

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração Desenvolvimento de Processos  
Biotecnológicos

***Projeto, Montagem e Operação de Instalação  
para a Produção Escalonável de Lipossomas  
Visando Aplicações Farmacêuticas***

**Autor**

*Eng. Amós Luciano Carneiro*

**Orientadora**

*Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana*

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

Campinas / São Paulo  
Setembro 2003

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

C215p Carneiro, Amós Luciano  
Projeto, montagem e operação de instalação para a  
produção escalonável de lipossomas visando aplicações  
farmacêuticas / Amós Luciano Carneiro.--Campinas,  
SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Filmes finos. 2. Adsorção. 3. Camada dupla de  
lipídios-Biotecnologia. 4. Simulação (Computadores).  
I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia  
Química. III. Título.









Dedico este trabalho antes de tudo a DEUS pelo supremo dom da vida,  
à minha mãe Creuza, pelo amor e carinho dispensados durante  
toda a minha vida, e a toda a minha família pelo  
incentivo e por entenderem minha  
ausência.



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana pela orientação segura e amizade adquirida durante os dois anos do Mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr. César Costapinto Santana por ter disponibilizado o uso do seu laboratório e pela contribuição dada na escrita da monografia.

Agradeço ao Dr. Paulo de Tarso Hennies pelas excelentes contribuições dadas no Exame de Qualificação.

Agradeço a todos os professores da Faculdade de Engenharia Química e da Área de Concentração Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, pelos conhecimentos adquiridos e pela experiência transmitida, em especial à Profa. Dra. Ana Maria Frattini Fileti pela sua atuação junto à CAPES para liberação da minha bolsa de Mestrado.

Agradeço em especial ao técnico do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Gilson Barbosa Maia Jr., pela dedicação e presteza em resolver os problemas e pela amizade.

Agradeço a todos os colegas da Unicamp e em especial aos colegas do LDPB, Adriano, Ana Paula, Bérigson, Christiane, Cláudia, Classius, Elaine, Fernanda, Giuliana, Juliana, Lucimara, Raquel, Reinaldo e Tatiana, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

Agradeço ao Sr. Moacir Vicentin pela confecção do sistema multitubular utilizado nos experimentos.

Agradeço, por fim, à CAPES pela bolsa pessoal sem a qual não seria possível a execução do trabalho e à FAPESP pelo auxílio à pesquisa que possibilitou o desenvolvimento do projeto.



## RESUMO

Neste trabalho foi feito o projeto, montagem e caracterização de uma instalação escalonável para a produção de lipossomas e o estudo da influência de parâmetros operacionais nas características dos lipossomas obtidos. A instalação é constituída de quatro sistemas básicos: alimentação e drenagem de solução lipídica, alimentação e recirculação de solução aquosa, produção de vácuo e sistema multitubular, para adsorção dos lipídios e formação dos lipossomas, composto por um feixe de tubos de vidro paralelos, posicionado no interior de uma coluna que permite a circulação de água para controle de temperatura. Pela hidratação de filmes lipídicos secos, formados no interior dos tubos foram produzidos os lipossomas, caracterizados quanto ao teor de fosfolipídios, diâmetro médio e a estabilidade na presença de tensoativo. A capacidade dos lipossomas para encapsulação de ativos foi avaliada utilizando o tuberculostático Pirazinamida. Foi feito o acompanhamento da cinética de formação dos lipossomas e a modelagem matemática desta cinética usando modelo que considera a penetração e dissolução do filme lipídico simultâneas à formação dos lipossomas. Os resultados obtidos demonstram que a instalação montada é de fácil operação e permite a produção contínua de lipossomas. A adsorção de fosfolipídios em diferentes concentrações produz a formação de um filme delgado adequado para a hidratação e formação dos lipossomas. A hidratação destes filmes lipídicos delgados formou uma população heterogênea de lipossomas com diâmetro médio variando entre 800 e 2000 nm, dependendo da concentração inicial da dispersão lipídica. A eficiência de incorporação da Pirazinamida nas vesículas atingiu 14% quando o fármaco foi adicionado na solução de hidratação. Os testes de estabilidade e liberação do fármaco mostraram que as vesículas formadas possuem um empacotamento denso e demonstraram a propriedade de barreira característica da bicamada lipídica. A modelagem da cinética de formação dos lipossomas demonstrou que o modelo utilizado conseguiu representar satisfatoriamente os dados experimentais.

**Palavras Chave:** Lipossomas, Escalonamento, Pirazinamida, Modelagem Computacional



## ABSTRACT

In this work we proposed the project, construction and characterization of a set-up able to scaling-up for liposome production and the study of the influence of the operational parameters on the liposomes production. The system is composed by four basic parts: feeding and draining of lipid solution, feeding and circulation of aqueous hydration solution, glass multitubular set for adsorption and hydration of lipids, connected to vacuum pump and thermal jacket for temperature control. Liposomes were produced by hydration of the thin lipid film adsorbed inside the glass tubes. The vesicles were characterized by their phospholipid contents, mean diameter and size distribution and stability in the presence of surfactants. The capacity of liposomes for encapsulation of active compounds was evaluated using the tuberculostatic Pyrazinamide. The kinetic behavior of liposome formation was monitored by absorbance of the dispersion and mean diameter of particles. A mathematical model considering the penetration of water, dissolution of the lipid film and simultaneous vesiculation was proposed to describe kinetic of liposome formation. The results demonstrated the operational versatility of the constructed set-up to continuous liposome production. The hydration of the lipid films formed at different concentrations produced liposomes with a mean diameter in the range of 800 to 2,000 nm. The maximum efficiency of Pyrazinamide incorporation was 14%, obtained when the drug was added to hydration solution. The stability profiles in the presence of surfactants, as well as the gradual drug delivery, showed the barrier properties of the lipid bilayer and dense packing of the membrane. The mathematical model for the kinetic of liposome formation is in good agreement with the experimental data.

**Keywords:** Liposomes, Scaling-up, Pyrazinamide, Mathematical modeling



## SUMÁRIO

<b>Assunto</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XXI</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>XXV</b>
<b>ABREVIACÕES .....</b>	<b>XXVII</b>
<b>NOMENCLATURA.....</b>	<b>XXIX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>5</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Considerações Gerais sobre Lipossomas.....</b>	<b>7</b>
3.1.1. Estrutura .....	7
3.1.2. Classificação.....	10
3.1.3. Aplicações .....	12
<b>3.2. Métodos de Preparação.....</b>	<b>13</b>
3.2.1. Métodos Tradicionais .....	13

3.2.1.1. Métodos de Incorporação de Bioativos .....	16
3.2.2. Métodos Escalonáveis .....	17
3.2.3. Método da Hidratação de Estruturas Lipídicas Secas .....	19
3.2.4. Fatores Envolvidos na Produção de Lipossomas em Escala Industrial.....	20
3.2.4.1. Matérias Primas .....	21
3.2.4.2. Processo .....	21
3.2.4.2.1. Mistura.....	22
3.2.4.2.2. Separação.....	22
3.2.4.2.3. Hidratação.....	23
3.2.4.2.4. Homogeneização .....	24
3.2.4.2.5. Esterilização .....	24
3.2.4.2.6. Estabilização.....	24
3.2.4.3. Controles.....	25
<b>3.3. Formação dos Lipossomas .....</b>	<b>25</b>
3.3.1. Aspectos Termodinâmicos .....	26
3.3.1.1. Condições para a Formação de Agregados.....	28
3.3.1.2. Estruturas Complexas.....	31
3.3.1.3. O Fator de Empacotamento .....	32
3.3.2. Aspectos Cinéticos .....	33
3.3.2.1. Forças Intramembrana .....	34
3.3.2.2. Forças Intermembranas .....	34
3.3.2.3. Mecanismos de Formação .....	35
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Material .....</b>	<b>39</b>
4.1.1. Equipamentos .....	40
<b>4.2. Métodos .....</b>	<b>40</b>
4.2.1. Caracterização do Fosfolipídio.....	40
4.2.2. Adsorção dos Fosfolipídios em Filme Delgado .....	41
4.2.2.1. Adsorção em um Único Tubo.....	41

4.2.2.1.1. Adsorção dos Fosfolipídios em Batelada .....	41
4.2.2.1.2. Adsorção Contínua de Fosfolipídios .....	43
4.2.2.1.3. Quantificação dos Fosfolipídios .....	43
4.2.2.1.4. Planejamento Experimental para Adsorção Contínua de Fosfolipídios ...	44
4.2.2.2. Adsorção de Fosfolipídios em Sistema Multitubular .....	45
4.2.2.2.1. Adsorção Contínua de Fosfolipídios .....	46
4.2.2.2.2. Adsorção de Fosfolipídios em Batelada .....	46
4.2.2.2.3. Comparação dos Lipossomas Produzidos a Partir de Filmes Depositados por Adsorção Contínua e em Batelada .....	47
4.2.2.2.4. Cinética de Adsorção do Fosfolipídio .....	48
4.3.3. Produção de Lipossomas .....	48
4.3.3.1. Cinética de Formação dos Lipossomas .....	48
4.3.3.1.1. Influência da Vazão de Circulação na Formação dos Lipossomas .....	49
4.3.3.1.2. Influência da Adição de Colesterol na Formação dos Lipossomas .....	49
4.3.3.2. Caracterização dos Lipossomas .....	50
4.3.3.2.1. Teor de Fosfolipídios .....	50
4.3.3.2.2. Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanhos .....	50
4.3.3.2.3. Estabilidade de Lipossomas em Presença de Tensoativo não Iônico .....	50
4.3.4. Encapsulação de Pirazinamida em Lipossomas .....	51
4.3.4.1. Adição de Pirazinamida na Solução de Hidratação .....	52
4.3.4.2. Adição de Pirazinamida no Filme Lipídico .....	52
4.3.4.3. Determinação da Eficiência de Encapsulação da Pirazinamida .....	53
4.3.5. Liberação da Pirazinamida Encapsulada nos Lipossomas .....	53
4.3.5.1. Modelo de Difusão de Solute em Esferas Sólidas .....	54
4.3.5.2. Determinação dos Parâmetros do Modelo de Difusão de Solute em Esferas Sólidas Utilizando-se o Método da Máxima Verossimilhança .....	57
4.3.6. Modelagem da Cinética de Formação dos Lipossomas .....	59
4.3.6.1. Construção do Modelo de Formação de Lipossomas a Partir de um Filme Lipídico Seco Depositado sobre uma Superfície de Vidro .....	62

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....** **65**

### **5.1. Projeto .....** **65**

5.1.1. Concepção do Processo .....	65
5.1.2. Projeto do Sistema Multitubular.....	67
5.1.3. Especificação dos Equipamentos .....	68
<b>5.2. Adsorção dos Fosfolipídios em Filmes Delgados .....</b>	<b>69</b>
5.2.1. Adsorção em um Único Tubo.....	69
5.2.1.1. Adsorção de Fosfolipídios em Batelada .....	70
5.2.1.2. Adsorção Contínua dos Fosfolipídios .....	73
5.2.1.3. Planejamento Experimental para a Adsorção Contínua de Fosfolipídios .....	78
5.2.2. Adsorção de Fosfolipídios em Sistema Multitubular .....	79
5.2.2.1. Comparação dos Modos de Operação Batelada e Contínuo.....	79
5.2.2.2. Caracterização dos Filmes Delgados.....	81
5.2.2.3. Cinética de Adsorção dos Fosfolipídios .....	83
5.2.2.4. Isotherma de Adsorção .....	84
<b>5.3. Produção de Lipossomas.....</b>	<b>85</b>
5.3.1. Cinética de Formação dos Lipossomas .....	85
5.3.1.1. Influência da Vazão de Circulação na Formação dos Lipossomas .....	89
5.3.1.2. Influência da Adição de Colesterol na Formação dos Lipossomas .....	91
<b>5.4. Encapsulação de Pirazinamida nos Lipossomas.....</b>	<b>92</b>
5.4.1. Determinação da Eficiência de Encapsulação de Pirazinamida .....	93
<b>5.5. Liberação de Pirazinamida Encapsulada nos Lipossomas .....</b>	<b>94</b>
5.5.1. Aplicação do Modelo de Difusão de Sólido em Esferas de Sólido.....	95
<b>5.6. Estabilidade de Lipossomas em Presença de Tensoativo não Iônico.....</b>	<b>96</b>
<b>5.7. Modelagem da Cinética de Formação de Lipossomas .....</b>	<b>97</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>105</b>
<b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>107</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>109</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>113</b>
<b>Anexo I - Curva de Calibração para Quantificação de Fosfato .....</b>	<b>113</b>
<b>Anexo II - Curva de Calibração para Quantificação de Fosfolipídios em Solução Aquosa .....</b>	<b>114</b>
<b>Anexo III - Curva de Calibração para Determinação de Pirazinamida Encapsulada em Lipossomas .....</b>	<b>115</b>
<b>Anexo IV - Curva de Calibração para Determinação de Pirazinamida não Encapsulada .....</b>	<b>116</b>
<b>Anexo V - Modelo da Difusão de Solutos no Interior de Esferas Porosas.....</b>	<b>117</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1- Estrutura de uma molécula de fosfatidilcolina. ....	8
Figura 2 - Representação das possíveis localizações de moléculas na estrutura de lipossomas (Adaptado de LASIC, 1993).....	9
Figura 3 - Esquema geral dos processos de produção de lipossomas (Adaptado de REDZINIAK <i>et al.</i> , 1995).....	21
Figura 4 – Variação da concentração de monômeros em solução e de agregados acima e abaixo da concentração micelar crítica.....	29
Figura 5 - Estruturas formadas a partir de anfífilicos com diferentes valores de fator de empacotamento (Adaptado de ISRAELACHVILI <i>et al.</i> , 1992). ....	33
Figura 6 - Representação do mecanismo de formação de MLV's pela hidratação de filmes lipídicos secos. As linhas indicam bicamadas de fosfolipídios. Lado (a): mecanismo baseado na hidratação das cabeças, lado (b): mecanismo de bicamadas interconectadas. As setas em 2a e 3b indicam a direção preferencial de migração das moléculas lipídicas (Adaptado de LASIC, 1993).....	36
Figura 7 – Molécula de Pirazinamida. (a) Fórmula empírica e massa molécula e (b) fórmula estrutural. ....	51
Figura 8 –Representação unidimensional da penetração de líquido e da dissolução do filme lipídico seco.....	62
Figura 9 - Fluxograma do processo de formação de lipossomas a partir de estruturas lipídicas secas produzidas no interior de um sistema multitubular. ....	66
Figura 10 - Cortes frontal e lateral no sistema multitubular, mostrando as partes do sistema e os seus materiais de construção. ....	68

- Figura 11 - Perfis de massa adsorvida por unidade de comprimento característico do tubo, para ensaios em batelada, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios e do diâmetro interno dos tubos. (a) média dos valores obtidos para tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) médias com suas respectivas barras de erro. .... 71
- Figura 12 - Perfis de porcentagem mássica adsorvida, nos ensaios em batelada, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios e do diâmetro interno dos tubos. (a) média dos valores obtidos para tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) médias com suas respectivas barras de erro. .... 72
- Figura 13 - Perfis de massa total adsorvida, em ensaio contínuo, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios e do número de Reynolds. (a) médias dos tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) médias dos tempos com suas respectivas barras de erro. .... 75
- Figura 14 -Perfis de massa total adsorvida por unidade de área superficial interna dos tubos, em ensaio contínuo, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios e do número de Reynolds. (a) médias dos tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) médias dos tempos com as suas respectivas barras de erro..... 76
- Figura 15 - Perfis da porcentagem mássica adsorvida, em ensaio contínuo, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios e do número de Reynolds. (a) médias dos tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) média dos tempos com as suas respectivas barras de erro. .... 77
- Figura 16 - Gráficos de Pareto (a) e (b) e superfícies de resposta (c) e (d), para as variáveis resposta massa adsorvida e massa adsorvida por área respectivamente..... 78
- Figura 17 - Fotografias do Sistema Multitubular e da Instalação para Produção de Lipossomas. .... 79
- Figura 18 - Fotografia dos filmes de fosfolipídios formados no interior dos tubos de vidro nos ensaios, corados com solução de safranina 0,1 M, de adsorção. (a) adsorção em modo contínuo e (b) adsorção em modo batelada. .... 83
- Figura 19 - Massa adsorvida nos tubos de vidro em função do tempo de circulação da solução lipídica. .... 84

Figura 20 - Isotherma de Adsorção de Fosfolipídios na Parede de Tubos de Vidro.....	85
Figura 21 - Evolução da absorbância da dispersão a 340 nm com o tempo para diferentes concentrações iniciais da solução de adsorção. ....	86
Figura 22 – Evolução do diâmetro médio das vesículas com o tempo para diferentes concentrações iniciais da solução de adsorção. ....	87
Figura 23 – Evolução da concentração de fosfolipídios na dispersão aquosa com o tempo para diferentes concentrações iniciais de adsorção. ....	88
Figura 24 – Influência da vazão de circulação nas propriedades dos lipossomas produzidos: (a) absorbância da dispersão a 340 nm, (b) diâmetro médio das vesículas e (c) concentração de fosfolipídios na dispersão. ....	90
Figura 25 - Influência da adição de colesterol nas propriedades dos lipossomas produzidos: (a) absorbância da dispersão a 340nm, (b) diâmetro médio das vesículas e (c)concentração de fosfolipídios na dispersão.....	91
Figura 26 - Influência da Pirazinamida encapsulada nas propriedades dos lipossomas produzidos: (a) absorbância a 340 nm, (b) diâmetro médio das vesículas e (c) concentração de fosfolipídios na dispersão. Pz1 - Pirazinamida incorporada conforme procedimento 1, Pz2 - Pirazinamida incorporada conforme procedimento 2. ....	93
Figura 27 - Liberação de Pirazinamida Encapsulada nos Lipossomas. (a) Pirazinamida encapsulada a partir de adição na solução de hidratação e (b) Pirazinamida encapsulada a partir de adição no filme lipídico seco. (● e ■) pontos experimentai, (—) dados do modelo.....	95
Figura 28 –Resultados da absorbância a 340 nm em função da porcentagem de tensoativo C <sub>12</sub> E <sub>5</sub> contido nos lipossomas.....	97
Figura 29 - Determinação dos parâmetros da equação de concentração de vesículas em função do tempo a partir dos dados de absorbância a 340 nm. ....	98
Figura 30 – Resultados obtidos para a massa adsorvida com o tempo para as concentrações estudadas, valores experimentais e obtidos pelo modelo.(a) 127 mM, (b) 85 mM, (c) 60 mM, (d) 40 mM, (e) 20 mM e (f) 5 mM.....	101

Figura 31 – Resultados obtidos para a variação do comprimento do filme lipídico penetrado pelo líquido ( $L_p$ ) e do comprimento do filme lipídico dissolvido ( $L_d$ ) com o tempo, para as concentrações estudadas. (a) 127 mM, (b) 85 mM, (c) 60 mM, (d) 40 mM, (e) 20 mM e (f) 5 mM. ....	102
Figura 32 - Curva de Calibração do Método de Stewart. ....	113
Figura 33 - Curva de Calibração do Método de Quantificação de Fosfato de CHEN. ....	114
Figura 34 - Curva de Calibração para Determinação de Pirazinamida após Incubação com Álcool. ....	115
Figura 35 - Curva de Calibração para Determinação de Pirazinamida sem Incubação com Álcool. ....	116
Figura 36 -Modelo físico de difusão de solutos no interior de esferas sólidas.....	117

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos principais métodos de preparação de lipossomas (Adaptação de VILLANOVA e CONSIGLIERI, 2001). .....	15
Tabela 2 - Níveis das variáveis usadas no planejamento fatorial. ....	45
Tabela 3 - Matriz de planejamento para a avaliação da influência do diâmetro interno dos tubos, concentração e tempo de contato na adsorção de fosfolipídios em batelada. ....	45
Tabela 4 - Velocidade do Escoamento e Número de Reynolds calculados para os diâmetros internos estudados. ....	74
Tabela 5 - Resultados da adsorção de fosfolipídios em sistema multitubular realizada em modo contínuo e em batelada. ....	80
Tabela 6 - Resultados da eficiência de encapsulação de Pirazinamida. ....	93
Tabela 7 - Constante k do modelo difusivo e coeficiente de permeabilidade P para as vesículas lipídicas .....	96
Tabela 8 – Propriedades físico-químicas utilizados na modelagem da formação dos lipossomas. ....	98
Tabela 9 - Valores de $K_t$ , $K_t'$ , $K_v$ e $K_{ext}$ obtidos para as concentrações estudadas. ....	100
Tabela 10 - Valores dos parâmetros ajustados utilizados na simulação da formação dos lipossomas. ....	100
Tabela 11 – Espessura do filme lipídico seco obtido pela modelagem da cinética de formação dos lipossomas para cada uma das concentrações estudadas. ....	103



## ABREVIações

CMC: Concentração Micelar Crítica

MLV: Vesícula Multilamelares

SUV: Vesícula Unilamelar Pequena

LUV: Vesícula Unilamelar Grande

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

PEG: Polietilenoglicol

DRV: Vesícula Desidratada/Rehidratada

TLC: Cromatografia de Camada Delgada

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance

DSPC: Diestearoil Fosfatidilcolina

DPPC: Dipalmitoil Fosfatidilcolina

UV: ultravioleta

QLS: Quase Elastic Light Scattering (Espalhamento de Luz Dinâmico)

HEPES: N-(2-Hidroxiethyl)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)

He: Helio

Ne: Neônio

C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>: dodecil-(pentaetilen)-glicol

Pz: Pirazinamida

MIC: Concentração Inibitória Mínima



## NOMENCLATURA

$T_c$ : Temperatura de Transição da Fase Gel para a Fase Líquido Cristalina

$m_{ads}$ : massa total adsorvida

$V_{extração}$ : volume utilizado para extração dos fosfolipídios dos tubos de vidro

$C_{solução}$ : concentração da solução após extração dos fosfolipídios dos tubos de vidro

$D_{int}$ : Diâmetro interno dos tubos de vidro

$h$ : Comprimento Característico

%Adsorção: Percentagem mássica adsorvida

$C_{inic}$ : Concentração inicial da dispersão de fosfolipídio em etanol

$L$ : Comprimento dos Tubos de Vidro

$N$ : número de agregação

$\mu_N$ : potencial químico de molécula em um agregado de número de agregação  $N$

$\mu_N^0$ : potencial químico padrão de molécula em um agregado de número de agregação  $N$

$X_N$ : concentração de moléculas em um agregado de número de agregação  $N$

$P$ : fator de empacotamento

$n_T$ : número total de moles de tensoativo

$n_L$ : número total de moles de lipídio

$F_0$ : concentração fármaco inicial

$F_F$ : concentração de fármaco final

$L_0$ : concentração de lipídios inicial

$L_F$ : concentração de lipídios final

xxx

$\theta$ : ângulo de contato do líquido com o sólido

$\eta$ : viscosidade do líquido

$\sigma$ : tensão superficial do líquido

D: difusividade do fosfolípido no líquido

$\rho$ : massa específica do sólido

$\varepsilon$ : porosidade do sólido

$\tau$ : tortuosidade do sólido

$d_H$ : diâmetro hidráulico dos poros do sólido

$S_0$ : superfície externa total do sólido

K: constante de penetração

$K_{ext}$ : constante de transferência de massa externa

$S_{ext}$ : área externa do sólido

$K_{int}$ : constante de transferência de massa interna

$S_{int}$ : área interna do sólido

v: velocidade do líquido

l: comprimento característico da transferência de massa

$C_s$ : concentração de fosfolípidios próxima à superfície do sólido

$C_{ext}$ : concentração de fosfolípidios no meio líquido externo

$k_d$ : coeficiente de transferência de massa

Sh: Número de Sherwood

Re: Número de Reynolds

Sc: Número de Schmidt

m: massa dissolvida

t: tempo

$L_p$ : comprimento do filme lipídico penetrado pelo líquido

$L_d$ : comprimento do filme lipídico dissolvido

$K_v$ : constante da taxa de formação de vesículas

$C_v$ : concentração de vesículas

$D_H$ : diâmetro hidrodinâmico

$e$ : espessura da bicamada lipídica

$a_{PL}$ : área média das moléculas de lipídios que compõem o lipossoma



## 1. INTRODUÇÃO

Os lipossomas ou vesículas de fosfolípidios tiveram suas propriedades e potenciais aplicações descritas por Alec Bangham em meados dos anos 1960 (BANGHAM *et al.*, 1965). Devido ao grande número de aplicações dos lipossomas em diversos campos, em especial na área médico-farmacêutica, estas vesículas têm despertado interesse crescente da comunidade científica.

As estruturas lipossomais têm forma aproximadamente esférica e são compostas de molécula de fosfolípidios que se agregam na forma de bicamada, delimitando um volume aquoso central (NEW, 1990). As vesículas de fosfolípidios se formam em solução aquosa, quando a concentração de espécies anfífilicas atinge o valor da CMC, no sentido de minimizar as interações entre as moléculas de água e as cadeias hidrocarbônicas dos fosfolípidios, e maximizar as interações das cadeias hidrocarbônicas entre si e das moléculas de água com os grupos de cabeça hidrofílicos dos fosfolípidios. Podem ser classificadas tanto com relação ao seu tamanho e lamelaridade, quanto ao seu comportamento frente aos fluidos biológicos. Com relação ao tamanho e número de lamelas os lipossomas podem ser classificados em vesículas multilamelares (MLV) e vesículas unilamelares pequenas e grandes (SUV e LUV). Com relação ao seu comportamento frente a fluidos biológicos os lipossomas podem ser convencionais, estericamente estabilizados ou “stealth”, imunolipossomas ou polimórficos (LASIC, 1997).

Duas das principais aplicações dos lipossomas são o estudo de membranas biológicas e a liberação controlada de fármacos. Na primeira aplicação eles são úteis devido à sua semelhança estrutural e em composição com as membranas biológicas. A segunda aplicação decorre da permeabilidade seletiva da bicamada e da sua habilidade de poder abrigar tanto moléculas de caráter hidrofóbico, quanto de hidrofílico e anfílico, seja no volume aquoso central ou no interior da bicamada lipídica. Essas características, aliadas à sua biocompatibilidade, além da maior interação com as células devido à semelhança em

---

estrutura e composição, fazem dos lipossomas um dos principais veículos para administração de fármacos da medicina moderna (LASIC, 1993).

Devido ao grande número de aplicações dos lipossomas em diferentes áreas, como exemplo a área farmacêutica, foram desenvolvidos diversos métodos de produção, específicos para uma determinada aplicação.

Embora sejam promissoras as aplicações dos lipossomas como veículos para liberação controlada de fármacos, atualmente o desenvolvimento de produtos lipossomais ainda é pequeno, devido principalmente à carência de métodos de produção que sejam aplicáveis na indústria, atendendo às exigências de esterilidade, estabilidade e possibilidade de escalonamento, além da necessidade de serem reprodutíveis, simples e econômicos (BARENHOLZS e LASIC, 1996).

Dentre os métodos escalonáveis citam-se a produção de lipossomas por injeção de etanol, a secagem de lipídios por atomização, ou “spray-drying”, e o método de desidratação por liofilização/hidratação. Métodos convencionais aplicados em escala industrial envolvem a microfluidização da dispersão lipídica e a diluição de soluções concentradas de fosfolipídios (KIKUCHI *et al.*, 1991; GREGORIADIS, 1993, WAGNER *et al.*, 2002, SORGI e HUANG, 1996, PERRETT, 1991).

À semelhança do método laboratorial de Bangham, no qual os lipossomas são formados a partir da hidratação de filmes secos de lipídios, TOURNIER *et al.*, 1999 desenvolveu um método escalonável, com o filme seco formado no interior de um feixe de tubos paralelos. Em condições operacionais adequadas, o processo também possibilita a obtenção de estruturas lipídicas expandidas no interior dos tubos, as quais por serem porosas e apresentarem alta superfície de contato com a solução aquosa de hidratação, possibilitam altas eficiências de encapsulação de bioativos.

Este trabalho consiste no projeto, montagem e operação de instalação passível de esterilização e escalonamento, para o estudo da produção de lipossomas com base no processo proposto por TOURNIER *et al.*, 1999. Filmes secos delgados foram formados em diferentes condições, avaliando-se a influência de parâmetros operacionais nas características dos filmes obtidos e no rendimento do processo. O processo de adsorção dos fosfolipídios no interior dos tubos de vidro foi estudado pela determinação da isoterma e da cinética de adsorção. Os lipossomas formados pela hidratação dos filmes lipídicos secos,

---

foram caracterizados quanto à capacidade de encapsulação do fármaco Pirazinamida e incorporação de colesterol. Um modelo matemático que considera a penetração e dissolução do filme lipídico seco e a formação simultânea dos lipossomas foi proposto para descrever a cinética de formação dos lipossomas.

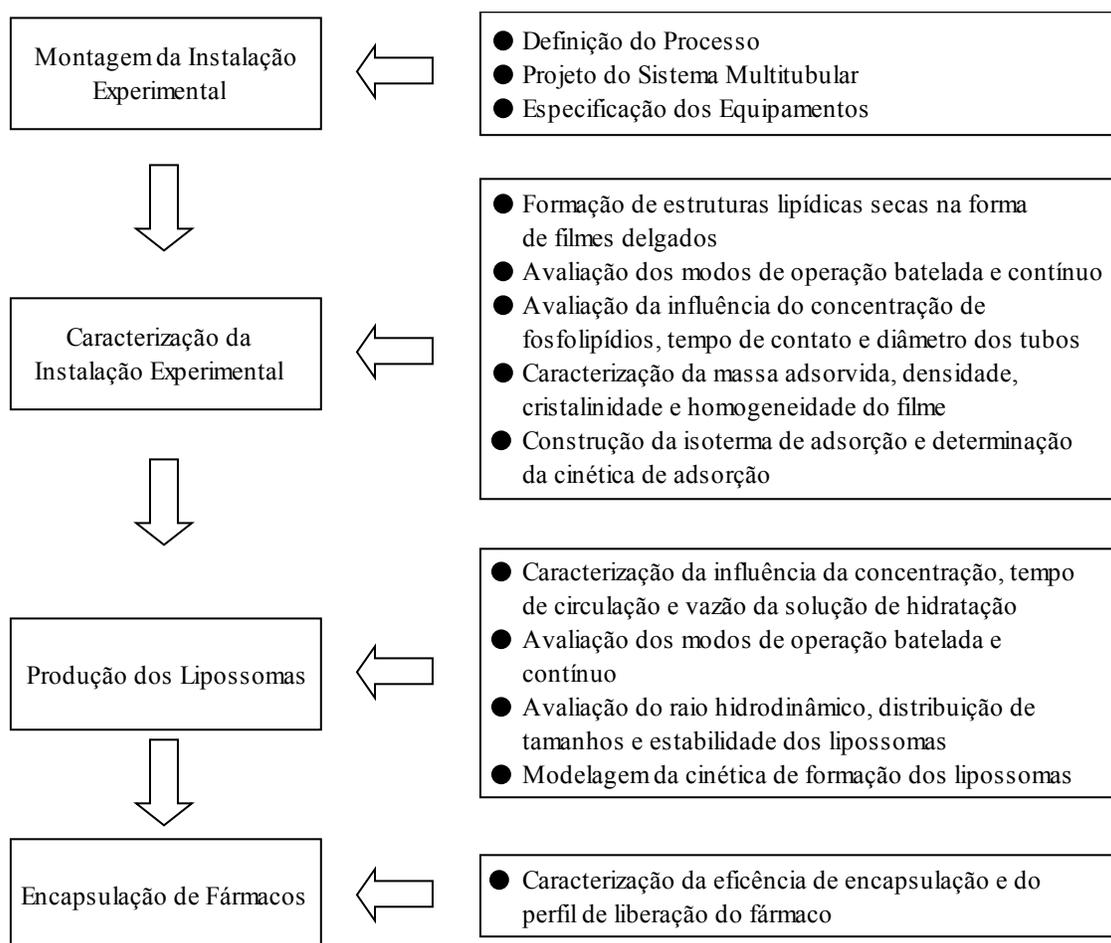
A importância deste trabalho reside na perspectiva de se contribuir para o desenvolvimento de processos escalonáveis de produção de lipossomas que atenda às exigências da indústria farmacêutica, e desta forma conduza à produção de medicamentos mais eficientes, e também para um melhor entendimento da cinética de formação destas vesículas.



## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é a montagem e operação de instalação passível de esterilização e escalonamento, para o estudo da produção de lipossomas a partir de estruturas lipídicas secas formadas no interior de um sistema multitubular, com ênfase na adsorção dos lipídios e hidratação das estruturas secas.

O estudo será abordado através dos aspectos apresentados no diagrama abaixo:





## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. Considerações Gerais sobre Lipossomas

Embora já tivessem sido observados por outros pesquisadores anteriormente, os lipossomas tiveram suas propriedades caracterizadas e suas potenciais aplicações reconhecidas apenas por volta de 1960, pelo pesquisador inglês Alec Bangham (BANGHAM *et al.*, 1965). Desde então os lipossomas têm causado grande impacto nos mais diversos campos de aplicação. Na área farmacêutica os lipossomas não tiveram impacto imediato na produção industrial devido a limitações de processo e controle de qualidade. Nas últimas décadas, com um maior conhecimento sobre sua estrutura e propriedades e com o desenvolvimento de novas técnicas de produção, os lipossomas voltaram a atrair o interesse dos pesquisadores e das indústrias.

#### 3.1.1. Estrutura

Os lipossomas podem ser definidos como vesículas lipídicas de forma aproximadamente esférica, nas quais um volume aquoso central é circundado por uma ou várias bicamadas lipídicas concêntricas que possuem propriedades de membranas. As bicamadas são constituídas principalmente por fosfolipídios. Os lipossomas podem variar em tamanhos que vão desde nanômetros até dezenas de micra.

Os fosfolipídios, que são os principais componentes estruturais dos lipossomas, são moléculas de caráter anfílico nas quais uma cabeça polar, no caso um grupo fosfato, está ligada a duas cadeias de hidrocarbonetos através de uma molécula de glicerol. Esta estrutura confere à molécula a propriedade de se agregar quando em solução aquosa.

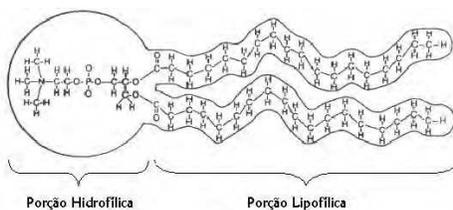
A estrutura lipossomal é formada em solução aquosa através da agregação de moléculas de fosfolipídios, para se minimizar as interações desfavoráveis entre as cadeias de hidrocarbonetos hidrofóbicas e o meio aquosos. Inicialmente as moléculas se alinham

formando bicamadas planas, as quais em seguida curvam-se em torno de si mesmas formando a estrutura vesicular tendendo a eliminar a interação desfavorável das extremidades expostas às moléculas de água.

As estruturas resultantes assemelham-se à membrana celular tanto em composição lipídica quanto em funções. Esta semelhança pode ser aumentada por meio de modificações na superfície dos lipossomas, por exemplo, pela adição de moléculas de reconhecimento. Os lipossomas são constituídos por um ou mais fosfolipídios com função estrutural, e algumas outras moléculas que são adicionadas para conferirem funções específicas (NEW, 1990).

Os fosfolipídios mais utilizados são do grupo das fosfatidilcolinas, ou lecitinas, as quais pertencem ao grupo dos glicerofosfolipídios. Elas são bastante empregadas por serem o principal lipídio estrutural tanto em membranas biológicas quanto biomédicas, pelo seu baixo custo se comparado com outros fosfolipídios, sua carga neutra e ao fato de serem quimicamente inertes.

Na Figura 1 abaixo se apresenta a estrutura geral da molécula de fosfatidilcolina, destacando-se suas porções hidrofóbica e hidrofílica.



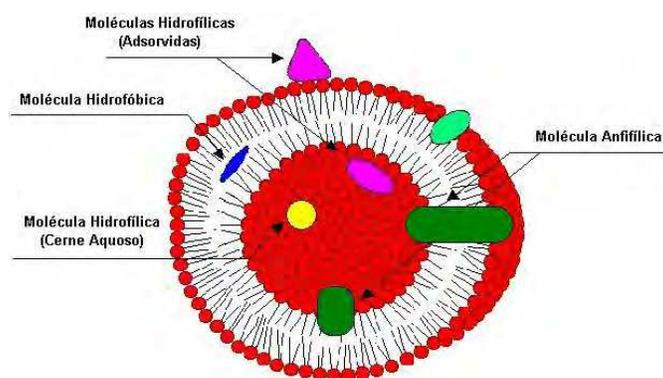
**Figura 1- Estrutura de uma molécula de fosfatidilcolina.**

Estas moléculas anfífilas são zwitteriônicas neutras em todos os valores de pH fisiológico devido à amônia quaternária presente no seu grupo de cabeça. As fosfatidilcolinas, assim como outros fosfolipídios, podem ser tanto de origem sintética quanto de origem natural. Enquanto as lecitinas de origem sintética possuem uma composição de cadeias de hidrocarbonetos muito bem definidas, as de origem natural são compostas de misturas de fosfolipídios com diferentes cadeias tanto em tamanho quanto em grau de insaturação. As lecitinas de origem natural podem ser extraídas tanto de fontes animais, como a gema de ovo, quanto vegetais, como os grãos de soja.

Dentre as outras moléculas que são adicionadas juntamente com os fosfolipídios podemos citar os açúcares e esteróis, como o colesterol, que têm como função auxiliar na estabilização da estrutura formada, fosfolipídios do grupo das fosfatidiletanolaminas que dotam a superfície de grupos amina e permitem a ligação covalente de moléculas de reconhecimento como anticorpos e polímeros como o polietilenoglicol que aumenta a estabilidade biológica dos lipossomas.

Os lipossomas podem acomodar tanto moléculas de caráter hidrofílico dentro do volume aquoso central ou adsorvidas na sua superfície, quanto moléculas hidrofóbicas que se posicionam no interior da bicamada. A bicamada comporta-se como uma barreira semipermeável para estas moléculas, com diferentes níveis de permeabilidade para cada classe de moléculas (LASIC, 1993).

Um esquema representativo dos lipossomas e das possíveis associações de bioativos com a sua estrutura é mostrado na Figura 2.



**Figura 2 - Representação das possíveis localizações de moléculas na estrutura de lipossomas (Adaptado de LASIC, 1993).**

Os lipossomas são agregados que apresentam mesoformismo liotrópico e termotrópico. Os fosfolipídios na forma cristalina representam estruturas de energia mínima, cuja mudança de fase passa por estados intermediários metaestáveis. O mesoformismo termotrópico dos fosfolipídios ocorre pelo fato de que após aquecimento os cristais de lipídios não passam diretamente para um estado isotrópico, mas formam uma ou mais fases intermediárias. Estes estados são denominados cristais líquidos, pelo fato de que se encontram entre os estados líquido e cristalino. Essa mudança de fase ocorre a uma

---

temperatura de transição  $T_c$ , que é dependente tanto da cadeia não polar quanto do tipo de grupo de cabeça.

Similarmente a este fenômeno os lipídios não passam prontamente do estado cristalino para o estado isotrópico líquido quando se adiciona água. Dependendo da quantidade água e da temperatura, diferentes fases hidratadas se formam, até que em uma diluição infinita temos a formação de uma solução ideal de lipídios no estado monomérico. Este comportamento é denominado mesoformismo liotrópico. As diferentes fases liotrópicas também apresentam mesoformismo termotrópico (CEVC, 1993).

O comportamento de transição de fase da membrana dos lipossomas determina propriedades como permeabilidade, fusão, agregação e ligação com diferentes moléculas, o que pode afetar de modo marcante a estabilidade das vesículas e o seu desempenho como veículos carregadores de fármacos (VILLANOVA e CONSIGLIERI, 2000).

A adição de colesterol às membranas torna a fase ordenada (fase líquido cristalina) mais desordenada e a fase desordenada (fase gel) torna-se mais ordenada, pois as moléculas de colesterol se arranjam entre as moléculas de fosfolipídios, com seu grupo hidroxil faceando a fase aquosa e com o anel tricíclico comprimido entre cadeias de hidrocarboneto. Isto resulta em uma fase fluida ordenada na qual para 50% de colesterol, a transição de fase praticamente é imperceptível. A adição de colesterol aumenta a fluidez da membrana, reduz a sua permeabilidade para moléculas hidrofílicas e aumenta a sua estabilidade na presença de fluidos biológicos (NEW, 1990; VEMURI e RHODES, 1995).

### **3.1.2. Classificação**

Os lipossomas podem ser classificados tanto com relação ao seu tamanho e número de lamelas quanto a sua interação com o meio biológico.

A classificação que mais é encontrada na literatura é em relação ao tamanho e ao número de bicamadas concêntricas, ou lamelas, presentes na vesícula. Neste item os lipossomas são classificados em multilamelares (MLV's), com tamanhos maiores que 500 nm, unilamelares pequenos (SUV's) ou grandes (LUV's), com diâmetros até 100 nm e entre 100 e 500 nm respectivamente.

---

Algumas propriedades físico-químicas e biológicas das membranas, como volume capturado por quantidade de lipídio, seu destino biológico e mecanismo de remoção na corrente sanguínea, dependem do tamanho da vesícula, da lamelaridade e do empacotamento das bicamadas concêntricas que formam a estrutura (LASIC, 1993).

Um bom exemplo desta influência são as MLV's, as quais por possuírem várias bicamadas concêntricas dentro da estrutura possuem um volume aquoso central menor que as LUV's. Por outro lado o fato de possuírem várias bicamadas significa que as moléculas aprisionadas no cerne aquoso central terão mais barreiras para atravessar antes de serem liberadas, gerando assim maiores tempos de liberação.

Também no caso da associação com as proteínas do soro que levam a desestabilização dos lipossomas nos fluidos biológicos, existem diferenças uma vez que as LUV's serão desestabilizadas mais rapidamente que as MLV's (VILLANOVA e CONSIGLIERI, 2000).

Os lipossomas podem ainda ser classificados com relação a seu comportamento nos fluidos biológicos. Nesse contexto o primeiro grupo engloba os lipossomas denominados convencionais, os quais possuem em sua composição apenas um lipídio estrutural, e adicionalmente colesterol e um lipídio com carga.

Além destes lipossomas convencionais, que se caracterizam por possuírem interação não específica com os fluidos biológicos, três outros grupos de lipossomas podem ser definidos com respeito a esta funcionalidade. Lipossomas estericamente estabilizados, ou seja, com pronunciada estabilidade no ambiente fisiológico, os quais são produzidos adicionando-se uma cobertura com um polímero hidrofílico inerte, como o polietilenoglicol (PEG), à superfície. Utiliza-se, tipicamente, uma concentração 5% molar de lipídio ligado covalentemente ao polímero.

Lipossomas com ligantes de direcionamento incorporados à estrutura, como anticorpos monoclonais ou oligossacarídeos podem ser direcionados para alvos específicos. Esses lipossomas são também denominados imunolipossomas. Para teste *in vitro* são utilizados lipossomas convencionais com ligantes, enquanto lipossomas estericamente estabilizados com ligantes específicos incorporados são usados para direcionamento sistêmico em tratamentos *in vivo*.

O ultimo grupo engloba os lipossomas denominados polimórficos, os quais mudam de forma, passando de uma fase para outra, dependendo da solução com a qual estão em contato. Um exemplo de lipossoma do grupo dos polimórficos são os lipossomas catiônicos ou aniônicos (capazes de incorporar compostos carregados na sua superfície externa ou na superfície das lamelas internas) e que possuem grande aplicação na vetorização de DNA (LASIC, 1997).

### **3.1.3. Aplicações**

A semelhança estrutural e em composição, entre os lipossomas e as membranas biológicas permitem a sua utilização como modelo para o estudo das propriedades físico-químicas das membranas. Essa foi a primeira grande aplicação dos lipossomas, e que até hoje vem sendo muito utilizada.

A identificação das suas propriedades de encapsulação e permeabilidade seletiva a diferentes tipos de moléculas, levou a utilização dos lipossomas como veículos para encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos, principalmente fármacos. A flexibilidade de incorporação de ligantes específicos na sua superfície conduziu a aplicações dessas estruturas como biossensor em diagnóstico.

As aplicações médicas dos lipossomas envolvem o diagnóstico, onde podem ser utilizados tanto lipossomas convencionais no caso de liberação de agentes de contraste nos órgãos do sistema retículo endotelial quanto lipossomas com superfície modificada para a vetorização para outros órgãos ou reconhecimento de determinados agentes, e aplicações terapêuticas, que incluem aplicações tópicas e sistêmicas, como a terapia anticâncer e a terapia antimicrobiológica dentre outras. Uma das mais promissoras aplicações de lipossomas na área médica é a sua associação com DNA, que possibilita a liberação desta macromolécula dentro do núcleo das células. Esta associação é importante para melhorar a eficiência terapêutica das vacinas que estão sendo desenvolvidas para o tratamento de diversas doenças (BANERJEE, 2001).

Comparados a outros sistemas de liberação controlada de fármacos, como géis e matrizes poliméricas, os lipossomas além de protegerem a substância ativa da degradação e

---

produzirem liberação controlada, possuem outras vantagens como uma melhor interação com as células, não serem tóxicos ou imunogênicos e serem biodegradáveis.

Além das aplicações em áreas médicas e farmacêuticas os lipossomas possuem aplicações nas mais diferentes áreas, desde a matemática onde são utilizados em estudos de topologia de superfícies, passando pela físico-química, onde servem como modelos para estudo de sistemas coloidais, chegando até a química, onde são utilizados como reatores fechados para reações específicas (LASIC, 1993).

### **3.2. Métodos de Preparação**

Apesar das vantagens sobre outros veículos de liberação controlada, a utilização de lipossomas na indústria tem sido limitada pelo desenvolvimento de processos escalonáveis eficientes, de fácil operação e capazes de produzir as estruturas projetadas para aplicações específicas (GREGORIADIS, 1993; LASIC, 1993).

Embora muitos já tenham sido os procedimentos desenvolvidos para preparação de lipossomas poucos destes atendem as exigências da indústria quanto à esterilidade e estabilidade dos lipossomas produzidos e com relação à possibilidade da técnica de sofrer aumento de escala e ser simples e reprodutível.

#### **3.2.1. Métodos Tradicionais**

Os principais métodos convencionais de preparação de lipossomas são: método de hidratação de filme lipídico seco, injeção de solventes voláteis e remoção de detergentes.

O método de hidratação do filme seco de lipídios consiste na solubilização de um ou mais lipídios em solvente orgânico seguida de evaporação deste solvente a vácuo. O filme seco, geralmente formado no fundo de balão de vidro, é hidratado com solução aquosa contendo o composto hidrofílico a ser encapsulado, a temperatura superior à de transição de fase,  $T_c$ , dos lipídios. O sistema é mantido sob agitação para o que os lipossomas sejam eficientemente formados. Este método gera uma população heterogênea e dispersa de MLV's. Para a obtenção de menor tamanho com distribuição estreita ou mesmo unimodal, deve-se submeter os lipossomas formados a sonicação ou extrusão através de

---

membranas. Os lipossomas sonicados são menores, enquanto que os extrudados apresentam distribuição mais estreita de tamanhos (LASIC, 1993).

O método de injeção de solventes voláteis consiste na injeção rápida de lipídios solubilizados em solvente orgânico, diretamente em uma fase aquosa, e posterior remoção do solvente através de diálise, diafiltração ou evaporação. O solvente pode ser miscível em água como é o caso do etanol, ou imiscível em água como o éter. O método de injeção de etanol foi uma das primeiras alternativas para preparação de SUV's sem uso de sonicação. O tamanho das vesículas formadas irá depender das condições de injeção do solvente (KREMER *et al*, 1977, CAFISO *et al.*, 1981). Algumas das vantagens deste método são a simplicidade, a ausência de tratamentos físicos ou químicos potencialmente prejudiciais aos lipossomas e a possibilidade de aumento de escala. As desvantagens são a necessidade de uma etapa adicional de remoção do etanol e a baixa concentração de vesículas produzidas (LASIC, 1993).

O método de remoção de detergentes foi desenvolvido em estudos de proteínas de membranas com proteolipossomas. Por ser pouco agressivo, permite que moléculas sensíveis a outros tipos de tratamento possam ser incorporadas em lipossomas, desde que o detergente apropriado seja escolhido. Nesse caso, os lipídios são solubilizados em detergente, formando uma solução de micelas mistas detergente/fosfolipídios. A formação dos lipossomas se dá na fase de remoção do detergente, que é feita através de diluição, diálise ou filtração em gel. Detergentes com alto valor de concentração micelar crítica (CMC) são os que produzem melhores resultados (NEW, 1990).

A cinética de remoção do detergente influencia nos tamanhos dos lipossomas formados. A principal vantagem desse método é a sua flexibilidade, permitindo a preparação de uma grande variedade de lipossomas. As desvantagens são as baixas concentrações de lipídios que podem ser usadas, normalmente até 20 mM, as várias etapas incluídas no procedimento e a presença de moléculas de detergente não removidas, que podem causar um aumento na permeabilidade da bicamada. (LASIC, 1993).

Além destas técnicas principais outras também são utilizadas, como os métodos de demulsificação, dos quais se destaca a evaporação em fase reversa. Esses métodos geram lipossomas com alta eficiência de encapsulação. Outras técnicas consistem na formação de

lipossomas a partir de vesículas pré-formadas através de fusão, ciclos de resfriamento/aquecimento ou de desidratação/hidratação.

Algumas das técnicas empregadas para a produção de lipossomas, bem como suas principais vantagens e desvantagens podem ser vistas na Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos principais métodos de preparação de lipossomas (Adaptação de VILLANOVA e CONSIGLIERI, 2001).**

<b>Métodos de Preparação</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Hidratação de Filme Lipídico com Agitação Mecânica	Simple e rápido	Baixa eficiência de encapsulação
	Formação de MLV's	Dispersão heterogênea dos MLV Não adaptável à escala industrial
Sonicação	Formação de SUV's	Baixa eficiência de encapsulação Contaminação com material da sonda
	Homogeneidade da suspensão	Aquecimento e degradação dos lipídios Não adaptável à escala industrial
Extrusão com Prensa Francesa	Simple, reprodutível e não agressivo Altas concentrações de lipídios	Difícil Manutenção do Equipamento
	Alta eficiência de encapsulação Adaptável à escala industrial	Preparação prévia de MLV's
Extrusão com Membranas de Policarbonato	Simple, reprodutível	Preparação prévia de MLV's
	Altas concentrações de lipídios Alta eficiência de encapsulação	Pequenos volumes são utilizados
Microfluidização	Alta eficiência de encapsulação	Preparação prévia de MLV's
	Adaptável à escala industrial	Aparelho de Difícil Manutenção
Injeção de Etanol	Homogeneidade da suspensão	Baixa eficiência de encapsulação
	Simple e rápido Adaptável à escala industrial	Baixa concentração de vesículas
Evaporação em Fase Reversa	Alta eficiência de encapsulação	Exposição a ultra-som e solventes Técnica complexa
		Não adaptável à escala industrial
Infusão de Éter	Adaptável à escala industrial	Baixa eficiência de encapsulação Exposição a altas temperaturas e solventes
		Heterogeneidade da suspensão
Liofilização/Rehidratação	Alta eficiência de encapsulação	Heterogeneidade da suspensão
	Adaptável à escala industrial Estabilidade da Preparação	Preparação prévia de MLV's
Congelamento/Descongelamento	Alta eficiência de encapsulação	Preparação prévia de MLV's ou SUV's
	Processo simples e rápido	Dificuldade de preparação na presença de fosfolipídios neutros
Remoção de Detergentes	Homogeneidade da suspensão	Baixa eficiência de encapsulação
	Condições suaves	Processo lento Dificuldade de remoção do detergente

---

### 3.2.1.1. Métodos de Incorporação de Bioativos

Além dos métodos de produção de lipossomas deve-se destacar também os métodos de incorporação de substâncias ativas dentro do cerne aquoso central ou no interior da bicamada, a qual pode ser feita por dois métodos: o passivo e o ativo (ou remoto).

O método passivo é a metodologia geral aplicada a qualquer substância ativa independente de sua massa molecular, forma da molécula, carga e balanço entre hidrofiliabilidade e hidrofobicidade. A incorporação passiva pode ser obtida por interação do agente encapsulado com a bicamada lipossomal (associação de membrana), pela encapsulação na fase aquosa intralipossomal, ou por uma combinação de ambas.

A associação com a membrana pode ser hidrofóbica ou eletrostática em sua natureza e está relacionada com o coeficiente de partição da substância ativa entre o lipossoma e o meio. A incorporação é controlada por parâmetros físicos e estruturais, como o tamanho, forma e números de lamelas, que controla o volume aquoso seqüestrado, bem como por interações específicas como atração e repulsão entre os componentes da bicamada e o agente incorporado.

A magnitude do gradiente osmótico formado após a hidratação do lipídio é outro fator que determina a eficiência de incorporação, como já foi comprovado para vesículas produzidas pelo método de desidratação/rehidratação DRV. A composição exata e o pH do meio de hidratação, meio de redução de tamanho e meio de armazenamento devem ser bem controlados e definidos no sentido de otimizar a incorporação nos lipossomas.

O método remoto de incorporação de substâncias ativas requer que os lipossomas sejam preparados com uma “força motriz” a qual possibilitará o transporte espontâneo do agente do meio extralipossomal através da bicamada lipídica para a fase aquosa intralipossomal. Para que o agente fique retido no interior do lipossoma, ele deve ser modificado de modo a prevenir sua liberação. Para agentes com alta energia de ativação para a liberação uma incorporação estável pode ser obtida.

Os três principais métodos para incorporação remota são baseados em gradiente de pH, potencial de membrana e gradiente de sulfato de amônia. Uma outra metodologia para a incorporação remota de bioativos em lipossomas é o uso de vesículas lipídicas compostas

---

de anfílicos catiônicos que formam estruturas com poli ou oligonucleotídios para liberação gênica (BARENHOLZS e LASIC, 1996).

### 3.2.2. Métodos Escalonáveis

Os métodos escalonáveis são compostos de duas etapas principais: formação de uma estrutura lipídica intermediária e posterior hidratação desta estrutura. Os principais métodos escalonáveis são: atomização por “spray-drying”, desidratação-rehidratação (DRV), microfluidização e injeção de etanol. Nos dois primeiros casos as estruturas lipídicas intermediárias formadas são partículas secas de diferentes graus de cristalinidade. No método de injeção de etanol as estruturas intermediárias são formadas diretamente na solução aquosa.

O método de secagem por atomização, ou “spray drying”, consiste inicialmente na dissolução dos lipídios em um solvente orgânico volátil. A solução orgânica é então atomizada em uma câmara de secagem com ar quente, e as partículas formadas são recolhidas em um ciclone. As partículas formadas por este método podem ser estocadas por longos períodos em refrigerador, e a sua elevada área superficial e grau de cristalinidade proporcionam elevada eficiência de hidratação (KIKUCHI *et al.*, 1991).

O processo de hidratação é feito com uma solução aquosa contendo o material a ser encapsulado, e a dispersão formada contém lipossomas multilamelares. O tamanho das partículas formadas depende da diferença de temperatura, da natureza dos lipídios e solventes, do diâmetro do bocal de atomização, da diferença de pressão e de outros parâmetros operacionais (LASIC, 1993).

Além da estabilidade de estocagem, outras vantagens desta técnica são a pureza do produto, a facilidade de operação, boa reprodutibilidade, grande versatilidade na composição das vesículas e elevada produtividade. A adição de açúcares na solução de alimentação aumenta o rendimento do processo, além de formar membranas secas mais amorfas, as quais podem ser mais facilmente hidratadas (KIKUCHI *et al.*, 1991; LASIC, 1993).

O método de injeção de etanol consiste na adição rápida de uma solução de etanol, contendo os lipídios dissolvidos, em uma fase aquosa bem agitada. Quando altas

---

quantidades de lipídios são utilizadas a solução lipídica deve ser injetada periodicamente na solução aquosa e o etanol deve ser removido continuamente através de diálise, diafiltração ou osmose reversa. Os lipossomas formados são do tipo multilamelares com população heterogênea, necessitando de um tratamento posterior de redução de tamanhos e homogeneização. Uma possibilidade de contornar este problema seria a associação em circuito fechado de um filtro cerâmico, para extrudar a população de lipossomas com auxílio de uma bomba de alta pressão (LASIC, 1993).

Este método já é aplicado para a produção de produtos farmacêuticos para o uso tópico, como por exemplo, lipossomas contendo econazol (NAEFF, 1996). Outros estudos indicam a possibilidade de aplicação desta técnica na produção de lipossomas contendo proteínas para uso em diagnóstico, sendo que uma planta piloto já se encontra em operação para esse fim (WAGNER *et al.*, 2002).

No método da desidratação-rehidratação (DRV), lipossomas formados por hidratação de estruturas lipídicas secas são submetidos à desidratação por liofilização e posteriormente reconstituídos por rehidratação. O composto pode ser incorporado na primeira hidratação ou na rehidratação. Dependendo da sua composição, os lipossomas podem ser reconstituídos em MLV's ou grandes agregados e em SUV's. Em geral adiciona-se um açúcar com propriedades vítreas, tais como trealose, manitol ou sacarose, para preservar as estruturas na desidratação e rehidratação. Este método é usado para a encapsulação de proteínas ou outros compostos sensíveis à temperatura. Nesse caso a incorporação do compostos nos lipossomas é feita na fase de rehidratação (GREGORIADIS, 1993).

Uma outra técnica que é bastante estudada, e que já é utilizada para a produção industrial de lipossomas, consiste na utilização de homogeneizadores a alta pressão, ou microfluidizadores. Esta técnica usa a força de duas dispersões de lipossomas que colidem entre si a altas pressões, fazendo com que as vesículas lipídicas se reorganizem (VILLANOVA e CONSIGLIERI, 2000). Alguns trabalhos já foram feitos para demonstrar que a técnica produz lipossomas estáveis em grande escala (SORGI e HUANG, 1996) e para a avaliar a influência de parâmetros operacionais nas características dos lipossomas obtidos (BARNADAS-RODRÍGUEZ e SABES, 2000).

---

Outros métodos de preparação de lipossomas que podem sofrer aumento de escala já foram descritos na literatura científica. Um deles envolve a diluição de soluções concentradas de lipossomas, que pode gerar tanto populações dispersas de lipossomas, quando a diluição é feita sob agitação mecânica, quanto uma população homogênea de SUV's, quando é utilizado um moinho de bolas para homogeneização da solução durante a etapa de diluição. Outro método também já estudado é a coacervação. Estes dois métodos possuem a vantagem de não utilizarem solventes inaceitáveis em aplicações farmacêuticas e não apresentarem etapas que demandem excessivo gasto de energia como a sonicação (PERRETT, 1990; BRANDL et al., 1998, SAEGUSA e ISHII, 2002).

Mais recentemente tem sido estudada a técnica de evaporação em fase reversa usando CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente, que tem como principal vantagem o fato de não utilizar solventes que podem ser nocivos tanto para o ambiente quanto para a saúde humana e também apresentar altas eficiências de encapsulação para moléculas hidrofílicas (OTAKE *et al.*, 2001).

Diversas novas técnicas de produção de lipossomas em larga escala são apresentadas em patentes depositadas, principalmente, nos Estados Unidos, Europa e Japão (ADAMICH *et al.*, 1986, BENAMEUR et al., 2001, BRACKEN, 1990, COHEN, 1986, COLLINS, 2002, HUNT *et al.*, 1985, MEZEI *et al.*, 1984, REDZINIAK *et al.*, 1985, TOURNIER *et al.*, 1999). Dentre essas técnicas pode-se destacar a produção de lipossomas a partir de estruturas lipídicas secas, em forma de filmes e expandidas, que é apresentada abaixo em maiores detalhes.

### **3.2.3. Método da Hidratação de Estruturas Lipídicas Secas**

Este método consiste de uma variação do método laboratorial de hidratação do filme seco de lipídios. Neste caso, o filme é formado na superfície interna de um conjunto de tubos dispostos paralelamente (TOURNIER *et al.*, 1999).

O sistema para deposição de lipídios consiste de uma coluna preenchida com tubos dispostos paralelamente, formando um sistema multitubular. O número de tubos e sua geometria devem ser determinados de forma a se obter uma relação área por volume máxima. O sistema pode ser operado de diferentes maneiras como, por exemplo, com

---

relação ao solvente que pode ser alimentado e disperso tanto na parte interna quanto na parte externa dos tubos, mas preferencialmente na parte interna para que seja propiciado um melhor controle da temperatura através de circulação de água de aquecimento na parte externa.

Os mesmos autores observaram que a formação dos lipossomas é mais eficiente e aproveita-se a máxima capacidade do equipamento utilizado quando o depósito lipídico obtido da evaporação do solvente é expandido em uma estrutura tridimensional. Nesse caso, a elevada razão entre a área de contato dos lipídios com a fase aquosa, ou seja, a área superficial da estrutura expandida, e o volume de fase aquosa, tornam a hidratação muito mais eficiente, podendo-se obter altas eficiências de encapsulação.

A evaporação do solvente pode ser realizada a temperaturas superiores a temperatura ambiente, ou a pressão reduzida, ou mesmo combinando-se pressão reduzida e altas temperaturas. Através de experimentos, observou-se que a taxa de evaporação tem forte influência no grau de expansão da estrutura lipídica e, portanto, para uma expansão ótima é necessário um controle apropriado da quantidade de calor e da pressão dentro do sistema, sobretudo quando se está próximo do final da evaporação e a solução torna-se mais viscosa. Neste ponto, uma ligeira redução da pressão resultará em uma expansão relativamente rápida (formação de espuma). Diferentes graus de expansão da estrutura lipídica podem ser obtidos, através do balanço adequado de temperatura e pressão para um dado solvente ou mistura de solventes.

Em ambas as situações, além da alta produtividade, esse método possui outras vantagens muito desejadas pela indústria, como a possibilidade de aumento de escala, a facilidade de controle da etapa de hidratação, tempos de processamento reduzidos, uso de materiais de construção de baixo custo, e utilização do mesmo sistema para deposição, evaporação do solvente, hidratação da estrutura lipídica expandida. A técnica também permite a produção de lipossomas em condições estéreis.

#### **3.2.4. Fatores Envolvidos na Produção de Lipossomas em Escala Industrial**

Os principais fatores envolvidos na produção de lipossomas em escala industrial são apresentados por REDZINIAK (REDZINIAK *et al.*, 1995).

### 3.2.4.1. Matérias Primas

As matérias primas utilizadas na produção de lipossomas podem ser divididas em três categorias principais: as anfipáticas que incluem os fosfolipídios, os detergentes, os glicolipídios e alguns tipos de fármacos; as lipofílicas, como os solventes, os esteróides, os lipídios carregados, os antioxidantes e os fármacos hidrofóbicos; e por fim as hidrofílicas, como a água, os tampões, alguns agentes antioxidantes e os fármacos hidrofílicos.

As matérias primas têm sido produzidas de acordo com os padrões exigidos pelas indústrias, visto que os fabricantes e as indústrias trabalham em estreita parceria. Esta colaboração entre fornecedores e indústrias pode levar a uma redução no preço das matérias primas em um futuro breve, sobretudo no que se refere às matérias primas sintéticas.

### 3.2.4.2. Processo

A grande maioria dos processos de produção de lipossomas em escala industrial segue as etapas básicas, apresentadas na Figura 3.

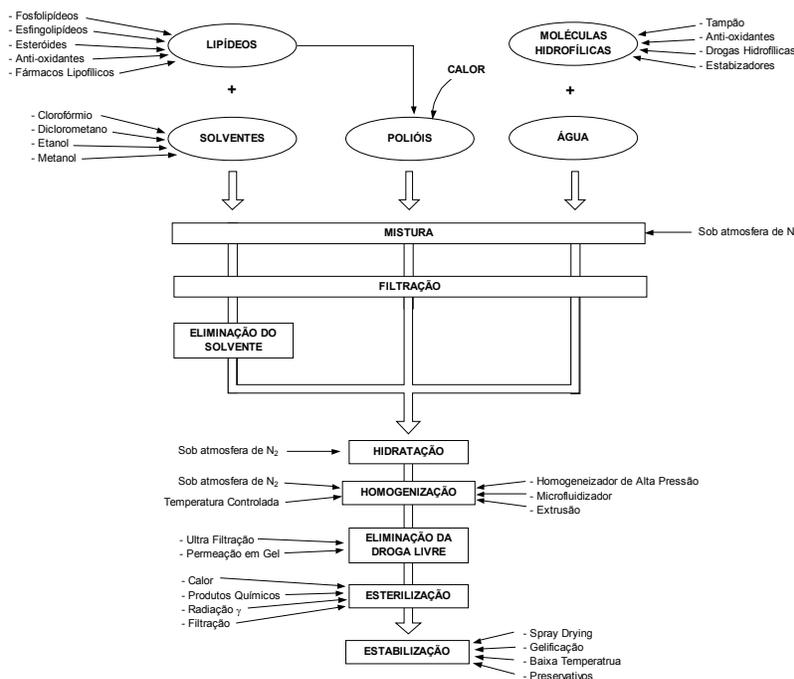


Figura 3 - Esquema geral dos processos de produção de lipossomas (Adaptado de REDZINIAK *et al.*, 1995).

Cada uma destas etapas do processo de produção de lipossomas é descrita em maior detalhe a seguir.

#### **3.2.4.2.1. Mistura**

A mistura das moléculas hidrofóbicas em um ou mais solventes orgânicos (clorofórmio, diclorometano, metanol, etanol, etc) requer equipamento especial que seja dotado de compartimentos que evitem vazamentos e que sejam a prova de chamas, onde as operações são controladas em relação à emissão de vapores através de detectores de solventes. Por fim é de especial importância que as matérias primas sejam manuseadas em condições estéreis, tanto no que se refere ao misturador, quanto à mistura dos componentes em si que deve ser efetuada sob atmosfera de gás inerte, geralmente o nitrogênio.

#### **3.2.4.2.2. Separação**

As técnicas de separação são usadas em vários estágios do processo industrial. Logo após a etapa de mistura inicial dos componentes é necessário algumas vezes a eliminação de resíduos insolúveis nos solventes orgânicos ou aquosos por filtração. Uma etapa de ultrafiltração também pode ser necessária para a eliminação de pirogêneos das soluções hidrofóbicas ou hidrofílicas.

As técnicas de separação, porém, são mais importantes nas etapas de eliminação de solventes, eliminação de detergentes, separação do fármaco não encapsulado ou de moléculas ativas, como substâncias tóxicas.

No caso da eliminação de solventes, diversas técnicas podem ser empregadas. A mais amplamente empregada, a evaporação do solvente, é limitada pelo volume de solvente utilizado que geralmente produz uma pequena massa de estrutura lipídica seca. Além disso, a combinação de temperatura elevada com os longos tempos de evaporação pode levar a desnaturação de alguns produtos, por exemplo, através de oxidação.

Uma segunda técnica que pode ser empregada para a eliminação do solvente é a liofilização. Esta técnica possui a vantagem de ser menos agressiva com as moléculas

---

lipídicas durante a eliminação do solvente. Porém a técnica sofre de algumas desvantagens como a alta quantidade de energia despendida durante o processo e a impossibilidade de trabalhar com solventes que não possam ser facilmente congelados como o metanol e o etanol.

A técnica de atomização por “spray drying”, a qual é baseada na atomização da mistura de solventes contendo as moléculas lipídicas por uma corrente de ar ou gás inerte quente ( $T \approx 65 \text{ }^\circ\text{C}$ ), também pode ser utilizada para eliminação de solvente. Os tempos de contato e de evaporação são da ordem de centésimos de segundos e a recuperação da mistura lipídica, na forma de um pó, é feita através de um ciclone. As partículas sólidas podem ser facilmente hidratadas quando em contato com uma solução aquosa.

A técnica que tem sido mais empregada para a eliminação de detergentes é a diálise, sendo que já existem equipamentos que executam esta técnica em escala industrial. Já para a separação dos lipossomas das moléculas não encapsuladas diversas técnicas podem ser aplicadas pelas indústrias, tais como, a cromatografia de permeação em gel, a ultrafiltração e a centrifugação.

#### **3.2.4.2.3. Hidratação**

Embora possa parecer uma etapa trivial do processo de produção de lipossomas a hidratação é uma etapa importante do processo. Nesta etapa a quantidade de fase aquosa, contendo ou não a substância ativa a ser encapsulada, bem como o tempo de contato da fase aquosa com a mistura lipídica vai depender do tipo de estrutura lipídica utilizada e a quantidade de fase aquosa encapsulada por mol de lipídio, que define a eficiência de encapsulação, pode variar em até 50%.

No caso de estrutura lipídica na forma de filme os tempos de hidratação são geralmente longos, podendo chegar a até 20 horas. O equipamento deve ser previamente esterilizado e termoestabilizado. Quando se utiliza partículas sólidas na forma de pós finos a hidratação requer tempos menores, de 1 a 2 horas, e a eficiência de encapsulação de moléculas hidrofílicas é maior que a obtida pela hidratação de filmes secos.

#### **3.2.4.2.4. Homogeneização**

A produção de lipossomas de tamanho uniforme é um parâmetro essencial na produção industrial destas vesículas, principalmente para evitar problemas de estabilidade com o tempo, como sedimentação dos lipossomas e vazamento da substância encapsulada, e nas suas aplicações “in vivo”.

Existem vários equipamentos que levam a homogeneização de soluções de lipossomas, e que são baseados tanto em agitação quanto na pressão com ou sem extrusão.

#### **3.2.4.2.5. Esterilização**

A esterilização dos lipossomas representa uma etapa importante e essencial para o uso em certas aplicações ou terapias com humanos. Em muitos casos a esterilização torna possível dispensar o uso de certos agentes preservativos que podem ser incompatíveis com determinadas rotas de administração terapêutica.

As várias técnicas de esterilização envolvem tratamentos com calor, agentes químicos como o óxido de etileno, filtração em membranas com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  e radiação do tipo  $\gamma$ .

#### **3.2.4.2.6. Estabilização**

Juntamente com a esterilização e adição de agentes preservativos, utilizados para estabilizar as suspensões de lipossomas contra contaminação microbiológica, as vesículas devem também ser estabilizadas química e fisicamente.

Esta estabilização pode ser feita controlando-se a quantidade e qualidade das matérias primas que formam a bicamada ou que ficam presentes na fase aquosa a ser encapsulada, como por exemplo pelo uso de agentes antioxidantes como o  $\alpha$ -tocoferol. Pode-se também aumentar a estabilidade das vesículas pelo controle do pH, viscosidade e potencial zeta.

---

### 3.2.4.3. Controles

Os lipossomas produzidos devem ser controlados através de suas propriedades químicas, físicas, óticas e biológicas.

As análises químicas incluem os testes da quantidade e qualidade das matérias primas que formarão o lipossoma, por cromatografia de camada delgada (TLC) ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Também pode ser avaliado o estado de oxidação através da determinação do valor de iodo ou do valor de peróxido, e do teor de ácidos graxos livres.

As análises físicas incluem principalmente a determinação do tamanho médio e distribuição de tamanhos das partículas, que pode ser feita por espalhamento de luz dinâmico. Outra análise física importante é a do potencial zeta, que é indicativo da carga dos lipossomas e permite avaliar o tempo de meia vida destas vesículas, bem como seus requerimentos de aplicação. A estabilidade física deve ser monitorada também, através do pH e da viscosidade das dispersões.

Os lipossomas podem ser visualizados por microscopia ótica após tratamento de coloração quando na forma de suspensões ou após a aplicação da técnica de fratura por congelamento (“freeze-fracture”) quando se apresentam na forma de meios complexos como géis e emulsões. O controle ótico permite estimar o tamanho e o número de lamelas que compõem o lipossoma, e ainda monitorar a sua estabilidade física com o tempo.

O controle biológico de vírus, bactérias e fungos deve ser feito tanto nas matérias primas que entram no processo de produção quanto nos lipossomas produzidos. Para aplicações intravenosas, o teste de “limulus” é usado para determinação de pirogêneos.

### 3.3. Formação dos Lipossomas

Pode-se encontrar em LASIC, 1993, uma descrição sobre o processo de formação dos lipossomas. De acordo com o autor, diferente dos aspectos experimentais da formação dos lipossomas em que muitos detalhes, como a influência de diferentes procedimentos de preparação e outros parâmetros nas propriedades dos lipossomas obtidos, já são bem

---

descritos na literatura, o mecanismo que governa estas transformações ainda é pouco entendido.

Muitos são os modelos que foram desenvolvidos para tentar explicar a formação destas estruturas, sendo que alguns abordam os aspectos termodinâmicos e outros os aspectos cinéticos da formação dos lipossomas.

Os modelos termodinâmicos mostram por que certas estruturas podem ser mais estáveis que outras, mas falham na tentativa de explicar o estado real do sistema: por exemplo, o fato de que muitos lipídios ou composições lipídicas podem formar nas mesmas condições experimentais uma larga variedade de lipossomas com diferentes tamanhos e lamelaridades, mas que exibem a mesma estabilidade.

Os fatores cinéticos apresentam um importante papel no processo de formação dos lipossomas, e assim, para o profundo entendimento dos sistemas liotrópicos, eles devem ser considerados ao lado dos fatores termodinâmicos. Exemplos típicos da influência de fatores cinéticos são as taxas de remoção de detergente e de injeção de lipídios em solvente orgânicos, e a intensidade e o tempo de agitação de filmes lipídicos secos em água.

### **3.3.1. Aspectos Termodinâmicos**

Uma análise dos aspectos termodinâmicos da formação dos lipossomas foi mostrada em ISRAELACHVILI, 1992.

Diversos tipos de agregados moleculares pequenos, como micelas, bicamadas, vesículas e membranas biológicas, formam-se em solução aquosa através da auto agregação espontânea de moléculas anfifílicas.

As forças que mantêm as moléculas anfifílicas unidas nestes agregados não são devidas a ligações iônicas ou covalentes, mas sim a interações fracas como as forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas.

Diferente de partículas sólidas ou macromoléculas rígidas, como o DNA, estes agregados são flexíveis ou fluidos. Sendo assim, alterações nas condições das soluções em que estão dispersos causa não apenas interferência nas interações entre os agregados, mas

também afeta as forças intermoleculares dentro de cada agregado, podendo levar a modificações na forma e tamanho das estruturas.

Uma condição para que o sistema, no caso o agregado, esteja em equilíbrio termodinâmico é que o potencial químico de todas as moléculas que formam as estruturas seja o mesmo que o das moléculas em solução. Sendo assim:

$$\mu = \mu_N = \mu_N^0 + \frac{k.T}{N} \log\left(\frac{X_N}{N}\right) \quad (1)$$

, em que:

- $\mu_N$  é o potencial químico de molécula em um agregado de número de agregação N
- $\mu_N^0$  é o potencial químico padrão, ou seja, a energia livre de interação média por molécula em um agregado de número de agregação N
- $X_N$  é a concentração, ou mais apropriadamente a atividade, das moléculas em um agregado de número de agregação N

Assim,  $N = 1$ ,  $\mu_1^0$  e  $X_1$ , correspondem moléculas isoladas, ou monômeros em solução.

A equação (2) expressa a equação (1) de uma maneira mais útil, através da concentração das moléculas:

$$X_N = N \left\{ X_1 \exp\left[\frac{(\mu_1^0 - \mu_N^0)}{k.T}\right] \right\}^N \quad (2)$$

A equação (2) combinada com a equação de conservação da concentração total de soluto, que é dada por:

$$C = X_1 + X_2 + X_3 + \dots X_N \quad (3)$$

, define completamente o sistema.

### 3.3.1.1. Condições para a Formação de Agregados

Os agregados irão se formar em solução se houver diferença entre as energias coesivas que existem entre as moléculas nos agregados e as energias dispersivas que existem entre os monômeros em solução. Se as moléculas em agregados de diferentes tamanhos, incluindo os monômeros, experimentam a mesma interação entre si a tendência é que a maioria das moléculas fique na forma de monômeros em solução.

A condição necessária para a formação de agregados grandes é que  $\mu_N^0$  seja menor que  $\mu_1^0$  para algum valor de N. Isso ocorrer, por exemplo, quando  $\mu_N^0$  progressivamente diminui com o valor de N ou quando  $\mu_N^0$  possui um valor mínimo para algum valor finito de N.

A variação exata de  $\mu_N^0$  com N também determina muitas das propriedades físicas dos agregados, como por exemplo seu tamanho médio e polidispersidade.

Para estruturas em formas simples podemos expressar o potencial químico através da expressão:

$$\mu_N^0 = \mu_\infty^0 + \frac{\alpha.k.T}{N^p} \quad (4)$$

, em que:

- $\alpha$  é uma constante positiva que depende das interações intermoleculares
- $p$  é um número que depende da forma ou dimensionalidade do agregado

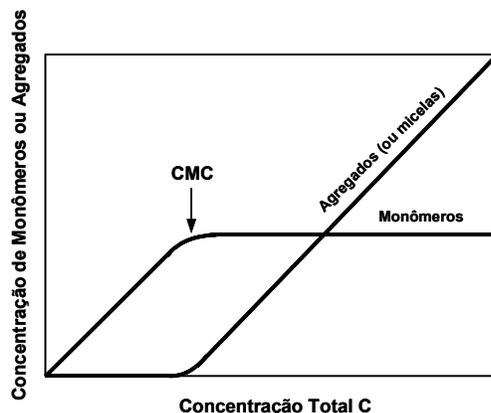
A determinação da concentração na qual os agregados se forma pode ser feita substituindo-se a equação (4) na equação (2), obtendo dessa forma:

$$X_N = N \left\{ X_1 \exp \left[ \alpha \left( 1 - \frac{1}{N^p} \right) \right] \right\}^N \approx N (X_1 e^\alpha)^N \quad (5)$$

Sendo  $X_N \leq 1$  e sabendo que  $X_1$  se aproxima de  $\exp\left[-\left(\frac{\mu_1^0 - \mu_N^0}{k.T}\right)\right]$ , ou  $e^{-\alpha}$ , torna-se claro que  $X_1$  não pode aumentar indefinidamente. Assim a concentração a partir da qual não ocorre aumento da concentração de monômeros é denominada Concentração Micelar Crítica (CMC), e é definida por:

$$(X_1)_{\text{critico}} = CMC \approx \exp\left[-\left(\frac{\mu_1^0 - \mu_N^0}{k.T}\right)\right] = e^{-\alpha} \quad (6)$$

A equação (6) define a concentração a partir da qual a adição de moléculas de soluto resulta na formação de mais agregados enquanto a concentração de monômeros em solução permanece aproximadamente invariável no valor de CMC, como pode ser observado na representação da Figura 3.



**Figura 4 – Variação da concentração de monômeros em solução e de agregados acima e abaixo da concentração micelar crítica.**

Para estruturas na forma de discos e esferas ocorre uma separação de fases, gerando um agregado de tamanho infinito ( $N \rightarrow \infty$ ) quando a concentração atinge o valor da CMC.

Moléculas de hidrocarbonetos em água se separam, a uma concentração superior a CMC, em uma fase oleosa a qual pode ser considerada como um agregado esférico muito grande. Nesse caso, como são dois líquidos imiscíveis, estamos tratando de solubilidade de um soluto em um solvente, e nesse caso, o  $\alpha$  das equações (4), (5) e (6) representa a energia

necessária para a transferência de uma molécula da fase soluto para a fase solvente (energia de hidrofobicidade ou solubilidade).

No caso de moléculas de tensoativos sendo transferidas para micelas ou bicamadas o incremento na energia de hidrofobicidade é menor, devido à proximidade da cabeça hidrofílica e a alta ordenação das cadeias nestes agregados, que age diminuindo a energia de hidrofobicidade. Porém a mais importante diferença entre molécula de hidrocarbonetos e tensoativos não está na solubilidade ou na CMC, que é menor para as moléculas anfífilas, mas sim no fato de que estas apresentam a habilidade de se agregarem em estruturas que atinjam um valor mínimo de  $\mu_N^0$  para um valor constante e finito de N. Esta é razão pela qual os agregados formados são finitos, fenômeno este denominado micelização, e não infinitos como acontece com as moléculas de hidrocarboneto no fenômeno de separação de fases.

Estas considerações podem ser expressas através de uma análise dos possíveis valores do parâmetro  $\mathbf{p}$  na equação (5).

a)  $\mathbf{p} = 1$

Nesse caso temos que:

$$X_N = N(X_1 e^\alpha)^N e^{-\alpha} \quad (7)$$

Considerando as concentrações superiores a CMC tem-se que para valores pequenos de N o valor de  $X_N$  é proporcional a N, ou seja, a concentração de moléculas no agregado cresce na proporção de seu tamanho. Já para valores altos de N temos que  $X_N$  tende a zero quando o valor de N tende a ser muito grande ( $N \rightarrow \infty$ ), ou seja, a probabilidade de surgirem agregados muito grandes é pequena, e neste caso não ocorre separação de fases.

b)  $\mathbf{p} < 1$

Nesse caso ocorre separação de fases, gerando um agregado de tamanho infinito.

---

c)  $p > 1$

Nesse caso não ocorre formação de agregados, já que nesse caso  $\mu_N^0$  passa a aumentar com o valor de N.

As micelas e vesículas em equilíbrio em solução exibem usualmente uma distribuição de tamanhos finita em torno de um valor médio, que pode ser estreita ou larga (polidispersa), simétrica ou assimétrica em torno do valor médio.

### 3.3.1.2. Estruturas Complexas

O valor do parâmetro  $p$  é constante apenas para agregados compostos de moléculas simples que se ordenam em estruturas com formas geométricas simples. Porém algumas moléculas anfifílicas mais complexas podem se agregar formando estruturas mais complexas, como vesículas, bastões interconectados e estruturas tridimensionais periódicas.

Para moléculas flexíveis as estruturas formadas adotam formas variadas. No caso de um disco, por exemplo, a energia de borda desfavorável pode ser eliminada pelo seu fechamento sobre si mesmo gerando uma vesícula.

Para dispersões de lipídios ou tensoativos ocorrem transições para mesofases maiores e mais ordenadas ou estruturas líquido cristalinas liotrópicas. As moléculas podem ser arranjadas em cilindros ordenados, fase hexagonal ou nemática, pilhas de bicamadas, fase lamelar, lipossomal ou esmética, ou uma rede tridimensional complexa de superfícies interconectadas, fases bicontínuas. Estas transições de fases são governadas pelas forças atrativas e repulsivas entre os agregados.

Considerando o caso das forças repulsivas entre os agregados, com o aumento da concentração de surfactantes os agregados, que inicialmente se encontram na forma de micelas, tendem a se aproximar. Essa aproximação, porém é energeticamente desfavorável, e isso leva a um rearranjo dos agregados na forma de feixes de cilindros ou pilhas de bicamadas, fazendo com que as suas superfícies fiquem na maior distância possível.

No caso das forças atrativas entre os agregados considera-se a possibilidade de coexistência de agregados grandes e menores em solução. Nesse caso o equilíbrio entre as

---

bicamadas ocorre no valor mínimo da energia potencial das forças de repulsão entre as moléculas do agregado. Dessa forma enquanto os agregados pequenos são favorecidos entropicamente, os lipossomas podem ser termodinamicamente mais favoráveis se o valor do mínimo de energia potencial for suficientemente grande.

### 3.3.1.3. O Fator de Empacotamento

O empacotamento das moléculas anfifílicas nos agregados depende de fatores geométricos como o volume ocupado pelas cadeias de hidrocarboneto  $v$ , as quais supõe-se serem fluídas e incompressíveis, a área ótima das cabeças hidrofílicas,  $a_0$ , e do comprimento efetivo que as cadeias podem assumir, que é denominado comprimento crítico de cadeia  $l_c$ . O comprimento crítico representa o limite até o qual as cadeias de hidrocarbonetos podem ser consideradas como fluídas.

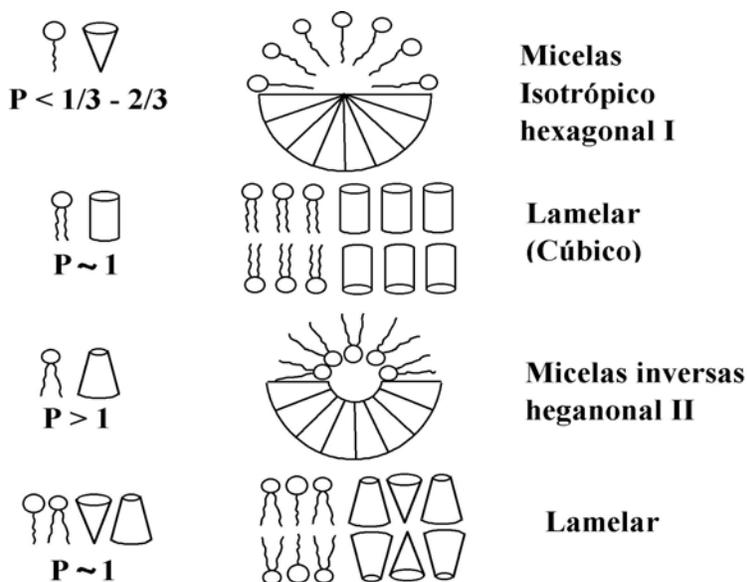
Através da relação entre a área ótima da cabeça hidrofílica, do volume das cadeias de hidrocarboneto e do comprimento crítico de cadeia pode-se prever o empacotamento das moléculas anfifílicas.

Como o valor de  $\mu_N^0$  é o mesmo para todas as estruturas, desde que o valor da área ótima do grupo de cabeça  $a_0$  seja o mesmo, a entropia vai favorecer a estrutura com menor número de agregação. Assim as estruturas maiores serão entropicamente desfavoráveis enquanto as estruturas menores serão energeticamente desfavoráveis (ISRAELACHVILI, 1992).

O fator de empacotamento  $P$  é definido como:

$$P = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (8)$$

Os modelos geométricos de empacotamentos para os diversos valores de  $P$  são apresentados na Figura 5.



**Figura 5 - Estruturas formadas a partir de anfifílicos com diferentes valores de fator de empacotamento (Adaptado de ISRAELACHVILI *et al.*, 1992).**

Os tensoativos de cadeia simples tendem a formar micelas, pois o volume do grupo de cabeça é maior que o da cadeia não polar. Assim pode-se considerar que a molécula tem uma forma cônica que leva à sua agregação na forma de micelas esféricas. No caso de alguns lipídios com dupla cadeia, como os fosfolipídios, o maior volume ocupado pela cadeia dupla confere à molécula uma forma cilíndrica que tende a se agregar na forma de bicamadas. Por fim com outras moléculas temos que o volume das cadeias de hidrocarboneto é maior que o volume da cabeça hidrofílica e as moléculas tenderão a se agregar na forma de micelas invertidas. A mistura de moléculas de lipídios de cadeia simples e de cadeia dupla também leva a formação de estruturas planares. (LASIC, 1993).

### 3.3.2. Aspectos Cinéticos

Em LASIC, 1993, pode-se encontrar um estudo sobre os aspetos cinéticos envolvidos na formação dos lipossomas.

---

### 3.3.2.1. Forças Intramembrana

As moléculas anfifílicas organizam-se em agregados para proteger as cadeias não polares da exposição à água. Uma vez que uma molécula de hidrocarboneto é transferida da água para uma fase não polar o sistema experimenta um ganho de energia. Em adição a esse quadro a energia livre  $\Delta G$  do sistema é reduzida pelas forças atrativas de dispersão (forças de van der Waals) entre as cadeias de hidrocarboneto na região não polar. Simultaneamente a hidratação do grupo de cabeça polar também reduz o valor de  $\Delta G$ .

Ambas as interações que reduzem a energia livre das moléculas individuais são energeticamente desfavoráveis no plano das cabeças polares, onde o aumento do volume das cabeças hidrofílicas e as interações com moléculas de água tendem a manter os grupos de cabeça na maior distância possível. Isto é contrabalançado pela proximidade das cadeias de hidrocarboneto que tendem a prevenir a entrada de água na região não polar.

As forças intrabicaçada, que são responsáveis pela manutenção da estrutura do agregado, consistem das forças hidrofóbicas, forças de hidratação, forças de van der Waals e forças eletrostáticas. As forças de van der Waals, também denominadas forças dispersivas de London, e as forças hidrofóbicas são de natureza atrativa. Já as forças de hidratação e as forças eletrostáticas são de natureza repulsiva. O tamanho das cabeças polar proporciona um efeito estérico, que tem o significado de uma interação estérica repulsiva.

### 3.3.2.2. Forças Intermembranas

Existem predominantemente 4 forças que podem ser envolvidas na interação entre várias superfícies ou partículas coloidais em soluções aquosas: forças atrativas de van der Waals, forças repulsivas eletrostáticas e de hidratação, e forças estéricas que em sistemas de bicamadas são praticamente apenas repulsivas.

Um papel direto destas forças pode ser observado no comportamento de intumescimento de estruturas lipídicas secas, nas quais as moléculas de água forçam a separação das bicamadas lipídicas empilhadas. Diferentes tipos de lipídios intumescem de forma diferente, principalmente no caso de lipídios carregados e não carregados devido à presença ou ausência de repulsão eletrostática. Os lipídios carregados dispersam melhor e tendem a formar uma fração maior de vesículas unilamelares. Isso é devido a uma repulsão

---

intercamada que leva a um aumento contínuo na separação das bicamadas, em mecanismo denominado intumescimento infinito. No intumescimento finito, que ocorre no caso de lipídios não carregados, em presença de excesso de água a distância entre as bicamadas atinge um valor de equilíbrio.

### **3.3.2.3. Mecanismos de Formação**

O fato de que vários tipos de lipossomas podem ser preparados por diferentes métodos parece indicar que podem existir vários mecanismos operando na formação de lipossomas.

Os métodos que se iniciam a partir de bicamadas pré-formadas podem formar lipossomas tanto pelo mecanismo de brotamento ou pela formação de pequenos fragmentos de bicamada que se juntam para gerar os lipossomas. Duas forças podem ser responsáveis por estas transformações: a elasticidade de curvatura da bicamada e a energia de borda que leva ao aparecimento de aberturas, poros ou defeitos na bicamada.

Com relação à quantidade e característica da energia disponível, o tratamento externo pode interagir tanto com a energia de elasticidade (modo transversal) quanto com as forças atrativas interbicamada, podendo criar poros, aberturas ou fragmentos (modo longitudinal).

As interações longitudinais causam a fragmentação da bicamada enquanto as interações transversais induzem curvatura. Ambas as interações podem causar a ruptura da simetria local, que leva a uma nova minimização da energia livre que envolve mudanças topológicas (vesiculação).

Embora a hidratação de filmes lipídicos secos em água, com o crescimento das figuras de mielina seja conhecida desde há algum tempo, não existe ainda um estudo detalhado da formação de MLV's.

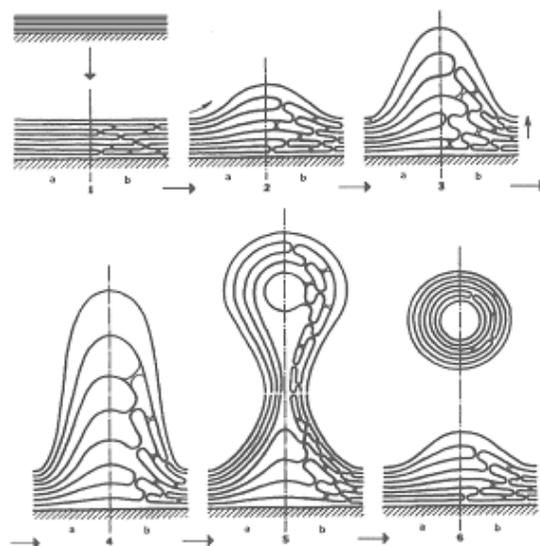
De uma maneira geral, com a adição de água ao filme fosfolipídico seco as monocamadas externas se hidratam mais rapidamente que as internas. Ocorre formação de um inchaço, ou bolha, devido ao aumento da área superficial dos grupos de cabeça com o

aumento da hidratação e devido à permeabilidade da água na bicamada lipídica, que não é infinita (Figura 6 - Mecanismo a).

Isto significa que existe um gradiente de concentração de água através das bicamadas. A reação exotérmica de hidratação reduz a energia do sistema causando um aumento da área superficial específica. As bicamadas deslizam formando as figuras de mielina, que crescem na forma de fibras tubulares, para proporcionar a máxima exposição das cabeças polares à água. Durante esta transformação a distância entre as bicamadas tende a um valor de equilíbrio, que é um compromisso entre as forças repulsivas de hidratação, estéricas e eletrostáticas e as forças atrativas de van der Waals.

Outro mecanismo sugere que, após a hidratação, bicamadas adjacentes podem tornar-se conectadas por uma passagem que atua como uma fonte, isto é, um funil em trajetória, para o transporte de moléculas lipídicas de dentro dos cilindros em crescimento (Figura 6 - Mecanismo b).

Em ambos os casos, após a agitação da solução aquosa os tubos se destacam, e imediatamente selam suas extremidades expostas e formam os lipossomas. Na Figura 6 abaixo se vê uma representação das etapas envolvidas na formação dos lipossomas através dos mecanismos a e b, descritos acima.



**Figura 6 - Representação do mecanismo de formação de MLV's pela hidratação de filmes lipídicos secos. As linhas indicam bicamadas de fosfolipídios. Lado (a): mecanismo baseado na hidratação das cabeças, lado (b): mecanismo de bicamadas interconectadas. As setas em 2a e 3b indicam a direção preferencial de migração das moléculas lipídicas (Adaptado de LASIC, 1993).**

Os lipossomas formados não são necessariamente esféricos, mas com o tempo as estruturas não esféricas normalmente transformam-se lentamente em estruturas esféricas, nas quais a energia de curvatura é mínima e o volume encapsulado é máximo.

Observações como o fato de que diferentes procedimentos de preparação geram lipossomas com distribuição de tamanhos diferentes a partir das mesmas composições, a sua estabilidade limitada e a irreversibilidade de muitos procedimentos de preparação suportam a idéia de que os lipossomas não estão em um estado de equilíbrio termodinâmico, mas em estados de equilíbrio metaestáveis, devido à quantidade de energia adicionada ao sistema na sua formação. Esse é um dos motivos pelo qual a cinética é tão importante para o conhecimento da distribuição de tamanho e da estabilidade.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os principais materiais, bem como os procedimentos utilizados nos ensaios.

### 4.1. Material

Para a produção de lipossomas foi utilizada lecitina natural hidrogenada de soja, em produto comercial designado por Epikuron 200 SH, fabricada pela Degussa Bioactives, Hamburgo, Alemanha. Nos experimentos foi usado o lote No. 119707.

Os reagentes, Cloreto Ferro Hexahidratado e Tiocianato de Amônia, usados nos ensaios de caracterização dos lipossomas, foram adquiridos respectivamente da Synth e Acros Organics, New Jersey, USA.

Os reagentes, Molibdato de Amônia, Ácido Ascórbico, Peróxido de Hidrogênio e Ácido Sulfúrico, utilizados no ensaio de quantificação de fosfato foram adquiridos respectivamente da Sigma (St. Louis, USA), Aldrich (Milwaukee, USA), Merck (Darmstadt, Germany), e Synth. O solvente orgânico etanol foi adquirido da Synth e Ecibra, e o clorofórmio da Vetec e Ecibra.

O tampão HEPES utilizado para hidratação das estruturas lipídicas secas e o fármaco Pirazinamida utilizado nos experimentos de encapsulação foram adquiridos da Sigma, St. Louis, USA. Os sacos de diálise, usados nos ensaios de liberação da Pirazinamida, foram da Inlab.

O tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub> e as placas de Microtitulação de poliestireno, ambos usadas nos experimentos de estabilidade de lipossomas foram adquiridos da Sigma, St. Louis, USA e da Corning Inc, respectivamente.

A água utilizada em todos os experimentos foi bidestilada e purificada em sistema Milli-Q.

#### **4.1.1. Equipamentos**

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento dos experimentos foram:

- i) Espectrofotômetro UV-visível, marca Hitachi, modelo U-2001
- ii) Espectrômetro de espalhamento de luz por incidência de raios laser, marca Malven Autosizer, modelo 4700.
- iii) Sistema de água ultrapura, marca Milli-Q Millipore, Catálogo No. QTUM000EX
- iv) Bomba peristáltica dosadora, marca Milani, modelo BP-601
- v) Bomba peristáltica, marca Cole Palmer, modelo 302FM-B
- vi) Agitador recíproco, marca New Brunswick Scientific Co., Inc., modelo G24
- vii) Centrífuga, marca FANEM, modelo Excelsa Baby2 16/15 mL
- viii) Centrífuga refrigerada, marca Hitachi, modelo Himac CF15D
- ix) Banho sonicator, marca Branson, modelo 2200
- x) Leitora de placas do tipo Elisa “Microtiter Plate Reader”, modelo Elx808, da Bio-Tek Instruments Inc.

#### **4.2. Métodos**

##### **4.2.1. Caracterização do Fosfolipídio**

Conforme especificação do fornecedor, o Epikuron 200 SH é composto de no mínimo 95% de fosfatidilcolina e no máximo 1% de lisofosfatidilcolina, 2,5% de outros fosfolipídios, 0,5% de umidade e 1% de óleos. A cadeia acila dos fosfolipídios é formada por 10-15% de ácido palmítico, 16 átomos de carbono, e 85-90% de ácido esteárico, 18 átomos de carbono. A partir destes dados, a massa molecular do lipídio foi estimada considerando-se a composição 90% de DSPC e 10% de DPPC. Assim a massa molecular média (MM) do Epikuron 200SH foi calculada através da equação 9, como a média ponderada das massas moleculares dos seus constituintes (790,2 e 734,0 g/gmol para o

---

DSPC e DPPC respectivamente), obtendo-se o valor 784,58 g/gmol que foi usado nos cálculos envolvidos nos ensaios.

$$MM_{Epikuron} = 0,9 * MM_{DSPC} + 0,1 * MM_{DPPC} \quad (9)$$

## 4.2.2. Adsorção dos Fosfolipídios em Filme Delgado

### 4.2.2.1. Adsorção em um Único Tubo

Para a caracterização da adsorção de fosfolipídios na parede interna dos tubos, foram estudados os efeitos das seguintes variáveis: concentração inicial de fosfolipídios tempo de contato da solução lipídica com a superfície interna dos tubos (adsorvente), diâmetro interno dos tubos e o modo de contato da solução adsorvente com os tubos, em batelada ou contínuo. As concentrações iniciais de fosfolipídios usadas foram 80mM, 20mM e 5mM, sendo a adsorção estudada em tubos de diâmetro interno 1,6mm, 2,4mm, 3,4mm e 4,0mm e em tempos de 10, 30 e 60 minutos. Todos os tubos usados possuíam comprimento de 11,5 cm.

#### 4.2.2.1.1. Adsorção dos Fosfolipídios em Batelada

Foram utilizados volumes de 10mL de dispersão de fosfolipídios em etanol, com concentração previamente estabelecida. Para promover uma melhor dispersão dos fosfolipídios no solvente, as soluções foram sonicadas em banho por 30 minutos e mantidas em repouso por mais 30 minutos antes de se iniciar os experimentos.

Para os ensaios de adsorção, os tubos de diferentes diâmetros foram posicionados na posição vertical, preenchidos completamente com a dispersão de fosfolipídios e deixados em repouso durante os tempos previamente selecionados. Todos os ensaios de adsorção foram realizados à temperatura ambiente.

Em seguida à adsorção as soluções foram drenadas e os tubos deixados para secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas.

Para quantificação da massa total adsorvida, os fosfolipídios foram extraídos com clorofórmio de pureza 99%, com o qual os tubos foram completamente preenchidos, sob

agitação recíproca (em “shaker”) a uma rotação de 150 rpm, durante 5 minutos. Após a agitação a solução de clorofórmio era retirada dos tubos e usada nas análises de quantificação de fosfolípidios. O procedimento de extração foi repetido várias vezes de modo a assegurar que o volume de clorofórmio usado na operação fosse aproximadamente o mesmo para todos os tubos, uma vez que os tubos usados possuíam diferentes volumes.

A massa total adsorvida foi calculada pela equação 10, em que o volume de extração foi igual a 5 mL e a concentração da solução foi obtida pelo método de quantificação de fosfato de Stewart conforme o item 4.2.2.1.3.

$$m_{ads} = V_{extração} \cdot C_{solução} \quad (10)$$

Os resultados foram expressos também em termos de massa adsorvida por unidade de comprimento característico e percentagem adsorvida, expressas pelas equações 11 e 13 respectivamente.

$$(m_{ads})^* = \frac{m_{ads}}{h} = 4 \cdot \frac{V_{extração} \cdot C_{solução}}{D_{int}} \quad (11)$$

, onde h é o comprimento característico que pode ser calculado pela equação 12.

$$h = \frac{Volume}{Area} \xrightarrow{p/cilindro} h = \frac{\pi D_{int}^2 \cdot L}{4 \cdot \pi D_{int} \cdot L} = \frac{D_{int}}{4} \quad (12)$$

$$\% Adsorção = 100 * \frac{m_{ads}}{C_{inic} \cdot \frac{\pi \cdot D_{int}^2 \cdot L}{4}} \quad (13)$$

O uso da massa adsorvida por unidade de comprimento característico para expressar os resultados tem por objetivo levar em consideração não só a área da superfície interna dos tubos, mas também os diferentes volumes de solução, uma vez que os comprimentos dos tubos foram mantidos constantes no ensaio.

---

#### 4.2.2.1.2. Adsorção Contínua de Fosfolipídios

Os ensaios de adsorção contínua de fosfolipídios foram feitos com tubos de mesmo diâmetro e soluções de concentrações análogas às usadas nos ensaios em batelada. A adsorção foi feita circulando a solução de fosfolipídios com auxílio de bomba dosadora peristáltica a uma vazão de 35 mL/min, menor vazão admitida pela bomba peristáltica, durante os mesmos tempos usados nos ensaios em batelada. Após a adsorção, foram feitas a extração e análise dos fosfolipídios adsorvidos tal como descrito nos itens 4.2.2.1.1 e 4.2.2.1.3.

Os resultados foram expressos em massa adsorvida por unidade de área superficial interna dos tubos, uma vez que nestes ensaios o volume de solução usado na adsorção foi o mesmo para todos os tubos, e percentagem adsorvida calculadas pelas equações 13 e 14 respectivamente.

$$m_{ads} / A = \frac{m_{ads}}{\pi \cdot D_{int} \cdot L} \quad (14)$$

A massa total adsorvida foi calculada pela equação 10.

#### 4.2.2.1.3. Quantificação dos Fosfolipídios

Os fosfolipídios adsorvidos, extraídos com clorofórmio, foram quantificados pelo Método de Stewart (NEW, 1990), o qual baseia-se na complexação dos fosfolipídios com ferrotiocianato de amônia.

Inicialmente preparava-se uma solução aquosa de ferrotiocianato de amônia 0,1M, solução de análise, a partir de 27,03 g de cloreto de ferro hexahidratado e 30,4 g de tiocianato de amônio, ambos solubilizados em 1 L de água bidestilada. Essa solução foi estocada à temperatura ambiente, mantendo-se estável por período de aproximadamente 6 meses.

Para a análise, 2mL de solução de ferrotiocianato de amônia foram previamente colocados em tubos de ensaio, aos quais se adicionou um volume total de 2 mL, de solução de fosfolipídios em clorofórmio em várias diluições, preparadas com diferentes volumes da

---

solução extraída dos tubos e de clorofórmio. Os tubos de ensaios foram então turbilhoados em vortex por aproximadamente 15 segundos, e as amostras centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm, para a separação de fases. A fase superior, fase aquosa, era retirada com uma pipeta Pasteur e a fase inferior, fase orgânica, era analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda 485 nm. A determinação da concentração de fosfolipídios foi feita através de curva de calibração previamente construída, utilizando soluções padrões dos fosfolipídios em clorofórmio, preparadas na faixa de concentrações entre 0 e 0,1 mg/mL (Anexo I). Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

A massa de lipossomas formada pela hidratação dos filmes lipídicos delgados foi determinada pela metodologia proposta por CHEN et al., 1956, com algumas modificações. Este método de quantificação baseia-se na redução do fosfato dos fosfolipídios a ortofosfato, na sua complexação com molibdato de amônia e posterior redução do complexo na presença de ácido ascórbico, gerando uma coloração azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato presente na amostra.

Para realização do ensaio foram adicionados a tubos de ensaios ensaio 100 µL de amostra e 500 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para digestão da amostra. Os tubos foram aquecidos à temperatura de 150 °C por 20 minutos, adicionando-se em seguida 165 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e retornando ao aquecimento por mais 30 minutos para assegurar a oxidação completa. Decorrido esse tempo foram adicionados a cada tubo 4 mL de água bidestilada, 500 µL de molibdato de amônia, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, e 500 µL de L-ácido ascórbico. Após os tubos ficarem por 7 minutos em um banho com água fervente (~100 °C), as amostras eram analisadas em espectrofotômetro no comprimento de onda 830 nm. A concentração de fosfolipídios na amostra era obtida por comparação com uma curva de calibração previamente construída (Anexo II). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

#### **4.2.2.1.4. Planejamento Experimental para Adsorção Contínua de Fosfolipídios**

Para melhor avaliação da influência das variáveis operacionais na adsorção de fosfolipídios nas paredes internas dos tubos de vidro, foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com ponto central em triplicata. A adsorção foi feita de modo contínuo, e as variáveis

estudadas foram o diâmetro interno dos tubos, a concentração de fosfolipídios e o tempo de contato da solução com os tubos, nos níveis indicados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Níveis das variáveis usadas no planejamento fatorial.**

	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
<b>Concentração</b>	5 mM	45 mM	85 mM
<b>Tempo</b>	20 minutos	40 minutos	60 minutos
<b>Diâmetro</b>	2,4 mm	3,4 mm	4,0 mm

Os experimentos realizados seguiram a matriz de planejamento mostrada na Tabela 3, que foi construída de acordo com BARROS NETO et al., 2001.

**Tabela 3 - Matriz de planejamento para a avaliação da influência do diâmetro interno dos tubos, concentração e tempo de contato na adsorção de fosfolipídios em batelada.**

<b>Ordem</b>	<b>Experimento</b>	<b>Concentração</b>	<b>Tempo</b>	<b>Diâmetro</b>
1	1	-1	-1	-1
8	2	+1	-1	-1
6	3	-1	+1	-1
4	4	+1	+1	-1
10	5	-1	-1	+1
7	6	+1	-1	+1
3	7	-1	+1	+1
11	8	+1	+1	+1
2	9	0	0	0
5	10	0	0	0
9	11	0	0	0

Nestes ensaios, a extração dos fosfolipídios foi feita preenchendo os tubos com clorofórmio e em seguida colocando-os em banho de sonicação por 1 minuto. A sonicação teve como objetivo aumentar a extração do fosfolipídio no clorofórmio. Após esse período a solução era drenada e guardada para ser analisada para quantificação do fosfolipídio total.

#### **4.2.2.2. Adsorção de Fosfolipídios em Sistema Multitubular**

Para os experimentos de adsorção de fosfolipídios no sistema multitubular foram fixados a concentração, o diâmetro interno dos tubos de vidro e o tempo de contato da

---

solução com o sistema, e foram avaliados os dois métodos de operação, batelada e contínuo, com relação ao rendimento do processo de adsorção e à homogeneidade do filme formado.

#### **4.2.2.2.1. Adsorção Contínua de Fosfolipídios**

Para análise da adsorção contínua de fosfolipídios foram utilizados nos experimentos 150 mL de solução de fosfolipídio em etanol na concentração de 85 mM. Esta solução foi circulada através de um módulo contendo 21 tubos de vidro de diâmetro interno igual a 4,0 mm, a uma vazão de aproximadamente 35 mL/min com auxílio de uma bomba dosadora peristáltica. O tempo total de circulação foi de 40 minutos. Durante a circulação da solução o sistema multitubular foi aquecido a 80° C, circulando-se água na parte externa dos tubos de vidro.

Decorrido o tempo de circulação a solução foi drenada e os tubos foram secos sob vácuo de 200 mbar e temperatura de 80 °C durante 90 minutos. O sistema multitubular foi então desmontado e alguns tubos foram retirados para análise de rendimento e de homogeneidade do filme formado. Para análise de rendimento foram usados 3 tubos, dos quais os fosfolipídios foram extraídos e quantificados conforme os itens 4.2.2.1.4 e 4.2.2.1.3. Os outros 5 tubos foram utilizados para o teste de homogeneidade. Para realização destes testes os tubos foram preenchidos completamente com uma solução aquosa de safranina a uma concentração de 0,1 M e depois lavados com água para se retirar o excesso de solução. Os tubos foram então fotografados.

#### **4.2.2.2.2. Adsorção de Fosfolipídios em Batelada**

Na adsorção de fosfolipídios em modo batelada foram usados 100 mL de solução de fosfolipídio em etanol na mesma concentração do ensaio anterior. O sistema multitubular foi completamente preenchido com a solução e mantido em repouso por tempo igual ao aplicado no ensaio de adsorção contínua. A temperatura do sistema foi dessa vez mantida a 50° C. A solução foi então drenada e os tubos foram secos sob efeito de vácuo e temperatura, nas mesmas condições do ensaio anterior, por 60 minutos.

---

Ao final da adsorção, foram separados 3 tubos para os ensaios de rendimento e outros 3 para avaliação da homogeneidade do filme formado, usando os mesmos procedimentos descritos no item 4.2.2.2.1.

#### **4.2.2.2.3. Comparação dos Lipossomas Produzidos a Partir de Filmes Depositados por Adsorção Contínua e em Batelada**

Para comparação dos lipossomas obtidos a partir de filmes depositados pelos modos de operação de adsorção em batelada e contínua, os ensaios foram feitos com o sistema multitubular preenchido com 21 tubos de vidro de 4,0 mm de diâmetro interno e 10,5 cm de comprimento, mantendo constante todas as demais condições de processo.

No modo de adsorção contínua foram circulados 150 mL de uma solução de Epikuron 200SH em etanol, de concentração 85 mM, a uma vazão de 30 mL/min durante 30 minutos para permitir a adsorção do fosfolípido nas paredes internas dos tubos de vidro do sistema multitubular. Para possibilitar a solubilização do fosfolípido em etanol a solução foi previamente aquecida a 60 °C e todo o processo de adsorção foi conduzido nesta temperatura. Em seguida a solução foi drenada e iniciou-se o processo de secagem do filme depositado nas paredes, pela evaporação do solvente utilizando-se vácuo de 200 mbar e temperatura de 80 °C durante o período de 1 hora.

Encerrado o processo de secagem procedeu-se a hidratação do filme seco aderido à superfície dos tubos de vidro pela circulação de uma solução tampão durante 1 hora a uma vazão de 930 mL/min. Foram utilizados na hidratação 100 mL de solução tampão HEPES 10 mM e pH 7,4. Todo o processo de hidratação foi conduzido a temperatura de 60 °C, superior à temperatura de transição de fases do Epikuron 200SH que é de aproximadamente 51 °C.

Ao final do processo de hidratação a solução contendo os lipossomas foi drenada e analisada quanto ao diâmetro médio das partículas e teor de fosfolípidios, através do método modificado de CHEN conforme o item 4.2.2.1.3.

No modo de operação em batelada todos os tubos de vidro do sistema multitubular foram preenchidos com a solução de Epikuron 200SH (85 mM) em etanol e deixados em repouso durante 30 minutos. A temperatura durante o processo foi mantida a 60 °C.

---

Decorrido o tempo de adsorção a solução foi drenada e o filme foi seco e depois hidratado através do mesmo procedimento usado para o experimento de adsorção em contínuo. Por fim a solução foi analisada quanto ao teor de fosfolipídios e diâmetro médio das partículas.

#### **4.2.2.2.4. Cinética de Adsorção do Fosfolipídio**

Para determinação da cinética de adsorção do fosfolipídio nas paredes internas do tubo de vidro foi utilizado um módulo composto de 37 tubos de vidro de 1,6 mm de diâmetro interno e 11,0 cm de comprimento. Foi feita a circulação de 100 mL de solução de Epikuron 200SH em etanol na concentração de 5 mM a uma vazão de 35 ml/min. A temperatura durante o ensaio foi mantida a 60 °C.

Amostras da solução lipídica foram retiradas em diversos tempos e analisadas quanto ao teor de fosfolipídios usando o método modificado de CHEN de acordo com o item 4.2.2.1.3. A quantidade adsorvida foi calculada pela diferença entre as concentrações nos tempos de amostragem e a concentração inicial.

### **4.3.3. Produção de Lipossomas**

#### **4.3.3.1. Cinética de Formação dos Lipossomas**

Nos experimentos de formação de lipossomas com o tempo o sistema multitubular foi composto de 37 tubos de vidro de 1,6 mm de diâmetro interno e 11,0 cm de comprimento. O tanque de lipídios e a tubulação desde o tanque até a entrada do sistema multitubular foram equipados com uma cinta de aquecimento para facilitar a dissolução dos fosfolipídios e aquecer a linha a fim de evitar que os lipídios precipitassem durante o escoamento da solução ou na entrada do sistema multitubular.

Primeiramente os fosfolipídios foram dissolvidos em 80 mL de etanol através do aquecimento a 60 °C durante aproximadamente 7 minutos, acompanhado de agitação da mistura. Em seguida foi feita a circulação desta solução através dos tubos de vidro a uma vazão de 35 mL/min durante 30 minutos para promover a adsorção dos fosfolipídios nas paredes dos tubos de vidro. A temperatura dos ensaios foi mantida em 60 °C.

---

Decorrido o tempo de adsorção a solução foi drenada e o filme formado foi seco pela evaporação do solvente através da aplicação de vácuo de 200 mbar e temperatura de 80 °C durante o período de 1 hora.

Ao final da etapa de secagem o filme foi hidratado pela circulação de 100 mL de solução tampão HEPES (10 mM e pH 7,4) durante 1 hora a uma vazão de 640 mL/min. A temperatura durante a etapa de hidratação foi mantida em 60 °C. Foram recolhidas amostras nos tempos de 1, 2, 5, 10, 25, 45 e 60 minutos, que foram analisadas quanto a absorbância a 340 nm, ao teor de fosfolipídios e diâmetro médio das vesículas.

Esse procedimento foi repetido para as 6 concentrações analisadas neste experimento: 5, 20, 40, 60, 85 e 127 mM.

#### **4.3.3.1.1. Influência da Vazão de Circulação na Formação dos Lipossomas**

Para analisar a influência da vazão de circulação nas propriedades dos lipossomas formados e no rendimento do processo, foi realizado experimento semelhante aos experimentos do item 4.3.3.1.

Neste ensaio foi utilizada uma solução de Epikuron 200SH (85 mM) em etanol para formação do filme lipídico nas mesmas usadas no item 4.3.3.1. Durante a etapa de hidratação utilizou-se uma vazão de circulação de solução tampão de 930 mL/min para permitir a formação dos lipossomas. O tempo de circulação da solução, o volume de tampão utilizado e a temperatura da operação foram as mesmas usadas no item 4.3.3.1.

Novamente foram retiradas amostras nos tempos 1, 2, 5, 10, 25, 45 e 60 minutos para serem analisadas quanto à absorbância a 340 nm, ao teor de fosfolipídios e a diâmetro médio da população de lipossomas produzida.

#### **4.3.3.1.2. Influência da Adição de Colesterol na Formação dos Lipossomas**

Foi realizado experimento para determinar o efeito da incorporação de colesterol nas vesículas formadas. Neste experimento o filme lipídico foi formado pela circulação de 80 mL de uma solução lipídica em etanol contendo 59,5 mM de Epikuron 200SH e 25,5

---

mM de colesterol (razão molar 7:3). O tempo de circulação foi de 30 minutos e a vazão de circulação foi de 35 mL/min. A temperatura de adsorção foi mantida em 60 °C.

As etapas de secagem e hidratação foram conduzidas da mesma forma, e utilizando as mesmas condições, do item 4.3.3.3. Foram retiradas amostras com o tempo durante a etapa de hidratação, que foram analisadas quanto à absorbância a 340 mM, ao teor de fosfolípido e ao diâmetro médio das vesículas formadas.

#### **4.3.3.2. Caracterização dos Lipossomas**

##### **4.3.3.2.1. Teor de Fosfolípidios**

A dispersão de lipossomas foi analisada quanto ao teor de fosfolípidios empregando-se o método modificado de CHEN, conforme descrito no item 4.2.2.1.3.

##### **4.3.3.2.2. Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanhos**

A dispersão foi analisada quanto ao diâmetro médio das vesículas e à distribuição de tamanhos, utilizando-se a técnica de espectroscopia de espalhamento de luz a 90 ° por incidência de raios laser, produzidos por uma fonte de laser He-Ne com potência de 32mW (quase elastic light scattering, QLS). As medidas foram realizadas considerando-se o índice de refração do lipídio 1,348 e a viscosidade da água 0,89.

##### **4.3.3.2.3. Estabilidade de Lipossomas em Presença de Tensoativo não Iônico**

A estabilidade dos lipossomas vazios na presença do tensoativo não iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>, foi determinada através de medidas da absorbância das soluções a 340nm a 25 °C em estado de pseudo-equilíbrio, 2 horas após o início da ação do tensoativo sobre as vesículas. Os experimentos foram feitos em placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços de fundo redondo de 200µL com agitação branda por 3 segundos para a homogeneização antes da leitura. A cada um dos poços da placa foram adicionados 120µL de soluções estoque do tensoativo C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>, dissolvidos em tampão HEPES/NaCl (10mM/120mM) em concentrações

que variaram entre 3 e 96%, e 80 $\mu$ L de lipossomas com concentração da dispersão lipídica de 1mM.

A porcentagem de tensoativo nas soluções foi definida como a razão entre o número de moles de tensoativo e o número de moles total presentes na solução, conforme a equação 15.

$$\% \textit{tensoativo} = 100 * \frac{n_T}{n_T + n_L} \quad (15)$$

Onde  $n_T$  é o número de moles do tensoativo e  $n_L$  é o número de moles da dispersão lipídica.

As amostras foram analisadas em duplicata e os valores médios das absorvâncias de cada amostra foram subtraídos das soluções de mesma concentração de tensoativo na presença de tampão sem a dispersão de lipossomas (controle). Assim, as soluções controle eram constituídas de 120 $\mu$ L de solução de tensoativo e 80 $\mu$ L de solução tampão em substituição ao mesmo volume de solução de lipossomas.

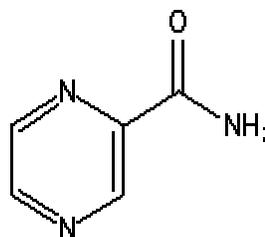
Os resultados foram analisados em termos dos perfis de absorvância versus concentração de tensoativo.

#### 4.3.4. Encapsulação de Pirazinamida em Lipossomas

Os fármacos usados no primeiro tratamento da tuberculose são: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida e Etambutol (RUFFINO NETO, 1998). A Figura 7 apresenta a fórmula estrutural, empírica e a massa molar da Pirazinamida.

**Fórmula química: C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O**

**Massa molar: 123,1g/mol**



(a)

(b)

**Figura 7 – Molécula de Pirazinamida. (a) Fórmula empírica e massa molecular e (b) fórmula estrutural.**

---

A Pirazinamida foi introduzida em 1952, sendo seu mecanismo de ação desconhecido. Entretanto, sabe-se da necessidade de pH ácido para sua atividade bactericida no interior de vesículas citoplasmáticas ou lisossomas. A dose diária recomendada é de 15-30mg/Kg do paciente, sendo a dosagem máxima de 2g. O efeito colateral mais comum associado a este fármaco é a dor nas juntas. A solubilidade da Pirazinamida é de 3g/100mL de água deionizada de pureza Milli-Q, e de 1g/100mL de tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM-pH 7,4). Seu coeficiente de partição em sistemas 1-octanol ou n-dodecano/tampão Hepes/NaCl (10mM/120mM-pH 7,4) é de 0,156 e 0,015, respectivamente, o que sugere a sua localização no meio aquoso da estrutura dos lipossomas (ALVES, 2003).

Neste trabalho foram estudados dois procedimentos para encapsular o tuberculostático Pirazinamida no interior dos lipossomas.

#### **4.3.4.1. Adição de Pirazinamida na Solução de Hidratação**

Neste ensaio (Procedimento 1) foi feita a adsorção de um filme lipídico nas paredes internas dos tubos de vidro, usando uma solução de Epikuron 200SH em etanol de concentração 127 mM. O procedimento de adsorção e secagem, bem como as condições empregadas nestas duas etapas, foram as mesmas que as do item 4.3.3.1.

A hidratação do filme seco formado nas paredes dos tubos de vidro foi feita pela circulação de 100 mL de uma solução tampão HEPES, contendo o tuberculostático Pirazinamida dissolvido. A solução de hidratação utilizada era composta de HEPES na concentração 10 mM e Pirazinamida na concentração 25 mM.

Foram retiradas amostras durante um determinado intervalo de tempo para se avaliar o teor de fosfolipídios e o diâmetro médio da população de lipossomas.

#### **4.3.4.2. Adição de Pirazinamida no Filme Lipídico**

Para estudar a encapsulação da Pirazinamida incorporada no filme lipídico (Procedimento 2) foi feita a adsorção usando uma solução de Epikuron 200SH (127 mM)

---

em etanol contendo ainda Pirazinamida na concentração 37,5 mM. O procedimento de adsorção e secagem, e as condições empregadas, foram os mesmas que as do item 4.3.3.1.

A hidratação do filme lipídico seco foi feita circulando-se 100 mL de solução tampão HEPES, nas mesmas condições apresentadas no item 4.3.3.1.

#### **4.3.4.3. Determinação da Eficiência de Encapsulação da Pirazinamida**

A eficiência da encapsulação de Pirazinamida foi determinada através dos perfis que relacionam as razões fármaco/lipídio inicial e final (encapsulado) e pelo parâmetro eficiência de encapsulação (EE), calculado através da Equação 16.

$$E_E = 100 * \frac{(F/L)_F}{(F/L)_0} \quad (16)$$

Onde F é a concentração de fármaco, L é a concentração de lipídio, e os índices 0 e F representam respectivamente os tempos inicial e final.

A concentração do fármaco total foi calculada através da determinação da absorbância a 260 nm, usando curva de calibração previamente construída (Anexo III), após os lipossomas terem sido desagregados pela ação de etanol durante 2 horas. Para determinação do fármaco encapsulado nos lipossomas foi feita a centrifugação da dispersão, a 3000 rpm por 30 minutos, e leitura direta da absorbância do sobrenadante a 260 nm. O fármaco final encapsulado nos lipossomas foi calculado pela diferença entre o fármaco total, quantificado antes da separação do fármaco por centrifugação, e o não encapsulado presente no sobrenadante.

#### **4.3.5. Liberação da Pirazinamida Encapsulada nos Lipossomas**

Os ensaios de liberação da Pirazinamida foram feitos utilizando sacos de diálise tipo envelope com diâmetro de corte de 20 KDa como membrana de separação entre a amostra e o meio aquoso.

Nos ensaios de liberação do fármaco foram utilizados 3 mL de dispersão de lipossomas, e o meio aquoso foi composto de 300 e 100 mL de solução tampão HEPES

10mM e pH 7,4, para liberação da Pirazinamida encapsulada conforme os procedimentos 1 e 2 do item 4.3.4.

A avaliação da liberação da Pirazinamida foi feita com os lipossomas contendo o fármaco encapsulado, separados da dispersão inicial de lipossomas por centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos e resuspensão em tampão HEPES 10mM e pH 7,4.

Os sacos de diálise eram preenchidos com a dispersão de lipossomas e depois imersos no meio aquoso mantido sob agitação recíproca a 37 °C. Foram retiradas alíquotas de 2mL nos tempos: 0, 5, 10, 15, 30 e 45 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 24 horas. O fármaco liberado foi quantificado através da leitura da absorbância a 260nm e utilização de curva de calibração previamente construída (Anexo IV).

#### 4.3.5.1. Modelo de Difusão de Solute em Esferas Sólidas

A permeação dos fármacos através das vesículas foi representada matematicamente pelo modelo físico de difusão de solutos no interior de esferas sólidas, descrito pela lei de Fick. No modelo, não foram consideradas as limitações interfaciais impostas pela membrana de diálise usada nos experimentos.

Em coordenadas esféricas e considerando somente a difusão na direção radial das partículas, o modelo de difusão pode ser representado por:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{1}{D} \frac{\partial c}{\partial t} \quad (17)$$

A equação (17) foi resolvida considerando as seguintes condições de contorno:

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

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

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

A solução da equação (17) gera uma série de Fourier de senos, a qual fornece a seguinte expressão para o perfil de concentração no interior das partículas representada pela equação (18):

$$c(r,t) = -2c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right] \frac{\text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right)}{\left(\frac{n\pi r}{R}\right)} \quad (18)$$

A quantidade total do soluto difundido no solvente (considerando N partículas) é representada pela equação (19):

$$c(t) = N \int_0^R c(r,t) 4\pi r^2 dr = N \left[ -2c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right]}{\frac{n\pi}{R}} \int \frac{\text{sen}\left(\frac{n\pi r}{R}\right)}{r} 4\pi r^2 dr \right] \quad (19)$$

De onde o perfil de concentração em função do tempo pode ser calculado pela equação (20):

$$\frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (20)$$

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

$$\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (21)$$

Onde  $c^*(t)$  é a concentração do fármaco difundida para o meio aquoso num tempo  $t$ ,  $c_{\text{int}}$  a quantidade liberada após um tempo infinito, o que corresponde à quantidade total de fármaco incorporado nas partículas no instante inicial do experimento, e  $k$  é a razão  $(D/R^2)$ , onde  $D$  é o coeficiente de difusão do fármaco na estrutura e  $R$  o raio das partículas. O detalhamento da dedução matemática do modelo é apresentado no Anexo II.

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

Os dados ajustados referem-se ao modelo de difusão e consiste matematicamente em uma função representada por uma série, onde o parâmetro a ser obtido,  $k$ , pertence a todos os termos dessa série, que varia de um a infinito. Obviamente o número de termos da série é um valor, que para propósitos práticos representa o valor exato da função. Desta forma utilizou-se 1000 termos da série. Este valor foi muito maior que o necessário, visto que após algum tempo ocorria a convergência da série, bastando apenas o primeiro termo para representar a função. O único ponto crítico é quando  $t$  tende a zero. Neste caso a série apresenta problemas de oscilação. Entretanto, no limite quando  $t$  tende a zero, a série é representada pela função:

$$\frac{M(t)}{M_{\infty}} = 3 \left( \frac{2(kt)^{\frac{1}{2}}}{\pi^{\frac{1}{2}}} - kt \right) \quad (22)$$

Deve-se notar que a equação (22) é a própria série do limite de  $t$  tendendo a zero, e não uma aproximação da mesma conforme GUY *et al.*, 1982.

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

$$P = \frac{J}{\Delta c} \quad (23)$$

Em termos da constante  $k$  usada no modelo (equação (21)), a permeabilidade pode ser expressa considerando o comprimento característico de uma esfera, ou seja, a razão  $V/A$ :

$$P = \frac{k V}{A} \quad (24)$$

, onde  $V$  e  $A$  são o volume e a área superficial das partículas, respectivamente. Nos cálculos, considerou-se o diâmetro principal das vesículas lipídicas.

#### 4.3.5.2. Determinação dos Parâmetros do Modelo de Difusão de Solute em Esferas Sólidas Utilizando-se o Método da Máxima Verossimilhança

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

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

O ajuste é feito pela minimização da função S dada pelas equações (25) a (28):

$$S = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N [W_{x_i} \varepsilon_{x_i}^2 + W_{y_i} \varepsilon_{y_i}^2] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N [\dots W_{x_i} (X_i - x_i)^2 + W_{y_i} (Y_i - y_i)^2] = \text{mínimo} \quad (25)$$

$$W_{x_i} = \frac{1}{\sigma_{x_i}^2} \quad i = 1, \dots, N \quad (26)$$

$$W_{y_i} = \frac{1}{\sigma_{y_i}^2} \quad i = 1, \dots, N \quad (27)$$

$$F = (x_i, y_i; a_1, \dots, a_p) = 0 \quad (28)$$

A minimização da função S, sujeita a N restrições  $F=0$ , requer o uso de multiplicadores de Lagrange  $\lambda_i$  (equações 29-32):

$$\left( \frac{\partial S}{\partial a_j} \right) + \sum_{i=1}^N \lambda_i \left( \frac{\partial F_i}{\partial a_j} \right) = 0 \quad j = 1, \dots, P \quad (29)$$

$$F(x_i, y_i; a_1, \dots, a_p) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (30)$$

$$\left(\frac{\partial S}{\partial x_i}\right) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial x_i}\right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (31)$$

$$\left(\frac{\partial S}{\partial y_i}\right) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial y_i}\right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (32)$$

Considerando S independente (explicitamente) dos parâmetros  $a_j$ :  $\left(\left(\frac{\partial S}{\partial a_j}\right) = 0\right)$ , e que cada ponto  $(x_i, y_i)$  é independente dos demais  $\left(\left(\frac{\partial F_i}{\partial x_i}\right) = \left(\frac{\partial F_i}{\partial y_i}\right) = 0, i \neq j\right)$ , o sistema de equações (33-36) toma a forma:

$$\sum_{i=1}^N \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial a_j}\right) = 0 \quad j = 1, \dots, P \quad (33)$$

$$F(x_i, y_i; a_1, \dots, a_p) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (34)$$

$$-W_{y_i}(Y_i - y_i) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial y_i}\right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (35)$$

$$-W_{x_i}(X_i - x_i) + \lambda_i \left(\frac{\partial F_i}{\partial x_i}\right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (36)$$

Para o caso de modelos, o sistema de equações (37-40) pode ser colocado na forma explícita,  $F(x, y; a_1, \dots, a_p) = y - f(x; a_1, \dots, a_p) = 0$ , que reescritas tomam a forma:

$$\sum_{i=1}^N \lambda_i \left(\frac{\partial f_i}{\partial a_j}\right) = 0 \quad j = 1, \dots, P \quad (37)$$

$$y_i - f(x_i; a_1, \dots, a_p) \quad i = 1, \dots, N \quad (38)$$

$$\varepsilon_{y_i} - \sum y \lambda_i = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (39)$$

$$\varepsilon_{x_i} + x \lambda_i \left( \frac{\partial f_i}{\partial X_i} \right) = 0 \quad i = 1, \dots, N \quad (40)$$

O sistema de equações para a determinação de funções implícitas em relação aos parâmetros (equações 36-36) ou explícitas em relação aos parâmetros (equações 37-40) sempre leva à resolução de um sistema de equações não linear (DRAPER e SMITH, 1981), mesmo que o modelo seja tão simples como uma reta, contendo apenas o coeficiente angular como parâmetro a ser determinado.

#### 4.3.6. Modelagem da Cinética de Formação dos Lipossomas

Para simular a formação dos lipossomas com o tempo durante a etapa de hidratação foi construído um modelo matemático baseado em modelo desenvolvido por MORTHA *et al.*, 1993, para a descrever a dissolução de tabletes de comprimidos em solução aquosa.

De acordo com o modelo proposto por MORTHA *et al.*, a dissolução do comprimido é um processo que depende tanto da penetração de água no tablete, que é considerado um sólido poroso, quanto da reação de dissolução das espécies constituintes.

A penetração da água nos poros do tablete é influenciada pela força de capilaridade, entre o líquido e a superfície dos poros, que direciona o líquido para dentro dos poros e a força de arraste viscosa, exercida nas paredes dos poros, que se opõe à penetração do líquido nos poros.

Considerando que a penetração do líquido nos poros segue a Equação de Washburn (WASHBURN, 1921) aplicada a um sólido poroso podemos escrever que:

$$L = \sqrt{\frac{\sigma \cdot \cos \theta \cdot d_H}{4 \cdot \tau^2 \cdot \eta}} \cdot \sqrt{t} \quad (41)$$

Em muitos casos, porém, essa equação não é válida para todas as fases da penetração do líquido no sólido, devido à existência de condições de estado não estacionário no fluxo de líquido. Sugere-se nesses casos a utilização de uma cinética de penetração que utilize a constante de penetração  $K$ , que pode ser escrita como:

$$L = K.t^{m(t)} \quad (42)$$

Onde que  $m(t)$  varia de 1, no início da penetração, até 0, no fim da penetração.

Como ocorrem modificações no tablete e na solução aquosa, pela dissolução das espécies, o valor de  $K$  também não é constante com tempo. Pode-se dessa forma escrever a equação (42) de outra forma mais adequada para os cálculos.

$$L = K(t).t^m \quad (43)$$

A diferenciação da equação (43) leva à equação modificada da velocidade de penetração.

$$\frac{dL}{dt} = \frac{L}{K} \cdot \frac{dK}{dt} + m.K^{\frac{1}{m}}.L^{\frac{m-1}{m}} \quad (44)$$

A integração da equação (44) leva à equação (41) no caso de  $m = 0,5$  e

$$K = K_0 = \left( \frac{\sigma \cdot \cos \theta \cdot d_H}{4 \cdot \tau^2 \cdot \eta} \right)^{0,5}$$

A desintegração do tablete resulta da reação dos constituintes, dentro dos poros, quando entram em contato com o líquido, e é limitada tanto pela taxa de reação dos constituintes quanto pela transferência de massa interna e externa.

- Limitação pela transferência de massa externa das espécies dissolvidas

A transferência de massa resulta da diferença de concentração das espécies em uma camada de líquido próxima a superfície do sólido,  $C_s$ , e a concentração no meio líquido externo,  $C_{ext}$ . O fenômeno pode ser representado pela equação (45), em que  $k_d$  é o

coeficiente de transferência de massa, e  $S_{ext}$  é a área externa do tablete que pode ser calculada pela equação (46).

$$\frac{dm}{dt} = k_d \cdot S_{ext} \cdot (C_s - C_{ext}) \quad (45)$$

$$S_{ext} = S_0 \left( 1 - \frac{\varepsilon}{\tau} \right) \quad (46)$$

O coeficiente de transferência de massa  $k_d$  pode ser calculado através de correlações envolvendo os grupamentos adimensionais Sherwood e Schmidt.

$$Sh = \alpha \cdot Re^\beta \cdot Sc^\gamma \quad (47)$$

em que:  $Sh = \frac{k_d \cdot l}{D}$ ,  $Re = \frac{\rho \cdot v \cdot l}{\eta}$  e  $Sc = \frac{\eta}{\rho \cdot D}$

$\rho$  é a densidade do líquido

$\eta$  é a viscosidade do líquido

$D$  é a difusividade das espécies no líquido

$v$  é a velocidade do líquido

$l$  é o comprimento característico da transferência de massa

- Limitação pela transferência de massa interna das espécies dissolvidas

A massa dissolvida é proporcional à superfície interna molhada e é uma função complexa da difusividade interna, da taxa de reação e da solubilidade das espécies no meio líquido. O fenômeno pode ser representado pela equação (48) em que  $K_{int}$  é uma taxa constante proporcional à desintegração do sólido e  $S_{int}$  é a área dos poros penetrada pelo líquido que para um sólido poroso pode ser expressa pela equação (49).

$$\frac{dm}{dt} = K_{int} \cdot S_{int}(t) \quad (48)$$

$$S_{int}(t) = 4 \cdot \frac{S_0 \cdot \varepsilon}{d_H} \cdot L(t) \quad (49)$$

O valor de  $K_{int}$  é de difícil predição e pode-se supor que seja da mesma ordem de grandeza que o produto da concentração na superfície pela taxa de transporte das espécies dissolvidas através do comprimento dos poros.

#### 4.3.6.1. Construção do Modelo de Formação de Lipossomas a Partir de um Filme Lipídico Seco Depositado sobre uma Superfície de Vidro

Para construção do modelo de dissolução do filme lipídico seco seguido da formação dos lipossomas, considera-se que a penetração do líquido e a desintegração do sólido ocorrem na direção da espessura  $L$ , conforme e representado na figura 8.

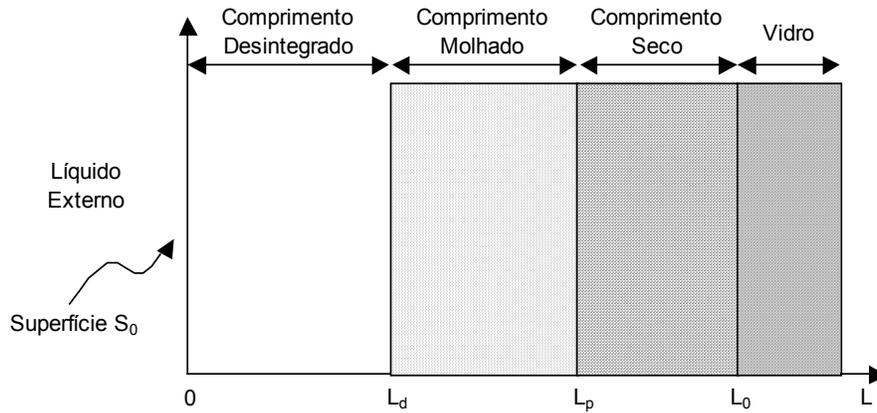


Figura 8 –Representação unidimensional da penetração de líquido e da dissolução do filme lipídico seco

A penetração do líquido na porção não desintegrada do filme é  $L = L_p - L_d$  e a velocidade da frente de penetração é  $dL_p/dt$  e pode ser expressa através da equação (26).

$$\frac{dL_p}{dt} = \frac{dL_d}{dt} + \frac{L_p - L_d}{K} \cdot \frac{dK}{dt} + m \cdot K^{\frac{1}{m}} \cdot (L_p - L_d)^{\frac{m-1}{m}} \quad (50)$$

A massa desintegrada na superfície do filme é considerada uma contribuição dos fenômenos externo e interno de transferência de massa e também da taxa de consumo de moléculas de fosfolípidios para formar os agregados.

Assume-se que a taxa de consumo de moléculas de fosfolípidios segue uma cinética de primeira ordem com relação à concentração de vesículas.

A variação da massa de fosfolipídios com o tempo é dada por:

$$\frac{dm}{dt} = K_{ext} \cdot S_0 \cdot \left(1 - \frac{\varepsilon}{\tau}\right) + K_{int} \cdot S_0 \cdot \frac{4 \cdot \varepsilon}{d_H} (L_p - L_d) - K_v \cdot C_v \quad (51)$$

em que  $C_v$  é a concentração de vesículas e  $K_v$  é a taxa de reação de produção de vesículas.

Admitimos que a variação da concentração de vesículas com tempo segue uma cinética representada pela equação (52).

$$C_v(t) = \frac{K_t \cdot t}{K_t' + t} \quad (52)$$

A taxa de dissolução do filme lipídico, por outro lado, é proporcional à frente de desintegração  $dL_d/dt$  de acordo com a equação (53).

$$\frac{dm}{dt} = \rho \cdot S_0 \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \frac{dL_d}{dt} \quad (53)$$

A combinação das equações (50), (51) e (53) constitui o modelo matemático representativo da penetração de água no filme e desintegração simultânea, levando à formação dos lipossomas.

A variação da constante de penetração  $K$  pode ser representada de modo empírico através da equação (54).

$$K = K_0 \cdot (1 + a \cdot t^n) \quad (54)$$



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Projeto

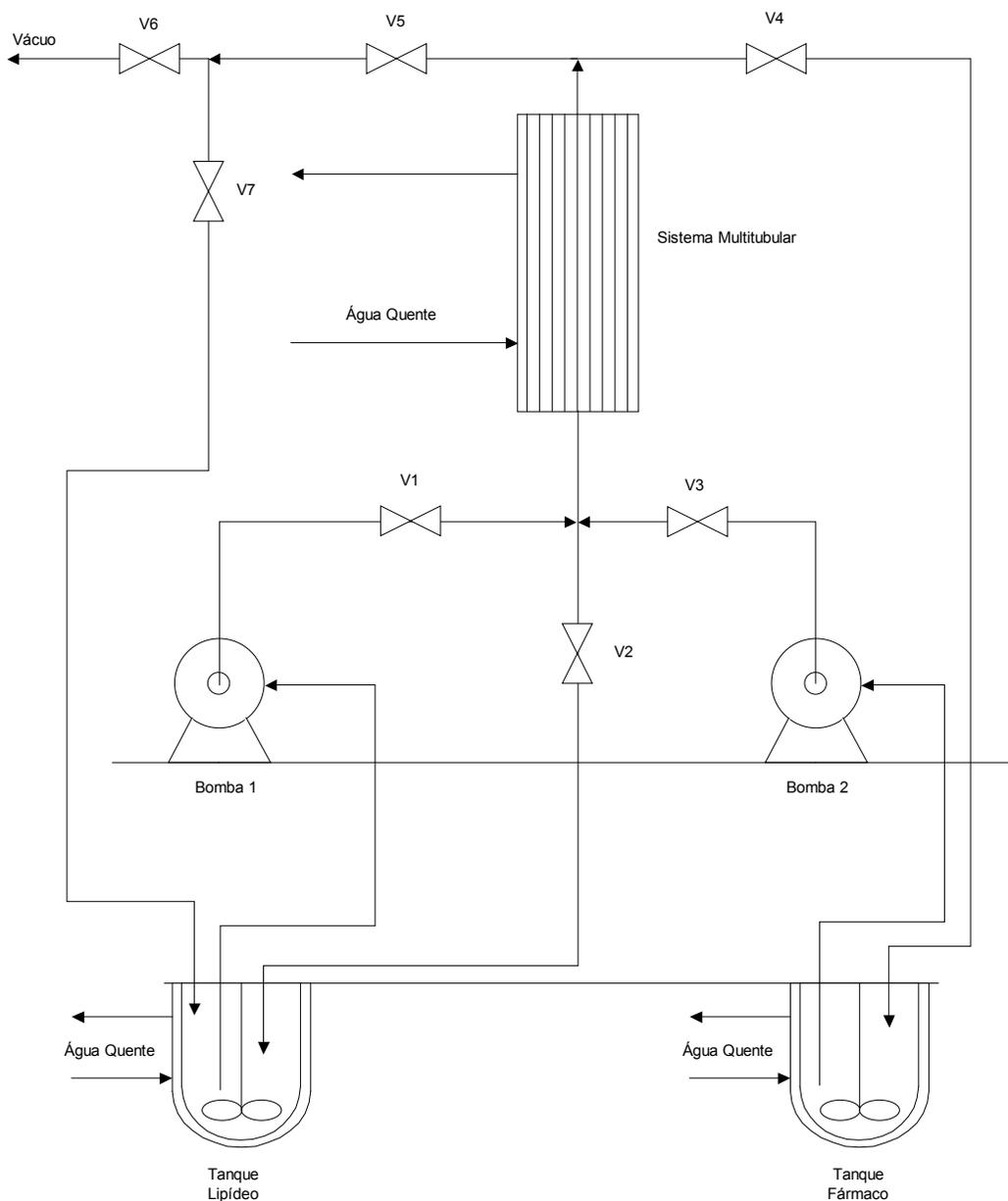
#### 5.1.1. Concepção do Processo

A primeira etapa do projeto correspondeu à definição do processo escalonável para produção de lipossomas a partir de estruturas lipídicas secas.

Dentro desse contexto, foi tomado como base o processo patenteado por TOURNIER et al., 1999, pela sua simplicidade, facilidade de esterilização e capacidade de operação contínua. Nesse processo, as estruturas lipídicas secas são produzidas e hidratadas no interior de um sistema multitubular. O processo total é composto de duas grandes partes: formação e homogeneização dos lipossomas produzidos. Neste trabalho, foi considerada para estudo somente a parte de formação dos lipossomas, cujo fluxograma de processo, adaptado da patente de TOURNIER et al., 1999, é apresentado na Figura 9.

De acordo com o fluxograma apresentado na Figura 9, os lipossomas são formados em 3 etapas principais: alimentação da dispersão de lipídios, secagem do solvente para formação das estruturas secas e hidratação das estruturas.

Na primeira etapa, inicialmente a solução de fosfolipídio em solvente orgânico previamente preparada é colocada em um tanque agitado e aquecido (tanque de lipídio) para melhorar a dispersão dos fosfolipídios. A solução lipídica é alimentada ao sistema multitubular através da bomba peristáltica 1, de modo contínuo ou descontínuo, conforme o ensaio.



**Figura 9 - Fluxograma do processo de formação de lipossomas a partir de estruturas lipídicas secas produzidas no interior de um sistema multitubular.**

Após o contato com a superfície interna dos tubos para adsorção dos fosfolipídios, o excesso de solvente é drenado, e evaporado a vácuo na segunda etapa do processo.

Na terceira etapa, a hidratação das estruturas lipídicas é feita através de uma solução aquosa, contendo ou não uma substância ativa a ser encapsulada, proveniente de um reservatório, tanque de fármaco, que é também equipado com sistema de agitação e aquecimento para homogeneização da solução e solubilização das moléculas. A solução é

---

então circulada entre o sistema multitubular e o tanque de fármaco, por meio da bomba peristáltica 2. Essa circulação da solução tem como objetivo não somente hidratar as estruturas secas formadas, mas também adicionar energia cinética ao sistema para conduzir à formação dos lipossomas.

O sistema multitubular é aquecido tanto na etapa de formação da estrutura lipídica seca, para ajudar na evaporação do solvente, quanto na etapa de circulação da solução aquosa, para que a temperatura da hidratação seja superior à temperatura de transição de fase dos fosfolipídios.

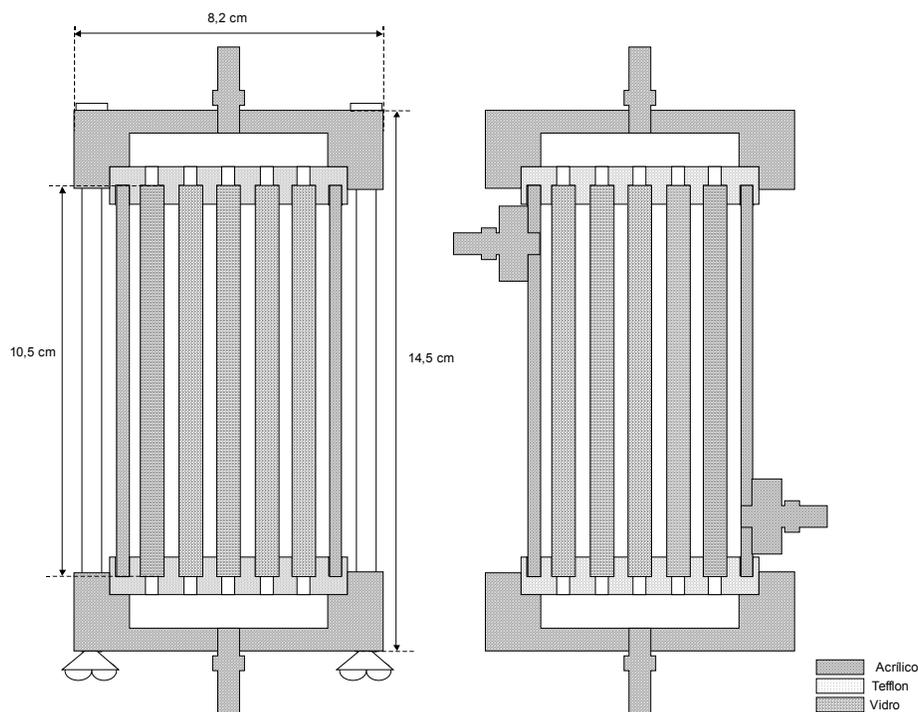
A passagem de uma etapa do processo de produção para outra é feita através de um conjunto de 7 válvulas. Assim sendo, na etapa de preenchimento do sistema multitubular com solução de fosfolipídios as válvulas V2, V3, V4 e V6 permanecem fechadas e as válvulas V1, V5 e V7 ficam abertas. Para que seja feita a drenagem da solução lipídica a válvula V2 é aberta e válvula V1 é fechada. Durante a etapa de evaporação do solvente a válvula V6 é aberta e as válvulas V1, V2 e V7 são fechadas. As válvulas V3 e V4 permanecem fechadas e a válvula V5 permanece aberta. Na etapa de circulação da solução aquosa as válvulas V3 e V4 são abertas e as válvulas V5 e V6 são fechadas, enquanto as válvulas V1, V2 e V7 permanecem fechadas.

### **5.1.2. Projeto do Sistema Multitubular**

No projeto do sistema multitubular foram definidas as dimensões dos tubos, o número de tubos e seu arranjo, as dimensões da coluna e os materiais de construção.

Para determinação das dimensões dos tubos foram consideradas as disponibilidades de matéria prima, no caso o Epikuron 200SH, e dos tubos de vidro no mercado. Inicialmente a escolha de tubos de vidro para suporte das estruturas lipídica secas foi feita devido à alta afinidade entre os fosfolipídios e o vidro, por ser o vidro um material quimicamente inerte e que resiste a temperaturas elevadas. O acrílico foi escolhido como material do corpo externo da coluna, pela facilidade de usinagem, resistência a altas temperaturas e a tensões localizadas. Por fim a escolha do teflon como material das bases de sustentação dos tubos foi feita pelo fato deste material ser flexível, quimicamente inerte e resistente a altas temperaturas.

Na figura 10 abaixo é apresentado um desenho esquemático do sistema multitubular projetado.



**Figura 10 - Cortes frontal e lateral no sistema multitubular, mostrando as partes do sistema e os seus materiais de construção.**

### 5.1.3. Especificação dos Equipamentos

Os equipamentos necessários para o funcionamento da instalação para produção de lipossomas, conforme o processo selecionado são: bomba de vácuo, bombas para circulação das soluções orgânica e aquosa, banho termostático e válvulas.

A bomba de vácuo é utilizada tanto para a remoção do solvente levando à formação do filme lipídico seco e secagem da estrutura lipídica expandida, quanto para provocar a perturbação no sistema que leva a formação da estrutura lipídica expandida. Desta forma, deve proporcionar um vácuo final alto, próximo de 1 atm, e também um controle fino do nível do vácuo no sistema, além de permitir a medição precisa do valor do vácuo. A bomba escolhida foi da marca EDWARDS, modelo D-Lab 20-8, que permite atingir uma pressão absoluta que varia de 1 até  $20 \times 10^{-3}$  bar, e que pode movimentar uma quantidade de solvente superior às que serão utilizadas nos testes.

---

Um banho termostático marca Tecnal, modelo TE-184, com capacidade de 8L, vazão de circulação de 12 mL/min e faixa de temperatura de -10 a 99,9 °C, foi especificado para atender às necessidades de aquecimento do sistema multitubular.

A bomba peristáltica para circulação da solução orgânica deve ter controle de vazão e operar na faixa de baixas vazões. Foi escolhida a bomba peristáltica dosadora da marca Milan, modelo BP-601, cuja faixa de vazões é de 20 a 280 mL/min. A vazão é controlada pelo diâmetro da mangueira, pela velocidade, tamanho e rotação do cabeçote.

A bomba peristáltica para circulação da solução aquosa de hidratação deve operar em uma faixa de vazões mais ampla que a da bomba dosadora, devido ao fato que o cisalhamento proporcionado pelo escoamento da solução contribui para a formação e homogeneização dos lipossomas. Foi escolhida uma bomba da marca Cole Palmer, modelo 302FM-B, para a qual foi selecionado um conjunto cabeçote/mangueira para a obtenção de vazões na faixa de 240 a 4500 mL/min.

As válvulas utilizadas nas linhas são de dois tipos: válvulas de fechamento rápido (ON/OFF), utilizadas para direcionamento de fluidos dentro do circuito, e válvulas de regulação, utilizadas para controlar a taxa de drenagem da solução lipídica do sistema multitubular e para controle do vácuo no sistema. As válvulas escolhidas foram do tipo agulha e como material do corpo das válvulas foi escolhido o aço inox 316. Todas as válvulas contam com um selo que permite que seja produzido vácuo no sistema sem que ocorra entrada de ar.

## **5.2. Adsorção dos Fosfolipídios em Filmes Delgados**

### **5.2.1. Adsorção em um Único Tubo**

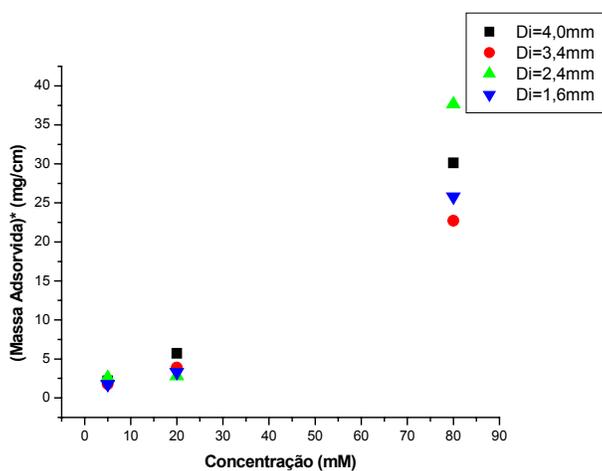
A adsorção de fosfolipídios, estudada inicialmente em um único tubo, foi analisada em termos de massa adsorvida por comprimento característico do tubo, relação entre o volume e área do tubo, e porcentagem de adsorção, ambas em função da concentração inicial da dispersão lipídica, para os vários diâmetros dos tubos.

Resultados preliminares mostraram que nestes experimentos a variável tempo não exerceu influência significativa nos resultados da adsorção. Dessa forma em todos os

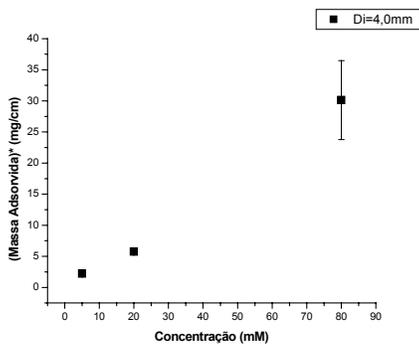
resultados apresentados nos itens 5.2.1 e 5.2.2 foi tomada a média dos resultados dos três tempos estudados nos experimentos, 20, 40 e 60 minutos. Assim pode-se também avaliar o erro associado às determinações das respostas. Os dados dos desvios padrões associados às médias também são apresentados nos resultados dos itens 5.2.1.1 e 5.2.1.2.

### 5.2.1.1. Adsorção de Fosfolípidios em Batelada

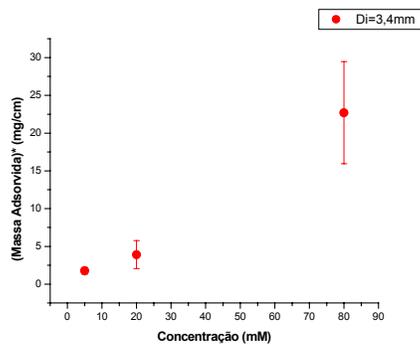
Os resultados obtidos para adsorção dos fosfolípidios em batelada, feita conforme procedimento descrito no item 4.2.2.1.1, são mostrados na Figuras 11 e 12.



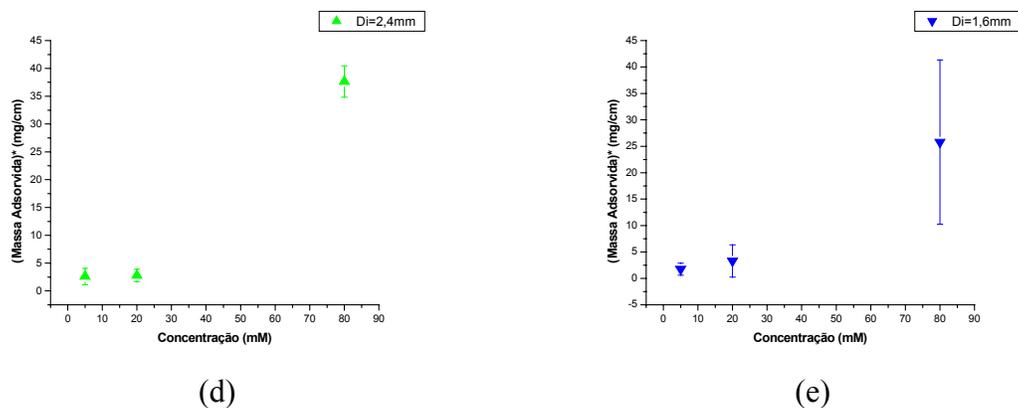
(a)



(b)

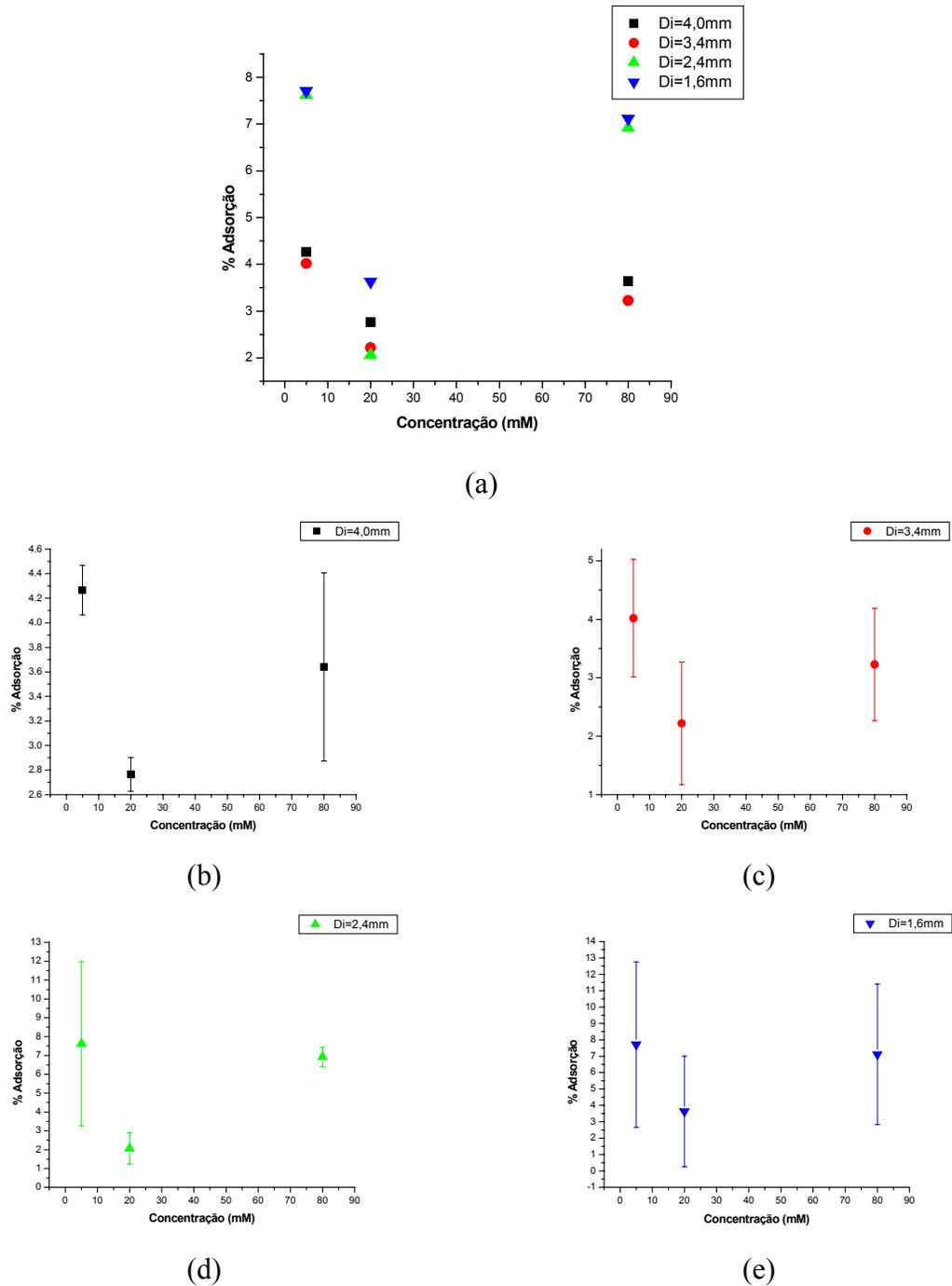


(c)



**Figura 11 - Perfis de massa adsorvida por unidade de comprimento característico do tubo, para ensaios em batelada, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios e do diâmetro interno dos tubos. (a) média dos valores obtidos para tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) médias com suas respectivas barras de erro.**

Os gráficos mostram que apesar da variabilidade dos resultados, existe uma tendência de que a massa adsorvida por unidade de comprimento característico aumenta com o aumento da concentração e parece ser independente do diâmetro do tubo. Isto indica, como esperado, que adsorção dos fosfolipídios depende somente da difusão, para a qual a massa adsorvida é diretamente proporcional à área superficial interna dos tubos e ao volume de solução utilizado. A variabilidade dos resultados é devida às dificuldades de remoção do fosfolipídio do interior dos tubos, bem como à incerteza associada à quantificação de pequena quantidade de fosfolipídios adsorvida em somente 1 tubo. A Figura 10 (a), construída com as médias dos tempos, mostra que para as concentrações das dispersões de fosfolipídios 5 e 20 mM, as massas adsorvidas por comprimento característico são muito baixas, e somente a elevadas concentrações, da ordem de 80mM, é que esses valores tornam-se expressivos e adequados para o processo em questão.



**Figura 12 - Perfis de porcentagem mássica adsorvida, nos ensaios em batelada, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolípidios e do diâmetro interno dos tubos. (a) média dos valores obtidos para tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) médias com suas respectivas barras de erro.**

Quando a massa adsorvida é expressa em termos de percentagem de adsorção, como apresentado na Figura 12, observa-se um decaimento desse valor com o aumento do diâmetro dos tubos. Os valores obtidos são maiores para tubos finos e decrescem de 50% aproximadamente para os diâmetros 3,4 e 4,0 mm. Essa tendência é a mesma para as várias concentrações de fosfolipídios, quando adsorvidos em tubos de 3,4 e 4,0 mm em praticamente todas as situações, dentro das limitações experimentais.

Essa tendência deve-se provavelmente às limitações difusionais presentes em maior proporção nos tubos de maior diâmetro, em decorrência do maior volume de dispersão.

### 5.2.1.2. Adsorção Contínua dos Fosfolipídios

Os resultados da adsorção contínua dos fosfolipídios são apresentados nas Figuras 13, 14 e 15. Nestes gráficos os resultados são apresentados em função do número de Reynolds em vez do diâmetro interno dos tubos, para melhor associar a adsorção com o tipo de escoamento dentro dos tubos.

O número de Reynolds pode ser calculado pela equação (55).

$$\text{Re} = \frac{\rho \cdot v \cdot D_i}{\eta} \quad (55)$$

Onde:  $\rho$  é a massa específica do líquido,  $v$  é a velocidade de escoamento do líquido e  $\eta$  é a viscosidade do líquido. A velocidade de escoamento do líquido é dada por

$$v = Q \cdot \frac{\pi \cdot D_i^2}{4} \quad (56)$$

Onde  $Q$  é a vazão de líquido.

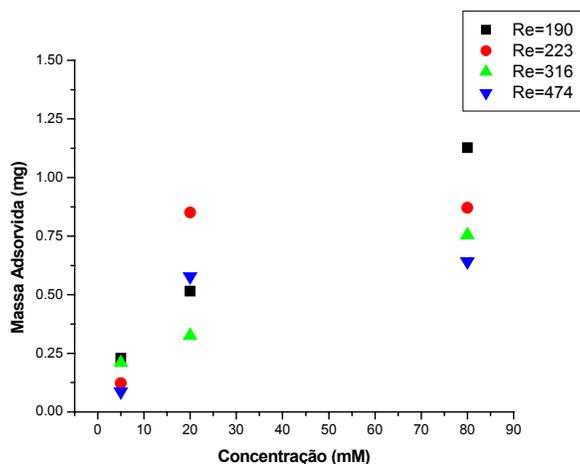
Nos cálculos do número de Reynolds para cada um dos tubos estudados foram usados como constantes:  $\rho = 0,98 \text{ g/cm}^3$ ,  $\eta = 0,0096 \text{ g/cm.s}$  e  $Q = 0,583 \text{ cm}^3/\text{s}$ .

As velocidades de escoamento e os números de Reynolds determinados para cada diâmetro são mostrados na Tabela 4.

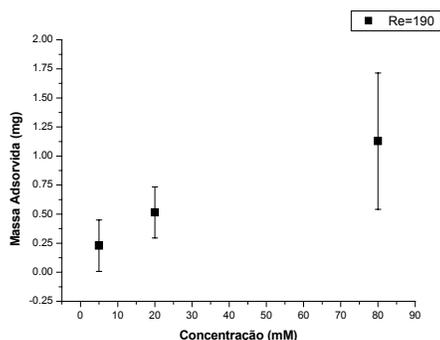
**Tabela 4 - Velocidade do Escoamento e Número de Reynolds calculados para os diâmetros internos estudados.**

$D_i$ (cm)	$v$ (cm/s)	Re
0,16	29,02	473,87
0,24	12,89	315,92
0,34	6,43	223,00
0,40	4,64	189,55

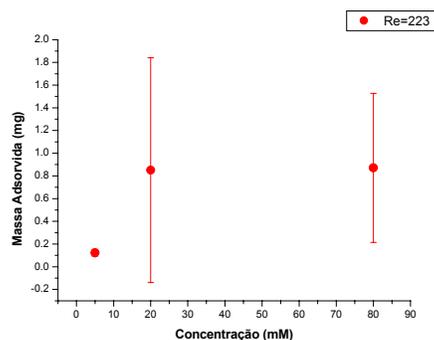
Na Figura 13, observa-se que em média, a massa total adsorvida aumenta acentuadamente quando a concentração da solução de fosfolipídios passa de 5mM para os níveis 20 e 80 mM. (Figura 13 (a)). Devido à variabilidade dos resultados na determinação da massa adsorvida, como mostrado nos gráficos (b), (c), (d) e (e), não se pode inferir sobre o comportamento da massa adsorvida com o diâmetro dos tubos.



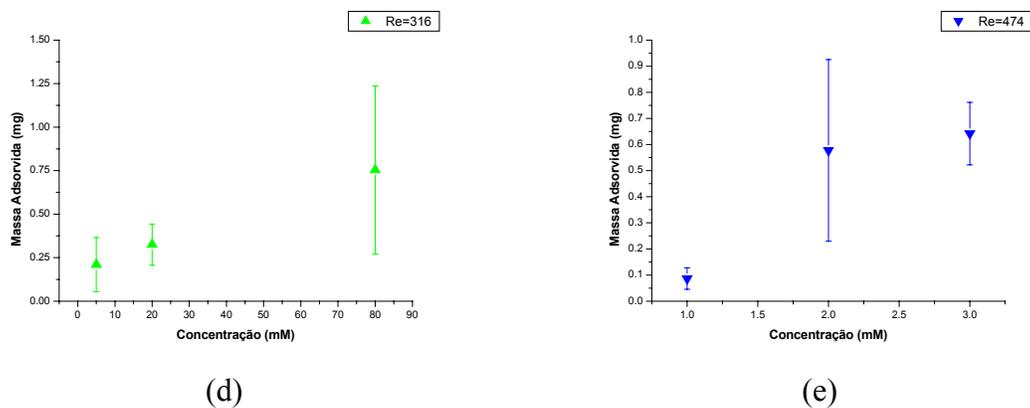
(a)



(b)

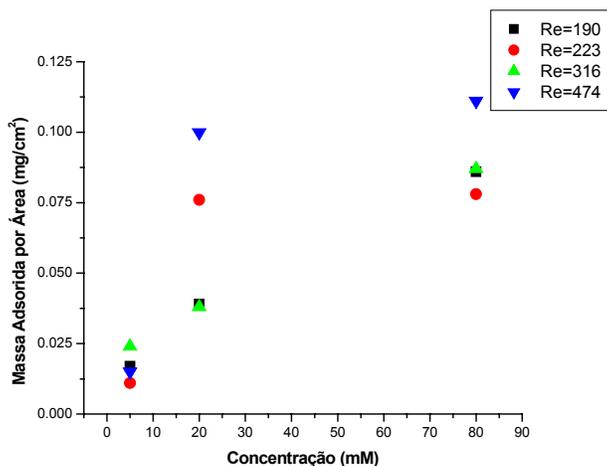


(c)

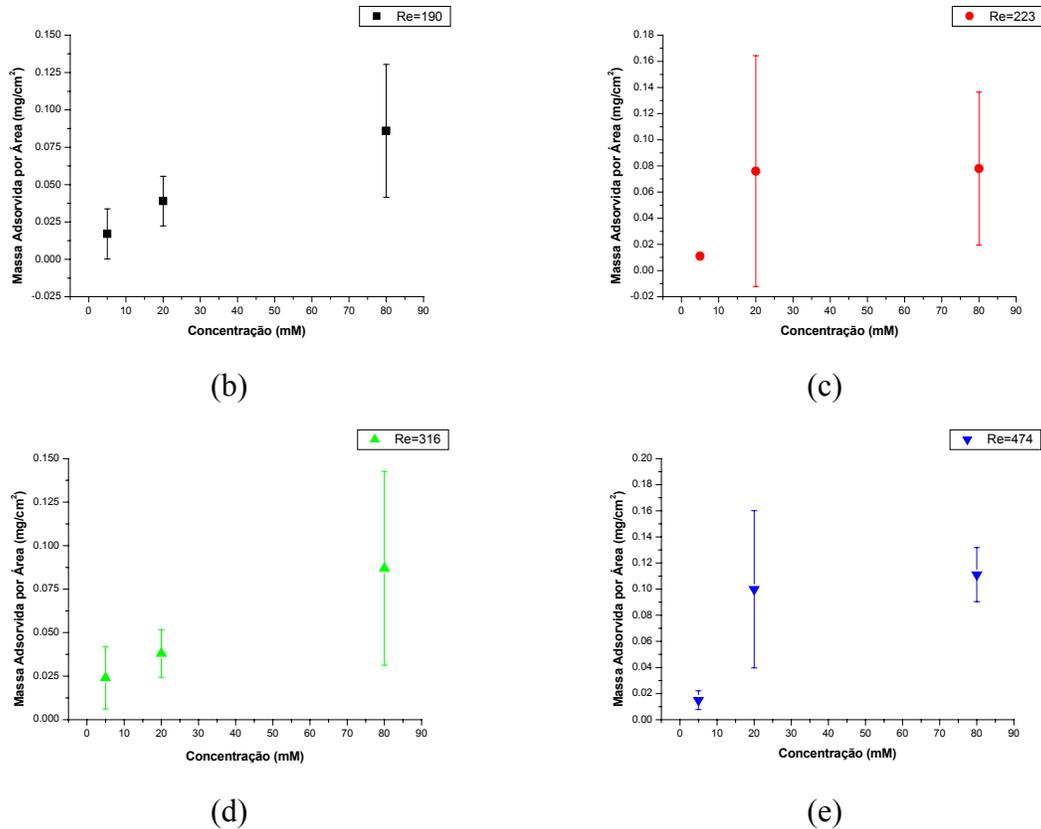


**Figura 13 - Perfis de massa total adsorvida, em ensaio contínuo, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios e do número de Reynolds. (a) médias dos tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) médias dos tempos com suas respectivas barras de erro.**

Os resultados da Figura 14 foram expressos em termos de massa adsorvida por unidade de área superficial interna, uma vez que o volume de dispersão usado na adsorção, foi o mesmo para todos os tubos. A massa adsorvida por unidade de área superficial interna aumentou cerca de 6 vezes quando a adsorção foi feita a partir das soluções de concentração 20 e 80 mM (Figura 14 (a)). Não houve diferença significativa da massa adsorvida com o diâmetro dos tubos uma vez que para os diâmetros estudados os números de Reynolds encontram-se todos na mesma faixa de escoamento laminar.

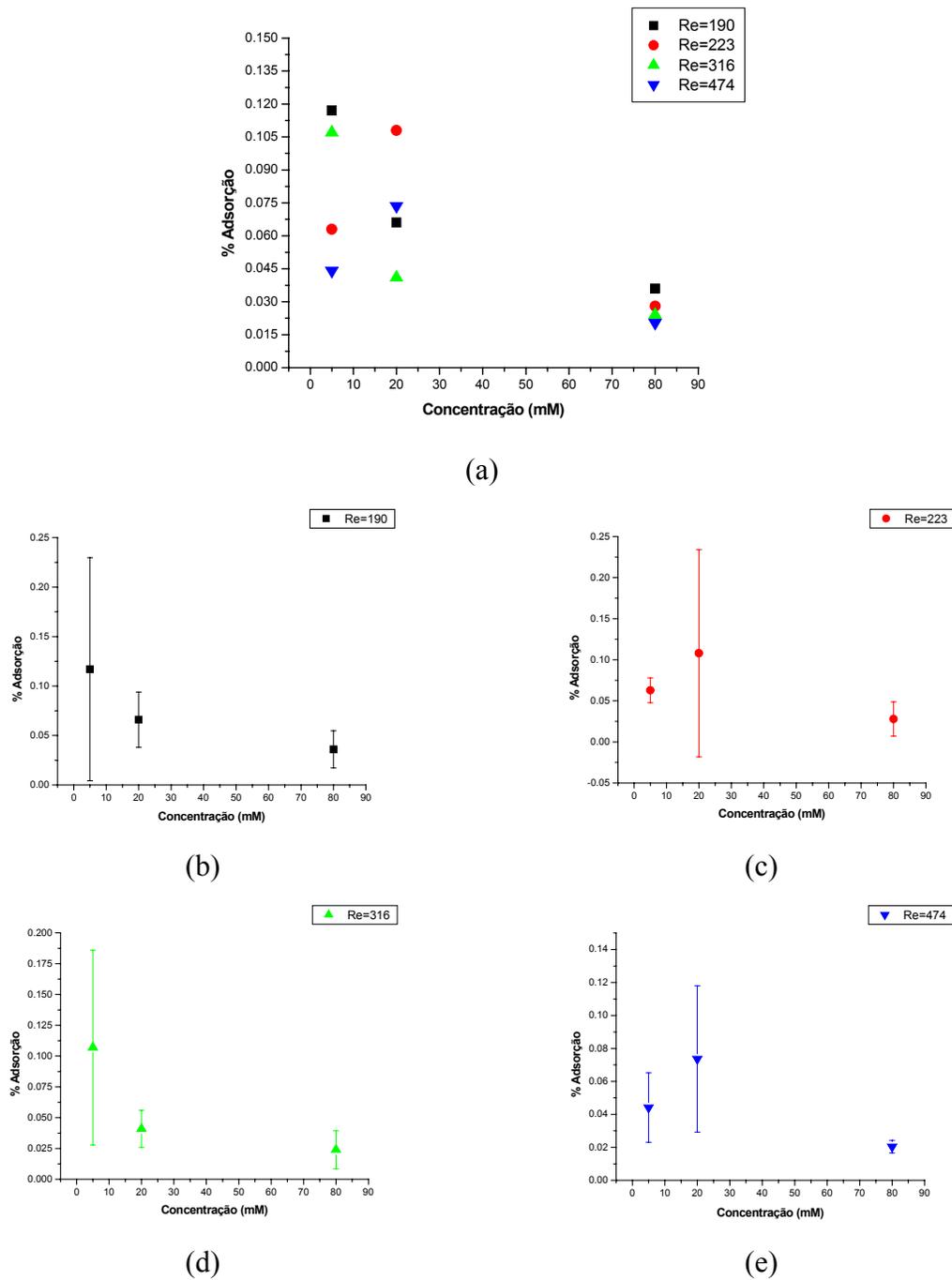


(a)



**Figura 14 -Perfis de massa total adsorvida por unidade de área superficial interna dos tubos, em ensaio contínuo, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolípidios e do número de Reynolds. (a) médias dos tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) médias dos tempos com as suas respectivas barras de erro.**

Apesar da variabilidade dos resultados, observa-se que percentagem mássica adsorvida não apresentou diferenças significativas para as concentrações 5 e 20 mM, porém decresceu acentuadamente para a concentração 80mM, independente do diâmetro dos tubos (Figura 15 (a)).

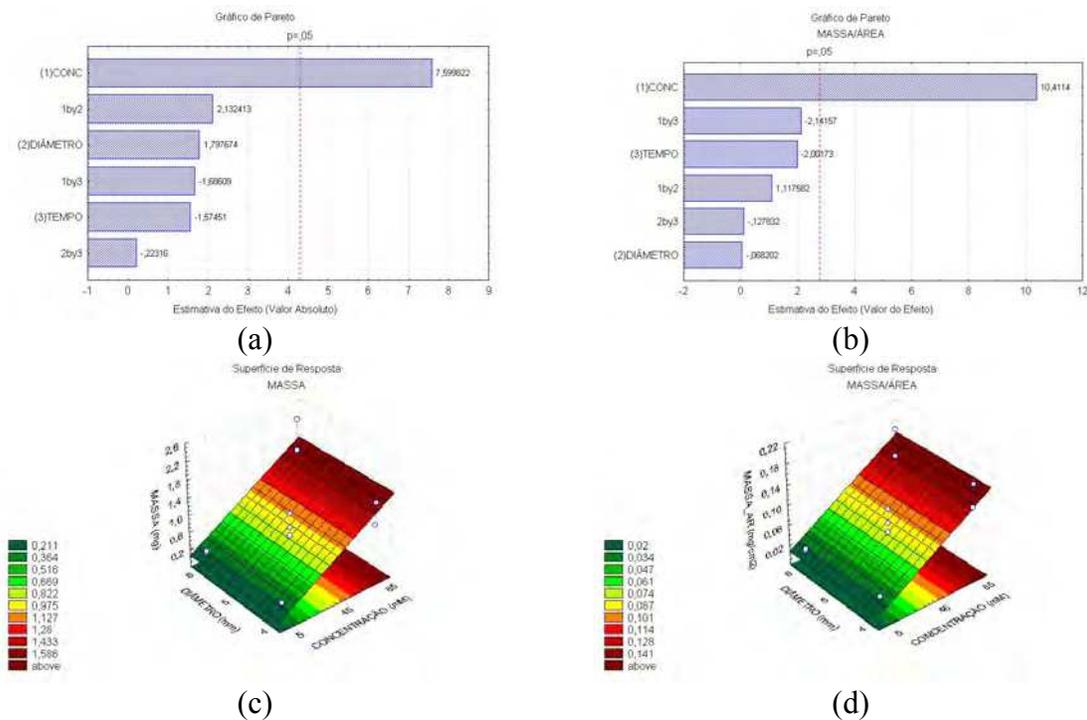


**Figura 15 - Perfis da percentagem mássica adsorvida, em ensaio contínuo, em função da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios e do número de Reynolds. (a) médias dos tempos de contato 10, 30 e 60 minutos. (b), (c), (d) e (e) média dos tempos com as suas respectivas barras de erro.**

### 5.2.1.3. Planejamento Experimental para a Adsorção Contínua de Fosfolipídios

Os resultados obtidos do planejamento estatístico com as variáveis independentes tempo de contato, diâmetro dos tubos e concentração da dispersão de fosfolipídios, tendo como variáveis resposta a massa total adsorvida, a massa adsorvida por unidade de área e a percentagem mássica adsorvida, são mostrados na Figura 16.

Os gráficos de Pareto (Figuras 16 (a) e 16 (b)), para a massa total adsorvida e a massa adsorvida por unidade de área confirmam os resultados anteriormente obtidos, nos quais somente a concentração da solução de fosfolipídios tem efeito significativo na adsorção ao nível de significância 95%. As superfícies de resposta (Figuras 16 (c) e 16 (d)), mostram que a massa total adsorvida expressa tanto em valor absoluto quanto por unidade de área superficial, cresce com a concentração, sendo praticamente independente do diâmetro dos tubos.



**Figura 16 - Gráficos de Pareto (a) e (b) e superfícies de resposta (c) e (d), para as variáveis resposta massa adsorvida e massa adsorvida por área respectivamente.**

### 5.2.2. Adsorção de Fosfolipídios em Sistema Multitubular

A instalação montada de acordo com o fluxograma da Figura 9 apresentou funcionamento adequado, com fácil operação necessitando, porém de alguns melhoramentos para que possa ser utilizada por maiores períodos de tempo sem que ocorram paradas para manutenção. Uma fotografia dessa montagem é apresentada na Figura 17 (b).



(a)



(b)

Figura 17 - Fotografias do Sistema Multitubular e da Instalação para Produção de Lipossomas.

#### 5.2.2.1. Comparação dos Modos de Operação Batelada e Contínuo

Os resultados obtidos para nos ensaios de adsorção em modo contínuo e em batelada em tubos de 4,0 mm, com tempo de contato de 40 minutos e concentração de 85mM de fosfolipídios na dispersão de alimentação, são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5 - Resultados da adsorção de fosfolipídios em sistema multitubular realizada em modo contínuo e em batelada.**

Modo de Adsorção	Massa por tubo (mg)		Massa por Área (mg/cm <sup>2</sup> )		% Adsorção	
	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
<b>Batelada – Conjunto 1</b> Tempo de contato 40 minutos Análise individual dos tubos	2,403	1,104	0,1821	0,0837	2,7309	1,2546
<b>Batelada – Conjunto 2</b> Tempo de contato 30 minutos Análise do conjunto de tubos	12,257	-	0,9289	-	0,18379	-
<b>Contínuo – Conjunto 1</b> Tempo de contato 40 minutos Análise individual dos tubos	1,604	0,571	0,1216	0,0433	0,0160	0,0057
<b>Contínuo – Conjunto 2</b> Tempo de contato 30 minutos Análise do conjunto de tubos	13,286	0,041	1,0069	0,0031	0,1992	0,0006

Como se pode verificar pelos dados relativos ao conjunto 1 tanto a adsorção contínua de fosfolipídios em sistema multitubular, quanto a adsorção em batelada apresentaram resultados muito semelhantes àqueles obtidos para a adsorção em um único tubo, cujos resultados foram apresentados no item 5.2.1.1 e 5.2.1.2. Esses resultados mostram a flexibilidade de escalonamento do sistema, simplesmente com o aumento do número e/ou comprimento dos tubos.

Pode-se observar também que o fato de ter-se aquecido o sistema a uma temperatura na qual o fosfolipídio é solúvel no etanol, não levou a uma diminuição da massa total adsorvida.

Comparando-se a adsorção em batelada com a em modo contínuo vê-se que a massa adsorvida total e a massa adsorvida por unidade de área são ligeiramente maiores para a adsorção em batelada. Porém a percentagem mássica adsorvida é muito maior para o modo de operação em batelada, o que indica que o rendimento do processo de adsorção, calculado em termos da massa disponível para hidratação em relação à massa inicial utilizada, da operação em batelada é muito superior ao rendimento da operação de adsorção em contínuo (2,7% para o processo em batelada e 0,016% para o processo contínuo). Um rendimento alto na etapa de adsorção permite que a dispersão final de lipossomas não seja muito diluída, e que a matéria prima, o fosfolipídio, seja melhor aproveitada.

---

É necessário porém se ressaltar que os experimentos de adsorção do conjunto 1 foram conduzidos a diferentes temperaturas para os dois modos de operação. Um dos motivos que pode ter gerado uma massa adsorvida maior para a adsorção em batelada é o fato de que nestes experimentos a drenagem da solução lipídica não foi tão eficiente como no caso da adsorção em contínuo, devido ao fato de que na temperatura em que foi efetuado o ensaio o fosfolipídio não se solubilizava no etanol o que acarretou a obstrução dos tubos pela dispersão de fosfolipídios. Outra possível causa desta diferença reside nos erros associados com a extração dos fosfolipídios para quantificação.

Comparando-se agora os resultados do conjunto 2, nos quais a quantificação da massa adsorvida foi feita indiretamente pela quantidade de lipossomas formados após a hidratação do filme lipídico, pode-se ver que não houve diferença significativa entre as quantidades adsorvidas nos modos de operação batelada e contínuo e nesse caso como o volume de dispersão utilizado para os experimentos com os dois métodos de operação foi o mesmo, o rendimento do processo de adsorção também não apresenta diferenças significativas.

Os valores da massa adsorvida obtida para os ensaios do conjunto 2 são maiores que aqueles obtidos para os experimentos do conjunto 1, pelo fato de que nos experimentos do conjunto 2 houve deposição de grande quantidade de fosfolipídios na parte superior dos módulos, que foi hidratada juntamente com a massa adsorvida nas paredes internas dos tubos de vidro.

Como, pelos resultados do conjunto 2, os dois procedimentos apresentaram rendimentos próximos e dada a maior facilidade operacional do modo de operação contínuo, decidiu-se pela utilização deste modo de operação nos experimentos subseqüentes.

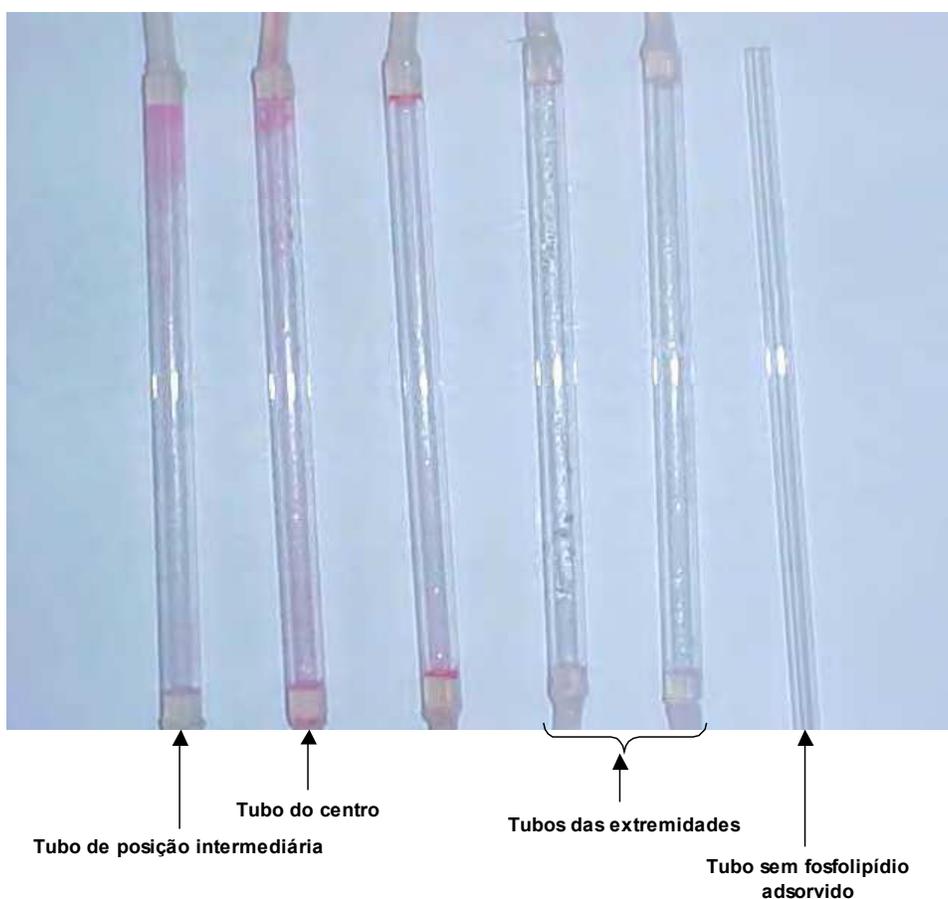
#### **5.2.2.2. Caracterização dos Filmes Delgados**

A Figura 18 apresenta uma fotografia dos tubos após o ensaio de adsorção em contínuo e em batelada, com concentração da dispersão de fosfolipídios 85 mM.

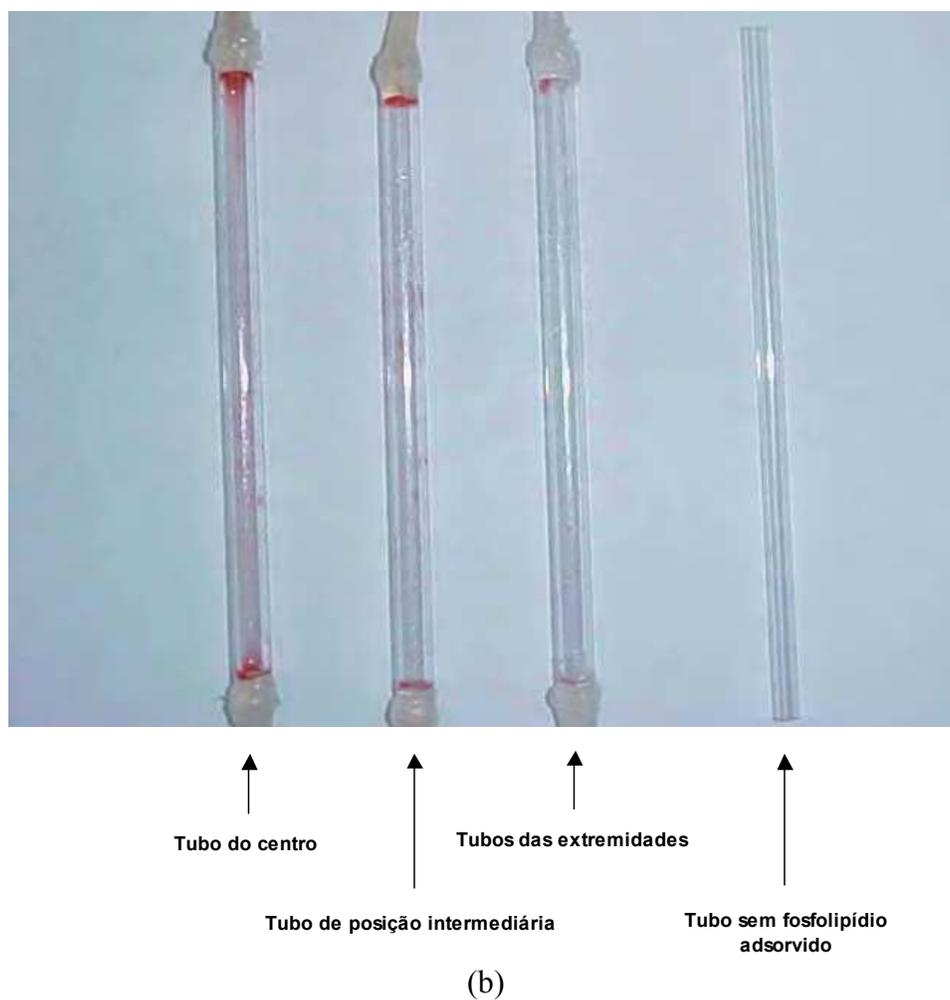
Observa-se em todos os casos a formação do filme, destacado pela coloração rosada característica do corante safranina usado, ao passo que o tubo no qual não foi

adsorvido o fosfolípido e foi colocado em contato com a mesma solução de safranina não apresentou esta coloração.

Observando-se os filmes formados ao longo dos tubos, percebe-se que a homogeneidade dos filmes não é a mesma para todos estes, sendo que nos tubos com maior heterogeneidade vê-se uma maior espessura nas extremidades do tubo. Essa heterogeneidade é devida provavelmente a uma retenção da solução devido às restrições, na entrada e na saída de cada tubo, causadas pelos dispositivos utilizados para manter os tubos ligados à base de teflon. O fato da deposição não ser homogênea em todos os tubos levou ao aprimoramento do sistema de distribuição da dispersão lipídica na entrada dos tubos.



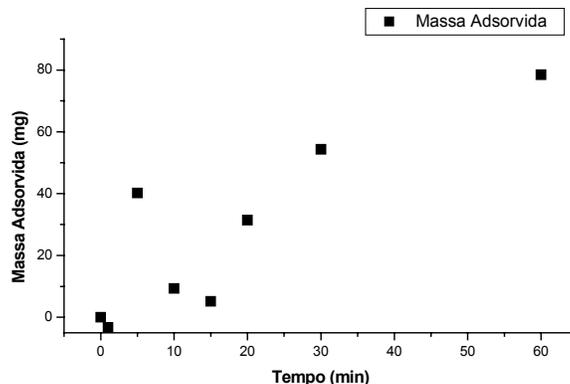
(a)



**Figura 18 - Fotografia dos filmes de fosfolipídios formados no interior dos tubos de vidro nos ensaios, corados com solução de safranina 0,1 M, de adsorção. (a) adsorção em modo contínuo e (b) adsorção em modo batelada.**

### **5.2.2.3. Cinética de Adsorção dos Fosfolipídios**

Os resultados obtidos na determinação da cinética de adsorção dos fosfolipídios nas paredes internas dos tubos de vidro são mostrados no gráfico da Figura 19.



**Figura 19 - Massa adsorvida nos tubos de vidro em função do tempo de circulação da solução lipídica.**

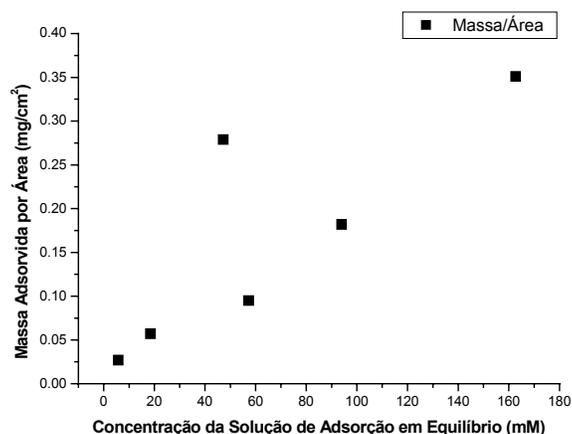
Pode-se observar pelos dados do gráfico que a massa adsorvida nas paredes dos tubos de vidro aumenta com o tempo, seguindo um perfil aproximadamente linear. O perfil apresentado é devido provavelmente à evaporação do etanol que faz com que a concentração da solução lipídica aumente com o tempo. Desta forma dentro do tempo do experimento não se chega a atingir o equilíbrio que caracteriza o máximo de adsorção esperado. Além disso, a variação da concentração com o tempo devido à evaporação do etanol também provoca um erro no cálculo da massa adsorvida, que é calculada, conforme descrito no item 4.2.2.1.3, pela diferença entre a concentração no tempo de amostragem e a concentração no instante inicial.

Para se obter maior confiabilidade dos dados da cinética de adsorção seria necessário conduzir o experimento com o sistema fechado para que não ocorram perdas por evaporação.

#### **5.2.2.4. Isoterma de Adsorção**

Para construção da isoterma de adsorção utilizou-se o valor da concentração de fosfolipídios presentes na solução aquosa nos tempos finais da etapa de hidratação (mostrado com maiores detalhes no item 5.3.1) para cada uma das concentrações estudadas, e o valor da concentração da solução lipídica drenada ao final do processo de adsorção para o cálculo da concentração de equilíbrio.

Utilizando-se a equação (14), calculou-se a massa adsorvida por unidade de área e construiu-se o gráfico da Figura 20.



**Figura 20 - Isoterma de Adsorção de Fosfolipídios na Parede de Tubos de Vidro.**

Pode-se observar pelos dados do gráfico da Figura 20 que a massa adsorvida por unidade de área aumenta com a concentração de equilíbrio. Devido à imprecisão na determinação da massa adsorvida e à evaporação do etanol com o tempo, não é possível associar os dados acima com uma das isotermas de adsorção encontradas na literatura, como a isoterma de Langmuir e a isoterma de Freundlich. Mais uma vez seria necessária a condução dos experimentos em sistema completamente fechado e melhorar a metodologia de determinação da massa adsorvida para termos maior confiança nos dados e assim associar os dados a uma isoterma conhecida.

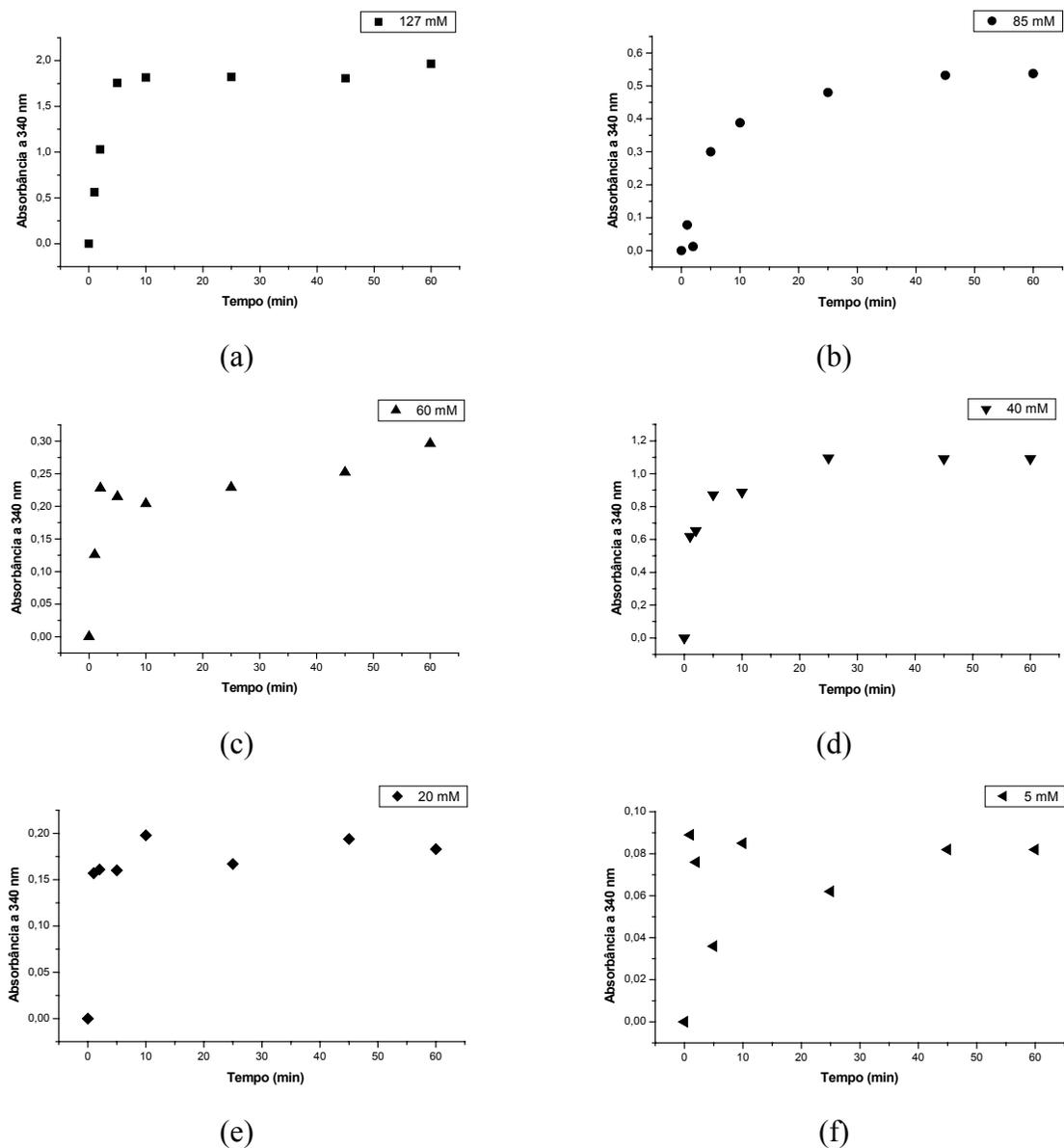
Pode-se, no entanto, a partir dos dados da isoterma de adsorção construída determinar qual a concentração inicial de fosfolipídios vai gerar a maior a concentração de vesículas após a hidratação, a partir da maior massa de fosfolipídios adsorvida.

### **5.3. Produção de Lipossomas**

#### **5.3.1. Cinética de Formação dos Lipossomas**

A formação dos lipossomas com o tempo foi analisada quanto à absorvância das dispersões a 340 nm, ao diâmetro médio das vesículas e à concentração de fosfolipídios

presente nas dispersões. Os resultados referentes à absorvância medida a 340 nm, diâmetro médio das vesículas e concentração de fosfolipídios podem ser visualizados respectivamente nos gráficos da Figura 21, 22 e 23.



**Figura 21 - Evolução da absorvância da dispersão a 340 nm com o tempo para diferentes concentrações iniciais da solução de adsorção.**

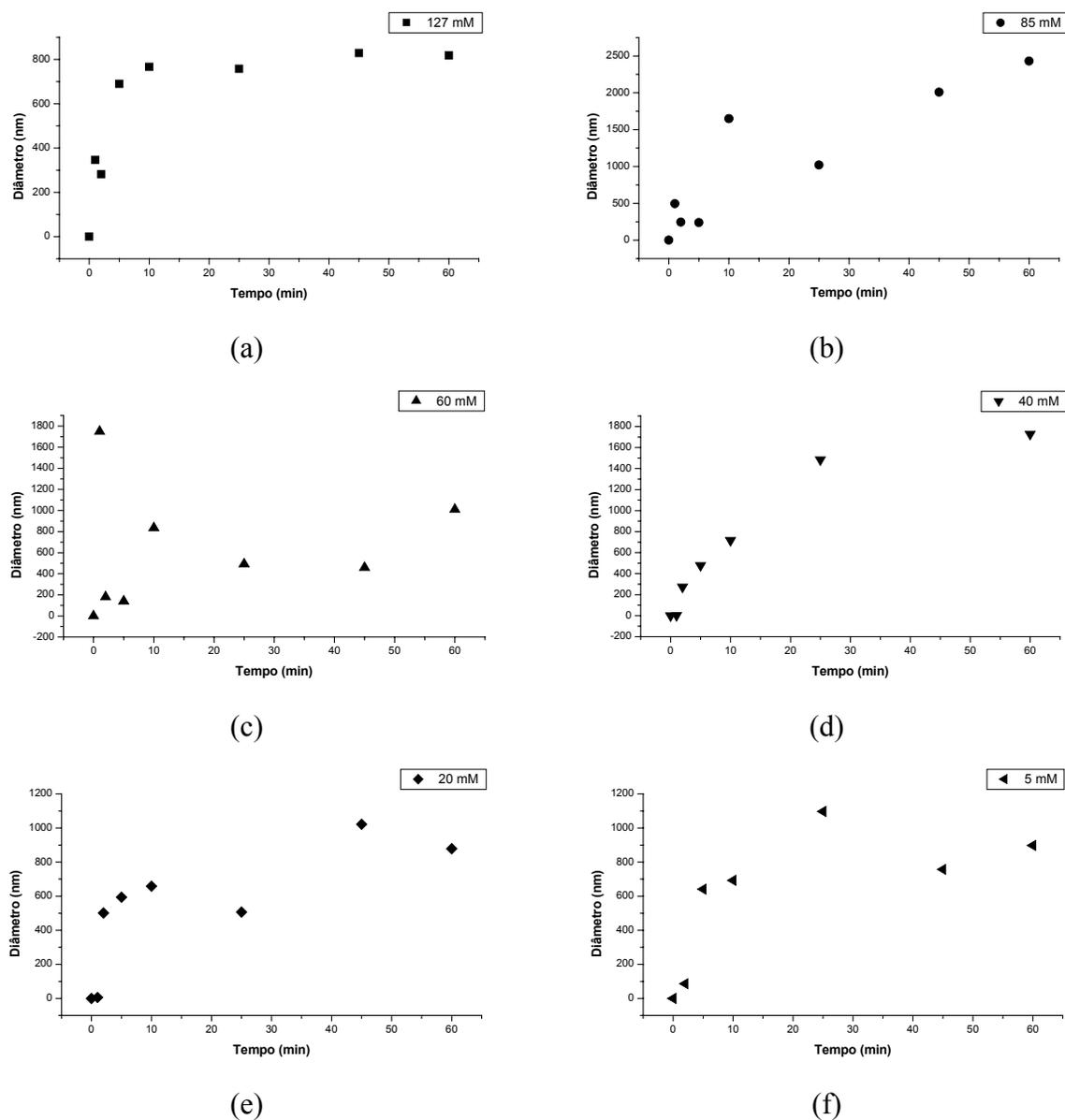
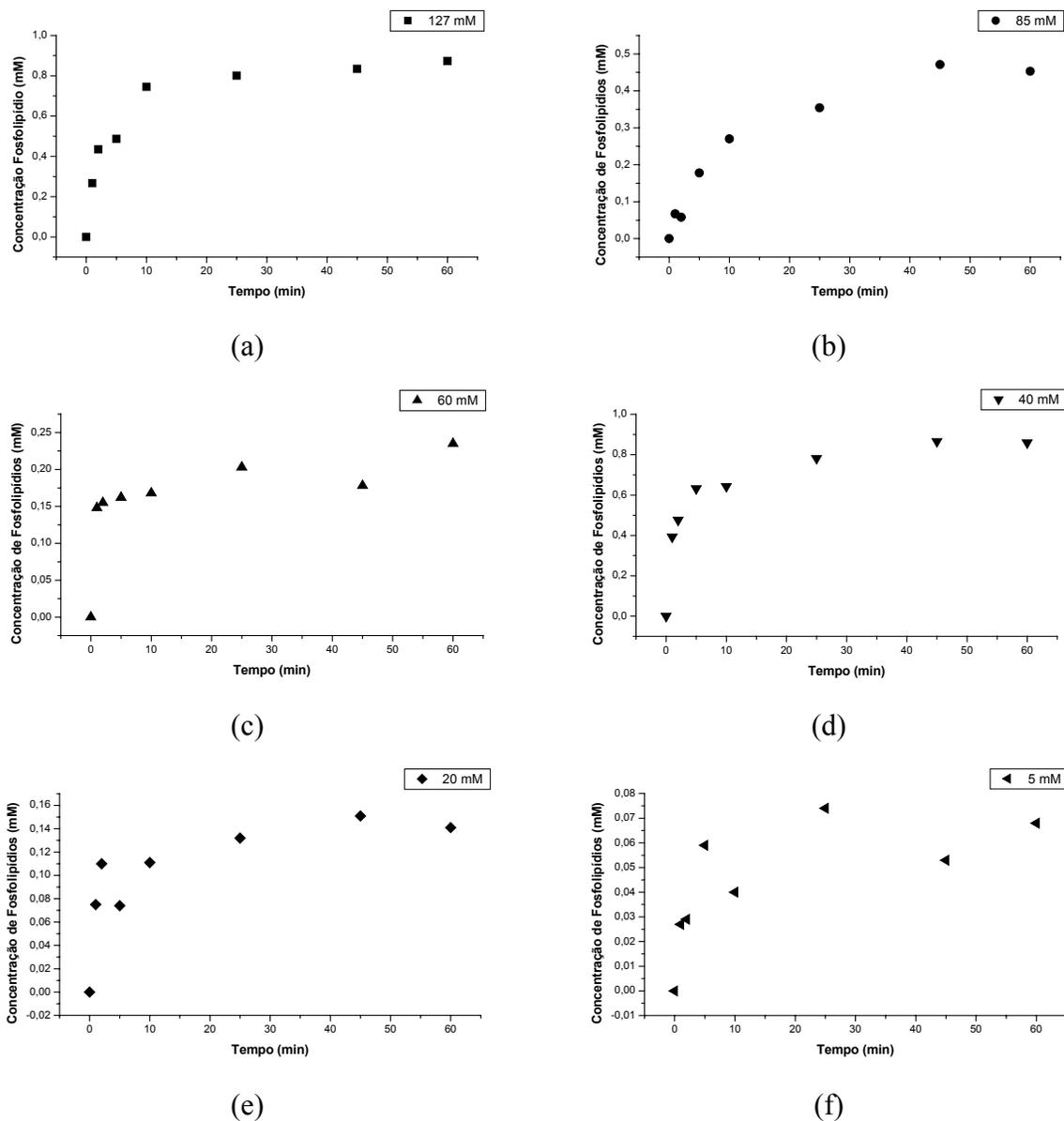


Figura 22 – Evolução do diâmetro médio das vesículas com o tempo para diferentes concentrações iniciais da solução de adsorção.



**Figura 23 – Evolução da concentração de fosfolipídios na dispersão aquosa com o tempo para diferentes concentrações iniciais de adsorção.**

Pode-se observar que para todas as respostas os perfis apresentam um comportamento assintótico.

Na Figura 21 observa-se que os valores de absorvância foram detectados desde os primeiros instantes da hidratação do filme lipídico seco. Visto que os fosfolipídios livres não absorvem luz no comprimento de onda de 340 nm as absorvâncias detectadas são devidas a presença de agregados lipídicos no meio. Portanto pode-se inferir que a formação

---

de agregados acontece desde o início da hidratação, aumentando com o tempo até que se chegue a uma concentração de equilíbrio entre as formas monoméricas, fosfolipídios livres, e agregados, vesículas fosfolipídicas.

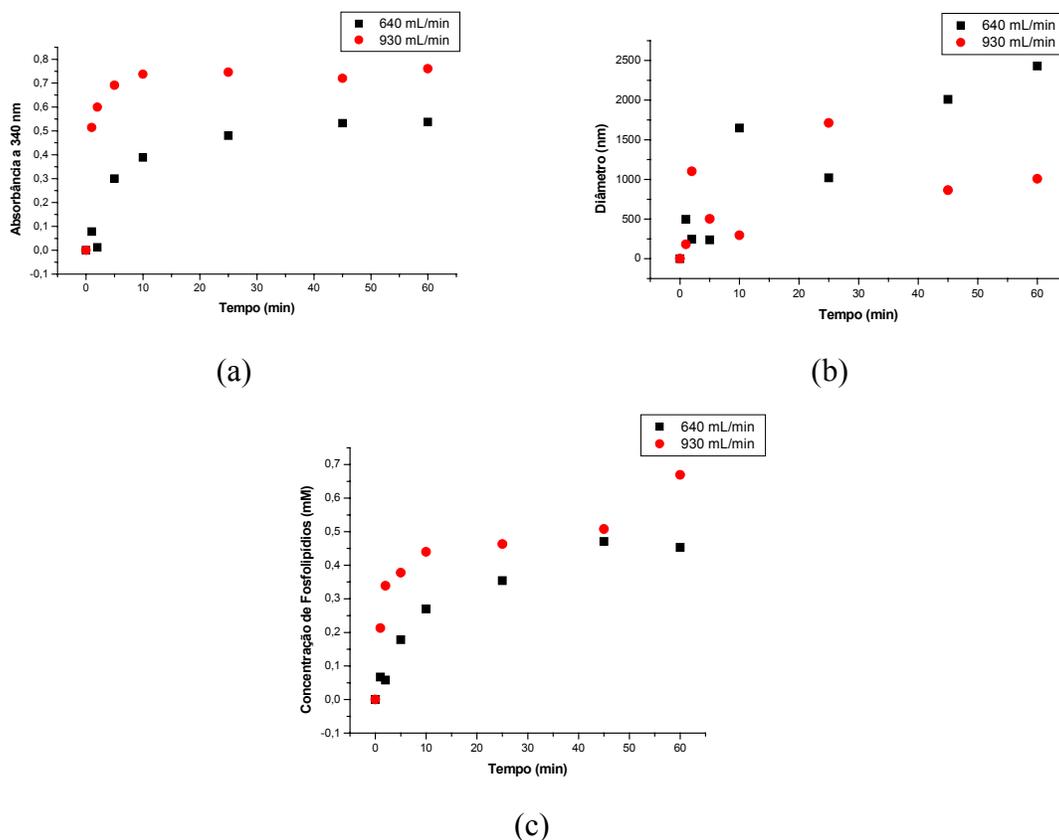
A evolução do diâmetro das partículas com o tempo (Figura 22), ilustra a agregação gradativa dos lipídios com a formação de estruturas lipossomais. Uma possível explicação para o aparecimento de pontos fora do perfil é o fato de que para baixas concentrações de vesículas o ensaio de espectroscopia de espalhamento de luz (QLS) passa a ter uma incerteza maior. Dessa forma tanto os dados de tempo de circulação pequenos quanto os de concentrações baixa possuem um erro associado grande.

O aumento da concentração de fosfolipídios na dispersão (Figura 23) demonstra a desorção do filme lipídico formado nos tubos. Pode-se considerar que o valor máximo da concentração obtido corresponde à massa total adsorvida nas paredes dos tubos de vidro. Esse valor de massa adsorvida foi utilizado para a construção da isoterma de adsorção, conforme apresentado no item 5.2.2.5.

Pode-se ainda perceber que o valor máximo da concentração de fosfolipídios é, em geral, atingido em tempos menores para as menores concentrações. Isso se deve provavelmente ao maior volume disponível para hidratação em relação à massa de fosfolipídios.

#### **5.3.1.1. Influência da Vazão de Circulação na Formação dos Lipossomas**

Os resultados do ensaio de determinação da influência da vazão de circulação na formação dos lipossomas podem ser observados na Figura 24.



**Figura 24 – Influência da vazão de circulação nas propriedades dos lipossomas produzidos: (a) absorbância da dispersão a 340 nm, (b) diâmetro médio das vesículas e (c) concentração de fosfolípidios na dispersão.**

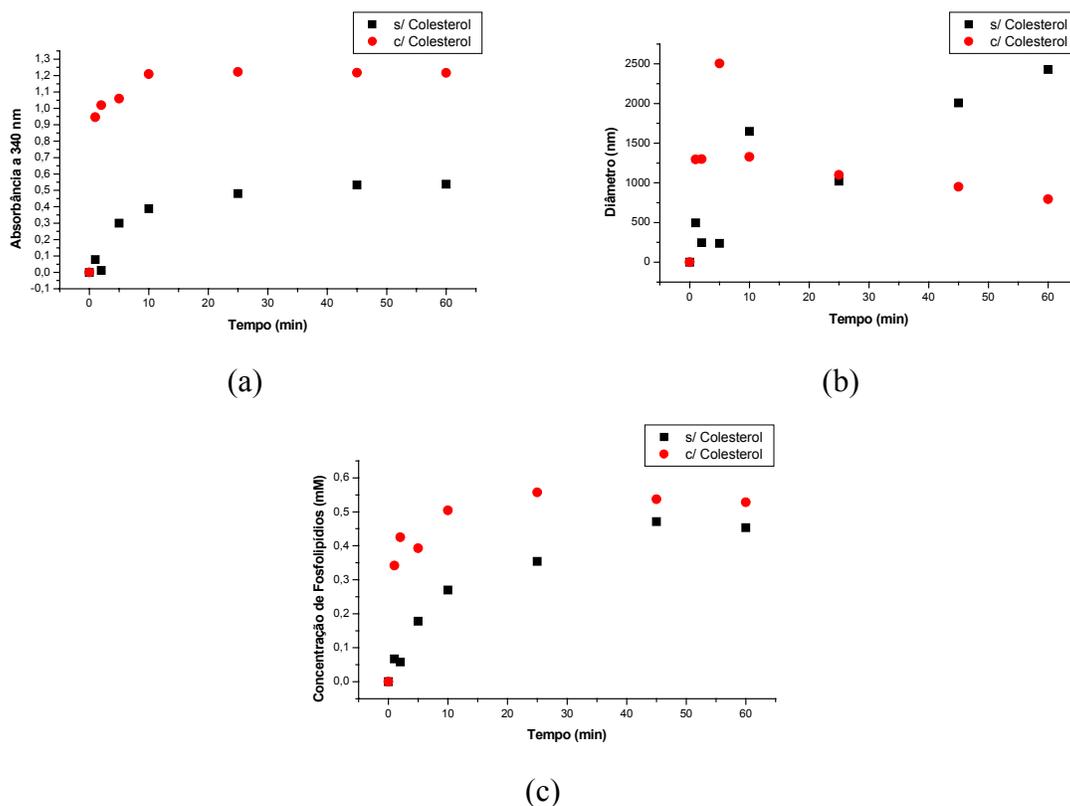
Pode-se, pelos dados da Figura 24, observar que o aumento da vazão de hidratação não muda o perfil da formação de lipossomas com o tempo. Os valores da absorbância da dispersão a 340 nm (Figura 24 (a)) são ligeiramente maiores no caso da hidratação realizada com vazão de 930 mL/min, o que pode ser explicado pelo fato de que temos nessa vazão a produção de uma dispersão com uma maior concentração de vesículas.

Pode-se observar pela Figura 24 (b) que os valores finais do diâmetro médio das vesículas são, em geral, menores quando a etapa de hidratação é conduzida com uma vazão de 930 mL/min. Isso era esperado pois com uma maior vazão para um mesmo diâmetro temos uma maior velocidade da solução de hidratação. Essa maior velocidade leva possivelmente a um rearranjo dos lipossomas em estruturas de menor tamanho, um fenômeno semelhante ao que ocorre na formação de lipossomas usando a técnica de microfluidização.

Pela Figura 24 (c) pode-se verificar que não há diferenças significativas entre a concentração final de vesículas obtida para as duas vazões de circulação, se considerarmos que o ponto correspondente ao tempo de 60 minutos na hidratação a 930 mL/min esta deslocado do seu real valor. Por fim pode-se ver que a concentração atinge o valor máximo em um tempo menor no caso da hidratação conduzida a vazão de 930 mL/min, aproximadamente 10 minutos, do que no caso da hidratação a vazão de 640 mL/min, aproximadamente 40 minutos. Isso é importante para o processo, pois significa tempos de processamentos menores.

### 5.3.1.2. Influência da Adição de Colesterol na Formação dos Lipossomas

Na Figura 25 são apresentados os resultados obtidos para o experimento de avaliação da influência da adição de colesterol nas propriedades dos lipossomas produzidos.



**Figura 25 - Influência da adição de colesterol nas propriedades dos lipossomas produzidos: (a) absorbância da dispersão a 340nm, (b) diâmetro médio das vesículas e (c)concentração de fosfolípidios na dispersão.**

A partir dos gráficos da Figura 25 observa-se que a adição de colesterol não altera o comportamento da formação dos lipossomas.

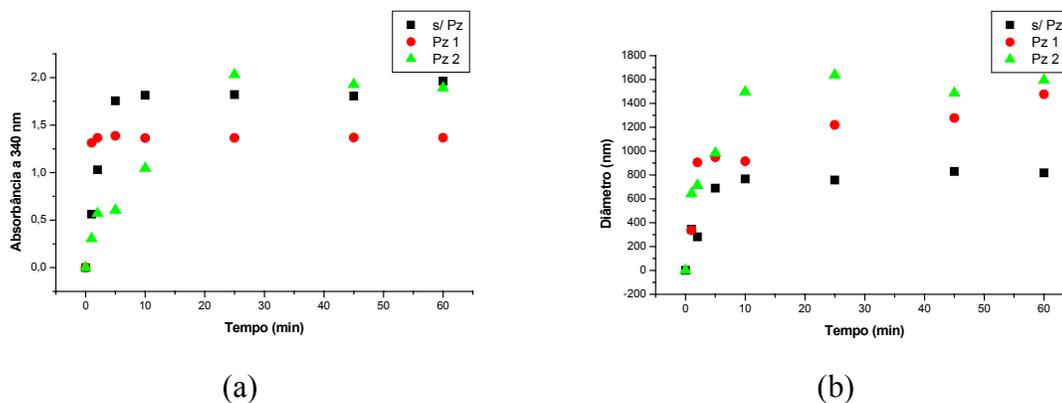
As maiores absorbâncias obtidas para o procedimento de hidratação do filme contendo colesterol deve-se ao fato de que o colesterol presente na dispersão absorve no comprimento de 340 nm e com isso a absorbância resultante acaba sendo maior.

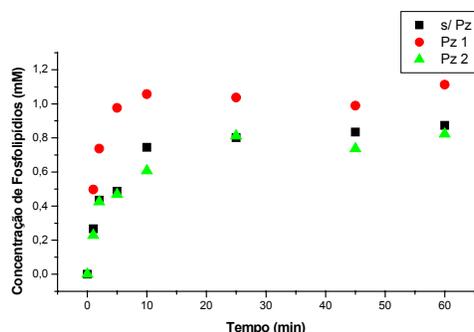
Com relação ao diâmetro pode-se perceber que a adição de colesterol levou à formação de lipossomas, em geral, de menor tamanho. Isso pode ser devido a maior rigidez da bicamada conseguida com a adição de colesterol.

Por fim com relação à concentração de vesículas vê-se que não existe diferença significativa entre os valores da concentração final para os dois tipos de lipossomas. Porém para o caso da hidratação de filmes contendo colesterol a concentração máxima é atingida em um tempo menor, aproximadamente 10 minutos, do que no caso da hidratação do filme composto apenas de Epikuron 200SH, aproximadamente 40 minutos.

#### 5.4. Encapsulação de Pirazinamida nos Lipossomas

Os resultados dos experimentos de avaliação da influência da Pirazinamida encapsulada nas propriedades dos lipossomas são mostrados na Figura 26.





(c)

**Figura 26 - Influência da Pirazinamida encapsulada nas propriedades dos lipossomas produzidos: (a) absorvância a 340 nm, (b) diâmetro médio das vesículas e (c) concentração de fosfolípidios na dispersão. Pz1 - Pirazinamida incorporada conforme procedimento 1, Pz2 - Pirazinamida incorporada conforme procedimento 2.**

Como podemos ver pelos dados da Figura 26 a encapsulação de Pirazinamida nos lipossomas não altera a cinética de formação. Além disso, pode-se observar que não ocorre alteração significativa nos valores tanto da absorvância quanto da concentração de fosfolípidios. Apenas o diâmetro médio das vesículas apresentou um valor maior quando foi adicionado a Pirazinamida nos lipossomas, para os dois modos de adição do fármaco: na solução de hidratação e adição no filme lipídico seco.

#### 5.4.1. Determinação da Eficiência de Encapsulação de Pirazinamida

Os resultados obtidos para a determinação da eficiência de encapsulação de Pirazinamida, incorporada conforme os procedimentos descritos nos itens 4.3.4.1 e 4.3.4.2, podem ser visualizados na Tabela 6.

**Tabela 6 - Resultados da eficiência de encapsulação de Pirazinamida.**

Procedimento	Concentração Pz Total (mM)	Concentração Pz não Encapsulada (mM)	Concentração Pz Encapsulada (mM)	Eficiência Encapsulação (%)
1	26,21	22,36	3,85	14,68
2	0,95	0,89	0,06	6,66

1- Adição do fármaco na solução de hidratação

2 - Adição do fármaco no filme lipídico seco

---

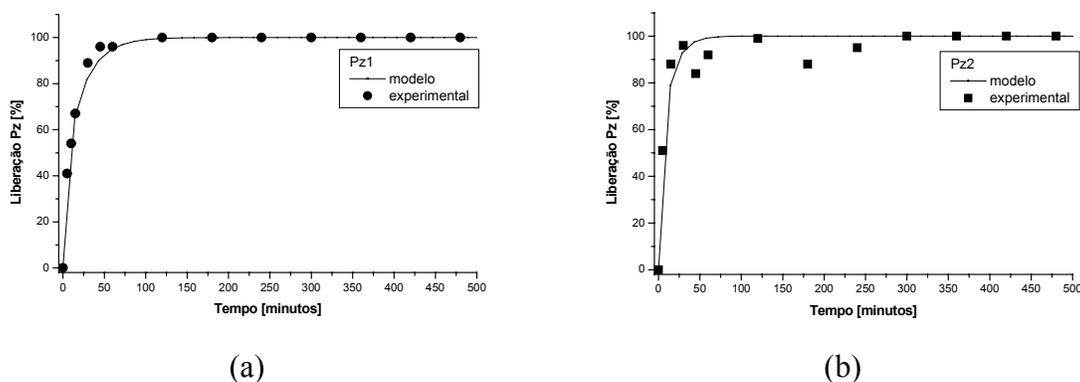
Pelos dados da Tabela 6 pode-se observar que a encapsulação da Pirazinamida é muito mais eficiente no caso da mesma ser incorporada a partir da solução de hidratação do que no caso de adição do fármaco no filme lipídico seco, uma vez que a eficiência de encapsulação é mais que o dobro no procedimento 1. Isso se deve provavelmente ao fato de que no caso da incorporação da Pirazinamida no filme adsorvido a quantidade de fármaco é muito pequena em relação à quantidade total de vesículas.

Analisando os níveis de Pirazinamida encapsulada e os requerimentos terapêuticos relativos ao MIC (SHERRIS, 1990), tem-se que, como regra geral, na terapia antimicrobiana adota-se que a concentração do fármaco atingirá *in vivo*, com êxito, se for usado um valor de duas a quatro vezes o valor da MIC obtido *in vitro* [<http://www.pbnet.com.Br/openline/vandique/informativos.htm>]. A MIC para o bacilo *M. tuberculosis* é de 12,5µg de Pirazinamida por mililitro de formulação. Considerando esse dado e os valores obtidos para a encapsulação da Pirazinamida, pode-se dizer que no caso de incorporação a partir da solução de hidratação assegura-se uma concentração de Pirazinamida (473,5 µg/mL) compatível com o valor necessário para se atingir o efeito terapêutico *in vivo*.

### **5.5. Liberação de Pirazinamida Encapsulada nos Lipossomas**

A liberação do fármaco Pirazinamida das vesículas lipídicas nos ensaios conduzidos *in vitro* foi caracterizada a partir dos perfis de concentração do fármaco liberado com o tempo, os quais refletem a taxa de liberação e a permeabilidade da bicamada lipídica.

Pode-se visualizar nos gráficos da Figura 27 os resultados obtidos nos experimentos de liberação controlada da Pirazinamida, encapsulada conforme os procedimentos descritos no item 4.3.4.1 e 4.3.4.2.



**Figura 27 - Liberação de Pirazinamida Encapsulada nos Lipossomas. (a) Pirazinamida encapsulada a partir de adição na solução de hidratação e (b) Pirazinamida encapsulada a partir de adição no filme lipídico seco. (● e ■) pontos experimentais, (—) dados do modelo.**

A partir das Figuras 27 (a) e 27 (b) pode-se perceber que para os dois casos estudados a liberação do fármaco segue o mesmo perfil. A liberação gradativa em ambos os casos ilustra a propriedade de barreira característica da bicamada lipídica, confirmando que as estruturas formadas são lipossomas.

A liberação da Pirazinamida encapsulada conforme o procedimento 1 aconteceu em um tempo maior que aquele necessário para liberar o fármaco encapsulado conforme o procedimento 2. Isso é explicado pela menor concentração de fármaco encapsulada no procedimento 2, que gera um tempo menor de liberação e também que leva a uma maior incerteza na determinação dos valores da absorvância e conseqüentemente da porcentagem liberada.

### 5.5.1. Aplicação do Modelo de Difusão de Solute em Esferas de Sólidas

Pode-se observar também pela Figura 27 que o modelo matemático de difusão de soluto em esferas sólidas ajustou-se bem aos pontos experimentais, sobretudo para a liberação da Pirazinamida encapsulada conforme o procedimento 1. Esses resultados sugerem que é o fenômeno de difusão que governa a liberação do fármaco de dentro do cerne aquoso do lipossoma para o meio extralipossomal.

A Tabela 7 apresenta os valores da constante  $k$  determinada pelo modelo difusivo e da permeabilidade  $P$  dos fármacos nas vesículas lipídicas.

Tabela 7 - Constante k do modelo difusivo e coeficiente de permeabilidade P para as vesículas lipídicas

Procedimento de Incorporação	k (h <sup>-1</sup> )	P (cm/s)
Solução de Hidratação	4,2x10 <sup>-3</sup>	1,6x10 <sup>-7</sup>
Filme Lipídico Seco	7,5x10 <sup>-3</sup>	9,9x10 <sup>-7</sup>

Apesar do bom ajuste dos dados experimentais ao modelo, como mostrado nas figuras anteriores, os valores da constante k obtidos foram em todos os casos menores que a unidade. De acordo com os estudos de GUY *et al.*, 1982, para valores de k menores que um, os efeitos da transferência interfacial através da membrana de diálise tornam-se significativos. Isso justifica a necessidade de utilização de modelos que incluam a limitação difusiva em estudos posteriores.

### 5.6. Estabilidade de Lipossomas em Presença de Tensoativo não Iônico

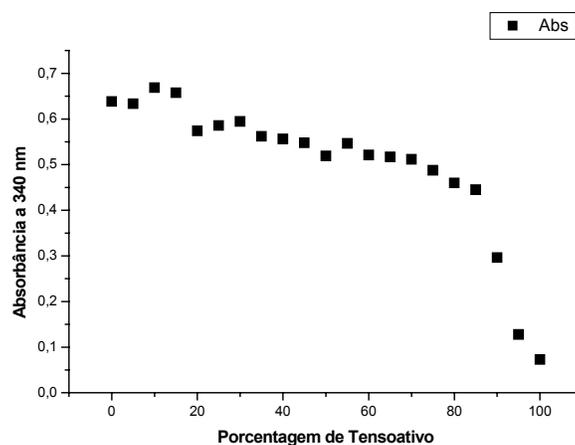
Foi avaliada a estabilidade dos lipossomas vazios na presença do tensoativo não iônico C<sub>12</sub>E<sub>5</sub>, representada pelas mudanças conformacionais sofridas pelas vesículas sob a ação do tensoativo, monitorada por medidas de absorvância das dispersões a 340nm.

A investigação do mecanismo de desestabilização dos lipossomas na presença de tensoativos permite a obtenção de informações sobre a integridade da bicamada lipídica, assim como do seu empacotamento. Estas informações são de fundamental importância na aplicação dos lipossomas para liberação controlada de medicamentos.

Os tensoativos têm a propriedade de solubilizar as vesículas lipídicas. A extensão da solubilização depende da facilidade de penetração deles na membrana. Assim, o empacotamento da membrana e as interações entre os tensoativos e as vesículas podem ser analisados, após incubação, através das absorvâncias das soluções de vesículas lipídicas/tensoativos, a várias concentrações de tensoativo. O perfil de absorvância versus concentração de tensoativo segue o modelo convencional de três estágios descrito para a solubilização de vesículas por tensoativo. Num primeiro estágio, a baixas concentrações de tensoativo, ocorre o inchamento inicial das vesículas. A seguir a vesícula aumenta gradativamente de tamanho devido à penetração das moléculas de tensoativo e a fusão. No estágio final, a altas concentrações de tensoativo, ocorre a ruptura das vesículas, com a

formação das micelas. Vesículas mais estáveis apresentam perfis com menos distúrbios das absorvâncias iniciais após exposição aos tensoativos (EDWARDS e ALMGREN, 1992).

Os resultados, de absorvância em função da porcentagem de tensoativo, obtidos no ensaio de estabilidade de lipossomas na presença de tensoativo não iônico  $C_{12}E_5$  podem ser visualizados na Figura 28.



**Figura 28 – Resultados da absorvância a 340 nm em função da porcentagem de tensoativo  $C_{12}E_5$  contido nos lipossomas.**

Os resultados indicam que os agregados lipídicos produzidos a partir da hidratação de filmes lipídicos secos têm características de membrana com empacotamento denso, oferecendo resistência à penetração do tensoativo mesmo a concentrações de tensoativo da ordem de 80%. Concentrações maiores causam a ruptura da bicamada e formação de micelas.

### **5.7. Modelagem da Cinética de Formação de Lipossomas**

Utilizando-se o conjunto de equações apresentadas no item 4.3.6.1 e aplicando-se o método de Euler para integração das equações diferenciais foram determinados os perfis de formação de lipossomas com o tempo.

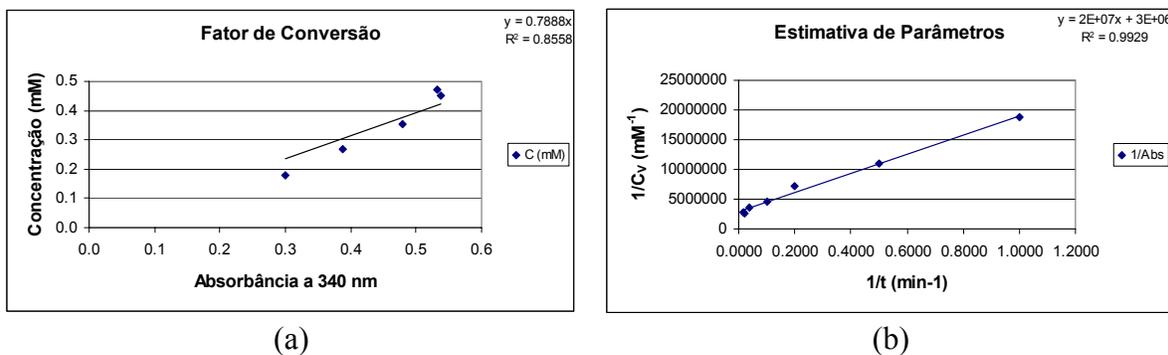
Para resolução do conjunto de equações foi construída rotina de cálculo utilizando o software Excel 2000 for Windows da Microsoft Corporation.

Nas simulações executadas para construção dos perfis de formação de lipossomas foram utilizadas as propriedades físico-químicas da Tabela 8, obtidas da literatura (PERRY, 1997). O valor da área externa total  $S_0$  foi obtido a partir das dimensões dos tubos de vidro utilizados nos experimentos.

**Tabela 8 – Propriedades físico-químicas utilizados na modelagem da formação dos lipossomas.**

$C_0$ (mM)	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\eta$ (g/cm.s)	$\sigma$ (g/s <sup>2</sup> )	$S_0$ (cm <sup>2</sup> )
127	0,96	0,006	0,96	213,9
85	0,96	0,006	0,96	213,9
60	0,96	0,006	0,96	213,9
40	0,96	0,006	0,96	213,9
20	0,96	0,006	0,96 </td <td>213,9</td>	213,9
5	0,96	0,006	0,96	213,9

Inicialmente foi feita a determinação dos parâmetros  $K_t$  e  $K_t'$  da equação 28. Para isso a curva de absorbância em função do tempo foi associada com a concentração de vesículas. Para relacionar a absorbância a 340 nm e a concentração de fosfolípidios presente nas vesículas foi utilizado um fator obtido pela relação entre a absorbância e a concentração de fosfolípidios (gráficos das Figuras 21 e 23) para os instantes finais da hidratação, quando quase todo o fosfolípidio encontra-se na forma de vesículas (Figura 29 (a)). Para se determinar a concentração de vesículas dividiu-se a concentração de fosfolípidios presente nas vesículas pelo número de agregação  $N$ .



**Figura 29 - Determinação dos parâmetros da equação de concentração de vesículas em função do tempo a partir dos dados de absorbância a 340 nm.**

A partir dos dados de absorbância a 340 nm transformada em concentração de vesículas encontrou-se os valores de  $K_t$  e  $K_t'$  através de um gráfico de  $1/C_v$  em função de

$1/t$ , no qual o valor do coeficiente linear é igual a  $1/K_t$  e o coeficiente angular é igual a razão entre  $K_t'$  e  $K_t$ . (Figura 29 (b)).

O valor de  $K_v$  da equação (51) foi obtido a partir da taxa inicial de formação de vesículas, ou seja, a partir do valor da derivada da equação (52) para os tempos iniciais. Derivando-se a equação (52) temos:

$$\frac{dC_v}{dt} = \frac{K_t \cdot K_t'}{K_t'^2 + 2K_t' t + t^2} \quad (57)$$

Tomando o limite da equação (57) quando  $t$  é muito pequeno ( $t \rightarrow 0$ ) temos que:

$$K_v \cdot C_v = \left. \frac{dC_v}{dt} \right|_{t \rightarrow 0} = \frac{K_t}{K_t'} \quad (58)$$

O número de agregação  $N$ , cujos valores são mostrados na Tabela 10, usado para se calcular a concentração de vesículas pode ser obtido para uma vesícula unilamelar através de dados do diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas e da área ocupada por um grupo de cabeça de uma molécula de fosfolípido. Através da relação entre a área de superfície total, interna e externa, do lipossoma e área do grupo de cabeça encontramos o número de fosfolípidios que compõem o lipossoma,  $N$ .

$$N = \frac{4\pi \cdot \left(\frac{D_H}{2}\right)^2 + 4\pi \left(\frac{D_H}{2} - e\right)^2}{a_{PL}} \quad (59)$$

, onde  $D_H$  é o diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas, e corresponde à espessura da bicamada lipídica e  $a_{PL}$  é área média das moléculas de lipídios que compõem o lipossoma.

Foram obtidos os valores de  $K_t$  e  $K_t'$  e  $K_v$  constantes da tabela 9 abaixo para as concentrações estudadas.

Tabela 9 - Valores de  $K_t$ ,  $K_t'$ ,  $K_v$  e  $K_{ext}$  obtidos para as concentrações estudadas.

Conc. (mM)	$K_t$ (mM)	$K_t'$ (s)	$K_v$ (mg/cm <sup>2</sup> .s.mM)	$K_{ext}$ (g/cm <sup>2</sup> s)
127	$9,86 \cdot 10^{-7}$	169,2	3,36	$4,2 \cdot 10^{-8}$
85	$3,44 \cdot 10^{-7}$	333,2	1,78	$1,3 \cdot 10^{-8}$
60	$2,07 \cdot 10^{-7}$	55,8	9,87	$2,6 \cdot 10^{-8}$
40	$7,95 \cdot 10^{-7}$	47,4	11,61	$1,3 \cdot 10^{-7}$
20	$1,31 \cdot 10^{-7}$	21,6	25,33	$7,4 \cdot 10^{-8}$
5	$8,88 \cdot 10^{-8}$	720,6	0,72	$2,8 \cdot 10^{-9}$

Os valores de  $K_{ext}$  mostrados na tabela 9 foram obtidos a partir dos dados de  $K_v$  e  $C_v$ , pois sabe-se que nos tempos finais do processo de hidratação não há variação da massa de fosfolipídios no meio com o tempo ( $\frac{dm}{dt} = 0$ ) e todo o filme lipídico já foi penetrado pelo líquido e desintegrado ( $L_p - L_d = 0$ ). Portanto podemos escrever que:

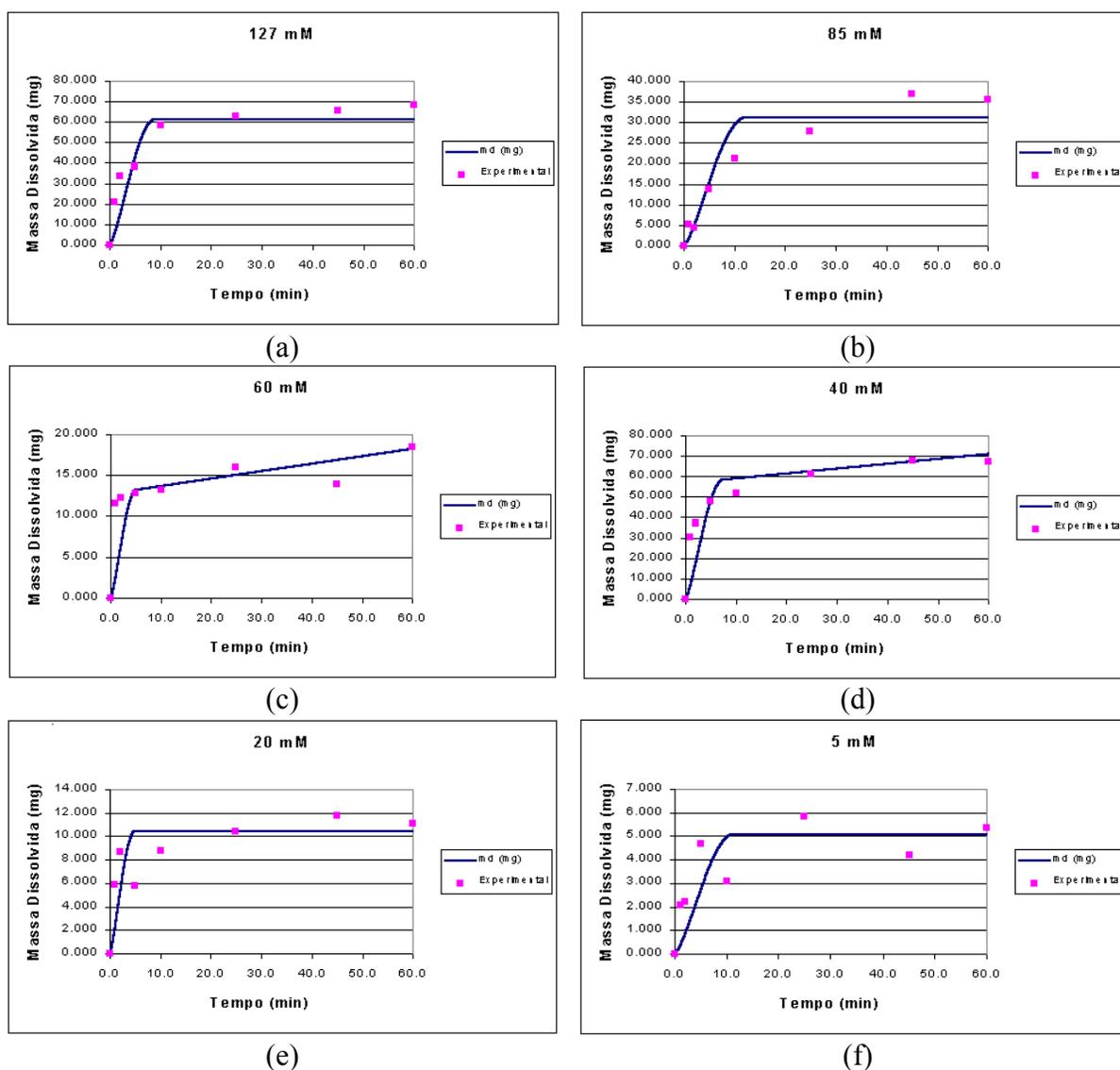
$$K_{ext} = \frac{K_v C_v}{S_0 \cdot \left(1 - \frac{\varepsilon}{\tau}\right)} \quad (60)$$

Os demais parâmetros do modelo, mostrados na Tabela 10, foram ajustados de forma que os dados gerados pelo modelo se aproximassem ao máximo dos dados experimentais.

Tabela 10 - Valores dos parâmetros ajustados utilizados na simulação da formação dos lipossomas.

$C_0$ (mM)	$\varepsilon$	$\tau$	$K_{int}$ (g/cm <sup>2</sup> s)	$d_H$ (nm)	$\cos \theta$	$K_0$ (nm/s)	a	n	N
127	0,7	1,3	$1,2 \cdot 10^{-8}$	5,00	$1,8 \cdot 10^{-9}$	11,8	-0,00185	1	$1,0 \cdot 10^6$
85	0,8	1,1	$9,4 \cdot 10^{-9}$	5,00	$1,8 \cdot 10^{-10}$	4,4	-0,00135	1	$1,0 \cdot 10^6$
60	0,7	1,1	$1,6 \cdot 10^{-8}$	5,00	$1,8 \cdot 10^{-10}$	4,4	-0,00325	1	$1,0 \cdot 10^6$
40	0,8	1,1	$1,3 \cdot 10^{-8}$	5,00	$1,8 \cdot 10^{-9}$	13,9	-0,00225	1	$1,0 \cdot 10^6$
20	0,8	1,1	$1,4 \cdot 10^{-8}$	5,00	$1,8 \cdot 10^{-10}$	4,4	-0,00345	1	$1,0 \cdot 10^6$
5	0,9	1,1	$1,5 \cdot 10^{-9}$	5,00	$1,8 \cdot 10^{-10}$	4,4	-0,00145	1	$1,0 \cdot 10^6$

Utilizando-se os valores dos parâmetros contidos nas tabelas 8, 9 e 10 e o conjunto de equações apresentadas no item 4.3.6.1, obteve-se os gráficos de massa dissolvida em função do tempo, para as 6 concentrações estudadas, da Figura 30. Nos cálculos realizados foi usado passo de integração igual a 0,15 s.



**Figura 30 – Resultados obtidos para a massa adsorvida com o tempo para as concentrações estudadas, valores experimentais e obtidos pelo modelo.(a) 127 mM, (b) 85 mM, (c) 60 mM, (d) 40 mM, (e) 20 mM e (f) 5 mM.**

Como podemos ver pelos dados dos gráficos da Figura 29 o modelo conseguiu representar bem os dados experimentais, o que indica que a desintegração do filme lipídico seco e a simultânea formação dos lipossomas segue o modelo representado pelas equações (51), (53) e (54).

$$\frac{dL_p}{dt} = \frac{dL_d}{dt} + \frac{L_p - L_d}{K} \cdot \frac{dK}{dt} + m \cdot K^{\frac{1}{m}} \cdot (L_p - L_d)^{\frac{m-1}{m}} \quad (51)$$

$$\frac{dm}{dt} = K_{ext} \cdot S_0 \cdot \left(1 - \frac{\varepsilon}{\tau}\right) + K_{int} \cdot S_0 \cdot \frac{4 \cdot \varepsilon}{d_H} (L_p - L_d) - K_v \cdot C_v \quad (53)$$

$$\frac{dm}{dt} = \rho \cdot S_0 \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \frac{dL_d}{dt} \quad (54)$$

O modelo gerou também dados de comprimento penetrado e comprimento dissolvido em função do tempo para as 6 concentrações estudadas, que são mostrados na figura 31.

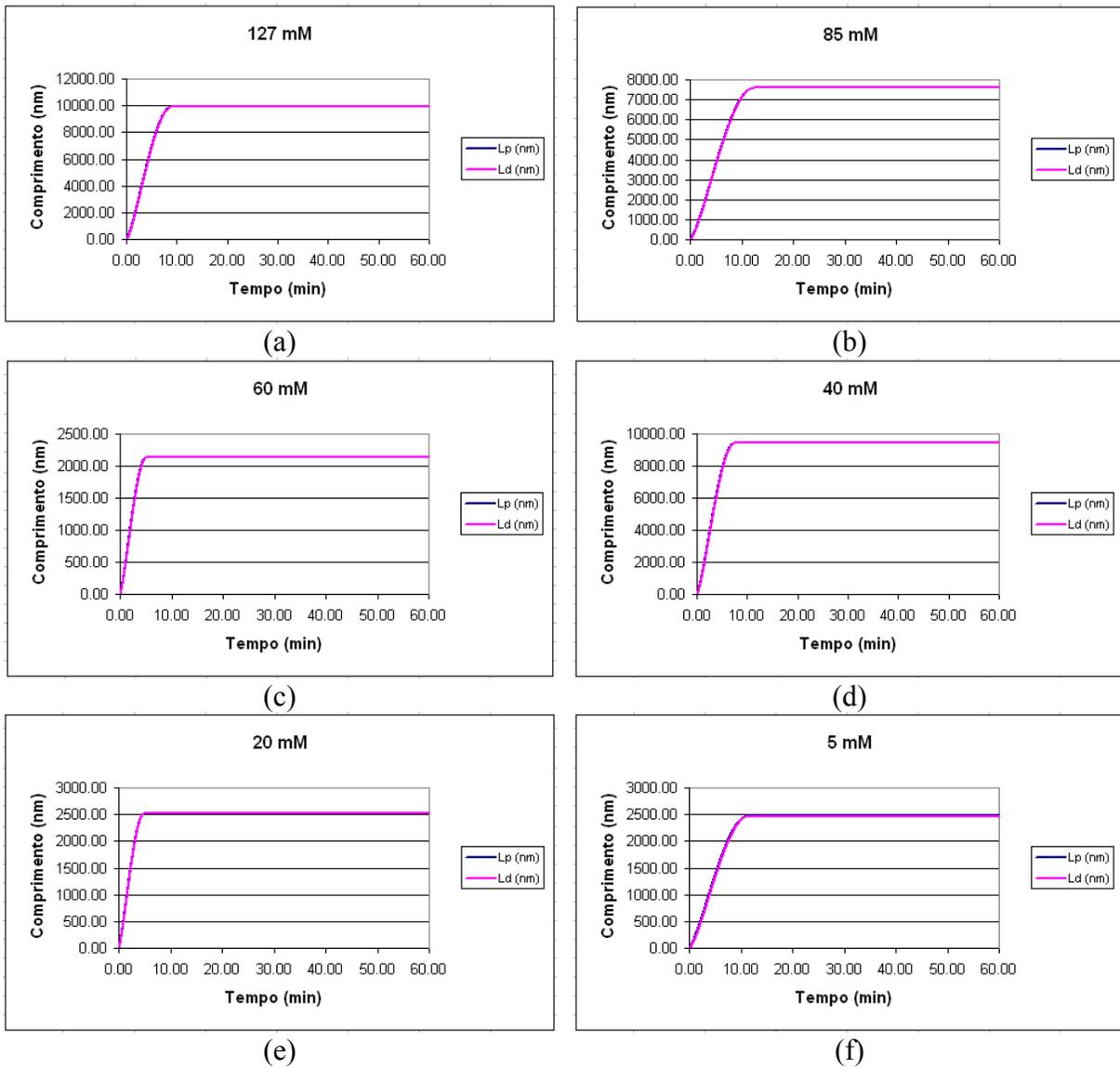


Figura 31 – Resultados obtidos para a variação do comprimento do filme lipídico penetrado pelo líquido ( $L_p$ ) e do comprimento do filme lipídico dissolvido ( $L_d$ ) com o tempo, para as concentrações estudadas. (a) 127 mM, (b) 85 mM, (c) 60 mM, (d) 40 mM, (e) 20 mM e (f) 5 mM.

Podemos ver pelos gráficos da Figura 31 que os valores de  $L_p$  e  $L_d$  são muito próximos, o que indica que a dissolução do filme lipídico ocorre tão logo o filme é penetrado pela solução aquosa, não havendo um comprimento molhado significativo. Isso pode ser explicado considerando que o mecanismo mostrado no item 3.3.2.3 é válido, pois nesse caso o escoamento da solução aquosa ajuda destacar as figuras de mielina, que corresponderiam ao comprimento molhado, fazendo com que este comprimento seja sempre não significativo.

O modelo permitiu, além de avaliar o perfil de formação de lipossomas com o tempo, estimar a espessura do filme lipídico adsorvido na superfície dos tubos de vidro. Esse valor corresponde ao valor máximo atingido por  $L_p$  e  $L_d$  na simulação, como pode ser visto nos gráficos da Figura 31.

Na Tabela 11 são apresentados os valores obtidos para a espessura do filme lipídico seco para cada uma das concentrações estudadas.

**Tabela 11 – Espessura do filme lipídico seco obtido pela modelagem da cinética de formação dos lipossomas para cada uma das concentrações estudadas.**

<b>Concentração (mM)</b>	<b>Espessura Filme Lipídico (nm)</b>
127	10000
85	7600
60	2200
40	9500
20	2500
5	2500

Os valores obtidos para a espessura dos filmes lipídicos são coerentes com as observações experimentais, nas quais visualizou-se a formação de um filme muito delgado no interior dos tubos (Figura 18), com espessura difícil de ser determinada visualmente.

Com relação ao efeito da concentração, pode-se observar que em geral a adsorção de soluções de maiores concentrações levou à formação de um filme lipídico de maior espessura. Isso é coerente com os resultados experimentais pelo fato de que nas maiores concentrações a massa disponível por unidade de área disponível para adsorção é maior.



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho mostram a viabilidade do processo de produção de lipossomas pela hidratação de filmes secos de lipídios formados por adsorção na parede interna de tubos de vidro em um sistema multitubular.

A adsorção de fosfolipídios em sistema multitubular mostrou resultados de rendimento semelhantes aos obtidos nos ensaios com um único tubo, o que é promissor para o escalonamento do processo. Os filmes obtidos não foram homogêneos e as causas da heterogeneidade estão associadas principalmente à distribuição da dispersão nos tubos de vidro.

A comparação dos modos de operação de adsorção contínua e em batelada mostrou que tanto a massa adsorvida quanto o rendimento do processo de adsorção não apresentou diferenças significativas para os dois modos de operação.

A hidratação dos filmes delgados formados mostrou-se ser um procedimento rápido e gerou uma população heterogênea de lipossomas com diâmetro médio variando entre 800 e 2000 nm dependendo da concentração inicial da dispersão de fosfolipídios.

A cinética de formação dos lipossomas apresentou um comportamento assintótico, tanto para a absorvância da dispersão a 340 nm, quanto para o diâmetro médio das vesículas e a concentração de fosfolipídios. O aumento da vazão de circulação da solução de hidratação não alterou o perfil da formação dos lipossomas, porém diminuiu o tempo em que concentração atinge o valor máximo. Esse menor tempo para a dessorção total dos fosfolipídios adsorvidos pode levar a tempos de processamento menores. A incorporação de colesterol no filme lipídico seco levou a formação de lipossomas de diâmetros menores e a menores tempos de dessorção.

A encapsulação da Pirazinamida nos lipossomas foi verificada e a eficiência da incorporação foi maior, da ordem de 14%, quando o fármaco foi adicionado na solução de

hidratação. Os perfis de liberação do fármaco mostraram que a Pirazinamida esta completamente liberada em tempos próximos de 45 minutos, e demonstram a propriedade de barreira característica das bicamadas lipídicas.

Os lipossomas produzidos mostraram-se estáveis na presença de tensoativos para concentrações de até 80% de tensoativo, indicando empacotamento denso dos fosfolipídios na membrana.

A modelagem matemática da formação de lipossomas mostrou que o modelo que considera a penetração de solução aquosa no filme lipídico e a dissolução deste filme, seguida pela formação dos lipossomas, é adequado para representar os dados experimentais em toda a faixa de concentração estudada. O modelo permitiu também verificar que a dissolução do filme lipídico se processa rapidamente, não ocorrendo a formação de um comprimento molhado significativo. Por fim o modelo permitiu estimar a espessura do filme depositado sobre a parede dos tubos de vidro para todas as concentrações estudadas. A espessura obtida pelo modelo está de acordo com as observações experimentais que sugerem a formação de um filme lipídico delgado.

Como conclusão geral pode-se dizer que o sistema multitubular e instalação para produção contínua de lipossomas são promissores, e que constituem um sistema simples e versátil para o escalonamento do processo. Os resultados contribuem para o desenvolvimento de processos contínuos, esterilizáveis e escalonáveis para a produção de lipossomas.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros podemos citar:

- 1) Realizar os experimentos com o sistema fechado para minimizar a influência da evaporação do etanol durante a etapa de adsorção;
- 2) Definir um novo procedimento para quantificação da massa adsorvida para se poder calcular os rendimentos dos processos de adsorção e hidratação separadamente;
- 3) Realizar ensaios em um módulo composto por tubos de maior tamanho ou então com um maior número de tubos para se avaliar de maneira mais adequada a possibilidade de aumento de escala;
- 4) Avaliar a possibilidade de encapsulação de outros fármacos de diferentes tamanhos e hidrofobicidades;
- 5) Associar as características dos lipossomas produzidos com a cristalinidade dos filmes lipídicos;
- 6) Associar um novo módulo, em série com o sistema multitubular, para estudar a redução de tamanho dos lipossomas;
- 7) Estudar o reaproveitamento da solução etanólica, contendo os fosfolipídios, drenada do sistema multitubular após a adsorção;
- 8) Estudar a formação das estruturas lipídicas expandidas no sistema multitubular;



---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMICH, M., BACH, D.T.; **United States Patent**, n. 4.622.188, 1986.

ALVES, G.P.; **Estudo do Processo de Produção de Partículas Lipídicas Sólidas e Lipossomas: Estudo de Variáveis e Encapsulação de Medicamentos de Primeiro Tratamento da Tuberculose**, Campinas, FEQ, UNICAMP, 2003. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

BANERJEE, R.; **Journal of Biomaterials Applications**, 16, p.3-21, 2001.

BANGHAM, A.D., STANDISH, M.M., WATKINS, J.C.; **Journal of Molecular Biology**, 13, p.238, 1965.

BARENHOLZS, Y., LASIC, D.; **Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes Volume III**; CRC Press, Boca Raton, 1996.

BARNADAS-RODRÍGUEZ, R., SABES, M.; **International Journal of Pharmaceutics**, 213, p.175-186, 2001.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E.; **Como Fazer Experimentos**, Editora da Unicamp, Campinas, 2001.

BENAMEUR, H., MOES, A., **United States Patent**, n. 6.217.899, 2001.

BRACKEN, K.R.; **United States Patent**, n. 4.935.171, 1990.

BRANDL, M., DRESCHLER, M., BACHMANN, D., TARDI, C., SCHMIDTGEN, M., KURT-HEINZ, B.; **International Journal of Pharmaceutics**, 170, p.187-199, 1998.

CAFISO, D.S., PETTY, H.R., MC CONNELL, H.M.; **Biochimica et Biophysica Acta**, 649, p.129-132, 1981.

CEVC, G.; **Phospholipids Handbook**, Marcel Dekker, New York 1993.

---

CHEN, P., TONIBARA, T.Y. WARNER, H.; **Analytical Chemistry**, 28, p. 1756-1758, 1956.

COHEN, B.; **United States Patent**, n. 4.619.795, 1986.

COLLINS, D.; **United States Patent**, n. 6.355.267, 2002.

DRAPER, N.R., SMITH, H.; **Applied Regression Analysis**, 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley & Sons Inc., New York, 1981.

EDWARDS, K., ALMGREN, M.; **Langmuir**, 8, p. 824-832, 1992.

GREGORIADIS, G.; **Liposome Technology**; CRC Press, Boca Raton, 1993.

GUY, R.H., HADGRAFT, J., KELLAWAY, I.W., TAYLOR, M.J.; **International Journal of Pharmaceutics**, 11, p. 199-207, 1982.

HUNT, C.A., PAPAHA DJOPOULOS, D.P.; **United States Patent**, n. 4.529.561, 1985.

ISRAELACHVILI, J.; **Intermolecular & Surface Forces**, 2nd Edition, Academic Press, London, 1992.

KIKUCHI, H., YAMAUCHI, H., HIROTA, S.; **Chemistry and Physics of Lipids**; 39, p.3-18, 1991.

KREMER, J.M.H., VD. ESKER, M.W.J., PATHMANOHARAN, C., WIERSEMA, P.H.; **Biochemistry**, 16, p.3932-3935, 1977.

LASIC, D.L.; **Liposomes: from Physics to Applications**; Elsevier, Amsterdam, 1993.

LASIC, D.L.; **Liposomes in Gene Delivery**; CRC Press, Boca Raton, 1997.

MEZEI, M., NUGENT, F.; **United States Patent**, n. 4.485.054, 1984.

MORTHA, G., MASSON, N., DEPERRAZ, P.; **Pharmaceutical Technology Conference**, pp. 264-285, 1993.

NAEFF, R.; **Advanced Drug Delivery Reviews**, 18, p.343-347, 1996.

NEW, R.R.C.; **Liposomes: a Practical Approach**; IRL Press, Oxford, 1990.

OTAKE, K., IMURA, T., SAKAI, H., ABE, M.; **Langmuir**, 17, p.3898-3901

---

PERRETT, S., GOLDING, M., WILLIAMS, P.; **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 43, p.154-161, 1991.

PERRY, J.H.; **Perry's Chemical Engineers' Handbook, 7th Edition**, New York, McGraw-Hill, 1997.

REDZINIAK, G., MEYBECK, A.; **United States Patent**, n. 4.508.703, 1985.

REDZINIAK, G., PERRIER, P., MARECHAL, C., A.; **Liposomes at Industrial Scale. In: Philippot, J., Schber, F. Liposomes as Tools in Basic Research and Industry**, CRC Press, Boca Raton, 1995.

RUFFINO NETTO, A.; **Tuberculose MDR, Médicos (HC-FMUSP) – Doenças Emergentes e Reemergentes**, ano I, n. 3, 1998.

SAEGUSA, K., ISHII, F.; **Langmuir**, 18, p.5984-5988, 2002.

SHERRIS, J.C.; **Medical Microbiology: an Introduction to Infectious Disease**, 2nd Edition, London, Prentice Hall International, 1990.

SORGI, F., HUANG, L.; **International Journal of Pharmaceutics**, 144, p.131-139, 1996.

TOURNIER, H., SCHNEIDER, M., GUILLOT, C.; **United States Patent**, no. 5.980.937, 1999.

VEMURI, S., RHODES, C.; **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, 70, p.95-111, 1995.

VILLANOVA, J., CONSIGLIERI, V.; **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 36, p.179-200, 2000.

WAGNER, A., VORAUER-UHL, K., KATINGER, H.; **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 54, p.213-219, 2002.

WASHBURN, E.W.; **Physics Reviews**, 17, p. 273-281, 1921.



## ANEXOS

### Anexo I - Curva de Calibração para Quantificação de Fosfato

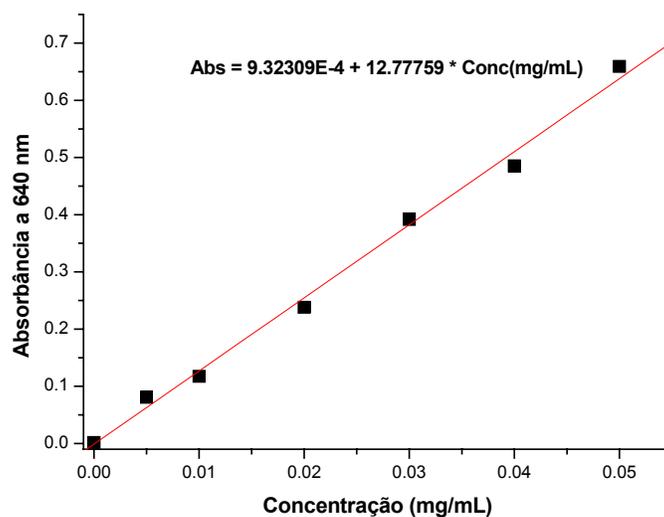


Figura 32 - Curva de Calibração do Método de Stewart.

## Anexo II - Curva de Calibração para Quantificação de Fosfolipídios em Solução Aquosa

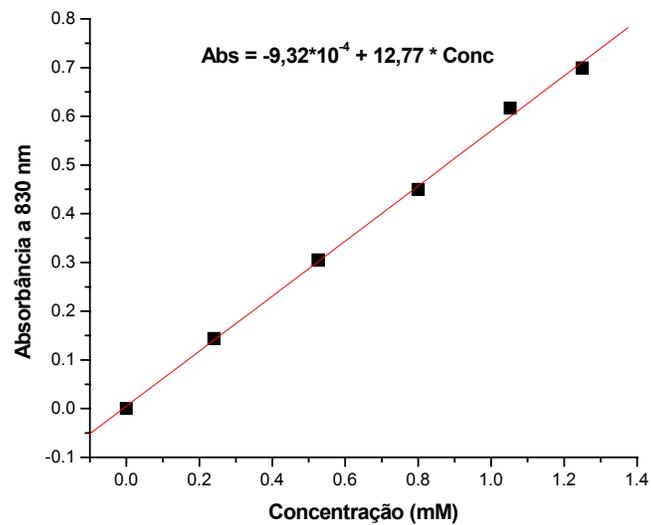


Figura 33 - Curva de Calibração do Método de Quantificação de Fosfato de CHEN.

---

### Anexo III - Curva de Calibração para Determinação de Pirazinamida Encapsulada em Lipossomas

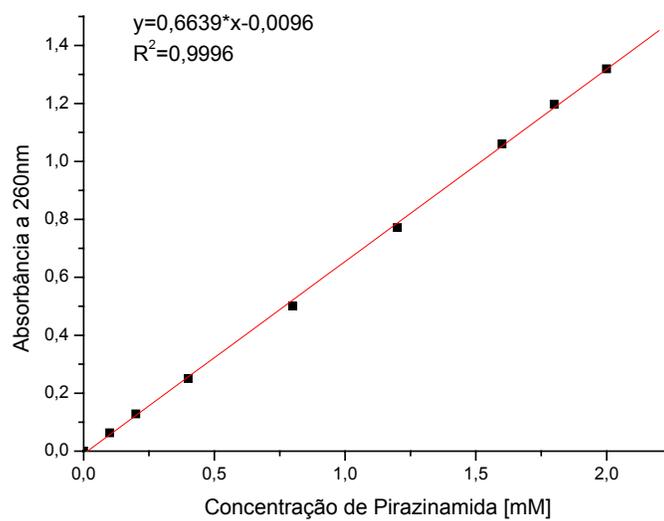


Figura 34 - Curva de Calibração para Determinação de Pirazinamida após Incubação com Álcool.

#### Anexo IV - Curva de Calibração para Determinação de Pirazinamida não Encapsulada

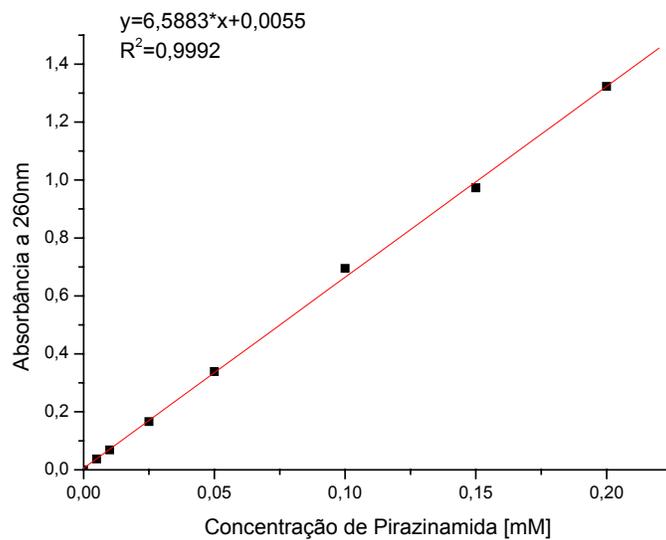


Figura 35 - Curva de Calibração para Determinação de Pirazinamida sem Incubação com Álcool.

## Anexo V - Modelo da Difusão de Solutos no Interior de Esferas Porosas

O processo de difusão dos fármacos do interior de partículas sólidas e lipossomas é apresentado na Figura VI.

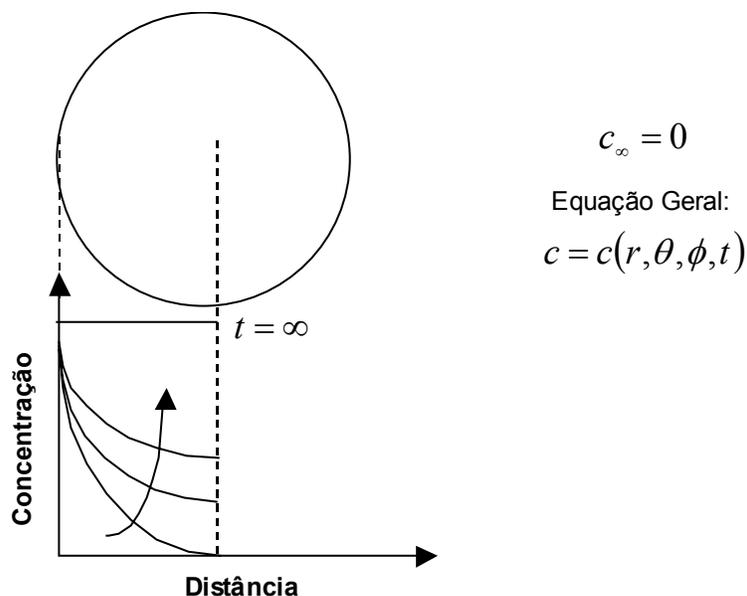


Figura 36 -Modelo físico de difusão de solutos no interior de esferas sólidas.

Nesse modelo considerou-se as seguintes hipóteses:

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

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

Na prática  $c_\infty$  é constante e uniforme para uma certa esfera (e não no trecho da coluna que contém as partículas);

- Existe simetria em  $\theta$  e  $\phi$ ,  $\Rightarrow c = c(r,t)$ ;
- Propriedades físicas permanecem uniformes e constantes.

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

$$D\nabla^2 c = \frac{\partial c}{\partial t} + \text{div}(c \vec{v}) \quad (61)$$

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

$$D\nabla^2 c = \frac{\partial c}{\partial t} \quad (62)$$

Para coordenadas esféricas:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right) = \frac{1}{D} \frac{\partial c}{\partial t} \quad (63)$$

As condições de contorno são:

$$\text{cc1} \rightarrow (\text{condição inicial}) t = 0, \quad 0 \leq r \leq R \quad c(r,t) = c_{\text{int}} \quad (64)$$

$$\text{cc2} \rightarrow t > 0, \quad t > 0, \quad r = R \quad c(R,t) = c_\infty = 0 \quad (65)$$

$$\text{cc3} \rightarrow c(r,t) \text{ é um valor finito para } 0 \leq r \leq R \quad (66)$$

Utilizando o método de separação das variáveis:

$$c(r,t) = R(r)\theta(t) \quad (67)$$

$$\frac{\partial c}{\partial r} = R'(r)\theta(t) \quad (68)$$

$$\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} = R''(r)\theta(t) \quad (69)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = R(r)\theta'(t) \quad (70)$$

Substituindo na equação diferencial parcial (61), tem-se:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} [r^2 R'(r)\theta(t)] = \frac{1}{D} R(r)\theta'(t) \quad (71)$$

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

$$\frac{1}{r^2} [2rR'\theta + r^2 R''\theta] = \frac{1}{D} R\theta' \quad (72)$$

Dividindo por  $c = RS \neq 0$ , obtém-se:

$$\frac{1}{r^2} \frac{1}{R} [2rR' + r^2 R''] = \frac{1}{D} \frac{\theta'}{\theta} = -\lambda \text{ (constante)} \quad (73)$$

$\lambda$  é uma constante,  $\lambda > 0$ , porque  $\lim_{t \rightarrow \infty} c(t)$  é valor finito. Pode-se então separar as equações:

$$r^2 R'' + 2rR' + \lambda^2 r^2 R = 0 \quad (74)$$

$$\theta' + \lambda D \theta = 0 \quad (39)$$

A partir da equação (39):

$$\theta(t) = A \exp(-\lambda D t) \quad (\lambda > 0 \text{ pela cc3}) \quad (75)$$

Quando:  $\lambda = 0$  temos que:

$$\theta(t) = A \text{ (constante)} \quad (76)$$

A partir da equação (38):

$$r^2 \frac{d^2 R}{dr^2} + 2r \frac{dR}{dr} + \lambda r^2 R = 0 \quad (77)$$

Definindo  $y = r.R$ , temos que:

$$R(r) = \frac{y(r)}{r} \quad (78)$$

$$\frac{dR}{dr} = \frac{1}{r} y' - \frac{1}{r^2} y \quad (79)$$

$$\frac{d^2 R}{dr^2} = \frac{1}{r} y'' - \frac{2}{r^2} y' + \frac{2}{r^3} y \quad (80)$$

Substituindo as equações (78), (79) e (80) na equação (77), tem-se:

$$r^2 \left( \frac{1}{r} y'' - \frac{2}{r^2} y' + \frac{2}{r^3} y \right) + 2r \left( \frac{1}{r} y' - \frac{1}{r^2} y \right) + \lambda r^2 \frac{y}{r} = 0 \quad (81)$$

$$r y'' - 2 y' + \frac{2y}{r} + 2 y' - \frac{2y}{r} + \lambda r y = 0 \quad (82)$$

$$y'' + \lambda y = 0 \quad (83)$$

Para  $\lambda = 0$ ,  $y = B_0 r + c_0$  ou  $Rr = B_0 r + c_0$ . Sendo assim temos que:

$$R = B_0 + \frac{c_0}{r} \quad (84)$$

Para  $\lambda > 0$ ,  $y = B_\lambda \operatorname{sen}(\sqrt{\lambda} r) + c_\lambda \cos(\sqrt{\lambda} r)$ . Sendo assim temos que:

$$R = \frac{1}{r} \left[ B_\lambda \operatorname{sen}(\sqrt{\lambda} r) + c_\lambda \cos(\sqrt{\lambda} r) \right] \quad (85)$$

Pela condição de contorno cc3  $\Rightarrow C(r,t)$  é finita, tem se que:

$$\lim_{r \rightarrow 0} \frac{1}{r} = +\infty \quad e \quad \lim_{r \rightarrow 0} \operatorname{sen} \frac{(\sqrt{\lambda} r)}{r} = \sqrt{\lambda} \quad (86)$$

Portanto:

$$c_0 = 0 \text{ e } c_\lambda = 0 \quad (87)$$

Logo:

$$c(r,t), \quad A_0 = B_0 A \quad (\lambda = 0) \quad (\text{solução em regime permanente}) \quad (88)$$

$$A_\lambda \exp(-\lambda Dt) \frac{1}{r} \text{sen}(\sqrt{\lambda} r) \quad (\lambda > 0) \quad (\text{solução em regime transiente}) \quad (89)$$

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

$$\text{Pela cc1, } t = 0 \quad \forall r \quad c(r,0) = c_{\text{int}} \quad (90)$$

$$\text{Pela cc2, } t > 0 \quad r = R \quad c(R,t) = 0 \quad (91)$$

$$\text{Ou, } A_\lambda \exp(-\lambda Dt) \frac{1}{R} \text{sen}(\sqrt{\lambda} R) = 0 \quad (92)$$

Para a solução não trivial isto só é possível se  $\sqrt{\lambda} R = n\pi$ ,  $n = 1,2,3\dots$  (93)

$$\lambda = \left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 \quad n = 1,2,3\dots \quad (94)$$

$$c(r,t) = A_n \exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right] \frac{1}{r} \text{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{R}\right) \quad n = 1,2,3\dots \quad (95)$$

Pela superposição das soluções:

$$c(r,t) = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right] \frac{1}{r} \text{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{R}\right) \quad (96)$$

$$\text{Pela cc1: } c(r,0) = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \frac{1}{r} \text{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{R}\right) = c_{\text{int}}$$

(97)

Multiplicando por r:

$$\sum_{n=1}^{\infty} A_n \operatorname{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{a}\right) = c_{\text{int}} r \quad 0 \leq r \leq a \quad (98)$$

A solução da equação (98) é uma série de Fourier de senos, onde:

$$A_n = \frac{2}{R} \int_0^R (c_{\text{int}} r) \operatorname{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{a}\right) dr = \frac{-2Rc_{\text{int}}(-1)^n}{n\pi} \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (99)$$

$$c(r, t) = -\sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{2R}{n\pi} c_{\text{int}} \exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right] \frac{1}{r} \operatorname{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{R}\right) \quad (100)$$

Ou, rearranjando:

$$c(r, t) = -2c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right] \frac{\operatorname{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{R}\right)}{\frac{n\pi \cdot r}{R}} \quad (101)$$

Considerando “N” partículas, a quantidade total do soluto difundido no solvente é dada por:

$$c(t) = N \int_0^R c(r, t) 4\pi \cdot r^2 dr = N \left[ -2c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 D\theta\right]}{\frac{n\pi}{R}} \int \frac{\operatorname{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{R}\right)}{r} 4\pi \cdot r^2 dr \right] \quad (102)$$

De (102) tem-se que:

$$c(t) = -N8\pi c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 D\theta\right]}{\frac{n\pi}{R}} \int \operatorname{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{R}\right) r dr \quad (103)$$

$$= -8\pi c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 D\theta\right]}{\frac{n\pi}{R}} \left[ \frac{-r \cos\left(\frac{n\pi \cdot r}{R}\right) \operatorname{sen}\left(\frac{n\pi \cdot r}{R}\right)}{\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2} \right]_0^R \quad (104)$$

$$= -8\pi N c_{\text{int}} \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 D\theta\right]}{\frac{n\pi}{R}} \left[ \frac{-R \cos n\pi}{\frac{n\pi}{R}} \right] \quad (105)$$

$$= 8\pi N c_{\text{int}} R^3 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^{2n} \frac{\exp\left[-\left(\frac{n\pi}{R}\right)^2 Dt\right]}{n^2 \pi^2} \quad (105)$$

$$= \frac{8\pi N c_{\text{int}} R^3}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (106)$$

$$\frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = A^* \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (107)$$

Quando  $t = 0$   $\frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = 1 = A^* \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2}$  (108)

Significa que todo o solvente está no interior das “N” esferas, logo  $c(t) = c_{\text{int}}$  e

sendo  $\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} = \frac{\pi^2}{6}$

$$1 = A^* \frac{\pi^2}{6}, \quad \text{logo} \quad A^* = \frac{6}{\pi^2} \quad (109)$$

$$\frac{c(t)}{c_{\text{int}}} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (110)$$

A concentração de fármaco difundido ao meio será:

$$c^*(t) = \frac{4\pi R^3 [c_{\text{int}} - c(t)] N}{3V} \quad (111)$$

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

$$c^*_{\text{int}} = c_{\text{int}} \left( \frac{4\pi R^3 N}{3V} \right) \quad (112)$$

Onde: V = volume do meio e N = número de esferas do meio, logo:

$$\frac{c^*(t)}{c_{\text{int}}} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp(-n^2 \pi^2 kt) \quad (113)$$

A equação (113) corresponde ao modelo já calculado por GUY *et al.*, 1982.