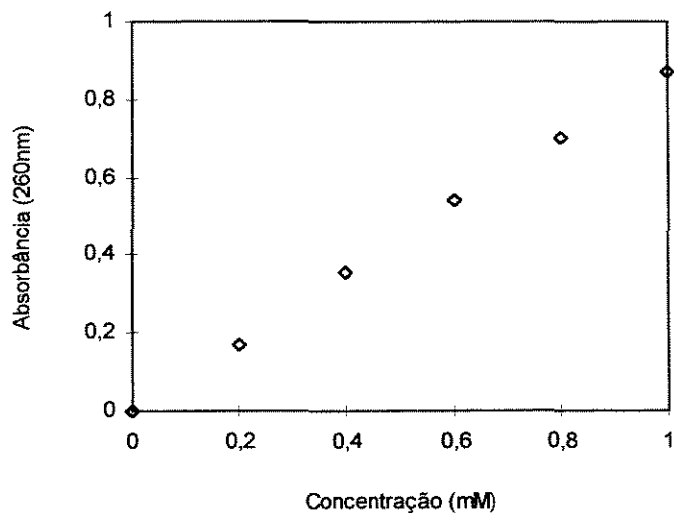


Figura 5.2: Curva de calibração para a determinação da concentração de isoniazida em presença de metanol.

Nos ensaios empregando-se etanol como solvente, realizou-se um estudo da variação das absorvâncias correspondentes às concentrações de isoniazida (0 a 1 mM) e de lipossomas vazios de SPC:Col (0 a 7,5 mM), no intervalo de uma hora. Observou-se que não houve variações significativas nas medidas de absorvâncias, decidindo-se assim efetuar

as medidas logo após a adição deste solvente. Apesar das curvas obtidas terem apresentado coeficientes de correlação linear da ordem de 0,99, tanto para os lipossomas vazios como para a isoniazida isolada, verifica-se que os valores de absorbância são muito baixos, indicando uma sensibilidade relativamente baixa desse método. Isto pode ser facilmente relacionado ao elevado volume de etanol que é adicionado no ensaio (diluição de 10 vezes), podendo gerar erros apreciáveis na detecção de baixas concentrações dos compostos.

Para o Triton X-100 reduzido, também estudou-se a variação das medidas de absorbâncias de amostras de lipossomas e de isoniazida num intervalo de meia hora, não se observando novamente mudanças significativas nas medidas. Para a quantificação com o Triton, a faixa de concentração de isoniazida que garantiu linearidade em relação às absorbâncias foi de 0 a 0,3 mM, menor que nos outros métodos (0 a 1 mM de isoniazida). Já para os lipossomas, esta faixa foi de 0 a 0,5 mM. Os resultados permitiram determinar que nos ensaios posteriores as medidas das absorbâncias fossem realizadas logo após a adição de detergente às suspensões de lipossomas.

Desta forma, os três métodos estudados poderiam ser empregados para a quantificação dos fármacos encapsulados em lipossomas. Os métodos com metanol e com Triton X-100 são mais indicados por não causarem uma grande diluição como o método com etanol. Contudo, como o Triton X-100 reduzido tem preço bastante elevado, este poderia ser efetivamente substituído pelo metanol no rompimento das vesículas.

5.2. Análise das Técnicas de Remoção de Fármaco não Encapsulado em Lipossomas Encapsulando Isoniazida por Incorporação Passiva

Com o intuito de avaliar a metodologia mais eficiente para a remoção de fármacos não incorporados às vesículas, foram testadas três técnicas distintas: a cromatografia de permeação em gel, a diálise e a ultrafiltração. Para isto, realizou-se a encapsulação passiva da isoniazida em lipossomas de SPC:Col (60:40 mol%) a uma razão molar inicial fármaco/lípido de 13,33, empregando-se uma solução de isoniazida com concentração de 100 mM em tampão Hepes. Nestas condições, a eficiência de encapsulação teórica máxima, para as vesículas com diâmetros médios de 270 nm, seria de 3,4%. Com isto, haveria um

grande excesso de fármaco não encapsulado a ser removido, podendo-se assim realizar um estudo mais abrangente, pois a escolha de uma técnica que possibilite a separação eficiente de uma elevada concentração de fármaco poderia eventualmente ser utilizada com sucesso nos ensaios de encapsulação ativa, onde a concentração inicial de fármaco utilizada é bastante inferior (4mM).

Os resultados de eficiências de encapsulação de isoniazida nos lipossomas, utilizando-se as três técnicas de remoção do fármaco livre e os três métodos de quantificação do mesmo testados anteriormente, estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Comparação das eficiências de encapsulação relativas à incorporação passiva de isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col, obtidas empregando-se diferentes técnicas de remoção do fármaco não incorporado e distintos métodos de quantificação da isoniazida.

Método de Remoção	Eficiência de Encapsulação (%)		
	Método de Quantificação		
	Metanol	Etanol	Triton
Cromatografia	0,61	0,00	5,39
Diálise	0,63	0,00	0,71
Ultrafiltração	0,76	0,10	1,35

Como pode-se observar na tabela, o método de quantificação com etanol mostrou-se pouco sensível na detecção das concentrações de fármaco. Conforme mencionado anteriormente, este método requer um volume grande de solvente, causando diluição nas amostras e dificultando a detecção de baixas concentrações de fármaco.

Apesar de terem sido obtidos bons resultados com o uso do Triton X-100 para o rompimento de lipossomas vazios, o detergente não se mostrou eficiente no rompimento das vesículas encapsulando o fármaco, resultando em amostras turvas após sua adição. É importante considerar que a presença do fármaco no interior da vesícula pode alterar a forma como o detergente age no rompimento do lipossoma, podendo não ser tão eficiente como no rompimento da vesícula vazia. Desta forma, o sistema gerado pode não ser

homogêneo, devido à presença de micelas mistas ou ainda de pequenas vesículas que possivelmente estariam ainda causando espalhamento de luz, interferindo na detecção espectrofotométrica do composto terapêutico.

Embora estes métodos de quantificação sejam frequentemente utilizados, o emprego tanto do etanol quanto do Triton X-100 para a dissolução das vesículas lipídicas contendo isoniazida não foi adequado para o sistema em questão. Sendo o método de quantificação com o metanol o mais eficiente nesta avaliação, este foi adotado para os estudos subsequentes.

A Tabela 5.2 apresenta detalhadamente os resultados obtidos com o uso do metanol. Pode-se observar que as três técnicas de separação da isoniazida apresentaram resultados consistentes entre si. Assim, para a escolha daquela a ser utilizada nos ensaios posteriores, levou-se em conta fatores como a viabilidade econômica e o tempo da realização do ensaio.

Tabela 5.2: Razão molar final fármaco/lipídio (F/L), concentrações finais de lipídios e de isoniazida encapsulada em lipossomas extrudados de SPC:Col. Os resultados são relativos à quantificação de isoniazida com metanol, após a separação do fármaco livre através de três técnicas distintas. Os lipídios foram determinados pela detecção de fosfato.

Método de Remoção	Concentração Final de Isoniazida (mM)	Concentração Final de Lipídios (mM)	Razão Molar Final F/L
Cromatografia	0,097	1,21	0,080
Diálise	0,561	6,64	0,084
Ultrafiltração	0,331	3,24	0,102

Dentre os três métodos investigados, a diálise é o mais simples e o mais lento. Contudo, já foi relatado na literatura (Dipali et al., 1996) que a cada troca de tampão realizada, a amostra é submetida a um elevado gradiente de concentração, o que poderia causar a saída dos compostos encapsulados nos lipossomas, acarretando a obtenção de menores eficiências de encapsulação. Isto não foi constatado no presente trabalho.

O mesmo se observa, embora em menor proporção, para amostras submetidas à ultrafiltração. Outro fator a ser considerado é que esta técnica requer um longo tempo de processamento da amostra, pois são necessárias pelo menos 4 etapas para uma remoção eficiente, sendo a duração de cada etapa de cerca de 70 minutos. Além disto, a membrana utilizada adiciona um custo relativamente elevado ao processo e, experimentalmente, verifica-se que neste sistema há uma tendência de entupimento dos poros da membrana quando concentrações lipídicas elevadas são empregadas, o que pode, em certa extensão, comprometer a remoção total do fármaco não encapsulado. Este fato pode ser a causa do valor mais elevado observado para a razão F/L final quando do uso da ultrafiltração.

Como pode ser verificado na Tabela 5.2, a cromatografia de permeação em gel apresenta a desvantagem de diluir as amostras. Quando se emprega esta técnica para a separação de compostos destinados a aplicações terapêuticas, pode haver a necessidade de se realizar a concentração da suspensão final. Contudo, é uma técnica rápida e bastante eficiente para a separação do composto terapêutico utilizado neste estudo, devido à grande diferença de tamanho deste em relação aos lipossomas.

Ressalta-se que qualquer uma das três técnicas poderia ser utilizada nos estudos subseqüentes, conseguindo-se bons resultados. A técnica adotada foi a cromatografia de permeação em gel, devido à necessidade de se utilizar uma técnica rápida para a execução de um grande número de experimentos. Este fator inviabilizaria o uso da ultrafiltração. Além disso, considerando-se o custo relativamente elevado do tampão utilizado, a cromatografia tem a vantagem de requerer uma quantidade menor de tampão (150 mL para 3 mL de amostra) que a diálise (480 mL para 3 mL de amostra).

5.3. Preparação e Caracterização de Lipossomas por Hidratação do Filme Lipídico Seco seguida de Extrusão

Os lipossomas vazios extrudados, preparados por hidratação do filme lipídico seco com solução tampão citrato, apresentaram diâmetro médio de 275 nm, apesar das membranas de polycarbonato empregadas na extrusão possuírem diâmetro nominal de poro de 400 nm. A distribuição típica de tamanhos das vesículas obtidas por esse método está mostrada na Figura 5.3, indicando uma distribuição bimodal.

A variação de tamanho verificada nos lipossomas preparados por este método é geralmente observada devido, provavelmente, a deformações das vesículas durante o processo de extrusão a pressões e temperaturas relativamente elevadas, conforme também verificado por outros autores (Lima, 2001; Costa, 2000; Justo, 1999; Perugini e Pavanetto, 1998).

Os diâmetros das vesículas não apresentaram mudanças significativas após a incorporação dos compostos terapêuticos, estando dentro da faixa recomendável para a administração por inalação (Lasic, 1993). Os valores dos diâmetros correspondentes aos lipossomas encapsulando os fármacos serão apresentados nos itens correspondentes a cada fármaco.

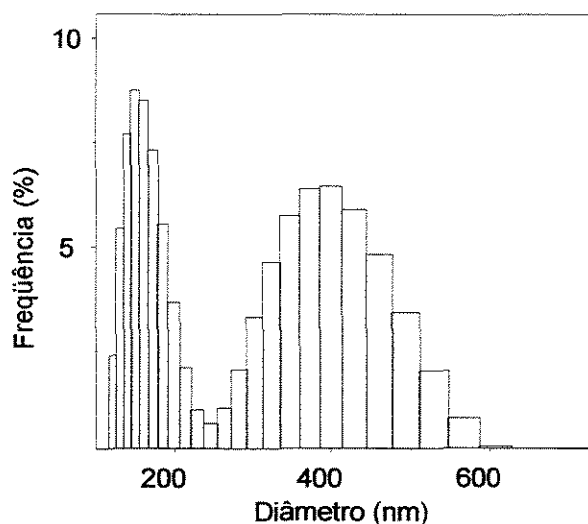


Figura 5.3: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas vazios extrudados, obtidos por hidratação do filme lipídico seco com ácido cítrico, e diluídos com tampão Hepes. O diâmetro médio é de 275 nm.

5.3.1. Encapsulação Ativa de Isoniazida em Lipossomas Extrudados

Os resultados do planejamento experimental completo, 2^3 com duplicatas no ponto central, realizado para avaliar os fatores mais importantes na eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas extrudados, estão apresentados na Tabela 5.3. As variáveis razão

molar inicial fármaco/lipídio $(F/L)_{\text{inicial}}$, temperatura e tempo de incubação do fármaco foram estudadas em dois níveis, e os valores de cada nível também estão mostrados nesta tabela.

Pode-se observar pela Tabela 5.3 que as eficiências de encapsulação para a isoniazida variaram de 1,1% a 22,5%, sendo os melhores resultados obtidos nos ensaios 3 e 7, quando se tinha uma razão $(F/L)_{\text{inicial}}$ de 0,2, uma temperatura de incubação de 60°C, e tempos de incubação de 10 e 60 minutos, respectivamente.

Tabela 5.3: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Ensaio	$(F/L)_{\text{inicial}}^*$	Temperatura (°C)	Tempo (min)	$(F/L)_{\text{final}}^{**}$	Eficiência (%)	Diâmetro (nm)
1	0,2	25	10	0,009	4,6	265
2	2,0	25	10	0,022	1,1	272
3	0,2	60	10	0,036	18,1	258
4	2,0	60	10	0,025	1,2	258
5	0,2	25	60	0,009	4,5	268
6	2,0	25	60	0,022	1,1	270
7	0,2	60	60	0,045	22,5	255
8	2,0	60	60	0,045	2,3	254
9	1,1	42,5	35	0,029	2,6	269
10	1,1	42,5	35	0,048	4,4	270

* Razão molar inicial fármaco/lipídio

** Razão molar final fármaco/lipídio

Esses resultados diferem daqueles obtidos por Justo (1999), onde uma eficiência de encapsulação de 100% foi obtida para a isoniazida quando se utilizou uma razão $(F/L)_{\text{inicial}}$ de 0,2, uma temperatura de 60°C e um tempo de incubação de 10 minutos. Entretanto, naquele trabalho foi empregada uma composição lipídica diferente (DSPC:Col). A distearoilfosfatidilcolina (DSPC) é um lipídio sintético, enquanto a lecitina de soja (SPC) é um lipídio natural hidrogenado contendo 95,5% de fosfatidilcolinas, fundamentalmente

distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Essa diferença na composição dos lipídios pode ter gerado um modo de empacotamento diferente na bicamada das vesículas, afetando a permeabilidade da membrana ao fármaco.

Na Tabela 5.3 também são apresentados os valores das razões molares finais (F/L) equivalentes a cada ensaio. Como pode ser visto, esses valores são muito baixos, correspondendo a concentrações de fármaco muito pequenas (até 0,03 mM). Comparando-se os ensaios 8 e 7, nota-se que, embora não se tenha um valor de eficiência significativo no primeiro (2,3%), sua razão molar final F/L (0,045) é idêntica àquela obtida para o segundo (com 22,5% de eficiência). Desta forma, não se pode afirmar que não há fármaco associado às vesículas do ensaio 8, mas sim que a eficiência do processo foi baixa considerando-se a alta concentração inicial de fármaco empregado (4,0 mM). O desejável, do ponto de vista farmacológico, é a obtenção de uma alta concentração de fármaco incorporado nos lipossomas, disponível para ser administrado. Contudo, do ponto de vista do processo de preparação das vesículas, é interessante se ter essa característica associada a uma alta eficiência, uma vez que os compostos terapêuticos de alto custo nem sempre podem ser reaproveitados após o processo. Foi com base neste enfoque que as análises estatísticas foram realizadas.

O tratamento dos dados experimentais foi realizado com o auxílio do programa computacional Statistica versão 5.0 da Microsoft.

Os efeitos dos fatores sobre a eficiência de encapsulação do fármaco são ilustrados na Tabela 5.4. De acordo com esses resultados, verifica-se que nenhum fator estudado é estatisticamente significativo a um nível de 95% de confiança. Contudo, considera-se que 95% de confiança é um limite relativamente elevado para o sistema em questão, onde um número muito grande de etapas é realizado até a obtenção do resultado final. Além disso, analisando-se os valores de p da Tabela 5.4 (0,053 para a variável $(F/L)_{\text{inicial}}$ e 0,0712 para a temperatura), achou-se razoável baixar o limite de confiança para o nível de 90%. Os resultados calculados considerando-se 90% de confiança estão apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.4: Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação da isoniazida nos lipossomas extrudados.

	Efeito	Desvio Padrão	t (1)	p	Lim.Conf -95%	Lim.Conf +95%
Média	6,238	0,411	15,162	0,0419	1,010	11,166
(1) (F/L) _{inicial}	-11,020	0,920	-11,978	0,0530	-22,709	0,6697
(2) Temperatura	8,195	0,920	8,908	0,0712	-3,495	19,885
(3) Tempo	1,330	0,920	1,446	0,3853	-10,359	13,019
(1) x (2)	-7,525	0,920	-8,179	0,0774	-19,215	4,165
(1) x (3)	-0,810	0,920	-0,880	0,5404	-12,499	10,879
(2) x (3)	1,395	0,920	1,516	0,3712	-10,295	13,085
(1) x (2) x (3)	-0,875	0,920	-0,951	0,5159	-12,565	10,815

Tabela 5.5: Valores de efeito, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial, para a eficiência de encapsulação da isoniazida nos lipossomas extrudados.

	Efeito	Desvio Padrão	t (1)	p	Lim.Conf -90%	Lim.Conf +90%
Média	6,238	0,411	15,162	0,0419	3,640	8,836
(1) (F/L) _{inicial} *	-11,020	0,920	-11,978	0,0530	-8,414	-2,606
(2) Temperatura *	8,195	0,920	8,908	0,0712	1,193	7,002
(3) Tempo	1,330	0,920	1,446	0,3853	-2,239	3,569
(1) x (2) *	-7,525	0,920	-8,179	0,0774	-6,667	-0,8582
(1) x (3)	-0,810	0,920	-0,880	0,5404	-3,309	2,499
(2) x (3)	1,395	0,920	1,516	0,3712	-2,207	3,602
(1) x (2) x (3)	-0,875	0,920	-0,951	0,5159	-3,342	2,467

* fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Observa-se pela Tabela 5.5 que os fatores significativos a 90% de confiança foram a razão molar inicial F/L, a temperatura e o termo de interação entre a $(F/L)_{\text{inicial}}$ e a temperatura.

Ignorando-se os efeitos não significativos, chegou-se à Equação 5.1 que descreve a resposta eficiência de encapsulação em função das variáveis analisadas.

$$\begin{aligned} \text{Eficiência} = & 6,238 - 5,510 \times (F/L)_{\text{inicial}} + 4,097 \times \text{Temperatura} \\ & - 3,763 \times [(F/L)_{\text{inicial}} \times \text{Temperatura}] \end{aligned} \quad (5.1)$$

A Tabela 5.6 apresenta a análise da variância (ANOVA) para a eficiência de encapsulação da isoniazida. Segundo a análise, o coeficiente de correlação foi de 94% e o F calculado 9,7 vezes maior que o F tabelado ao nível de 90% de confiança.

Tabela 5.6: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	490,448	3	163,483	31,8
Resíduo	30,845	6	5,141	
Falta de Ajuste	29,152	5		
Erro Puro	1,693	1		
Total	521,293	9		

Coeficiente de correlação $R^2=0,94$

$F_{0,90;3;6}=3,29$

De acordo com Barros Neto (1995), se o valor de $F_{\text{calculado}}$ for maior que o de F_{tabelado} , já há uma evidência estatística para a proposição de um modelo. Porém, um modelo significativo do ponto de vista do teste F pode não ser útil para realizar previsões, por cobrir uma faixa de variação pequena dos fatores estudados. Box e Wetz (1973) sugerem que para

que um modelo seja não apenas estatisticamente significativo, mas também útil para fins preditivos, o $F_{\text{calculado}}$ deve ser no mínimo de quatro a cinco vezes o valor de F_{tabelado} .

Neste planejamento foram observados bons valores para o teste F e para o coeficiente de correlação. Calculando-se os desvios dos valores preditos pelo modelo em relação aos valores observados experimentalmente, constatou-se a existência de valores de desvios elevados para uma parte dos dados. Contudo, nota-se que isto ocorreu sempre para os valores de eficiência muito baixos, onde uma diferença considerada grande do ponto de vista estatístico não é significativa no tocante à eficiência de encapsulação. Os valores desses desvios estão apresentados na Tabela A.1 do Anexo I.

Com o intuito de avaliar melhor o comportamento do sistema nas condições estudadas, os efeitos das variáveis estão representados na Figura 5.4. Com base na Equação 5.1, construiu-se a superfície de resposta apresentada na Figura 5.5.

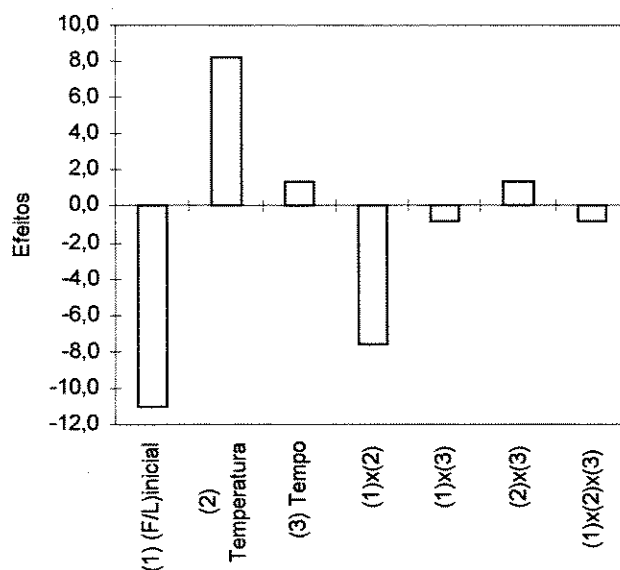


Figura 5.4: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Pelas Figuras 5.4 e 5.5, pode ser observado que a razão molar inicial F/L foi a variável independente que mais afetou a eficiência de encapsulação, sendo que um decréscimo no valor dessa variável gerou uma maior incorporação da isoniazida. Já o efeito da temperatura foi o inverso, pois um incremento no valor dessa variável conduziu a um aumento considerável na eficiência.

Analisando-se a Figura 5.5, observa-se que na faixa operacional estudada, maior eficiência de encapsulação é obtida a alta temperatura de incubação e baixa razão molar inicial fármaco/lipídio. Este comportamento foi verificado independentemente do tempo de incubação das suspensões de lipossomas com o fármaco.

Com o intuito de otimizar o sistema, obtendo-se eficiências de encapsulação maiores, poderia ser cogitada a hipótese de expansão do planejamento, estudando-se as variáveis significativas em outras faixas. Contudo, no planejamento aqui empregado, já se havia selecionado condições próximas ao limite operacional. Para o sistema estudado, não é viável a utilização de razões molares iniciais menores, devido à dificuldade de detecção do fármaco a baixas concentrações, nem temperaturas maiores, que poderiam causar a degradação do mesmo.

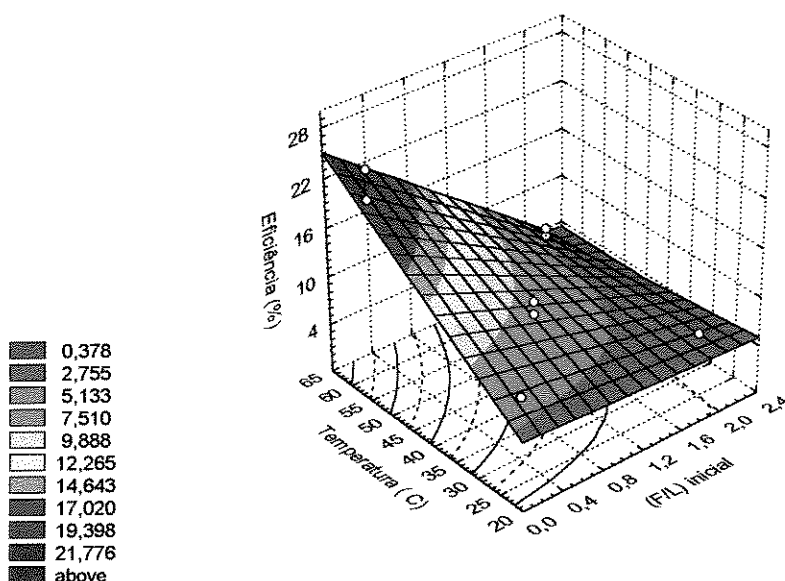


Figura 5.5: Superfície de resposta para a eficiência de encapsulação da isoniazida em função da razão molar inicial fármaco/lipídio e da temperatura de incubação.

Segundo Madden et al. (1990), a técnica de incorporação ativa possibilita índices elevados de encapsulação, podendo chegar a 100%, mas isso varia consideravelmente com as características do composto terapêutico. Propriedades como solubilidade, coeficientes de partição e pKa têm uma grande importância na incorporação dos compostos. Os pesquisadores também discutiram que a incubação do fármaco juntamente com os lipossomas pode levar a uma diminuição no gradiente de pH, dificultando a encapsulação, ou acarretando a liberação do fármaco encapsulado em um curto intervalo após sua incorporação.

Na literatura, há uma discrepância em relação aos valores das constantes de ionização da isoniazida devido, em parte, aos diferentes métodos de determinação empregados (Brewer, 1977). Entretanto, observa-se uma aparente convergência para valores de pKa na faixa de 2,0; 3,6 e 10,8. Com base nessas referências, analisando-se a estrutura do fármaco, supõe-se que no pH empregado nos ensaios (7,4), provavelmente apenas uma fração muito pequena das moléculas de isoniazida estaria neutra, entrando na vesícula e se protonando. Outra possibilidade é que devido a defeitos no empacotamento da membrana lipídica, a molécula de fármaco poderia estar entrando no lipossoma na forma protonada.

Outro fator a ser considerado é o coeficiente de partição do fármaco em sistemas hidrofóbico/hidrofílico. Compostos que apresentam baixos valores de partição do fármaco podem ter dificuldade em atravessar a bicamada lipídica durante a incubação com os lipossomas pré-formados. Um estudo realizado por Justo (1999) indicou um baixo valor de partição para a isoniazida em sistemas contendo soluções aquosas e 1-octanol ou n-dodecano, mas só esse fator isoladamente não pode explicar uma baixa eficiência de encapsulação.

Desta forma, conclui-se que para a encapsulação ativa da isoniazida em lipossomas de SPC:Col, preparados pela hidratação do filme lipídico seco seguida de extrusão, dentro da faixa operacional avaliada as melhores condições a serem utilizadas são uma $(F/L)_{\text{inicial}}$ de 0,2 a uma temperatura de 60°C. Destaca-se que a temperatura de 60°C está acima da temperatura de transição de fases gel/líquido cristalino da lecitina de soja empregada

(50,4°C), conferindo, possivelmente, maior fluidez à bicamada lipídica. Como o tempo de incubação não foi muito significativo, sugere-se um tempo de 10 minutos de incubação.

Para todas as amostras foram realizadas medidas dos diâmetros médios das vesículas, apresentadas na Tabela 5.3. Pode-se observar que não houve variação significativa entre as medidas, provavelmente devido à baixa incorporação do fármaco. Observou-se também que a presença do fármaco não induziu agregação ou fusão das vesículas. A Figura 5.6 mostra uma distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas extrudados encapsulando isoniazida por incorporação ativa.

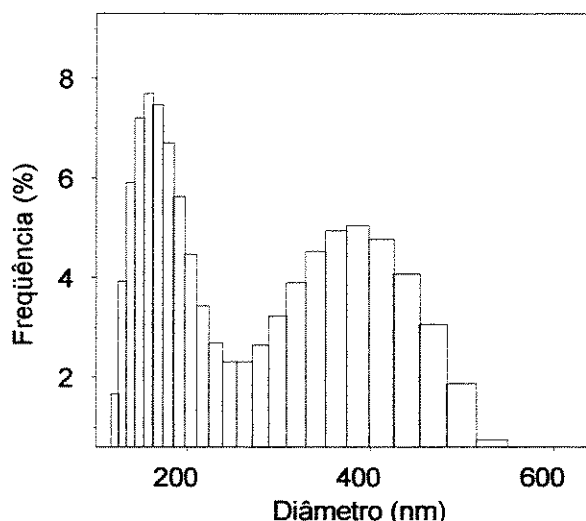


Figura 5.6: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas extrudados, encapsulando isoniazida por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 255 nm, referente ao ensaio 7.

5.3.2. Encapsulação Ativa de Pirazinamida em Lipossomas Extrudados

O planejamento experimental realizado para avaliar os fatores mais importantes na eficiência de encapsulação da pirazinamida em lipossomas extrudados foi idêntico ao realizado para a isoniazida. Os resultados obtidos, juntamente com as condições experimentais empregadas, estão apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação da pirazinamida em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Ensaio	(F/L) _{inicial} [*]	Temperatura (°C)	Tempo (min)	(F/L) _{final} ^{**}	Eficiência (%)	Diâmetro (nm)
1	0,2	25	10	0,000	0,0	270
2	2,0	25	10	0,000	0,0	269
3	0,2	60	10	0,032	15,8	257
4	2,0	60	10	0,016	0,8	261
5	0,2	25	60	0,011	5,5	273
6	2,0	25	60	0,000	0,0	270
7	0,2	60	60	0,031	15,7	259
8	2,0	60	60	0,024	1,2	258
9	1,1	42,5	35	0,000	0,0	270
10	1,1	42,5	35	0,014	1,3	270

* razão molar inicial fármaco/lipídio

** razão molar final fármaco/lipídio

Para a pirazinamida, as eficiências de encapsulação variaram de 0 a 15,8%, sendo os melhores resultados obtidos nos ensaios 3 e 7, quando se tinha uma razão (F/L)_{inicial} de 0,2, uma temperatura de incubação de 60°C, e tempos de incubação de 10 e 60 minutos, respectivamente.

Com o auxílio do programa Statistica foram obtidos os efeitos dos fatores sobre a eficiência de encapsulação da pirazinamida. Observou-se que a um nível de 95% de confiança apenas a razão molar inicial F/L é estatisticamente significativa. Todavia, conforme visto na Tabela 5.8, os valores de p para a variável temperatura e para o termo de interação (F/L)_{inicial} e temperatura estão muito próximos de 0,05. Desta maneira, como no estudo anterior, reduziu-se o limite de confiança para 90%, e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8: Valores de efeito, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial, para a eficiência de encapsulação da pirazinamida nos lipossomas extrudados.

	Efeito	Desvio Padrão	t (1)	p	Lim.Conf -90%	Lim.Conf +90%
Média	4,024	0,297	13,531	0,0469	2,146	5,902
(1) (F/L) _{inicial} *	-8,763	0,665	-13,177	0,0482	-6,481	-2,282
(2) Temperatura*	6,982	0,665	10,500	0,0604	1,392	5,591
(3) Tempo	1,463	0,665	2,199	0,2716	-1,368	2,831
(1) x (2)*	-6,017	0,665	-9,049	0,0701	-5,108	-0,909
(1) x (3)	-1,277	0,665	-1,921	0,3055	-2,738	1,461
(2) x (3)	-1,283	0,665	1,929	0,3045	-2,741	1,458
(1) x (2) x (3)	1,467	0,665	2,207	0,2708	-1,365	2,833

* fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Segundo a Tabela 5.8 e a Figura 5.7, pode-se verificar que, conforme observado para a isoniazida, os fatores significativos são a razão molar inicial F/L, a temperatura e o termo de interação entre a (F/L)_{inicial} e a temperatura. Observa-se que um incremento na razão F/L de 0,2 para 2,0 gerou uma queda na eficiência de encapsulação. No caso da temperatura, constatou-se um efeito inverso, seu acréscimo gerou um aumento na eficiência de incorporação do fármaco. Novamente, o tempo praticamente não afetou a variável resposta estudada.

A partir destes resultados, chegou-se à Equação 5.2 que descreve a resposta eficiência de encapsulação da pirazinamida como função das variáveis analisadas.

$$\begin{aligned} \text{Eficiência} = & 4,024 - 4,381 \times (\text{F/L})_{\text{inicial}} + 3,491 \times \text{Temperatura} \\ & - 3,009 \times [(\text{F/L})_{\text{inicial}} \times \text{Temperatura}] \end{aligned} \quad (5.2)$$

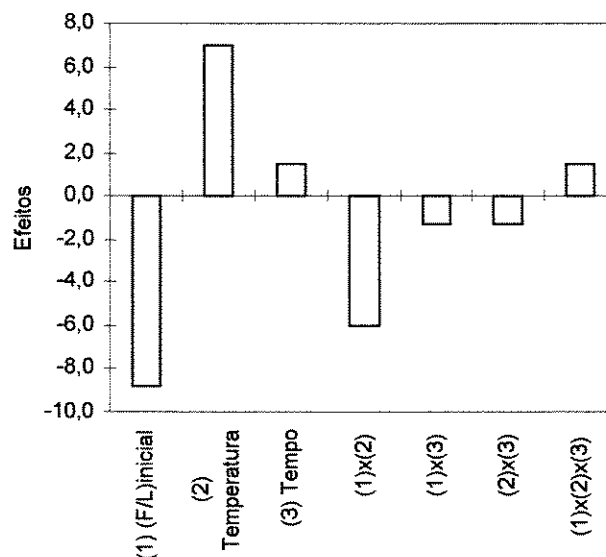


Figura 5.7: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da pirazinamida em lipossomas extrudados de SPC:Col.

A Tabela 5.9 apresenta a análise da variância (ANOVA) para a eficiência de encapsulação da pirazinamida. O coeficiente de correlação foi de 88% e, segundo o teste F, o valor calculado foi 4,4 vezes maior que o valor tabelado a 90% de confiança.

Tabela 5.9: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da pirazinamida em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	323,493	3	107,831	14,63
Resíduo	44,231	6	7,372	
Falta de Ajuste	43,346	5		
Erro Puro	0,885	1		
Total	367,724	9		

Coeficiente de correlação $R^2=0,88$

$F_{0,90;3;6}=3,29$

A Figura 5.8 ilustra a superfície de resposta para a eficiência de encapsulação da pirazinamida, construída a partir da Equação 5.2. Nota-se através da figura que as melhores eficiências de encapsulação são obtidas a altas temperaturas e baixas razões molares iniciais F/L. Destaca-se que, como no caso da isoniazida, uma otimização do sistema não foi realizada devido às mesmas limitações operacionais discutidas anteriormente.

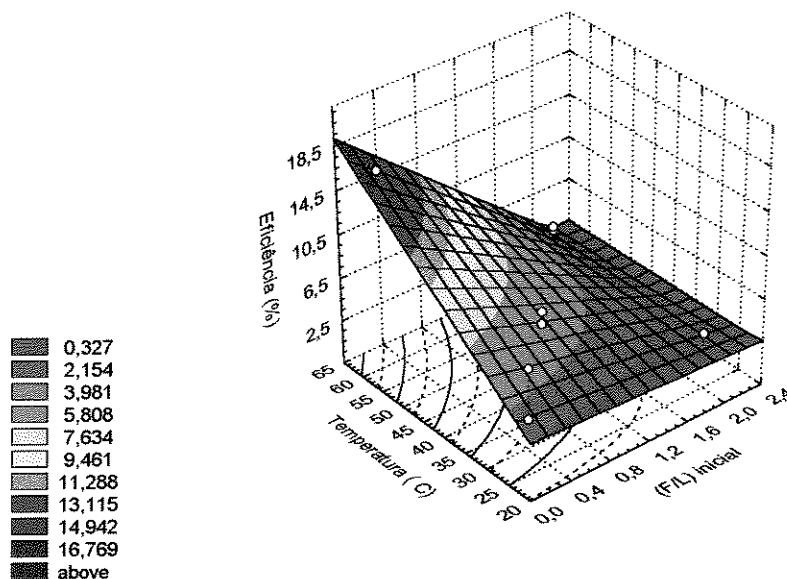


Figura 5.8: Superfície de resposta para a eficiência de encapsulação da pirazinamida em função da razão molar inicial fármaco/lipídio e da temperatura de incubação.

A pirazinamida apresentou um comportamento semelhante ao da isoniazida, com valores de eficiência relevantes apenas para temperatura elevada e baixa razão molar inicial F/L, independentemente do tempo de incubação. Isto já era esperado, uma vez que os fármacos apresentam estruturas químicas similares. O coeficiente de partição deste fármaco em sistema octanol/Hepes é praticamente idêntico ao observado para a isoniazida, e o mesmo se aplica para o sistema octanol/citrato (Justo, 1999), verificando-se acúmulo preferencial do fármaco na fase aquosa.

Quanto ao pKa, este composto apresenta, segundo a literatura (Merck Index, 1996), um valor correspondente a 0,5. O que poderia estar ocorrendo é que no pH de 7,4 uma fração muito grande de moléculas estaria neutra, podendo permear a bicamada, porém,

poucas moléculas estariam sofrendo ionização no interior da vesícula (pH 4,0), e a maioria estaria retornando à fase externa. Contudo, apenas suposições podem ser feitas a respeito dos estados de ionização das moléculas deste fármaco, pois a análise de sua estrutura não é óbvia, não se podendo afirmar se as mesmas encontram-se neutras ou ionizadas nas condições de pH empregadas.

As medidas de diâmetros médios das vesículas encapsulando pirazinamida podem ser vistas na Tabela 5.7, não sendo, também neste estudo, observadas variações significativas entre as medidas. A Figura 5.9 mostra uma distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas extrudados encapsulando pirazinamida por incorporação ativa.

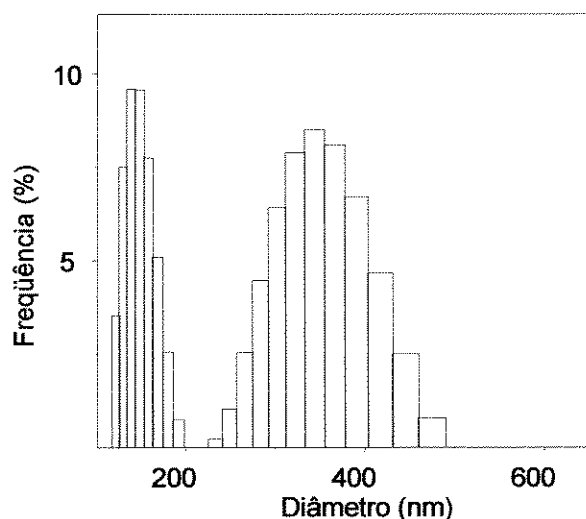


Figura 5.9: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas extrudados, encapsulando pirazinamida por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 257 nm, referente ao ensaio 3.

5.3.3. Encapsulação Ativa de Estreptomicina em Lipossomas Extrudados

Para a análise dos fatores que exercem maior influência sobre a eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas extrudados, foi realizado um planejamento experimental semelhante aos citados anteriormente, variando-se apenas os valores utilizados para a razão molar inicial F/L. Os resultados de eficiência de encapsulação, diâmetro médio

das vesículas e as condições experimentais empregadas nos ensaios estão apresentados na Tabela 5.10.

Pode-se observar através da análise da Tabela 5.10 que as eficiências de encapsulação variaram de 0 a 21,0% nas condições estudadas. O melhor resultado foi obtido no ensaio 3, onde foram utilizados a menor razão $(F/L)_{\text{inicial}}$ (0,18), a temperatura mais elevada (60°C) e o menor tempo de incubação (10 minutos).

Tabela 5.10: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Ensaio	$(F/L)_{\text{inicial}}^*$	Temperatura (°C)	Tempo (min)	$(F/L)_{\text{final}}^*$	Eficiência (%)	Diâmetro (nm)
1	0,18	25	10	0,000	0,0	294
2	1,76	25	10	0,000	0,0	287
3	0,18	60	10	0,038	21,0	274
4	1,76	60	10	0,033	1,9	278
5	0,18	25	60	0,019	10,9	283
6	1,76	25	60	0,000	0,0	285
7	0,18	60	60	0,018	9,8	279
8	1,76	60	60	0,019	1,1	279
9	0,97	42,5	35	0,023	2,4	283
10	0,97	42,5	35	0,010	1,0	285

* razão molar inicial fármaco/lipídio

** razão molar final fármaco/lipídio

Após a análise dos dados experimentais com o auxílio do programa Statistica, observou-se que apenas a variável razão molar $(F/L)_{\text{inicial}}$ foi estatisticamente significativa a 95% de confiança, conforme já tinha sido observado para a encapsulação da pirazinamida. Da mesma forma que anteriormente, realizou-se para este fármaco a análise dos dados considerando-se o limite de confiança de 90%.

A Tabela 5.11 mostra os efeitos das variáveis independentes estudadas sobre a eficiência de encapsulação da estreptomicina. Para uma melhor visualização dos resultados, a Figura 5.10 ilustra os efeitos de cada fator.

Tabela 5.11: Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação da estreptomicina nos lipossomas extrudados.

	Efeito	Desvio Padrão	t (1)	p	Lim.Conf -90%	Lim.Conf +90%
Média	4,813	0,311	15,485	0,0411	2,851	6,775
(1) (F/L) _{inicial} *	-9,665	0,695	-13,906	0,0457	-14,053	-5,277
(2) Temperatura *	5,725	0,695	8,237	0,0769	1,337	10,113
(3) Tempo	-0,295	0,695	-0,424	0,7444	-4,683	4,093
(1) x (2) **	-4,200	0,695	-6,043	0,1044	-8,588	0,188
(1) x (3)	-0,130	0,695	-0,187	0,8823	-4,518	4,258
(2) x (3) *	-5,760	0,695	-8,288	0,0764	-10,148	-1,372
(1) x (2) x (3) *	5,335	0,695	7,676	0,0825	0,947	9,723

* fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

** fator estatisticamente significativo a 89% de confiança.

Pode ser verificado que a razão molar inicial F/L foi a variável que mais afetou a eficiência de encapsulação. Um incremento de 0,18 para 1,76 provocou em média uma queda de 9,7% na variável resposta. A variável temperatura, o termo de interação temperatura e tempo, e o termo de interação entre os três fatores apresentaram praticamente os mesmos valores de efeitos, em termos absolutos. Diferentemente da (F/L)_{inicial}, a elevação da eficiência foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura. O termo de interação (F/L)_{inicial} e temperatura foi considerado significativo a um nível de 89% de confiança.

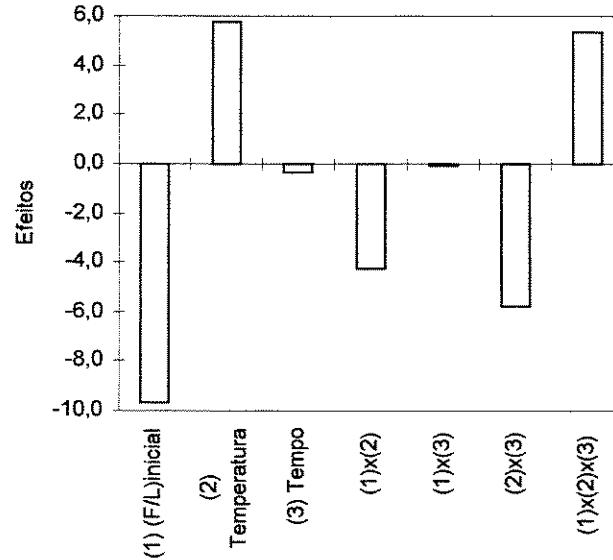


Figura 5.10: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Ignorando-se os fatores não significativos, chegou-se à seguinte equação:

$$\begin{aligned} \text{Eficiência} = & 4,813 - 4,832 \times (F/L)_{\text{inicial}} + 2,862 \times \text{Temperatura} - 2,100 \times [(F/L)_{\text{inicial}} \times \text{Temperatura}] \\ & - 2,880 \times [\text{Temperatura} \times \text{Tempo}] + 2,667 \times [(F/L)_{\text{inicial}} \times \text{Temperatura} \times \text{Tempo}] \end{aligned} \quad (5.3)$$

Foi realizada a análise da variância (ANOVA) para a validação do modelo proposto pela análise estatística e os resultados são mostrados na Tabela 5.12. O coeficiente de correlação verificado foi de 94% e, pelo teste F realizado, a razão entre o $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} foi de 3,2. Apesar do valor do teste F ser menor que 4,0, calculando-se os desvios dos valores preditos pelo modelo em relação aos observados experimentalmente, observou-se uma boa correspondência para os dados de maior eficiência de encapsulação (Tabela A.3 do Anexo I). Conforme já mencionado, para as eficiências muito baixas verificou-se desvios bem maiores, indicando que para esses valores o modelo não seria preditivo.

Tabela 5.12: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	410,935	5	82,187	12,82
Resíduo	25,635	4	6,409	
Falta de Ajuste	24,669	3		
Erro Puro	0,966	1		
Total	436,570	9		

Coefficiente de correlação $R^2=0,94$

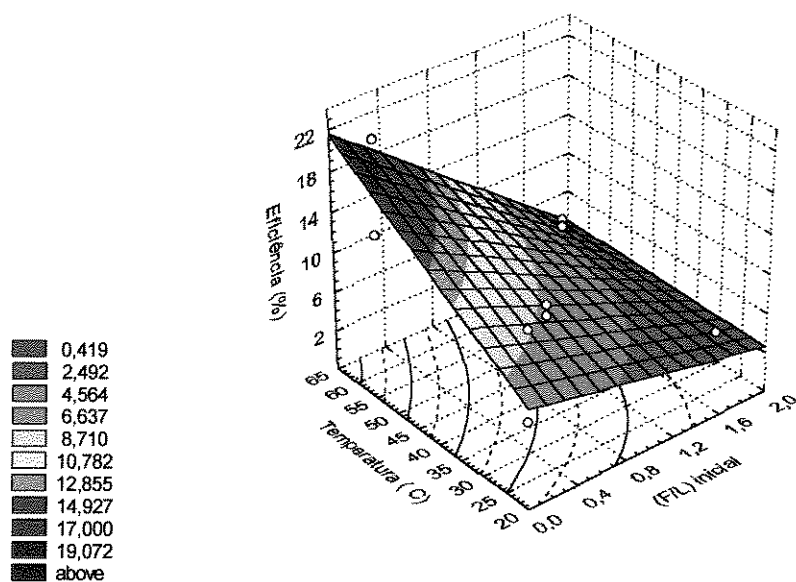
$F_{0,90;5;4}=4,05$

A partir da Equação 5.3, construiu-se a curva ilustrada na Figura 5.11a, que dá indícios do comportamento da encapsulação da estreptomicina com as variações da razão molar inicial F/L e da temperatura de incubação. A Figura 5.11b mostra a superfície de resposta para a eficiência de encapsulação do fármaco em função do tempo e da temperatura de incubação, fixando a razão molar inicial F/L no menor valor estudado (0,18).

Verifica-se pela Figura 5.11a que altos valores de $(F/L)_{\text{inicial}}$ não são interessantes, não se tendo quase nenhuma incorporação do composto terapêutico na $(F/L)_{\text{inicial}}$ mais elevada, por toda a faixa de temperatura estudada.

De acordo com a Tabela 5.10, verifica-se que a maior eficiência (21,0%) foi obtida na menor razão molar F/L, no menor tempo de incubação, e na maior temperatura (ensaio 3). Entretanto, se o tempo for aumentado, verifica-se uma queda desse valor para 9,8%. Uma possível explicação é que na temperatura de 60°C, a encapsulação máxima do fármaco já ocorre em um curto período de tempo de incubação. Contudo, a exposição das vesículas contendo o fármaco a uma alta temperatura, por um longo tempo, pode causar desestabilização na bicamada lipídica, com liberação do composto ou até mesmo a degradação do fármaco. Isto pode ser melhor visualizado na Figura 5.11b.

a)



b)

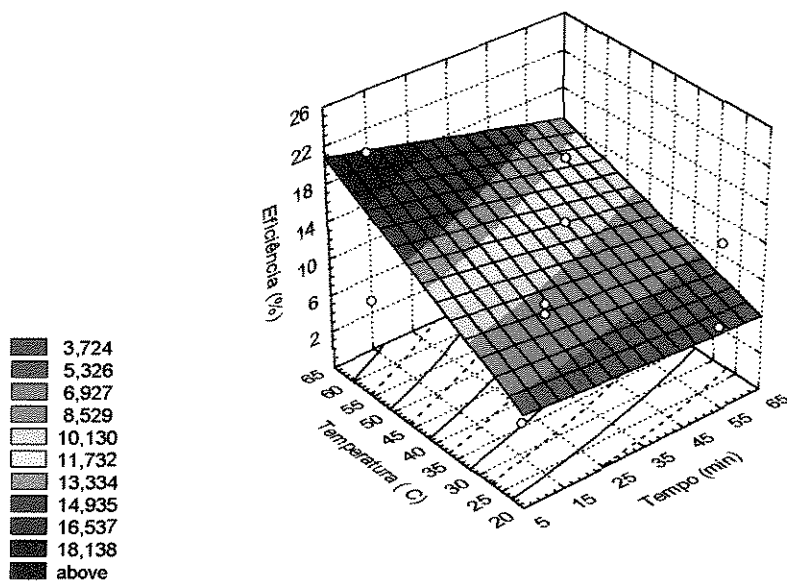


Figura 5.11: Superfícies de resposta para a eficiência de encapsulação da estreptomicina em função a) da razão molar inicial fármaco/lipídio e da temperatura de incubação, e b) do tempo e da temperatura de incubação.

Um outro comportamento foi observado para a temperatura mais baixa (25°C). Pelo ensaio 5, nota-se uma encapsulação de 10,9% quando se utilizou maiores tempos de incubação. Isto é possível pois baixas temperaturas requerem maiores tempos de incubação para a incorporação do composto, uma vez que, possivelmente, a etapa de difusão do fármaco através da bicamada lipídica é a etapa limitante da acumulação do fármaco no interior da vesícula.

De forma semelhante aos planejamentos realizados para isoniazida e pirazinamida, a maior eficiência de encapsulação da estreptomicina nos lipossomas extrudados de SPC:Col foi obtida com alta temperatura e baixos valores das variáveis razão molar inicial F/L e tempo de incubação. As eficiências de encapsulação também apresentaram valores baixos para a técnica de incorporação ativa. Isto pode ser decorrente do forte caráter hidrofílico deste composto, que apresenta coeficiente de partição octanol/Hepes praticamente nulo (Justo,1999). Além disso, a estreptomicina possui uma elevada massa molecular (1457,4 Da). Estas características associadas, provavelmente, dificultaram a permeação do composto através da bicamada lipídica. Para a estreptomicina, não foram localizados na literatura valores de pKa, não sendo feita uma análise da influência deste fator na eficiência de encapsulação do fármaco.

Diante destes resultados, as variáveis poderiam ser analisadas em outras faixas, como a maiores temperaturas e menores razões molares iniciais. Contudo, conforme discutido nos planejamentos da isoniazida e pirazinamida, devido a limitações operacionais, isto pode não ser apropriado. Outra análise poderia ser feita em torno da temperatura mais baixa (25°C) a maiores tempos de incubação, entretanto, uma eficiência de 10,9% não é indício suficiente para sugerir maiores estudos nesta faixa, uma vez que é um valor de eficiência de encapsulação ainda muito baixo para a técnica utilizada.

Os valores de diâmetros dos lipossomas apresentados na Tabela 5.10 não variaram significativamente. Uma distribuição típica dos tamanhos dos lipossomas extrudados encapsulando estreptomicina aparece na Figura 5.12. Novamente observa-se uma distribuição bimodal nos diâmetros das vesículas lipídicas.

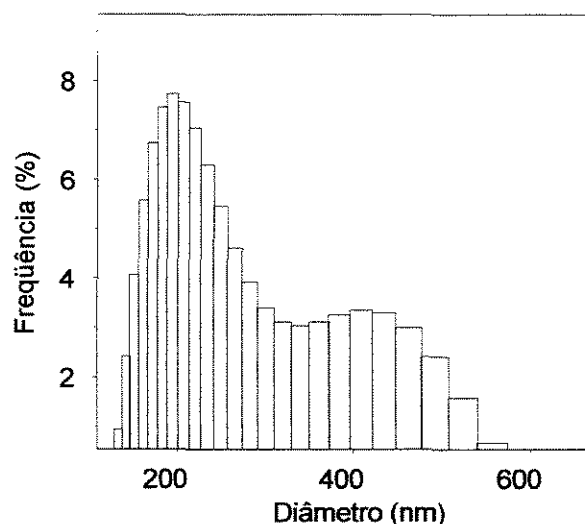


Figura 5.12: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas extrudados, encapsulando estreptomicina por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 274 nm (medida referente ao ensaio 3).

5.4. Preparação e Caracterização de Lipossomas por Injeção de Etanol

O método de injeção de etanol foi testado como uma alternativa ao método tradicional de hidratação do filme lipídico seco, por ter a vantagem de ser um método simples, de rápida execução e por possibilitar a produção de lipossomas em uma maior escala, aspecto de grande relevância do ponto de vista industrial. Além disto, devido à presença de etanol residual na preparação, as características de empacotamento molecular da bicamada lipídica poderiam apresentar-se diferentes das vesículas extrudadas, resultando em diferentes comportamentos quando na presença dos fármacos estudados.

Uma distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas vazios obtidos pelo método de injeção de etanol pode ser vista na Figura 5.13. As vesículas vazias apresentaram diâmetro médio de 139 nm, valor superior ao citado na literatura, em torno de 25 nm (Batzri e Korn, 1973), possivelmente devido à mistura pouco eficiente do solvente orgânico com a solução aquosa. As vesículas obtidas possuem diâmetros adequados para administração por via pulmonar (Lasic, 1993).

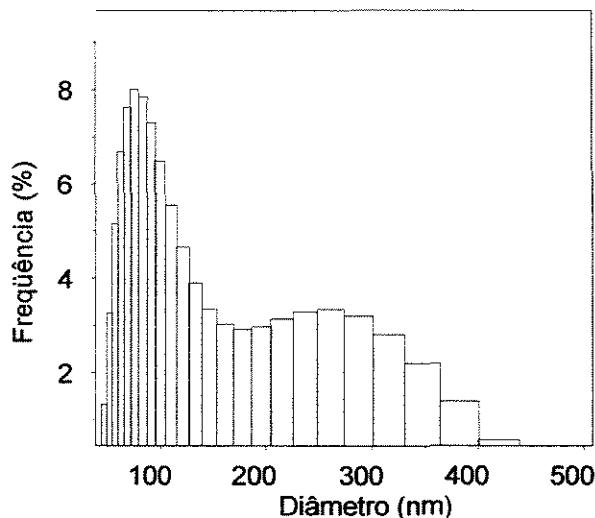


Figura 5.13: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas vazios obtidos pelo método de injeção de etanol, apresentando diâmetro médio de 139 nm.

A técnica de encapsulação ativa em lipossomas vazios preparados por injeção de etanol foi testada para os três fármacos, utilizando-se novamente a estratégia estatística de planejamento experimental como ferramenta para avaliar a influência das variáveis razão molar inicial F/L, temperatura e tempo de incubação das amostras na eficiência de encapsulação dos fármacos.

Para cada composto terapêutico, foi empregado um planejamento experimental completo 2^3 , com duplicatas no ponto central. Para as variáveis temperatura e tempo de incubação, foram empregadas as mesmas condições experimentais dos ensaios com lipossomas extrudados, havendo mudanças somente nos valores de razão molar inicial F/L empregados. Os resultados obtidos para cada fármaco estudado serão apresentados nos itens que se seguem.

5.4.1. Incorporação Ativa de Isoniazida em Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol

Os valores de eficiências de encapsulação e diâmetros médios obtidos após a incorporação ativa da isoniazida em vesículas preparadas por injeção de etanol são apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação de isoniazida em lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol.

Ensaio	(F/L) _{inicial} [*]	Temperatura (°C)	Tempo (min)	(F/L) _{final} ^{**}	Eficiência (%)	Diâmetro (nm)
1	0,16	25	10	0,013	8,3	128
2	1,60	25	10	0,012	0,7	129
3	0,16	60	10	0,015	9,3	132
4	1,60	60	10	0,003	0,2	127
5	0,16	25	60	0,026	16,0	130
6	1,60	25	60	0,024	1,5	131
7	0,16	60	60	0,002	1,0	140
8	1,60	60	60	0,007	0,4	131
9	0,88	42,5	35	0,001	0,1	124
10	0,88	42,5	35	0,012	1,3	129

* Razão molar inicial fármaco/lipídio

** Razão molar final fármaco/lipídio

Na incorporação da isoniazida em vesículas preparadas por injeção de etanol, notou-se um comportamento um pouco diferente daquele observado para os lipossomas extrudados. Os melhores resultados foram adquiridos nos ensaios 5, 3 e 1, respectivamente, sendo 16,0% o máximo valor de eficiência de encapsulação obtido. Conforme mencionado anteriormente, as vesículas obtidas pelo método de injeção de etanol podem apresentar um empacotamento da bicamada diferente daquelas obtidas por hidratação do filme lipídico seco

seguida de extrusão. Isto pode ser a causa da diferença entre as eficiências de encapsulação obtidas através dos dois métodos. A presença do etanol não removido durante a incubação dos lipossomas com o fármaco (uma vez que a cromatografia de permeação em gel causaria a diluição das amostras) poderia estar afetando de alguma forma a incorporação do fármaco. Contudo, não foram encontradas na literatura informações a respeito da influência deste fator na encapsulação.

Essa diferença na incorporação de isoniazida em lipossomas preparados pelos dois métodos também foi observada em uma investigação preliminar realizada por nosso grupo de pesquisa quando se utilizou como composição lipídica DSPC/Col (60:40 mol%). Conforme mencionado anteriormente, para essa composição de lipídios, razão F/L inicial de 0,2, temperatura de 60°C e tempo de incubação de 10 minutos, uma eficiência de encapsulação de 100% foi obtida em lipossomas extrudados. Entretanto, empregando-se as mesmas condições de encapsulação, apenas 25% de isoniazida foi incorporada em vesículas preparadas por injeção de etanol. Da mesma forma que observado aqui, quando foram utilizados valores de razões F/L iniciais superiores, as eficiências de encapsulação caíram bastante. Comparando-se estes resultados com os apresentados na Tabela 5.13, observa-se novamente uma melhor incorporação do composto quando do uso do DSPC. Contudo, ressalta-se que este composto tem custo aproximadamente 400 vezes mais elevado que o SPC.

Após o tratamento dos dados, obteve-se os resultados apresentados na Tabela 5.14. A Tabela 5.15 apresenta a análise da variância (ANOVA) efetuada para a validação do modelo considerando-se os fatores significativos.

Pode-se observar pela ANOVA que o coeficiente de correlação foi de 90%, contudo, o teste F não apresentou um bom resultado ($F_{\text{calculado}}$ 1,8 vezes maior que F_{tabelado}), indicando a inadequação do modelo. Assim, a análise do planejamento fatorial foi efetuada com base nos efeitos mostrados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14: Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação da isoniazida nos lipossomas preparados por injeção de etanol.

	Efeito	Desvio Padrão	t (1)	p	Lim.Conf -90%	Lim.Conf +90%
Média	3,883	0,275	14,118	0,0450	2,147	5,620
(1) (F/L) _{inicial} *	-7,920	0,615	-12,878	0,0493	-11,803	-4,037
(2) Temperatura *	-3,910	0,615	-6,358	0,0993	-7,793	-0,027
(3) Tempo	0,110	0,615	0,179	0,8873	-3,773	3,993
(1) x (2) ***	3,080	0,615	5,008	0,1254	-0,803	6,963
(1) x (3)	0,400	0,615	0,650	0,6329	-3,483	4,283
(2) x (3) *	-4,140	0,615	-6,732	0,0939	-8,023	-0,257
(1) x (2) x (3) **	3,850	0,615	6,260	0,1008	-0,033	7,733

* fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

** fator estatisticamente significativo a 89% de confiança.

*** fator estatisticamente significativo a 87% de confiança.

Tabela 5.15: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas preparados por injeção de etanol.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	238,926	5	47,78	7,29
Resíduo	26,191	4	6,55	
Falta de Ajuste	25,435	3		
Erro Puro	0,756	1		
Total	265,117	9		

Coefficiente de correlação $R^2=0,90$

$F_{0,90;5;4}=4,05$

Os efeitos estimados de cada variável, juntamente com seus efeitos de interação, são ilustrados na Figura 5.14. Pela figura, nota-se que a razão molar $(F/L)_{\text{inicial}}$ apresentou uma influência bem maior na incorporação da isoniazida do que as outras variáveis. Seu efeito, em termos absolutos, foi quase o dobro daqueles verificados para as outras variáveis, sendo que um decréscimo desta variável de 1,6 para 0,16, gerou um aumento médio de 7,9% na eficiência de encapsulação. Outros fatores que afetaram a variável resposta estudada foram a temperatura de incubação e os termos de interação $(F/L)_{\text{inicial}}$ e temperatura, temperatura e tempo, e o termo de interação dos três fatores.

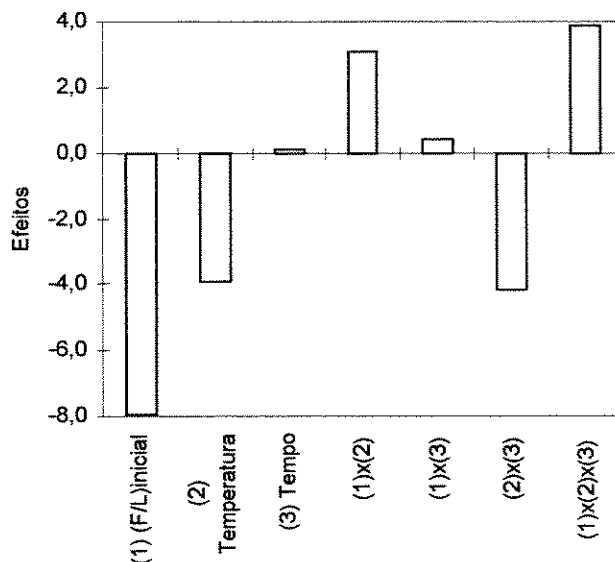


Figura 5.14: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L , da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da isoniazida em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol.

Para este estudo, pode-se concluir que uma eficiência máxima de encapsulação (16,0%) pode ser adquirida com $(F/L)_{\text{inicial}}$ de 0,16, temperatura de 25°C e tempo de 60 minutos. Utilizando-se a mesma condição de $(F/L)_{\text{inicial}}$, aumentando-se a temperatura de

incubação para 60°C, em um período de 10 minutos, é possível a obtenção de uma eficiência em torno de 10%.

Uma distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas preparados por injeção, encapsulando isoniazida por incorporação ativa, é ilustrada na Figura 5.15.

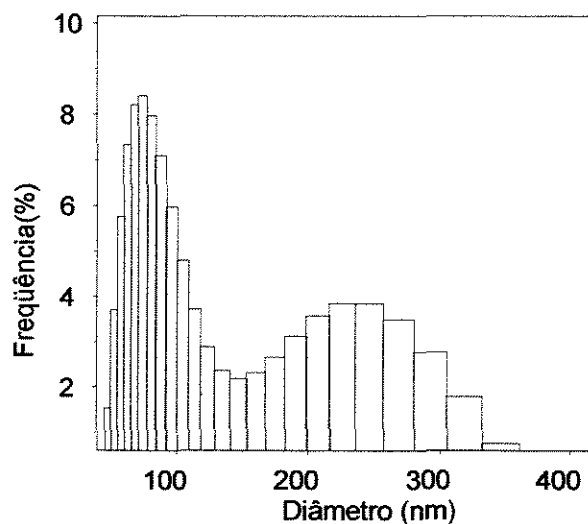


Figura 5.15: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas obtidos pelo método de injeção de etanol, encapsulando isoniazida por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 132 nm, referente ao ensaio 3.

5.4.2. Incorporação Ativa de Pirazinamida em Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol

Os valores de eficiências de encapsulação e diâmetros médios obtidos após a incorporação ativa da pirazinamida em vesículas preparadas por injeção de etanol aparecem na Tabela 5.16.

Como pode ser observado pela Tabela 5.16, as eficiências de encapsulação de pirazinamida em vesículas preparadas por injeção de etanol apresentaram valores muito

baixos para a técnica de encapsulação ativa empregada, não havendo nenhum valor de eficiência que possa ser considerado relevante no estudo. Sendo assim, não se efetuou o tratamento estatístico dos dados experimentais.

Tabela 5.16: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação de pirazinamida em lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol.

Ensaio	(F/L) _{inicial} [*]	Temperatura (°C)	Tempo (min)	(F/L) _{final} ^{**}	Eficiência (%)	Diâmetro (nm)
1	0,16	25	10	0,000	0,0	131
2	1,60	25	10	0,002	0,1	130
3	0,16	60	10	0,001	0,7	133
4	1,60	60	10	0,002	0,1	131
5	0,16	25	60	0,000	0,0	131
6	1,60	25	60	0,008	0,5	130
7	0,16	60	60	0,000	0,0	134
8	1,60	60	60	0,011	0,7	131
9	0,88	42,5	35	0,024	2,7	127
10	0,88	42,5	35	0,006	0,7	127

^{*} Razão molar inicial fármaco/lipídio

^{**} Razão molar final fármaco/lipídio

A Figura 5.16 ilustra uma distribuição típica dos tamanhos dos lipossomas encapsulando pirazinamida. Essa distribuição é bimodal, com diâmetro médio de 127 nm, sendo referente ao ensaio 9.

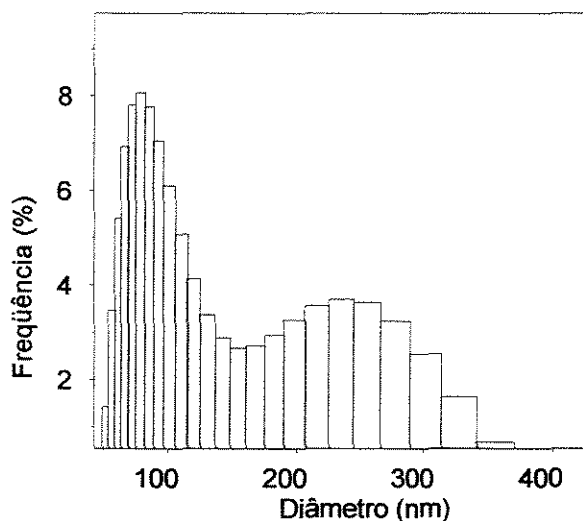


Figura 5.16: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas obtidos pelo método de injeção de etanol, encapsulando pirazinamida por incorporação ativa. O diâmetro médio é de 127 nm (ensaio 9).

5.4.3. Incorporação Ativa de Estreptomicina em Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol

Os resultados do planejamento experimental, realizado para avaliar as variáveis que mais influenciaram a encapsulação da estreptomicina em lipossomas preparados por injeção de etanol, estão apresentados na Tabela 5.17.

Pode-se observar que as eficiências de encapsulação para a estreptomicina variaram de 0 a 19,3%, sendo que o único resultado com uma eficiência de encapsulação que pode ser considerada como atraente foi o obtido no ensaio 3, quando se tinha uma razão $(F/L)_{\text{inicial}}$ de 0,16, uma temperatura de incubação de 60°C, e tempo de incubação de 10 minutos. A Tabela 5.18 apresenta os valores estimados dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta eficiência de encapsulação.

Tabela 5.17: Planejamento experimental completo para a eficiência de encapsulação de estreptomicina em lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol.

Ensaio	(F/L) _{inicial} [*]	Temperatura (°C)	Tempo (min)	(F/L) _{final} ^{**}	Eficiência (%)	Diâmetro (nm)
1	0,16	25	10	0,000	0,0	127
2	1,60	25	10	0,000	0,0	128
3	0,16	60	10	0,031	19,3	129
4	1,60	60	10	0,000	0,0	131
5	0,16	25	60	0,000	0,0	129
6	1,60	25	60	0,012	0,7	129
7	0,16	60	60	0,008	5,1	133
8	1,60	60	60	0,029	1,8	130
9	0,88	42,5	35	0,035	4,0	127
10	0,88	42,5	35	0,023	2,6	125

* Razão molar inicial fármaco/lipídio

** Razão molar final fármaco/lipídio

Tabela 5.18: Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação da estreptomicina nos lipossomas preparados por injeção de etanol.

	Efeito	Desvio Padrão	t (1)	p	Lim.Conf -90%	Lim.Conf +90%
Média	3,345	0,311	10,762	0,0589	1,383	5,307
(1) (F/L) _{inicial} [*]	-5,450	0,695	-7,842	0,0807	-9,838	-1,062
(2) Temperatura [*]	6,360	0,695	9,151	0,0693	1,972	10,748
(3) Tempo	-2,915	0,695	-4,194	0,1490	-7,303	1,473
(1) x (2) [*]	-5,820	0,695	-8,374	0,0757	-10,208	-1,432
(1) x (3)	4,195	0,695	6,036	0,1045	-0,193	8,583
(2) x (3)	-3,285	0,695	-4,727	0,1327	-7,673	1,103
(1) x (2) x (3)	3,825	0,695	5,504	0,1144	-0,563	8,213

* fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Pode ser verificado na Tabela 5.18 que os fatores significativos a 90% de confiança foram a razão $(F/L)_{\text{inicial}}$, a temperatura de incubação e o termo de interação entre os dois.

A Tabela 5.19 apresenta a análise da variância (ANOVA) efetuada para a validação do modelo considerando-se apenas os fatores significativos a 90%.

Tabela 5.19: Análise da Variância para a eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas preparados por injeção de etanol.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	208,049	3	69,35	4,00
Resíduo	104,016	6	17,34	
Falta de Ajuste	103,050	5		
Erro Puro	0,966	1		
Total	312,065	9		

Coeficiente de correlação $R^2=0,67$

$F_{0,90;3;6}=3,29$

A análise da variância mostrou que o modelo de primeira ordem não é adequado para a representação dos dados obtidos. Apenas quando reduziu-se o limite de confiança para 85%, é que se verificou melhores resultados, tendo-se pequenos desvios entre os valores preditos e observados (dados não apresentados). Contudo, não se considerou adequada a proposição de um modelo com um número tão grande de parâmetros.

Desta forma, pode-se fazer uma avaliação dos efeitos das variáveis estudadas sobre a eficiência de encapsulação através da Figura 5.17. Da mesma forma que na encapsulação da estreptomicina em lipossomas extrudados, um decréscimo da razão molar inicial F/L e um aumento da temperatura de incubação geraram maiores eficiências de encapsulação. A diferença é que, neste estudo, o tempo de incubação das suspensões teve uma maior influência na eficiência de encapsulação. Entretanto, esses fatores não devem ser analisados de forma isolada uma vez que todos os fatores, inclusive os termos de interação entre eles, também influenciam a variável resposta de maneira considerável.

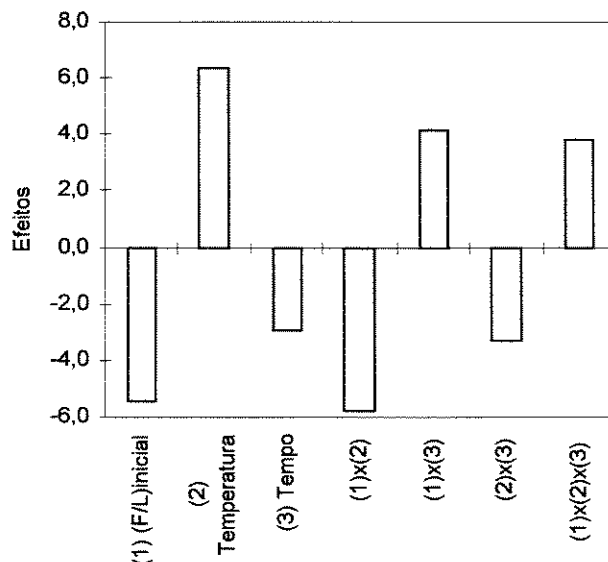


Figura 5.17: Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura, do tempo de incubação e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da estreptomicina em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol.

Pode ser visto mais uma vez que melhores eficiências podem se adquiridas com menores valores de razão molar $(F/L)_{\text{inicial}}$ e maiores temperaturas de incubação. Comparando-se os ensaios 3 e 7 mostrados na Tabela 5.17, nota-se que se empregando uma menor razão molar (0,16) e uma maior temperatura (60°C), ocorre incorporação do composto já com 10 minutos de incubação. Entretanto, com o aumento do tempo de incubação, a incorporação do composto cai consideravelmente. Este comportamento já havia sido observado na encapsulação da estreptomicina em lipossomas extrudados, dando indícios da sensibilidade deste composto a altas temperatura, por longos períodos. Outra possibilidade é que o composto terapêutico encapsulado esteja sendo liberado em um curto período.

Não houve variação significativa nas medidas de diâmetros dos ensaios realizados (Tabela 5.17). A distribuição típica dos tamanhos das vesículas contendo estreptomicina associada é ilustrada na Figura 5.18.

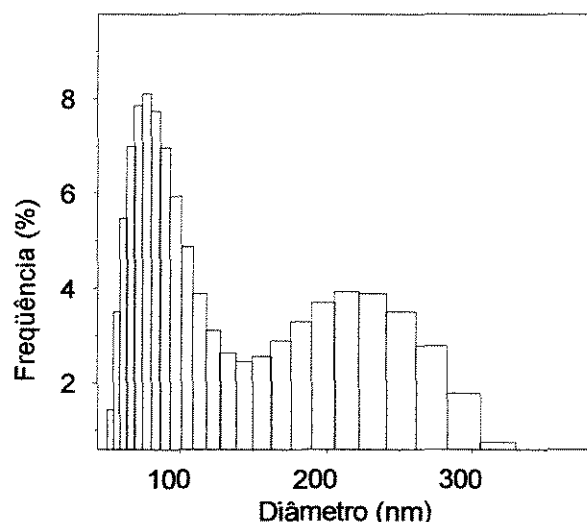


Figura 5.18: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas obtidos pelo método de injeção de etanol, encapsulando estreptomicina por incorporação ativa. As vesículas apresentaram diâmetro médio de 129 nm (ensaio 3).

Como pôde ser visto, a tendência geral observada nos cinco planejamentos discutidos foi de poucos ensaios apresentando eficiências de encapsulação razoáveis, sendo que a grande maioria apresentou valores de eficiências praticamente nulos, não havendo uma distribuição uniforme dos valores da variável resposta. Este fato pode ser a causa dos altos desvios dos valores preditos em relação aos observados verificados sempre para as baixas eficiências de encapsulação, como pode ser visto nas tabelas apresentadas no Anexo I.

Por fim, pode-se dizer que, de uma forma geral, os compostos terapêuticos estudados, variando-se os métodos de preparação de lipossomas de SPC:Col (60:40 mol%), apresentaram baixas eficiências de encapsulação para a técnica de incorporação ativa empregada, tendo-se como eficiências máximas 22,5%, 15,8% e 21,0% para isoniazida, pirazinamida e estreptomicina, respectivamente.

Para uma elevada incorporação de um composto em uma vesícula lipídica através da técnica de encapsulação ativa, a molécula deve ser solúvel em água, ter preferencialmente uma região hidrofóbica, uma baixa massa molecular e carga elétrica neutra. Os três compostos terapêuticos estudados aqui apresentam alta hidrofilicidade e baixos coeficientes

de partição. De acordo com Barenholz e Crommelin (1994), a interação entre a bicamada lipídica e o composto a ser encapsulado depende das características de ambos, como rigidez da bicamada e propriedades físico-químicas dos compostos. Esses autores identificaram três grupos de compostos conforme seu tipo de interação com a bicamada. Com base na classificação sugerida por esses pesquisadores, os compostos terapêuticos aqui estudados podem se encaixar no grupo I, que compreende compostos hidrofílicos solúveis em água, com coeficientes de partição óleo/água e octanol/água praticamente nulos, não interagindo com a bicamada lipídica. Essas características podem estar dificultando a permeação dos fármacos através da membrana da vesícula, resultando em baixa eficiência de encapsulação. No caso da estreptomicina, sua massa molecular é elevada, sendo mais um obstáculo na incorporação ativa.

Outro fator considerado importante na incorporação ativa é o valor de pKa dos compostos, uma vez que para as moléculas atravessarem a bicamada elas devem, preferencialmente, ter carga neutra. Entretanto, mesmo dispondo dos valores de pKa para a isoniazida e pirazinamida, os estados de ionização em que as moléculas destes compostos se encontram nas condições de pH aqui empregadas não estão totalmente esclarecidos, dificultando assim a predição do comportamento dos fármacos durante a encapsulação. Desta forma, visando a obtenção de melhores eficiências de encapsulação, novos ensaios foram realizados testando-se o mesmo tampão externo às vesículas (Hepes) em um outro valor de pH (8,0) e também aumentando-se sua salinidade com a adição de 120 mM de NaCl.

5.4.4. Incorporação Ativa de Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina em Lipossomas preparados por Injeção de Etanol, com Gradiente de pH de 4,0 unidades

Conforme já descrito no item Materiais e Metodologia, empregou-se nestes ensaios razões molares iniciais F/L de 0,16, temperatura de incubação das suspensões de 60°C e tempo de incubação de 10 minutos uma vez que, em geral, foram nestas condições que se obteve as melhores eficiências de encapsulação. Ajustou-se os pHs das soluções dos compostos terapêuticos para 8,0 pois em um pH mais elevado os fármacos poderiam apresentar um estado de ionização diferente, ou seja, uma fração maior de moléculas dos

fármacos poderia estar neutra, podendo então permear a bicamada lipídica para o interior dos lipossomas.

Além disto, foram realizados ensaios testando-se uma solução tampão com maior salinidade, adicionando-se 120 mM de NaCl, para avaliar se a molécula de fármaco que supostamente estaria carregada poderia se associar aos íons da solução, sofrendo um efeito de blindagem da carga elétrica, podendo assim permear a bicamada lipídica da vesícula. Soluções tampão Hepes com ou sem NaCl foram utilizadas para a geração dos gradientes de pH por cromatografia de permeação em gel, bem como para solubilizar os fármacos. Os resultados são mostrados na Tabela 5.20.

Os estudos mostraram que aumentando-se o pH da solução tampão Hepes para 8,0 houve uma incorporação ainda menor para os três compostos estudados, como pode ser visto na Tabela 5.20.

Tabela 5.20: Valores de razão molar final F/L, eficiência de encapsulação e diâmetro médio obtidos para a incorporação ativa de isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas preparados por injeção de etanol apresentando $\Delta\text{pH} = 4,0$. Os fármacos foram solubilizados em soluções tampão Hepes (10mM) e Hepes (10mM)/NaCl (120mM) a pH 8,0.

Fármaco	Solução aquosa externa às vesículas	Razão (F/L) _{final}	Eficiência de Encapsulação (%)	Diâmetro Médio (nm)
Isoniazida	Hepes	0,003	2,0	94,8
	Hepes/NaCl	0,005	2,9	91,5
Pirazinamida	Hepes	0,006	3,6	95,5
	Hepes/NaCl	0,005	3,3	94,3
Estreptomicina	Hepes	0,003	1,6	93,2
	Hepes/NaCl	0,015	9,1	91,8

Quando avaliou-se a força iônica da solução tampão com a adição de 120 mM de NaCl, verificou-se que praticamente não houve alteração na incorporação da isoniazida e da pirazinamida. Apenas para a estreptomicina é que se observou um aumento na eficiência de encapsulação. Contudo, esse aumento não foi muito significativo, não chegando a superar o valor de eficiência obtido quando do uso do tampão Hepes a pH 7,4.

Os lipossomas preparados nestes ensaios apresentaram distribuição de diâmetros similar às obtidas anteriormente, porém, com diâmetros médios um pouco menores. Isso se deu, provavelmente, devido à diferente pressão de injeção na seringa, durante a formação das vesículas, variável esta de difícil controle, uma vez que o processo de injeção é manual. Os lipossomas vazios tinham diâmetros médios de 99,2 nm e 98,2 nm para vesículas suspensas em solução tampão Hepes e Hepes/NaCl, respectivamente e a incorporação dos fármacos não alterou significativamente o tamanho dos lipossomas.

5.4.5. Incorporação Passiva de Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina em Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol

Na tentativa de aumentar a razão molar final fármaco/lipídio dos sistemas estudados, foi testada a técnica de encapsulação passiva em lipossomas preparados por injeção de etanol. As concentrações das soluções de fármacos empregadas neste estudo foram escolhidas de acordo com as limitações de solubilidade de cada composto, com a finalidade de se obter as maiores razões molares iniciais fármaco/lipídio possíveis, para que uma maior quantidade de fármaco pudesse estar disponível para a captura. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5.21.

Primeiramente foi empregada uma concentração inicial de fármaco na suspensão de lipossomas de 95 mM para os três compostos. Como pode ser observado na tabela, apesar das altas razões iniciais F/L utilizadas, a incorporação de isoniazida e pirazinamida nos lipossomas foi muito baixa, com eficiências de encapsulação de 0,06% e 0,08%, respectivamente, correspondendo a razões molares finais F/L de 0,009 e 0,013. Testou-se então, para a isoniazida, uma maior razão molar inicial, obtendo-se um aumento pouco significativo na razão F/L final. Para a pirazinamida não foi avaliada uma razão molar inicial mais elevada devido a sua menor solubilidade no tampão empregado.

Estes resultados são ainda menos favoráveis que os obtidos através da encapsulação ativa, sugerindo a inadequação desta técnica para a encapsulação dos fármacos em questão.

Para a estreptomicina, a técnica de incorporação passiva permitiu uma eficiência de encapsulação de 0,62%, com uma razão molar final F/L correspondente de 0,138 (melhor resultado). Este valor de $(F/L)_{\text{final}}$ é cerca de 3,6 vezes maior que o melhor resultado obtido com a técnica de encapsulação ativa. Pode-se notar também que a concentração estimada de estreptomicina no interior das vesículas lipídicas apresenta um valor razoável (57,7 mM). Assim, conforme a definição de eficiência de captura, 34,7% do composto terapêutico disponível inicialmente na solução aquosa foi capturado durante a formação dos lipossomas.

Tabela 5.21: Caracterização dos lipossomas encapsulando isoniazida, pirazinamida e estreptomicina por incorporação passiva através do método de injeção de etanol. Concentração lipídica final: 1,0 mM.

	Isoniazida		Pirazinamida	Estreptomicina	
C_{inicial} de Fármaco (mM)	95,0	475,0	95,0	95,0	166,3
Razão $(F/L)_{\text{final}}$	0,009	0,012	0,013	0,099	0,138
Diâmetro Médio (nm)	100,0	111,6	106,0	130,0	145,5
Efic. de Encapsulação (%)	0,06	0,02	0,08	0,65	0,62
C_{interna} de Fármaco (mM)	5,5	6,8	7,6	46,3	57,7
Efic. de Captura (%)	5,8	1,4	8,0	48,7	34,7

Os lipossomas vazios obtidos injetando-se uma solução de lipídios em etanol em solução tampão Hepes (10 mM e pH 7,4) apresentaram um diâmetro médio de 104,0 nm, com distribuição bimodal mostrada na Figura 5.19. Observa-se pela Tabela 5.21 que os diâmetros obtidos para a isoniazida e pirazinamida apresentaram valores muito próximos aos dos lipossomas vazios, devido, provavelmente, às baixas concentrações de fármacos no interior das vesículas. Já os lipossomas contendo estreptomicina, com uma concentração interna de fármaco mais elevada, apresentaram um diâmetro médio com valor até 40% maior que os vazios. Os lipossomas encapsulando os compostos terapêuticos apresentaram distribuições de tamanhos similares a da Figura 5.19.

Como os valores máximos de razão molar final F/L para a isoniazida e a pirazinamida ainda foram baixos, testes para avaliar a estabilidade de estocagem das vesículas lipídicas foram realizados apenas para a amostra encapsulando estreptomicina.

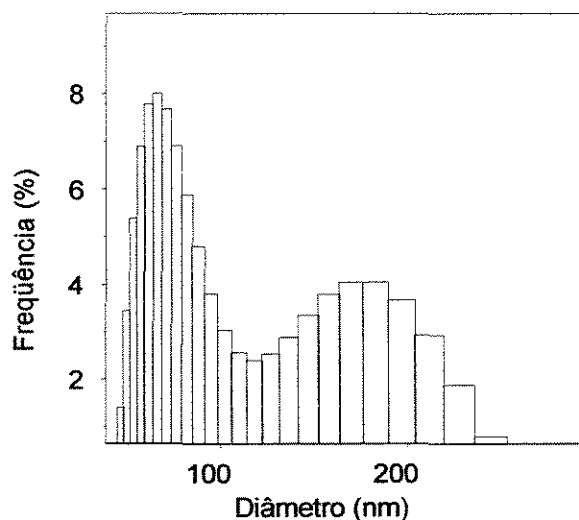


Figura 5.19: Distribuição típica dos diâmetros dos lipossomas vazios obtidos pela injeção de uma solução etanólica de lipídios em uma solução tampão Hepes a 10 mM e pH 7,4. As vesículas apresentaram diâmetro médio de 104 nm.

5.5. Avaliação da Estabilidade de Estocagem dos Lipossomas Encapsulando Estreptomicina por Incorporação Passiva durante a Injeção de Etanol

A estabilidade de estocagem dos lipossomas contendo estreptomicina, incorporada durante a formação das vesículas pelo método de injeção de etanol a uma razão molar inicial F/L de 166,3:5, foi avaliada quanto ao diâmetro médio e à capacidade de retenção do composto encapsulado. As Figuras 5.20 e 5.21 apresentam as variações observadas nessas características em função do tempo de estocagem sob refrigeração a 4°C. O tempo escolhido para o monitoramento foi de 1 mês porque, em geral, é o período em que ocorrem as maiores modificações estruturais nos lipossomas. Após este período, alterações podem ocorrer, contudo, em taxas significativamente menores.

Como pode ser visto na Figura 5.20, a variação dos diâmetros médios foi pequena durante o tempo de monitoramento, atingindo um máximo de 4%, podendo-se concluir que não houve agregação nem fusão das vesículas lipídicas com o passar do tempo.

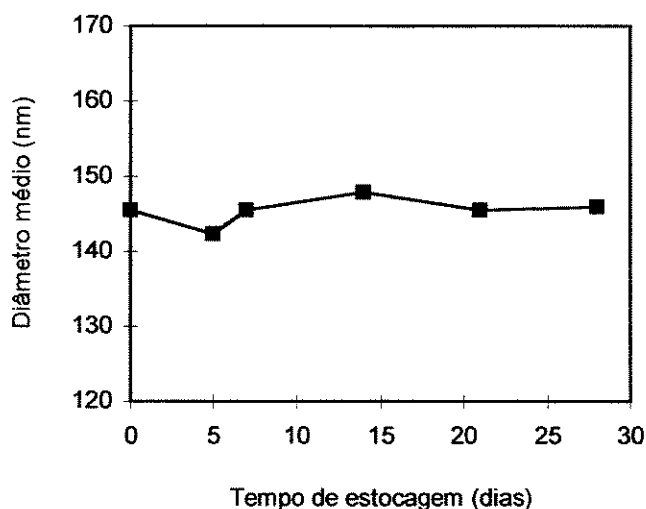


Figura 5.20: Variação dos diâmetros médios dos lipossomas encapsulando estreptomicina por incorporação passiva em função do tempo de estocagem a 4°C. O diâmetro médio inicial é de 145,5 nm.

Em relação à capacidade de retenção do fármaco incorporado às vesículas, o comportamento do sistema foi um pouco diferente daquele observado para os diâmetros. De acordo com a Figura 5.21, pode ser observado que até 72 horas após a encapsulação da estreptomicina, esta ainda permanecia totalmente no interior da vesícula. Contudo, após 5 dias, cerca de 22% do composto havia sido liberado dos lipossomas. Em duas semanas mais de 50% do fármaco já tinha sido liberado e em três semanas apenas 37% de estreptomicina permanecia encapsulada, mantendo-se neste patamar até o final do mês. Observa-se a partir da terceira semana uma tendência das vesículas à estabilidade, contudo, a razão molar final F/L do composto retido nos lipossomas é muito baixa (0,050), próxima daquela obtida para as vesículas extrudadas encapsulando ativamente o fármaco. A concentração da estreptomicina no interior dos lipossomas, que era inicialmente de 57,7 mM passa, ao final

de um mês, para 20,9 mM. Essa concentração ainda apresenta um valor superior aos obtidos pelos outros métodos de encapsulação.

Desta forma, de acordo com a estabilidade de estocagem destes lipossomas, pode-se dizer que os mesmos deveriam ser administrados, preferencialmente, até três dias após o seu preparo, uma vez que a partir deste período a estreptomicina já começaria a ser indesejavelmente liberada.

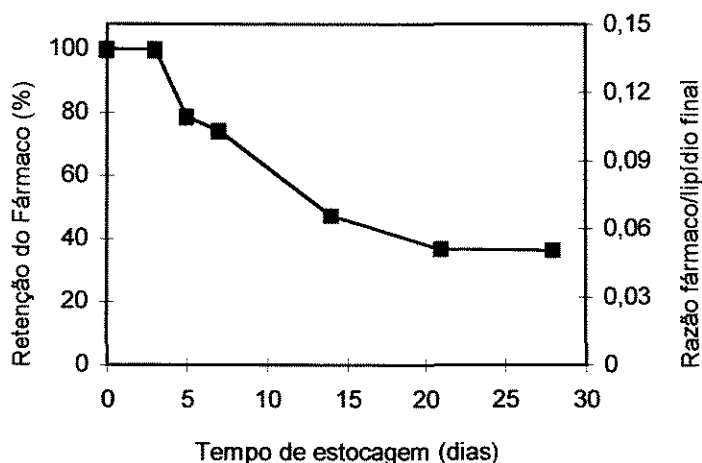


Figura 5.21: Variação da retenção do fármaco no interior dos lipossomas e da razão molar final fármaco/lipídio após a remoção da estreptomicina liberada com o tempo de estocagem a 4°C. Os lipossomas foram preparados por injeção de etanol e o fármaco incorporado às vesículas por encapsulação passiva.

5.6. Comparação dos Métodos de Encapsulação Utilizados para a Incorporação de Isoniazida, Pirazinamida e Estreptomicina.

Pode-se afirmar, conforme verificado ao longo do trabalho, que técnicas distintas de encapsulação, empregadas em condições diversas, permitem a incorporação dos fármacos estudados em graus distintos. Neste item estão apresentados os melhores resultados obtidos para a encapsulação de isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas de SPC:Col (60:40 mol%) nas condições aqui estudadas. Na Tabela 5.22 estão dispostas as características das melhores formulações obtidas encapsulando os fármacos estudados.

Tabela 5.22: Melhores resultados obtidos para a encapsulação de isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas de SPC:Col.

	Isoniazida	Pirazinamida	Estreptomicina
$(F/L)_{\text{final}}$	0,045	0,032	0,138
Eficiência (%)	22,5	15,8	0,62
Diâmetro (nm)	255,0	257,0	145,5
C_{final} de fármaco (mM)	0,028	0,019	0,138
C_{interna} de fármaco (mM)	11,1	7,5	57,7
Técnica utilizada	extrusão (ativa)	extrusão (ativa)	injeção de etanol (passiva)
M (mg)*	0,69	0,37	20,1

* massa total de fármaco calculada para amostras de 10 mL de lipossomas a 10 mM.

Para os compostos isoniazida e pirazinamida, as maiores eficiências de encapsulação obtidas foram de 22,5% e 15,8%, respectivamente. Esses valores de eficiência bem como as razões molares F/L finais foram obtidos com a técnica de encapsulação ativa em lipossomas preparados por hidratação do filme seguida de extrusão, utilizando-se a menor razão molar F/L inicial testada (0,2) e a maior temperatura de incubação das suspensões lipídicas (60°C).

No caso da pirazinamida, é interessante ressaltar que as vesículas preparadas por incorporação passiva apresentavam uma concentração de fármaco no seu interior (7,6 mM) igual àquela obtida através da incorporação ativa do fármaco em lipossomas extrudados (Tabela 5.22). Contudo, a concentração de fármaco inicialmente utilizada naquele método foi cerca de 238 vezes maior, constatando-se a vantagem da incorporação ativa para a encapsulação do fármaco em questão. Para a isoniazida, a encapsulação ativa possibilitou uma concentração interna de fármaco ainda maior que a obtida pela técnica passiva.

Para a estreptomicina, apesar da maior eficiência de encapsulação ter sido obtida com a técnica de incorporação ativa (21,0%), o melhor resultado em termos de razão molar final F/L e concentração interna de fármaco nas vesículas foi obtido através da incorporação passiva. Como pode ser visto na Tabela 5.22, verificou-se uma concentração interna de

estreptomicina de 57,7 mM, que é 6,5 vezes maior que a obtida com a técnica ativa. Este dado é muito importante do ponto de vista farmacológico, pois, quanto mais alta a concentração de fármaco incorporado aos lipossomas disponível para administração, mais adequado seria o sistema. A desvantagem é que do ponto de vista da engenharia, não seria interessante uma baixa eficiência de encapsulação devido ao custo do composto terapêutico, a menos que este pudesse ser recirculado no sistema.

Os resultados obtidos neste estudo encontram-se dentro dos valores localizados na literatura, apresentados na Tabela 3.3 (item Revisão da Literatura). Conforme mencionado anteriormente, os resultados obtidos aqui, no tocante à eficiência de encapsulação e razão molar F/L final, foram menos favoráveis do que os obtidos por Justo (1999) para os três fármacos avaliados. Entretanto, comparando-se os resultados obtidos aqui com os de Lima (2001) para a encapsulação de isoniazida e pirazinamida, verificou-se maiores valores de eficiências de encapsulação e razões molares F/L finais, utilizando-se uma composição lipídica de menor custo. Para a estreptomicina, obteve-se uma razão molar final F/L dentro da faixa obtida por Gangadharam (1995), empregando-se um método de preparação das vesículas mais simples e passível de escalonamento.

Dispondo dos valores de razões molares finais F/L, é possível calcular as massas de fármacos associadas às vesículas em preparações de, por exemplo, 10 mM de concentração lipídica. Esses valores são mostrados na Tabela 5.22 e podem ser comparados aos valores das dosagens diárias necessárias aos pacientes. Segundo dados do Ministério da Saúde (1997), a dosagem diária de isoniazida (na forma livre) é de 400 mg para pacientes adultos pesando mais de 45 kg, a de pirazinamida é de 2000 mg e a de estreptomicina é de 1000 mg.

Assim, verifica-se a partir dos resultados obtidos que as concentrações dos fármacos nas suspensões de lipossomas apresentam valores muito reduzidos se comparados aos requeridos nas dosagens usualmente utilizadas no tratamento da Tuberculose. Entretanto, alguns dados da literatura sugerem que o emprego dos fármacos associados aos lipossomas possa levar ao aumento da eficácia terapêutica dos compostos antimicrobianos em até 2000 vezes (Agarwal et al., 1994). Além disso, a administração através de outra rota modifica a forma de absorção dos compostos.

Por fim, sugere-se que estudos suplementares sejam realizados, investigando-se o efeito de outras variáveis na eficiência de encapsulação, razão molar final F/L e capacidade de retenção do fármaco nos lipossomas, de forma a se obter formulações com maior aplicabilidade nessa área.

Capítulo VI

Conclusões e Sugestões

6.1. Conclusões

- No estudo comparativo dos métodos de quantificação de isoniazida, a utilização de etanol como solvente para o rompimento das vesículas causou grande diluição das amostras, acarretando baixa sensibilidade na detecção do fármaco. O método envolvendo Triton X-100 não se mostrou eficiente para o rompimento de vesículas de SPC:Col (60:40 mol%) incorporando isoniazida, enquanto a técnica empregando metanol mostrou-se eficaz.
- As três técnicas testadas para a remoção da isoniazida não encapsulada nos lipossomas apresentaram bons resultados. Contudo, a necessidade de se utilizar uma técnica rápida para a realização de um grande número de experimentos inviabilizou o uso da ultrafiltração. A diálise, por sua vez, embora seja a mais simples, é a mais lenta e requer maior quantidade de tampão do que a cromatografia, aspecto desvantajoso do ponto de vista econômico. Diante disto, apesar de ter causado a diluição das amostras, a técnica escolhida foi a cromatografia de permeação em gel.
- Para todos os estudos de encapsulação efetuados, a variável que mais influenciou as eficiências de encapsulação foi a razão molar inicial F/L, sendo que um decréscimo em seu valor acarretou maiores eficiências. A temperatura também apresentou influência significativa, porém em menor grau.
- Para a encapsulação ativa de isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas extrudados de SPC:Col (60:40 mol%), obteve-se 22,5%, 15,8% e 21,0%, respectivamente, de eficiência de encapsulação máxima.

- Nos ensaios com lipossomas de SPC:Col (60:40 mol%) preparados por injeção de etanol, as melhores eficiências de encapsulação para isoniazida, pirazinamida e estreptomicina obtidas foram de 16,0%, 2,7% e 19,3%, respectivamente.
- Os lipossomas vazios, obtidos pelo método de hidratação do filme apresentaram diâmetros médios em torno de 275 nm, e os obtidos pelo método de injeção de etanol em torno de 139 nm, com distribuição predominantemente bimodal, estando dentro da faixa de tamanho de vesículas recomendável para administração por inalação. A presença do fármaco não causou mudanças significativas nos tamanhos das vesículas.
- Para os ensaios de incorporação ativa empregando-se Hepes e Hepes/NaCl a pH 8,0 como tampão externo às vesículas preparadas por injeção de etanol, obteve-se eficiências de encapsulação ainda menores que as obtidas anteriormente para os três fármacos.
- A incorporação passiva de isoniazida e pirazinamida durante a formação das vesículas pelo método de injeção de etanol resultou em baixas eficiências de encapsulação, com valores máximos de 0,06% e 0,08%, respectivamente.
- A encapsulação passiva de estreptomicina em lipossomas preparados por injeção de etanol resultou em uma eficiência de 0,62%, valor aceitável uma vez que corresponde a uma razão molar final F/L de 0,138 e a uma concentração de fármaco no cerne aquoso da vesícula de 57,7mM. Essas vesículas apresentaram diâmetros médios de 145,5 nm, passíveis de administração por inalação.
- Os lipossomas encapsulando estreptomicina por incorporação passiva apresentaram boa estabilidade de estocagem do ponto de vista de agregação e fusão das vesículas, não sendo verificadas alterações significativas nos seus diâmetros médios em um período de um mês de estocagem a 4°C. Contudo, neste período, observou-se uma liberação de 63% do fármaco encapsulado no interior da vesícula, recomendando-se assim sua administração até 72 horas após o preparo.

6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

Para dar continuidade ao trabalho desenvolvido, sugere-se o estudo de alguns aspectos citados a seguir:

- Estudos *in vitro* e *in vivo* da efetividade das formulações desenvolvidas contra o microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*.
- Avaliação da estocagem na forma liofilizada dos lipossomas encapsulando estreptomicina, na tentativa de reduzir a liberação indesejável do fármaco.
- Avaliação da estabilidade das vesículas quanto à integridade da bicamada lipídica na presença de um tensoativo.
- Estudos de estabilidade das vesículas encapsulando os fármacos frente à nebulização.
- Avaliação da incorporação dos fármacos por outros métodos, como evaporação em fase reversa ou desidratação e reidratação, visando a obtenção de maiores eficiências de encapsulação.
- Avaliação de outras composições lipídicas para a obtenção de melhores eficiências de encapsulação para os compostos estudados, uma vez que a composição pode alterar o empacotamento da bicamada e, conseqüentemente, a permeação dos fármacos durante a incorporação ativa.
- Estudo do efeito de variáveis operacionais como velocidade de injeção e taxa de agitação nas características finais das vesículas preparadas pelo método de injeção de etanol, visando a ampliação de escala.

- Avaliação da encapsulação em lipossomas de compostos utilizados no tratamento da Tuberculose multirresistente, como a kanamicina, composto passível de incorporação nas vesículas pela técnica de encapsulação ativa devido às suas características físico-químicas.

Capítulo VII

Referências Bibliográficas

- ADAMS, L.B.; SINHA, I.; FRANZBLAU, S.G.; KRAHENBUHL, J.L.; MEHTA, R.T. Effective Treatment of Acute and Chronic Murine Tuberculosis with Liposome-Encapsulated Clofazimine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, p.1638-1643, 1999.
- AEGIS - AIDS Education Global Information System. *Isoniazid*. Disponível em <<http://www.aegis.org/pubs/drugs/28.html>> Acesso em 21 nov, 2001 (a).
- AEGIS - AIDS Education Global Information System. *Pyrazinamid*. Disponível em <<http://www.aegis.org/pubs/drugs/29.html>> Acesso em 21 nov, 2001 (b).
- AEGIS - AIDS Education Global Information System. *Streptomycin sulfate*. Disponível em <<http://www.aegis.org/pubs/drugs/115.html>> Acesso em 21 nov, 2001 (c).
- AGARWAL, A.; KANDPAL, H.; GUPTA, H.P.; SINGH, N.B.; GUPTA, C.M. Tuftsin-Bearing Liposomes as Rifampin Vehicles in Treatment of Tuberculosis in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.38, p.588-593, 1994.
- AGGER, E.M.; ANDERSEN, P. Tuberculosis Subunit Vaccine Development: on role of interferon- γ . *Vaccine*, v.19, p.2298-2302, 2001.
- ALLEN, T.M.; RYAM, J.L.; PAPAHA DJOPOULOS, D. Gangliosides Reduce Leakage of Aqueous-Space Markers from Liposomes in the Presence of Human Plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.818, p.205-210, 1985.

- BARENHOLZ, Y.; CROMMELIN, D.A., Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms. In Swarbrick, J. e Boylan, J.C. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, v.9. Marcel Dekker Inc., New York, 1994. p.1-39.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.
- BATZRI, S.; KORN, E.D. Single Bilayer Liposomes Prepared Without Sonication. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.298, p.1015-1019, 1973.
- BERKOW, R. *Manual Merck de Medicina: Diagnóstico e Tratamento*. São Paulo: Rocca, 1989, p.126-141.
- BERMUDEZ, L.E. Use of Liposome Preparation to Treat Mycobacterial Infections. *Immunobiology*, v.191, n.4-5, p.578-583, 1994.
- BOX, G.E.P.; WETZ, J., Criteria for Judging Adequacy of Estimation by an Approximate Response Function. University of Wisconsin Technical Report. 9, 1973.
- BREWER, G.A. Isoniazid. In Florey, K. *Analytical Profiles of Drug Substances*. New York: Academic Press, 1977. p.185-238.
- BRIDGES, P.A.; TAYLOR, K.M.G. Nebulisers for the Generation of Liposomal Aerosols. *International Journal of Pharmaceutics*, v.173, p.117-125, 1998.
- BRIDGES, P.A.; TAYLOR, K.M.G. An Investigation of some of the Factors Influencing the Jet Nebulisation of Liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v.204, p.69-79, 2000.
- CHEN Jr, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. Microdetermination of Phosphorous. *Analytical Chemistry*, v.28, p.1756-1758, 1956.

- CONLEY, J.; YANG, H.; WILSON, T.; BLASETT, K.; DI NINNO, V.; SCHNELL, G.; WONG, J.P. Aerosol Delivery of Liposome-Encapsulated Ciprofloxacin: Aerosol Characterization and Efficacy against *Francisella tularensis* Infection in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 1288-1292, 1997.
- COSTA, C.A.M., *Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Ácido Azelaico, Bleomicina e 5-Fluorouracil para Aplicação na Terapia de Melanomas*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000. 113 p. Tese (Mestrado).
- CROMMELIN, D.J.A.; SCHREIER, H. Liposomes. In Kreuter, J. *Colloidal Drug Delivery Systems*. New York: Marcel Dekker Inc., 1994, p.73-191.
- DEOL, P.; KHULLER, G.K.; JOSHI, K. Therapeutic Efficacies of Isoniazid and Rifampin Encapsulated in Lung-Specific Stealth Liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* Infection Induced in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41, p.1211-1214, 1997.
- DEOL, P.; KHULLER, G.K. Lung Specific Stealth Liposomes: Stability, Biodistribution and Toxicity of Liposomal Antitubercular Drugs in Mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1334, p.161-172, 1997.
- 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.
- GABIZON, A.; PAPAHAJOPOULOS, D. The Role of Surface Charge and Hydrophilic Groups on Liposome Clearance in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1103, p.94-100, 1992.

- GANGADHARAM, P.R.J.; ASHTEKAR, D.A.; FLASHER, D.L.; DÜZGÜNES, N. Therapy of *Mycobacterium avium* Complex Infections in Beige Mice with Streptomycin Encapsulated in Sterically Stabilized Liposomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.39, p.725-730, 1995.
- GANGADHARAM, P.R.J.; ASHTEKAR, D.A.; GHORI, N.; GOLDSTEIN, J.A.; DEBS, R.J.; DÜZGÜNES, N. Chemotherapeutic Potential of Free and Liposome Encapsulated Streptomycin against Experimental *Mycobacterium avium* Complex Infections in Beige Mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.28, p.425-435, 1991.
- GILBERT, B.E.; WILSON, S.Z.; GARCON, N.M.; WYDE, P.R.; KNIGHT, V. Characterization and Administration of Cyclosporine Liposomes as a Small-particles Aerosol. *Transplantation*, v.56, p.974-977, 1993.
- HARAN, G.; COHEN, R.; BAR, L.K.; BARENHOLZ, Y. Transmembrane Ammonium Sulfate Gradients in Liposomes Produce Efficient and Stable Entrapment of Amphipathic Weak Bases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1151, p.201-215, 1993.
- ISRAELACHVILI, J., *Intermolecular Surface Forces*, 2ed., San Diego, 1994.
- ISRAELACHVILI, J.; MITCHELL, D.J., A Model for the Packing of Lipids in Bilayer Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.389, p.13-19, 1975.
- JUSTO, O.R., *Preparação e Caracterização de Lipossomas para a Administração por Inalação de Compostos Terapêuticos Utilizados na Terapia da Tuberculose*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. Tese (Mestrado).
- KLIBANOV, A.L.; MARUYAMA, K.; TORCHILIN, V.P.; HUANG, L. Amphipathic polyethyleneglycol effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Letters*, v.268, n.1, p.235-237, 1990.

- KRIFTNER, R.W., Liposome Production: The Ethanol Injection Technique and the Development of the First Approved Liposome Dermatic, in Korting, H.C.F; Braun, O. and Maibach, H.I - *Liposome Dermatics*. Munique, 1992, p. 91-100.
- LASIC, D.D. The Mechanism of Vesicle Formation. *Biochem. Journal*, v.256, p.1-11, 1988.
- LASIC, D.D. Liposomes: From Physics and Applications. Amsterdam: Elsevier Science Publishes, 1993.
- LEUNG, K.K.M.; BRIDGES, P.A.; TAYLOR, K.M.G. The Stability of Liposomes to Ultrasonic Nebulisation. *International Journal of Pharmaceutics*, v.145, p.95-102, 1996.
- LIMA, H.O.S. *Estudo da Encapsulação de Fármacos de Primeira Linha no Tratmento da Tuberculose em Lipossomas e Ciclodextrinas*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 173 p. Tese (Doutorado).
- LIMA, K.M.; BONATO, V.L.D.; FACCIOLO, L.H.; BRANDÃO, I.T.; SANTOS, S.A.; COELHO-CASTELO, A.A.M.; LEÃO, S.C.; SILVA, C.L. Comparison of Different Delivery System of Vaccination for the Induction of Protection against Tuberculosis in Mice. *Vaccine*, v.19, p.3518-3525, 2001.
- MADDEN, T.D.; HARRIGAN, P.R.; TAI, L.C.L.; BALLY, M.B.; MAYER, L.D.; REDELMEIER, T.E.; LOUGHREY, H.C.; TILCOCK, C.P.S.; REINISH, L.W.; CULLIS, P.R. The Accumulation of Drugs within Large Unilamellar Vesicles Exhibiting a Proton Gradient: a Survey. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.53, p.37-46, 1990.
- MAURER-SPUREJ, E.; WONG, K.F.; MAURER, N.; FENSK, D.B.; CULLIS, P.R. Factors Influencing Uptake and Retention of amino-containing Drugs in Large Unilamellar Vesicles Exhibiting Transmembrane pH gradients. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1416, p.1-10, 1999.

- McCALLION, O.N.M.; TAYLOR, K.M.G.; BRIDGES, P.A.; THOMAS, M; TAYLOR, A.J. Jet Nebulisers for Pulmonary Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.130, p.1-11, 1996.
- MAYER, L.D.; BALLY, M.B.; HOPE, M.J.; CULLIS, P.R. Techniques for Encapsulating Bioactive Agents into Liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.40, p.333-345, 1986.
- MAYER, L.D.; TAI, L.C.L.; BALLY, M.B.; MITILENES, G.N.; GINSBERG, R.S.; CULLIS, P.R. Characterization of Liposomal Systems Containing Doxorubicin Entrapped in Response to pH Gradients. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1025, p.143-151, 1990.
- MAYER, L.D.; MADDEN, T.D.; BALLY, M.B.; CULLIS, P.R. pH Gradient-mediated Drug Entrapment in Liposomes. In Gregoriadis, G., *Liposome Technology*, v.II, Boca Raton: CRC Press Inc., 1993, p.27-45.
- MAYER, L.D.; REAMER, J.; BALLY, M.B. Intravenous Pretreatment with Empty pH Gradient Liposomes Alters the Pharmacokinetics and Toxicity of Doxorubicin through In Vivo Active Drug Encapsulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.88, p.96-102, 1999.
- MELO, M.F. SP Lidera o *Ranking* de Casos de Tuberculose no País. *O Estado de São Paulo*, São Paulo, Julho, 1999.
- METHA, R.T.; KEYHANI, A.; MCQUEEN, T.J.; ROSENBAUM, B.; ROLSTON, K.V.; TARRAND, J.J. *In Vitro* Activities of Free and Liposomal Drugs against *Mycobacterium avium* - *M. intracellulare* Complex and *M. tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.37, p.2584-2587, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Normas para o Controle da Tuberculose. *Jornal de Pneumologia*, v.23, n.6, p. 281-293, 1997.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Programas e Projetos*. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/programas/Tuberculose/intro.html>> Acesso em 21 jun, 2001.
- NEW, R.R.C. *Liposomes: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 1990.
- OH, Y.K.; NIX, D.E.; STRAUBINGER, R.M. Formulation and Efficacy of Liposome-Encapsulated Antibiotics for Therapy of Intracellular *Mycobacterium avium* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.39, p.2104-2111, 1995.
- OSTRO, M.J. Liposomes. *Scientific American*, v.256, n.1, p 90-99, 1987.
- PERUGINI, P.; PAVANETTO, F. Liposomes containing boronophenylalanine for boron neutron Capture Therapy. *Journal of Microencapsulation*, v.15, p.473-483, 1998.
- POWERS, J.D.; KILPATRICK, P.K.; CARBONEL, R.G. Trypsin Purification by Affinity Binding to Small Unilamellar Liposomes. *Biotechnology and Bioengineering*, v.36, p.506-519, 1990.
- RIBAS, A.M. *Estudo da Estabilidade de Bicamadas Lipídicas em Presença de Tensoativos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1997. 98 p. Tese (Mestrado).
- ROUHI, A.M. Tuberculosis: a Tough Adversary. *Chemical & Engineering News*, p.52-69, maio, 1999.
- SECRETARIA DE SAÚDE DE CAMPINAS. Informe Epidemiológico - Dia Nacional de Combate à Tuberculose. Prefeitura Municipal de Campinas. Campinas, Novembro, 1998.
- SUNTRES, Z.E.; SHEK, P.N. Liposomes Promote Pulmonary Glucocorticoid Delivery. *Journal of Drug Targeting*, v.6, p.175-182, 1998.

TALSMA, H.; CROMMELIN, D.J.A. Liposomes as Drug Delivery System, Part 1: Preparation. *BioPharm.* Outubro, 1992.

TAYLOR, K.M.G.; McCALLION, O.N.M. Ultrasonic Nebulisers for Pulmonary Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.153, p.93-104, 1997.

TAYLOR, K.M.G.; NEWTON, J.M. Liposomes for Controlled Delivery of Drugs to the Lung. *Thorax*, v.47, p.257-259, 1992.

THE MERCK INDEX: AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS DRUGS AND BIOLOGICALS, 11ed. New Jersey: Rahway, 1989.

THOMAS, D.A.; MYERS, M.A.; WICHERT, B.; SCHREIER, H.; GONZALEZ-ROTHI, R.J. Acute Effects of Liposome Aerosol Inhalation on Pulmonary Function in Healthy Human Volunteers. *Chest*, v.99, p.1268-1270, 1991.

UEHARA, C.; SANTORO, I.L. Tuberculose Pulmonar e Tuberculose Pleural. Em *Atualização Terapêutica: Manual Prático de Diagnóstico e Tratamento / por um grupo de colaboradores especializados*. São Paulo: Artes Médicas, 1999, p.128-135.

WALDREP, J.C.; ARPPE, J.; JANSÁ, K.A.; VIDGREN, M. Experimental Pulmonary Delivery of Cyclosporin A by Liposome Aerosol. *International Journal of Pharmaceutics*, v.160, p.239-249, 1998.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION - Tuberculosis, *Fact Sheet*, n.104, April, 2000.

WOODLE, M.C.; LASIC, D.D. Sterically Stabilized Liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1113, p.171-199, 1992.

WOODLE, M.C.; COLLINS, L.R.; SPONSLER, E.; KOSSOVSKY, N.;
PAPAHADJOPOULOS, D.; MARTIN, F.J. Sterically Stabilized Liposomes:
Reduction in Electrophoretic Mobility but not Eletrostatic Surface Potential.
Biophysical Journal, v.61, p.902-910, 1992.

Anexo I:

Tabelas de Desvios dos Planejamentos Experimentais

Os desvios dos valores de eficiências preditos por um modelo em relação aos valores observados experimentalmente foram calculados pela seguinte equação:

$$d(\%) = \left(\frac{E_{\text{predita}} - E_{\text{observada}}}{E_{\text{observada}}} \right) \times 100 \quad (\text{A.1})$$

onde: d = desvio

E = eficiência de encapsulação

As Tabelas A.1, A.2 e A.3 apresentam os desvios entre os valores de eficiências de encapsulação preditos pelo modelo e observados experimentalmente nos planejamentos da isoniazida, pirazinamida e estreptomicina, respectivamente.

Tabela A.1: Valores de desvios e de eficiências de encapsulação preditas e observadas experimentalmente no planejamento experimental realizado para a incorporação de isoniazida em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Ensaio	(F/L) _{inicial}	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Eficiência Observada (%)	Eficiência Predita (%)	Desvio (%)
1	0,2	25	10	4,6	3,9	15,5
2	2,0	25	10	1,1	0,4	64,2
3	0,2	60	10	18,1	19,6	8,3
4	2,0	60	10	1,2	1,1	11,5
5	0,2	25	60	4,5	3,9	13,6
6	2,0	25	60	1,1	0,4	64,2
7	0,2	60	60	22,5	19,6	12,9
8	2,0	60	60	2,3	1,1	53,8
9	1,1	42,5	35	2,6	6,2	139,9
10	1,1	42,5	35	4,4	6,2	41,8

Tabela A.2: Valores de desvios e de eficiências de encapsulação preditas e observadas experimentalmente no planejamento experimental realizado para a incorporação de pirazinamida em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Ensaio	(F/L) _{inicial}	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Eficiência Observada (%)	Eficiência Predita (%)	Desvio (%)
1	0,2	25	10	0,0	1,9	-
2	2,0	25	10	0,0	-0,8	-
3	0,2	60	10	15,8	14,9	5,7
4	2,0	60	10	0,8	0,13	84,4
5	0,2	25	60	5,5	1,9	65,4
6	2,0	25	60	0,0	-0,8	-
7	0,2	60	60	15,7	14,9	5,1
8	2,0	60	60	1,2	0,13	89,6
9	1,1	42,5	35	0,0	4,0	-
10	1,1	42,5	35	1,3	4,0	209,5

Tabela A.3: Valores de desvios e de eficiências de encapsulação preditas e observadas experimentalmente no planejamento experimental realizado para a incorporação de estreptomicina em lipossomas extrudados de SPC:Col.

Ensaio	(F/L) _{inicial}	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Eficiência Observada (%)	Eficiência Predita (%)	Desvio (%)
1	0,18	25	10	0,0	-0,9	-
2	1,76	25	10	0,0	-1,0	-
3	0,18	60	10	21,0	20,2	4,0
4	1,76	60	10	1,9	1,0	49,7
5	0,18	25	60	10,9	10,2	6,1
6	1,76	25	60	0,0	-0,6	-
7	0,18	60	60	9,8	9,1	7,5
8	1,76	60	60	1,1	0,5	51,8
9	0,97	42,5	35	2,4	4,8	100,5
10	0,97	42,5	35	1,0	4,8	381,3