

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

**PRODUÇÃO DE LIPOSSOMAS PELO MÉTODO DE INJEÇÃO DE ETANOL
ENCAPSULANDO AGENTES TUBERCULOSTÁTICOS E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL DE ESCALONAMENTO DO PROCESSO**

Autora: ME. Oselys Rodriguez Justo

Orientadora: Dra. Ângela Maria Moraes

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

200413575

Campinas - São Paulo

Dezembro de 2003

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	TI/UNICAMP
	R618p
V	
TOT	59531
PROC	16-P.117/04
C	X
PREÇO	11,00
DATA	14/09/2004
Nº CPD	

Bib Id 321561

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

R618p Rodriguez Justo, Oselys
 Produção de lipossomas pelo método de injeção de
 etanol encapsulando agentes tuberculostáticos e
 avaliação do potencial de escalonamento do processo /
 Oselys Rodriguez Justo.--Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

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

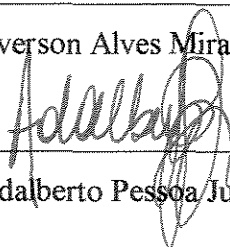
Tese de Doutorado defendida por Oselys Rodriguez Justo e aprovada em 19 de Dezembro de 2003 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof(a). Dr(a). - Orientador(a). Ângela Maria Moraes



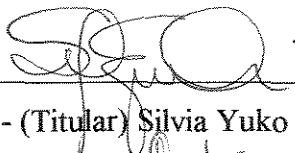
Prof. Dr. - (Titular) Everson Alves Miranda



Prof. Dr. - (Titular) Adalberto Pessoa Junior



Prof. Dr. - (Titular) Adriano Rodrigues Azzoni

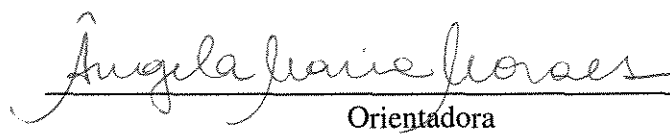


Dr(a). - (Titular) Silvia Yuko Eguchi



Dr.(Titular) Cláudio de Lima Miguel Martinez

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


Orientadora

Com carinho, a minha maravilhosa família,
minhas belas filhas, meu marido Victor,
minha querida irmã e meus pais.

AGRADECIMENTOS

A culminação deste trabalho está indissoluvelmente ligada ao apoio e colaboração de muitas pessoas, às quais estarei muito agradecida. Assim sendo, gostaria de agradecer:

Aos meus pais Alba e Orlando, minha irmã querida e toda minha grande família por seus grandes estímulos, o apoio e por estar sempre comigo em todos os momentos apesar da grande distancia.

A meu marido Victor pelo seu amor, carinho, companheirismo e ajuda profissional durante todo o trabalho.

A meus grandes tesouros, minhas belas filhas Jessica e Julia, por serem muito importantes para mim.

A Victor Rafael por seu, carinho, companhia e ajuda na etapa final deste trabalho.

A meus amigos de perto e de longe, pelo carinho de sempre e principalmente pela amizade.

À professora Dra. Ângela Maria Moraes pela aceitação, ajuda, respeito e confiança nos momentos de dificuldades e particularmente pela orientação científica durante todos estes anos. Muito obrigada.

Aos professores do Departamento de Processos Biotecnológicos pelas discussões científicas, pela disposição e pelo uso dos Laboratórios do Departamento durante todo o trabalho desenvolvido.

A todos os Professores e aos colegas de faculdade especialmente à Chrissana pela excelente amizade, companheirismo, carinho e entendimento nos anos de pesquisa da Pós-Graduação.

A todos os colegas do Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides, pelo companheirismo, ajuda e estímulo.

A todos os colegas de Pós-Graduação do Departamento de Processos Biotecnológicos que de alguma forma contribuíram para o melhor desenvolvimento deste trabalho.

Às pessoas que com sua ajuda permitiram o desenvolvimento de alguma parte deste projeto de pesquisa.

Gostaria de agradecer à FAPESP pela concessão da Bolsa e o apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

Enfim, a todos os que me acompanharam e foram parte deste processo. Muito obrigada.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo o escalonamento da produção de lipossomas projetados para a liberação controlada por inalação de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose, visando a melhoria de sua eficácia terapêutica e a redução de sua toxicidade. O método de injeção de etanol foi selecionado para a produção das vesículas, por ser simples e de baixo custo. Os fármacos isoniazida, pirazinamida e rifampicina, comumente usados na terapia primária da tuberculose e o agente terapêutico kanamicina, empregado em casos de tuberculose resistente a múltiplos compostos terapêuticos, assim como o fármaco modelo doxorubicina, foram incorporados nas vesículas unilamelares contendo basicamente lecitina natural purificada e colesterol, dentre outras formulações. Foram avaliados os efeitos de variáveis operacionais como temperatura, taxa de agitação, velocidade de injeção e concentração inicial de lipídios nas características finais dos lipossomas obtidos. As formulações preparadas foram caracterizadas quanto às concentrações finais de lipídios e de fármacos, ao tamanho dos lipossomas, a sua lamelaridade, à estabilidade de estocagem na forma de suspensão aquosa e de pó liofilizado reconstituído. Os principais resultados indicaram que as vesículas preparadas pelo método de injeção de etanol em escala de bancada permitiram encapsular ativamente os fármacos em estudo, embora o gradiente de pH estabelecido nestes lipossomas tenha se mostrado estável por menos de cinco dias. As características finais das vesículas preparadas por injeção de etanol em maior escala foram influenciadas pelo tipo e intensidade da agitação da fase aquosa, pela temperatura desta fase e pelo diâmetro da agulha de injeção. Foram obtidas altas eficiências de encapsulação ativa dos fármacos nestes lipossomas, atingindo-se até 100%, sendo tais eficiências influenciadas principalmente pela concentração inicial e pela composição lipídica das vesículas. As vesículas constituídas de fosfatidilcolina sintética mostraram-se mais apropriadas para a encapsulação dos fármacos, entretanto, seu custo é substancialmente maior. As populações mais frequentes nos lipossomas apresentaram diâmetros médios variando de 132 a 156 nm. O processo de liofilização das vesículas provocou aumento em seu diâmetro médio e diminuição nas eficiências de encapsulação obtidas, e a adição dos crioprotetores manitol e sacarose não preveniu a agregação e fusão dos lipossomas. A análise preliminar da viabilidade econômica da produção de lipossomas preparados por injeção de etanol em larga escala e a subsequente incorporação do fármaco kanamicina indicou que o processo é economicamente viável.

Palavras-chave: lipossomas, escalonamento, injeção de etanol, tuberculose.

ABSTRACT

The aim of this work was to the scale-up of the production of liposomes designed for the administration through inhalation of drugs used in tuberculosis therapy, seeking to improve drug therapeutic efficacy as well to reduce drug toxicity. The method based on ethanol injection was selected for vesicle production due to its simplicity and low cost. The drugs isoniazid, pyrazinamide and rifampin, indicated for tuberculosis primary treatment, as well as kanamycin, a drug used for multiresistant tuberculosis therapy and doxorubicin, a model drug, were incorporated in unilamellar vesicles basically prepared from purified natural lecithin and cholesterol, among other formulations. The effects of operational variables such as temperature, mixing rate, injection rate and initial lipid concentration on the characteristics of the vesicles were analyzed. The preparations were characterized concerning to lipid and drug concentration, vesicle diameter and lamellarity and also to liposomal storage stability both in aqueous solution and in the lyophilized form after rehydration. The most relevant results indicate that the vesicles prepared by ethanol injection in bench scale were able to actively encapsulate the studied drugs, however, the pH gradient established in liposomal membrane was stable for less than five days. The final characteristics of vesicles prepared by ethanol injection in larger scale were affected by aqueous phase mixing type and intensity, temperature as well as by the injection needle inner diameter. High active encapsulation efficiencies of the evaluated drugs in liposomes were achieved, reaching 100%, and those efficiency values were influenced by lipid concentration and composition. The vesicles containing synthetic phosphatidylcholine were more adequate for drug encapsulation, however, their cost is substantially higher. The most frequent populations in liposomes presented average diameters varying in the range from 132 to 156 nm. The lyophilization caused increases in vesicle mean diameters, reduced drug incorporation efficiency and the addition of the cryoprotectors mannitol and sucrose did not prevent vesicle aggregation and fusion. A preliminary analysis showed that the large scale production of liposomes through ethanol injection followed by kanamycin active loading is economically feasible.

Keywords: liposomes, scale-up, ethanol injection, tuberculosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Microscopia eletrônica do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (adaptado de www.microbiologia.com.ar).....	9
Figura 3.2 – Fórmulas moleculares estruturais dos compostos tuberculostáticos isoniazida (MM: 137,5 Da), pirazinamida (MM: 123,1 Da), rifampicina (MM: 823,0 Da) e kanamicina (MM: 582,6 Da).	17
Figura 3.3 – Representação esquemática de lipossomas multilamelares como veículos para a encapsulação de compostos hidrofílicos no cerne aquoso, ou hidrofóbicos na bicamada.	21
Figura 3.4 – Estrutura básica de um fosfolípido, na qual (X) caracteriza o grupo ligado ao grupo fosfato (adaptado de Baggio, 1999).	22
Figura 3.5 – Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro (D) e à morfologia. (a) VUP: vesícula unilamelar pequena ($20 < D < 100$ nm); (b) VUG: vesícula unilamelar grande ($D > 100$ nm); (c) VML: vesícula multilamelar ($D > 0,5$ μ m); (d) VOL: vesícula oligolamelar ($0,1 < D < 1$ μ m); (e) VMV: vesícula multivesicular ($D > 1$ μ m) (adaptada de Crommelin e Schreier, 1994).	27
Figura 3.6 – Representação esquemática da formação de vesículas unilamelares através da injeção de uma solução orgânica de lipídios em uma fase aquosa. O solvente orgânico é imiscível com água e é volatilizado quando de sua injeção na fase aquosa. Cada linha representa um fragmento de bicamada lipídica.	33
Figura 3.7 – Representação esquemática da formação de vesículas lipídicas unilamelares através da injeção de uma solução orgânica miscível de lipídios em uma fase aquosa. Cada estrutura esférica representa um lipossoma formado.	35
Figura 4.1 - Procedimento para a obtenção de vesículas unilamelares por hidratação do filme lipídico seco em escala de bancada.....	68
Figura 4.2 - Procedimento para a obtenção de vesículas unilamelares por injeção de etanol em escala de bancada.	71

Figura 4.3 – Montagem experimental para a preparação de vesículas lipídicas por injeção de etanol usada nos estudos de ampliação de escala e o elemento de agitação empregado.	72
Figura 4.4 – Esquema da técnica de encapsulação ativa de compostos terapêuticos em vesículas lipídicas. (1) Preparação dos lipossomas a pH 4,0; (2) estabelecimento do gradiente de pH; (3) incubação dos lipossomas com o fármaco; (4) incorporação do fármaco.	74
Figura 5.1 – Diagrama com as etapas e os ensaios realizados durante o trabalho de pesquisa.	88
Figura 5.2 - Isotermas de Langmuir para os fosfolipídios DSPC e SPC e para o lipídio colesterol.	89
Figura 5.3 - Isotermas de Langmuir-Blodgett para as misturas de DSPC/Col e SPC/Col (60/40 mol%).	90
Figura 5.4 - Termograma obtido por microcalorimetria diferencial de varredura para o fosfolipídio SPC.	92
Figura 5.5 – Avaliação da absorbância a 260 nm de lipossomas extrudados de SPC/Col (60:40 mol/mol) a diferentes concentrações lipídicas em presença de etanol.	95
Figura 5.6 - Avaliação do método de ultrafiltração na remoção do composto terapêutico isoniazida de uma amostra com uma concentração de fármaco livre de 100 mmol/L.	99
Figura 5.7 – Distribuição de tamanhos de lipossomas vazios de SPC/Col obtidos pelo método de extrusão. Diâmetros médios das duas populações de lipossomas: 137 nm (44,6%) e 354 nm (55,4%). Índice de polidispersão de 0,12.	100
Figura 5.8 – Distribuição típica de tamanhos de lipossomas vazios de DSPC/Col obtidos pelo método de injeção de etanol, com diâmetro médio de 120 nm. Índice de Polidispersão de 0,14.	103
Figura 5.9 – Distribuição de tamanhos de lipossomas vazios de SPC/Col obtidos pelo método de injeção de etanol. Diâmetro médio de 82 nm (74,6%) para a primeira população e de 202 nm (25,4%) para a segunda população de partículas. Índice de polidispersão de 0,16.	104

Figura 5.10 - Efeito da razão molar inicial isoniazida/lipídio na razão molar final isoniazida/lipídio de vesículas de DSPC/Col obtidas por injeção de etanol em pequena escala, preparados em três lotes distintos.....	105
Figura 5.11 - Efeito da razão molar inicial isoniazida/lipídio na eficiência de encapsulação para vesículas de DSPC/Col obtidas por injeção de etanol em pequena escala, preparadas em 3 lotes distintos.	106
Figura 5.12 – Resultados dos efeitos das variáveis independentes estudadas e de sua interação sobre a razão molar final kanamicina/lipídio incubada durante 10 (■) e 60 minutos (□) nas vesículas de SPC:Col.	117
Figura 5.13 - Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol, incubados por 10 (■) e 60 minutos (□) nas vesículas de SPC:Col.	121
Figura 5.14 - Resultado dos efeitos da temperatura, da razão molar inicial F/L, do tempo e de suas interações sobre a razão molar final kanamicina/lipídio em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol em escala de bancada.	125
Figura 5.15 - Resultado dos efeitos da temperatura, da razão molar inicial F/L, do tempo e de suas interações sobre a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol.	127
Figura 5.16 - Efeito da razão molar inicial doxorrubicina/lipídio na razão molar final doxorrubicina/lipídio de vesículas de SPC/Col preparadas por injeção de etanol em escala de bancada.	130
Figura 5.17 - Efeito da razão molar inicial doxorrubicina/lipídio na eficiência de incorporação ativa de doxorrubicina de vesículas de SPC/Col preparadas por injeção de etanol em escala de bancada.....	131
Figura 5.18 – Resultados da eficiência de estocagem em geladeira a 4 °C dos lipossomas de SPC/Colesterol preparados por injeção de etanol em pequena escala encapsulando ativamente o composto terapêutico doxorrubicina a uma razão molar fármaco/lipídio de 0,55.....	132

Figura 5.19 - Efeito do tempo decorrido após o estabelecimento do gradiente prótons de pH na razão molar final doxorrubicina/lipídio em vesículas lipídicas de SPC/Col obtidas por injeção de etanol em pequena escala, preparadas em 2 lotes distintos. Vesículas lipídicas com diâmetro médio de 227,8 nm (o) e 210,7 nm (*).	134
Figura 5.20 - Efeito do tempo decorrido após o estabelecimento do gradiente prótons na eficiência de encapsulação ativa de doxorrubicina em vesículas lipídicas de SPC/Col obtidas por injeção de etanol em pequena escala, preparadas em 2 lotes distintos. Vesículas lipídicas com diâmetro médio de 227,8 nm (o) e 210,7 nm (*).	135
Figura 5.21 – Estabilidade do gradiente de prótons estabelecido em vesículas lipídicas de SPC/Col com diâmetro médio de 108,8 nm obtidas por injeção de etanol em pequena escala na avaliação da razão molar final fármaco/lipídio (■) e na eficiência de encapsulação (o).	137
Figura 5.22 – Efeitos das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre a variável resposta diâmetro médio das vesículas de SPC:Col.	144
Figura 5.23 – Superfície representativa da influência das variáveis agitação e vazão no diâmetro médio das vesículas lipídicas.	145
Figura 5.24 – Efeitos das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre a eficiência de encapsulação da pirazinamida nas vesículas de SPC:Col.	150
Figura 5.25 - Superfície representativa da influência das variáveis: concentração lipídica inicial e vazão na eficiência de encapsulação de pirazinamida nas vesículas lipídicas.	150
Figura 5.26 - Superfície representativa da influência das variáveis: concentração lipídica inicial e intensidade de agitação (A) e vazão de injeção e intensidade de agitação (B) na eficiência de encapsulação de pirazinamida nas vesículas lipídicas.	151
Figura 5.27 – Efeitos das variáveis independentes: concentração inicial de lipídios, vazão de injeção, agitação e de suas interações sobre a eficiência de encapsulação da kanamicina nas vesículas de SPC:Col.	156

Figura 5.28 - Distribuição de tamanhos dos lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol variando-se a temperatura da solução aquosa na qual os lipídios eram injetados. Índices de polidispersão menores que 0,2.	161
Figura 5.29 - Variações no diâmetro hidrodinâmico durante o tempo de estocagem de 8 semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas de composições variadas contendo o composto terapêutico kanamicina em uma razão molar inicial de 0,16.....	164
Figura 5.30 – Distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas preparadas durante o escalonamento do método de preparação por injeção de etanol. Índices de polidispersão menores de 0,5.....	169
Figura 5.31 – Distribuição de tamanhos dos lipossomas liofilizados durante 24 horas após rehidratação. Índices de polidispersão menores de 0,5.	171
Figura 5.32 – Fluxograma do processo de produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando o fármaco kanamicina.	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Coeficientes de partição dos compostos tuberculostáticos em sistemas aquosos/1-octanol. Composição das fases aquosas: água deionizada; ácido cítrico a 300 mmol/L e pH 4,0; HEPES a 100 mmol/L e pH 7,4; HEPES/NaCl a 100/120 mmol/L e pH 7,4 e HEPES/NaCl a 100/120 mmol/L e pH 13,0.	20
Tabela 3.2 – Coeficientes de partição dos compostos tuberculostáticos em sistemas aquosos/n-dodecano. Composição das fases aquosas: água deionizada; ácido cítrico a 300 mmol/L e pH 4,0; HEPES a 100 mmol/L e pH 7,4; HEPES/NaCl a 100/120 mmol/L e pH 7,4 e HEPES/NaCl a 100/120 mmol/L e pH 13,0.	20
Tabela 3.3 – Formas possíveis de empacotamento de fosfolipídios e outras moléculas anfífilas em função de diferentes valores do parâmetro de empacotamento crítico (p). Adaptado de Baggio, 1999.	24
Tabela 3.4 - Principais parâmetros relacionados com a estabilidade das formulações lipídicas (adaptado de Braun e col., 1992).	43
Tabela 4.1 – Composições lipídicas empregadas na preparação dos lipossomas em escala de bancada. Foram utilizadas soluções dos lipídios a 100 mmol/L em etanol.	70
Tabela 5.1 – Eficiências de encapsulação obtidas para a incorporação passiva de uma solução de isoniazida a 100 mmol/L em lipossomas de SPC/Col preparados por extrusão usando vários métodos de remoção do fármaco não incorporado.....	98
Tabela 5.2 – Eficiências de encapsulação obtidas para a incorporação de isoniazida em lipossomas preparados por injeção de etanol em menor escala.	108
Tabela 5.3 – Incorporação ativa de kanamicina a 60 °C, 200 rpm por 10 minutos em lipossomas de SPC:Col para distintas concentrações iniciais do fármaco kanamicina.	112
Tabela 5.4 - Planejamentos experimentais 2^2 para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas durante 10 e 60 minutos de incubação a diferentes temperaturas e razões molares iniciais fármaco/lipídios.....	113

Tabela 5.5 - Estimativa dos efeitos para 10 minutos de incubação na razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina.	114
Tabela 5.6 - Estimativa dos efeitos para 60 minutos de incubação na razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina.	115
Tabela 5.7 - Valores dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial para 60 minutos de incubação na razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina.	115
Tabela 5.8 - Análise da variância para a razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina nas vesículas de SPC:Col obtidas por injeção de etanol.	116
Tabela 5.9 - Estimativa dos efeitos para 10 minutos de incubação na eficiência de encapsulação da kanamicina.	118
Tabela 5.10 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col incubada durante 10 minutos.	119
Tabela 5.11 - Estimativa dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (95%), obtidos do planejamento fatorial para 60 minutos de incubação na eficiência de encapsulação da kanamicina.	120
Tabela 5.12 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col incubada durante 60 minutos.	120
Tabela 5.13 – Novo conjunto de experimentos, na condição central para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas.	122
Tabela 5.14 - Estimativa dos efeitos para a razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina.	123
Tabela 5.15 - Análise da variância para a razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina em lipossomas de SPC:Col.	124
Tabela 5.16 - Estimativa dos efeitos das variáveis estudadas na eficiência de encapsulação ativa da kanamicina.	126
Tabela 5.17 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col.	126

Tabela 5.18 - Planejamento experimental completo (2^3) para o diâmetro médio de vesículas lipídicas de SPC:Col preparadas por injeção de etanol automatizada.....	140
Tabela 5.19 - Estimativa dos efeitos para o diâmetro médio das vesículas lipídicas, para 95% de confiança.	141
Tabela 5.20 - Valores de coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial, para o diâmetro médio das vesículas lipídicas obtidas de SPC:Col.	142
Tabela 5.21 – Resultados da análise da variância para o diâmetro médio dos lipossomas.	143
Tabela 5.22 - Planejamento experimental completo (2^3) para a encapsulação da pirazinamida em lipossomas de SPC:Col preparados pelo procedimento automatizado de injeção de etanol.....	146
Tabela 5.23 - Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação de pirazinamida nas vesículas lipídicas obtidas, para 95% de confiança.....	147
Tabela 5.24 - Valores de coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), para a eficiência de encapsulação de pirazinamida nos lipossomas.	148
Tabela 5.25 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da pirazinamida nas vesículas de SPC:Col obtidas por injeção de etanol em maior escala.....	148
Tabela 5.26 - Planejamento experimental completo (2^3) para a encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col preparados pelo procedimento automatizado de injeção de etanol.	152
Tabela 5.27 - Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação de kanamicina nas vesículas lipídicas obtidas, para 95% de confiança.....	153
Tabela 5.28 - Valores de coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial, para a eficiência de encapsulação de kanamicina nas vesículas lipídicas obtidas.	154
Tabela 5.29 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da kanamicina nas vesículas de SPC:Col obtidas por injeção de etanol.....	155

Tabela 5.30 - Valores de diâmetro médio de vesículas de SPC:Col preparadas pelo método de injeção de etanol.	158
Tabela 5.31 - Valores de diâmetro médio de vesículas de SPC:Col preparadas pelo método de injeção de etanol com variações na temperatura da solução aquosa. Diâmetro da agulha: 4 μm	160
Tabela 5.32 - Incorporação ativa de kanamicina em lipossomas de diferentes composições lipídicas.	163
Tabela 5.33 – Condições empregadas durante o escalonamento da produção dos lipossomas de SPC/Col por injeção de etanol. Condições de preparação de referência para a produção de vesículas lipídicas com diâmetro médio menor que 400 nm: 650 rpm e volume total de 80 mL. Concentração de lipídios em etanol de 100 mmol/L, temperatura de 50 °C e vazão de injeção de 60 mL/h	167
Tabela 5.34 – Valores dos diâmetros médios obtidos durante o escalonamento da produção das vesículas lipídicas de SPC/Col por injeção de etanol.	168
Tabela 5.35 – Valores dos diâmetros médios obtidos durante o escalonamento da produção das vesículas lipídicas de SPC/Col por injeção de etanol após a liofilização e rehidratação das suspensões. As condições experimentais foram as mesmas mencionadas na Tabela 5.34.	170
Tabela 5.36 – Valores dos diâmetros médios e das eficiências de encapsulação obtidos durante o escalonamento da produção das vesículas lipídicas de SPC/Col por injeção de etanol após a liofilização e rehidratação das suspensões.	173
Tabela 5.37 – Valores dos parâmetros considerados e estimados no cálculo da massa total de kanamicina incorporada em uma amostra de 10 mL de lipossomas de SPC/Col preparados por injeção de etanol automatizada a uma concentração lipídica de 2 mmol/L. A área ocupada por molécula de SPC/Col foi considerada nos cálculos como 38,0 $\text{\AA}^2$	176
Tabela 5.38 – Estimativa dos preços de equipamentos da planta de produção de lipossomas.	180
Tabela 5.39 – Índices médios de composição do investimento total a partir do preço dos equipamentos (Petrides, 2000).	181

Tabela 5.40 – Estimativa dos custos da matéria-prima (Catálogo da Sigma Chemical Company, 2001).	182
Tabela 5.41 –Análise econômica total para a produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol.	183

NOMENCLATURA E ABREVIACÕES

$(F/L)_{\text{final}}$: Razão molar final Fármaco/Lipídio (mol/mol)

$(F/L)_{\text{inicial}}$: Razão molar inicial Fármaco/Lipídio (mol/mol)

$[H^+]_{\text{externa}}$: Concentração externa de prótons (mol)

$[H^+]_{\text{interna}}$: Concentração interna de prótons (mol)

$[HA^+]_{\text{externa}}$: Concentração externa do composto protonado (mol)

$[HA^+]_{\text{interna}}$: Concentração interna do composto protonado (mol)

H_L : Altura da coluna de líquido (m)

ρ : Densidade do fluido (kg. m^{-3})

D_i : Diâmetro do impelidor (m)

D_T : Diâmetro do tanque (m)

N : Frequência de rotação (rpm ou rps)

N_p : Número adimensional de potência

N_{Re} : Número de Reynolds

P : Potência transmitida na agitação (W)

μ : Viscosidade do fluido ($\text{kg. m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

V : Volume do tanque (m^3)

AIDS: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

A_o : Área superficial ótima ($\text{\AA}^2$)

BCG: Bacilo de Calmette-Guerin

cmc: Concentração micelar crítica (mol)

CO_2 : Dióxido de carbono

Col: Colesterol

D : Coeficiente de difusão médio da vesícula ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

D : Diâmetro médio dos lipossomas (nm)

DLPC: Dilauroilfosfatidilcolina

DMPC: Dimiristoilfosfatidilcolina

DMPE: Dimiriesfosfatidiletanolamina

DMPG: Dimiristoilfosfatidilglicerol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPG: Dipalmitoilfosfatidilglicerol

DSPC: Distearoilfosfatidilcolina

DSPE: Distearoilfosfatidiletanolamina

DSPE-PEG: Distearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol

EPC: Fosfatidilcolina de ovo

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

HCl: Ácido clorídrico

HIV: Virus de Imunodeficiência Humana

k : Constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$)

L_c : Comprimento efetivo máximo da cadeia ou comprimento crítico (Å)

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

O-SAP: O-stearilamilopectina

P : Coeficiente de partição

p: Parâmetro de empacotamento crítico

PC: Fosfatidilcolina

PE: Fosfatidiletanolamina

PEG: Polietilenoglicol

R_h : Raio hidrodinâmico médio (m ou nm)

RMN: Ressonância magnética nuclear

RNA: Ácido ribonucléico

SDS: Dodecilsulfato de sódio

SER: Sistema reticuloendotelial

SPC: Fosfatidilcolina de soja

T: Temperatura absoluta (K ou °C)

T_C : Temperatura de transição gel/líquido cristalino dos fosfolípidios (K ou °C)

TNBS: Ácido trinitrobenzeno sulfônico

V : Volume molecular da porção hidrofóbica ($\text{\AA}^3$)

VML: Vesícula multilamelar

VMV: Vesícula multivesicular

VOL: Vesícula oligolamelar

VP: Vesícula pequena

VUG: Vesícula unilamelar grande

VUP: Vesícula unilamelar pequena

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1. A Tuberculose e suas Características	9
3.2. Características dos Agentes Terapêuticos Utilizados no Tratamento da Tuberculose..	15
3.3. Características dos Lipossomas.....	21
3.4. Preparação de Lipossomas	30
3.4.1 Preparação de Lipossomas por Injeção de Etanol	32
3.5. Estabilização de Vesículas Lipídicas por Liofilização.....	42
3.6. Aplicação de Sistemas Liberadores de Fármacos na Terapia da Tuberculose.....	50
3.7. Aplicações da Técnica de Nebulização na Administração de Lipossomas.....	57
MATERIAIS E METODOLOGIA.....	63
4.1. Materiais.....	63
4.2. Metodologia.....	64
4.2.1. Obtenção das Isotermas de Langmuir-Blodgett dos Lipídios DSPC, Colesterol e SPC	64
4.2.2. Determinação da Temperatura de Transição de Fases do SPC por Microcalorimetria Diferencial de Varredura	65
4.2.3. Determinação dos Coeficientes de Partição do Fármaco Kanamicina.....	66
4.2.4. Preparação dos Lipossomas.....	66
4.2.4.1. Método de Hidratação do Filme Lipídico Seco.....	67
4.2.4.2. Método de Injeção de Etanol.....	69
4.2.5. Encapsulação Ativa dos Compostos Terapêuticos.....	73

4.2.6. Encapsulação Passiva dos Compostos Terapêuticos.....	75
4.2.7. Remoção do Composto Terapêutico não Encapsulado em Lipossomas	76
4.2.7.1. Remoção por Diálise	76
4.2.7.2. Remoção por Cromatografia de Permeação em Gel	77
4.2.7.3. Remoção por Ultrafiltração	77
4.2.8. Liofilização dos Lipossomas	78
4.2.9. Caracterização dos Lipossomas.....	78
4.2.9.1. Determinação da Concentração de Lipídios.....	78
4.2.9.2. Determinação da Concentração de Composto Terapêutico Encapsulado	80
4.2.9.3. Determinação do Diâmetro Médio e da Distribuição de Tamanhos das Vesículas Lipídicas	83
4.2.9.4. Determinação da Lamelaridade das Vesículas Lipídicas	83
4.2.9.5. Estabilidade de Estocagem em Suspensão Aquosa dos Lipossomas	84
4.2.9.6. Estabilidade dos Lipossomas após Liofilização.....	85
RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1. Resultados Básicos da Caracterização dos Sistemas em Estudo.....	89
5.1.1. Comportamento dos Lipídios Puros e das Misturas Lipídicas em Interfaces Ar-Água	89
5.1.2. Determinação da Temperatura de Transição de Fases da SPC por Microcalorimetria Diferencial de Varredura	91
5.1.3. Comportamento da Kanamicina quanto à Partição nos Sistemas Analisados.....	93
5.1.4. Análise da Adequação dos Métodos de Quantificação dos Compostos Terapêuticos por Espectrofotometria	94
5.1.5. Seleção da Técnica de Remoção do Fármaco Livre de Lipossomas.....	97

5.1.6 Preparação e Caracterização de Lipossomas Extrudados Encapsulando Isoniazida, Pirazinamida e Rifampicina por Incorporação Ativa	99
5.2. Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Agentes Tuberculostáticos por Injeção de Etanol em Pequena Escala	101
5.2.1. Efeito de Diferentes Matérias-Primas nas Características dos Lipossomas	102
5.2.2. Encapsulação Ativa de Isoniazida	104
5.2.3. Encapsulação Ativa de Pirazinamida	108
5.2.4. Encapsulação Ativa e Passiva de Rifampicina	109
5.2.5. Encapsulação Ativa de Kanamicina	111
5.2.5.1 Avaliação dos Efeitos das Variáveis Razão Molar Inicial Fármaco/Lipídio e Temperatura na Encapsulação Ativa de Kanamicina nos Lipossomas de SPC/Col	112
5.2.6. Encapsulação Passiva de Kanamicina	127
5.2.7 Encapsulação Ativa de Doxorrubicina	128
5.2.8 Estabilidade de Estocagem das Vesículas Lipídicas de SPC/Col Encapsulando Ativamente Doxorrubicina	132
5.2.9 Estudo da Estabilidade do Gradiente de Prótons dos Lipossomas na Encapsulação Ativa da Doxorrubicina	133
5.3. Escalonamento da Produção de Lipossomas Encapsulando Agentes Tuberculostáticos por Injeção de Etanol	137
5.3.1. Influências das Variáveis Operacionais Concentração Inicial de Lipídios, Agitação e Vazão de Injeção no Diâmetro Médio das Vesículas Lipídicas	140
5.3.2. Influência das Variáveis Operacionais Concentração Inicial de Lipídios, Agitação e Vazão de Injeção na Incorporação Ativa de Pirazinamida	145
5.3.3. Influências das Variáveis Operacionais Concentração Inicial de Lipídios, Agitação e Vazão de Injeção na Incorporação Ativa de Kanamicina	152
5.3.4. Influência da Temperatura da Fase Aquosa, do Tipo de Agitação e do Diâmetro da Agulha de Injeção nas Características das Vesículas Lipídicas	157

5.3.5. Efeito da Composição Lipídicas dos Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol Automatizada na Encapsulação Ativa de Kanamicina.....	162
5.3.6. Desenvolvimento e Aplicação de Modelo Matemático para a Produção das Vesículas Lipídicas de SPC/Col Considerando como Critério de Ampliação de Escala a Potência por Unidade de Volume.....	164
5.3.7. Liofilização das Vesículas Lipídicas de SPC/Col.....	170
5.3.8 Encapsulação Ativa de Doxorrubicina em Lipossomas de SPC/Col Preparados por Injeção de Etanol em Maior Escala.....	172
5.3.9 Avaliação das Características de Lamelaridade das Vesículas Lipídicas de SPC/Col Preparados por Injeção de Etanol em Maior Escala.....	174
5.3.10 Análise Preliminar da Viabilidade Econômica da Produção de Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol em Larga Escala Encapsulando Kanamicina	175
CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	185
6.1. Conclusões.....	185
6.2. Sugestões	187
BIBLIOGRAFIA.....	189

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

No mundo tem sido observada nos últimos anos, a explosão de doenças infecciosas emergentes como a síndrome de imunodeficiência adquirida, a síndrome pulmonar por hantavírus, e o reaparecimento epidemiológico de doenças como a tuberculose, a cólera, a difteria, a peste, a febre amarela, a dengue e a malária. As doenças infecciosas emergentes são aquelas nas quais a principal característica é o rápido aumento na incidência, prevalência ou na extensão geográfica, atingindo níveis referentes de épocas anteriores. Nos últimos anos, as notificações destas doenças vêm crescendo, e seu efeito compreende tanto países em desenvolvimento da África, Ásia e América, como os desenvolvidos da Europa e EUA.

Entre estas doenças, a tuberculose volta a ser um dos mais graves problemas de saúde pública em todo o mundo, embora na década de 1950 com o advento do uso de antibióticos, acreditava-se que esta enfermidade tinha sido eliminada. Até 10 anos atrás suas manifestações vinham declinando e esta doença era considerada como quase sob controle, porém atualmente é a doença infecciosa que mais adultos mata no mundo, apresentando maior incidência na faixa etária mais produtiva, de 15 a 50 anos. Hoje, a cada segundo uma pessoa é infectada pela bactéria e a cada 10 segundos, alguma pessoa no mundo morre desta antiga doença (Peixoto, 2000), que há anos deixou de atrair a atenção das autoridades de saúde pública.

No mundo existem aproximadamente dois bilhões de pessoas infectadas, com uma incidência anual de quase nove milhões, em comparação aos 2,8 milhões por ano notificados na década de 60 (Ministério da Saúde, 2001).

Conseqüentemente, esta doença, que era responsável antigamente pela morte de 500 mil pessoas por ano, hoje causa aproximadamente três milhões de mortes no mundo e estima-se que cerca de um terço da população mundial já teve algum tipo de contato com o bacilo. Prevê-se que nos próximos anos, 10 pessoas serão contaminadas por cada um destes

doentes e 10% desenvolverão a doença causando a morte de mais de 30 milhões (Ministério da Saúde, 1995).

Nos países desenvolvidos, cerca de 40.000 mortes são devidas à tuberculose e mais de 400.000 casos novos são descobertos a cada ano. Nesses países, a doença é mais freqüente entre as pessoas idosas, nas minorias étnicas e imigrantes estrangeiros. Nos países em desenvolvimento, estima-se que ocorrem cerca de 2,8 milhões de mortes por tuberculose e 7,5 milhões de casos novos por ano, atingindo a todos os grupos etários, com maior predomínio nos indivíduos economicamente ativos (Ministério da Saúde, 2001).

Cerca de 80% dos casos de tuberculose no mundo concentram-se em 22 países, entre eles a Índia, Bolívia, Peru e o Brasil (com um total de mais de 50 milhões de casos). Os menores índices são obtidos na Dinamarca, Suécia, Holanda, EUA, Canadá e Cuba, com 5 a 10 casos por 100 mil habitantes. Índices de ocorrência nulos já não são esperados em nenhum país do mundo. A prevenção da doença é feita em diversas partes do mundo pela utilização da vacina BCG, sendo que segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a eficácia dessa vacina varia de zero a 70% entre as diferentes populações mundiais.

Estima-se que no Brasil do total da população, 35 a 50 milhões de pessoas estão infectadas e que a incidência da doença seja mais de 53,4 casos novos registrados para cada 100 mil habitantes, notificando-se anualmente 90 mil casos, com mais de seis mil óbitos. Entretanto, estima-se que o número total real de casos, incluindo os não notificados, chegue a 129 mil (Melo e col., 1997). Dadas as desigualdades sócio-econômicas existentes, observa-se uma variação desta taxa em diferentes regiões. Dos 90 mil casos mencionados, aproximadamente 19 mil ocorrem no Estado de São Paulo, com uma taxa de incidência em torno de 55 por 100 mil habitantes, e 1.500 mortes. Deste total, cerca de 8.000 são da forma pulmonar bacilífera, responsáveis por manter a cadeia de transmissão. Em Campinas, identifica-se uma incidência anual entre 52 e 65 casos novos por 100 mil habitantes, superando a média do Estado nos anos de 1993 a 1996, com taxas ascendentes de letalidade ao redor de 10%. Os dados de incidência da doença são obtidos dos casos notificados pelo sistema nacional de saúde, nem sempre representando o universo dos casos. Algumas regiões do Brasil possuem uma taxa de incidência superior à de algumas cidades da África

e da Ásia, ou seja, mais de 300 casos por 100.000 habitantes. Estes números colocam o Brasil como o sexto do mundo em incidência de tuberculose (Melo e col., 1997).

No Brasil, o tratamento da tuberculose é todo centralizado na rede pública de saúde. Assim, embora curável, a doença vem se desenvolvendo de forma alarmante no país, sendo agravada por fatores sociais como o adensamento populacional e o surgimento de favelas na periferia de grandes centros urbanos. A crescente resistência bacteriana, somada a problemas técnicos, políticos e administrativos comuns aos programas de saúde pública e também à disseminação da AIDS nos anos de 1980 contribuíram para o ressurgimento da tuberculose. Normalmente, das pessoas que carregam o bacilo da tuberculose em seu organismo, poucas desenvolvem a doença. Entretanto, indivíduos fragilizados, com o sistema imunológico debilitado, como os pacientes acometidos pela AIDS, são presas fáceis para as infecções causadas pelo *Mycobacterium*.

A terapia da doença, de acordo com os programas oficiais de saúde, não tem tido o sucesso esperado, contando com apenas 75% de cura no país, quando pelo menos 85% deveriam ser atingidos para um controle adequado da tuberculose. Uma das maiores causas do insucesso da terapia é a alta taxa de abandono do tratamento, que reflete no desenvolvimento de resistência do organismo causador da doença aos antibióticos geralmente empregados.

Os fármacos usados no combate à tuberculose compreendem a isoniazida, a pirazinamida e a rifampicina no primeiro tratamento e os compostos terapêuticos, estreptomicina, etionamida e o etambutol como parte do segundo tratamento. Em casos de resistência ao emprego destes compostos terapêuticos se faz necessário o uso de outros quimioterápicos, os comumente empregados são a kanamicina, o ácido p-amino-salicílico, a capreomicina, a ciclosserina, a ciprofloxacina, a clofazimina, a ofloxacina, a norfloxacina, o sulfato de rifabutina, a sparfloxacina, a terizidona e a tiacetazona.

A Química Fina poderia interferir diretamente no abandono do tratamento, através da produção de fármacos que, por exemplo, reduzam o tempo de tratamento, o número de doses requeridas ou a toxicidade dos compostos terapêuticos, diminuindo seus efeitos colaterais. No Brasil se reivindicam melhores condições de pesquisa nesta área e um maior envolvimento intelectual, o que tem feito com que a pesquisa desenvolvida no país tenha

atingido um padrão internacional, e com que nossa indústria farmacêutica seja a quarta em volume de produção, atrás dos Estados Unidos, França e Itália. Entretanto, o Brasil ainda não compete com o seletivo grupo de nações que desenvolve formulações e princípios ativos farmacêuticos. As empresas farmacêuticas mundiais realizam vultosos investimentos em pesquisa e desenvolvimento como parte integrante de sua estratégia competitiva, visando o constante lançamento de novos produtos. Estes investimentos caracterizam-se por requerer de 10 a 15 anos de pesquisa e recursos da ordem de 350 milhões de dólares até a introdução de um novo fármaco no mercado.

Uma inovação terapêutica economicamente mais interessante poderia ser a administração controlada dos fármacos clássicos empregados na terapia da tuberculose, alterando apenas sua forma de apresentação ou seja, através do desenvolvimento de novas formulações, o que poderia também melhorar o perfil farmacoterapêutico dos medicamentos em uso atualmente. Estima-se que o desenvolvimento de veículos para a administração de compostos terapêuticos já existentes envolva verbas bem menores (10 a 20 milhões de dólares), por períodos de 4 a 6 anos.

O rejuvenescimento dos medicamentos através da sua encapsulação em vesículas lipídicas ou lipossomas é uma das vias pelas quais pode-se alterar a sua forma de apresentação, podendo também melhorar substancialmente a farmacocinética e a biodistribuição do composto no organismo, aumentando seu índice terapêutico, definido como a razão efetividade/toxicidade.

Os lipossomas são partículas aproximadamente esféricas com diâmetros da ordem de nanômetros a micrômetros, constituídos fundamentalmente por fosfolípidios organizados em bicamadas hidratadas. Estas vesículas lipídicas vêm sendo usadas com sucesso na terapia de diversas doenças, dentre elas, alguns tipos de câncer. O desenvolvimento bem sucedido destes sistemas para aplicações terapêuticas depende basicamente do tipo de composto que se deseja encapsular, da metodologia de preparação das vesículas e de sua forma de administração.

A seleção da composição em lípidios, do tamanho da vesícula e do método utilizado para a incorporação do agente ativo nos lipossomas é fundamental no projeto destes sistemas, determinando as características físico-químicas e o impacto terapêutico

final associado à sua administração. Para a determinação destas variáveis é preciso um estudo dos métodos disponíveis, da relação custo-benefício entre os métodos e os produtos obtidos, da disponibilidade e do custo da matéria-prima. Uma vez estabelecidas as metodologias, é essencial o uso de estratégias de otimização de maneira a garantir, entre outros fatores, a incorporação eficiente e econômica do composto ativo selecionado, bem como a estabilidade química e física do sistema obtido.

Os problemas de maior relevância na fabricação de lipossomas em escala industrial fundamentam-se na limitada estabilidade das vesículas obtidas, na necessidade de processos de esterilização do material produzido para finalidade terapêutica e no escalonamento do processo integrado com um baixo custo associado.

Assim, a produção de veículos efetivos na liberação controlada de medicamentos tem natureza essencialmente interdisciplinar, na qual se destacam as contribuições das áreas de farmacologia, química, engenharia química, biologia e medicina.

Os resultados de trabalhos desenvolvidos anteriormente envolvendo a preparação de lipossomas em escala de bancada pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão para a administração de medicamentos mostram a factibilidade da encapsulação estável de alguns compostos usados na terapia da tuberculose, embora este método de preparação envolva procedimentos de escalonamento relativamente complexos.

Este trabalho enfocou a encapsulação de agentes tuberculostáticos em lipossomas, sendo que a seleção do método de injeção de etanol e da matéria-prima à base de lecitina natural de soja visou o escalonamento da metodologia de preparação das vesículas lipídicas, para que pudesse ser mais facilmente implantada industrialmente, requerendo baixo investimento em equipamentos e em materiais. Os fármacos em estudo, isoniazida, pirazinamida, estreptomicina, rifampicina e kanamicina são comumente empregados na terapia da tuberculose. Os estudos com o fármaco doxorrubicina objetivaram a análise do sistema através da encapsulação de um composto de referência para estudos de sistemas liberadores de fármacos.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

Dentro do objetivo global de contribuir para o desenvolvimento de formulações de lipossomas contendo agentes terapêuticos comumente utilizados no tratamento da tuberculose, este projeto teve os seguintes objetivos específicos:

1. Encapsulação em lipossomas dos fármacos pirazinamida, isoniazida e rifampicina, além de um agente terapêutico indicado para tuberculose multirresistente;
2. Estudo do comportamento dos lipossomas quanto à estabilidade das formulações aquosas e liofilizadas obtidas;
3. Determinação da influência de variáveis como concentração lipídica inicial, temperatura, vazão de injeção, intensidade e tipo de agitação nas características finais das vesículas lipídicas formadas pela metodologia de injeção de etanol e na incorporação dos agentes terapêuticos;
4. Escalonamento da metodologia de injeção de etanol, como técnica simples e factível pelo baixo investimento em equipamentos, para a preparação de lipossomas utilizando matéria-prima de custo relativamente reduzido.

CAPÍTULO III

REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A Tuberculose e suas Características

A tuberculose é uma doença infecciosa, contagiosa e potencialmente fatal, sendo causada pelo agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch (mostrado na Figura 3.1). Embora a tuberculose já fosse conhecida pelos médicos desde a era de Hipócrates (460 A.C) séculos antes de ter sido descoberto o bacilo, os conhecimentos sobre a doença eram limitados, sendo a mesma frequentemente confundida com outras enfermidades.



Figura 3.1 - Microscopia eletrônica do *Mycobacterium tuberculosis* (adaptado de www.microbiologia.com.ar).

Com a descoberta do bacilo em 1882, por Robert Koch (que lhe proporcionou o Prêmio Nobel de Medicina em 1905) e dos raios-X por Roentgen em 1895, a tuberculose

passou a ser melhor estudada e caracterizada. Os estudos mostram que estes bacilos medem entre 0,3 - 0,6 por 0,5 - 4,0 μm e se apresentam na forma de bastonetes delgados retos ou ligeiramente curvados, com várias formas ramificadas. São ácido-resistentes, apresentam evolução crônica e causam elevada taxa de mortalidade em indivíduos inadequadamente tratados.

Ao contrário de outros agentes causadores de infecções, o *M.tuberculosis* não produz uma substância química que age como uma toxina comum. É a sua estratégia de sobrevivência no hospedeiro que o torna diferente, ou melhor, as suas características biológicas aliadas a uma inusitada habilidade química. Seu ciclo de crescimento é muito lento (o *M. tuberculosis* divide-se a cada 24 horas) quando comparado por exemplo à *E.coli* que se divide a cada 20 minutos (Lacaz, 1969). A sua natureza e a capacidade de manter-se inativo por décadas para depois se reativar dificultam o diagnóstico, o tratamento e o ritmo das pesquisas.

Em 1998, com o seqüenciamento completo do genoma da *M. tuberculosis* (por cientistas do Instituto Pasteur), os pesquisadores passaram a contar com informações que vêm permitindo conhecer melhor esta bactéria. As pesquisas em geral indicam que ela pode sobreviver anaerobicamente (sem ou com pouco oxigênio), mas mesmo assim, seu cultivo no laboratório é feito em condições aeróbicas. Este microrganismo pode causar lesões em qualquer parte do organismo humano (pele, rins, fígado, cérebro, dentre outros), tendo mostrado preferência pelo sistema pulmonar.

A transmissão da tuberculose se dá através do contágio individual direto ou indireto. Diretamente, entrando nos pulmões pela respiração, quando o doente com tuberculose tosse, espirra ou fala, os bacilos transportados por gotículas de saliva de tamanhos variados são expelidos no ar, onde se disseminam e podem atingir outras pessoas. O contágio indireto ocorre por via digestiva, pela ingestão de alimentos contaminados ou provenientes de animais doentes.

Quando o *M. tuberculosis* entra no pulmão, é fagocitado pelos macrófagos, localizando-se posteriormente em um compartimento denominado fagossomo. Normalmente, no caso de várias outras doenças, o fagossomo se funde a outro compartimento do macrófago, denominado lisossomo, que contém enzimas que degradam o

material contido no fagossomo. Esta fusão não ocorre no caso do *M. tuberculosis* e o microrganismo sobrevive no interior do macrófago. Com a multiplicação da bactéria, o macrófago morre, liberando os microrganismos gerados, que serão absorvidos por mais macrófagos. A presença destas células no sítio infectado origina um granuloma e, em 5% dos casos, a infecção se espalha por outras partes do corpo (Rouhi, 1999).

Após a infecção pela bactéria transcorrem em média de 4 a 12 semanas para a detecção das lesões primárias. Geralmente os novos casos da doença ocorrem em torno de 12 meses após a infecção inicial e esta evolução depende de múltiplas causas. Dentre as principais causas, tem-se a faixa etária, a imunidade natural ou competência imunológica, as condições físicas e sócio-econômicas.

A cura da tuberculose se dá através do uso de medicamentos, sendo que o esquema terapêutico usado é altamente eficaz quando adequadamente seguido. A terapia envolve uma combinação de fármacos e dura no mínimo cerca de seis meses, período em que infelizmente parte dos doentes abandona o tratamento tão logo apresente uma melhora. As estatísticas mostram que o abandono do tratamento atinge proporções elevadas no país (Melo e col., 1997). Estimativas indicam valores de 16%, chegando a 30% nas capitais. As principais causas de abandono podem ser atribuídas ao tempo longo de tratamento (que pode chegar a um ano e meio), à deficiência no sistema de atendimento aos doentes, à falsa impressão de cura após algumas semanas de tratamento e a fatores individuais, como o alcoolismo.

A rápida identificação dos doentes nos estágios iniciais, quando ainda não há sintomas mas há contaminação, seguida de tratamento efetivo, é o principal método de prevenção da propagação da doença. Os métodos de diagnóstico existentes comumente empregados (radiografia e a baciloscopia direta de secreção pulmonar) são, embora simples, de demorada análise, difícil realização em condições precárias, como as que existem em diversos centros públicos de saúde e de sensibilidade em torno de 50%. O cultivo do bacilo no meio apresenta maior sensibilidade, mas os resultados são disponibilizados depois de 4 a 6 semanas. Esta situação acaba por resultar no retardo do diagnóstico, protelando o início do tratamento, criando condições para o abandono primário e contribuindo para a manutenção de altos níveis de transmissão da doença no país.

Além da vacina BCG para a prevenção de formas graves em crianças, infelizmente não há, atualmente, nenhuma vacina curativa ou preventiva de uso geral para a tuberculose. O BCG (bacilo de Calmette-Guerin) é resultado do trabalho de atenuação do *Mycobacterium bovis*, que Albert Calmette (1863 - 1933) e Camille Guérin (1872 - 1961) conduziram por 13 anos no Instituto Pasteur, no início do século 20. Depois de testes com animais e de ter comprovada ação contra infecções, tanto pelo *M. bovis* como pelo *M. tuberculosis*, o BCG foi usado pela primeira vez como vacina em 1921. Em 1927, já se recomendava sua aplicação generalizada. A dose única dessa vacina viva (vacina de primeira geração), aplicada no recém-nascido, estimula o sistema imune em torno de 20 a 30 anos. Esta vacina é de fácil produção, com um custo de US\$ 0,08 por unidade e apresenta um nível de proteção de até 75% (Ministério da Saúde, 1995). As vacinas a partir dos antígenos purificados da BCG (vacina de segunda geração) também não induziam a proteção desejada contra a tuberculose. É importante considerar também os efeitos colaterais, que geralmente são gerados quando são introduzidos patógenos e vacinas de sub-unidades ou de microrganismos vivos nos seres humanos.

O Brasil é auto-suficiente na produção de vacinas contra o sarampo, difteria, tétano, coqueluche, caxumba, hepatite B, meningite meningocócica A e C e febre amarela. O Instituto Butantan, ligado à Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, e Bio-Manguinhos, vinculado ao Ministério da Saúde são atualmente responsáveis por 75% da produção nacional de vacinas no país. Também integram o sistema nacional de produção de imunológicos o Instituto Tecnológico do Paraná (TecPar), mantido pelo governo paranaense, que produz vacina contra raiva, e a Fundação Ataulfo de Paiva, uma entidade privada sem fins lucrativos que, junto com o Instituto Butantan, é responsável pelo fornecimento da vacina de BCG.

Apesar dos bons resultados da política para imunobiológicos no país, o modelo de produção pública de vacinas está em extinção no resto de mundo. O grande obstáculo para o setor público está no alto custo fixo da produção de vacinas, na exigência de economia de escala e na necessidade constante de incorporação de novas tecnologias. Investe-se cerca de dez anos para produzir uma vacina nova, e ainda assim, geralmente é um investimento de alto risco. De fato, segundo a Organização Mundial de Saúde, só a pesquisa das principais

doenças tropicais do planeta, para ser eficaz, demandaria uma injeção de recursos da ordem US\$ 1,5 bilhão por ano.

Outro grave problema para o controle da tuberculose é a resistência adquirida pelo *M. tuberculosis* ao tratamento por um ou por vários fármacos (multirresistência), fenômeno este em ascensão mundial, no qual os medicamentos em uso não têm mais ação efetiva contra certas cepas. No Brasil não há dados recentes que permitam conclusões válidas sobre a situação atual da resistência, embora se tenha observado que os níveis detectados de resistência primária foram, em geral, baixos. Ao contrário da tuberculose comum, para a qual o tratamento pode ter 100% de eficácia, a um custo inferior a R\$ 100,00, a tuberculose multirresistente é frequentemente incurável (até 20% de cura) e sua terapia é de alto custo, podendo exceder R\$ 3.000,00 (Fiúza, 1997).

O desenvolvimento de novas drogas para doenças como a tuberculose, que em sua maioria afetam populações em países em desenvolvimento, não figura no mapa das prioridades da indústria farmacêutica. Este imenso mercado, apesar de reunir cerca de 80% da população mundial (mais de 90% dos usuários residem em países em desenvolvimento), é pouco atrativo, já que responde por apenas 20% das vendas globais de remédios. Das 1.393 drogas aprovadas no mundo entre 1975 e 1999, apenas 16 (ou seja, apenas 1%) foram desenvolvidas para combater doenças tropicais como a tuberculose (que respondem por 12% das afecções globais). Em comparação, no mesmo período, surgiram 179 novas drogas para doenças que respondem praticamente pelo mesmo percentual, como as cardiovasculares.

Este problema mundial precisa de respostas globais e urgentes para seu controle, o que somente será possível com a participação e cooperação internacional dos diferentes setores da sociedade e da saúde pública. Nesta parceria, as principais armas disponíveis e já bem testadas são: tecnologia e pesquisa apropriada, políticas objetivas, infra-estrutura básica para a saúde pública, cobertura vacinal, desenvolvimento de novas vacinas, conscientização do caráter epidemiológico, educação e participação da sociedade.

Assim, o alto índice de mortalidade dessa doença e a baixa eficiência da vacina justificam o grande número de pesquisas sobre a tuberculose. Na última década, os avanços no desenvolvimento de vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a

obtenção e produção de antígenos, assim como foram desenvolvidas vias alternativas de administração e apresentação desses antígenos. Estas estratégias abriram caminho para inovações, particularmente no contexto do desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Dentro de este contexto, as vacinas de DNA, ou vacinas gênicas, podem tornar-se um poderoso instrumento de combate a doenças infecciosas para as quais até hoje não existe prevenção segura.

Hoje, o primeiro grande desafio dos pesquisadores é desenvolver formas de imunização mais seguras contra a doença. Esforços nesse sentido se multiplicam por todo o mundo, estando em fase de teste pelo menos 170 novas vacinas, a maioria delas gênicas ou de DNA, consideradas de terceira geração. Entre elas, destaca-se a que está sendo desenvolvida no Centro de Pesquisa em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-SP), da Universidade de São Paulo (USP), com o apoio financeiro da FAPESP. O segundo desafio seria encontrar novas terapêuticas (menos agressivas e mais eficazes) para tratar os indivíduos que já desenvolveram a enfermidade.

Desde 1991, o Laboratório de Vacinas Gênicas pertencente ao referido centro vem desenvolvendo pesquisas visando a descoberta de uma nova e eficaz vacina contra a tuberculose. Os resultados mostraram que a vacina de DNA desenvolvida, não só tem atividade preventiva como também alta atividade terapêutica contra a doença já estabelecida (Lowrie e col., 1999). Neste contexto, estudos para determinar a melhor maneira de administração foram iniciados, uma vez que várias injeções intramusculares de DNA foram necessárias para a obtenção de bons resultados terapêuticos. A administração da vacina encapsulada em microesferas (1 a 10 μm) está sendo avaliada, uma vez que a encapsulação poderia permitir a redução da quantidade de droga e do número de administrações (Lima e col., 2000).

Recentemente, autorizada pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), esta vacina estará sendo testada em seres humanos. A vacina, apesar de ter sido inicialmente planejada para prevenir e tratar só a tuberculose, pode ser também eficaz contra vários tipos de câncer, leishmaniose e artrite, através de pequenas variações realizadas na sua composição ou na dosagem, começando um capítulo decisivo na história da primeira vacina gênica desenvolvida no Brasil.

Embora ainda haja um longo caminho a ser percorrido até que uma nova vacina se prove totalmente segura, eficaz e ganhe as prateleiras das farmácias hospitalares, se reconhece que vêm sendo feitos trabalhos notáveis e reconhecidos pela comunidade científica internacional. No Brasil, apesar de os investimentos neste setor serem pequenos quando comparados com os de outros países, surgem estes exemplos de competência e de domínio tecnológico, com resultados semelhantes aos dos grandes laboratórios multinacionais.

Por outro lado, apesar do alto custo associado, o desenvolvimento de novos tuberculostáticos com maior efetividade e menor toxicidade têm-se mostrado alvo de pesquisas nacionais e internacionais. Nos últimos anos, no país foi descoberta uma nova droga, definida como $C_{16}H_{23}N_2O_7$ e denominada como glicenina, cujos primeiros testes mostraram sua eficácia *in vitro* contra o *Mycobacterium*. A atividade terapêutica deste novo composto terapêutico mostrou-se igual ou superior à da rifampicina, um dos antibióticos mais potentes dos atualmente em uso (Peixoto, 2000), além de apresentar uma redução nos efeitos colaterais.

Uma opção relevante para o aumento do índice terapêutico dos agentes tuberculostáticos comercialmente disponíveis é a sua incorporação em dispositivos de liberação controlada como lipossomas, nanocápsulas e microesferas, o que poderia alterar a distribuição espacial e temporal no organismo das moléculas de compostos terapêuticos encapsulados.

3.2. Características dos Agentes Terapêuticos Utilizados no Tratamento da Tuberculose

O primeiro antibiótico ao qual o homem teve acesso foi à penicilina, descoberta no ano de 1928 por Fleming em uma cultura de fungo e isolada em sua forma pura, somente em 1930 por Florey e Chain. Onze anos depois, em 1941, aparecia no mercado farmacêutico a sua primeira forma injetável e disponível para uso em humanos. Curiosamente, este composto terapêutico mostrou-se totalmente ineficaz contra o bacilo de Koch.

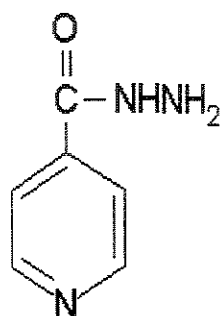
Quinze anos após a pioneira descoberta de Fleming, Waksman descobriu o composto estreptomicina, que passou a ser o primeiro agente antimicrobiano eficaz contra muitas doenças até então incuráveis, como a tuberculose.

A estreptomicina é um composto pouco absorvido no trato gastro-intestinal, tendo absorção imediata após administração intramuscular e sendo largamente distribuída por todo o organismo. Este fármaco inibe a síntese de proteínas bacterianas, sendo ativo contra a multiplicação do bacilo em meio extracelular neutro ou levemente alcalino. Comercializado na forma de sulfato, apresenta as seguintes solubilidades a 28 °C (em mg/mL): acima de 20,0 em água; 0,85 em metanol; 0,30 em etanol; 0,035 em éter (Merck Index, 1989). Este composto foi amplamente usado até se comprovar que a sua monoterapia levava à resistência microbiana e falha do tratamento.

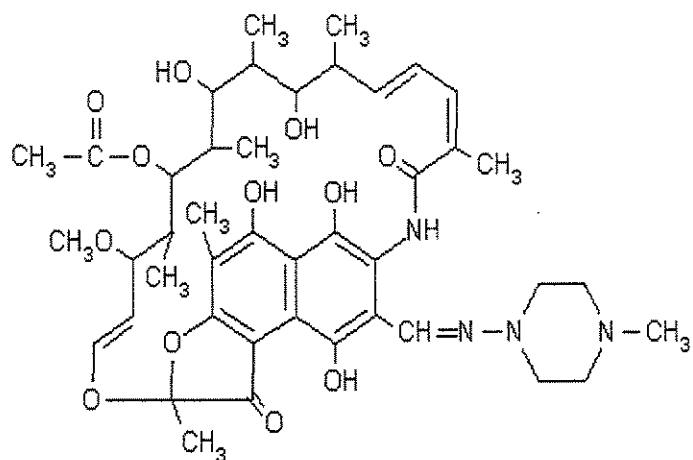
Posteriormente, vários outros compostos terapêuticos passaram a ser empregados no tratamento da tuberculose. A adição da isoniazida em 1952 como segundo fármaco ao regime iria prevenir os problemas associados à terapia com estreptomicina, permitindo também uma redução no tempo de tratamento para 18 meses. Este medicamento age fortemente sobre a divisão extracelular do bacilo e fracamente sobre a multiplicação intracelular. A isoniazida é facilmente absorvida pelo trato gastro-intestinal e difunde-se para todas as células e fluidos corpóreos (Uehara e Santoro, 1999), sendo atualmente o agente menos tóxico dentre os empregados para a terapia da tuberculose (Berkow, 1989). Sua solubilidade em água a 25 e 40 °C é de 14,0 e 26,0 g/100 mL respectivamente, em álcool etílico, a 25 °C, é de 2,0 g/100 mL e no solvente orgânico clorofórmio é de 0,1 g/100 mL. Em éter e benzeno, este composto é praticamente insolúvel (Merck Index, 1989; Brewer, 1977).

Atualmente, dentre os diversos fármacos que podem ser empregados no combate à doença além dos compostos estreptomicina e isoniazida tem-se a pirazinamida, a rifampicina, a etionamida e o etambutol, integrantes dos primeiro e segundo tratamento da enfermidade.

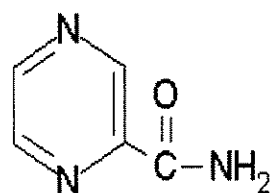
A Figura 3.2 mostra as fórmulas moleculares estruturais dos compostos terapêuticos empregados no desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.



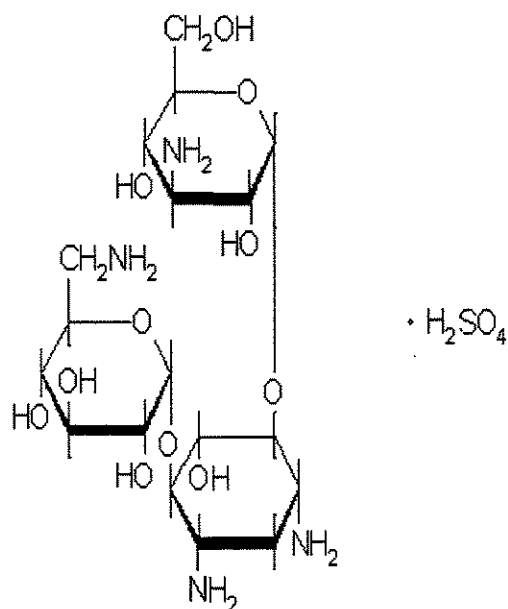
isoniazida



rifampicina



pirazinamida



kanamicina

Figura 3.2 – Fórmulas moleculares estruturais dos compostos tuberculostáticos isoniazida (MM: 137,5 Da), pirazinamida (MM: 123,1 Da), rifampicina (MM: 823,0 Da) e kanamicina (MM: 582,6 Da).

No caso da pirazinamida e do etambutol desconhecem-se seus mecanismos exatos de ação, sendo o primeiro bem absorvido no trato gastro-intestinal e usado principalmente em pH menor que 7 contra micobactérias intracelulares. A pirazinamida possui uma solubilidade em água de 15 mg/mL, em metanol de 13,8 mg/mL, em etanol de 5,7 mg/mL, em iso-octano de 0,01 mg/mL e em clorofórmio de 7,4 mg/mL (Merck Index, 1989). Verifica-se também rápido desenvolvimento de resistência bacteriana para ambos os fármacos.

A rifampicina inibe a enzima RNA polimerase das micobactérias, agindo tanto na multiplicação rápida como na lenta do bacilo, intracelular ou extracelularmente. Quando empregada isoladamente, verifica-se rápido desenvolvimento de resistência a seus efeitos terapêuticos.

Embora estes sejam os compostos mais comumente utilizados, os mesmos não têm conseguido evitar o crescimento alarmante dos casos de tuberculose resistentes. Esta resistência pode se apresentar por três mecanismos: inativação enzimática dos antibióticos (mais freqüente), alteração dos ribossomos por mutação e a reduzida difusão através dos invólucros bacterianos.

A kanamicina é um fármaco usado principalmente quando da aparição de resistência microbiana à isoniazida e à estreptomicina. Descoberta em 1957 no Japão por Umezawa e seus colaboradores, é um antibiótico que se utiliza principalmente na forma de sulfato. A kanamicina pertence ao grupo de antibióticos que inibem a síntese protéica dos microrganismos, e o mecanismo de ação deste composto é se ligar à subunidade 30 S dos ribossomos, provocando uma leitura errada da mensagem codificada no RNA mensageiro. São então produzidas proteínas anômalas que são incorporadas na membrana celular da bactéria, o que vai alterar a sua permeabilidade, com o conseqüente fluxo desequilibrado de íons K^+ , resultando na morte celular (Cardozo e col., 2000).

Como a kanamicina é uma molécula catiônica, o que dificulta sua passagem através dos lipídios constituintes das membranas celulares, sua farmacocinética é desfavorável oralmente, sendo a mesma mal absorvida no trato digestivo e no sistema gastro-intestinal. Por essa razão, este fármaco é administrado apenas por via parenteral para o tratamento de infecções sistêmicas (Cardozo e col., 2000), sendo rapidamente absorvido e

distribuído no local da injeção, ocorrendo o pico plasmático de 30 a 90 min após a administração. Em meio fisiológico, a kanamicina penetra muito mal nos tecidos, confinando-se aos espaços extracelulares, sendo eliminada sem ser metabolizada e apresentando tendência para se fixar no sistema renal, no qual geralmente se acumula. Como todos os outros fármacos usados na terapia da tuberculose, a administração parenteral de kanamicina apresenta vários efeitos adversos, destacando-se a ototoxicidade e a nefrotoxicidade. O composto terapêutico sulfato de kanamicina é solúvel em água e praticamente insolúvel em álcoois e solventes polares comuns, sendo estável em uma ampla faixa de pH.

A administração destes fármacos, geralmente feita por via oral, está associada a diversos efeitos colaterais indesejáveis, como náuseas, vômitos, icterícia, diarreia, alterações visuais e toxicidade a tecidos normais (Ministério da Saúde, 1995), o que leva o paciente a se desestimular com o tratamento, interrompendo-o e contribuindo substancialmente para o aumento do número de casos de tuberculose multirresistente. Estes efeitos colaterais constatados com o uso dos compostos terapêuticos de referência justificam o fato pelo qual hoje a tuberculose é a área de pesquisa mais ativa entre as doenças infecciosas.

A capacidade de absorção através de membranas biológicas dos compostos terapêuticos *in vivo* relaciona-se à partição entre fases aquosas e orgânicas, parâmetro conhecido como coeficiente de partição (razão entre as concentrações do composto na fase orgânica e na fase aquosa). Determinações realizadas por Justo (1999) de alguns agentes tuberculostáticos indicaram que os fármacos isoniazida, pirazinamida e estreptomicina acumulam-se preferencialmente na fase aquosa dos sistemas, enquanto os compostos rifampicina e etionamida mostraram preferência pela fase orgânica, conforme mostrado nas Tabelas 3.1 e 3.2. Em alguns sistemas não foi possível efetuar com precisão a análise, devido às características de reduzida solubilidade dos fármacos nas soluções aquosas ou orgânicas.

Tabela 3.1 – Coeficientes de partição dos compostos tuberculostáticos em sistemas aquosos/1-octanol. Composição das fases aquosas: água deionizada; ácido cítrico a 300 mmol/L e pH 4,0; HEPES a 100 mmol/L e pH 7,4; HEPES/NaCl a 100/120 mmol/L e pH 7,4 e HEPES/NaCl a 100/120 mmol/L e pH 13,0.

<i>Composto</i>	<i>Água Deionizada</i>	<i>Ácido Cítrico pH 4,0</i>	<i>HEPES pH 7,4</i>	<i>HEPES/NaCl pH 7,4</i>	<i>HEPES/NaCl pH 13,0</i>
Isoniazida	0,152	0,075	0,105	0,189	0,089
Pirazinamida	0,282	0,515	0,333	0,370	0,370
Rifampicina	8,259	2,257	11,346	42,478	-
Estreptomicina	0,105	-	0,000	0,000	0,000
Etionamida	19,000	2,165	13,286	10,111	2,125
Etambutol	0,042	-	0,111	0,099	-

Tabela 3.2 – Coeficientes de partição dos compostos tuberculostáticos em sistemas aquosos/n-dodecano. Composição das fases aquosas: água deionizada; ácido cítrico a 300 mmol/L e pH 4,0; HEPES a 100 mmol/L e pH 7,4; HEPES/NaCl a 100/120 mmol/L e pH 7,4 e HEPES/NaCl a 100/120 mmol/L e pH 13,0.

<i>Composto</i>	<i>Água Deionizada</i>	<i>Ácido Cítrico pH 4,0</i>	<i>HEPES pH 7,4</i>	<i>HEPES/NaCl pH 7,4</i>	<i>HEPES/NaCl pH 13,0</i>
Isoniazida	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000
Pirazinamida	0,000	0,075	0,064	0,005	0,087
Rifampicina	-	-	-	-	0,000
Estreptomicina	0,259	-	0,000	0,000	0,000
Etambutol	0,031	-	0,087	0,087	-

Em decorrência deste fato, diversas tentativas estão sendo feitas para se elevar o índice terapêutico dos fármacos de uso consagrado e diminuir seus efeitos adversos. Este índice poderia ser elevado, por exemplo, através do uso de agentes transportadores de compostos terapêuticos, como os lipossomas. A encapsulação destes compostos em lipossomas poderia reduzir o número e a intensidade dos efeitos colaterais, poupando tecidos saudáveis, além de favorecer a deposição do fármaco em órgãos específicos.

3.3. Características dos Lipossomas

Os lipossomas (Figura 3.3) são vesículas compostas por membranas simples ou múltiplas constituídas de lipídios, que circundam um ou mais compartimentos aquosos.

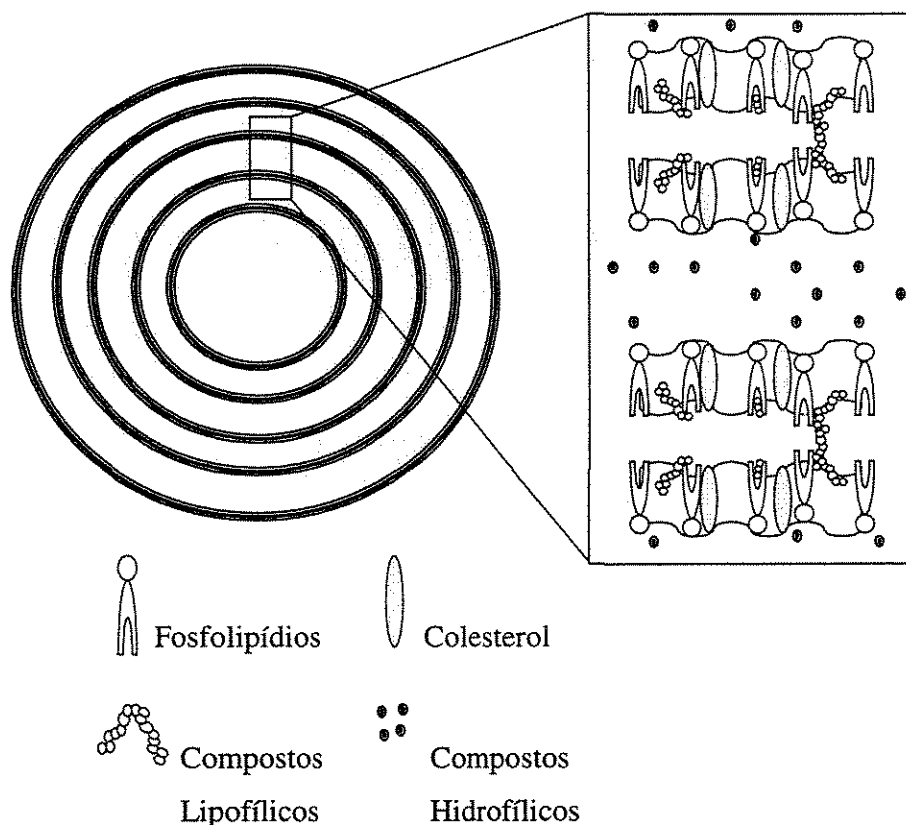


Figura 3.3 – Representação esquemática de lipossomas multilamelares como veículos para a encapsulação de compostos hidrofílicos no cerne aquoso, ou hidrofóbicos na bicamada.

Estes sistemas apresentam tamanhos variáveis (entre 0,025 e 50 μm), são biodegradáveis, não tóxicos e não imunogênicos, podendo encapsular, devido à sua estrutura em bicamadas, uma grande variedade de compostos nas partes internas, externas ou na interface de suas membranas. O potencial de encapsulação de um determinado composto por estas vesículas lipídicas será determinado principalmente por características como sua massa molecular, sua hidrofobicidade e solubilidade.

Estas vesículas lipídicas assemelham-se a membranas celulares em sua estrutura e composição. Os fosfolipídios, seus componentes moleculares primários aos quais devem sua estrutura, exibem propriedades anfifílicas (Figura 3.4), o que permite que se agreguem, em soluções aquosas diluídas, blindando a parte hidrofóbica do meio aquoso, ao mesmo tempo em que expõem a porção polar hidrofílica à água.

A grande variedade de estruturas resultantes da associação das moléculas de fosfolipídios em soluções aquosas deve-se à geometria molecular e às interações intra e intermoleculares presentes nos processos de auto-organização e auto-associação. A formação de agregados por moléculas anfifílicas em um meio aquoso é favorecida pelo efeito hidrofóbico, enquanto várias outras interações se opõem a isso, o que gera o efeito de forças opostas (Israelachvili, 1992), que agem principalmente na região interfacial (interface água-cadeia hidrocarbônica) do agregado. O efeito hidrofóbico tende a diminuir a área interfacial por molécula (área da cabeça polar) e as outras forças tendem a aumentar essa área, sendo que estas últimas forças resultam de vários tipos de interações, incluindo repulsão de hidratação, repulsão eletrostática e as contribuições estéricas da molécula.

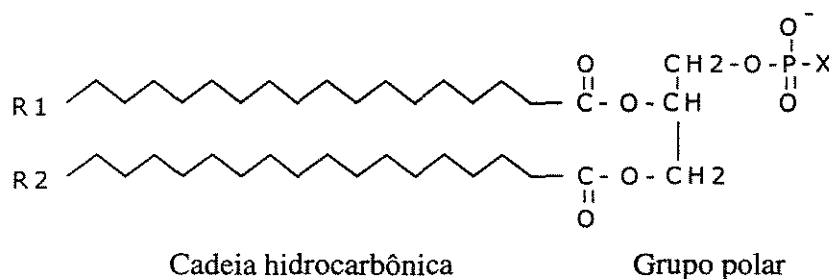


Figura 3.4 – Estrutura básica de um fosfolipídio, na qual (X) caracteriza o grupo ligado ao grupo fosfato (adaptado de Baggio, 1999).

Esse conceito sugere que, nas condições de equilíbrio termodinâmico, há uma área superficial ótima A_o , em que a energia de interação por molécula é mínima. Considerando que as cadeias polares se comportam como fluidos incompressíveis (volume constante a uma temperatura fixa), então é possível definir um parâmetro adimensional denominado parâmetro de empacotamento crítico (p), definido de acordo com a equação 3.1:

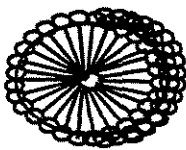
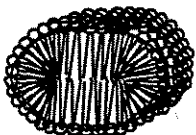
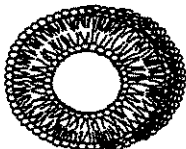
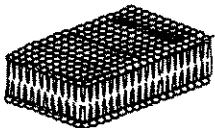
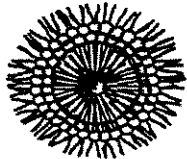
$$p = V / (A_o L_c) \quad (3.1)$$

na qual L_c é o comprimento efetivo máximo da cadeia, também conhecido como comprimento crítico e V o volume molecular da porção hidrofóbica. Uma vez especificado o valor deste parâmetro para uma dada molécula anfifílica, é possível determinar os tipos de agregados nos quais ela poderá se organizar. A Tabela 3.3 resume as estruturas usualmente formadas por fosfolipídios para vários valores de parâmetros de empacotamento críticos.

Após saturar a interface água-água, as moléculas anfifílicas diluídas em solução aquosa estruturam-se em micelas, pequenos agregados formados acima de uma certa temperatura e concentração micelar crítica (cmc). Estes agregados podem apresentar diferentes formas tais como: esférica, cilíndrica ou discóide, dependendo da natureza da molécula anfifílica e das condições da solução aquosa (temperatura, pH e salinidade, entre outras).

Os fosfolipídios em solução aquosa produzem estruturas lamelares organizadas mesmo a baixas concentrações. As vesículas multilamelares são uma forma particular de estruturas lamelares, correspondendo a sistemas fechados compostos de bicamadas esferoidais concêntricas que circundam um volume aquoso central.

Tabela 3.3 – Formas possíveis de empacotamento de fosfolipídios e outras moléculas anfifílicas em função de diferentes valores do parâmetro de empacotamento crítico (p). Adaptado de Baggio, 1999.

<i>Molécula Anfifílica</i>	<i>Parâmetro de Empacotamento Crítico (p)</i>	<i>Forma de Empacotamento</i>	<i>Estruturas Formadas</i>
Cadeia hidrofóbica simples com área de cabeça polar grande: dodecilsulfato de sódio (SDS)	$<1/3$	Cone	Micelas esféricas 
Cadeia hidrofóbica simples com área de cabeça polar pequena: dodecilsulfato de sódio (SDS)	$1/3-1/2$	Cone Truncado	Micelas cilíndricas 
Cadeia hidrofóbica dupla com área de cabeça polar grande: Fosfatidilcolina (PC)	$1/2-1$	Cone Truncado	Vesículas 
Cadeia hidrofóbica dupla com área de cabeça polar pequena: Fosfatidiletanolamina (PE)	≈ 1	Cilindro	Bicamadas Planares 
Cadeia hidrofóbica dupla com área de cabeça polar pequena: Colesterol (Col)	>1	Cone Truncado Invertido	Micelas Reversas 

Geralmente, a altas concentrações de fosfolípido é formada uma fase lamelar pura, na qual as cadeias de hidrocarbonetos adotam uma conformação fluida. Na medida em que o sistema é diluído, mais água é incorporada entre as lamelas a fim de reduzir a repulsão entre as porções polares da bicamada. Esse processo continua até as bicamadas lipídicas atingirem uma certa distância entre si que permita o equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas. Atingido o limite de hidratação, o excesso de fase aquosa (água) no sistema não pode ser mais incorporado entre as camadas lamelares, dando origem a uma região bifásica no sistema. A presença desta região bifásica em uma grande faixa de concentração e temperatura é característica dos fosfolípidos, e nesta região a geometria do agregado é controlada pelo seu empacotamento e a transição para uma fase lamelar (Baggio, 1999).

Uma característica importante dos fosfolípidos é que ao reduzir o comprimento da cadeia hidrocarbônica de suas moléculas, estruturas vesiculares estáveis passam a não ser mais obtidas no sistema. Nesta situação, micelas cilíndricas ou esféricas passam a ser estruturas prováveis, como observado para a lecitina de cadeia dupla com 12 ou menos átomos de carbono por cadeia. Este fato pode ser explicado pelo efeito da cadeia hidrocarbônica na curvatura da bicamada (Israelachvili, 1992).

Os fosfolípidos são a maior classe de lipídios presentes nas membranas celulares de plantas e animais e os mais usados na preparação de sistemas destinados a aplicações terapêuticas. Estas moléculas anfifílicas, geralmente solúveis em solventes orgânicos ou em suas misturas, são divididas em diferentes classes de acordo com as características de seu grupo polar.

Muitos fosfolípidos disponíveis para a produção de vesículas lipídicas são fosfolípidos naturais, especialmente de ovo ou soja, os quais podem ser modificados por hidrogenação parcial para permitir a obtenção de vesículas mais resistentes a processos oxidativos. Também são empregados fosfolípidos semi-sintéticos, sintéticos e outros compostos anfifílicos completamente sintéticos, tais como os surfatantes não-iônicos (Crommelin e Schreier, 1994).

Entre os lipídios naturais mais utilizados na área farmacológica encontra-se a fosfatidilcolina de soja, fosfolípido com um custo de produção muito baixo quando

comparado a outros fosfolipídios, de alta estabilidade e biocompatibilidade.

Desde a descoberta em 1965 por Bangham dos lipossomas, um grande número de pesquisadores tem se dedicado ao estudo das propriedades físico-químicas destas vesículas lipídicas. O desenvolvimento de pesquisas e a diversificação de diferentes modelos de membrana a partir de lipossomas têm aumentado notavelmente.

Estas propriedades fizeram dos lipossomas candidatos atraentes para uso como veículos liberadores de fármacos desde os anos 70, embora desde 1934 seja conhecida uma patente da IGI Farben Industrie, a qual alegava que suspensões aquosas de lecitina e colesterol podiam ser empregadas como transportadoras de fármacos, conforme mencionado por Lasic (1998).

Dependendo dos componentes da bicamada e do método utilizado na preparação dos lipossomas, estes podem variar consideravelmente algumas de suas características físico-químicas como tamanho, número de lamelas, carga, fluidez da bicamada e volume encapsulado (Talsma e Crommelin, 1992a). Para partículas esféricas em movimento Browniano, o raio hidrodinâmico médio, R_h , pode ser determinado pela relação de Stokes-Einstein, segundo a equação 3.2:

$$R_h = \frac{k T}{6\pi D \mu} \quad (3.2)$$

na qual k é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, D o coeficiente de difusão médio da vesícula e μ a viscosidade do solvente.

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho e o número de bicamadas lipídicas (lamelas) que apresentam em sua constituição. De acordo com suas dimensões as vesículas lipídicas podem ser classificadas como: pequenas, cujo tamanho varia de 0,02 a 0,1 μm ; grandes, com diâmetro variando de 0,1 a 1 μm e gigantes, com diâmetro de até 50 μm (Lasic, 1988), podendo apresentar em sua constituição diferentes números de bicamadas lipídicas ou lamelas, conforme mostrado na Figura 3.5.

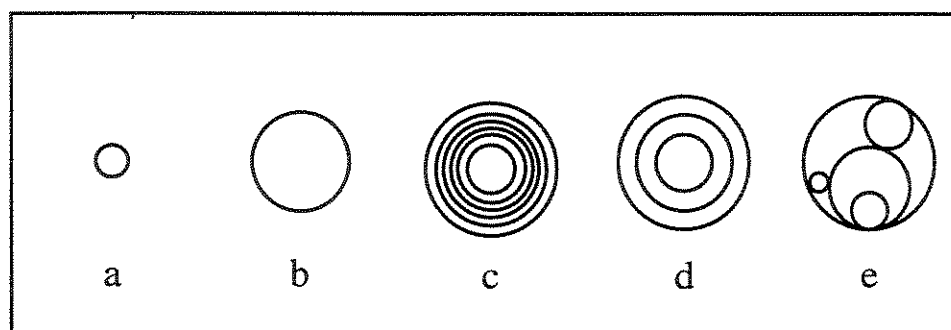


Figura 3.5 – Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro (D) e à morfologia. (a) VUP: vesícula unilamelar pequena ($20 < D < 100$ nm); (b) VUG: vesícula unilamelar grande ($D > 100$ nm); (c) VML: vesícula multilamelar ($D > 0,5$ μ m); (d) VOL: vesícula oligolamelar ($0,1 < D < 1$ μ m); (e) VMV: vesícula multivesicular ($D > 1$ μ m) (adaptada de Crommelin e Schreier, 1994).

Dois tipos de lipossomas são habitualmente os mais usados, as vesículas multilamelares (VML) e as vesículas unilamelares (VUL) pequenas e grandes. As VML, são formadas por camadas concêntricas de fosfolípidios nas quais o compartimento aquoso é reduzido, por isto são muito úteis para encapsular compostos lipofílicos. Quando estes lipossomas são submetidos a sonicação ou extrusão através de filtros ou membranas, formam-se as VUL. Em geral as VUL são mais adequadas para encapsular e transportar compostos hidrofílicos.

O alvo de destino determinará a escolha quanto ao tamanho de partícula das vesículas lipídicas, que podem ser administradas através de diversas rotas, incluindo as vias: tópica, intravenosa, ocular, pulmonar, nasal, oral, intramuscular e subcutânea. Vesículas lipídicas pequenas (100 nm) são adequadas para administração intravenosa, já vesículas maiores (100 – 1000 nm) seriam indicadas para administração pulmonar (Lasic, 1993).

Em terapias nas quais sejam utilizados lipossomas, o fármaco encapsulado pode ter como destino os alvos naturais (sistema imunológico) ou específicos (órgãos, locais ou tumores específicos). A farmacocinética e a biodistribuição *in vivo* de lipossomas podem

ser controladas pela seleção adequada do tamanho da vesícula, da via de administração e da composição em lipídios.

Lipossomas podem ser incorporados tanto em formulações relativamente simples, como em preparações mais complexas. Estas vesículas lipídicas podem ser incorporadas em tipos distintos de veículos, como géis, cremes, pastas, suspensões, dispersões coloidais, loções, tinturas, aerossóis e pós, dentre outros (Lasic, 1993), o que flexibiliza bastante sua utilização.

As aplicações das vesículas lipídicas na liberação de compostos terapêuticos dependem, e são baseadas, em suas características físico-químicas tais como, composição, tamanho, eficiência de encapsulação e estabilidade. Estas características dos lipossomas devem ser determinadas e otimizadas para cada sistema fármaco ou partícula/lipídio específico.

Atualmente, estas vesículas representam uma opção relevante para o transporte e deposição específica de compostos terapêuticos para a terapia de alguns tipos de câncer, de infecções fúngicas e de leishmaniose (Deol e col., 1997). Na medicina preventiva, que utiliza extensivamente vacinas, as vesículas mostram também um grande potencial de aplicações.

Além disto, os lipossomas podem ser utilizados para a liberação controlada de compostos de interesse em fluidos corpóreos (agindo como micro-reservatórios) e no interior de células (após a endocitose). Os lipossomas também têm sido utilizados como modelo de membranas para ação anestésica, transportadores de materiais encapsulados para o interior de células, transportadores de agentes quimioterápicos no tratamento de infecções (intracelulares, do sistema reticuloendotelial e fúngicas), de substâncias moduladoras de respostas biológicas e incorporando anticorpos específicos entre suas cadeias de ácidos graxos que podem ser liberados nas células que possuam o receptor ou antígeno específico para esse anticorpo.

Aplicações muito relevantes podem ser esperadas ou já estão em andamento, principalmente quando a proteção de moléculas sensíveis é necessária (DNA, RNA, oligonucleotídeos), para aumentar a solubilização de compostos (Anfotericina B), aumentar a penetração intracelular (fármacos antineoplásicos, antibióticos, e antivirais), como sistemas

para liberação controlada na área cosmética e principalmente com o objetivo de modificar a farmacocinética e a biodistribuição de compostos terapêuticos ou diminuir a toxicidade destes fármacos em suas formas livres. Além disso, a quantidade de doses necessárias para o desenvolvimento de uma resposta terapêutica eficiente e duradoura é normalmente menor que a quantidade requerida por administrações tradicionais, que geralmente necessitam de esquema múltiplo de dosagem.

A utilidade médica dos lipossomas convencionais é limitada pela rápida fagocitose pelas células do sistema reticuloendotelial (SRE), fundamentalmente no fígado e no baço. Embora esta característica seja de grande utilidade quando os lipossomas são utilizados para transportar fármacos no tratamento de processos infecciosos causados por patógenos intracelulares nos quais o SRE é o alvo, já não se verifica a mesma aplicabilidade quando as vesículas são utilizadas para outros tipos de tratamento (como de tumores).

O uso de VUP que possam penetrar nas células por mecanismos de endocitose melhora em parte este problema. Por outro lado, destaca-se o desenvolvimento de novos lipossomas conhecidos como vesículas de segunda geração ou estabilizados, os quais têm em sua composição lipídios sintéticos contendo grupos volumosos resultantes do acoplamento covalente de polímeros hidrossolúveis (PEG), que os converte em sistemas mais hidrofílicos e reduz a opsonização e fagocitose pelo SRE. Estes lipossomas permanecem na circulação sanguínea mais longamente que as vesículas convencionais e podem assim aumentar a eficácia farmacológica dos fármacos encapsulados (Papahadjopoulos e col., 1991; Lasic e col., 1991; Woodle e col., 1992; Schaffazick e col. 2003).

Pela habilidade dos lipossomas de solubilizar moléculas hidrofóbicas em sistemas naturais água-lipídio, aliada à grande penetração das vesículas através das mucosas e pela controlada liberação, os mesmos têm sido aplicados também na indústria de alimentos, na qual as vesículas têm liberado oralmente aromas e nutrientes como vitaminas, minerais e extratos de ervas. Outras utilizações incluem a atuação como ligantes para princípios ativos, substratos para testar canais iônicos, em pesquisas de pesticidas e em testes para enzimas de membranas.

3.4. *Preparação de Lipossomas*

Para a produção de lipossomas em escala de laboratório, várias metodologias têm sido comumente utilizadas e os principais detalhes têm sido abordados na literatura (Lasic, 1988; New, 1990; Talsma e Crommelin, 1992b; Barenholz e Crommelin, 1994; Crommelin e Schreier, 1994). O livro editado por New (1990), em particular, descreve detalhes experimentais para a produção de lipossomas em escala de laboratório por uma grande variedade de metodologias. Entretanto, a literatura é relativamente escassa no tocante ao aumento de escala de produção de lipossomas.

O uso efetivo de lipossomas em produtos industriais manufaturados para aplicações clínicas depende de vários critérios. As vesículas obtidas a um custo relativamente baixo através de metodologias simples, reprodutíveis, que permitam a esterilização e envolvam materiais relativamente inertes, devem permitir a encapsulação eficiente e estável do fármaco (Gregoriadis, 1992).

Para maiores escalas, os problemas são constituídos principalmente pela baixa estabilidade dos sistemas obtidos, pela necessidade de obtenção de material estéril para fins terapêuticos e pelo escalonamento em si das tecnologias.

O projeto dos lipossomas constitui uma das etapas mais importantes para o sucesso da formulação. Dependendo da seleção dos componentes da bicamada e do método de preparação utilizado, os lipossomas podem variar consideravelmente algumas de suas características físico-químicas como tamanho, número de lamelas, carga, fluidez da bicamada e volume encapsulado (Talsma e Crommelin, 1992a).

A principal diferença entre as metodologias laboratoriais fundamenta-se nas formas pelas quais são conduzidas e combinadas as etapas de hidratação dos lipídios, incorporação do fármaco, redução do tamanho das vesículas e remoção do material não encapsulado. Entre as principais metodologias que envolvem a preparação das vesículas tem-se: técnicas de dispersão mecânica, de substituição de solventes orgânicos por soluções aquosas, de remoção de detergente, de mudança de tamanho, de fusão de vesículas e de variações de pH durante a hidratação dos lipídios. As técnicas de extrusão ou sonicação de vesículas multilamelares podem ser utilizadas para a redução do tamanho dos lipossomas,

que devem, conforme mencionado anteriormente, ser dimensionados de acordo com o alvo de destino. Entre os principais métodos comumente empregados para a remoção do material não encapsulado se encontram a diálise, a ultracentrifugação, a ultrafiltração e a cromatografia de filtração em gel. Todas as metodologias apresentam vantagens e desvantagens, não havendo, via de regra, uma metodologia ótima que possa ser considerada como universal.

Ainda hoje, os mecanismos de formação das vesículas lipídicas são pouco esclarecidos na literatura, principalmente pelo fato dos métodos físicos e químicos de análise existentes não conseguirem ainda caracterizar detalhadamente as estruturas intermediárias do processo. Alguns mecanismos de formação de vesículas lipídicas foram descritos por Lasic (1988; 1992). Segundo este autor, para a formação dos lipossomas, as moléculas anfífilicas devem estar necessariamente organizadas em estruturas simples, como lamelas ou bicamadas. Uma vez que a exposição das extremidades hidrofóbicas das lamelas à água é desfavorável, com a agitação do sistema as bicamadas tendem a se enrolar em estruturas esféricas que retêm um volume aquoso, formando as vesículas lipídicas (Lasic, 1992).

Um dos métodos de preparação mais empregados na escala laboratorial é o método da hidratação do filme lipídico seco. Este consiste na obtenção de vesículas multilamelares pela hidratação, em constante agitação e a uma temperatura maior que a temperatura de transição gel/líquido-cristalino dos fosfolipídios, de bicamadas finas de lipídios formadas pela evaporação do solvente orgânico no qual os mesmos estavam dissolvidos. A hidratação das moléculas dos lipídios provoca o aumento do tamanho de suas cabeças polares e da área superficial externa, permitindo a formação de formas convexas a partir das quais crescem as bicamadas. Quando é atingido um certo distanciamento, provocado pela incorporação da fase aquosa, entre as bicamadas formadas, essa transformação cessa e as extremidades laterais hidrofóbicas ficam expostas a moléculas de água, fazendo com que os fragmentos de bicamadas lipídicas se desprendam das paredes do frasco e se agreguem em lipossomas, enquanto encapsulam parte da solução aquosa (Lasic, 1988). As vesículas obtidas tornam-se unilamelares através da realização de procedimentos posteriores à preparação como a extrusão.

A simples mistura de lipídios com uma fase aquosa raramente resulta na formação eficiente de lipossomas, uma vez que geralmente não ocorre a hidratação simultânea de todas as moléculas presentes, requerendo etapas posteriores de homogeneização, que não são efetivas quando misturas lipídicas estão envolvidas. Outros tratamentos poderiam ser empregados, como agitação mecânica ou aquecimento prolongado, embora possam causar degradações, mesmo mostrando-se aparentemente efetivos (Gregoriadis, 1992). Para minimizar este efeito, a hidratação dos lipídios deve ser conduzida de maneira a aumentar a razão área superficial/volume da vesícula lipídica. Este objetivo poderia ser atingido através da preparação de um filme lipídico fino pela evaporação da fase orgânica contendo os lipídios dissolvidos, através da obtenção de uma massa agregada porosa pela liofilização dos lipídios, pela atomização de uma solução orgânica contendo os lipídios solubilizados ou pela introdução direta em uma fase aquosa de lipídios solubilizados em uma fase orgânica.

Dentre os métodos acima mencionados, os dois últimos são os que apresentam maior potencialidade de escalonamento, entretanto, não existe um único método aplicável a todos os sistemas de lipossomas, devendo-se sempre avaliar as vantagens e limitações de cada metodologia.

3.4.1 Preparação de Lipossomas por Injeção de Etanol

Lipídios solubilizados em solventes orgânicos miscíveis em água (etanol, propilenoglicol) ou solventes orgânicos imiscíveis em água (éter, freon) podem ser injetados em uma fase aquosa, seguida da remoção do solvente orgânico (e possível reciclagem) por evaporação, cromatografia de exclusão em gel, filtração ou diálise. Na Figura 3.6 pode-se observar uma representação esquemática do processo de formação de vesículas lipídicas pelo método de injeção de solventes orgânicos voláteis imiscíveis com água.

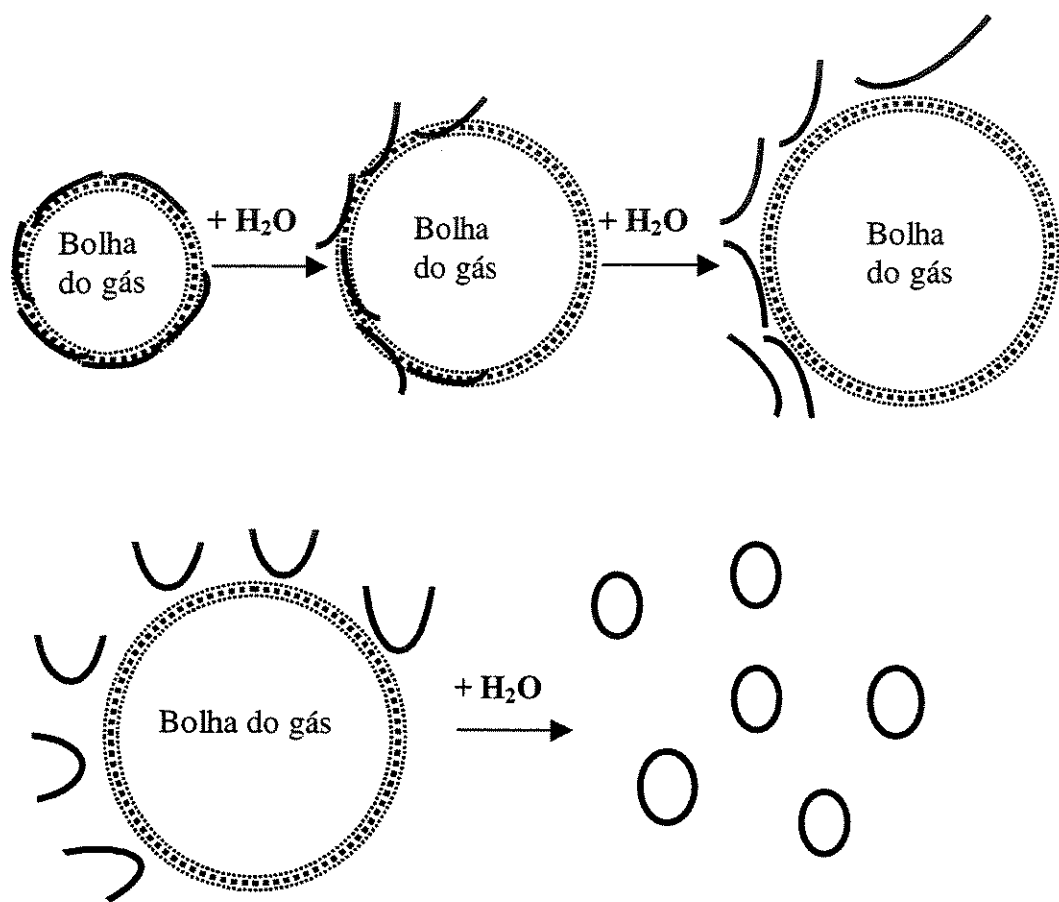


Figura 3.6 – Representação esquemática da formação de vesículas unilamelares através da injeção de uma solução orgânica de lipídios em uma fase aquosa. O solvente orgânico é imiscível com água e é volatilizado quando de sua injeção na fase aquosa. Cada linha representa um fragmento de bicamada lipídica.

Dependendo do tipo e a concentração final de solvente orgânico na preparação, pode não ser necessária esta etapa de remoção, uma vez que a quantidade de solvente remanescente na amostra (etanol ou propilenoglicol) poderia não ser nociva e, adicionalmente preveniria o crescimento microbiano em produtos cosméticos, nutricionais ou farmacêuticos.

Entre os métodos de preparação envolvendo dispersão de solvente, na categoria de solvente orgânico miscível na fase aquosa, encontra-se o método de injeção de etanol, proposto por Batzri e Korn em 1973.

Neste método, os lipídios, previamente dissolvidos em um solvente orgânico miscível como o etanol, são colocados em contato com a fase aquosa através de uma injeção rápida e direta. Com o contato entre as fases aquosa e orgânica, ocorre a praticamente imediata diluição do etanol. E, como consequência da mudança nas condições de solubilidade dos lipídios, ocorre precipitação destas moléculas, formando-se então fragmentos de bicamadas lipídicas. Através da dissipação de energia no sistema (agitação, ultrassonicação, etc.), os fragmentos de bicamadas lipídicas produzidos tendem a diminuir a exposição da parte hidrofóbica das moléculas pelo rearranjo das mesmas nesta região, o que resulta no arqueamento dos fragmentos das bicamadas que, fechados, formam estruturas ovais. A agitação e a força de injeção geralmente são suficientes para garantir uma mistura completa, de forma que a diluição do solvente e a dispersão das moléculas de lipídios na fase aquosa são quase instantâneas. As estruturas ovais transformam-se em esféricas com o decorrer do tempo, nas quais a energia de curvatura é mínima e o volume aquoso retido é máximo, possivelmente através do deslocamento bidirecionado das moléculas dos fosfolipídios (Lasic, 1992). Este mecanismo de formação de vesículas está representado na Figura 3.7.

Esta metodologia para a obtenção de lipossomas possui a vantagem de ser simples, apresentar fácil e rápida execução, não promover alterações degradativas nos lipídios e sua escolha, unida à seleção de matéria-prima à base de lipídios naturais, representa uma das poucas alternativas que possibilitam uma fácil transposição para a escala industrial, tendo sido selecionada para a encapsulação dos compostos terapêuticos no presente estudo.

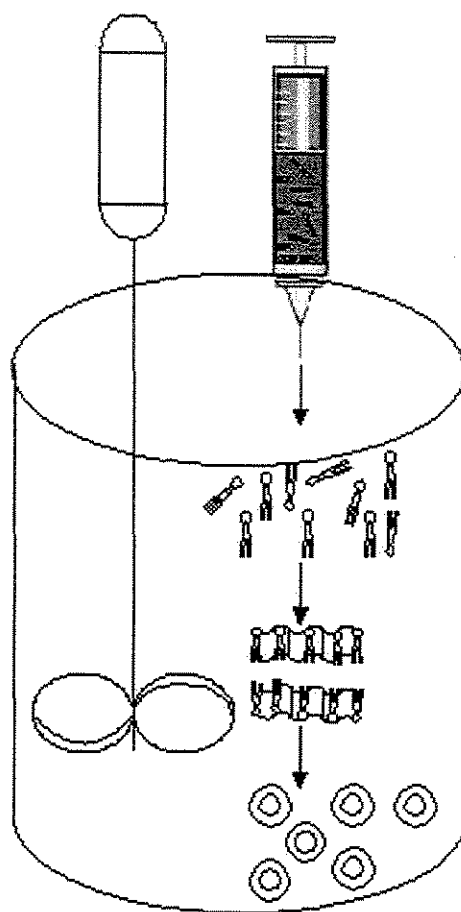


Figura 3.7 – Representação esquemática da formação de vesículas lipídicas unilamelares através da injeção de uma solução orgânica miscível de lipídios em uma fase aquosa. Cada estrutura esférica representa um lipossoma formado.

O trabalho publicado por Perret e col. (1991) enfoca a produção de vesículas lipídicas por injeção de etanol descrevendo a obtenção de um diagrama trifásico (lipídios, etanol e solução aquosa) a 20°C e a formação de prolipossomas precursores das vesículas

lipídicas. No diagrama de fases apresentado pelos pesquisadores, especificamente com a fosfatidilcolina de ovo (EPC), pode se observar que dependendo da concentração inicial dos três compostos analisados poderão ser obtidos lipossomas, bicamadas lipídicas precipitadas ou simplesmente lipídios solubilizados. Na presença de mais de 20% de solvente orgânico dificilmente obtém-se vesículas lipídicas. Por outro lado, o aumento na porcentagem da fase aquosa (tampão) no sistema teria um efeito inverso. Um aumento na concentração do fosfolipídio no sistema (acima de 50%) provocaria a obtenção de bicamadas precipitadas e não de vesículas lipídicas. Possivelmente para um sistema com fosfatidilcolina de soja/etanol/água este comportamento não seria observado nas mesmas faixas de concentração, pois a solubilidade no solvente orgânico deste fosfolipídio é menor que a do EPC e sua temperatura de transição de fases é maior.

A encapsulação estável e eficiente do composto terapêutico é um dos grandes desafios na produção de lipossomas. Compostos hidrofílicos são tipicamente introduzidos na solução de hidratação. Na metodologia de injeção de etanol a incorporação passiva dos compostos terapêuticos nos lipossomas é realizada durante a formação das vesículas lipídicas, utilizando-se isoladamente soluções aquosas dos fármacos. Neste tipo de processo, a eficiência, determinada pela fração de composto terapêutico incorporado na vesícula, é diretamente influenciada pelo volume aquoso retido no cerne aquoso da vesícula lipídica no qual o composto se encontra dissolvido e que, por sua vez, depende do tamanho e do número de lamelas do lipossoma (Moraes, 1996). Para os compostos predominantemente hidrofóbicos, a incorporação passiva pode ser feita diretamente na bicamada lipídica, dissolvendo-o conjuntamente com os lipídios no mesmo solvente orgânico. Neste caso, a quantidade de composto incorporado será dependente da estabilidade da bicamada lipídica, na qual o número de moléculas de composto acomodadas não deverá afetar, de maneira substancial, o empacotamento das moléculas de lipídios.

Bases ou ácidos fracos podem ser incorporados em lipossomas previamente preparados apresentando distribuições de prótons do tipo Henderson-Hasselbalch, uma vez que estas vesículas podem apresentar gradientes entre as fases aquosas interna e externa de suas membranas. As maiores eficiências de encapsulação são atingidas pela incorporação de bases fracas do tipo amina lipofílica em vesículas apresentando gradientes de pH (interior ácido) ou de concentração de sulfato de amônio. Analogamente, ácidos fracos

podem ser incorporados por gradientes de pH (interior alcalino) ou de bicarbonato de sódio. A encapsulação de tais moléculas é em geral menos estável que a incorporação das bases fracas, que podem formar precipitado com ânions presentes, o que geralmente não acontece entre os ácidos fracos e cátions encapsulados (Haran e col., 1993).

O potencial eletrostático, a pressão osmótica e outros gradientes nem sempre são efetivos na encapsulação de fármacos. Para garantir altas eficiências de incorporação de compostos terapêuticos que não respondem à presença de gradientes vesiculares, o trabalho com altas concentrações de fármacos e, especialmente de lipídios (100 – 150 mmol/L) é ainda requerido. Eficiências teóricas de encapsulação acima de 70% dificilmente são obtidas experimentalmente, sendo eficiências de 50% consideradas altas. Geralmente, 20 a 30% de eficiência de encapsulação é o máximo obtido (Lasic, 1998) e para vesículas unilamelares pequenas, percentuais inferiores a 5% são normalmente verificados.

O trabalho pioneiro descrito por Batzri e Korn (1973) envolvia a preparação de lipossomas de lecitina de ovo através da injeção da solução etanólica do fosfolipídio em água. Uma agitação vigorosa foi necessária para evitar a formação de lipossomas maiores e heterogêneos e a substituição da água por uma solução de KCl a 160 mmol/L não provocou mudanças nos resultados. O processo não provocou a degradação ou oxidação da fosfatidilcolina empregada, fato comprovado através dos espectros de absorção da solução orgânica de lipídios e dos lipossomas preparados. A suspensão homogênea de vesículas, facilmente concentrada por ultrafiltração, teve uma concentração final de solvente de 7,5% e diâmetros médios em torno de 25 nm. Os autores destacaram a rapidez, alta reprodutibilidade desta metodologia e uso das vesículas após sua estocagem por vários dias, discutindo também duas desvantagens inerentes ao método, a presença do solvente na suspensão que poderia ser removido por diálise ou ultrafiltração e os volumes grandes de fase aquosa usados para grandes concentrações de soluto.

Embora estudos sobre o método de injeção de etanol indiquem a fácil remoção do solvente orgânico por técnicas como a diálise, a remoção do etanol presente nas bicamadas lipídicas constitui ainda uma das principais limitações desta técnica. Este método de preparação também é diretamente limitado pela baixa solubilidade dos lipídios no solvente, o que origina geralmente suspensões muito diluídas de vesículas e, conseqüentemente,

eficiências de encapsulação baixas para compostos hidrofílicos. Poucos trabalhos têm sido publicados abordando novos métodos de preparação de lipossomas e o uso destes sistemas na liberação controlada de agentes tuberculostáticos.

Os lipossomas preparados por Kremer e col. (1977) a partir de dois tipos de fosfolípidios (dimiristoilfosfatidilcolina, DMPC e dipalmitoilfosfatidilcolina, DPPC) foram empregados em estudos como modelo de membranas biológicas. As vesículas foram preparadas pela metodologia proposta por Batzri e Korn em um recipiente de 2 cm de diâmetro, contendo a solução aquosa agitada por barra magnética, onde foi injetada cada solução de lipídio a uma vazão entre 10^{-4} e 0,05 mL/min, mantendo sempre a concentração final de solvente entre 2,5 e 7,5%. A temperatura da fase aquosa foi superior a 35 e 55 °C para a preparação das vesículas de DMPC e DPPC, respectivamente, para trabalhar sempre em valores acima das temperaturas de transição de fases dos lipídios. As vesículas obtidas com diâmetros médios de até 120 nm foram submetidas à diálise para a remoção do etanol presente nas suspensões, observando-se que após 8 horas, esta etapa reduzia a concentração de etanol para 0,01% em volume, e que a presença do solvente não provocava mudanças no tamanho dos lipossomas. O raio externo das vesículas preparadas por esta metodologia, assim como sua massa molecular, foram variáveis afetadas pela concentração de lipídios na solução orgânica injetada no tampão aquoso. A obtenção de vesículas unilamelares grandes ou a formação de agregados de lipídios ocorre se a mistura for ineficiente (New, 1990).

Em 1984, a companhia Cilag (Suíça) iniciou o desenvolvimento de lipossomas à base de fosfatidilcolina e colesterol, para aplicações dermatológicas, contendo 1% do agente antifúngico econazol, a partir do estudo de técnicas com potencial econômico e de escalonamento, conforme discutido por Kriftner (1992) e publicado por Naeff 1996. O composto ativo, solúvel em etanol, foi incorporado passivamente na bicamada lipídica das vesículas. As primeiras bateladas de lipossomas de lecitina e colesterol obtidas foram preparadas em um volume de 200 mL. Na primeira etapa foram otimizadas a proporção inicial lipídio/fase aquosa e as condições para a velocidade de rotação e de injeção para a obtenção de lipossomas unilamelares com uma estreita distribuição de tamanho. Posteriormente, foram produzidos lotes de vesículas de até 12 Kg otimizando a preparação e sua validação como patente (publicada em 1986). Baseado nestes resultados, o processo foi ampliado para uma escala de até 480 kg. A solução orgânica de lipídios e o agente

econazol foi injetada através de uma bomba, capaz de gerar pressões entre 0,1 e 300 bar e uma vazão entre 1 e 1000 mL/min, foi dispersa em um homogenizador que continha a fase aquosa sob agitação (de 1500 até 20.000 rpm). A fase aquosa continha, além da solução salina tamponada, agentes preservativos e um agente quelante, uma vez que a veiculação das vesículas seria na forma de gel. Independentemente do volume preparado (10 bateladas), as vesículas mais estáveis foram obtidas em pH entre 5 e 7 e poderiam ser aplicadas topicamente sem a necessidade de processos de purificação. Por esta metodologia foram obtidas vesículas unilamelares com diâmetros médios entre 151 e 192 nm, e este tamanho de partícula não foi influenciado pelo processo de ultracentrifugação para a remoção do fármaco não encapsulado. A eficiência de incorporação de econazol nos lipossomas, sempre superior a 90%, o tamanho das vesículas e a sua estabilidade foram controladas e reprodutíveis na escala industrial. As avaliações em seres humanos da formulação obtida na forma de gel (estável por 2 anos a temperatura entre 15 e 25 °C) mostraram que o “Pevaryl® lipogel” incrementou a eficácia do composto ativo e diminuiu o tempo de tratamento normalmente usado. A administração da suspensão lipossomal de econazol uma vez por dia teve o mesmo efeito que a aplicação duas vezes por dia do fármaco em creme.

A tioguanina, um quimioterapêutico empregado no tratamento de leucemia, foi encapsulada em lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol com diâmetros médios variando de 50 a 70 nm (Foradada e Estelrich, 1995). Várias concentrações iniciais de fármaco (0,01; 0,1 e 1 mmol/L) no solvente orgânico e três condições de pH (4,7; 7,4 e 9,2) foram testadas no estudo. Os autores atingiram valores de eficiência de encapsulação máxima de 3 mmol/mol de lipídio no pH de 4,7, correspondente ao pH no qual o composto apresentou um maior coeficiente de partição, independentemente da concentração inicial de composto terapêutico. Para os outros valores de pH os valores máximos de eficiências foram mais de 50% menores que os obtidos para o pH mais baixo.

No trabalho publicado por Szoka (1996) na forma de patente, lipossomas de fosfatidilcolina de ovo e colesterol (EPC/Col) foram preparados a partir da metodologia de injeção de etanol, estudando-se o efeito de diversas variáveis nas características finais das vesículas lipídicas. Entre as variáveis estudadas pelo autor foram incluídas a agitação, a vazão de injeção da solução orgânica, os volumes de injeção e de fase aquosa, a

concentração de etanol, a temperatura, a concentração lipídica e o tipo de solvente orgânico empregado. No trabalho comprovou-se que os diâmetros médios das vesículas preparadas sem agitação poderiam ser até duas vezes maiores que os diâmetros obtidos com a fase aquosa agitada. Um aumento na agitação (de 100 até 250 rpm) provocou uma diminuição nos diâmetros médios das vesículas obtidas, os quais permaneceram praticamente constantes para os outros valores de agitação estudados (de 250 até 750 rpm). A vazão de injeção teve uma influência menos significativa nesta característica, uma vez que o diâmetro médio dos lipossomas preparados foi pouco afetado com um aumento na vazão de injeção de 0,4 a 6,0 mL/min. Com o aumento do volume da fase orgânica e um aumento da concentração de lipídios (de 40 a 121 mmol/L), o diâmetro das vesículas apresentou um incremento (de 83 a 690 nm) associado também a um aumento na polidispersão das medidas realizadas por espalhamento de luz. Este comportamento foi oposto ao apresentado quando do aumento em 2,5 vezes do volume da fase aquosa.

Neste trabalho (Szoka, 1996) também foi realizado um estudo referente ao efeito do tipo e concentração final de solvente no diâmetro das vesículas lipídicas, concluindo-se que esta variável tem uma influência significativa no diâmetro dos lipossomas. Vesículas obtidas a partir de misturas de dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol em uma razão molar de 7,5:1 apresentaram diâmetros médios menores (93 nm), quando comparados com o diâmetro de 483 nm obtidos para os lipossomas obtidos na mesma concentração lipídica e dissolvidos em etanol puro. Misturas de diferentes solventes com DMSO resultaram em variações nos diâmetros das vesículas. O autor observou também que um incremento na temperatura da fase aquosa (de 30 a 80 °C) teve um modesto efeito nas medidas dos diâmetros das vesículas obtidas. Baseado nestes resultados, o autor selecionou como as melhores condições operacionais, uma vazão de injeção entre 2 e 6 mL/min, uma temperatura da fase aquosa de 30 °C e uma agitação de 750 rpm.

Vorauer-Uhl e col. (2001) prepararam vesículas lipídicas de distearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol (Col) e estearilamina em uma razão molar de 7:2:1 em condições estéreis pela metodologia de injeção de etanol proposta por Batzri e Korn (1973). Lipossomas obtidos com diâmetros médios de 200 a 300 nm encapsularam passivamente a enzima humana recombinante Cu/Zn superóxido dismutase, com valores de encapsulação de até 25 µg de enzima/µg de DSPC. Esta enzima, empregada na terapia

sistêmica de processos inflamatórios, apresenta na sua forma livre uma reduzida penetração através da pele, limitando sua terapia às zonas periféricas. Com a administração *in vivo* (coelhos albinos) do gel (1% de Carbopogel 980NF, Goodrich-Bélgica) de lipossomas contendo este agente terapêutico, o tamanho das lesões e a necrose foram significativamente reduzidos quando comparados com ensaios controle, provavelmente pela maior penetração e pela liberação controlada do fármaco. Este resultado foi corroborado pelo aumento do tempo de disponibilidade biológica do composto terapêutico, de 10 minutos na forma livre, para 36 horas quando de sua aplicação encapsulado.

Em 2002 Domazou e Luisi estudaram a distribuição de tamanhos e o diâmetro médio de vesículas lipídicas obtidas pela metodologia de injeção de etanol. Os lipossomas foram preparados a partir de várias soluções orgânicas de lipídio (etanol, metanol, PEG 200, 2-3-butanediol e 1,2-propanediol). Os estudos foram realizados avaliando-se a influência da concentração lipídica no solvente metanol (entre 10 e 100 mmol/L), a concentração final de lipídio (entre 0,05 e 2,5 mmol/L) e a porcentagem final de solvente na suspensão (entre 0,14 e 8%) na distribuição de tamanhos obtida. Para os outros solventes a concentração lipídica foi fixada em 25 mmol/L, a concentração lipídica final na fase aquosa em 0,5 mmol/L e a porcentagem de solvente em 2%. Quando baixas concentrações de lipídio tanto na fase orgânica como na fase aquosa são estabelecidas (concentração lipídica em metanol menores ou iguais a 25 mmol/L), os lipossomas obtidos apresentam uma distribuição monomodal de tamanhos, com diâmetros entre 40 e 70nm. As suspensões diluídas de vesículas mantiveram suas distribuições monomodais após processos de concentração. A altas concentrações lipídicas, lipossomas de até 500 nm de diâmetro médio podem ser obtidos.

Wagner e col. (2002) desenvolveram uma metodologia baseada nos princípios do método de injeção de etanol que permitia a produção contínua de bateladas com vários mililitros até vários litros de lipossomas compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e Col incorporando passivamente uma enzima recombinante hidrofílica de alta massa molecular (33 kDa). A principal característica desta metodologia era a unidade de injeção do fluxo em contra corrente da solução orgânica de lipídios que estava contida em um recipiente pressurizado, cujo tubo de saída com um diâmetro de 250 μ m foi soldado transversalmente ao tubo de saída do sistema de bombeamento da solução protéica. A

mistura de lipídios e a solução aquosa de proteína se encontravam dissolvidas a 55 °C e a pressão empregada na injeção foi de 2,5 bar. Após a formação, as vesículas eram imediatamente diluídas em tampão sob agitação. A concentração final de etanol na suspensão não excedeu 7,5%. Os autores obtiveram eficiências de encapsulação entre 25 e 27% nas quatro bateladas de vesículas preparadas com diferentes concentrações iniciais de proteína e os diâmetros médios dos lipossomas preparados variaram de 270 a 2970 nm. Os autores destacaram que a metodologia empregada mostrou-se altamente factível para a produção de material para uso clínico, obtendo-se resultados reprodutíveis e relativamente rápidos.

Assim, apesar das limitações do método de preparação das vesículas lipídicas por injeção de etanol, esta abordagem mostra-se interessante e factível para diversas aplicações terapêuticas.

3.5. Estabilização de Vesículas Lipídicas por Liofilização

Embora os lipossomas sejam considerados hoje um dos mais importantes sistemas de liberação de compostos terapêuticos, para que estas vesículas lipídicas possam ser utilizadas na terapêutica da tuberculose ou de qualquer outra doença é necessário vencer um problema comum que elas apresentam: a instabilidade física e química das formulações líquidas durante sua estocagem. Esta instabilidade das vesículas lipídicas pode ser manifestada principalmente pela rápida agregação das nanopartículas, pela liberação indesejável do material encapsulado ou pela degradação química de seus principais componentes.

A estabilidade das vesículas lipídicas pode ser dividida nos tipos: física, química e biológica, as quais geralmente se encontram inter-relacionadas. Na Tabela 3.4 são ilustrados os principais parâmetros relacionados com estas estabilidades das preparações de lipossomas.

A estabilidade de produtos farmacêuticos e cosméticos encapsulados é determinada pela estabilidade físico-química dos lipossomas, como uniformidade na

distribuição de tamanho, eficiência de encapsulação e a capacidade de evitar a degradação de seus componentes. Otimizando-se a distribuição de tamanho, o pH e a força iônica, e com a adição de antioxidantes, as formulações de lipossomas podem ser estáveis durante anos. Por outro lado, a adição de crioprotetores adequados permite sua estocagem nas formas congelada e liofilizada. A estabilidade biológica depende da presença de agentes que possam interagir com as vesículas lipídicas.

Tabela 3.4 - Principais parâmetros relacionados com a estabilidade das formulações lipídicas (adaptado de Braun e col., 1992).

<i>Instabilidade</i>	<i>Causas prováveis</i>
Física	Liberação de compostos hidrofílicos
	Influência da composição lipídica
	Influência da técnica de preparação
Química	Oxidação dos lipídios insaturados
	Hidrólise dos lipídios
	Degradação dos compostos encapsulados
Microbiológica	Contaminação bacteriana
	Interações com preservativos
	Influência da técnica de preparação

As vesículas lipídicas podem também ser armazenadas na forma de pó liofilizado a ser reconstituído imediatamente antes da sua utilização.

O processo de liofilização é capaz de conferir ao produto características que o tornam mais estável quimicamente e que, portanto, conservam, por um período de tempo prolongado, as características indispensáveis a um produto farmacêutico, desde que sempre seja armazenado sob condições adequadas. Este processo desempenha hoje um papel de grande importância na tecnologia de medicamentos.

Amplamente usada na indústria farmacêutica, a liofilização tem sido sugerida por alguns pesquisadores como um processo bastante útil no aumento da estabilidade de nanopartículas ou lipossomas (Suzuki e col., 1996; Zingel e col., 1996; Cavalli e col., 1997; Schwarz e Mehnert, 1997; Peer e Margalit, 2000; Joshi e Misra, 2001a; Joshi e Misra, 2001b e Konan e col., 2002). Sendo a liofilização capaz de dar aos produtos características muito desejáveis quando se tratando de preparações farmacêuticas, tais como a solubilidade, a estabilidade e a integridade, pode-se afirmar que esta técnica tem um valor muito grande, quando se fala em tecnologia farmacêutica, sendo que vários fármacos disponíveis comercialmente e que estão sendo lançados recentemente são geralmente apresentados na forma de liofilizados.

As vantagens da liofilização de produtos farmacêuticos devem-se a diversas razões (Avis e Wu, 1996 e Rey e May, 1999). O processo sempre é conduzido a temperaturas bem mais baixas do que aquelas exigidas pelos processos comuns de secagem, evitando-se os problemas que podem ser ocasionados pelas altas temperaturas que induzem a degradação. A degradação do produto por oxidação é reduzida, pois a liofilização processa-se sob vácuo, e após a liofilização, o produto apresenta-se com teor de umidade residual muito baixo. O produto liofilizado reconstitui-se muito rapidamente quando em contato com o solvente, sendo que a forma e as características do produto final são essencialmente as mesmas das formulações originais.

Entretanto, como qualquer processo, a liofilização também apresenta suas desvantagens. Se por um lado pode-se obter produtos bastante estáveis do ponto de vista químico, economicamente devem ser considerados o tempo total requerido no processamento do material, o elevado custo do equipamento e o gasto energético. Paralelamente, outras pesquisas são realizadas na tentativa de se amenizar os problemas que ocorrem em um ciclo de liofilização, tais como agregação, absorção de ar e modificação da estrutura da superfície, o que pode dificultar a redispersão das vesículas em meio aquoso (Kreuter, 1983, De Chasteigner e col., 1995 e Allémann e col., 1998). Esses fatos limitam o uso da liofilização aos produtos considerados muito instáveis e de elevado custo, muitos dos quais teriam um prazo da validade efêmero, se conservados como soluções aquosas ou então com elevado teor da umidade. É o caso de alguns antibióticos, vitaminas, vacinas e outros produtos químicos ou biotecnológicos.

A liofilização é um processo de secagem pelo qual a água contida no produto é completamente removida por sublimação, ou seja, partindo-se de um material previamente congelado e submetendo-se a alto vácuo, a água passa diretamente do estado sólido ao estado de vapor.

Sendo a liofilização um processo de secagem por sublimação, um determinado produto, previamente congelado, submetido a determinadas pressões e temperaturas inferiores à do ponto triplo no diagrama de fases da água (4,58 mmHg e 0,098 °C respectivamente) poderá perder água por sublimação, mantendo assim as características que adquiriu quando do seu congelamento. Sabendo-se que a água pura congela a 0 °C, na liofilização trabalha-se geralmente com temperaturas bem abaixo do ponto triplo, uma vez que a solução a liofilizar pode conter sais dissolvidos que podem provocar um abaixamento na temperatura de congelamento da amostra.

Durante o processo de liofilização é necessária a utilização de excipientes na formulação de um liofilizado. Estes excipientes usados são substâncias farmacologicamente inertes, que são adicionados aos produtos, com duas finalidades principais. A primeira é dar forma ao liofilizado, ou seja facilitar a formação de uma matriz ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas e evitando assim a agregação durante o processo. Entende-se por matriz a massa seca porosa de aproximadamente o mesmo tamanho do produto congelado resultante do processo de liofilização do produto quando da sua reconstituição, no momento de uso. Aliás, a grande afinidade pela água que o produto liofilizado apresenta deve-se, em parte, a essa estrutura porosa. Polissacarídeos, tais como o manitol e a lactose, são muito utilizados como formadores da matriz em liofilizados (Schaffazick e col., 2003). A segunda finalidade é isotonzar o produto, e quando se trata de medicamentos injetáveis, utilizam-se sais inorgânicos, tais como cloreto de sódio, fosfato de sódio e fosfato de potássio.

O liofilizador é um equipamento constituído fundamentalmente por uma câmara de secagem resistente ao vácuo, no qual fica o material a ser liofilizado. Geralmente ela possui prateleiras onde o produto é disposto em frascos ou até mesmo em bandejas (no caso de alimentos, principalmente). Possui também um condensador que normalmente encontra-se ligado a um compressor e a uma bomba de vácuo, que pode ser de difusão, rotativa ou

ainda ambas. Esse condensador deve operar a uma temperatura inferior à do produto, o que é necessário para que a água sob forma de vapor, que foi retirada do produto por sublimação, deposite-se sob forma de gelo no condensador. Caso isso não ocorra, o ambiente se torna saturado, impedindo o curso normal da liofilização. As bombas de difusão são utilizadas nos aparelhos maiores, pois sua capacidade de produzir vácuo é superior à das bombas rotativas. A pressão a ser atingida durante a liofilização geralmente varia de 0,05 mmHg a 2 mmHg (Vila-Jato, 1997).

O primeiro passo a ser dado quando da produção de produtos terapêuticos liofilizados é a preparação da solução aquosa do fármaco e dos excipientes que compõem a fórmula. Após essa operação, pode-se realizar a esterilização do produto por filtração através de membranas e logo em seguida a solução, já estéril, é envasada em recipientes adequados sempre semi-abertos. Em seguida, inicia-se a liofilização propriamente dita habitualmente dividida em três etapas, o congelamento da solução, a sublimação ou secagem primária e a secagem secundária.

O congelamento da solução normalmente é realizado fora do liofilizador, utilizando-se um equipamento especialmente desenvolvido para esta operação. As temperaturas necessárias ao congelamento do material podem ser atingidas utilizando-se, por exemplo, imersão em álcool refrigerado ou em nitrogênio líquido.

Estando o produto convenientemente congelado, os recipientes são levados então ao liofilizador, no qual, após um período de tempo, se for necessária a estabilização da temperatura, aplica-se vácuo, dando início à sublimação da água. Ao final desta etapa, consegue-se retirar do produto grande parte da água nele contida.

Na secagem secundária, a umidade que permanece no produto é então reduzida, utilizando-se secagem pelo calor, sob vácuo, ainda no liofilizador. A umidade residual geralmente fica abaixo de 1%. Um ciclo completo de liofilização pode ser bastante demorado, alcançando até 48 horas ou mais, conforme o produto. Quando se trata de um produto estéril, a liofilização é evidentemente realizada em áreas assépticas, e com os cuidados que se exige para esta forma farmacêutica (Vila-Jato, 1997).

Em 1996, Suzuki e colaboradores publicaram um trabalho no qual estudaram os efeitos da glicose e outros oligopolímeros (maltose, maltotriose, maltotetraose,

maltohexaose e maltoheptaose) a uma concentração de 50 mmol/L na estabilidade de lipossomas durante a liofilização, através do monitoramento da retenção do composto fluorescente Calceína. A retenção deste composto não dependeu somente do tipo de açúcar ou lipídio, mas também da razão molar sacarídio/lipídio. A adição de maltose ou maltotriose a lipossomas de lecitina de ovo levou a uma grande estabilização durante a liofilização, embora o açúcar glicose não tenha mostrado estas mesmas características no processo.

Zingel e colaboradores (1996) prepararam, pelo método de evaporação de etanol, vesículas multilamelares compostas basicamente de fosfatidilcolina de soja e colesterol que encapsularam aproximadamente 35% de um agente monomérico de contraste altamente solúvel em água. Estes lipossomas com diâmetro médio de 300 nm foram estabilizados por um processo de liofilização e a rehidratação das nanopartículas com uma solução aquosa de manitol resultou em maior eficiência de encapsulação quando comparada às obtidas com as outras soluções empregadas. Esta eficiência de encapsulação e o diâmetro médio das vesículas foram sensíveis ao aumento da concentração de manitol na solução de rehidratação. A ressuspensão dos lipossomas com soluções de sacarose e KCl não se mostrou tão efetiva como a rehidratação com a solução de manitol no aumento da eficiência de encapsulação.

Em 1997, Schwarz e Mehnert liofilizaram nanopartículas sólidas de lipídios obtidas por homogeneização a alta pressão durante 24 horas a uma temperatura de -25°C seguida de uma fase secundária de secagem a 20°C e pressão máxima durante 24 horas. A reconstituição por agitação seguida de sonicação do produto congelado mostrou que dos 11 crioprotetores avaliados em diferentes concentrações, os compostos que mostraram maior potencial protetor foram a glicose, a manose, a maltose e a trealose. Dentre estes compostos, a trealose a uma concentração de 15% (m/v) foi o carboidrato mais efetivo quando avaliado o efeito no diâmetro médio destas partículas, embora mudanças no tamanho das partículas também possam estar associadas a outros parâmetros tais como a velocidade de congelamento das amostras e a metodologia para a rehidratação.

Cavalli e colaboradores em 1997 estudaram o efeito da liofilização por 36 horas de nanopartículas sólidas em dispersão de trealose a 2% ou Pluronic F68 a 2% ou ainda em

água destilada, antes e depois da sua esterilização por autoclave a 121 °C por 15 minutos, necessária para futuras administrações intravenosas e oculares. Para os três tipos de dispersões foi apresentado um incremento nos diâmetros médios das partículas liofilizadas e dispersas sob agitação mecânica em água a uma razão de 1:25 após um ano de estocagem. Os autores supõem que este aumento deva-se à presença de agregados promovida pelas condições do processo de liofilização ou que a concentração do estabilizante tenha sido muito baixa para este processo. Para confirmar esta hipótese, as nanopartículas foram dispersas em uma solução de trealose a 15%, verificando-se um menor aumento no diâmetro médio do produto liofilizado redisperso.

Para minimizar os problemas de estabilidade apresentados na incorporação de fármacos em lipossomas, principalmente em vesículas com a superfície modificada, Peer e Margalit (2000) avaliaram duas novas metodologias, empregando lipossomas com composição convencional e bioadesivas com a superfície modificada com ácido hialurônico. Uma das metodologias consistiu na preparação das vesículas lipídicas vazias (N-lipossomas) e de sua liofilização em presença do composto (na forma livre) a encapsular. Na outra metodologia, os dois tipos de lipossomas liofilizados foram posteriormente reconstituídos através da hidratação com uma solução aquosa do fármaco a ser incorporado, como tradicionalmente realizado (T-lipossomas). Todas as vesículas lipídicas compostas principalmente de fosfatidilcolina de soja foram congeladas a -80 °C por até 4 horas e liofilizadas durante 48 horas. Cinco compostos foram encapsulados nos dois tipos de lipossomas (fluoresceína, sacarose, histidina, mitomicina C e cloranfenicol) pelas duas metodologias. Os valores de eficiências de encapsulação obtidos pelas duas metodologias para as vesículas regulares e as estericamente modificadas ficaram entre 10 e 90% e com exceção da sacarose, para todos os outros compostos, as eficiências de encapsulação obtidas pela nova metodologia foram superiores ou iguais às obtidas nos lipossomas rehidratados com a solução aquosa do composto.

Joshi e Misra (2001a) formularam e caracterizaram um pó liofilizado e inalável de lipossomas encapsulando o antihistamínico fumarato de cetotifeno. As vesículas multilamelares de fosfatidilcolina de ovo e colesterol foram preparadas através da hidratação do filme lipídico seco com tampão fosfato a pH 7,4 contendo 1 mmol/L de EDTA e 100 mmol/L do crioprotetor (lactose, maltose, sacarose ou dextrose) seguida de

sonicação. A dispersão formada foi convenientemente diluída até se obter uma razão molar lipídio/açúcar de 1/12, as vesículas lipídicas foram congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e secas a vácuo durante 24 horas. A quantidade de composto retido nas vesículas após sua incorporação foi determinada depois da liofilização e rehidratação dos lipossomas. Os resultados revelaram que a sacarose permitiu uma retenção significativamente maior do antihistamínico quando comparada com os outros açúcares. Quando as vesículas foram liofilizadas na presença de várias concentrações de sacarose, verificou-se que a porcentagem de composto terapêutico retido após a rehidratação foi dependente desta concentração. Em uma concentração de sacarose de 500 mmol/L foi verificada também a influência da variação na razão mássica lipídio/açúcar, verificando-se que estas variações eram também importantes na retenção do fármaco inicialmente encapsulado.

Konan e col. (2002) estudaram o efeito de vários crioprotetores tais como trealose, lactose, manitol e glicose no diâmetro médio de nanopartículas. Os pesquisadores comprovaram que as partículas liofilizadas sem o crioprotetor mostraram uma grande agregação quando comparadas às amostras desidratadas na presença dos açúcares. Para todos os açúcares testados foi evidenciada a pouca agregação das vesículas após sua hidratação por agitação manual durante 30 segundos, embora na amostra contendo glicose o liofilizado não se tenha mostrado expandido e estável em prateleira. Em adição, todas as partículas liofilizadas mostraram-se muito higroscópicas, o que implica em adotar condições favoráveis de estocagem para evitar a umidificação das misturas.

Estes trabalhos mostram que no processo de liofilização de lipossomas ou nanopartículas é sempre recomendada a adição de açúcares estabilizantes para garantir uma maior estabilização durante o processo e após a rehidratação. Esta adição de crioprotetores também pode influenciar a eficiência de encapsulação de compostos terapêuticos nos lipossomas e, em alguns casos, esta eficiência poderia ser sensível ao aumento da concentração de polissacarídeo na solução. Também foi verificado que a presença de estabilizantes e as variações nas suas concentrações podem ser fatores importantes na retenção de fármacos inicialmente encapsulados nas nanopartículas.

3.6. Aplicação de Sistemas Liberadores de Fármacos na Terapia da Tuberculose

A toxicidade, sobretudo renal e hepática, e a escassa margem terapêutica são os principais inconvenientes dos fármacos geralmente usados na terapia da tuberculose. Para melhorar a falta de especificidade destes compostos terapêuticos, tem-se proposto uma série de procedimentos relativamente sofisticados, dentre os quais se encontram a utilização de transportadores com interação seletiva sobre os alvos e que produzam uma liberação controlada, como as formulações em lipossomas.

No atual quadro epidemiológico, a busca por novas alternativas para a administração de fármacos e vacinas levou vários grupos de pesquisa a aplicar a tecnologia da liberação controlada de fármacos na terapia da tuberculose (Vladimirski e col., 1980, 1983; Vladimirski e Ladigina, 1982; Gay e col., 1984; Orozco e col., 1986, 1990; Heifets e Lindholm-Levy, 1987; Saito e Tomioka, 1989; Gonzalez-Tothi, 1991; Kurunov, 1992; Kurunov e col., 1995; Metha e col., 1993; Wong e col., 1993, 1995; Agarwal e col., 1994; Koga e col., 1994; Yu-Kyoung e Straubinger, 1995 e Parampal e col., 1997). Trabalhos enfocando antibióticos encapsulados em lipossomas para o tratamento de infecções com outras micobactérias são também relatados na literatura (Bermudez e col., 1990; Fresta e col., 1995 e Nelson e Richardson, 1997).

O uso de lipossomas como um novo sistema na liberação controlada de fármacos fundamentou-se no fato que estes sistemas apresentam baixa toxicidade e imunogenicidade, sendo sistemas biocompatíveis e biodegradáveis, e por permitirem a encapsulação de diferentes tipos de compostos. Além disto, estas vesículas poderiam modificar a rota de administração, reduzir a dosagem, o número e a intensidade dos efeitos colaterais dos fármacos livres, conforme já discutido anteriormente.

Estes sistemas lipossomais poderiam também ser administrados por aplicação tópica (efeito local) na pele e mucosas, por aplicação sistêmica em tecidos internos, em tecidos que se comunicam com o exterior (aparelho gastro-intestinal: retal, oral e sublingual; e aparelho respiratório: alveolar e bronquial), em tecidos interiores que não se comunicam com o exterior (intramuscular e subcutânea) e direto à circulação sistêmica (endovenosa).

O desenvolvimento da tecnologia de lipossomas para inalação (aerossóis), poderia encontrar grandes aplicações no tratamento da tuberculose, uma vez que o sistema receptor é de fácil acesso, permitindo a terapia local e sistêmica da infecção. Esta via permite também obter rapidamente níveis plasmáticos adequados devido à grande área superficial, ao alto fluxo sanguíneo e à delgada membrana que separa os alvéolos da circulação sistêmica. Estas vesículas consistem também em uma boa opção do ponto de vista de conforto do paciente quando comparada com outras formas de administração tradicionais.

A encapsulação de fármacos em lipossomas para aplicação na terapia da tuberculose tem sido pesquisada por diversos grupos, conforme mencionado anteriormente. Dentre os trabalhos localizados, destacam-se os descritos a seguir.

Vladimirski e col. (1980, 1983) e Vladimirski e Ladigina (1982) trataram camundongos por via intravenosa usando os fármacos isoniazida e estreptomicina encapsulados em vesículas lipídicas com resultados satisfatórios. A terapia de camundongos infectados com o *M. tuberculosis* com lipossomas de diâmetro médio entre 40 e 80 nm encapsulando estreptomicina revelou que os lipossomas de lecitina administrados por via intravenosa foram mais efetivos que o composto livre no prolongamento da sobrevivência dos animais e na redução do número de microrganismos no baço, mas não nos pulmões (Vladimirski e Ladigina, 1982).

Em 1986, Orozco e col. usaram uma combinação de rifampicina e isoniazida encapsulada em lipossomas de fosfatidilcolina e colesterol para o tratamento da tuberculose por via intravenosa, observando uma melhor eficácia dos fármacos encapsulados quando comparados com sua forma livre. Similarmente, os fármacos amikacina (Cynamon e col., 1989), rifampicina (Saito e Tomioka, 1989) e gentamicina (Nightingale e col., 1993) demonstraram maior eficiência quando encapsulados em lipossomas e administrados também por via intravenosa.

Metha e col. (1993) incorporaram vários agentes potencialmente antimicrobianos (aclacinomicina, clorpromazina, bafilomicina, cerulenina, resorcinomicina, azalomicina, clofazimina, lantiopeptina, kanamicina, sparfloxacina, pirodotriazina, rifampicina, roxitromicina) em lipossomas multilamelares de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). As vesículas preparadas pelo método de hidratação do

filme lipídico seco permitiram obter eficiências de encapsulação variando de 62 até 100%. Quando comparadas as atividades antibacterianas *in vitro* destes compostos em sua forma livre e encapsulada em lipossomas, os resultados mostraram que as atividades foram mantidas depois que os fármacos foram incorporados nas vesículas.

Resultados promissores foram obtidos por Agarwal e col. (1994) para o uso de lipossomas (preparados por hidratação do filme lipídico seco seguido de sonicação) constituídos de fosfatidilcolina de ovo encapsulando o agente rifampicina. A atividade antituberculose dos lipossomas foi aumentada pelo acoplamento de um tetrapeptídeo ativador de macrófagos na superfície das vesículas. A administração intravenosa destes lipossomas (duas vezes por semana) foi mais efetiva na redução do número de bacilos localizados nos pulmões de camundongos infectados que o tratamento contínuo, levando a um aumento da efetividade de pelo menos 2.000 vezes em relação à administração intravenosa do fármaco livre.

Em 1994, Bermudez estudou o uso *in vitro* e *in vivo* de preparações de lipossomas contendo isoniazida e rifampicina na terapia de infecções causadas por micobactérias, confirmando que os sistemas lipossomas-fármacos teriam a vantagem de liberar concentrações mais elevadas dos compostos antimicrobianos nas células infectadas quando comparados com o fármaco na forma livre.

Koga e col. (1994) mostraram que maior eficácia no tratamento da tuberculose em camundongos é obtida pelo uso de estreptomicina e de amikacina encapsulada em vesículas lipídicas que através da administração dos fármacos livres por via intravenosa. Similarmente, lipossomas associados aos glicosídeos asiaticosídeo e corcorusina provaram ter efeito microbicida mais efetivo nas células de *M. tuberculosis* que os glicosídeos em suas formas livres em solução (Medda e col., 1995).

O composto terapêutico ciprofloxacina tem demonstrado bom nível de atividade bactericida *in vitro* para um grande número de patógenos causadores de infecções respiratórias, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis* (Gay e col., 1984; Heifets e Lindholm-Levy, 1987). Wong e col. (1993 e 1995) descreveram formulações de lipossomas para a encapsulação de ciprofloxacina demonstrando que, quando administrados por via

intranasal a camundongos, resultavam em retenções do fármaco nos pulmões significativamente maiores.

Kurunov e col. (1995) testaram a inalação de rifampicina livre e encapsulada em lipossomas para a terapia de tuberculose, observando que maior eficiência foi obtida pela inalação diária dos lipossomas contendo o fármaco. A eficácia de administrações diárias e intermitentes do fármaco antituberculose na forma livre em soluções aquosas e encapsulado em lipossomas foi avaliada na terapia de camundongos tuberculosos do tipo BALB/c. Os melhores efeitos foram obtidos com as inalações diárias de fármaco encapsulado em lipossomas. Apesar do fato de que o regime intermitente para o fármaco encapsulado em lipossomas tenha envolvido uma dosagem menor, sua eficácia não foi inferior à terapia diária com as soluções aquosas do fármaco livre. A alta eficiência dos lipossomas diminuiu as prolongadas persistências de altas concentrações de rifampicina no tecido pulmonar.

Yu-kyoung e col. (1995) pesquisaram formulações dos antibióticos ciprofloxacina e azitromicina encapsulados em lipossomas e testaram suas atividades antibacterianas *in vitro* para o *M. avium Complex*. Ambos os compostos aumentaram a inibição do crescimento intracelular do microrganismo quando encapsulados em lipossomas.

Em 1997, Deol e col. avaliaram a eficiência de isoniazida e rifampicina encapsulada em lipossomas do tipo Stealth (estericamente estabilizados com polietilenoglicol), em termos da eliminação do microrganismo dos órgãos infectados de camundongos, sendo esta mais elevada com os fármacos encapsulados do que com os fármacos livres. A redução do número de colônias de células nos pulmões, fígado e baço foi também significativamente superior com o uso dos fármacos encapsulados em lipossomas e abaixo das concentrações terapêuticas geralmente usadas. A hepatotoxicidade induzida pelos fármacos encapsulados foi menor que a observada para os compostos livres, indicando menor toxicidade.

Deol e Khuller (1997), prepararam lipossomas com maior afinidade pelo tecido pulmonar através da modificação da superfície de lipossomas Stealth pela adição de O-stearilamilopectina (O-SAP). Os lipossomas foram estáveis e seu acúmulo foi maior nos pulmões que no sistema reticuloendotelial de camundongos normais e tuberculosos. *In vivo*, a administração intravenosa destes lipossomas resultou na liberação lenta e controlada de

seus conteúdos encapsulados. Isoniazida e rifampicina encapsulada nos lipossomas apresentaram menor toxicidade aos macrófagos peritoneais em comparação aos fármacos livres.

Raynaud e col. (1999) estudaram os mecanismos de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* ao antibiótico pirazinamida. Com base em experimentos de difusão com vesículas lipídicas, os autores observaram uma rápida difusão do fármaco através das membranas celulares e um grande efeito terapêutico, concluindo que os mecanismos de resistência residem no fato de que o fármaco livre não é suficientemente bem absorvido.

Em 1999, Adams e col. estudaram a eficácia terapêutica da encapsulação de clofazimina em lipossomas. Camundongos infectados com o *Mycobacterium tuberculosis* foram expostos às preparações de vesículas lipídicas encapsulando o fármaco e ao composto livre. O tratamento com a dosagem requerida de fármaco livre foi ineficiente, enquanto o uso de 10 doses de composto encapsulado em lipossomas permitiu atingir respostas significativas na redução do número de células do microrganismo em todos os tecidos analisados (pulmões, fígado e rins), sem apresentar efeitos tóxicos. Os autores consideraram o sistema à base de lipossomas eficiente no tratamento da tuberculose, independentemente do estágio da infecção.

Ajay e Gupta (2000), usaram vesículas lipídicas como transportadores de compostos terapêuticos no tratamento de infecções intracelulares, usando lipossomas modificados estericamente com o ativador de macrófagos Tuftsin. Estes lipossomas modificados não só têm mostrado maior especificidade pelas células do sistema reticuloendotelial, como também sua atividade natural bactericida é maior.

No trabalho desenvolvido por Lima (2001), a associação e liberação de isoniazida e pirazinamida em lipossomas convencionais de DSPC:DMPE:Col (40:20:40 mol%), e estericamente estabilizados, *Stealth*, de DSPC:DMPE:Col:DMPE-PEG (34:20:43:3 mol%) foi avaliada. Os fármacos foram associados às vesículas lipídicas nas formas livres ou complexados em ciclodextrinas (oligossacarídeos cíclicos). As eficiências máximas de encapsulação para a pirazinamida e a isoniazida, para os dois tipos de lipossomas, foram de 14,2% e 10,0%, correspondendo a razões molares finais fármaco/lipídio de 0,019 e 0,013, respectivamente. A presença de PEG aumentou consideravelmente a estabilidade da

bicamada lipídica destas vesículas. A administração *in vitro* das vesículas lipídicas contendo os compostos terapêuticos contra o bacilo da tuberculose, demonstrou que a eficácia terapêutica dos fármacos encapsulados foi comparável à dos compostos nas formas livres.

Em um trabalho desenvolvido por Calheiros (2001), vesículas lipídicas de SPC:Col (60:40 mol%) preparadas pela metodologia de injeção de etanol acoplada a sonicação encapsularam ativamente diferentes agentes tuberculostáticos. As maiores eficiências de encapsulação atingidas foram de 16,0%, 2,7% e 19,3% para os fármacos isoniazida, pirazinamida e estreptomicina, respectivamente. Embora estes valores de eficiências tenham se mostrado razoavelmente baixos, a autora conclui que provavelmente a administração pulmonar destes sistemas melhoraria sua eficácia terapêutica e diminuiria a toxicidade apresentada pelos fármacos na forma não encapsulada.

Labana e col. (2002), avaliaram a encapsulação de isoniazida e rifampicina em vesículas lipídicas do tipo stealth contendo fosfatidilcolina de ovo (EPC), colesterol (Col), dicetilfosfato (DCP) e distearoilfosfatidiletanolamina covalentemente ligada a polietilenoglicol de massa molecular de 2000 Da (DSPE-PEG). A administração intravenosa em camundongos do sistema liposomal contendo os dois fármacos mostrou ter uma eficácia terapêutica superior ao sistema envolvendo os compostos na forma livre. A administração das vesículas encapsulando os quimioterápicos atingiu um pico de concentração plasmática às 24 horas após sua injeção intravenosa e estes compostos foram detectados, nos órgãos dos animais tratados, após sete dias. Em contraste os fármacos administrados livremente apresentaram uma concentração plasmática máxima 15 minutos após a injeção com uma biodisponibilidade de até 48 horas para a isoniazida e de 24 horas para a rifampicina nos pulmões e de 48 horas no fígado.

Dentre os trabalhos de pesquisas mais recentes relacionados à quimioterapia da tuberculose empregando sistemas de liberação controlada, encontra-se o publicado por Chambers e col. (2003). Neste trabalho, os autores testaram um sistema vacinal encapsulado em lipossomas para o tratamento preventivo de tuberculose. O bacilo BCG derivado do *Mycobacterium bovis* foi primeiramente inativado com baixas concentrações de formol e avaliada a sua não viabilidade em camundongos imunodeficientes. Os sistemas

lipossomais NovasomeTM carregados negativamente (Novavax, Inc., MD, USA) permitiram a encapsulação dos bacilos atenuados e sua administração subcutânea em porcos. As vesículas lipídicas contendo a vacina foram rapidamente removidas da circulação sanguínea, localizando-se rapidamente e com muita mais efetividade no fígado, no baço e nos pulmões, que os lipossomas neutros ou positivamente carregados. Os autores concluíram que a administração de células inativadas da bactéria através de um adjuvante como, por exemplo os lipossomas, evidenciava uma adequada proteção terapêutica.

Em 2003, Rodrigues e col. estudaram a localização dos compostos terapêuticos isoniazida e rifampicina em dois tipos de bicamadas lipídicas através de técnicas de espectroscopia de fluorescência e de ressonância magnética nuclear (RMN). Os autores estudaram dois lipídios com diferentes características de hidrofobicidade e carga, a dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e o dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG). As vesículas foram preparadas pela hidratação com tampão HEPES (pH 7,4) dos filmes secos de lipídios seguida de extrusão em membranas de polycarbonato com diâmetro de 100 nm. A encapsulação ativa dos fármacos nos lipossomas foi levada a cabo durante 30 minutos de incubação a 37 °C. O estudo mostrou características físico- químicas diferentes para os tuberculostáticos, sendo que a isoniazida encontra-se neutra no pH fisiológico e a rifampicina é parcialmente ionizada neste pH, apresentando 40% de suas moléculas na forma aniônica. Os coeficientes de partição dos fármacos nos dois tipos de vesículas também foram diferentes. Nos lipossomas de DMPC o coeficiente para a rifampicina foi de 5,09 e para a isoniazida, de 0,84. Nas vesículas de DMPG, os valores foram de 0,54 e 0,59 para os compostos rifampicina e isoniazida, respectivamente. Estes resultados são corroborados pelas análises da RMN, mostrando que a rifampicina apresenta interações mais fortes que a isoniazida com as vesículas de DMPC. Provavelmente este composto penetra nas bicamadas destes lipossomas, enquanto a isoniazida fique apenas adsorvida na superfície das vesículas. Foi comprovado também que estas interações não provocam mudanças significativas na estrutura das membranas lipídicas.

Estes trabalhos e seus resultados fundamentam o desenvolvimento de novas estratégias de rejuvenescimento de fármacos para o tratamento de tuberculose baseadas em sua encapsulação em lipossomas. É importante ressaltar, no entanto, que a literatura é escassa no que se refere aos estudos enfocando a avaliação da eficácia *in vivo* de fármacos

encapsulados em lipossomas e administrados por inalação, no combate a esta doença. Também é relevante mencionar que a maior parte destas pesquisas trata da preparação das vesículas lipídicas em escala laboratorial, não enfocando aspectos de escalonamento de sua produção, fundamentais do ponto de vista de aplicação industrial.

3.7. Aplicações da Técnica de Nebulização na Administração de Lipossomas

Um aumento no índice terapêutico de fármacos pode ser atingido alterando-se substancialmente sua farmacocinética e biodistribuição no organismo. A encapsulação de compostos em vesículas lipídicas possibilitaria o transporte e a deposição específica do fármaco através de várias rotas, incluindo a via pulmonar. A administração por inalação ou nebulização, diretamente aos pulmões, diminuiria os riscos e a ineficiência das terapias convencionais utilizadas para a administração dos fármacos em estudo, além de possibilitar a terapia local e sistêmica e aumentar o conforto do paciente.

A nebulização é um método muito utilizado para administração de fármacos e na fluidificação de secreções respiratórias. Esta metodologia favorece a penetração de soluções aquosas ou de compostos terapêuticos no sistema pulmonar, e este mecanismo de penetração dos compostos é influenciado diretamente pelo tamanho das partículas. Diversas pesquisas têm mostrado também que vesículas depositadas nas vias respiratórias por nebulização são retidas por períodos de tempo maiores (Leung e col. 1996), o que resulta no prolongamento da presença do composto terapêutico no sistema.

Existem diversos tipos de nebulizadores comercialmente disponíveis, e suas características constituem fatores importantes que determinam tanto o tamanho do aerossol, como as características de saída do fluido (McCallion e col., 1996). Estes equipamentos podem ser classificados em dois tipos em relação ao mecanismo de nebulização que utilizam: nebulizadores a jato e nebulizadores ultrassônicos.

Os nebulizadores a jato utilizam gás comprimido para vaporizar o líquido em forma de *spray*. As partículas pequenas abandonam diretamente o nebulizador, enquanto que as partículas de maior tamanho são retidas por defletores e recicladas ao reservatório do

líquido. Por outro lado, nos nebulizadores ultrassônicos, o aerossol é gerado através de vibrações de alta frequência de um cristal piezoelétrico, que produz ondas no fluido, resultando na formação do aerossol.

Apesar de serem relativamente poucos os estudos encontrados sobre a liberação pulmonar de fármacos encapsulados em lipossomas, a grande maioria dos estudos nesta área tem sido feita utilizando nebulizadores a jato. Este tipo de equipamento usa gás comprimido para gerar o aerossol das suspensões ou soluções aquosas e, pode causar danos estruturais em algumas formulações de lipossomas.

Existe uma ampla variedade de nebulizadores a jato, com diferentes tipos de desempenho quanto ao tamanho da gota de aerossol e ao tempo de nebulização, dentre outras variáveis. As características ideais do aerossol dependem de vários fatores, embora exista um consenso a respeito de que são requeridas partículas nebulizadas com um tamanho menor ou igual a 5 μm para a deposição de fármacos nas regiões pulmonares mais profundas (Bridges e Taylor, 2000), embora o alcance de sítios específicos nos pulmões pode requer um controle mais preciso do tamanho da partícula. Outro fator que pode ser muito importante é a velocidade de saída do aerossol. Para sistemas de lipossomas nebulizados deve-se considerar também outras propriedades, por exemplo, o tamanho médio das vesículas que pode intervir na estabilidade do lipossoma e esta, na retenção do material encapsulado.

Geralmente, partículas com diâmetros entre 0,1 e 1 μm podem ser projetadas para transportar compostos terapêuticos até os alvéolos pulmonares enquanto partículas com tamanhos entre 1 e 15 μm são depositadas através de todo o sistema pulmonar. Sistemas particulados com tamanhos maiores (entre 15 e 20 μm) podem geralmente ser retidas na entrada da garganta e então engolidas (Lasic, 1993).

Leung e col. (1996) analisaram a estabilidade de lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina de ovo (EPC) e fosfatidilcolina de ovo/colesterol (EPC/Col) no processo de formação de aerossol, monitorando o tamanho das vesículas. O tamanho das partículas produzidas a partir de vesículas de EPC foi independente da concentração lipídica. Contudo, o aumento na concentração de fosfolípido e colesterol nas vesículas de EPC/Col resultou na diminuição no tamanho do aerossol. O tamanho dos lipossomas remanescentes

no nebulizador teve uma diminuição mais acentuada nas vesículas de EPC, observando-se um aumento na estabilidade dos lipossomas quando foi adicionado colesterol. Foi observada a existência de uma relação direta entre o tamanho das vesículas depositadas e o tamanho do aerossol produzido em cada etapa.

Em 1997 Conley e col. avaliaram o uso de 12 tipos comerciais de nebulizadores para a liberação de ciprofloxacina encapsulada em lipossomas e tomando como base seus melhores resultados, foi usada ciprofloxacina encapsulada em lipossomas na forma de aerossol para o tratamento de camundongos infectados com doses letais de *Francisella tularensis*. Todos os animais tratados com o aerossol de lipossomas encapsulando o fármaco sobreviveram à infecção, mas os camundongos tratados ou não com o composto terapêutico livre, sucumbiram à infecção.

Taylor e McCallion (1997), estudaram os fatores que determinam o tamanho do aerossol e a liberação de materiais terapêuticos por nebulização ultrassônica. Neste trabalho, foi descrito o mecanismo de formação do aerossol, bem como a taxa de liberação do material terapêutico. Os autores verificaram que as características do nebulizador ultrassônico são determinantes no tamanho do aerossol e na taxa de liberação do composto terapêutico. Neste contexto, explicaram que os nebulizadores ultrassônicos produzem partículas e velocidades de saída do fluido maiores que os nebulizadores a jato.

As propriedades físico-químicas das soluções podem afetar significativamente o desempenho da nebulização, sendo a viscosidade particularmente uma das mais importantes, uma vez que um incremento desta pode aumentar o tamanho do aerossol, mas conseqüentemente tende a reduzir a deposição. Desta forma, é muito importante levar sempre em consideração que fluidos com altas viscosidades não podem ser nebulizados de uma forma totalmente eficiente. Também é importante considerar que durante a nebulização a temperatura do fluido no reservatório aumenta, o que poderia resultar na degradação de compostos sensíveis ao calor, incluindo a fusão de lipossomas, embora materiais potencialmente termosensíveis, como proteínas e lipossomas, tenham sido liberados satisfatoriamente por esta metodologia.

Waldrep e col. (1998) comentaram a existência de diversos fatores que determinam a eficácia terapêutica de formulações de aerossol, considerando também

importantes as características e as condições de operação dos nebulizadores, posto que um inadequado uso do equipamento ou dos procedimentos pode afetar o tamanho das partículas (aerossol) e também as doses inaladas. Os autores consideram de importância crítica a formulação do sistema material terapêutico/lipossoma devido a que esta pode influenciar a eficiência de saída do aerossol bem como as suas propriedades aerodinâmicas. Neste contexto, os autores estudaram a eficácia terapêutica de aerossóis a partir da preparação de lipossomas com elevadas doses de compostos terapêuticos imunossupressivos e antiinflamatórios. Os resultados mostraram que um incremento da concentração fármaco/lipossoma reduziu a massa nebulizada, provocou um incremento na viscosidade aparente do material e uma diminuição na tensão superficial. Entretanto, os autores não verificaram nenhuma correlação entre estes parâmetros e a velocidade de saída do composto terapêutico.

Em 1998 Bridges e Taylor estudaram a nebulização de suspensões de lipossomas multilamelares usando nebulizadores a jato e ultrassônicos. Foi observado que o tamanho das partículas de aerossol geradas (medidas por difração de raio laser) era influenciado pela concentração fosfolipídica das preparações, principalmente para os nebulizadores a jato, e pelo tipo de nebulizador utilizado, o que pode ser atribuído às mudanças na viscosidade do fluido. O tamanho do aerossol foi independente do tamanho das vesículas e da composição das bicamadas lipídicas. Os dois tipos de nebulizadores produziram alterações na estrutura dos lipossomas, e particularmente observou-se uma redução do tamanho das vesículas. Lipossomas de fosfatidilcolina de ovo apresentaram rompimento intenso durante sua nebulização, embora a inclusão de colesterol ou de fosfolipídios com elevadas temperaturas de transição de fases, como a dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) nas bicamadas das vesículas lipídicas tenha provocado uma maior resistência às forças de ruptura às quais os lipossomas são expostos durante a nebulização a jato ou ultrassônica.

Finlay e Wong (1998), nebulizaram ciprofloxacina encapsulada em lipossomas (22,2 mg de ciprofloxacina/mL) em 25 nebulizadores de cinco tipos diferentes. Os autores utilizaram um simulador de respiração para inalar o aerossol gerado (com um volume de 0,75 L e uma taxa de inalação de 0.3 L/s) o qual foi caracterizado pelo tamanho das partículas e pela eficiência de retenção do fármaco no aerossol inalado. Os autores observaram diferentes porcentagens de fármaco encapsulado efetivamente depositado nos

pulmões, e estas diferenças estavam relacionadas aos tipos de equipamentos utilizados.

Saari e col. (1999), estudaram a distribuição pulmonar e a liberação de dipropionato de beclometasona incorporado em lipossomas de dilauroilfosfatidilcolina (DLPC) e DPPC. Foi empregado um nebulizador a jato e ambos os aerossóis de lipossomas tiveram tamanhos satisfatórios (diâmetro aerodinâmico médio de 1,3 μm), permitindo conseqüentemente uma adequada deposição pulmonar. Porém, na massa liberada do composto houve uma diferença relativamente grande entre as vesículas de DLPC e as de DPPC, de 11,4 μg e 3,1 μg de fármaco respectivamente. Os autores observaram em ambos os lipossomas a liberação progressiva de composto terapêutico 24 horas depois da inalação, sendo que 79 e 83% do fármaco encapsulado nos lipossomas de DLPC e de DPPC respectivamente permaneceram nos pulmões. Desta forma, houve uma liberação do fármaco ligeiramente mais lenta nos lipossomas inalados de DPPC. Os autores concluíram que ambas as formulações de lipossomas foram satisfatórias para a nebulização, embora nuvens de aerossol tenham sido mais eficientemente obtidas a partir das vesículas lipídicas de DLPC.

Bridges e Taylor (2000), realizaram um estudo para determinar os fatores que influenciaram a nebulização a jato de lipossomas multilamelares de fosfatidilcolina de ovo preparados com e sem colesterol. Os autores utilizaram quatro tipos de nebulizadores e observaram que o tamanho das partículas de aerossol das suspensões foi independente do tamanho médio dos lipossomas e da composição da bicamada lipídica. Embora um incremento na concentração fosfolipídica tenha causado um aumento no tamanho médio do aerossol, este efeito foi também dependente do tipo de nebulizador utilizado. Este incremento na concentração lipídica também provocou uma redução na velocidade de saída das partículas.

De modo geral os trabalhos abordados enfocam diversos aspectos relacionados com a nebulização de compostos associados a vesículas lipídicas. Estes estudos têm demonstrado que a encapsulação de fármacos em lipossomas para administração pulmonar pode produzir uma absorção modulada, resultando em ações localizadas dos fármacos no sistema respiratório, um prolongamento da presença do composto na circulação e uma diminuição dos efeitos sistêmicos dos compostos (Bridges e Taylor, 1998). A literatura

consultada mostra também que não há definição clara sobre o tamanho de vesícula lipídica ótimo para a nebulização, e sim uma faixa relativamente grande (de 0,1 μm a 0,5 μm) para as partículas nebulizadas atingirem eficientemente os alvéolos pulmonares. As pesquisas também demonstram a necessidade de uma grande estabilidade e resistência das vesículas a serem nebulizadas, o que poderia ser obtido aumentando-se a rigidez das bicamadas lipídicas (pela adição de colesterol) ou através do uso de fosfolípidios com altas temperaturas de transição de fases (como o DPPC, a distearoilfosfatidilcolina e a fosfatidilcolina de soja).

Desta forma, o presente trabalho enfocou a obtenção de vesículas lipídicas ou lipossomas por metodologia escalonável como a injeção de etanol, com diâmetros da ordem de 100 nm, preparados a partir de matéria-prima de custo relativamente reduzido como a fosfatidilcolina de soja para a administração por inalação dos agentes tuberculostáticos pirazinamida, isoniazida, rifampicina e kanamicina.

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E METODOLOGIA

4.1. Materiais

Os compostos terapêuticos (com pureza mínima de 99%) estreptomicina, isoniazida (ácido isonicotínico), kanamicina e pirazinamida, o fármaco rifampicina (com pureza mínima de 95%), o agente tamponante HEPES (com pureza mínima de 99,5%), os fosfolipídios empregados (com pureza aproximada de 99%) L- α -fosfatidilcolina de ovo (EPC), L- α -distearoilfosfatidilcolina (DSPC), L- α -dimiriesfosfatidiletanolamina (DMPE), L- α -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e L- α -dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), o lipídio colesterol (Col., com pureza mínima de 99%), o solvente orgânico metanol, os detergentes Triton X-100 reduzido e Triton X-100, o gel cromatográfico Sephadex G-50, a solução de ácido 2,4,6 trinitrobenzenossulfônico (TNBS) a 5% m/v, o ácido clorídrico (HCl), o ácido cítrico e o bicarbonato de sódio (com pureza mínima de 99,5%) foram obtidos da Sigma Chemical Company, EUA. O fármaco liofilizado doxorubicina foi obtido da Pharmacia, Itália. A fosfatidilcolina de soja Epikuron 200SH (SPC, com pureza de 98%) de qualidade farmacêutica foi obtida da Lucas Meyer Co, Alemanha. O solvente orgânico clorofórmio, o peróxido de hidrogênio a 30%, o 1-octanol e o carbonato de sódio foram obtidos da Merck, Alemanha. O ácido sulfúrico (10 N) foi obtido da Química Especializada Erich Ltda, Brasil e o monofosfato de sódio hidratado da Baker Analysed Reagent, EUA. O solvente orgânico etanol (a 99,5° GL) foi obtido da Ecibra, Brasil. O ácido ascórbico, o cloreto de sódio (NaCl), o manitol, a sacarose e o molibdato de amônio foram obtidos da Synth, Brasil. O hidróxido de sódio (NaOH) empregado foi da Vetec Química Ltda, Brasil. Todos os reagentes apresentavam qualidade analítica certificada, com pureza mínima de 99%. A água utilizada foi sempre destilada e purificada em sistema Milli-Q da Millipore, Brasil.

4.2. Metodologia

4.2.1. Obtenção das Isotermas de Langmuir-Blodgett dos Lipídios DSPC, Colesterol e SPC

A tendência das moléculas anfifílicas de se organizar quando dispersas em uma interface ar-água quando em baixas concentrações, é formar um filme monomolecular. O estudo das isotermas de Langmuir-Blodgett dos lipídios e suas misturas (DSPC/Col ou SPC/Col a 60:40 mol%) foi realizado para se obter indícios da forma pela qual tais moléculas se apresentariam na bicamada lipídica dos lipossomas e determinar a área média ocupada por molécula de lipídio para as vesículas compostas por estas duas misturas, quando sob máxima compressão, o que seria equivalente à condição de alto empacotamento molecular.

O equipamento empregado para a obtenção das isotermas foi uma cuba de Langmuir-Blodgett tipo 611 da Nima Technology (Coventry, Inglaterra). Antes da realização dos ensaios foi necessário fazer uma cuidadosa limpeza do equipamento com um papel livre de fibras (Kimberly-Clark) embebido em clorofórmio, a fim de se retirar as impurezas e partículas presentes na superfície do equipamento. A limpeza foi considerada adequada quando os valores obtidos de pressão superficial de água deionizada foram inferiores a 0,5 mN/m.

Inicialmente, os lipídios de interesse foram solubilizados em clorofórmio (a uma concentração de 1 mg/mL). Transferiu-se então, um volume conhecido de aproximadamente 50 μ L da solução lipídica do frasco de armazenamento para a cuba previamente limpa, preenchida com água deionizada. Esta transferência foi realizada com auxílio de uma microseringa de 100 μ L de capacidade. Como o sistema é insolúvel em fase aquosa, formou-se uma fina camada de material na superfície da mesma. Esperou-se aproximadamente dois minutos para que houvesse a evaporação do solvente orgânico.

Um sistema de aquisição de dados acoplado à cuba registrava, durante o fechamento das barreiras móveis da cuba, a pressão superficial em função da área ocupada por molécula, e assim foram obtidas as isotermas.

A velocidade de fechamento das barreiras utilizada em todos os experimentos foi de 100 cm²/min e não houve possibilidade de um controle rigoroso da temperatura da subfase aquosa durante a formação do filme de Langmuir-Blodgett, uma vez que o equipamento não dispunha deste dispositivo. O ambiente foi constantemente refrigerado por um aparelho condicionador de ar, no entanto, a temperatura dos lipídios e das misturas lipídicas não apresentou um valor constante, oscilando em torno de 20 °C. A isoterma de Langmuir foi obtida plotando-se a área ocupada por molécula em função da pressão superficial.

4.2.2. Determinação da Temperatura de Transição de Fases do SPC por Microcalorimetria Diferencial de Varredura

O equipamento utilizado para a determinação da temperatura de transição de fases da SPC foi um microcalorímetro da Microcal Inc., modelo VP-DSC (USA). Como etapa preparativa foi realizada a desgaseificação da amostra e do tampão HEPES 10 mmol/L durante 8 minutos em um banho ultrassônico Branson (modelo 3510). Após a certificação da limpeza da célula, foi injetado um volume de aproximadamente 0,52 mL de tampão, usando uma seringa de vidro de 1 mL de capacidade. Em seguida, foi injetado o mesmo volume da amostra de interesse na célula de análise. A injeção foi realizada lentamente para evitar a formação de bolhas na célula, o que poderia comprometer a linha base do termograma obtido.

Com a realização das medidas de capacidade calorífica das amostras e plotando-se esta capacidade calorífica (kcal/mol °C) em função da temperatura, foi obtido o termograma da fosfatidilcolina de soja.

4.2.3. Determinação dos Coeficientes de Partição do Fármaco Kanamicina

Os coeficientes de partição do fármaco kanamicina em sistemas aquosos/1-octanol foram determinados com base nos protocolos experimentais descritos por Moraes (1996) e Justo (1999). Soluções do composto terapêutico a 0,2 mmol/L foram preparadas em cinco tipos de soluções aquosas: água deionizada, solução de ácido cítrico a 300 mmol/L pH 4,0 e pH 7,4, solução contendo 10 mmol/L de HEPES a pH 7,4 e solução de 10 mmol/L de HEPES e 120 mmol/L de NaCl a pH 7,4.

As soluções preparadas foram aquecidas a 30 °C por 10 minutos em um agitador orbital Lab-Line. Em seguida, uma alíquota de 3 mL de cada uma das soluções aquosas foi misturada em um tubo de ensaio a um volume idêntico de 1-octanol previamente saturado com água deionizada. Após a mistura, os tubos foram tampados e as amostras foram homogeneizadas através de 30 inversões. As amostras foram novamente incubadas a 30 °C por 30 minutos, em repouso. Amostras das fases aquosas foram então coletadas e as concentrações de kanamicina foram determinadas.

A concentração do composto na fase complementar foi estimada como sendo a diferença entre a quantidade originalmente adicionada ao sistema e a quantidade determinada na fase aquosa. Calculou-se o coeficiente de partição (P), como a razão entre as concentrações do fármaco na fase hidrofóbica e a concentração na fase aquosa após a incubação, não se levando em conta o composto terapêutico eventualmente acumulado nas interfaces do sistema. Os ensaios experimentais foram realizados, no mínimo, em duplicata.

4.2.4. Preparação dos Lipossomas

A preparação dos lipossomas foi realizada por dois procedimentos distintos, o método de hidratação do filme lipídico seco (que produz vesículas multilamelares de diversos tamanhos) seguido da homogeneização do tamanho das vesículas por extrusão em membranas de polycarbonato, e o método de injeção de etanol, que produz vesículas lipídicas pequenas e grandes. O objetivo da preparação das vesículas pela primeira

metodologia foi o de se ter uma referência quanto ao processo tradicionalmente empregado, enfocando a comparação dos resultados obtidos pelo método fundamentalmente adotado neste trabalho, de injeção de etanol.

4.2.4.1. Método de Hidratação do Filme Lipídico Seco

Os lipossomas extrudados foram preparados a partir de 60 mol% de fosfatidilcolina de soja e 40 mol% de colesterol (SPC/Col).

Este método consiste na preparação de vesículas multilamelares pelo depósito de uma camada fina de lipídios nas paredes de um frasco de vidro de fundo redondo, formada pela evaporação do solvente orgânico no qual os compostos lipídicos estão dissolvidos. Após a formação do filme é adicionada a fase aquosa em excesso, sob constante agitação, a uma temperatura maior que a temperatura de transição gel/líquido cristalino dos fosfolipídios (T_C), fazendo com que os lipídios se desprendam das paredes do frasco e se agreguem em vesículas lipídicas, enquanto encapsulam parte da solução aquosa, ocorrendo assim a hidratação do filme seco. Esta metodologia está ilustrada na Figura 4.1.

Para a obtenção de 5 mL de suspensão de lipossomas multilamelares com concentrações finais totais de lipídios variando de 6,0 a 7,5 mmol/L, inicialmente pesou-se a massa dos lipídios em balança analítica da Quimis Aparelhos Científicos Ltda., modelo LAC 214, Brasil.

Transferiram-se estes lipídios para um frasco de vidro (Pyrex) de fundo redondo de 50 mL de capacidade, no qual adicionou-se 5 mL de uma solução de clorofórmio/metanol (9:1 v/v), para a solubilização dos mesmos. O frasco foi levado a um evaporador rotatório da Art Lab, modelo Fisatom 802 (Brasil), com rotação de 150 rpm, à temperatura ambiente, por aproximadamente 20 minutos e depois à temperatura de 65 °C (controlada pelo banho ultratermostático Quimis modelo MI014, Brasil) por mais 15 minutos. Desta forma, o solvente foi evaporado, com a formação de um filme seco de lipídios na parede do frasco.

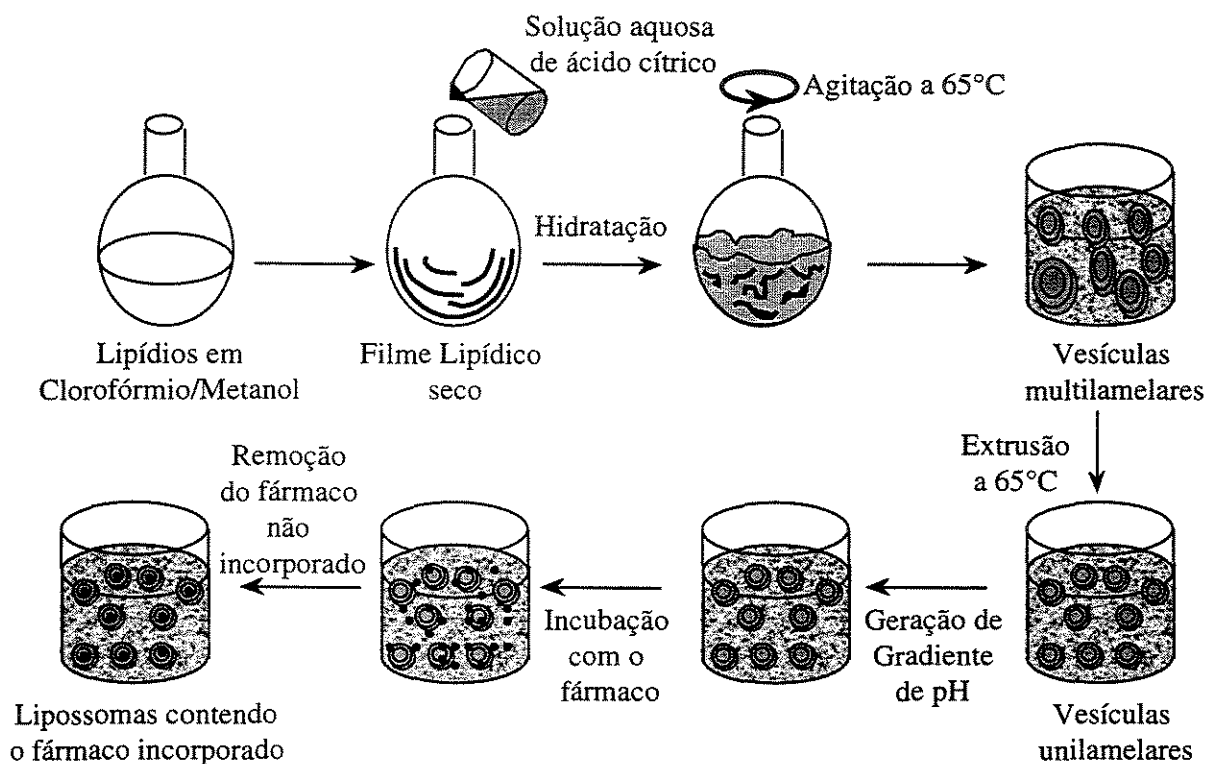


Figura 4.1 - Procedimento para a obtenção de vesículas unilamelares por hidratação do filme lipídico seco em escala de bancada.

Na etapa seguinte, o filme seco obtido foi hidratado com um volume de 5 mL de solução tampão HEPES a 10 mmol/L e pH 7,4 contendo ou não o composto terapêutico solubilizado ou 5 mL de uma solução de ácido cítrico a 300 mmol/L e pH 4,0 para preparar as vesículas que posteriormente seriam usadas na encapsulação ativa dos fármacos. A amostra foi mantida por mais 30 minutos a 65 °C, na mesma rotação de 150 rpm.

Por este procedimento foram obtidas vesículas multilamelares de vários diâmetros, sendo necessário um tratamento posterior para torná-las unilamelares e com uma distribuição homogênea de tamanhos.

As vesículas foram sonicadas, por 10 minutos em banho sonicador Branson modelo 3510 e posteriormente, foram homogeneizadas por extrusão. A etapa de extrusão é baseada na dispersão forçada de vesículas multilamelares em membranas com poros de

tamanho definido, envolvendo o uso de pressões relativamente elevadas e a uma temperatura maior que a de transição gel/líquido cristalino dos lipídios. Para o fosfolípido SPC, a T_C é de 50,4 °C de acordo com a determinação por microcalorimetria (DSC), enquanto o lipídio colesterol não apresenta transição de fases.

A etapa de homogeneização do tamanho das vesículas foi realizada em uma extrusora de aço inoxidável, modelo T. 001 da Lipex Biomembranes Inc. (Canadá). com capacidade de 10 mL de volume e com um sistema de aquecimento de camisa térmica com recirculação de água. Foram utilizados um disco de dreno e duas membranas de polycarbonato sobrepostas para a extrusão. O equipamento foi conectado a um cilindro de nitrogênio, equipado com uma válvula redutora/reguladora de pressão, mantida em níveis entre 2 a 5 Kgf/cm². As amostras foram extrudadas através de 15 passagens pelas membranas, à temperatura de 65 °C, sendo que, para cada nova passagem, a amostra permanecia em repouso na extrusora por no mínimo 3,5 minutos para que se atingisse o equilíbrio térmico (Ribas, 1997). Após o preparo, os lipossomas foram estocados em geladeira a 5 °C.

4.2.4.2. Método de Injeção de Etanol

Este método foi empregado em duas escalas, preparando-se até 10 mL de lipossomas (escala de bancada) e até 800 mL de vesículas lipídicas (escala automatizada). Nos ensaios em escala de bancada, as vesículas foram preparadas pelo método de injeção de etanol a partir de soluções etílicas contendo distintos lipídios na concentração total de 100 mmol/L, conforme mostrado na Tabela 4.1. As concentrações dependeram das solubilidades máximas dos compostos no solvente orgânico. Alíquotas destas soluções foram injetadas rapidamente em um béquer imerso em um banho termostático a 65 °C contendo a solução aquosa em excesso, na proporção volumétrica de 0,5:9,5 (fase etanólica/fase aquosa), conforme descrito a seguir.

Para preparar as vesículas lipídicas que seriam utilizadas na incorporação ativa dos compostos terapêuticos foi empregada uma solução aquosa de ácido cítrico a 300 mmol/L e pH 4,0.

Tabela 4.1 – Composições lipídicas empregadas na preparação dos lipossomas em escala de bancada. Foram utilizadas soluções dos lipídios a 100 mmol/L em etanol.

<i>Composição da solução de lipídios em etanol</i>	<i>Razão molar (%)</i>
SPC/Col	60/40
EPC/Col	60/40
EPC/Col	70/30
DSPC/Col	60/40
DPPC/Col	60/40
DSPC/Col/DMPE	40/40/20
DPPC/Col/DPPG	55/40/5

Nestes estudos em escala de bancada, a injeção foi realizada manualmente usando-se uma seringa de vidro da BD (Brasil) de 3 mL de capacidade, acoplada a uma agulha de aço inoxidável de 10 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno. No momento da injeção, o béquer contendo a solução aquosa estava imerso no banho sonicador modelo 3510 da Branson, a 65 °C (Figura 4.2).

Com a agulha imersa na respectiva solução aquosa, as misturas de lipídios ou de lipídios-rifampicina em etanol foram manualmente injetadas o mais rapidamente possível nas soluções tampões mencionadas para cada caso. A formação das vesículas sempre ocorreu instantaneamente, sendo as amostras em seguida sonicadas durante três minutos. Antes e após a etapa de injeção da solução lipídica, a agulha e a tubulação empregada foram devidamente lavadas através de três passagens consecutivas de álcool etílico a 95%.

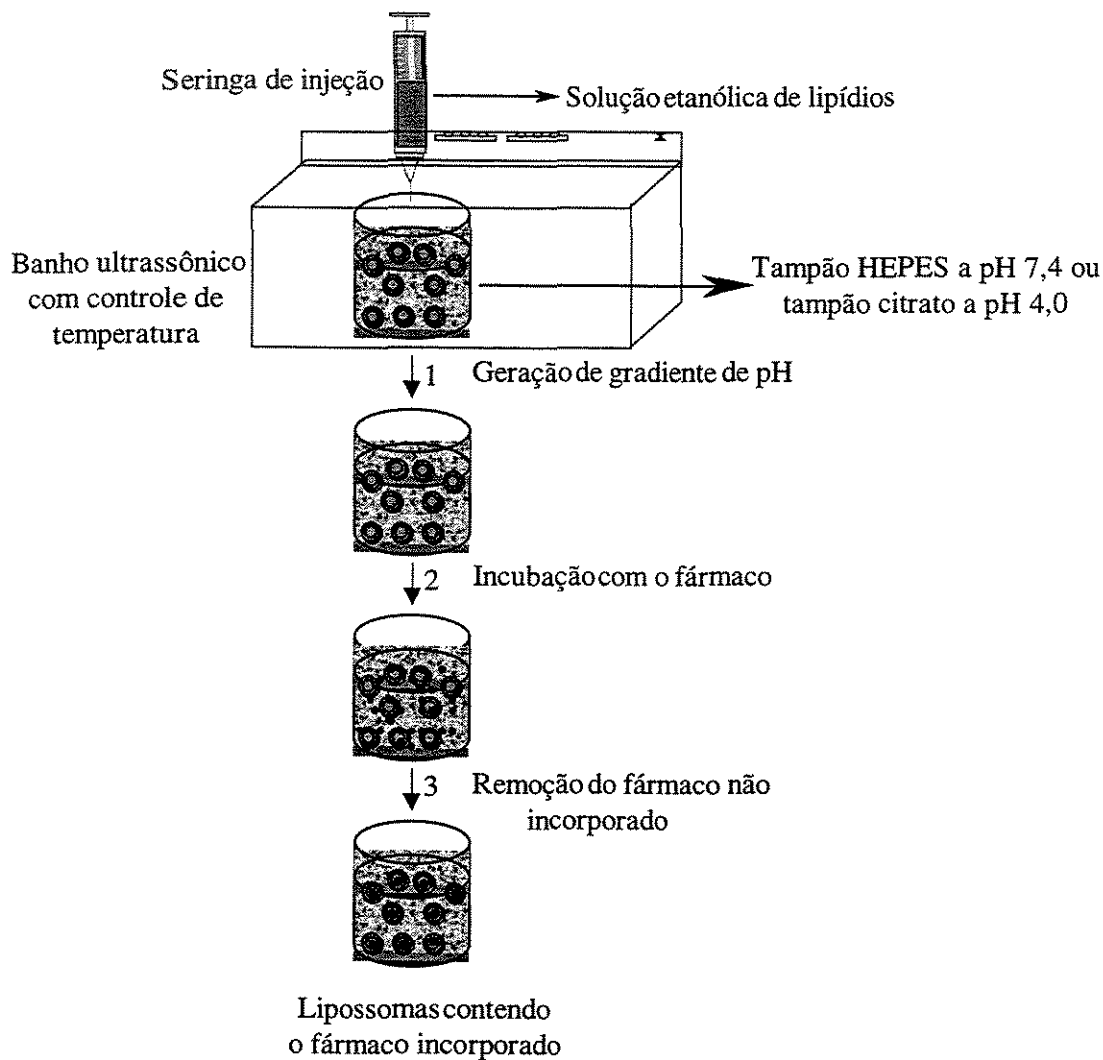


Figura 4.2 - Procedimento para a obtenção de vesículas unilamelares por injeção de etanol em escala de bancada.

Após a obtenção dos lipossomas com composição de DSPC/Col pelo método de injeção de etanol, uma alíquota de 5 mL da suspensão contendo as vesículas foi submetida a um processo de congelamento-descongelamento, com a finalidade de melhorar a distribuição de solutos na amostra e aumentar o volume aquoso interno capturado nas vesículas. O congelamento da amostra foi realizado através de sua imersão durante 1 minuto em nitrogênio líquido, e o descongelamento foi efetuado em banho termostático

Yamato modelo RE52, a 65 °C durante o mesmo período. O processo foi repetido por cinco vezes, segundo procedimento proposto por Mayer e col. (1985).

Nos estudos de ampliação de escala, utilizou-se uma bomba seringa Samtronic modelo ST-670T provida de uma seringa de vidro BD de 50 mL de capacidade e agulha de aço inoxidável de 10 cm de comprimento e diâmetro de 4 ou 7 μm acoplada à tubulação de injeção. Este sistema permitia a injeção da solução orgânica de lipídios na solução aquosa agitada contida em um vaso cilíndrico mantido a uma temperatura constante, a uma altura aproximada de 5 cm com relação à superfície da fase líquida. A agitação do sistema foi efetuada por um agitador mecânico de hélices de alumínio com 6 cm de diâmetro. A Figura 4.3 ilustra o esquema do sistema experimental automatizado, detalhando o elemento de agitação.

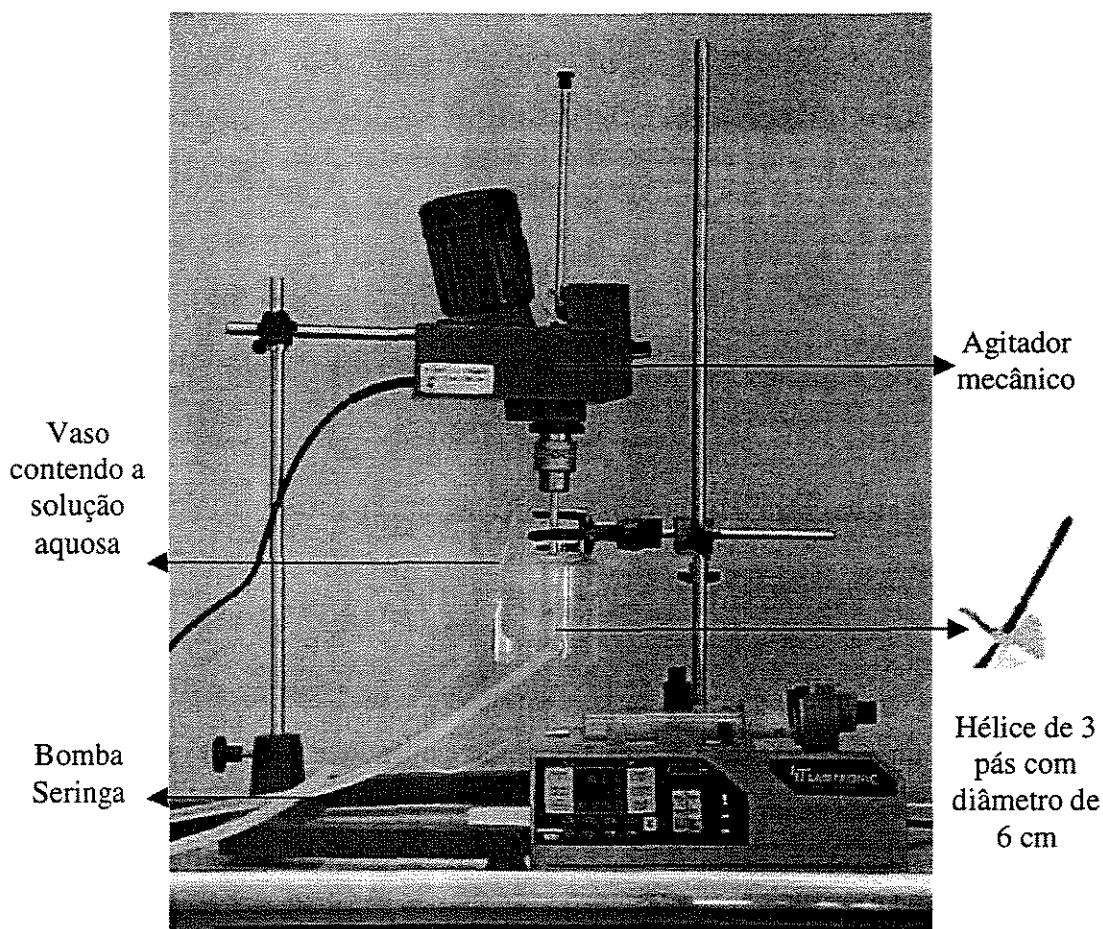


Figura 4.3 – Montagem experimental para a preparação de vesículas lipídicas por injeção de etanol usada nos estudos de ampliação de escala e o elemento de agitação empregado.

Neste sistema foram estudadas variáveis como a concentração inicial de lipídios (50 a 100 mmol/L), a intensidade de agitação da fase aquosa (150 a 650 rpm), a vazão de injeção da solução etanólica de lipídios (60 a 300 mL/h) e a temperatura da fase aquosa (30 a 60 °C).

Em todos os procedimentos de preparação das vesículas lipídicas por injeção de etanol, os volumes de solução lipídica e de fase aquosa foram estabelecidos de tal forma que não se excedeu 5% (em volume) do solvente orgânico na suspensão final de lipossomas.

4.2.5. Encapsulação Ativa dos Compostos Terapêuticos

Anteriormente à etapa de incorporação ativa dos compostos terapêuticos nos lipossomas obtidos por ambos os métodos, estabeleceu-se um gradiente de pH nas vesículas lipídicas para que a encapsulação dos fármacos pudesse ser efetuada. O gradiente de pH entre as regiões interna e externa aos lipossomas foi estabelecido pela titulação até pH 7,4 com solução de Na_2CO_3 das vesículas originalmente suspensas na solução de ácido cítrico a 300 mmol/L e pH 4,0 ou pela passagem por uma coluna de permeação em gel (Sephadex G-50) pré-equilibrada com solução tampão a pH 7,4 contendo 10 mmol/L de HEPES, no caso da encapsulação dos compostos tuberculostáticos, ou contendo 10 mmol/L de HEPES e 120 mmol/L de NaCl, para a incorporação do fármaco doxorrubicina. As mesmas soluções foram empregadas para a eluição das vesículas lipídicas.

Por este procedimento, estabeleceu-se um gradiente de pH da suspensão de lipossomas de aproximadamente 3,4 unidades. A existência deste gradiente foi comprovada segundo procedimento padrão para a encapsulação de doxorrubicina em vesículas lipídicas (Mayer e col., 1990). Estabelecido o gradiente de pH, as vesículas obtidas foram geralmente usadas para a encapsulação dos fármacos dentro de até 72 horas. Esta técnica de incorporação de compostos terapêuticos está representada na Figura 4.4.

Para a incorporação ativa dos compostos terapêuticos, a suspensão de vesículas foi convenientemente diluída e misturada com as soluções contendo o fármaco que se desejava

encapsular solubilizado em tampão HEPES a 10 mmol/L com pH igual a 7,4, nas diferentes proporções molares fármaco/lipídio estudadas.

Como a rifampicina é pouco solúvel no tampão usado, realizou-se uma etapa prévia de recristalização deste fármaco, dissolvendo-se a mesma em clorofórmio/metanol (9:1 v/v) e evaporando-se os solventes em evaporador rotatório à temperatura ambiente, até que um filme seco do fármaco fosse obtido. Ao filme seco do composto adicionou-se solução tampão HEPES e a amostra resultante contendo o composto terapêutico solúvel foi incubada com a suspensão de vesículas nas mesmas condições e proporções molares dos outros fármacos, conforme procedimento por Justo (1999).

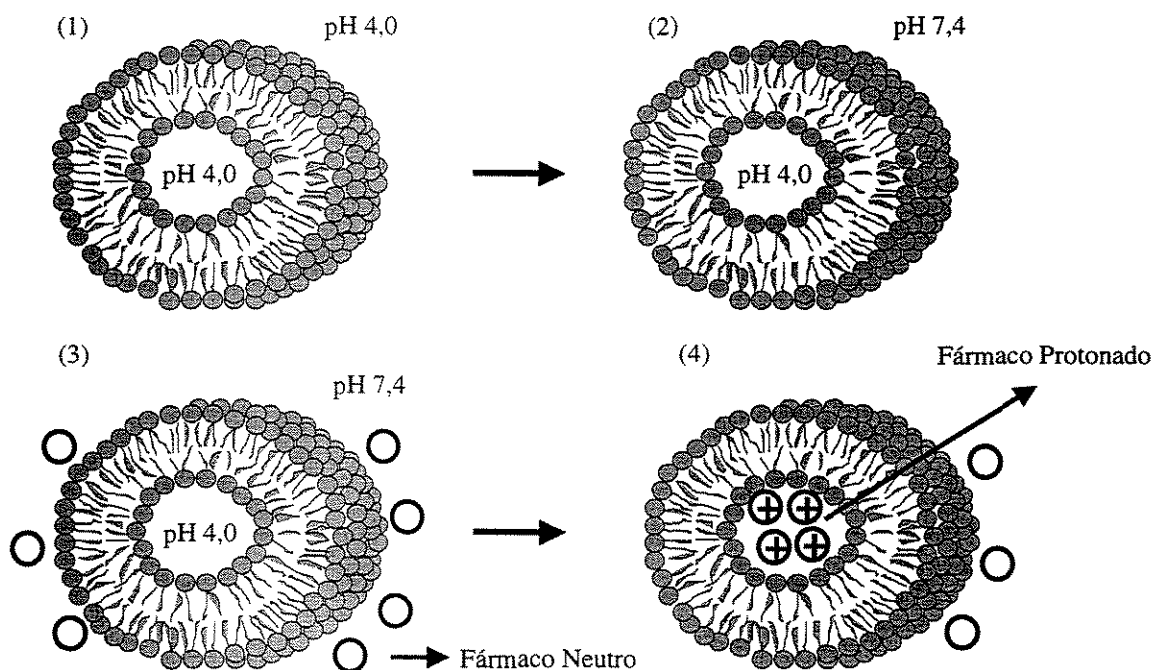


Figura 4.4 – Esquema da técnica de encapsulação ativa de compostos terapêuticos em vesículas lipídicas. (1) Preparação dos lipossomas a pH 4,0; (2) estabelecimento do gradiente de pH; (3) incubação dos lipossomas com o fármaco; (4) incorporação do fármaco.

As misturas de vesículas lipídicas e compostos terapêuticos (10 mL de volume total) foram incubadas em razões molares fármaco/lipídio de 0,03 a 1,82 em frascos Erlenmeyer de 50 mL de capacidade em agitador orbital Lab-line (EUA), a temperaturas variando de 25 a 60 °C, a uma taxa de agitação de 200 rpm por um período de 10 a 60 minutos.

Após a incubação, as amostras de lipossomas foram resfriadas em banho de água à temperatura ambiente e submetidas aos processos de remoção do composto terapêutico não encapsulado.

4.2.6. Encapsulação Passiva dos Compostos Terapêuticos

O composto terapêutico kanamicina foi incorporado passivamente na fase aquosa das vesículas lipídicas através da injeção de uma solução de lipídios (SPC/Col) no solvente etanol (100 mmol/L) em uma solução aquosa de tampão HEPES a 10 mmol/L e pH 7,4 contendo o fármaco.

Foi também preparada uma solução de lipídios (SPC/Col) e rifampicina no solvente orgânico (100 mmol/L:12,15 mmol/L), para o caso específico da encapsulação passiva deste fármaco. Os volumes de solução tampão e da solução lipídica injetada foram calculados para que não fosse ultrapassada a proporção de 5% (em volume) de etanol na suspensão final de lipossomas.

Nestes estudos, a injeção foi realizada manualmente usando-se uma seringa de vidro de 3 mL de capacidade, com uma agulha de aço inoxidável de 10 cm de comprimento e 4 µm de diâmetro. No momento da injeção o recipiente contendo as soluções tampões estava imerso em um banho sonificador modelo 3510 da Branson, a 65 °C. Com a agulha imersa na solução aquosa, as misturas de lipídios em etanol foram manualmente injetadas o mais rapidamente possível na solução tampão, sendo em seguida as amostras sonicadas durante três minutos.

4.2.7. Remoção do Composto Terapêutico não Encapsulado em Lipossomas

Após a encapsulação dos compostos terapêuticos nos lipossomas, efetuou-se a separação do fármaco livre do composto incorporado nas vesículas por três metodologias distintas: diálise, cromatografia de permeação em gel ou ultrafiltração.

As metodologias, descritas a seguir, exploram as diferenças de tamanho dos materiais a se separar (Harris e Angal, 1989).

4.2.7.1. Remoção por Diálise

A diálise é uma técnica de separação aplicável em uma grande variedade de tamanhos de moléculas, usada para remover o excesso de solutos indesejáveis de baixas massas moleculares, simultaneamente introduzindo um novo tampão na solução, não sendo aplicável para a remoção de moléculas maiores que 15 a 20 kDa. A separação por diálise é bastante simples e requer poucos equipamentos, sendo adequada para o uso em escala de laboratório. Como desvantagens, a técnica envolve a necessidade de várias trocas de tampão e o uso de grandes volumes deste, além da relativa falta de rapidez inerente ao processo (Scopes, 1994).

Nestes ensaios foram utilizadas membranas de diálise (do tipo envelope) Inlab (Brasil), produzidas a partir de celulose regenerada, com massa molecular de corte de 12 a 16 kDa, porosidade de 25 Å e dimensões de 2,5 x 15 cm.

Inicialmente, as membranas de diálise, foram hidratadas em água fervente durante 30 minutos. Após o término da hidratação, as membranas tiveram uma de suas extremidades fechadas. Uma alíquota de 2,5 mL de amostra foi colocada na membrana, e fechando-se o outro extremo do envelope, que foi então submerso em 100 mL de solução tampão a pH 7,4. Foram feitas quatro trocas da solução tampão HEPES (total de 400 mL) no intervalo total de cerca de 40 horas, sendo que o sistema de separação sempre foi mantido em geladeira a 5 °C. Ao final do processo de remoção do composto terapêutico

não encapsulado, as amostras foram coletadas e analisadas para a determinação das concentrações finais de lipídios e de material terapêutico encapsulado nas vesículas.

4.2.7.2. Remoção por Cromatografia de Permeação em Gel

Nos ensaios feitos por cromatografia de permeação em gel, utilizou-se uma coluna cromatográfica obtida da Sigma Chemical Co. (EUA) empacotada com gel de Sephadex G-50. A coluna apresentava volume de leito de 50 mL e diâmetro de 2,5 cm enquanto a faixa de massa molecular de exclusão do gel era de 1,5 a 30 kDa.

A coluna foi primeiramente pré-equilibrada pela passagem de 30 mL de tampão HEPES a 10 mmol/L e pH 7,4. Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de amostra, após o que se adicionou 32 mL do mesmo tampão para a eluição do material a se separar. Durante a separação a coluna cromatográfica foi conectada a um coletor de frações modelo Bio-Rad 2110 (EUA), no qual se coletaram alíquotas de 40 a 50 gotas (aproximadamente 1,5 mL por fração) que foram posteriormente analisadas para a determinação da concentração de lipídios e de composto terapêutico incorporado.

4.2.7.3. Remoção por Ultrafiltração

Os ensaios foram realizados utilizando-se uma célula de ultrafiltração Amicon modelo 50, com membrana de polietileno do tipo XM 50 e diâmetro de corte de 50 kDa.

Em todos os ensaios, 10 mL de amostra foram inicialmente misturados com 50 mL de tampão HEPES 10 mmol/L a pH 7,4, e a ultrafiltração foi efetuada sob agitação magnética constante, a uma pressão de aproximadamente 2,5 Kgf/cm² de nitrogênio, promovendo-se a separação do material terapêutico não encapsulado nas vesículas.

Para cada amostra tratada foram realizadas quatro etapas de ultrafiltração sob as mesmas condições anteriormente mencionadas. Ao final do processo, as amostras retidas pela membrana foram coletadas e analisadas.

4.2.8. Liofilização dos Lipossomas

As vesículas lipídicas foram liofilizadas usando o equipamento Freeze Dry System da Labconco, modelo Freezone 4.5.

Inicialmente os lipossomas suspensos em tampão de ácido cítrico a 300 mmol/L e pH 4, foram diluídos (1:1) com uma solução aquosa do crioprotetor manitol ou sacarose a uma concentração de 15%, sendo o volume final de amostra (8 mL) colocado em um tubo de vidro de 40 mL de capacidade, com parede espessa. Todas as amostras foram previamente congeladas em nitrogênio líquido através de aproximadamente 5 imersões durante 10 segundos, e acopladas então ao equipamento. O liofilizador empregado permitiu um controle automático da temperatura do sistema a aproximadamente $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando era então automaticamente acionado o vácuo a uma pressão de 133.10^{-3} mBAR.

4.2.9. Caracterização dos Lipossomas

Após a remoção do composto terapêutico não incorporado nas vesículas, as amostras foram caracterizadas quanto às concentrações finais de lipídios, às concentrações finais de fármaco encapsulado, ao diâmetro médio das vesículas, à estabilidade de estocagem na forma suspensão aquosa durante quatro semanas em geladeira a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e à estabilidade após liofilização.

4.2.9.1. Determinação da Concentração de Lipídios

A determinação da concentração lipídica foi realizada pela análise quantitativa de íons fosfato em solução.

Os fosfolipídios utilizados na preparação dos lipossomas possuem apenas um átomo de fósforo por molécula, permitindo a determinação do teor de fosfolipídios pela quantidade de fosfato. O ensaio baseia-se no método de Chen e col. (1956), no qual

primeiramente ocorre a oxidação com ácido sulfúrico das cadeias de ácido graxo a carbono elementar, que é transformado em dióxido de carbono (CO_2) por peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O fósforo é transformado em ortofosfato, que forma um complexo com o molibdato de amônio. Quando este complexo é reduzido pelo ácido ascórbico, há o aparecimento da cor azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato na amostra.

O mesmo procedimento foi também realizado para as soluções de padrões orgânicos e inorgânicos, com concentrações conhecidas de fosfolipídios e de fosfato respectivamente, e para uma solução isenta de fosfato (branco). Os compostos distearoilfosfatidilcolina, monofosfato de sódio hidratado e o tampão HEPES (10 mmol/L) a pH 7,4 foram, respectivamente usados como padrão orgânico, padrão inorgânico e branco.

Os experimentos foram conduzidos da seguinte forma: pipetou-se 100 μL de solução em cada tubo (amostras, padrões e branco) conjuntamente com 500 μL de solução de ácido sulfúrico a 10 N. Adicionou-se duas esferas de vidro em cada tubo para melhorar a distribuição de calor durante o aquecimento. Os tubos foram colocados em suporte metálico e aquecidos em placa térmica pré-aquecida a 200 °C por 30 minutos. Os tubos foram retirados do aquecimento e após atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 165 μL de H_2O_2 isenta de fosfato em cada um dos tubos. Em seguida, as amostras foram aquecidas novamente a 200 °C por mais 30 minutos. A placa de aquecimento foi posicionada no interior de uma capela, pois nesta etapa há a formação de dióxido de carbono, que deve ser retirado pelo exaustor. Após o segundo aquecimento, os tubos foram retirados da placa aquecedora e, ao atingirem a temperatura ambiente, adicionou-se 4 mL de água deionizada. Em seguida, 500 μL de solução molibdato de amônio tetraidratado a 2,5% (m/v) e 500 μL de solução de ácido ascórbico a 10% (m/v) diluídos em água deionizada foram adicionados. Os tubos foram aquecidos em água fervente por 7 minutos e em seguida foram resfriados. Determinou-se a absorbância de todas as amostras a 830 nm.

A partir dos padrões utilizados foi obtida uma curva de calibração para a determinação da concentração de fosfolipídios da amostra. Por este procedimento, determina-se somente a concentração correspondente aos fosfolipídios, que representa na

maior parte dos casos, 60% da concentração total de lipídios na amostra. Para se levar em conta a presença do colesterol, dividiu-se os valores obtidos por 0,6 ou 0,7, dependendo da proporção de colesterol na amostra.

4.2.9.2. Determinação da Concentração de Composto Terapêutico Encapsulado

Após a remoção do composto não encapsulado analisou-se a concentração do fármaco remanescente nas amostras. A determinação foi feita pela avaliação da absorbância após o rompimento das vesículas com etanol, com metanol ou com Triton X-100 reduzido ou não.

No método por adição de etanol, a um volume de 150 μ L dos lipossomas encapsulando o fármaco foi adicionado 1350 μ L do solvente. Após uma hora, foram determinadas as absorbâncias das amostras de lipossomas livres, dos fármacos livres e dos lipossomas encapsulando o composto terapêutico no comprimento de onda selecionado para cada composto: para os fármacos isoniazida e pirazinamida, 260 nm e para o composto rifampicina, 340 nm. Cada determinação foi feita pelo menos em duplicada.

No método por adição de metanol, um volume de 2 mL do solvente foi adicionado a um volume de 0,5 mL da amostra de vesículas encapsulando os compostos terapêuticos. Foram determinadas as absorbâncias das amostras de lipossomas vazios, fármaco livre e lipossomas encapsulando os compostos nos mesmos comprimentos de ondas usados no método por adição de etanol.

No caso do rompimento dos lipossomas com Triton X-100 reduzido, a metodologia baseou-se na técnica descrita por Mayer e col. (1990) para a determinação da concentração total de doxorrubicina em lipossomas. Preparou-se uma solução aquosa de Triton X-100 a 20% (m/v), e a 1,2 mL de amostra foram adicionados 12 μ L da solução de detergente. As soluções foram incubadas por um período de até 30 minutos e em seguida foi lida a absorbância nos comprimentos de ondas usados para os lipossomas e para cada composto descrito nos métodos anteriores.

Para a determinação da concentração do composto terapêutico kanamicina, um volume de 0,3 mL de amostra adicionou-se o mesmo volume de uma solução aquosa de Triton X-100 a 100 mmol/L. As amostras foram então incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, para se assegurar o rompimento das vesículas lipídicas. Em seguida, a determinação da concentração de kanamicina nas amostras foi realizada por reação com o ácido 2,4,6 tri-nitro benzeno-sulfônico (TNBS), conforme descrito a seguir.

A determinação se baseia na reação das aminas primárias presentes na kanamicina em pH alcalino com o TNBS, sendo baseada no procedimento descrito por New (1990) no qual o produto final da reação apresenta coloração amarela intensa, possibilitando seu monitoramento espectrofotométrico.

A metodologia da reação com TNBS envolve cinco etapas na qual, primeiramente são preparados os padrões deste composto usados nas curvas de calibração. Em uma segunda etapa, a cada amostra adicionou-se 0,2 mL de uma solução de NaHCO_3 , a pH 8,5 para se elevar o pH da solução. Após esta etapa, adicionou-se a todas as amostras 20 μL de solução aquosa de TNBS a 15 mg/mL. Depois de vigorosa agitação, as amostras foram incubadas no escuro por mais 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 0,4 mL de HCl a 1,5 N. As medidas de absorbância das amostras e dos padrões foram realizadas contra água a 410 nm dentro de um período de até uma hora.

A determinação da concentração de doxorubicina encapsulada foi baseada na técnica descrita por Mayer e col. (1990) que permite determinar, por diferença, a concentração de doxorubicina incorporada em sistemas lipossomais através da quantificação da concentração do fármaco não encapsulado. A doxorubicina apresenta alteração pronunciada do máximo de absorbância quando se aumenta, por adição de NaOH, o pH da solução de suspensão dos lipossomas, de 7,4 para 10,5, o que pode observado visualmente pela alteração de cor da solução de vermelho-alaranjado para azul.

Primeiramente diluiu-se as amostras de lipossomas contendo o composto doxorubicina com a solução tampão para se alcançar concentrações do fármaco variando de 0,02 a 0,10 mmol/L. Em seguida, adicionou-se 12 μL de uma solução aquosa do tensoativo Triton X-100 a 20% (m/v) a 1,2 mL da amostra, para romper as vesículas.

Aguardou-se 15 minutos para que as membranas lipídicas dos lipossomas se desestabilizassem e a doxorrubicina fosse liberada das vesículas. Avaliou-se a absorbância da solução a 480 nm contra a solução tampão HEPES contendo a mesma quantidade de detergente que a amostra, e descontou-se o valor de absorbância devido à presença das vesículas por si só (determinado utilizando-se a mesma concentração de vesículas, sem fármaco, e de Triton X-100). A concentração total de doxorrubicina na amostra foi calculada a partir de uma curva de calibração previamente obtida.

Para a determinação da concentração de doxorrubicina externa aos lipossomas, tomaram-se duas alíquotas de 1,2 mL cada de amostra de lipossomas contendo de 0,02 a 0,1 mmol/L em fármaco (alíquotas A e B). Na alíquota A adicionou-se 24 µL de água deionizada e ajustou-se a absorbância a 600 nm para zero (com esta etapa, elimina-se a interferência causada pelo espalhamento de luz devido à presença das vesículas). Na alíquota B, adicionou-se 24 µL de solução aquosa de NaOH a 1 M. Mediu-se a absorbância da alíquota B a 600 nm, dentro de dois minutos (a absorbância da doxorrubicina em valores de pH elevados não é estável, e a solução transforma-se rapidamente de azulada para incolor). A concentração externa do fármaco na amostra foi calculada a partir de uma curva de calibração previamente estabelecida e, de posse deste valor e do valor para a concentração total de doxorrubicina nas amostras, determinou-se por diferença a concentração de composto terapêutico encapsulado.

Em todos os ensaios, preparou-se curvas de calibração para o fármaco livre e para os lipossomas não encapsulando o composto, para se avaliar o efeito da presença isolada dos lipídios na absorbância.

Dispondo dos dados de concentração de lipídios e de compostos terapêuticos encapsulados de cada amostra, efetuou-se o cálculo das eficiências de encapsulação, determinadas como a relação percentual entre a razão molar fármaco/lipídio final (após a remoção do fármaco) e a inicial (antes da remoção do fármaco), de acordo com a equação 4.1:

$$E = 100 * \left(\frac{(\text{moles Fármaco/moles Lipídio})_{\text{final}}}{(\text{moles Fármaco/moles Lipídio})_{\text{inicial}}} \right) \quad (4.1)$$

4.2.9.3. Determinação do Diâmetro Médio e da Distribuição de Tamanhos das Vesículas Lipídicas

A distribuição de tamanhos e o diâmetro médio das vesículas foram determinados por espectroscopia de espalhamento de luz de comprimento de onda determinado (633 nm) obtida por incidência de raios laser (“quasi-elastic light scattering”, QLS). Por este método são realizadas medidas das flutuações da intensidade do espalhamento de luz com o tempo para a determinação do coeficiente de difusão da partícula em solução diluída (Ford, 1985), inversamente proporcional ao diâmetro da partícula.

4.2.9.4. Determinação da Lamelaridade das Vesículas Lipídicas

A lamelaridade das vesículas lipídicas preparadas pelo método de injeção de etanol em escala ampliada foi estimada pela medida da proporção de fosfolipídios que se encontram expostos na superfície dos lipossomas. Para vesículas unilamelares, grandes esta proporção deve ser de 50% e para as vesículas unilamelares pequenas, deverá ser maior que este valor, uma vez que a distribuição de lipídios é assimétrica (New, 1990). Para lipossomas multilamelares, este valor deve ser menor que 50%.

A proporção de lipídios na superfície das vesículas lipídicas pode ser determinada por métodos químicos ou por medidas de espectroscopia direta envolvendo ressonância magnética nuclear. No primeiro caso, uma pequena quantidade de fosfatidiletanolamina (PE) é incorporada nos lipossomas vazios durante sua preparação, a qual é então detectada nas vesículas intactas por reação com o ácido 2,4,6 - trinitrobenzenossulfônico (TNBS), sendo somente quantificadas as moléculas de PE expostas externamente. Paralelamente, alíquotas da mesma amostra de vesículas lipídicas são desestabilizadas com Triton X-100 antes da reação com o TNBS, e todas as moléculas de PE presentes são então detectadas. As etapas envolvidas nesta determinação proposta por New (1990) são descritas a continuação.

Primeiramente, preparou-se os padrões (A) da fosfatidiletanolamina incorporada nas vesículas lipídicas em concentrações variando de 0,07 a 0,20 mmol/L em aminas. Estes padrões foram empregados para preparar as curvas de calibração. Em uma segunda etapa, aos padrões (0,6 mL) e às amostras para determinar as aminas externas (B) foram adicionados 0,2 mL de uma solução de NaHCO_3 , a pH 8,5 para se elevar o pH da solução. Nas amostras (C), com as vesículas lipídicas para determinar as aminas totais (0,6 mL), foram adicionados 20 μL de Triton X-100 a 1,6% em tampão bicarbonato a pH 8,5. Após esta etapa, adicionou-se 20 μL de solução aquosa de TNBS a 15 mg/mL a todas as amostras. As amostras foram então incubadas no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente depois de uma vigorosa agitação. A reação nas amostras A e B foi interrompida pela adição de 0,4 mL de Triton X-100 a 1,2% em HCl a 1,5 M seguida de agitação e nas amostras C, pela adição de 0,4 mL de Triton X-100 a 0,4% em HCL a 1,5 M seguida também de uma vigorosa agitação. As medidas de absorbância das amostras e dos padrões foram realizadas contra água deionizada em um comprimento de onda de 410 nm dentro de um período de até uma hora.

4.2.9.5. Estabilidade de Estocagem em Suspensão Aquosa dos Lipossomas

A avaliação da estabilidade de estocagem das vesículas lipídicas preparadas contendo os compostos terapêuticos encapsulados foi realizada em um período de até dois meses após a preparação dos lipossomas, monitorando-se as alterações no diâmetro médio das vesículas, na distribuição de tamanhos e na liberação do fármaco inicialmente incorporado, que indicariam possíveis mudanças estruturais nas suspensões. Geralmente quando ocorrem mudanças nas estruturas das vesículas lipídicas estas aparecem nas primeiras semanas após sua preparação. O estudo da estabilidade de estocagem das vesículas lipídicas foi avaliada a uma temperatura de 5 °C e para cada uma das amostras analisadas empregou-se como controle as vesículas vazias correspondentes obtidas no mesmo ensaio.

4.2.9.6. Estabilidade dos Lipossomas após Liofilização

Após o período de 24 horas de liofilização das vesículas na presença do crioprotetor manitol, as amostras em pó foram reconstituídas com 4,0 mL de água deionizada por agitação manual durante 2 minutos à temperatura ambiente.

Os diâmetros médios e as distribuições de tamanhos destas vesículas lipídicas após sua ressuspensão foram determinados. Nestas vesículas rehidratadas, também foi realizada a encapsulação ativa do fármaco doxorrubicina a uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 1,0 durante 10 minutos a 60 °C e a uma taxa de agitação de 200 rpm.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados e analisados os resultados obtidos referentes à: caracterização dos lipídios e das misturas lipídicas utilizadas na preparação das vesículas, caracterização da kanamicina, preparação e caracterização dos lipossomas preparados pela metodologia de injeção de etanol em escala de bancada e em escala ampliada, encapsulando os fármacos por incorporação passiva e ativa nas condições estudadas, a liofilização das suspensões aquosas das vesículas lipídicas e a estabilidade de estocagem das formulações obtidas.

Uma melhor visualização das etapas e dos ensaios realizados pode ser observada no diagrama mostrado na Figura 5.1.

A composição lipídica tida como alvo envolvia majoritariamente fosfatidilcolina de soja, um composto natural e biocompatível cujo custo pode ser até 1000 vezes menor que o dos fosfolipídios sintéticos comumente empregados na produção de lipossomas. Entretanto, a título de comparação no trabalho, fosfolipídios sintéticos foram também usados na preparação das vesículas lipídicas.

O tampão HEPES foi selecionado para a solubilização dos compostos terapêuticos com base nas características de solubilidade dos fármacos neste tampão, além de permitir a maior aproximação às condições fisiológicas, principalmente devido ao pH de 7,4 e à sua biocompatibilidade, apesar de seu custo ser razoavelmente elevado. O tampão fosfato poderia ser utilizado com sucesso para a mesma finalidade, entretanto, não foi empregado neste trabalho por interferir na metodologia de determinação da concentração lipídica das vesículas.

Os experimentos em escala de bancada visaram verificar a factibilidade da incorporação em lipossomas dos compostos estudados, enquanto os ensaios em maior escala destinaram-se ao estudo do efeito de diversas variáveis operacionais na encapsulação dos referidos fármacos.

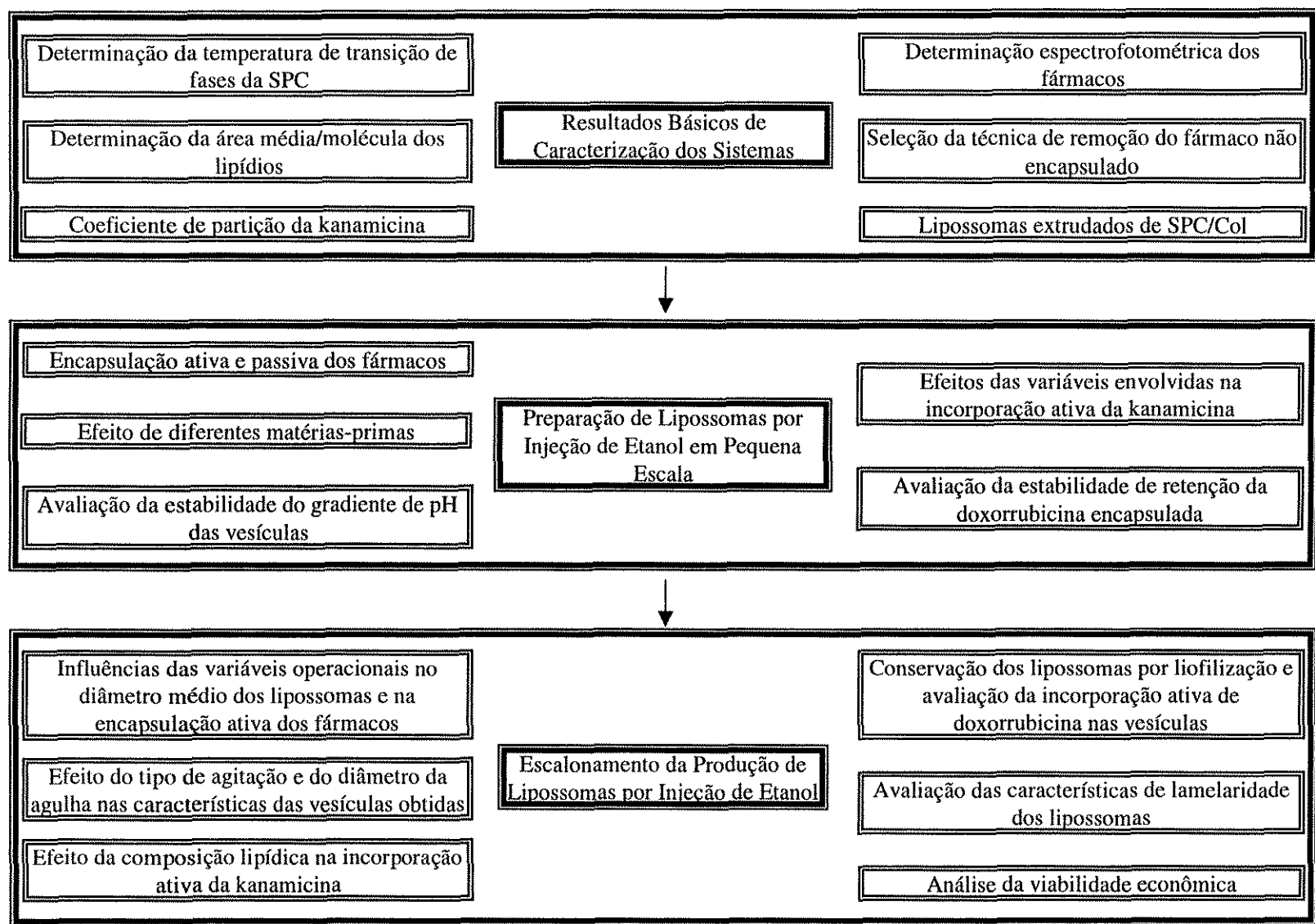


Figura 5.1 – Diagrama com as etapas e os ensaios realizados durante o trabalho de pesquisa.

5.1. Resultados Básicos da Caracterização dos Sistemas em Estudo

5.1.1. Comportamento dos Lipídios Puros e das Misturas Lipídicas em Interfaces Ar-Água

Foram determinadas as isotermas de pressão em função da área molecular (isotermas de Langmuir-Blodgett) para os fosfolipídios DSPC e SPC, para o lipídio Col e para as misturas DSPC/Col e SPC/Col (60/40 mol%), através das quais determinou-se para cada ensaio a área ocupada correspondente para cada molécula de lipídio analisada. As isotermas obtidas estão mostradas nas Figuras 5.2 e 5.3. Destaca-se que os lipídios avaliados apresentavam pureza mínima de 99%, para a DSPC e o Col e de 98% para a SPC.

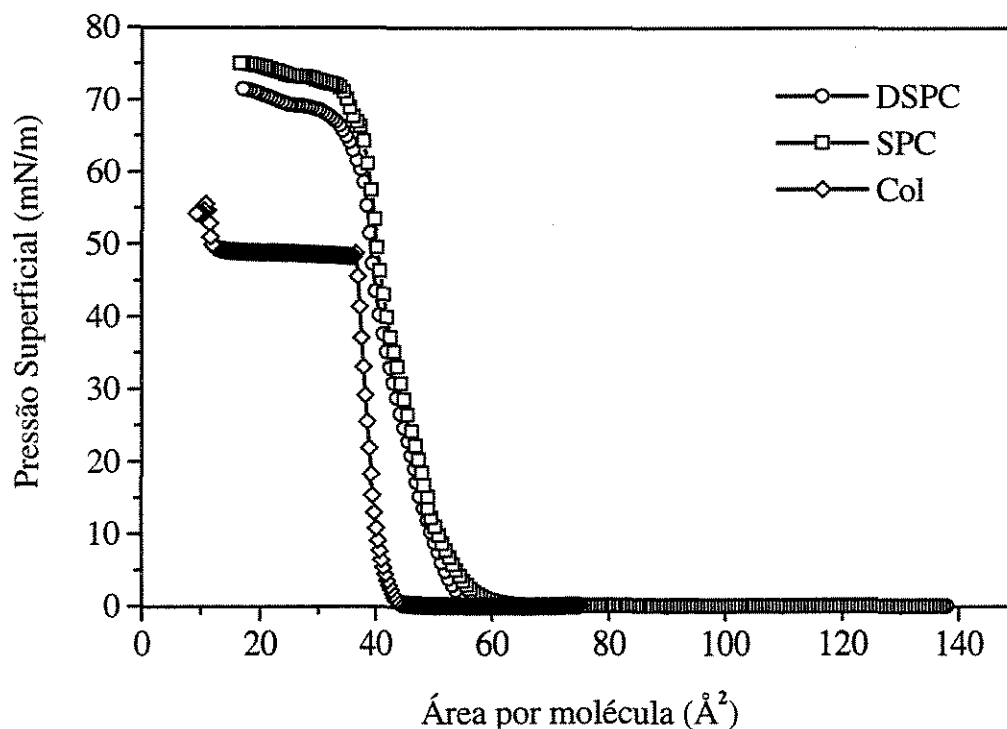


Figura 5.2 - Isotermas de Langmuir para os fosfolipídios DSPC e SPC e para o lipídio colesterol.

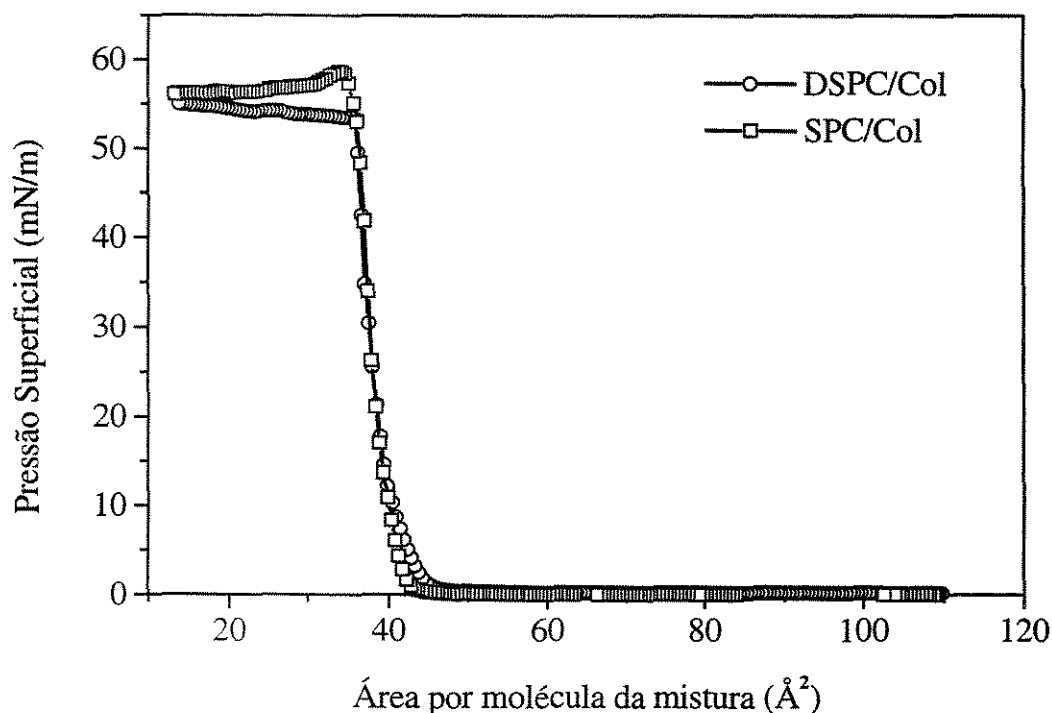


Figura 5.3 - Isotermas de Langmuir-Blodgett para as misturas de DSPC/Col e SPC/Col (60/40 mol%).

Observa-se nas referidas figuras que a uma temperatura de aproximadamente 20 °C as monocamadas formadas pelas moléculas de DSPC, Col, SPC e as monocamadas das moléculas de misturas de DSPC/Col e SPC/Col apresentaram valores aproximados de área ocupada por molécula de 40 Å² para o DSPC, 38 Å² para o Col, 38 Å² para a mistura DSPC/Col, 46 Å² para a SPC e 38 Å² para a mistura SPC/Col. Israelachvili e Mitchell (1975) reportaram valores de área ocupada por moléculas de Col em monocamadas puras de 38 Å² e de 71 Å² para a fosfatidilcolina de ovo. O valor da área da molécula da lecitina é maior que o obtido em nosso trabalho, embora a temperatura em que foi determinado este valor não tenha sido detalhada e esta variável seja muito importante neste tipo de determinação. Os autores observaram que em filmes de misturas lipídicas e colesterol a área molecular média observada experimentalmente é menor que a teórica ponderada, provavelmente pelo efeito de condensação do colesterol.

Embora se tenha observado pequenas alterações na temperatura ambiente durante a coleta dos dados, os resultados obtidos mostram que o fosfolípido natural SPC apresenta um comportamento muito próximo ao obtido para o fosfolípido sintético DSPC, embora na composição da SPC comercial mais de 90% seja DPPC. Estas variações na temperatura podem também ter influenciado os valores das áreas moleculares dos compostos, uma vez que há indicações na literatura de grande dependência entre estas variáveis (Roberts, 1990). Estes resultados mostram que resultados obtidos em um sistema contendo o fosfolípido sintético DSPC podem ser muito úteis como referência para o estudo do sistema contendo lecitina natural de soja.

5.1.2. Determinação da Temperatura de Transição de Fases da SPC por Microcalorimetria Diferencial de Varredura

O estudo da transição reversível entre os estados gel e líquido-cristalino dos fosfolípidos é muito importante quando de seu uso na preparação de lipossomas para aplicações farmacológicas. Normalmente esta transição é induzida pela temperatura, podendo também ser provocada por variações na pressão a temperatura constante e por mudanças no pH da solução aquosa para bicamadas formadas por fosfolípidos carregados negativamente (Braun e col., 1992).

A temperatura de transição dos fosfolípidos depende da natureza da cabeça polar, do comprimento e do grau de insaturações das cadeias apolares. Geralmente, as propriedades físicas das bicamadas lipídicas dependem da fase em que estão. A permeabilidade das bicamadas líquido-cristalinas é muito maior que a de bicamadas na fase gel, na qual a organização molecular e a rigidez são maiores que na fase líquido-cristalina.

A temperatura de transição de fases gel/líquido cristalino pode ser avaliada, em termos de equilíbrio termodinâmico, por experimentos de microcalorimetria. Pela técnica cuja metodologia foi descrita anteriormente, foi determinada a temperatura de transição de fases gel/líquido-cristalino do fosfolípido SPC em tampão HEPES 10 mmol/L. O termograma obtido, ilustrado na Figura 5.4, mostra o valor desta temperatura, T_c , igual a 50,4 °C, calculado pelo *software* do equipamento.

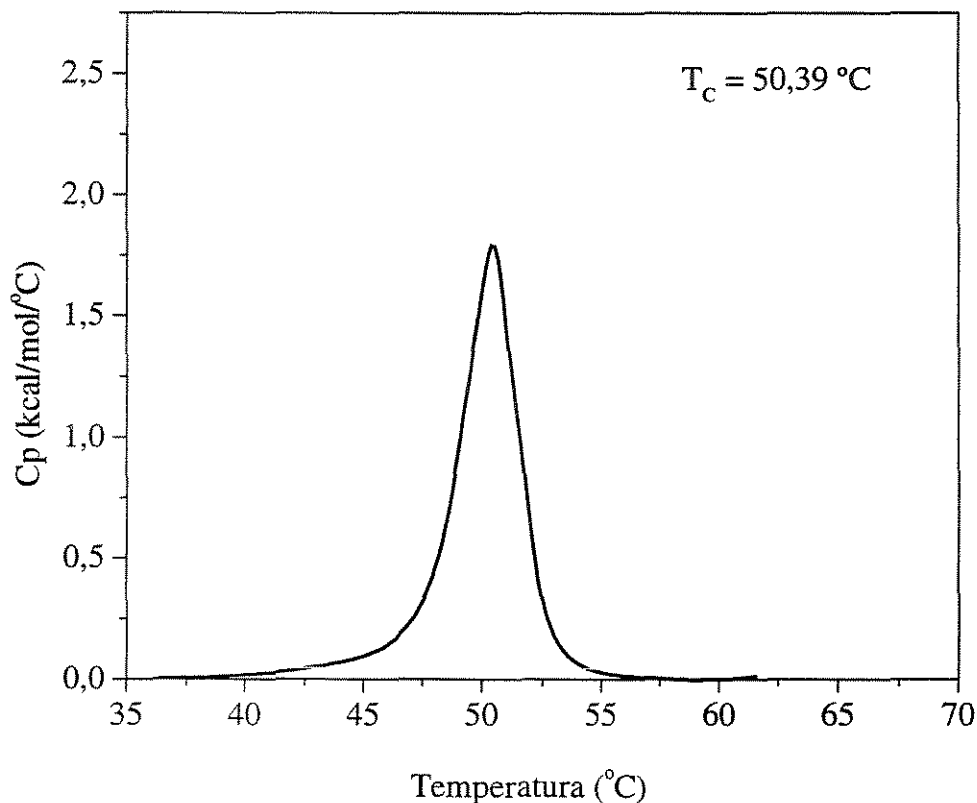


Figura 5.4 - Termograma obtido por microcalorimetria diferencial de varredura para o fosfolípido SPC.

Embora a literatura indique valores de temperatura de transição de fases para a fosfatidilcolina de soja em torno de 41 °C, por tanto significativamente menores que o determinado neste trabalho, este valor é influenciado pela natureza do fosfolípido e pela metodologia de preparação da amostra (Rodney e Lichtenberg, 1993). Para o fosfolípido DSPC, a temperatura de transição de fases, segundo Szoka e Papahadjopoulos (1980), é de cerca de 55 °C, portanto, próxima ao valor obtido para a lecitina de soja, o que novamente corrobora o comportamento físico semelhante destes fosfolípidos.

5.1.3. Comportamento da Kanamicina quanto à Partição nos Sistemas Analisados

Os modelos comumente usados para a avaliação da partição de um composto em sistemas aquosos e 1-octanol são muito úteis no estudo do transporte de um fármaco através de membranas biológicas. Uma vez que os lipossomas são membranas constituídas principalmente por fosfolipídios, este comportamento quanto à partição relaciona-se também à capacidade deste fármaco em permear estes sistemas. Assim, estes estudos são úteis no esclarecimento de aspectos específicos sobre a encapsulação e a retenção do composto nas vesículas lipídicas.

Uma vez que o comportamento dos fármacos isoniazida, pirazinamida e rifampicina quanto à partição em diversos sistemas aquosos e 1-octanol já havia sido avaliado anteriormente (Justo, 1999) conforme discutido no capítulo de Revisão da Literatura, realizou-se no presente trabalho este estudo unicamente para o composto terapêutico kanamicina.

As soluções aquosas empregadas representam fundamentalmente os ambientes interno e externo às vesículas. Na incorporação ativa, o interior da vesícula lipídica está preenchido por uma solução de ácido cítrico a 300 mmol/L e pH 4,0, enquanto a região aquosa externa poderia conter 300 mmol/L de ácido cítrico a pH 7,4, 10 mmol/L de HEPES a pH 7,4 ou ainda 10 mmol/L de HEPES e 120 mmol/L de NaCl também a pH 7,4.

Os coeficientes de partição da kanamicina nos sistemas contendo soluções aquosas e 1-octanol mostram certa dificuldade do fármaco em permear a membrana lipídica, uma vez que os coeficientes foram relativamente baixos. Para o sistema de referência contendo água deionizada e 1-octanol o valor do coeficiente de partição foi de 0,013, enquanto para os sistemas 1-octanol e ácido cítrico, a pH 4,0 ou 7,4 foi de 0,313 e 0,29, respectivamente. Para os dois sistemas restantes à base de HEPES, foram obtidos valores nulos de coeficiente de partição.

Segundo Madden e col. (1990), apenas resultados da análise de coeficiente de partição podem não explicar isoladamente o comportamento observado para a encapsulação ativa ou não de um determinado fármaco em lipossomas. Entretanto, baixos valores de coeficiente (menores que um) indicam o acúmulo preferencial do composto terapêutico na

fase aquosa e seu caráter predominantemente hidrofílico. A encapsulação ativa da kanamicina nos lipossomas através do uso de gradientes de pH, embora seja factível em decorrência das aminas primárias presentes em sua estrutura, seria então, limitada por sua característica de elevada hidrofiliabilidade.

5.1.4. Análise da Adequação dos Métodos de Quantificação dos Compostos Terapêuticos por Espectrofotometria

A metodologia empregada envolveu a determinação espectrofotométrica da concentração de isoniazida, pirazinamida e rifampicina após o rompimento das vesículas com etanol, metanol ou Triton X-100 reduzido. Este rompimento faz-se necessário devido à grande interferência das vesículas na absorção de luz pelas amostras, resultante do espalhamento de luz pelos lipossomas. Além disto, a intensidade da luz que alcança uma molécula de fármaco encapsulado difere da que alcança uma molécula de fármaco livre em decorrência da blindagem feita pelos lipossomas intactos. Outro fator relevante relaciona-se à maior homogeneidade dos sistemas contendo lipossomas após sua dissolução com detergentes ou solventes orgânicos.

A metodologia de quantificação dos fármacos em amostras dissolvidas com etanol já havia sido avaliada anteriormente para vesículas lipídicas compostas de DSPC/Col (Justo, 1999), realizou-se então testes para sua quantificação em lipossomas de SPC/Col.

As variações nas absorbâncias a 260 nm e 340 nm de amostras de lipossomas extrudados de SPC/Col (60:40 mol:mol) em tampão HEPES a 10 mmol/L e pH 7,4 sem fármacos encapsulados, foram efetuadas após a dissolução das vesículas com etanol, nas mesmas condições empregadas para a determinação da concentração dos fármacos livres.

Observou-se que as variações nas medidas de absorbância das amostras durante o período de uma hora não foram muito significativas, conforme ilustrado na Figura 5.5 para o comprimento de 260 nm, podendo-se então, realizar as medidas logo após a adição do solvente. A sensibilidade deste método é, entretanto, relativamente baixa também para os fármacos, pois o volume de etanol que se deve adicionar é bastante elevado, o que poderia

resultar em erros apreciáveis na detecção de baixas concentrações dos compostos terapêuticos.

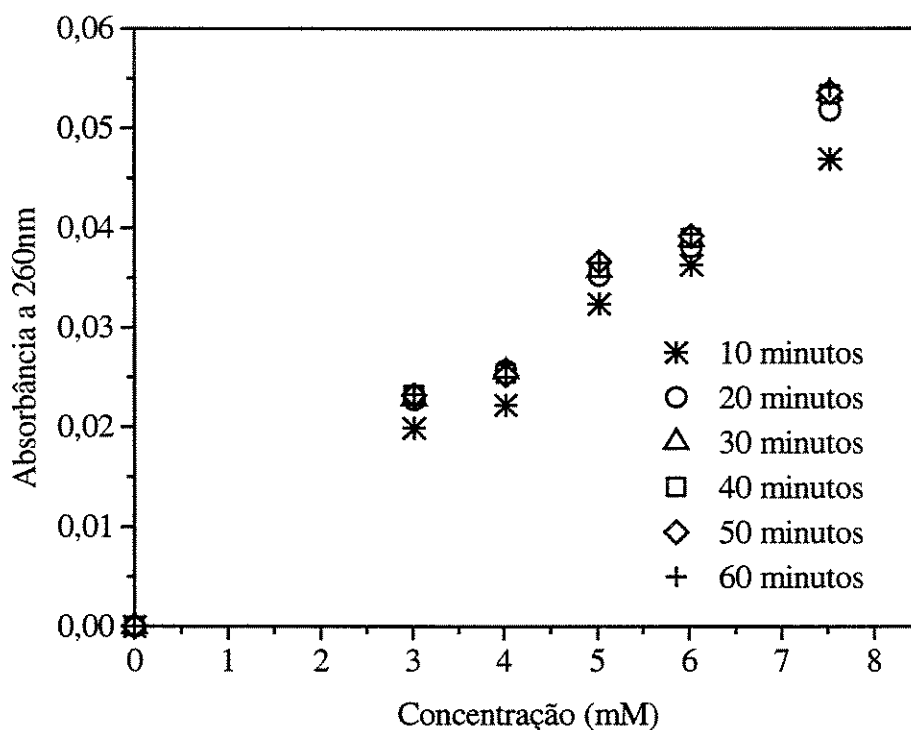


Figura 5.5 – Avaliação da absorbância a 260 nm de lipossomas extrudados de SPC/Col (60:40 mol/mol) a diferentes concentrações lipídicas em presença de etanol.

É interessante notar que embora este método de quantificação seja bastante difundido (Ostro, 1987; Lasic, 1992; New, 1990), estudos acerca da conveniência de sua utilização para amostras com elevadas concentrações lipídicas não são comuns, tendo-se já observado uma baixa eficiência de rompimento das vesículas com o etanol, o que resulta em baixa reprodutibilidade dos resultados.

Testou-se, então os métodos de dissolução ou rompimento das vesículas lipídicas com metanol ou Triton X-100 reduzido, métodos nos quais as concentrações finais

necessárias de solvente ou detergente na amostra para o rompimento das vesículas lipídicas são menores quando comparadas com a metodologia anterior.

Também na quantificação dos fármacos isoniazida, pirazinamida e rifampicina encapsulados nos lipossomas após dissolução das vesículas com metanol, avaliou-se as variações nas medidas de absorbância das amostras durante um intervalo de uma hora, com a finalidade de se definir o tempo mínimo necessário para a realização de leituras estáveis de absorbância. Para as soluções de isoniazida e pirazinamida, as curvas de calibração foram obtidas para uma faixa de concentração de 0 a 1 mmol/L, e para a rifampicina, na faixa de 0 a 0,2 mmol/L.

Foram avaliadas também as variações de absorbância de lipossomas vazios de SPC/Col extrudados e de lipossomas vazios de DSPC/Col e SPC/Col preparados por injeção de etanol em tampão HEPES a 10 mmol/L e pH 7,4, a 260 nm e 340 nm após dissolução das vesículas lipídicas com o solvente metanol nas mesmas condições expostas para as soluções de fármacos livres. A faixa de concentração lipídica analisada foi de 0 a 0,8 mmol/L.

Para o método de dissolução em metanol as variações nas absorbâncias das amostras durante uma hora não foram muito significativas. Realizaram-se, então, as medidas 10 minutos após a adição do solvente.

Pelo método de quantificação com Triton X-100 reduzido, avaliou-se a concentração apenas de isoniazida encapsulada nos lipossomas após dissolução dos lipossomas com o detergente. As variações nas absorbâncias das amostras foram avaliadas durante um intervalo de 30 minutos, com a finalidade de definir o tempo mínimo necessário para a realização de leituras estáveis de absorbância por esta metodologia. Para este composto terapêutico, a curva de calibração foi obtida para uma faixa de concentração de 0 a 0,3 mmol/L, verificando-se boa correspondência entre a concentração do composto terapêutico e a absorbância no período estudado.

Foram avaliadas também as variações de absorbância dos lipossomas extrudados de SPC/Col em tampão HEPES a 10 mmol/L e pH 7,4, a 260 nm após dissolução das vesículas com o detergente, nas mesmas condições expostas para quantificação de isoniazida. A determinação foi realizada em uma faixa de concentração em lipídios de 0 a

0,4 mmol/L. Também neste caso as variações na absorbância não foram muito significativas, optando-se por realizar as medidas imediatamente após a adição do detergente.

Destaca-se que em todas as situações estudadas, as curvas de calibração obtidas apresentaram coeficientes de regressão maiores que 0,99, indicando o bom ajuste das mesmas aos dados experimentais obtidos.

Desta forma, nota-se que os três métodos estudados podem ser empregados para a quantificação dos fármacos encapsulados em lipossomas. Entretanto, o método que utiliza etanol para o rompimento das vesículas lipídicas parece ser o menos adequado, pois é o menos sensível, enquanto as técnicas que envolvem metanol ou Triton X-100 reduzido possibilitariam a quantificação dos compostos terapêuticos em amostras mais diluídas.

Uma vez que as absorbâncias do composto terapêutico livre e das vesículas lipídicas vazias são da mesma ordem de grandeza nas faixas de concentrações testadas e que o custo das análises com Triton X-100 reduzido é relativamente elevado, optou-se pelo emprego do metanol nos ensaios subseqüentes de determinação dos fármacos isoniazida, pirazinamida e rifampicina.

A metodologia de quantificação de kanamicina com TNBS resultou em curvas de calibração com bons coeficientes lineares em uma faixa de concentração de fármaco de 0 a 0,2 mmol/L. Este método apresenta um custo significativamente menor, uma vez que o Triton X-100 empregado para o rompimento das vesículas não é reduzido.

5.1.5. Seleção da Técnica de Remoção do Fármaco Livre de Lipossomas

A seleção do procedimento de remoção do fármaco não encapsulado nas vesículas lipídicas tem impacto direto no tempo de processamento e na concentração lipídica final das amostras, dentre outras características. As técnicas avaliadas foram a cromatografia de permeação em gel, a diálise e a ultrafiltração.

Como sistema modelo, avaliou-se a adequação das referidas técnicas para a separação de isoniazida não encapsulada em lipossomas de SPC/Col, preparados a partir da

hidratação do filme seco de lipídios com solução de tampão HEPES a 10 mmol/L e pH 7,4 contendo 100 mmol/L de isoniazida seguida de extrusão. Neste caso, haveria uma quantidade considerável de fármaco não incorporado para ser removido. As eficiências de encapsulação foram avaliadas e os resultados estão mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Eficiências de encapsulação obtidas para a incorporação passiva de uma solução de isoniazida a 100 mmol/L em lipossomas de SPC/Col preparados por extrusão usando vários métodos de remoção do fármaco não incorporado.

<i>Técnica de Remoção</i>	<i>Concentração Final de Fármaco (mmol/L)</i>	<i>Concentração Final de Lipídios (mmol/L)</i>	<i>Eficiência de Encapsulação (%)</i>
Ultrafiltração	0,33	3,24	0,77
Diálise	0,56	6,64	0,64
Cromatografia	0,09	1,21	0,57

Para a remoção do composto terapêutico por ultrafiltração, inicialmente avaliou-se o número de etapas necessárias para a remoção eficiente de fármaco livre. Através desta análise, realizada para uma solução de isoniazida (na ausência de vesículas lipídicas) de 100 mmol/L de concentração, sugere-se um mínimo de quatro etapas de ultrafiltração para atingir uma boa eficiência de separação na amostra. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 5.6.

Nos ensaios realizados usando a técnica de ultrafiltração, o tempo necessário para a separação do fármaco livre foi longo devido ao número de etapas requeridas, aspecto que reduziria a viabilidade do uso desta técnica, principalmente em maiores escalas.

Dentre os métodos estudados, a técnica de remoção por diálise tem a vantagem de ser o método mais simples. Contudo, os novos gradientes de concentração formados induzem a saída do composto encapsulado nas vesículas, para se atingir novos estados de equilíbrio (Dipali e col., 1996). Como resultado deste processo, provavelmente menores eficiências de encapsulação poderiam estar sendo obtidas.

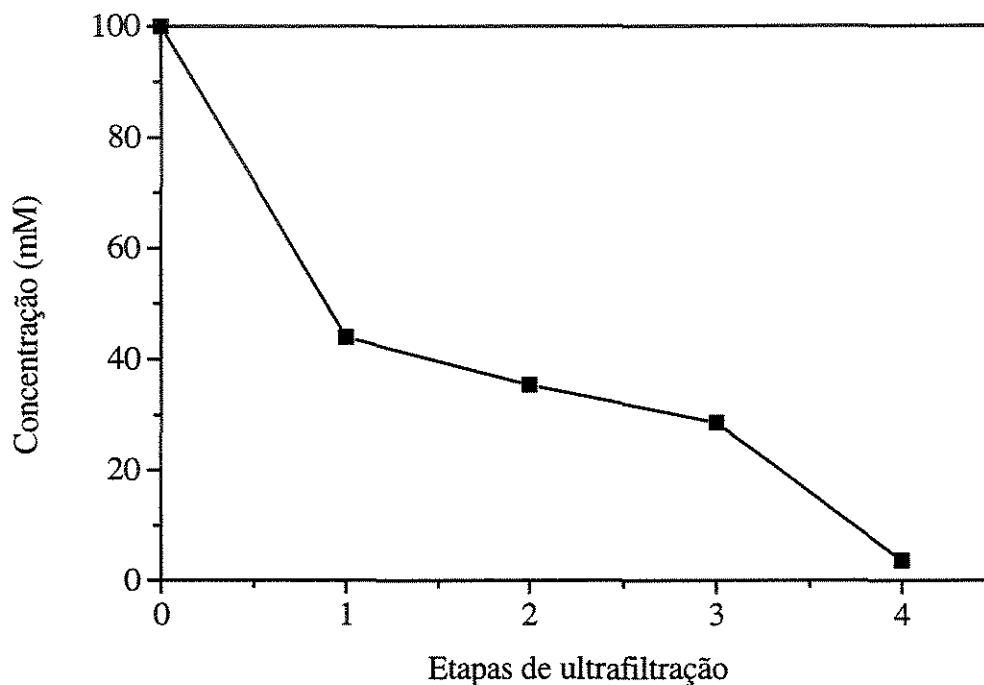


Figura 5.6 - Avaliação do método de ultrafiltração na remoção do composto terapêutico isoniazida de uma amostra com uma concentração de fármaco livre de 100 mmol/L.

Apesar de ter gerado a diluição das preparações de lipossomas analisadas, a separação por cromatografia de permeação em gel é de rápida execução mostrando-se uma técnica adequada para a remoção do composto livre, principalmente considerando-se que neste estudo em muitas etapas não havia o requerimento de altas concentrações de fármaco e lipídios.

5.1.6 Preparação e Caracterização de Lipossomas Extrudados Encapsulando Isoniazida, Pirazinamida e Rifampicina por Incorporação Ativa

Um estudo inicial de encapsulação dos fármacos em vesículas preparadas pela metodologia de hidratação do filme lipídico seco de lipídios foi realizado pela necessidade de comparar os resultados em um sistema experimental obtido a partir de metodologias

clássicas com os resultados no novo método ou sistema, como o método de injeção de etanol. Vesículas lipídicas utilizadas para a incorporação ativa dos fármacos isoniazida, pirazinamida e rifampicina foram preparadas a partir da hidratação do filme lipídico seco de SPC/Col com solução de tampão citrato a pH 4,0. As vesículas lipídicas unilamelares obtidas por extrusão apresentaram uma distribuição de tamanhos bimodal com valores de diâmetros de até 500 nm (Figura 5.7).

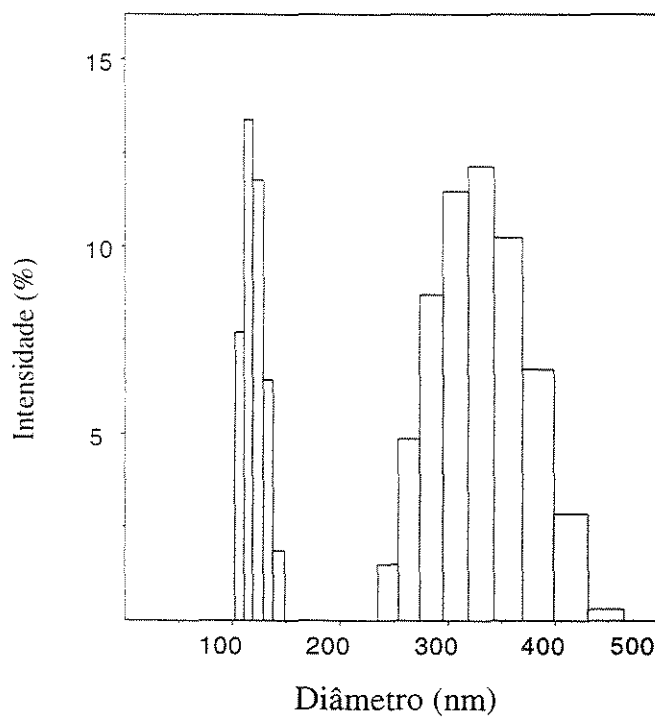


Figura 5.7 – Distribuição de tamanhos de lipossomas vazios de SPC/Col obtidos pelo método de extrusão. Diâmetros médios das duas populações de lipossomas: 137 nm (44,6%) e 354 nm (55,4%). Índice de polidispersão de 0,12.

Embora o diâmetro nominal de poro das membranas de policarbonato empregadas na homogenização de tamanho fosse de 400 nm, os tamanhos dos lipossomas preparados por esta técnica geralmente apresentam discrepância neste sentido, devido provavelmente à desestruturação e re-estruturação das vesículas observadas nos processos de extrusão a elevadas temperaturas. Este fato é demonstrado por diversos pesquisadores, conforme discutido por Costa (2000).

As soluções aquosas dos agentes terapêuticos diretamente dissolvidos em HEPES a 10 mmol/L e pH 7,4, no caso dos compostos isoniazida e pirazinamida, e dissolvido no mesmo tampão após sua recristalização a partir de uma solução de clorofórmio/metanol para o fármaco rifampicina, foram incorporadas a lipossomas titulados a um pH de 7,4 com Na_2CO_3 , apresentando um gradiente de pH de cerca de 3,4 unidades.

As vesículas contendo isoniazida, pirazinamida e rifampicina encapsuladas ativamente a uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 0,19 para a isoniazida e 0,15 para os dois fármacos restantes, apresentaram razões molares finais composto terapêutico/lipídio em média de 0,0550; 0,0200 e 0,0073, equivalentes a eficiências de encapsulação de 28,9%; 13,3% e 4,9%, respectivamente. Estas eficiências de encapsulação são mais baixas que as obtidas anteriormente para vesículas de DSPC/Col preparadas através da mesma metodologia (Justo, 1999), respectivamente, de 100%, 100% e 20%, devendo-se destacar que a composição utilizada na preparação das vesículas lipídicas foi diferente, o que poderia ter afetado a incorporação dos compostos terapêuticos, devido a alterações na permeabilidade da membrana dos lipossomas. Outra possível explicação para a menor incorporação dos fármacos em comparação aos resultados obtidos anteriormente (Justo, 1999) fundamenta-se no tipo de método de detecção dos fármacos. A concentração dos compostos encapsulados pode ter sido superestimada em função de se ter utilizado etanol para o rompimento dos lipossomas, método este que envolve grande diluição da amostra e está associado a erros de medida consideráveis.

5.2. Preparação e Caracterização de Lipossomas Encapsulando Agentes Tuberculostáticos por Injeção de Etanol em Pequena Escala

O desenvolvimento natural de processos ou produtos químicos parte de uma escala de produção menor para uma escala maior. Nesta primeira escala, tendo em vista sua maior flexibilidade e menor custo de operação, é necessário verificar sempre os dados básicos sobre o processo assim como a produtividade e o rendimento do produto de interesse sob o ponto de vista econômico antes de se ampliar a produção para uma escala maior.

5.2.1. Efeito de Diferentes Matérias-Primas nas Características dos Lipossomas

As vesículas unilamelares foram preparadas segundo o método de injeção de etanol em pequena escala como descrito anteriormente, usando duas composições distintas, uma com DSPC/Colesterol e a outra contendo fosfatidilcolina natural de soja, SPC/Colesterol, ambas a razões molares de 60:40 mol%.

A concentração lipídica final das vesículas unilamelares obtidas pelo método de injeção de etanol foi diretamente influenciada pela máxima solubilidade dos lipídios em questão no solvente. Para a mistura de DSPC/Col atingiu-se uma concentração inicial máxima de lipídios de 80 mmol/L, correspondente a concentrações de 48 mmol/L para a DSPC e 32 mmol/L de Col. Para as vesículas lipídicas de SPC/Col, uma concentração lipídica final de 100 mmol/L (60 mmol/L de SPC e 40 mmol/L de Col) foi obtida. Para a obtenção de soluções límpidas e homogêneas dos lipídios em etanol, foi necessária a sonicação das amostras durante 10 minutos a 45 °C.

Três diferentes lotes de amostras de vesículas de DSPC/Col foram preparados e apresentaram diâmetros médios de 120 nm, 183 nm e 230 nm, com populações pouco heterogêneas conforme se pode verificar na Figura 5.8, que ilustra o perfil tipicamente obtido. Lipossomas compostos por SPC/Col obtidos por este procedimento apresentaram distribuição comumente bimodal, com populações de diâmetros médios de 82 nm e 202 nm (Figura 5.9).

Estas vesículas lipídicas, quando vazias e estocadas a 5 °C em geladeira, foram aparentemente mais estáveis que as extrudadas, as quais tendiam à formação de precipitados com maior facilidade e em um menor tempo. Uma amostra de vesículas de DSPC/Col com diâmetro médio de 120 nm foi submetida ao processo de congelamento-descongelamento com o objetivo de melhorar a distribuição de solutos. O aumento no volume de encapsulação do tampão de hidratação induziu um aumento de aproximadamente 40nm no diâmetro médio final dos lipossomas.

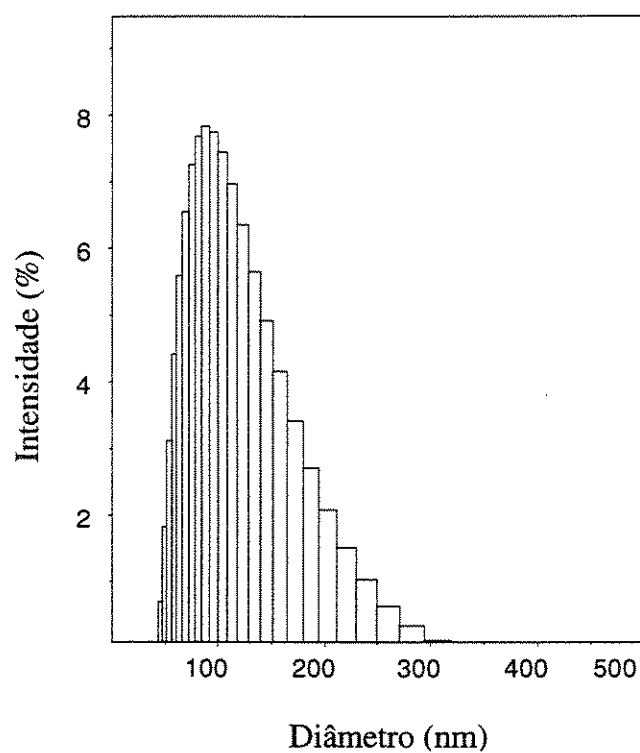


Figura 5.8 – Distribuição típica de tamanhos de lipossomas vazios de DSPC/Col obtidos pelo método de injeção de etanol, com diâmetro médio de 120 nm. Índice de Polidispersão de 0,14.

Nota-se que, nas condições testadas, os diâmetros médios das vesículas foram significativamente superiores aos valores inicialmente citados na literatura, de aproximadamente 25 nm (Batzri e Korn, 1973). Também se pode observar que o método de injeção de etanol em escala de bancada não permitiu controlar o efeito de algumas variáveis operacionais nas características finais dos lipossomas, como a velocidade de injeção no tamanho médio das vesículas preparadas, obtendo-se populações com grandes diferenças de tamanhos, o que indicou baixa reprodutibilidade.

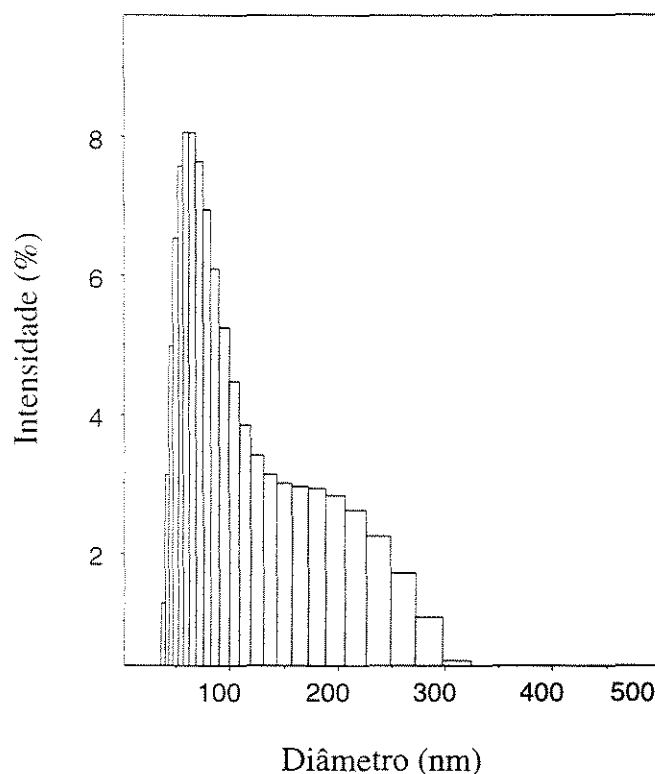


Figura 5.9 – Distribuição de tamanhos de lipossomas vazios de SPC/Col obtidos pelo método de injeção de etanol. Diâmetro médio de 82 nm (74,6%) para a primeira população e de 202 nm (25,4%) para a segunda população de partículas. Índice de polidispersão de 0,16.

5.2.2. Encapsulação Ativa de Isoniazida

Os resultados obtidos na incorporação ativa de isoniazida em vesículas de DSPC/Col, ilustrados nas Figuras 5.10 e 5.11, mostram que o acúmulo deste composto terapêutico nestas vesículas preparadas pelo método de injeção de etanol manual é sensível a variações nas razões molares iniciais fármaco/lipídio utilizadas durante a incubação. O aumento nas razões molares iniciais isoniazida/lipídio de 0,03 a 0,1 implica no aumento da eficiência de encapsulação para 100%. Entretanto, para razões molares iniciais fármaco/lipídio de 0,1 a 0,35 ocorre uma diminuição nos valores das razões molares finais isoniazida/lipídio e,

conseqüentemente, valores menores de eficiência de encapsulação são obtidos, possivelmente devido à ocorrência de rearranjos na bicamada lipídica das vesículas em decorrência da exposição a altas concentrações de fármaco. Para razões molares iniciais superiores a 0,35, aparentemente é alcançado um platô, indicando a possível existência de saturação na encapsulação do fármaco nas vesículas.

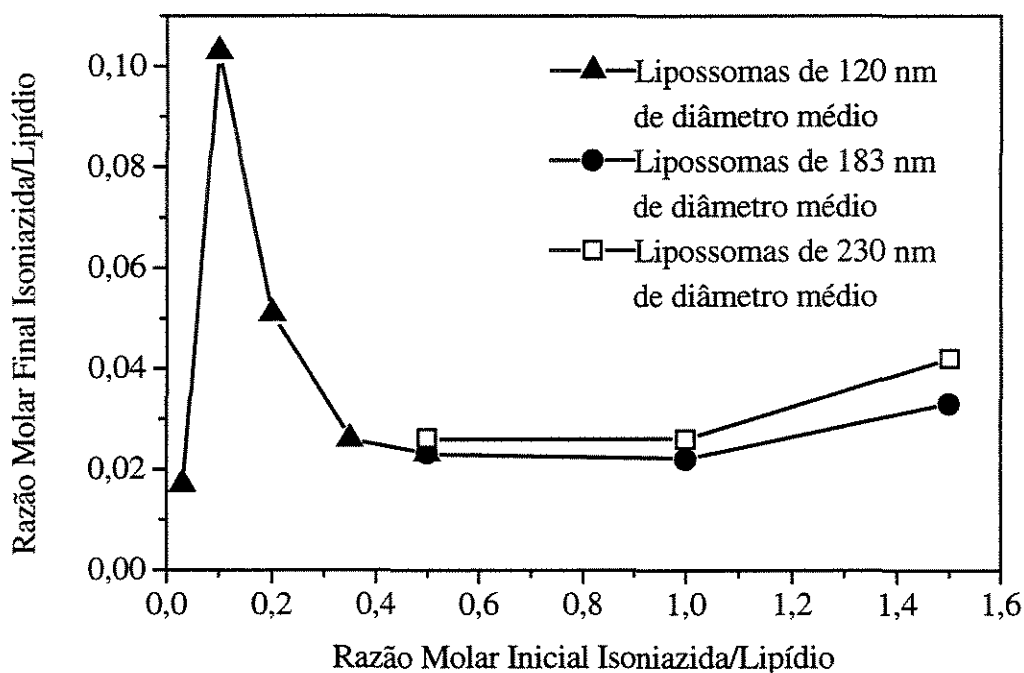


Figura 5.10 - Efeito da razão molar inicial isoniazida/lipídio na razão molar final isoniazida/lipídio de vesículas de DSPC/Col obtidas por injeção de etanol em pequena escala, preparados em três lotes distintos.

Este comportamento foi também observado para lipossomas de DSPC/Col com diâmetro médio de 230 nm incubados com isoniazida usando razões molares iniciais fármaco/lipídio de 0,5, 1,0 e 1,5. Os valores das razões molares finais fármaco/lipídio para este sistema foram muito próximos aos valores obtidos para os lipossomas com diâmetros médios de (183 nm).

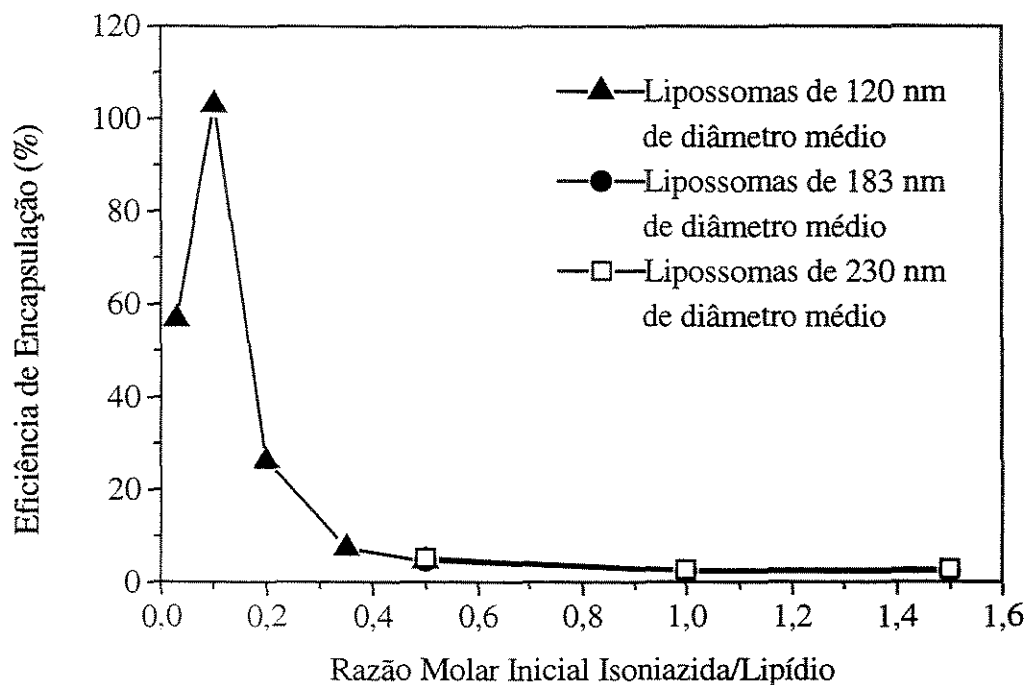


Figura 5.11 - Efeito da razão molar inicial isoniazida/lipídio na eficiência de encapsulação para vesículas de DSPC/Col obtidas por injeção de etanol em pequena escala, preparadas em 3 lotes distintos.

Os resultados apresentados diferem dos obtidos por Justo (1999), nos quais uma eficiência de encapsulação de 100% foi obtida para este fármaco quando se utilizou uma razão molar inicial de 0,2 e as mesmas condições de incubação. Entretanto, naquele trabalho foram empregados lipossomas obtidos por extrusão, que apresentavam diâmetros médios superiores. Vesículas lipídicas maiores tendem a reter no seu interior um maior volume aquoso, o que provavelmente facilitaria a acomodação de maior número de moléculas do fármaco. Outra possibilidade é que estas vesículas apresentem também mudanças no empacotamento da membrana lipídica, o que afetaria a entrada da molécula de fármaco no sistema.

Durante a estocagem por quatro semanas a 5 °C dos lipossomas encapsulando isoniazida preparados nas diferentes razões molares iniciais fármaco/lipídio mencionadas, não se verificou variações significativas no diâmetro médio dos lipossomas.

Foi avaliada também a incorporação de isoniazida nas vesículas submetidas ao processo de congelamento-descongelamento antes da encapsulação do fármaco, na tentativa de atingir melhores resultados na encapsulação do composto terapêutico. Lipossomas de DSPC/Col de diâmetro médio de 160 nm foram incubados com a solução do fármaco a razão molar inicial composto terapêutico/lipídio de 0,2. Após a remoção por diálise do composto terapêutico não encapsulado, as vesículas obtidas apresentaram uma razão molar final fármaco/lipídio de 0,041. Este valor correspondente a uma eficiência de encapsulação de cerca de 21%, valor este próximo ao obtido para as vesículas obtidas por injeção manual de etanol incubadas na mesma razão molar inicial e ao obtido para as vesículas extrudadas incubadas em uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 0,19, indicando que não há benefício adicional em se incorporar esta nova etapa, trabalhosa e energeticamente onerosa no processamento das vesículas.

As vesículas lipídicas de SPC/Col preparadas pelo procedimento de injeção de etanol em pequena escala foram incubadas com uma solução do fármaco em uma razão molar inicial composto terapêutico/lipídio de 0,15. Após a encapsulação e a separação do composto não encapsulado por diálise, foi realizada a caracterização dos lipossomas.

Para estes lipossomas encapsulando isoniazida, a eficiência de encapsulação foi de 42,0% correspondente a uma razão molar final composto terapêutico/lipídio de 0,063. Este resultado foi superior ao obtido no trabalho desenvolvido por Calheiros (2001), no qual valores de eficiências de incorporação muito baixos foram obtidos (máximo de 16%), embora tenham sido empregadas outras condições de incubação do fármaco com as vesículas, o que pode ter sido a causa desta diferença no comportamento.

O diâmetro médio das vesículas lipídicas encapsulando isoniazida, após a incorporação não apresentou mudanças significativas em relação ao diâmetro médio inicial. Esta estabilidade foi mantida também durante o período de estocagem de quatro semanas a 5 °C.

A tabela 5.2 sumariza os principais resultados obtidos para a incorporação de isoniazida, mostrando que apenas de se poder atingir elevadas eficiências de encapsulação, baixas razões molares finais fármaco/lipídios são observadas.

Tabela 5.2 – Eficiências de encapsulação obtidas para a incorporação de isoniazida em lipossomas preparados por injeção de etanol em menor escala.

Caracterização	Amostra*									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Razão Molar Inicial Fármaco/Lipídio	0,03	0,1	0,2	0,35	0,5	0,5	1,0	1,5	0,2	0,15
Eficiência de Encapsulação (%)	56,7	100	26,2	7,4	4,6	4,6	2,2	2,2	21,0	42,0
						5,2	2,6	2,8		

*As amostras na faixa de 1 a 5 correspondem aos lipossomas de DSPC/Col com diâmetro médio de 120 nm e as amostras 6, 7 e 8 correspondem às vesículas de DSPC/Col com diâmetro médio de 183 e 230 nm, respectivamente. A amostra 9 refere-se às vesículas de DSPC/Col submetidas ao congelamento-descongelamento e a número 10 aos lipossomas de SPC/Col.

5.2.3. Encapsulação Ativa de Pirazinamida

Vesículas lipídicas compostas de SPC/Col com 110 nm de diâmetro médio preparadas em escala de bancada por injeção de etanol foram incubadas a uma razão molar inicial composto terapêutico/lipídio de 0,15. Após a encapsulação e a remoção do composto não encapsulado por diálise, verificou-se uma eficiência de encapsulação de 16,7%. Este valor correspondente a uma razão molar final composto terapêutico/lipídio de 0,025.

O valor final obtido é menor que os atingidos na encapsulação ativa de isoniazida nas mesmas condições, provavelmente devido às diferenças nas características físico-químicas destes compostos, principalmente com relação aos valores de pKa e à solubilidade das espécies protonadas no solvente intravesicular. Nota-se certa discrepância em relação aos valores de pKa da isoniazida citados na literatura, entretanto há uma convergência para valores próximos a 2,0; 3,6 e 10,8, destacando-se, que este fármaco sofre ionização em dois diferentes grupos. Para a pirazinamida, verifica-se um valor de pKa de 0,5 (Merck Index,

1996), o que poderia explicar que das moléculas neutras de fármaco que entram na vesícula uma pequena parte estaria sofrendo ionização e a maioria estaria retornando à fase aquosa externa no pequeno período de tempo.

Entretanto, um valor de eficiência de encapsulação de 100% foi obtido para vesículas de DSPC/Col preparadas por extrusão encapsulando ativamente pirazinamida (Justo, 1999). Conforme mencionado anteriormente, este fato poderia ser devido a que os lipossomas obtidos por injeção de etanol apresentam tamanhos relativamente menores que os obtidos por hidratação do filme lipídico seco seguido de extrusão e podem apresentar também mudanças no empacotamento de suas bicamadas. A diferença na composição lipídica das vesículas pode também ter apreciável contribuição, uma vez que se verificaram variações na incorporação ativa de isoniazida em lipossomas preparados por injeção de etanol em pequena escala quando mudanças na composição eram realizadas.

O diâmetro médio das vesículas lipídicas após a incorporação do fármaco não apresentou mudanças significativas em relação ao diâmetro médio inicial das vesículas, estabilidade apresentada também durante o período de estocagem de quatro semanas a 5 °C.

5.2.4. Encapsulação Ativa e Passiva de Rifampicina

A incorporação ativa de rifampicina em vesículas de SPC/Col incubadas com o fármaco a uma razão molar inicial composto terapêutico/lipídio de 0,15 permitiu obter uma eficiência de encapsulação de 12,7%, correspondente a uma razão molar final fármaco/lipídio de 0,019. Este valor deferiu substancialmente do valor de eficiência de encapsulação atingido (20%) quando da incorporação ativa de rifampicina em vesículas lipídicas de DSPC/Col preparadas por hidratação do filme lipídico seco seguida de extrusão.

Pode-se observar também que este valor foi inferior aos atingidos pelos fármacos isoniazida e pirazinamida nas mesmas condições de encapsulação, o que pode ser atribuído ao forte caráter hidrofóbico e à elevada massa molecular da rifampicina (823 Da). Estas características associadas possivelmente dificultam a permeação do fármaco através da

bicamada lipídica. Para a rifampicina, não foram encontrados até o momento na literatura valores de pK_a , o que não permitiu uma análise da influência deste fator na eficiência de incorporação ativa do composto.

A incorporação ativa do fármaco rifampicina não mudou o diâmetro médio das vesículas lipídicas em relação ao diâmetro médio inicial. Estas vesículas mostraram também grande estabilidade durante o período de estocagem de quatro semanas em geladeira a 5 °C.

Foi avaliada também a encapsulação passiva de rifampicina pelo método de injeção de etanol em escala de bancada de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Os lipossomas foram preparados a partir de misturas de SPC/Colesterol e o composto rifampicina no solvente etanol a uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 0,122. Este valor de razão molar inicial foi limitado pela solubilidade do composto terapêutico no solvente orgânico. Neste estudo foram testadas duas metodologias para a remoção do composto não encapsulado nas vesículas, a cromatografia de permeação em gel e a diálise.

As vesículas lipídicas unilamelares obtidas apresentaram diâmetros médios iniciais de 170 nm, valor este não alterado após a separação do fármaco livre por ambas as técnicas. As razões molares finais fármaco/lipídio obtidas foram de 0,026 para as vesículas tratadas por cromatografia de permeação em gel e de 0,017 para as vesículas tratadas por diálise, correspondentes a eficiências de encapsulação de 21,3% e de 13,9% respectivamente, próximas às verificadas na encapsulação ativa do fármaco em lipossomas obtidos por injeção de etanol. Como previsto, a retenção do fármaco foi possivelmente afetada pelo processo de diálise, embora para ambas as metodologias de remoção do fármaco não incorporado as eficiências de incorporação mostraram-se bastante reduzidas, possivelmente devido à elevada massa molecular da rifampicina e ao apreciável volume da molécula, o que dificultaria sua acomodação na bicamada das vesículas.

Os resultados apresentados foram melhores que os obtidos quando da encapsulação passiva do composto terapêutico em vesículas lipídicas extrudadas de DSPC/Col (Justo, 1999), no qual a encapsulação passiva não conduziu à incorporação do fármaco nos lipossomas para uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 0,1.

Durante um mês após a encapsulação do composto terapêutico rifampicina nas vesículas lipídicas, os diâmetros médios dos lipossomas permaneceram praticamente constantes, o que indicou novamente a boa estabilidade das vesículas obtidas por esta metodologia após a incorporação do fármaco.

5.2.5. Encapsulação Ativa de Kanamicina

Dentre os fármacos estudados, a kanamicina está associada a uma metodologia de quantificação relativamente mais simples e sensível que as empregadas com os outros compostos. Testou-se então a encapsulação ativa da kanamicina em condições similares às empregadas para doxorrubicina (Mayer e col., 1990), um fármaco que apresenta excelente incorporação ativa em lipossomas, avaliando-se mais detalhadamente a influência de variações na razão molar inicial fármaco/lipídio nas características finais das vesículas lipídicas preparadas por injeção de etanol em pequena escala. Foram avaliadas cinco razões molares iniciais e a encapsulação do fármaco foi realizada a 60 °C e 200 rpm por 10 minutos. O composto terapêutico não encapsulado nos lipossomas, com diâmetros médios de 98,2 nm, foi removido por cromatografia de permeação em gel. Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 5.3.

Nota-se que a incorporação ativa de kanamicina é sensível à variação da concentração inicial do composto terapêutico. O aumento nas razões molares iniciais fármaco/lipídio implicou em variações nas razões molares finais. Variações nas razões molares iniciais de 0,1 a 0,4 provocaram um aumento de 40% nas razões molares finais, embora os valores de eficiência de encapsulação tenham diminuído em 57%. Para valores de razões molares iniciais superiores a 0,4, as razões molares finais fármaco/lipídio e as eficiências de encapsulação diminuíram consideravelmente. Estes valores de eficiências são menores que os obtidos para a encapsulação ativa de doxorrubicina e de outros fármacos, para os quais valores de até 100% foram obtidos por esta metodologia. Diversos motivos podem ter levado a estes resultados. Sendo a kanamicina um composto terapêutico altamente hidrofílico, um deles pode ser a dificuldade em atravessar a bicamada lipídica hidrofóbica das vesículas e ser incorporado nas vesículas.

Tabela 5.3 – Incorporação ativa de kanamicina a 60 °C, 200 rpm por 10 minutos em lipossomas de SPC:Col para distintas concentrações iniciais do fármaco kanamicina.

<i>Caracterização do sistema</i>	<i>Razão Molar Inicial Fármaco/Lipídio</i>				
	<i>0,1</i>	<i>0,2</i>	<i>0,4</i>	<i>0,8</i>	<i>1,6</i>
Razão Molar Final Fármaco/Lipídio	0,014	0,016	0,024	0,002	0,009
Eficiência de Encapsulação (%)	14,00	8,00	6,00	0,25	0,56

5.2.5.1 Avaliação dos Efeitos das Variáveis Razão Molar Inicial Fármaco/Lipídio e Temperatura na Encapsulação Ativa de Kanamicina nos Lipossomas de SPC/Col

A partir dos resultados obtidos nos ensaios discutidos anteriormente, enfocou-se a determinação das condições ótimas de encapsulação ativa da kanamicina, uma vez que apenas o aumento da razão molar inicial não levou a valores elevados de razão molar final fármaco/lipídio, conforme mostrado no item anterior. Nestes ensaios, novamente, empregou-se vesículas preparadas por injeção de etanol e sonicadas, apresentando diâmetros médios dentro da faixa requerida para o tipo de aplicação terapêutica almejado (131,5 nm).

Os planejamentos experimentais realizados para avaliar os efeitos dos fatores temperatura e razão molar inicial fármaco/lipídio na eficiência de encapsulação ativa da kanamicina em lipossomas preparados por injeção de etanol em escala de bancada foram realizados para dois tempos de incubação diferentes, 10 e 60 minutos. Inicialmente, não se considerou a variável tempo de incubação dentro da análise estatística para não incluir um parâmetro cinético, uma vez que se ignorava quando seria atingido o equilíbrio do sistema em estudo. As condições experimentais empregadas são mostradas na Tabela 5.4 conjuntamente com os resultados obtidos na encapsulação ativa do composto terapêutico para os dois tempos de incubação.

Tabela 5.4 - Planejamentos experimentais 2^2 para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas durante 10 e 60 minutos de incubação a diferentes temperaturas e razões molares iniciais fármaco/lipídios.

Ensaio	Temperatura (°C)	$(F/L)_{\text{inicial}}^*$	Tempo de Incubação			
			10 minutos		60 minutos	
			$(F/L)_{\text{final}}^{**}$	$E^{***} (\%)$	$(F/L)_{\text{final}}^{**}$	$E^{***} (\%)$
1	25,0	0,16	0,0368	23,00	0,0397	24,80
2	60,0	0,16	0,0387	24,20	0,1006	62,90
3	25,0	1,60	0,0352	2,20	0,0448	2,80
4	60,0	1,60	0,0816	5,10	0,0704	4,40
5	42,5	0,88	0,0378	4,30	0,0704	8,00
6	42,5	0,88	0,0554	6,30	0,0466	5,30
7	42,5	0,88	0,0475	5,40	0,0537	6,10

* razão molar inicial fármaco/lipídio

** razão molar final fármaco/lipídio

*** eficiência de encapsulação

Para a kanamicina, as razões molares finais fármaco/lipídio variaram entre 0,036 e 0,101 e as eficiências de encapsulação de 2,20 a 62,90%. Os melhores resultados de razão molar final fármaco/lipídio foram obtidos no ensaio 4 (10 minutos de incubação a 60 °C com uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 1,6) e no ensaio 2 (60 minutos de incubação a 60 °C com uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 0,16). As melhores eficiências de encapsulação obtidas foram para o ensaio 2 nos dois tempos de incubação estudados, no qual se tinha uma razão $(F/L)_{\text{inicial}}$ de 0,16 e uma temperatura de incubação de 60 °C. Os ensaios nos quais a temperatura foi inferior a este valor não apresentaram razões molares finais fármaco/lipídio maiores que 0,07 e eficiências de encapsulação maiores que 24,80%.

Os efeitos estatísticos destes fatores sobre a razão molar final fármaco/lipídio e a eficiência de encapsulação da kanamicina são discutidos a seguir.

Segundo a Tabela 5.5 quando se incubou o composto terapêutico durante 10 minutos, nenhuma das variáveis estudadas foi estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95% sobre a razão molar final fármaco/lipídio. Pode-se notar também que os valores de p para os termos lineares são elevados (maiores que 0,1).

Tabela 5.5 - Estimativa dos efeitos para 10 minutos de incubação na razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina.

	<i>Efeito</i>	<i>Desvio</i> <i>Padrão</i>	<i>t (2)</i>	<i>p</i>	<i>Lim.Conf</i> <i>-95%</i>	<i>Lim.Conf</i> <i>+95%</i>
Média	0,047	0,0032	14,843	0,0045	0,034	0,062
(1) Temperatura (°C)	0,024	0,0085	2,822	0,1060	-0,013	0,061
(2) (F/L) _{inicial}	0,021	0,0085	2,469	0,1323	-0,016	0,058
(1) x (2)	0,022	0,0085	2,587	0,1226	-0,015	0,059

A variação da temperatura resultou no mesmo comportamento verificado pela razão molar inicial fármaco/lipídio, implicando um acréscimo nos valores de razões molares finais (F/L). Quando o tempo de incubação do composto terapêutico durante a encapsulação ativa foi de 60 minutos, novamente nenhuma das variáveis independentes estudadas foi estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95% sobre a razão molar final fármaco/lipídio (Tabela 5.6).

Nota-se também que o valor de p da variável temperatura seria relevante com a diminuição deste limite de confiança para 90%. Os resultados estatísticos obtidos para este limite de confiança são mostrados na Tabela 5.7.

Tabela 5.6 - Estimativa dos efeitos para 60 minutos de incubação na razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina.

	<i>Efeito</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>t (2)</i>	<i>p</i>	<i>Lim.Conf -95%</i>	<i>Lim.Conf +95%</i>
	Média	0,061	13,689	0,0053	0,041	0,080
(1)	Temperatura (°C)	0,043	3,647	0,0676	-0,008	0,094
(2)	(F/L) _{inicial}	-0,013	-1,103	0,3851	-0,064	0,038
(1) x (2)		-0,018	-1,527	0,2664	-0,069	0,033

Tabela 5.7 - Valores dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial para 60 minutos de incubação na razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina.

	<i>Coef. de Regressão</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>t (2)</i>	<i>p</i>	<i>Lim.Conf -90%</i>	<i>Lim.Conf +90%</i>
	Média	0,0610	13,689	0,0053	0,048	0,074
(1)	Temperatura (°C) *	0,0215	3,647	0,0676	0,004	0,039
(2)	(F/L) _{inicial}	-0,0065	-1,103	0,3851	-0,024	0,011
(1) x (2)		-0,0090	-1,527	0,2664	-0,026	0,008

*fator estatisticamente significativo a 90% de confiança

A Equação 5.1 descreve a resposta da razão molar final fármaco/lipídio (F/L_{final}) da kanamicina como função das variáveis independentes analisadas para 60 minutos de incubação do composto terapêutico com as vesículas lipídicas, através dos resultados apresentados anteriormente na Tabela 5.7. A análise da variância deste modelo é mostrada na Tabela 5.8.

$$(F/L)_{\text{final}} = 0,0610 + 0,0215 \times X1 \quad (5.1)$$

X1: variável codificada da temperatura.

Tabela 5.8 - Análise da variância para a razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina nas vesículas de SPC:Col obtidas por injeção de etanol.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	0,001849	1	0,001849	10,81
Resíduo	0,000855	5	0,000171	
Falta de Ajuste	0,000577	3		
Erro Puro	0,000278	2		
Total	0,002704	6		

Coefficiente de correlação $R^2=0,684$

$F_{0,90;1;5}=4,06$

Como se pode observar, os valores dos coeficientes de correlação (0,684) e do coeficiente do teste F (valor calculado 2,66 vezes maior que o valor tabelado) mostram que o modelo linear proposto não é estatisticamente adequado para ajustar o sistema de dados obtidos. Segundo Barros e col. (1995), se se verifica que o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} , tem-se evidência estatística suficiente para supor a existência de uma relação linear entre as variáveis, e quanto maior o valor do $F_{\text{calculado}}$, mais adequado. Porém, nem sempre uma regressão dada como significativa pelo teste F é útil para realizar previsões. Na prática pode-se considerar uma regressão como útil para fins de previsão se o valor do $F_{\text{calculado}}$ for, pelo menos, cerca de dez vezes o valor do ponto da distribuição F com o número apropriado de graus de liberdade, no nível de confiança escolhido (Box e Wetz, 1973; Box e Draper, 1987).

Na figura 5.12 pode-se comparar mais diretamente os efeitos das variáveis independentes estudadas, para ambos os tempos de incubação, sobre a razão molar final fármaco/lipídio. Observa-se que em ambas as situações a variável que mais eleva a razão molar final é a temperatura de incubação.

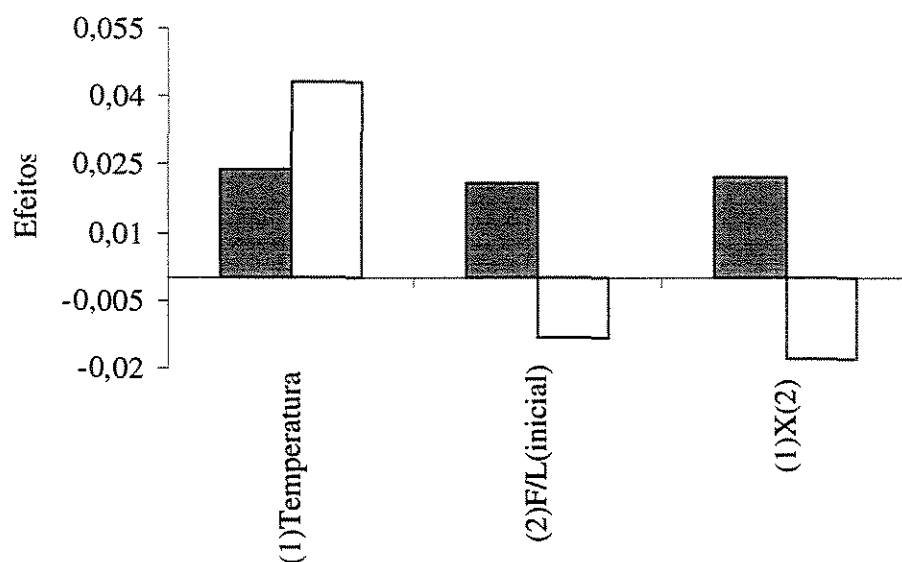


Figura 5.12 – Resultados dos efeitos das variáveis independentes estudadas e de sua interação sobre a razão molar final kanamicina/lipídio incubada durante 10 (■) e 60 minutos (□) nas vesículas de SPC:Col.

De modo geral, para a obtenção de razões molares finais fármaco/lipídio (F/L_{finais}) maiores, poderia ser cogitada a hipótese de expansão do planejamento estatístico, estudando-se as variáveis independentes mais significativas em outras faixas. Contudo, no planejamento aqui empregado, já se havia selecionado condições muito próximas ao limite operacional da variável temperatura, uma vez que para o sistema em estudo não é viável a utilização de temperaturas de encapsulação maiores que 60 °C, pois poderia haver degradação do composto terapêutico e dos lipídios. Razões molares iniciais fármaco/lipídios diferentes poderiam ser estudadas e seus efeitos nas razões molares finais dos sistemas e nas eficiências de encapsulação do composto terapêutico poderiam ser analisados. Uma análise do tempo de incubação como variável independente também

poderia ser interessante, uma vez que os resultados obtidos poderão diferir para cada tempo analisado.

A análise estatística das eficiências de encapsulação da kanamicina obtidas para um tempo de incubação de 10 minutos mostrou que a única variável estudada estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95% (Tabela 5.9) é a razão molar inicial fármaco/lipídio.

Tabela 5.9 - Estimativa dos efeitos para 10 minutos de incubação na eficiência de encapsulação da kanamicina.

	<i>Efeito</i>	<i>Desvio</i> <i>Padrão</i>	<i>t</i> (2)	<i>p</i>	<i>Lim. Conf</i> -95%	<i>Lim. Conf</i> +95%
Média	10,0714	0,3786	26,6022	0,0014	8,443	11,700
(1) Temperatura (°C)	2,0500	1,0017	2,0466	0,1773	-2,260	6,260
(2) (F/L) _{inicial} *	-19,9500	1,0017	-19,9168	0,0025	-24,260	-15,640
(1) x (2)	0,8500	1,0017	0,8486	0,4855	-3,460	5,160

*fator estatisticamente significativo a 95% de confiança

Quando realizada uma análise estatística para um nível de confiança de 90% observa-se que nenhuma outra variável independente analisada é significativa, o que sugere a adoção do maior nível de confiança. Na Tabela 5.10 é mostrada a análise da variância (ANOVA) para os resultados obtidos da eficiência de encapsulação da kanamicina.

Pode-se observar pela ANOVA que o coeficiente de correlação obtido para o modelo (de 0,76), e o valor do teste F não apresentaram bons resultados ($F_{\text{calculado}}$ 2,41 vezes maior que F_{tabelado}), indicando a inadequação do modelo obtido. Desta maneira, a análise dos resultados foi efetuada com base nos efeitos estimados de cada variável independente e seus efeitos de interação.

Tabela 5.10 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col incubada durante 10 minutos.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	398,0025	1	398,0025	15,95
Resíduo	124,7918	5	24,9584	
Falta de Ajuste	122,7851	3		
Erro Puro	2,0067	2		
Total	522,7943	6		

Coefficiente de correlação $R^2=0,76$

$F_{0,90;1;5}=6,61$

Quando realizada a análise estatística dos resultados obtidos de eficiências de encapsulação de kanamicina para um tempo de incubação de 60 minutos, observou-se que para um nível de confiança de 95% as duas variáveis independentes estudadas e sua interação foram estatisticamente significativas (Tabela 5.11).

Desta forma, a Equação 5.2 descreve a resposta da eficiência de encapsulação da kanamicina em função das variáveis analisadas.

$$E(\%) = 16,3286 + 9,9250 \times X1 - 20,1250 \times X2 - 9,1250 \times X1 \times X2 \quad (5.2)$$

X1: Variável codificada da temperatura.

X2: Variável codificada da razão molar inicial fármaco/lipídio.

Tabela 5.11 - Estimativa dos coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (95%), obtidos do planejamento fatorial para 60 minutos de incubação na eficiência de encapsulação da kanamicina.

	<i>Coef. de Regressão</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>t (2)</i>	<i>p</i>	<i>Lim. Conf -95%</i>	<i>Lim. Conf +95%</i>
Média	16,3286	0,52418	31,1509	0,0010	14,073	18,584
(1) Temperatura (°C)*	9,9250	0,69342	14,3131	0,0048	6,941	12,909
(2) (F/L) _{inicial} *	-20,1250	0,69342	-29,0228	0,0012	-23,109	-17,141
(1) x (2)*	-9,1250	0,69342	-13,1594	0,0057	-12,109	-6,141

*fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança

A análise da variância (Tabela 5.12) dos resultados de eficiências, mostra que além do coeficiente de correlação ter sido baixo (0,82) o valor do $F_{\text{calculado}}$ foi menor que o valor do F_{tabelado} para o nível de 95% de confiança (9,28), indicando a inadequação do modelo.

Tabela 5.12 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col incubada durante 60 minutos.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	2347,147	3	782,382	4,56
Resíduo	514,447	3	171,482	
Falta de Ajuste	510,600	1		
Erro Puro	3,847	2		
Total	2861,594	6		

Coeficiente de correlação $R^2=0,82$

$F_{0,95;3;3}=9,28$

Nesta análise, a temperatura mostrou um efeito quase 10 vezes maior que o verificado no estudo realizado com 10 minutos de incubação, provavelmente pelo fato que com um tempo de exposição maior a uma temperatura superior à temperatura de transição de fases gel/líquido cristalino da lecitina de soja (50,4 °C), atingir-se-ia uma maior fluidez nas bicamadas das vesículas lipídicas, o que possibilitaria uma maior permeabilidade e a melhor entrada do fármaco nos lipossomas.

Novamente, a análise dos resultados foi efetuada com base nos efeitos obtidos para cada variável (Figura 5.13). A razão molar inicial fármaco/lipídio foi a variável mais significativa estatisticamente, sendo seu efeito, em termos absolutos, mais que oito vezes maior que o verificado para a temperatura, sendo também maior o observado para a interação das duas variáveis quando o tempo de incubação foi de 10 minutos, sendo o dobro daquele apresentado pela temperatura e pela interação de ambas quando o tempo foi de 60 minutos.



Figura 5.13 - Resultado dos efeitos da razão molar inicial F/L, da temperatura e de suas interações sobre a variável resposta eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol, incubados por 10 (■) e 60 minutos (□) nas vesículas de SPC:Col.

Conforme a Figura 5.13 o efeito desta variável mostra que seu valor deve ser mantido baixo para obter altas eficiências de encapsulação. No entanto, valores muito menores que os escolhidos seriam poucos recomendáveis devido aos erros verificados na detecção de concentrações muito baixas de fármaco incorporado.

Uma vez que o tempo de incubação mostrou-se uma variável importante no estudo da razão molar final fármaco/lipídio e na eficiência de encapsulação ativa da kanamicina, decidiu-se realizar um novo planejamento experimental como uma maneira alternativa de se interpretar os dados obtidos considerando o ensaio anterior como único, tomando-se como variáveis independentes a temperatura, a razão molar inicial fármaco/lipídio e o tempo de incubação. Para isto, realizou-se um novo conjunto de experimentos em quadruplicata nas condições experimentais centrais, que uniu os dois lotes de ensaios isolados e originou um planejamento exponencial do tipo 2^3 .

Os lipossomas empregados apresentaram diâmetros médios de 151,8 nm. Os resultados obtidos da encapsulação do composto terapêutico nas condições experimentais centrais empregadas, sendo estas 42,5 °C, $(F/L)_{\text{inicial}}$ de 0,88 e 35 minutos de incubação, estão apresentados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Novo conjunto de experimentos, na condição central para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas.

<i>Ensaio</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>(F/L)_{inicial}</i> *	<i>Tempo (minutos)</i>	<i>(F/L)_{final}</i> **	<i>Eficiência (%)</i>
1	42,5	0,88	35	0,1206	13,70
2	42,5	0,88	35	0,1135	12,90
3	42,5	0,88	35	0,0801	9,10
4	42,5	0,88	35	0,1214	13,80

* razão molar inicial fármaco/lipídio

** razão molar final fármaco/lipídio

A análise estatística do planejamento experimental 2^3 mostrou os efeitos dos três fatores estudados sobre a razão molar final fármaco/lipídio e a eficiência de encapsulação da kanamicina. Estes efeitos estão mostrados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14 - Estimativa dos efeitos para a razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina.

	<i>Efeito</i>	<i>Desvio</i> <i>Padrão</i>	<i>t (3)</i>	<i>p</i>	<i>Lim.Conf</i> <i>-90%</i>	<i>Lim.Conf</i> <i>+90%</i>
Média	0,0738	0,0057	12,951	0,0010	0,060	0,087
(1) Temperatura (°C)*	0,0335	0,0140	2,399	0,0960	0,000	0,066
(2) (F/L) _{inicial}	0,0040	0,0140	0,286	0,7932	-0,029	0,037
Tempo (minutos)	0,0155	0,0140	1,110	0,3480	-0,017	0,048
(1) x (2)	0,0020	0,0140	0,143	0,8952	-0,031	0,035
(1) x (3)	0,0095	0,0140	0,680	0,5451	-0,023	0,042
(2) x (3)	-0,0170	0,0140	-1,217	0,3105	-0,050	0,016
(1) x (2) x (3)	-0,0200	0,0140	-1,432	0,2475	-0,053	0,013

*fator estatisticamente significativo a 90% de confiança

Para um nível de confiança de 95%, nenhuma das variáveis estudadas foi estatisticamente significativa sobre a razão molar final fármaco/lipídio. Quando se reduziu o limite de confiança para 90%, o único termo linear estatisticamente significativo foi a temperatura de incubação do fármaco.

A Tabela 5.15 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a razão molar final fármaco/lipídio. O coeficiente de correlação (0,33) e o teste F foram muito baixos a 90% de confiança. Assim, não foi possível obter um modelo matemático que descrevesse satisfatoriamente a resposta razão molar final fármaco/lipídio em função das variáveis analisadas.

Tabela 5.15 - Análise da variância para a razão molar final fármaco/lipídio da kanamicina em lipossomas de SPC:Col.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	0,002245	1	0,002245	2,1
Resíduo	0,010669	10	0,0010669	
Falta de Ajuste	0,009499	7		
Erro Puro	0,001170	3		
Total	0,012914	11		

Coeficiente de correlação $R^2=0,33$

$F_{0,90;1;10}=3,29$

Pela Figura 5.14, nota-se que a temperatura apresentou uma influência bem maior na razão molar final do que as outras variáveis. Seu efeito foi de 1,7 a 17 vezes maior que os verificados para os outros termos, sendo que um aumento desta variável de 0,16 para 1,6 invariavelmente provocou aumentos na $(F/L)_{\text{final}}$ dos ensaios. Estes incrementos foram superiores a 5%, chegando a aumentos de até 60%.

Pela análise dos resultados do planejamento experimental realizado para avaliar as variáveis que mais influenciam a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas preparados por injeção de etanol e sonicação, temos que a um nível de confiança de 95% todos os termos foram estatisticamente significativos (Tabela 5.16). Embora se tenha obtido um bom coeficiente de correlação (0,96), a análise da variância dos resultados mostrados indica que não é possível propor um modelo em função dos termos analisados, uma vez que o coeficiente entre os valores do $F_{\text{calculado}}$ e do F_{tabelado} foi relativamente baixo (2,3). Estes resultados são mostrados na Tabela 5.17.

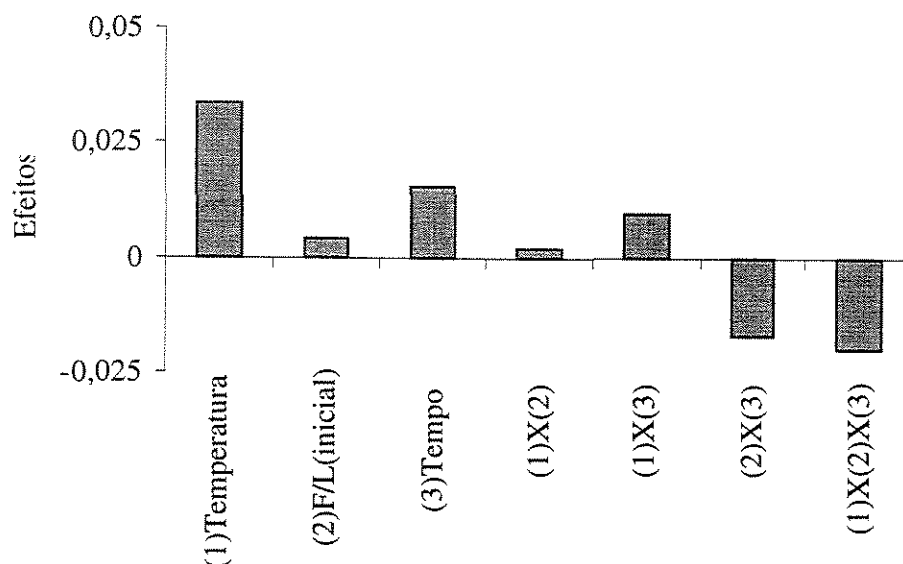


Figura 5.14 - Resultado dos efeitos da temperatura, da razão molar inicial F/L, do tempo e de suas interações sobre a razão molar final kanamicina/lipídio em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol em escala de bancada.

A análise dos efeitos estatísticos de todos os termos independentes estudados mostra que embora todos os parâmetros lineares sejam significativos para a eficiência de encapsulação do fármaco kanamicina em vesículas lipídicas de SPC/Col preparadas em escala de bancada, o valor do efeito provocado pela razão molar inicial fármaco/lipídio (F/L_{inicial}) é, no mínimo, três vezes superior aos valores dos efeitos apresentados pelas outras variáveis independentes, mostrando também que apresenta um efeito negativo apreciável, ou seja, um aumento no seu valor acarreta uma diminuição na eficiência de encapsulação deste agente terapêutico. A Figura 5.15 ilustra estes resultados obtidos para uma melhor visualização.

Tabela 5.16 - Estimativa dos efeitos das variáveis estudadas na eficiência de encapsulação ativa da kanamicina.

	<i>Efeito</i>	<i>Desvio</i> <i>Padrão</i>	<i>t (3)</i>	<i>p</i>	<i>Lim.Conf</i> <i>-95%</i>	<i>Lim.Conf</i> <i>+95%</i>
Média	16,5750	0,6410	25,862	0,0001	14,535	18,615
(1) Temperatura (°C)*	10,9500	1,5700	6,975	0,0060	5,954	15,946
(2) (F/L) _{inicial} *	-30,1000	1,5700	-19,173	0,0003	-35,096	-25,104
Tempo (minutos)*	10,1000	1,5700	6,434	0,0076	5,104	15,096
(1) x (2)*	-8,7000	1,5700	-5,542	0,0116	-13,696	-3,704
(1) x (3)*	8,9000	1,5700	5,669	0,0109	3,904	13,896
(2) x (3)*	-10,1500	1,5700	-6,465	0,0075	-15,146	-5,154
(1) x (2) x (3)*	-9,5500	1,5700	-6,083	0,0089	-14,546	-4,554

*fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança

Tabela 5.17 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma</i> <i>Quadrática</i>	<i>Graus de</i> <i>Liberdade</i>	<i>Média</i> <i>Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	2954,094	7	422,0134	13,99
Resíduo	120,628	4	30,157	
Falta de Ajuste	105,840	1		
Erro Puro	14,788	3		
Total	3074,722	11		

Coeficiente de correlação $R^2=0,96$ $F_{0,95;7;4}=6,09$

Para este estudo, pode-se concluir que uma eficiência máxima de encapsulação do fármaco kanamicina pode ser atingida com uma razão molar inicial fármaco/lipídio (F/L_{inicial}) de 0,16, uma temperatura de 60 °C e um tempo de incubação de 60 minutos. Entretanto, no caso em estudo, é relevante considerar que processos relacionados a etapas longas de incubação geralmente tendem à elevação do custo associado ao produto final, visto que seriam aumentados os gastos com a manutenção de temperaturas elevadas por longos períodos, além do que se aumenta a probabilidade de degradação térmica dos compostos envolvidos.

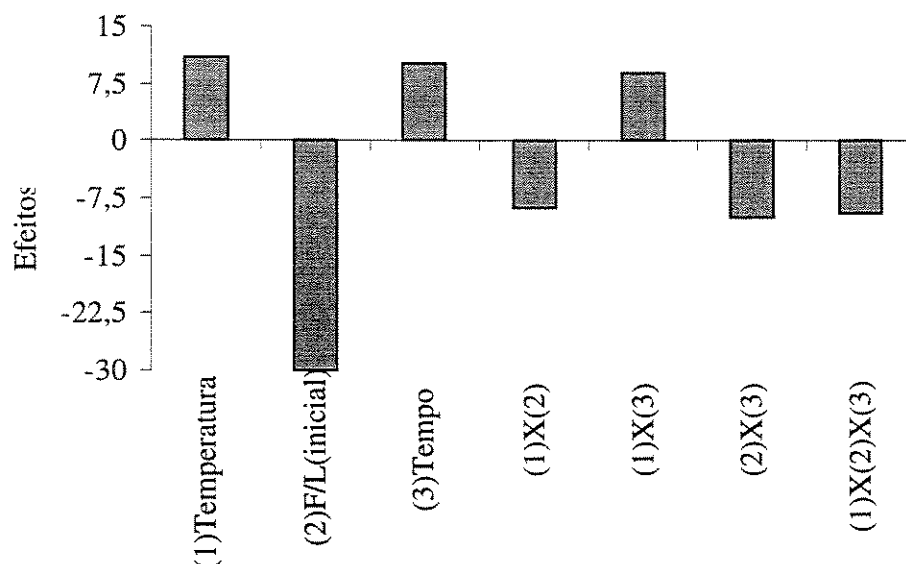


Figura 5.15 - Resultado dos efeitos da temperatura, da razão molar inicial F/L, do tempo e de suas interações sobre a eficiência de encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol.

5.2.6. Encapsulação Passiva de Kanamicina

A incorporação passiva de kanamicina foi avaliada em vesículas lipídicas obtidas pelo método de injeção de etanol em escala de bancada de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Neste estudo os lipossomas foram preparados a partir de misturas de SPC/Colesterol a uma razão molar de 60:40 mol% e o composto kanamicina foi

solubilizado em tampão HEPES a pH 7,4 para a incorporação no cerne aquoso das vesículas.

A encapsulação passiva do composto terapêutico na fase aquosa foi avaliada a razão molar inicial fármaco/lipídio de 20. As vesículas obtidas apresentaram diâmetros médios de 157 nm, valor este não alterado após a separação do fármaco livre por cromatografia de permeação em gel. A razão molar final composto terapêutico/lipídio obtida foi de 0,29, correspondente a uma eficiência de encapsulação de 1,45%. Este valor de eficiência de encapsulação foi menor que os obtidos nas incorporações ativas deste composto em vesículas obtidas pela mesma metodologia com tamanhos muito próximos, entretanto a razão molar final foi significativamente maior. Embora o resultado da maior razão molar final seja atraente do ponto de vista farmacológico, permitindo que maiores dosagens do fármaco possam ser administradas com menor quantidade associada de lipídios, o custo de produção aumenta significativamente, pois uma quantidade inicial bem mais elevada de kanamicina é requerida.

Um mês após a encapsulação passiva do fármaco no núcleo aquoso dos lipossomas, o diâmetro médio das vesículas lipídicas permaneceu praticamente constante, indicando boa estabilidade estrutural dos lipossomas obtidos por esta metodologia.

Destaca-se que a incorporação deste composto na bicamada lipídica não pode ser efetuada devido à limitada solubilidade do fármaco em etanol e por suas características predominantemente hidrofílicas.

5.2.7 Encapsulação Ativa de Doxorrubicina

Estudos têm mostrado que a doxorrubicina pode ser incorporada eficientemente em lipossomas que apresentam gradientes de pH, internamente ácido (Mayer e col., 1990), alcançando-se freqüentemente 100% de encapsulação do fármaco. Em valores de pH neutros, a doxorrubicina pode transitar livremente pela camada lipídica, entretanto, quando em presença de íons H^+ (pH ácido) a doxorrubicina assume a forma protonada, que não permea a bicamada lipídica. Assim, quando em solução neutra em presença de lipossomas

com gradiente de pH, a doxorrubicina consegue transpor a camada lipídica e uma vez atingido o interior ácido do lipossoma, é impedida de transitar pela camada, ficando portanto encapsulada.

Este efeito de gradiente de prótons nas concentrações do composto terapêutico nos ambientes interno e externo das vesículas é descrito pela equação de Henderson-Hasselbach:

$$\frac{[HA^+]_{\text{interna}}}{[HA^+]_{\text{externa}}} = \frac{[H^+]_{\text{interna}}}{[H^+]_{\text{externa}}} \quad (5.3)$$

Visto que o fármaco doxorrubicina tem sido incorporado com grande sucesso em vesículas lipídicas com gradiente de pH e sendo atualmente um composto terapêutico de referência nos estudos de encapsulação e liberação controlada de fármacos, uma detalhada caracterização da incorporação deste composto em lipossomas preparados no sistema em estudo poderia fornecer várias informações relativas às vesículas empregadas, dentre elas a permeabilidade das membranas lipídicas dos lipossomas, a estabilidade do gradiente de pH das vesículas e a capacidade de retenção do composto encapsulado. Estes ensaios foram realizados em escala de bancada, na qual há maior flexibilidade operacional e menor custo associado.

Os resultados obtidos na incorporação ativa em duplicata de doxorrubicina em vesículas de SPC/Col de 112 nm de diâmetro médio preparadas pelo método de injeção de etanol em escala de bancada mostram que o acúmulo do composto terapêutico é sensível às variações nas razões molares iniciais fármaco/lipídio empregadas durante a incubação. Tais resultados estão expressos nas Figuras 5.16 e 5.17.

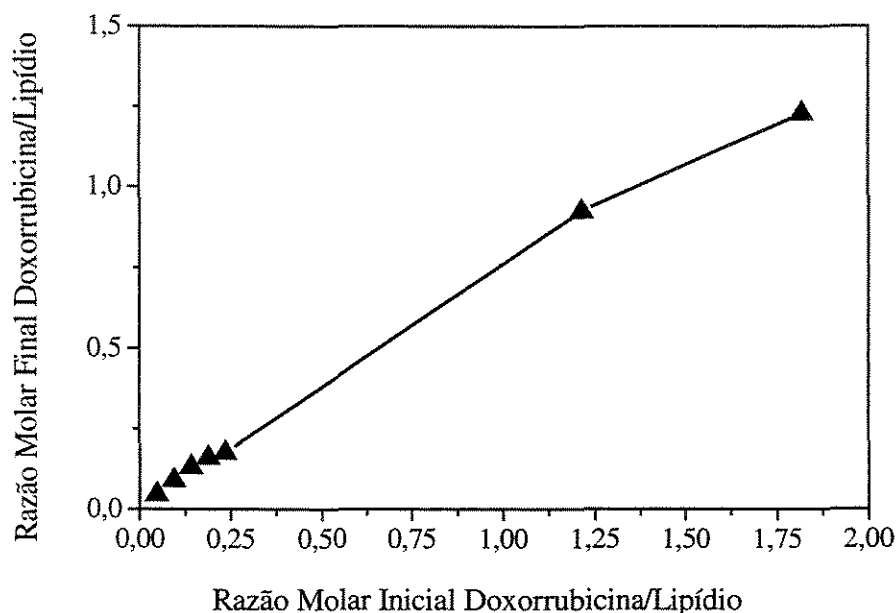


Figura 5.16 - Efeito da razão molar inicial doxorrubicina/lipídio na razão molar final doxorrubicina/lipídio de vesículas de SPC/Col preparadas por injeção de etanol em escala de bancada.

As eficiências de encapsulação atingidas foram altas, condizendo com valores da literatura, na qual se encontram eficiências acima de 90% para este método (Mayer e col., 1990). Pode-se também notar que um aumento na razão molar inicial fármaco/lipídio implica no aumento da razão molar final doxorrubicina/lipídio e, conseqüentemente, valores maiores de concentração de fármaco encapsulado no interior aquoso das vesículas são obtidos.

Na faixa analisada não foi alcançado um platô, indicando que possivelmente as vesículas lipídicas ainda não se encontravam saturadas com o composto terapêutico, embora valores de razões molares iniciais fármaco/lipídios superiores a 2 sejam de difícil obtenção, devido à limitada capacidade tamponante do tampão citrato.

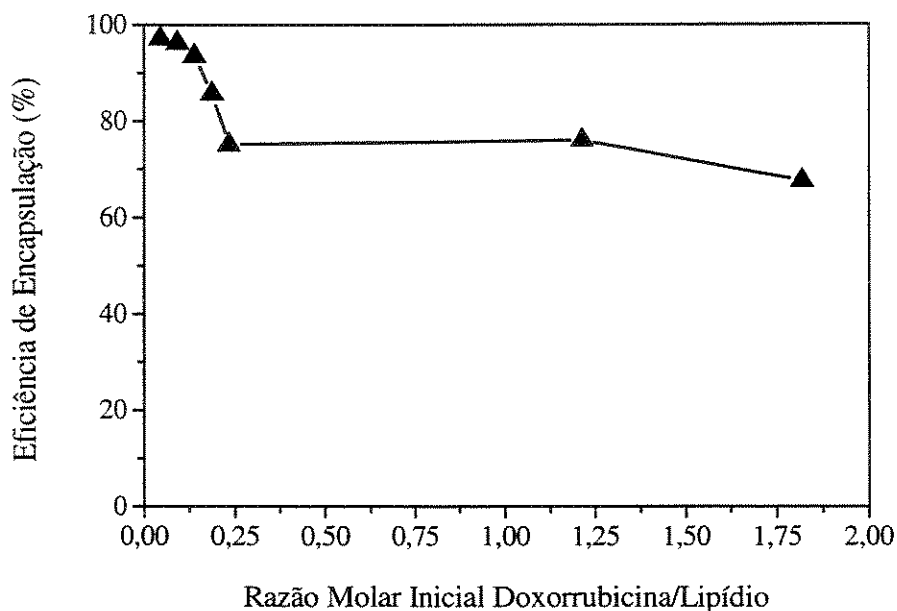


Figura 5.17 - Efeito da razão molar inicial doxorrubicina/lipídio na eficiência de incorporação ativa de doxorrubicina de vesículas de SPC/Col preparadas por injeção de etanol em escala de bancada.

Estes resultados permitem verificar que as vesículas lipídicas de SPC/Col preparadas pelo método de injeção de etanol apresentam características adequadas para a encapsulação ativa de compostos terapêuticos, permitindo alcançar altas eficiências de incorporação. Estes resultados indicam também que as baixas eficiências observadas na incorporação dos agentes tuberculostáticos testados devem ser atribuídas tanto às características moleculares dos fármacos, quanto à composição das vesículas, sendo menos dependentes do método de preparação das vesículas em si.

Embora o sistema obtido para a doxorrubicina tenha se mostrado altamente eficiente, a avaliação da capacidade de retenção do fármaco incorporado nestes lipossomas durante a estocagem na forma de suspensão aquosa é muito importante na análise de um projeto que visa resultados passíveis de escalonamento industrial, resultados estes que serão discutidos a seguir.

5.2.8 Estabilidade de Estocagem das Vesículas Lipídicas de SPC/Col Encapsulando Ativamente Doxorrubicina

A estabilidade de estocagem das vesículas lipídicas preparadas por injeção de etanol em pequena escala com diâmetro médio de 148 nm e encapsulando ativamente doxorrubicina foi avaliada para uma amostra apresentando razão molar inicial fármaco/lipídio de 0,55. Este valor de razão molar foi selecionado por ser intermédio com relação ao perfil total de incorporação do fármaco, que variou de 0,05 a 1,8. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 5.18.

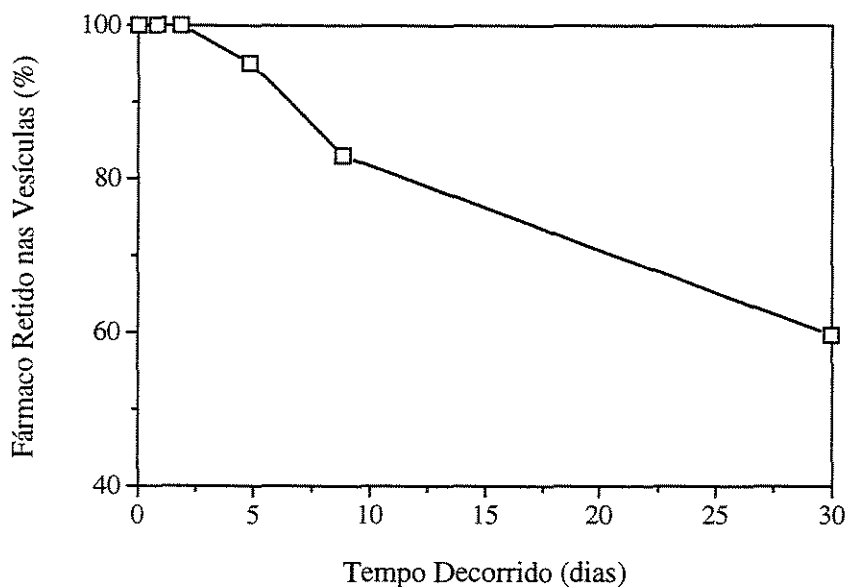


Figura 5.18 – Resultados da eficiência de estocagem em geladeira a 4 °C dos lipossomas de SPC/Colesterol preparados por injeção de etanol em pequena escala encapsulando ativamente o composto terapêutico doxorrubicina a uma razão molar fármaco/lipídio de 0,55.

Observa-se que durante os cinco primeiros dias após a estocagem, a retenção do fármaco foi superior a 90%, entretanto, após este período, verificou-se um decaimento contínuo, que resultou na retenção de apenas 60% da doxorrubicina inicialmente

incorporada após 30 dias. Estes resultados indicam que o gradiente de pH das vesículas lipídicas é aparentemente estável durante cinco dias e que a utilização das vesículas para a incorporação de fármacos durante até três dias, conforme empregado neste trabalho, é, a priori, adequada.

Embora a liberação tenha sido acentuada para a amostra estocada em fase aquosa, o mesmo talvez não se verifique para amostras liofilizadas, para as quais os efeitos do elevado gradiente de concentração de composto terapêutico entre as fases aquosas externas e internas aos lipossomas seriam minimizados.

Uma vez que o sistema aquoso preparado em pequena escala não apresenta retenção estável do fármaco encapsulado após cinco dias, estudos adicionais para avaliar a estabilidade do gradiente de pH estabelecido nas vesículas e de estocagem dos lipossomas preparados em uma escala ampliada são de relevância para verificar se ocorre também a liberação indesejada do fármaco neste sistema.

5.2.9 Estudo da Estabilidade do Gradiente de Prótons dos Lipossomas na Encapsulação Ativa da Doxorrubicina

Visto que o composto terapêutico doxorrubicina foi incorporado ativamente com sucesso nas vesículas lipídicas de SPC/Col obtidas por injeção de etanol com gradientes de pH e que o estudo mostrou uma baixa capacidade de retenção do fármaco encapsulado após as primeiras horas, realizou-se um estudo para avaliar a estabilidade do gradiente de pH estabelecido pela passagem dos lipossomas em pH ácido por colunas de permeação em gel equilibradas com tampão HEPES a pH 7,4. Uma baixa estabilidade deste gradiente mostraria que o composto inicialmente encapsulado e impermeável à bicamada lipídica poderia assumir uma forma neutra capaz de transitar livremente, ficando em equilíbrio com a fase externa às vesículas.

As vesículas empregadas nestes ensaios foram preparadas em escala de bancada e na incorporação ativa da doxorrubicina foi empregada uma razão molar inicial

doxorubicina/lipídio de 0,47. Nestas condições a eficiência de encapsulação esperada seria de cerca de 35% para vesículas com diâmetro próximos de 112 nm.

Os resultados obtidos na incorporação ativa em duplicata do fármaco doxorubicina em vesículas de SPC/Col de 227,8 nm e 210,7 nm de diâmetro médio respectivamente preparadas pelo método de injeção de etanol com gradiente de pH de aproximadamente 3,5 unidades mostram que o acúmulo do composto terapêutico doxorubicina é sensível ao período transcorrido após o estabelecimento deste gradiente. Tais resultados estão expressos nas Figuras 5.19 e 5.20.

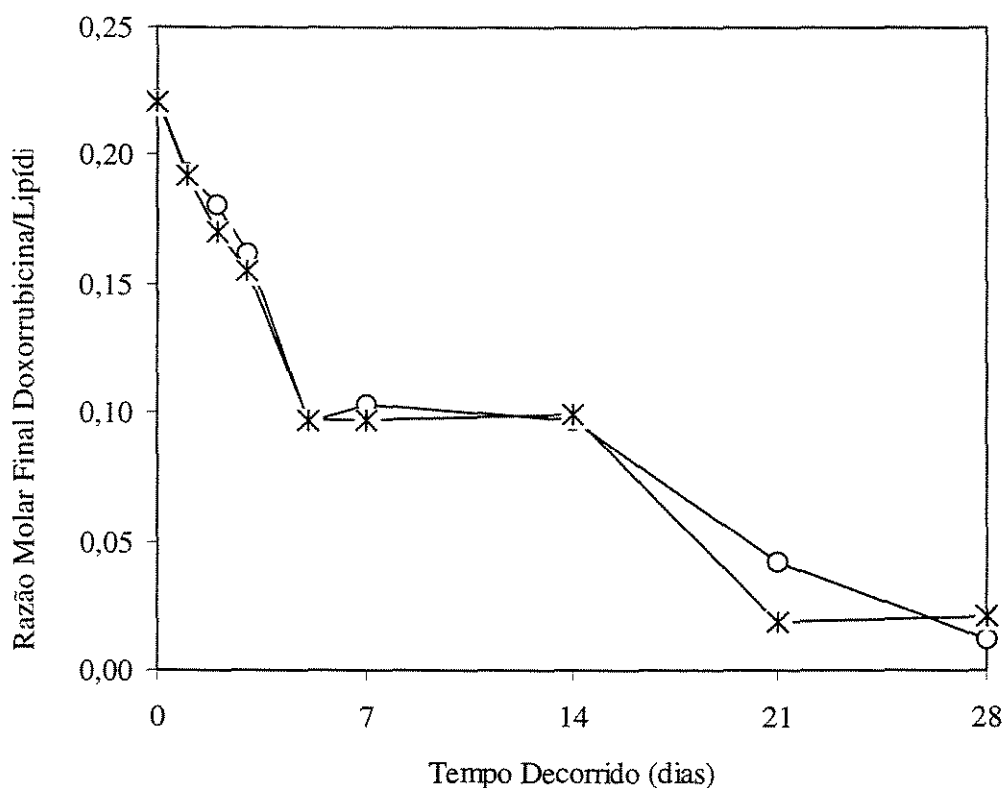


Figura 5.19 - Efeito do tempo decorrido após o estabelecimento do gradiente prótons de pH na razão molar final doxorubicina/lipídio em vesículas lipídicas de SPC/Col obtidas por injeção de etanol em pequena escala, preparadas em 2 lotes distintos. Vesículas lipídicas com diâmetro médio de 227,8 nm (o) e 210,7 nm (*).

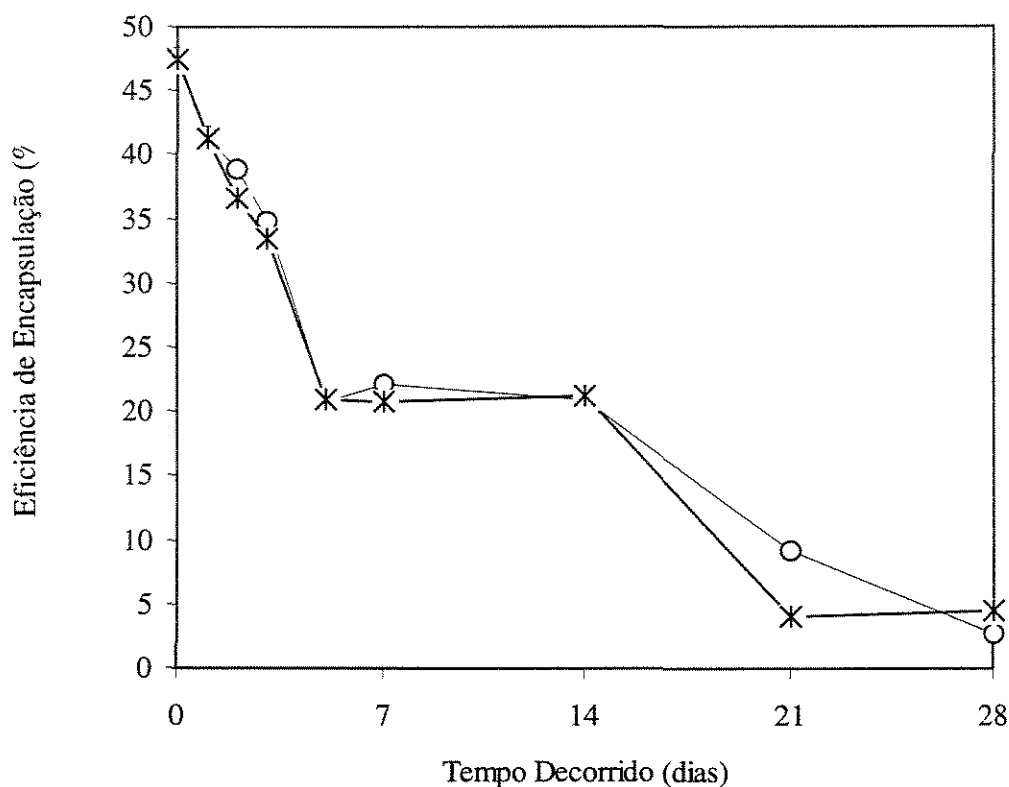


Figura 5.20 - Efeito do tempo decorrido após o estabelecimento do gradiente prótons na eficiência de encapsulação ativa de doxorubicina em vesículas lipídicas de SPC/Col obtidas por injeção de etanol em pequena escala, preparadas em 2 lotes distintos. Vesículas lipídicas com diâmetro médio de 227,8 nm (O) e 210,7 nm (*).

Os valores dos diâmetros médios obtidos para os dois lotes preparados foram superiores aos obtidos anteriormente nas vesículas preparadas por sonicação em pequena escala. Provavelmente este fato se deve a uma maior viscosidade da solução de lipídios em etanol provocada pela baixa temperatura ambiente nos dias em que foram preparadas as vesículas lipídicas (inferior a 20 °C). Embora não tenha sido possível efetuar o controle da temperatura da solução etanólica de lipídios durante o desenvolvimento deste trabalho, observou-se que quando a temperatura ambiente era menor que 20 °C, ocorria a precipitação dos lipídios no tubo localizado na saída da bomba-seringa antes da injeção.

Pode-se observar que um aumento no tempo decorrido após o estabelecimento do gradiente de pH provocou uma desestabilização do mesmo, principalmente após 14 dias, mas verificada mesmo em um curto período após a passagem das vesículas pela coluna cromatográfica.

A eficiência de incorporação do fármaco imediatamente após o estabelecimento do gradiente de pH foi de 47%, portanto superior ao valor esperado, de 35%, em decorrência do maior diâmetro das vesículas lipídicas.

A incorporação ativa do fármaco depois de transcorridas as primeiras 24 horas teve uma diminuição na razão molar final doxorrubicina/lipídio de aproximadamente 13% e, conseqüentemente, valores menores de eficiências de encapsulação foram obtidos. Após as primeiras 72 horas depois de se estabelecer o gradiente de pH, a eficiência de encapsulação diminuiu em até 64%. De forma correspondente, a concentração de fármaco encapsulado no interior aquoso das vesículas também teve uma diminuição significativa neste período, sendo obtidos nas primeiras horas valores na faixa de 0,22 mmol/L e após um mês de estocagem das vesículas a 5 °C em geladeira, esta concentração de fármaco incorporado ativamente diminuiu para 0,017 mmol/L.

Uma vez que este estudo mostrou uma baixa estabilidade do gradiente de pH das vesículas lipídicas principalmente durante as primeiras 72 horas, realizou-se então um estudo no qual se avaliou mais detalhadamente este período, para lipossomas preparados por sonicação com diâmetro médio de 108,8 nm. Nestes ensaios foi utilizada uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 1, com eficiência de incorporação de até 69%. Embora as eficiências de encapsulação obtidas para estas vesículas tenham sido maiores que as atingidas anteriormente, provavelmente pela maior razão molar inicial empregada, os resultados (Figura 5.21) novamente mostram a instabilidade do gradiente de pH estabelecido. Três dias após a passagem das vesículas lipídicas pela coluna cromatográfica, as razões molares finais fármaco/lipídio diminuíram em 45% e, conseqüentemente, menores eficiências de encapsulação foram obtidas. Estes resultados indicam claramente que a incorporação ativa de fármacos em lipossomas preparados por esta metodologia deve ser efetuada tão logo o gradiente de pH seja estabelecido nas vesículas, sob pena de severa redução na eficiência de encapsulação em caso contrário.

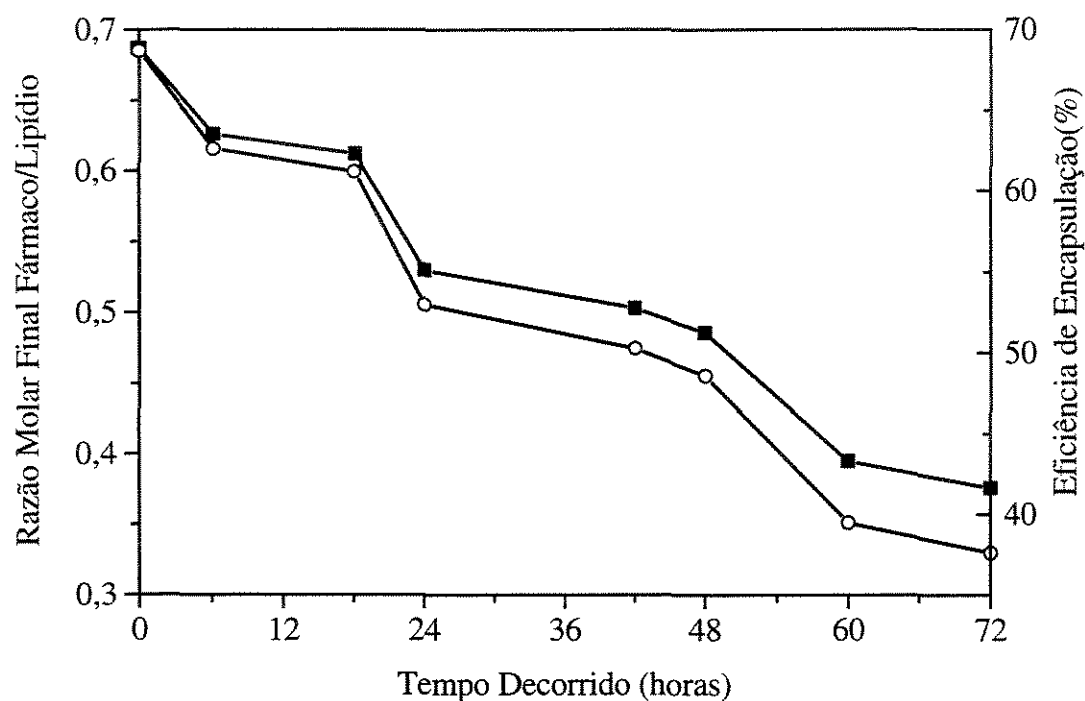


Figura 5.21 – Estabilidade do gradiente de prótons estabelecido em vesículas lipídicas de SPC/Col com diâmetro médio de 108,8 nm obtidas por injeção de etanol em pequena escala na avaliação da razão molar final fármaco/lípido (■) e na eficiência de encapsulação (○).

5.3. Escalonamento da Produção de Lipossomas Encapsulando Agentes Tuberculostáticos por Injeção de Etanol

Comumente, em escala laboratorial, os lipossomas são preparados pelo método de hidratação do filme seco seguida de extrusão, metodologia de difícil escalonamento. Este método foi empregado inicialmente neste trabalho para que se pudesse efetuar uma comparação entre as duas estratégias de preparação de lipossomas, a hidratação seguida de extrusão e a injeção manual de etanol também em escala de bancada. Em ambas as metodologias a capacidade máxima de produção, de posse dos materiais e equipamentos disponíveis no laboratório, era de até 20 mL.

A obtenção automatizada de lipossomas pelo método de injeção de etanol foi realizada através do uso da instalação experimental para o escalonamento do processo mostrada na Figura 4.3. A injeção nesta etapa foi realizada com uma bomba seringa podendo-se empregar seringas de até 60 mL de capacidade volumétrica. Considerando que o volume de solvente orgânico representa em torno de 5% do volume total preparado de suspensão de lipossomas, pode-se então preparar um volume de lipossomas de até 1,2 L, o que representa uma ampliação de escala de 60 vezes.

Desta forma, a escala de preparação não pôde ser aumentada mais que 60 vezes em decorrência de limitações físicas da bomba injetora.

Em um sistema no qual dois fluidos completamente miscíveis são misturados, quase sempre verifica-se regiões ricas em um fluido e regiões ricas no outro, caso a mistura seja ineficiente. Quando o tempo requerido para estes dois fluidos formarem uma mistura homogênea não for muito curto com relação ao tempo necessário para ocorrerem outros possíveis processos, considera-se que estes possam estar ocorrendo durante o processo de homogeneização ou quando as moléculas de um fluido entram em contato com as moléculas do outro. Este é o caso dos processos envolvendo fluidos muito viscosos ou processos muito rápidos como o método de preparação de lipossomas por injeção de etanol. Nestes sistemas uma homogeneização adequada é de importância primária e freqüentemente a uniformidade das partículas relaciona-se com a energia gasta para homogeneizar os fluídos. O tamanho e algumas propriedades físicas das partículas são intimamente influenciados pela velocidade do processo e pela distribuição das moléculas. Mesmo em sistemas homogêneos muitas outras variáveis podem afetar a taxa de mistura, como a temperatura, a pressão e a composição das fases (Levenspiel, 1999).

A homogeneização das amostras foi realizada através de um agitador de hélice mecânico e a temperatura da solução aquosa nesta etapa foi controlada por um banho termostático.

Nesta instalação experimental, foi realizado o estudo da influência de variáveis operacionais envolvidas no processo de preparação dos lipossomas como a intensidade de agitação, a vazão de injeção da solução orgânica, a temperatura da fase aquosa e a concentração inicial de lipídios. As características finais analisadas nas vesículas obtidas

foram o diâmetro médio final das vesículas e a eficiência de encapsulação dos fármacos pirazinamida e kanamicina. A incorporação dos fármacos foi efetuada em condições ótimas, conforme estabelecido nos experimentos em pequena escala, buscando-se um comprometimento entre a eficiência de incorporação e a estabilidade dos compostos testados.

Este estudo foi realizado utilizando-se como ferramenta estatística o planejamento experimental. As variáveis operacionais escolhidas foram estudadas em um planejamento experimental com repetição no ponto central e em dois níveis, mostrados na Tabela 5.18. Devido a limitações na solubilidade dos lipídios no solvente orgânico etanol, os ensaios foram realizados avaliando-se uma faixa de concentração inicial de lipídios de 50 mmol/L a 100 mmol/L.

Embora a reprodutividade no tamanho médio das vesículas lipídicas preparadas por este procedimento possa ser considerada como relativamente boa, a maior limitação desta metodologia é a obtenção de dispersões de lipossomas diluídas (concentração máxima de 5 mmol/L). Este fato foi abordado e fez-se uma tentativa de contorná-lo adicionando-se dimetilsulfóxido (DMSO) na composição da solução de lipídios em etanol, conforme sugerido por Szoka (1996). Entretanto, este autor empregou no seu trabalho fosfatidilcolina de ovo (EPC), enquanto no presente estudo utiliza-se primordialmente fosfatidilcolina de soja (SPC) e, para a SPC, o DMSO não apresentou efeito solubilizante relevante mesmo a baixas concentrações, de forma que esta limitação não pôde ser contornada com seu emprego.

Neste estudo inicial usando o procedimento automatizado em maior escala a temperatura da fase aquosa na qual foram injetados os lipídios em solução orgânica de etanol foi mantida a 30 °C. Os resultados obtidos para a influência das variáveis nas características finais das vesículas lipídicas preparadas e nas eficiências de encapsulação ativa dos fármacos pirazinamida e kanamicina estão apresentados nos itens seguintes.

5.3.1. Influências das Variáveis Operacionais Concentração Inicial de Lipídios, Agitação e Vazão de Injeção no Diâmetro Médio das Vesículas Lipídicas

Os resultados do planejamento experimental completo estão, conforme já mencionado, apresentados na Tabela 5.18. Pode-se observar que os diâmetros médios das vesículas lipídicas variaram de 390,2 nm até acima de 1000 nm. Os valores destes diâmetros são maiores que os geralmente obtidos por esta metodologia, embora em todos os casos a distribuição típica tenha apresentado amplas faixas de valores de diâmetro.

Tabela 5.18 - Planejamento experimental completo (2³) para o diâmetro médio de vesículas lipídicas de SPC:Col preparadas por injeção de etanol automatizada.

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis independentes</i>			<i>Variáveis resposta</i>	
	<i>Agitação (rpm)</i>	<i>Vazão (mL/h)</i>	<i>Conc. lipídica inicial (mmol/L)</i>	<i>Diâmetro após preparação (nm)*</i>	<i>Diâmetro após GPC (nm)**</i>
1	150	60	50	>1000	432,2
2	650	60	50	429,7	293,8
3	150	300	50	>1000	571,4
4	650	300	50	390,2	216,0
5	150	60	100	>1000	457,7
6	650	60	100	612,5	290,0
7	150	300	100	>1000	604,3
8	650	300	100	769,0	333,6
9	400	180	75	516,0	228,0
10	400	180	75	672,3	264,8

*Amostras diluídas 30 vezes com tampão HEPES.

**Amostras submetidas à cromatografia de permeação em gel.

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

Os diâmetros médios analisados estatisticamente foram os obtidos após a passagem pela coluna de permeação em gel, uma vez que as determinações dos diâmetros logo após a preparação das vesículas lipídicas apresentaram valores de polidispersão muito elevados, provavelmente pela presença de lipossomas muito grandes, com diâmetros superiores aos que poderiam ser efetivamente medidos no equipamento empregado ($<1\ \mu\text{m}$) ou às amplas faixas de tamanho presentes nas vesículas obtidas, não permitindo a obtenção de medidas confiáveis. Os valores dos efeitos dos fatores independentes estudados sobre o diâmetro médio das vesículas lipídicas obtidas são apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19 - Estimativa dos efeitos para o diâmetro médio das vesículas lipídicas, para 95% de confiança.

	<i>Efeito</i>	<i>Desvio</i> <i>Padrão</i>	<i>t (1)</i>	<i>p</i>	<i>Lim. Conf</i> <i>-95%</i>	<i>Lim. Conf</i> <i>+95%</i>
Média	369,180	8,3	44,8648	0,01419	264,624	473,736
(1) Agitação	-233,050	18,4	-12,6658	0,05016	-466,844	0,744
(2) Vazão	62,900	18,4	3,4185	0,18117	-170,894	296,694
(3) Concentração	43,050	18,4	2,3397	0,25714	-190,744	276,844
(1) x (2)	-80,000	18,4	-4,3478	0,14392	-313,794	153,794
(1) x (3)	13,850	18,4	0,7527	0,58923	-219,944	247,644
(2) x (3)	32,200	18,4	1,7500	0,33050	-201,594	265,994
(1) x (2) x (3)	28,500	18,4	1,5489	0,36497	-205,294	262,294

De acordo com esses resultados, verificou-se que para um nível de confiança de 95%, nenhum fator estudado foi estatisticamente significativo. Uma vez que o sistema experimental mostrou variações de aproximadamente 14% entre os valores das duplicatas

referentes ao ponto central, considerou-se conveniente reduzir este limite de confiança para 90%. Os novos efeitos calculados considerando-se este limite são mostrados na Tabela 5.20.

Observa-se pela Tabela 5.20 que, dos três fatores estudados, o mais significativo sobre o diâmetro médio das vesículas lipídicas foi a agitação. Fazendo uma análise da variância (ANOVA) para o diâmetro médio dos lipossomas, obteve-se os valores mostrados na Tabela 5.21.

Neste estudo, o coeficiente de correlação do modelo (0,62) e o teste F (valor calculado 3,76 vezes maior que o valor tabelado) não exibiram altos valores a 90% de confiança, conduzindo a uma regressão não significativa.

Tabela 5.20 - Valores de coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial, para o diâmetro médio das vesículas lipídicas obtidas de SPC:Col.

	<i>Coef. de Regressão</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>t (1)</i>	<i>p</i>	<i>Lim.Conf -90%</i>	<i>Lim.Conf +90%</i>
Média	369,180	8,3	44,8648	0,01419	317,226	421,134
(1) Agitação*	-116,525	9,2	-12,666	0,05016	-174,612	-58,439
(2) Vazão	31,450	9,2	3,4185	0,18117	-26,637	89,537
(3) Concentração	21,525	9,2	2,3397	0,25714	-36,562	79,612
(1) x (2)	-40,000	9,2	-4,3478	0,14392	-98,087	18,087
(1) x (3)	6,925	9,2	0,7527	0,58923	-51,162	65,012
(2) x (3)	16,100	9,2	1,7500	0,33050	-41,987	74,187
(1) x (2) x (3)	14,250	9,2	1,5489	0,36497	-43,837	72,337

*fator estatisticamente significativo a 90% de confiança.

Tabela 5.21 – Resultados da análise da variância para o diâmetro médio dos lipossomas.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	108624,6	1	108624,6	12,996
Resíduo	66865,7	8	8358,2	
Falta de Ajuste	66188,6	7		
Erro Puro	677,1	1		
Total	175490,3	9		

Coefficiente de correlação $R^2=0,62$

$F_{0,90;1;8}=3,76$

Os efeitos apresentados pelas variáveis são representados na Figura 5.22 observa-se facilmente que a variável independente que mais afetou o diâmetro médio das vesículas foi a agitação, sendo que um aumento no valor desta variável resultou em grande diminuição no valor da resposta.

Nos métodos de injeção, segundo Lasic (1988), geralmente são formadas vesículas unilamelares pequenas, embora vesículas grandes possam também ser obtidas dependendo da energia ou potência dissipada no sistema. Em um sistema a baixa concentrações lipídicas, precipitados fosfolipídicos hidratados formam-se somente em um estado de baixa energia. Vesículas multilamelares apresentam altas energias no sistema, apesar de que em sistemas nos quais se formam lipossomas unilamelares, esta energia seja ainda maior.

Conforme discutido por Szoka (1996), provavelmente este resultado se deve ao fato de ser a intensidade de agitação da fase aquosa o que determina o movimento e a organização das moléculas na solução aquosa, de maneira que uma agitação intensa provocaria maior homogeneidade no sistema, evitando a agregação das moléculas e a formação de vesículas maiores. Um efeito inverso pode ser atribuído às variáveis vazão e concentração lipídica, nas quais um incremento em seus valores conduziria a um aumento

nos valores dos diâmetros médios, possivelmente em decorrência do estabelecimento de condições mais propícias para a supersaturação local em lipídios.

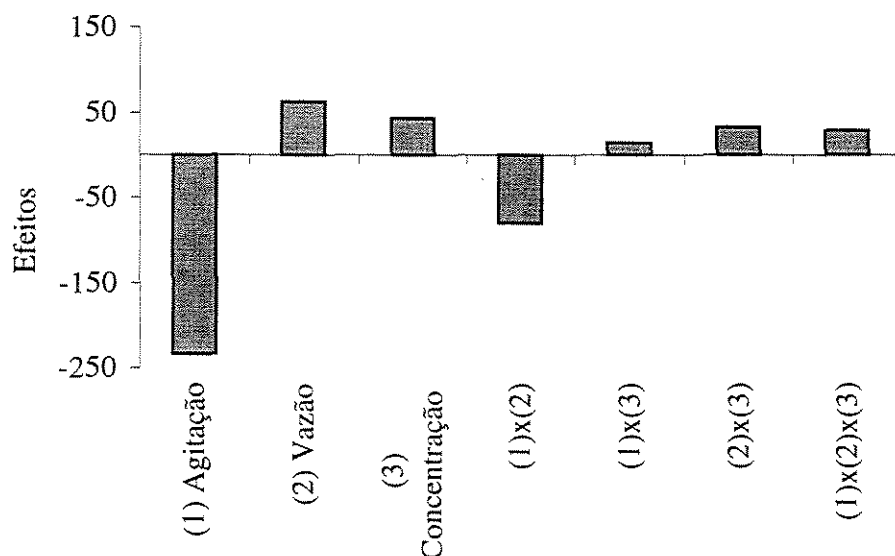


Figura 5.22 – Efeitos das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre a variável resposta diâmetro médio das vesículas de SPC:Col.

A partir dos resultados obtidos, para a obtenção dos valores de diâmetros desejáveis (100 nm a 300 nm), poderia ser realizado um novo planejamento com vistas a avaliar um modelo quadrático, estudando as variáveis mais significativas. Apesar dos modelos matemáticos obtidos não serem significativos do ponto de vista estatístico, a nova faixa a estudar poderia ser escolhida através da análise da Figura 5.23, que mostra claramente as tendências de comportamento do sistema estudado, observando-se que um ótimo para o diâmetro médio das vesículas poderia ser atingido se se avaliasse uma faixa mais estreita de agitação (300 rpm – 600 rpm). Entretanto, estes resultados devem ser também discutidos à luz dos resultados dos planejamentos experimentais realizados para a encapsulação dos fármacos como relatado a seguir, uma vez que os efeitos apresentados pelas variáveis estudadas nas características das vesículas poderiam não ser os mesmos apresentados para as eficiências de encapsulação dos fármacos.

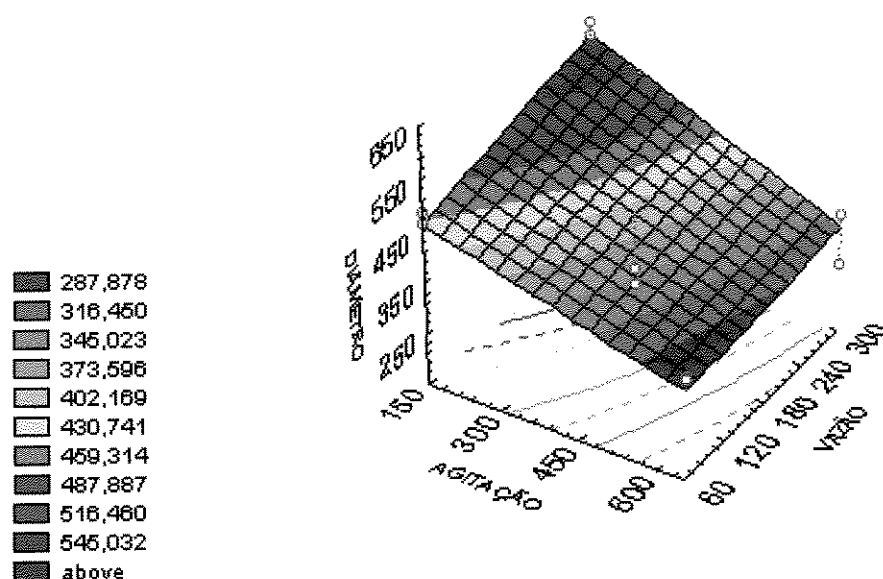


Figura 5.23 – Superfície representativa da influência das variáveis agitação e vazão no diâmetro médio das vesículas lipídicas.

5.3.2. Influência das Variáveis Operacionais Concentração Inicial de Lipídios, Agitação e Vazão de Injeção na Incorporação Ativa de Pirazinamida

As vesículas descritas no item anterior, preparadas em condições distintas, poderiam apresentar, além de diferentes diâmetros médios, outras características distintas. Por exemplo, empacotamentos lipídicos com maior ou menor fluidez, vesículas com diferentes volumes de cernes aquosos e diferentes número de lamelas, entre outras. Estas características afetariam diretamente a permeabilidade aos fármacos e aos íons H^+ e o desempenho quanto à sua incorporação e retenção.

Os resultados do planejamento experimental completo realizado para avaliar os fatores mais importantes quanto à produção dos lipossomas na eficiência de encapsulação ativa da pirazinamida em vesículas preparadas pela metodologia automatizada de injeção

de etanol estão mostrados na Tabela 5.22. As condições de incubação do fármaco com os lipossomas foram de 60 °C a 200 rpm durante 10 minutos a uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 0,2.

Tabela 5.22 - Planejamento experimental completo (2^3) para a encapsulação da pirazinamida em lipossomas de SPC:Col preparados pelo procedimento automatizado de injeção de etanol.

<i>Ensaio</i>	<i>Agitação (rpm)</i>	<i>Vazão (mL/h)</i>	<i>Concentração lipídica inicial (mmol/L)</i>	<i>Razão molar F/L final</i>	<i>Eficiência de encapsulação (%)</i>
1	150	60	50	0,0266	13,3
2	650	60	50	0,0164	8,2
3	150	300	50	0,0304	15,2
4	650	300	50	0,0170	8,5
5	150	60	100	0,0850	42,5
6	650	60	100	0,0590	29,5
7	150	300	100	0,0438	21,9
8	650	300	100	0,0254	12,7
9	400	180	75	0,0144	7,2
10	400	180	75	0,0194	9,7

Pode-se observar pela Tabela 5.22 que as eficiências de encapsulação para a pirazinamida variaram de 7,23% a 42,46%, sendo o melhor resultado obtido no ensaio 5, quando se prepararam as vesículas com uma agitação de 150 rpm, uma vazão de injeção de 60 mL/h e uma concentração lipídica inicial de 100 mmol/L.

Os efeitos dos fatores sobre a eficiência de encapsulação de pirazinamida estão indicados na Tabela 5.23. De acordo com esses resultados, verifica-se que nenhum fator

estudado é estatisticamente significativo a um nível de 95% de confiança. Novamente foi conveniente considerar um menor limite de confiança para o sistema. Os resultados calculados considerando-se 90% de confiança estão apresentados na Tabela 5.24.

Tabela 5.23 - Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação de pirazinamida nas vesículas lipídicas obtidas, para 95% de confiança.

	<i>Efeito</i>	<i>Desvio</i> <i>Padrão</i>	<i>t (l)</i>	<i>p</i>	<i>Lim.Conf</i> <i>-95%</i>	<i>Lim.Conf</i> <i>+95%</i>
Média	16,859	0,55	30,6487	0,0208	9,8697	23,8483
(1) Agitação	-8,508	1,23	-6,9167	0,0914	-24,1361	7,1211
(2) Vazão	-8,808	1,23	-7,1606	0,0883	-24,4361	6,8211
(3) Concentração	15,353	1,23	12,4817	0,0509	-0,2761	30,9811
(1) x (2)	0,558	1,23	0,4533	0,7291	-15,0711	16,1861
(1) x (3)	-2,583	1,23	-2,0996	0,2830	-18,2111	13,0461
(2) x (3)	-9,863	1,23	-8,0183	0,0790	-25,4911	5,7661
(1) x (2) x (3)	1,333	1,23	1,0833	0,4746	-14,2961	16,9611

Observa-se pela Tabela 5.24 que os fatores mais significativos foram a agitação, a vazão, a concentração lipídica inicial e o termo de interação entre a vazão e a concentração. Ignorando-se os efeitos não significativos, os resultados da análise da variância (ANOVA) para a eficiência de encapsulação da pirazinamida são mostrados na Tabela 5.25.

O coeficiente de correlação (0,831) e o teste F (valor calculado 1,74 vezes maior que o valor tabelado) mostram que o modelo linear proposto não é estatisticamente adequado para o sistema de dados obtidos.

Tabela 5.24 - Valores de coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), para a eficiência de encapsulação de pirazinamida nos lipossomas.

	<i>Coef. de Regressão</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>t (1)</i>	<i>p</i>	<i>Lim.Conf -90%</i>	<i>Lim.Conf +90%</i>
Média	16,859	0,5500	30,6487	0,0208	13,3859	20,3320
(1) Agitação*	-4,254	0,6150	-6,9167	0,0914	-8,1367	-0,3708
(2) Vazão*	-4,404	0,6150	-7,1606	0,0883	-8,2867	-0,5208
(3) Concentração	7,676	0,6150	12,4817	0,0509	3,7933	11,5592
(1) x (2)	0,279	0,6150	0,4533	0,7291	-3,6042	4,1617
(1) x (3)	-1,291	0,6150	-2,0996	0,2830	-5,1742	2,5917
(2) x (3)*	-4,931	0,6150	-8,0183	0,0790	-8,8142	-1,0483
(1) x (2) x (3)	0,666	0,6150	1,0833	0,4746	-3,2167	4,5492

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Tabela 5.25 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da pirazinamida nas vesículas de SPC:Col obtidas por injeção de etanol em maior escala.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	965,836	4	241,459	6,13
Resíduo	196,895	5	39,379	
Falta de Ajuste	193,869	4		
Erro Puro	3,026	1		
Total	1162,731	9		

Coeficiente de correlação $R^2=0,831$

$F_{0,90;4;5}=3,52$

Analisando-se o efeito de cada variável independente sobre a resposta (Figura 5.24), observa-se que a variável que tem maior efeito é a concentração inicial de lipídios seguida do efeito da interação da mesma com a vazão usada na injeção. Se se considera como aplicável o modelo matemático linear obtido, para a geração de curvas do tipo superfícies de resposta (Figuras 5.25 e 5.26), pode-se observar mais claramente que um decréscimo na agitação gera uma maior eficiência de encapsulação do fármaco, sendo esse efeito muito mais evidenciado para uma maior concentração lipídica inicial. A vazão de injeção teve um comportamento similar ao da agitação, sua diminuição provoca um aumento na eficiência de encapsulação, embora este efeito seja mais apreciável a concentrações maiores de 75 mmol/L. Para a concentração, que foi o efeito mais significativo, um acréscimo no seu valor gerou sempre maiores eficiências de encapsulação. Provavelmente ao se trabalhar com menores valores de intensidade de agitação, vesículas maiores estariam sendo formadas como já foi discutido, o que poderia estar relacionado com um maior volume aquoso no interior das vesículas e um maior potencial de encapsulação. Estes efeitos são mais evidenciados quando concentrações altas de lipídios são empregadas, o que geralmente resulta em vesículas com maior número de moléculas, menor curvatura e maior diâmetro.

As figuras indicam que para otimizar a eficiência de encapsulação da pirazinamida seria conveniente aumentar a concentração lipídica inicial, reduzir a vazão de injeção e trabalhar com uma agitação em torno de 400 rpm. Contudo, nestas novas condições o sistema experimental utilizado é limitado operacionalmente, uma vez que a mínima vazão de injeção usada já é muito próxima do limite operacional inferior do equipamento (bomba seringa) e a maior concentração lipídica inicial empregada, foi justamente o máximo valor atingido de solubilidade para os lipídios em etanol.

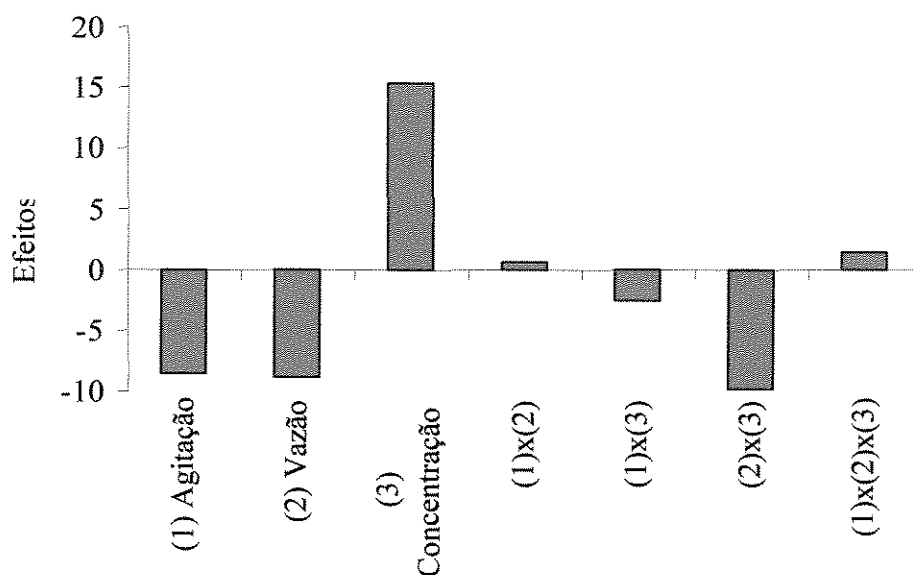


Figura 5.24 – Efeitos das variáveis independentes estudadas e de suas interações sobre a eficiência de encapsulação da pirazinamida nas vesículas de SPC:Col.

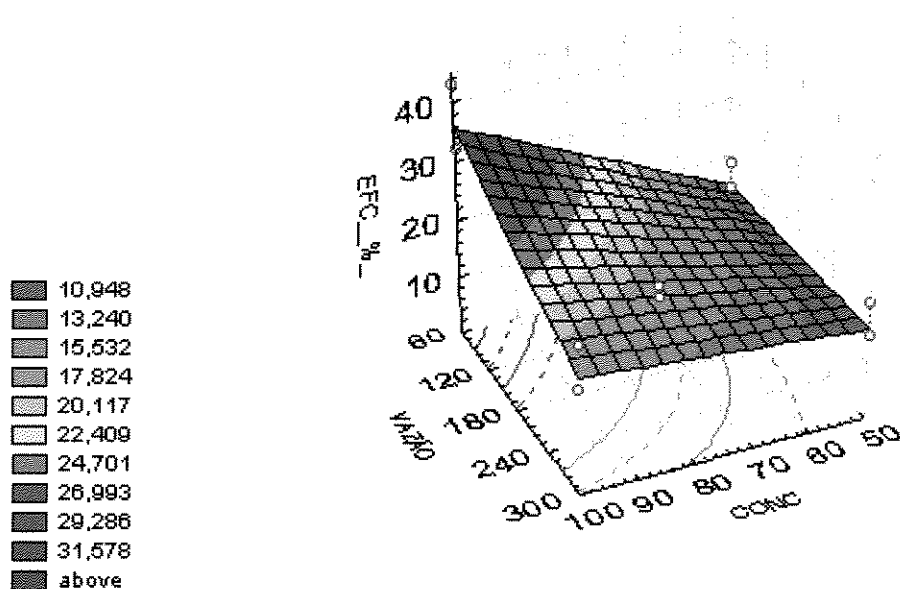


Figura 5.25 - Superfície representativa da influência das variáveis: concentração lipídica inicial e vazão na eficiência de encapsulação de pirazinamida nas vesículas lipídicas.

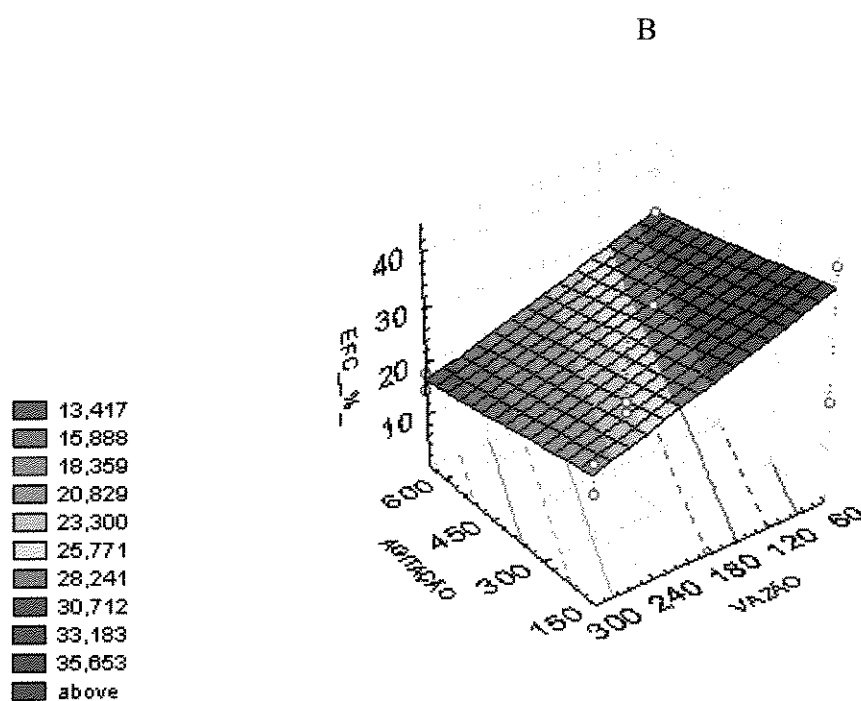
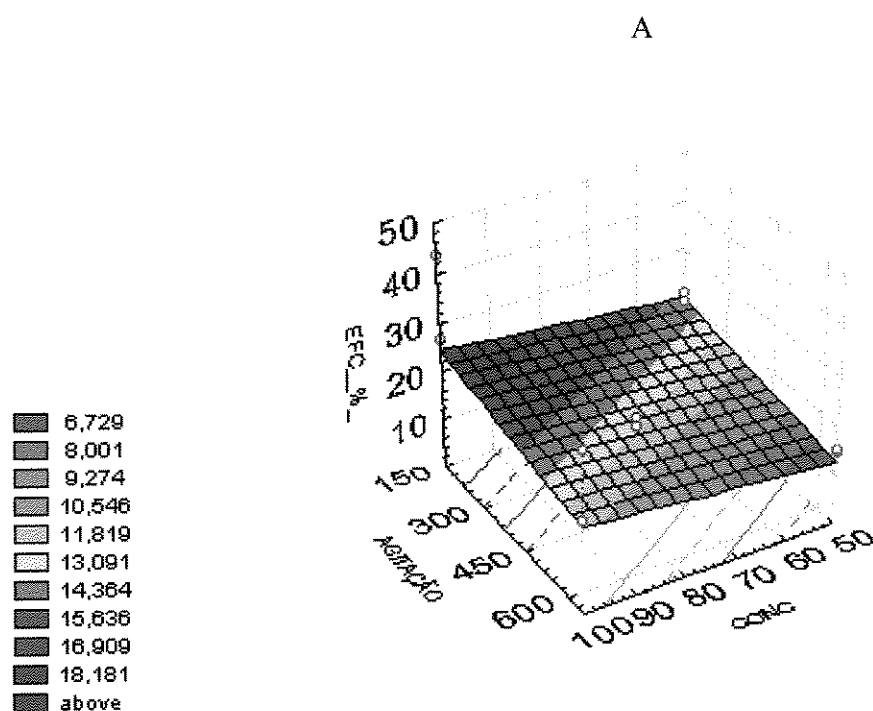


Figura 5.26 - Superfície representativa da influência das variáveis: concentração lipídica inicial e intensidade de agitação (A) e vazão de injeção e intensidade de agitação (B) na eficiência de encapsulação de pirazinamida nas vesículas lipídicas.

5.3.3. Influências das Variáveis Operacionais Concentração Inicial de Lipídios, Agitação e Vazão de Injeção na Incorporação Ativa de Kanamicina

O planejamento experimental completo realizado para avaliar o efeito das variáveis independentes mais importantes do processo de preparação das vesículas pela metodologia de injeção de etanol na eficiência de encapsulação ativa da kanamicina resultou nos dados apresentados na Tabela 5.26. Para a kanamicina foram empregadas as mesmas condições de encapsulação ativa já descritas anteriormente para a pirazinamida.

Tabela 5.26 - Planejamento experimental completo (2^3) para a encapsulação da kanamicina em lipossomas de SPC:Col preparados pelo procedimento automatizado de injeção de etanol.

<i>Ensaio</i>	<i>Agitação (rpm)</i>	<i>Vazão (mL/h)</i>	<i>Concentração lipídica inicial (mmol/L)</i>	<i>Razão molar final F/L</i>	<i>Eficiência de Encapsulação (%)</i>
1	150	60	50	0,1144	57,18
2	650	60	50	0,1058	52,92
3	150	300	50	0,1194	59,72
4	650	300	50	0,0504	25,19
5	150	60	100	0,2000	100,00
6	650	60	100	0,1339	66,94
7	150	300	100	0,2000	100,00
8	650	300	100	0,1494	74,72
9	400	180	75	0,0502	25,12
10	400	180	75	0,0400	20,00

Pode-se observar que as eficiências de encapsulação para este composto terapêutico variaram de 25% a 100%, sendo os melhores resultados os obtidos nos ensaios 5 e 7, quando as vesículas lipídicas foram preparadas com uma concentração lipídica inicial de 100 mmol/L, uma agitação de 150 rpm e vazões de injeção de 60 mL/h e 300 mL/h respectivamente.

Os efeitos estatísticos dos fatores estudados sobre a eficiência de encapsulação da kanamicina foram calculados, verificando-se que o único fator significativo a um nível de 95% de confiança é a concentração lipídica inicial (Tabela 5.27). Considerando um limite de confiança menor para o sistema, uniu-se a este fator a taxa de agitação da fase aquosa. Os resultados calculados considerando-se 90% de confiança estão apresentados na Tabela 5.28.

Tabela 5.27 - Estimativa dos efeitos para a eficiência de encapsulação de kanamicina nas vesículas lipídicas obtidas, para 95% de confiança.

	<i>Efeito</i>	<i>Desvio</i> <i>Padrão</i>	<i>t (l)</i>	<i>p</i>	<i>Lim. Conf</i> <i>-95%</i>	<i>Lim. Conf</i> <i>+95%</i>
	Média	58,1790	1,14	50,8173	0,0125	43,6321 72,7259
(1)	Concentração*	36,6625	2,56	14,3213	0,0444	4,1346 69,1904
(2)	Agitação	-24,2825	2,56	-9,4854	0,0669	-56,8104 8,2454
(3)	Vazão	-4,3525	2,56	-1,7002	0,3385	-36,8804 28,1754
	(1) x (2)	-4,8875	2,56	-1,9092	0,3072	-37,4154 27,6404
	(1) x (3)	8,2425	2,56	3,2197	0,1917	-24,2854 40,7704
	(2) x (3)	-5,6225	2,56	-2,1963	0,2720	-38,1504 26,9054
	(1) x (2) x (3)	9,5125	2,56	3,7158	0,1674	-23,0154 42,0404

*fator estatisticamente significativo a 95% de confiança.

Tabela 5.28 - Valores de coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança (90%), obtidos do planejamento fatorial, para a eficiência de encapsulação de kanamicina nas vesículas lipídicas obtidas.

	<i>Coef. de Regressão</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>t (1)</i>	<i>p</i>	<i>Lim. Conf -90%</i>	<i>Lim. Conf +90%</i>
Média	58,1790	1,14	50,8173	0,1253	50,9506	65,4074
(1) Concentração*	18,3313	1,28	14,3213	0,0444	10,2496	26,4129
(2) Agitação*	-12,1413	1,28	-9,4854	0,0669	-20,2229	-4,0597
(3) Vazão	-2,1763	1,28	-1,7002	0,3385	-10,2579	5,9054
(1) x (2)	-2,4437	1,28	-1,9092	0,3072	-10,5254	5,6379
(1) x (3)	4,1212	1,28	3,2197	0,1917	-3,9604	12,2029
(2) x (3)	-2,8113	1,28	-2,1963	0,2720	-10,8929	5,2704
(1) x (2) x (3)	4,7563	1,28	3,7158	0,1674	-3,3254	12,8379

*fatores estatisticamente significativos a 90% de confiança.

Pelos resultados da Tabela 5.28, chegou-se à Equação 5.4, que descreve a resposta da eficiência de encapsulação da kanamicina em função das variáveis analisadas estatisticamente significativas, na forma codificada.

$$E(\%) = 58,18 + 18,33 \times X1 - 12,14 \times X2 \quad (5.4)$$

X1: variável codificada da concentração.

X2: variável codificada da agitação.

Ignorando-se os efeitos não significativos, os resultados da análise da variância (ANOVA) para a eficiência de encapsulação da kanamicina, são mostrados na Tabela 5.29. O coeficiente de correlação (0,514) e o teste F (valor calculado 1,13 vezes maior que o

valor tabelado) mostraram que, assim como nos casos anteriores, o modelo linear obtido não é estatisticamente adequado para descrever o sistema em estudo.

Tabela 5.29 - Análise da variância para a eficiência de encapsulação da kanamicina nas vesículas de SPC:Col obtidas por injeção de etanol.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Teste F</i>
Regressão	3867,557	2	1933,7785	3,71
Resíduo	3650,632	7	521,52	
Falta de Ajuste	3637,525	6		
Erro Puro	13,107	1		
Total	7518,189	9		

Coefficiente de correlação $R^2=0,514$

$F_{0,90;4;5}=3,26$

Pode ser observado na Figura 5.27 que a variável independente que mais afetou a encapsulação ativa da kanamicina foi a concentração lipídica inicial seguida do efeito da agitação, sendo que um aumento no valor desta primeira variável resulta em um grande aumento no valor da resposta. Um efeito inverso foi relacionado à variável agitação da fase aquosa, na qual um incremento em seus valores conduziu a diminuições nos valores de eficiências e um decréscimo na agitação gerou uma maior eficiência de encapsulação do fármaco, sendo esse efeito muito mais evidenciado para uma maior concentração lipídica inicial. A diminuição da vazão de injeção provocou um pequeno aumento na eficiência de encapsulação, embora este efeito tenha sido quase 6 vezes menor que o apresentado pela agitação. Estes resultados são muito semelhantes aos obtidos no estudo da incorporação do composto pirazinamida. Provavelmente a encapsulação destes compostos, com características hidrofílicas, esteja relacionada com os mesmos parâmetros das vesículas obtidas por esta metodologia.

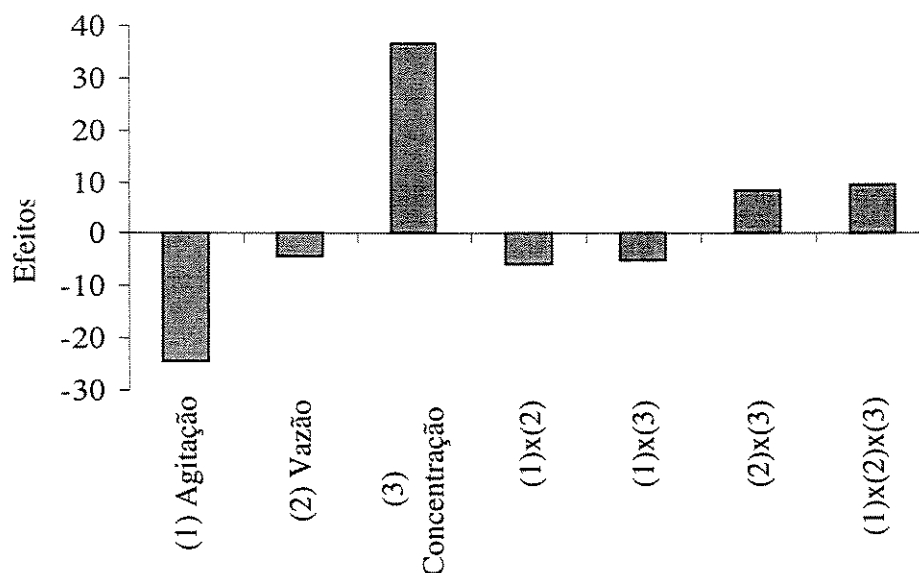


Figura 5.27 – Efeitos das variáveis independentes: concentração inicial de lipídios, vazão de injeção, agitação e de suas interações sobre a eficiência de encapsulação da kanamicina nas vesículas de SPC:Col.

A Figura 5.27 também indica que para aumentar a eficiência de encapsulação da kanamicina, seria conveniente aumentar a concentração lipídica inicial, diminuir a agitação da fase aquosa e a vazão de injeção da solução orgânica. Contudo esta nova condição experimental seria limitada operacionalmente, conforme discutido anteriormente para a incorporação de pirazinamida. Ressalta-se também que uma diminuição na agitação da fase aquosa, embora aumente a eficiência de encapsulação da kanamicina, também provocaria um aumento no diâmetro médio das vesículas conforme analisado anteriormente. Este aumento de tamanho não seria recomendável se os alvos destes lipossomas fossem as terapias pulmonar profunda e intravenosa, que requerem diâmetros médios menores que 400 nm. Esta análise permite concluir também que as situações nas quais os melhores valores de eficiências de encapsulação foram obtidos são justamente aquelas nas quais se tem a presença das vesículas com tamanhos maiores, o que é atribuído ao maior volume de captura de solução de ácido cítrico por vesícula, que, por sua vez, garante maior capacidade de tamponamento do meio intravesicular, permitindo maior acumulação do fármaco.

5.3.4. Influência da Temperatura da Fase Aquosa, do Tipo de Agitação e do Diâmetro da Agulha de Injeção nas Características das Vesículas Lipídicas

Uma vez que nos estudos anteriores foram obtidos valores de diâmetros médios para as vesículas preparadas por injeção de etanol em maior escala muito elevados e acima da faixa requerida para as aplicações desejadas, realizou-se um estudo com outros parâmetros cujos efeitos poderiam estar influenciando as características finais das vesículas lipídicas, tais como a temperatura da fase aquosa, o tipo de agitação e o diâmetro da agulha usada na injeção da fase orgânica.

As vesículas foram preparadas usando uma concentração lipídica (SPC:Col) inicial de 100 mmol/L na razão molar de 60:40 mol% e nos primeiros ensaios, mostrados na Tabela 5.30, os lipossomas foram preparados a uma temperatura fixa de 30 °C e uma vazão de injeção de 60 mL/h.

Nestes experimentos foram usados dois sistemas com características fluidodinâmicas diferentes, uma vez que se variou o mecanismo de agitação (homogeneização) da solução aquosa na qual era injetada a solução etanólica de lipídios. O primeiro sistema consistiu de um recipiente agitado com dos diferentes tipos de impelidores: a) um impelidor de turbina tipo hélice com três pás e b) um impelidor tipo barra magnética de teflon acionado por agitador magnético. No segundo sistema foi usado um recipiente, sem agitação mecânica, utilizando como mecanismo de agitação um dispositivo de sonicação do tipo banho ultrassônico.

Pode-se observar que todos estes fatores têm grandes efeitos nas características finais do sistema obtido, embora o efeito seja mais evidente quando da alteração no tipo de agitação.

Ao analisar os resultados apresentados na Tabela 5.30 observa-se que um aumento na intensidade de agitação influenciou o diâmetro das vesículas lipídicas, verificando-se uma redução do valor do diâmetro quando comparada a agitação com o impelidor de turbina tipo hélice com a agitação magnética, ou seja, a intensidade de agitação foi inversamente proporcional ao diâmetro das vesículas lipídicas. Para explicar melhor estes resultados, é conveniente fazer uma análise dos mecanismos de mistura envolvidos.

Tabela 5.30 - Valores de diâmetro médio de vesículas de SPC:Col preparadas pelo método de injeção de etanol.

<i>Ensaio</i>	<i>Tipo de Homogeneização da Solução Aquosa</i>	<i>Diâmetro da Agulha (μm)</i>	<i>Diâmetro Médio para as Diferentes Populações de Vesículas (nm)</i>
1	Mecânica, com impelidor turbina do tipo hélice de 4 cm e com 3 pás. Intensidade de agitação de 650 rpm e potência de 0,07 kW	4	29,8 (5,2%), 152,3 (86,4%), 1574,3 (7,1%), 3803,6 (1,3%)
2	Mecânica, com impelidor tipo barra magnética. Potência de 0,25 kW	4	132,7 (85,9%) 715,5 (14,1%)
3	Sonicação, por banho de ultra-som. Potência de 0,1 kW	4	160,3 (100%)
4	Sonicação, por banho de ultra-som. Potência de 0,1 kW	7	233,5 (100%)

Os agitadores mecânicos imprimem um movimento tangencial no fluido que tende a igualar as velocidades das diferentes camadas deste no recipiente de mistura. Este movimento inclusive pode gerar a formação indesejável de vórtices. É conhecido que a intensidade com a qual se mistura um sistema depende diretamente do grau de turbulência que se atinge no mesmo. Assim, quando por efeito do impelidor cria-se em um líquido uma corrente de alta velocidade, esta tende a transmitir mais rápido o movimento às outras zonas não atingidas diretamente pelo agitador. Esta quantidade de movimento se transmite pelo atrito do impelidor, sendo o regime turbulento o mais favorável fluidodinamicamente. Por estes motivos, ao se aumentar a intensidade da agitação, há uma menor resistência à transferência de massa da fase orgânica para a fase aquosa, ou seja uma dissolução mais rápida e uniforme do etanol contendo os lipídios na fase aquosa e, conseqüentemente, segundo o mecanismo discutido anteriormente, as moléculas dos lipídios dispersam-se

rapidamente, favorecendo a formação de agregados lipídicos com um pequeno número de moléculas, o que resulta em vesículas lipídicas de menor diâmetro.

Uma última análise destes sistemas agitados mecanicamente pode ser feita com relação à potência transmitida ao fluido, uma vez que ao usar um impelidor de tipo hélice esta potência é menor quando comparada com a dissipada na agitação magnética. Provavelmente, isto se deve a que o movimento do líquido com o agitador tipo hélice ocorre na direção axial, enquanto que o impelidor magnético tem um fluxo na direção radial. Da maneira com que os ensaios foram realizados, o agitador magnético encontrava-se no fundo do recipiente, o que poderia favorecer ao aumento na turbulência do sistema, embora o vórtice apresentado neste sistema tenha sido maior. Este último mostrou ser mais efetivo com relação ao diâmetro das vesículas lipídicas preparadas por injeção de etanol à temperatura ambiente.

Quando comparados os diâmetros médios das vesículas obtidas por sonicação com a melhor condição de agitação mecânica (agitação magnética), observamos uma diminuição do diâmetro dos lipossomas chegando a valores da ordem de 77,5%. Estes resultados certamente são uma consequência da natureza fluidodinâmica que apresenta o sistema ao se usar sonicação como mecanismo de agitação, a qual difere completamente daquela observada com agitação mecânica.

Os efeitos provocados pelos processos de sonicação ocorrem devido ao fenômeno de cavitação acústica, que é o processo de nucleação, crescimento e colapso de bolhas de líquidos expostos a ondas ultrassônicas de baixa frequência (< 1 MHz). Estas ondas se propagam no líquido por ciclos alternados de compressão e expansão, liberando grande quantidade de energia. Desta forma, a sonicação não apenas constitui um efetivo sistema de agitação, mas também a energia por ela liberada contribui para a formação de vesículas menores que aquelas obtidas com agitação mecânica (Lasic, 1988). Finer e col. (1972) propuseram um mecanismo de formação de lipossomas por sonicação, sugerindo que as ondas ultrassônicas induziam colisões entre as vesículas, as quais se rompiam resultando pequenos fragmentos de bicamadas lipídicas ou outras formas de pequenos agregados que se reorganizam em vesículas menores.

Nas vesículas preparadas por sonicação, o diâmetro da agulha utilizada na injeção teve um importante efeito, notando-se que uma diminuição no seu valor origina vesículas também de menor diâmetro médio. Isto pode se dever ao fato que no momento da injeção com a agulha de maior diâmetro, a dissolução do solvente etanol é mais lenta, resultando em maior saturação relativa local. Este fato provavelmente leva a uma distribuição de tamanho de vesículas maior e menos uniforme.

Quando realizada a preparação dos lipossomas variando-se a temperatura da solução aquosa na qual são injetados os lipídios, usando o sistema automatizado (650 rpm e 60 mL/h) acoplado a uma agulha de 4 μm de diâmetro, na mesma concentração lipídica inicial dos ensaios anteriores, obteve-se os resultados mostrados na Tabela 5.31.

Tabela 5.31 - Valores de diâmetro médio de vesículas de SPC:Col preparadas pelo método de injeção de etanol com variações na temperatura da solução aquosa. Diâmetro da agulha: 4 μm .

<i>Lipossoma</i>	<i>Temperatura da solução aquosa (°C)</i>	<i>Diâmetro Médio para as Diferentes Populações de Vesículas (nm)</i>
1	30	27,9 (10,9%), 146,8 (80,8%), 1862,7 (6,8%), 5044,0 (1,3%)
2	40	150,9 (97,1%), 2455,4 (2,9%)
3	50	122,1 (94,8%), 534,1 (5,2%)
4	60	91,2 (100%)

A temperatura da solução aquosa teve um efeito apreciável na faixa de diâmetros obtida e nos diâmetros médios das vesículas lipídicas. Para os lipossomas preparados a uma temperatura de 30 °C, partículas com diâmetro de até 5000 nm foram detectadas, fato que foi somente verificado nesta condição e que impossibilitou a obtenção de medidas de diâmetros médios confiáveis (valores de polidispersão muito altos). A Figura 5.28

apresenta as distribuições dos diâmetros das vesículas lipídicas preparadas em cada um dos ensaios.

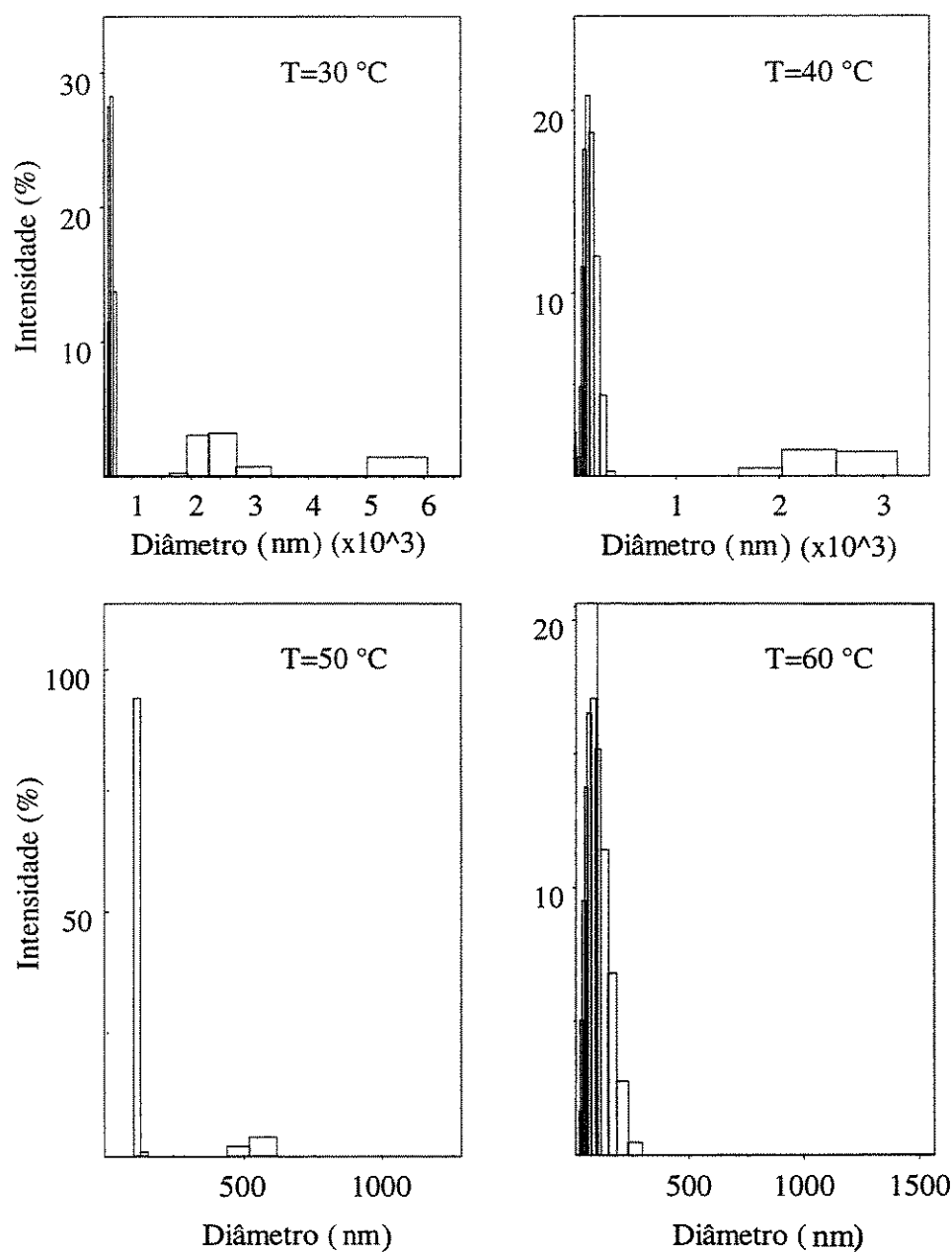


Figura 5.28 - Distribuição de tamanhos dos lipossomas de SPC:Col preparados por injeção de etanol variando-se a temperatura da solução aquosa na qual os lipídios eram injetados. Índices de polidispersão menores que 0,2.

Observa-se que quanto menor a temperatura, maior é o número de populações de vesículas obtidas.

Os resultados obtidos podem ter sido fortemente influenciados por estes valores de temperaturas que diferem em alguns casos da temperatura de transição de fases do SPC (50,4 °C). Embora a patente de autoria de Szoka (1996) não mostre a variável temperatura da fase aquosa como um fator relevante no diâmetro médio das vesículas preparadas por injeção de etanol, isto não é observado no presente estudo. Este fato poderia dever-se a diversos fatores, destacando-se a composição lipídica diferente dos lipossomas preparados pelo autor (fosfatidilcolina de ovo, EPC). Para o estudo de vesículas lipídicas compostas de SPC e Col recomenda-se, por tanto, a utilização de temperaturas de 50 a 60 °C para a obtenção de populações com menores diâmetros e mais homogêneas.

5.3.5. Efeito da Composição Lipídicas dos Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol Automatizada na Encapsulação Ativa de Kanamicina

Variações no tipo e proporção de lipídios empregados na preparação das vesículas lipídicas podem afetar variáveis como o diâmetro médio dos lipossomas, a razão molar final fármaco/lipídio e a eficiência de encapsulação do composto de interesse.

Lipossomas preparados por injeção de etanol automatizada a 50 °C com agitação mecânica de 650 rpm e uma vazão de injeção de 60 mL/h foram preparados usando diferentes composições lipídicas. Nestas vesículas foi realizada a incorporação ativa a 60 °C e 200 rpm durante um tempo de incubação de 10 minutos de kanamicina a uma razão molar inicial fármaco/lipídio de 0,16. Optou-se por este tempo de incubação para não se expor o sistema por muito tempo a condições nas quais possíveis degradações térmicas ocorreriam. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5.32, destacando-se que as populações de vesículas apresentaram distribuições de tamanhos unimodais.

Observa-se que os valores de eficiências de encapsulação variaram entre 6,3% e 57,8%, correspondendo a razões molares finais de 0,010 e 0,093, respectivamente, sendo o melhor desempenho o do sistema composto por DSPC/Col. Embora as vesículas lipídicas

contendo DSPC/Col se mostrem como o melhor sistema dentre os estudados considerando-se também a incorporação dos outros fármacos empregados, seu custo é consideravelmente maior que o observado para a SPC utilizada.

Tabela 5.32 - Incorporação ativa de kanamicina em lipossomas de diferentes composições lipídicas.

<i>Composição do sistema</i>	<i>Razão Molar Final Fármaco/Lipídio</i>	<i>Eficiência de Encapsulação (%)</i>	<i>Diâmetro Médio (nm)</i>
SPC/Col(60:40)	0,033	20,3	107,9
EPC/Col(60:40)	0,018	11,3	116,8
EPC/Col(70:30)	0,010	6,3	128,3
DSPC/Col(60:40)	0,093	57,8	108,4
DSPC/DMPE/Col(40:20:40)	0,032	19,7	145,2
DPPC/Col(60:40)	0,022	13,5	136,5
DPPC/DPPG/Col(55:5:40)	0,043	26,6	122,7

Foi avaliada a estabilidade de estocagem a 5 °C por 8 semanas das vesículas lipídicas preparadas a composições variadas encapsulando ativamente kanamicina e os resultados obtidos são mostrados na Figura 5.29. Logo após a cromatografia estas vesículas tiveram seus diâmetros médios reduzidos em cerca de 2,4% a 13,2%, sendo a maior diminuição a das vesículas de EPC/Col (70/30mol%). Pela Figura 5.29 observa-se que o diâmetro médio das vesículas encapsulando o composto não sofreu grandes alterações durante o tempo analisado, apresentando tendência de aumento.

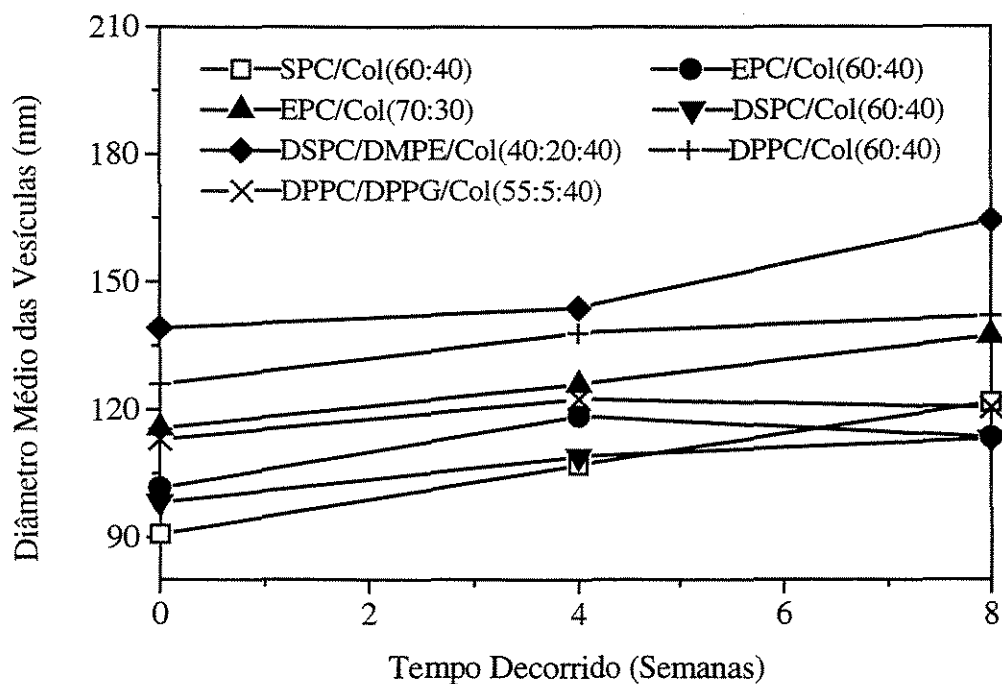


Figura 5.29 - Variações no diâmetro hidrodinâmico durante o tempo de estocagem de 8 semanas a 5 °C em geladeira dos lipossomas de composições variadas contendo o composto terapêutico kanamicina em uma razão molar inicial de 0,16.

5.3.6. Desenvolvimento e Aplicação de Modelo Matemático para a Produção das Vesículas Lipídicas de SPC/Col Considerando como Critério de Ampliação de Escala a Potência por Unidade de Volume

O estudo da ampliação de escala varia de processo para processo, pois depende das especificações de cada um. O aumento de escala da produção dos lipossomas pela metodologia de injeção de etanol foi realizado até um volume de preparação de 800 mL usando como critério de ampliação a potência por unidade de volume em reatores cilíndricos agitados (P/V), no qual o diâmetro médio dos lipossomas foi monitorado, com o objetivo de reproduzir as características obtidas na menor escala.

Conforme Schmidell e col. (2001), em tanques cilíndricos agitados, no regime turbulento ($N_{Re} \geq 10^4$), tem-se que o Número de Potência (N_p) é constante:

onde:

$$N_p : \text{Número adimensional de potência} \left(= \frac{P}{N^3 D_i^5 \rho} \right)$$

$$N_{Re} : \text{Número de Reynolds} \left(= \frac{N D_i^2 \rho}{\mu} \right)$$

P : Potência transmitida na agitação (W)

N : Freqüência de rotação (rpm ou rps)

ρ : Densidade do fluido (kg. m^{-3})

μ : Viscosidade do fluido ($\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$)

D_i : Diâmetro do impelidor (m)

Portanto:

$$P \propto N^3 D_i^5$$

O volume do tanque (V) é dado por:

$$V \equiv \pi \frac{D_T^2}{4} H_L$$

onde:

D_T : Diâmetro do tanque (m)

H_L : Altura da coluna de líquido (m)

Como se pretende, na ampliação de escala, manter semelhança geométrica, e sabendo-se que:

$$D_T \propto D_i \text{ e } H_L \propto D_i$$

e mantendo D_i constante, tem-se que:

$$\left(\frac{P}{V}\right)_1 \equiv \left(\frac{P}{V}\right)_2$$

$$\frac{P}{V} \propto \frac{N^3 D_i^5}{V}$$

$$\left(\frac{N^3 D_i^5}{V}\right)_1 = \left(\frac{N^3 D_i^5}{V}\right)_2$$

e portanto:

$$\left(\frac{N^3}{V}\right)_1 = \left(\frac{N^3}{V}\right)_2 \text{ ou } N_2^3 = N_1^3 \left(\frac{V_2}{V_1}\right) \quad (5.5)$$

onde:

N : Frequência de rotação (rpm ou rps)

V : Volume de amostra (mL)

O número de Reynolds, N_{Re} , foi calculado de maneira aproximada para o sistema em estudo, desprezando-se possíveis efeitos da adição do ácido cítrico, do etanol e dos lipídios. Estimou-se a densidade ρ como sendo a da água, igual a 10^3 kg/m^3 . A taxa de agitação N foi estipulada como a 10,83 rotações por segundo (equivalente a 650 rpm ou seja, o valor mais indicado segundo os ensaios de escalonamento anteriormente descritos para a obtenção de vesículas lipídicas com diâmetros médios menores que 400 nm) e o diâmetro do elemento de agitação D_i como 0,06 m. Estimou-se a viscosidade da suspensão lipídica como sendo cerca de 1 mPa.s a 50°C, não considerando a contribuição do ácido cítrico, do hidróxido de sódio para sua neutralização parcial, do etanol, dos lipídios e da água nesta temperatura.

Isto resulta no valor de 38.988 para o N_{Re} , caracterizando um regime turbulento mesmo para a condição na qual seria utilizada a menor taxa de agitação e um diâmetro da hélice do agitador de 0,06 m. Este resultado indica que a modelagem utilizada é, a priori, aplicável ao sistema em estudo.

Empregando-se a equação (5.5), estimou-se o valor de taxa de agitação requerida para cada volume de amostra a ser processado, quando do escalonamento da produção dos lipossomas pelo método de injeção de etanol até um volume de 800 mL. Estes valores estão mostrados na Tabela 5.33.

Foram preparadas duas bateladas de cada amostra de vesículas lipídicas (SPC/Col, 60:40 mol%) para avaliar a reprodutividade do sistema nestas condições. Nestes ensaios, a proporção volumétrica de solução etanólica/fase aquosa manteve-se em 5:95, a temperatura da fase aquosa agitada foi de 50 °C e a vazão de injeção da solução etanólica de lipídios foi de 60 mL/h.

Tabela 5.33 – Condições empregadas durante o escalonamento da produção dos lipossomas de SPC/Col por injeção de etanol. Condições de preparação de referência para a produção de vesículas lipídicas com diâmetro médio menor que 400 nm: 650 rpm e volume total de 80 mL. Concentração de lipídios em etanol de 100 mmol/L, temperatura de 50 °C e vazão de injeção de 60 mL/h

<i>Condição Experimental</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Volume de solução de lipídios em etanol (mL)	5	10	15	30	40
Volume Final da Dispersão de Vesículas Lipídicas, V_2 (mL)	100	200	300	600	800
Taxa de Agitação, N_2 (rpm)	700	882	1010	1272	1400

Neste estudo o diâmetro médio dos lipossomas preparados nas duas bateladas foi monitorado logo após sua preparação com o objetivo de avaliar se eram reproduzidas as características das vesículas lipídicas preparadas em menor escala. Nas duas bateladas o perfil do tamanho das nanopartículas preparadas foi muito semelhante e os valores dos diâmetros médios obtidos foram muito próximos, mostrando que a estratégia adotada para o escalonamento foi adequada (Tabela 5.34).

Nota-se que as populações de lipossomas mais frequentes apresentaram diâmetros médios na faixa de 132 a 156 nm, que é justamente a faixa desejada no estudo e que coincide com os valores que se obtiveram anteriormente nos ensaios em menor escala. A Figura 5.30 mostra a distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas de uma batelada que foi posteriormente submetida ao processo de liofilização.

Pode-se observar que uma pequena porcentagem de vesículas lipídicas apresenta diâmetros acima de 1000 nm. Este fato não seria muito relevante para vesículas que são projetadas para administração por via pulmonar, uma vez que a faixa geralmente recomendada de diâmetros de partículas é de 0,1 até 5000 nm (Joshi e Misra, 2001a e Joshi e Misra, 2001b), mas limitaria a utilização das mesmas em outras terapias. Vale a pena ressaltar que não foi observada a presença de precipitados em nenhuma das suspensões preparadas durante este escalonamento.

Tabela 5.34 – Valores dos diâmetros médios obtidos durante o escalonamento da produção das vesículas lipídicas de SPC/Col por injeção de etanol.

<i>Condição experimental</i>	<i>Volume de lipossomas (mL)</i>	<i>Diâmetros médios das várias populações de lipossomas (nm)</i>
1	100	152,2 (89,7%); 961,3 (10,3%)
2	200	155,6 (94,5%); 1289,9 (5,5%)
3	300	18,2 (12,9%); 147,2 (79,1%); 944,3 (8,0%)
4	600	131,7 (96,3%); 1249,9 (3,7%)
5	800	156,1 (91,3%); 1164,9 (8,7%)

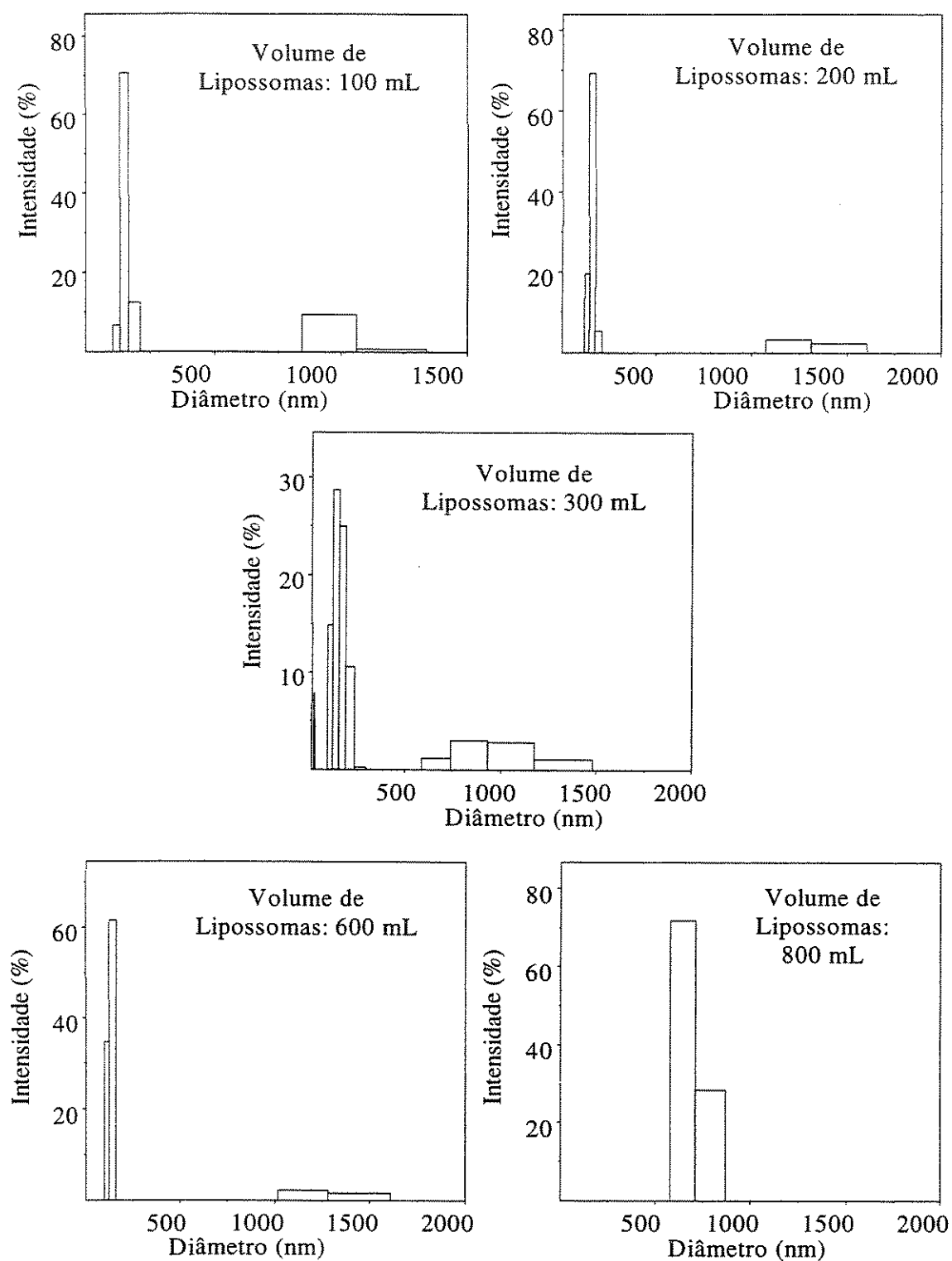


Figura 5.30 – Distribuição de tamanhos das vesículas lipídicas preparadas durante o escalonamento do método de preparação por injeção de etanol. Índices de polidispersão menores de 0,5.

5.3.7. Liofilização das Vesículas Lipídicas de SPC/Col

Normalmente as vesículas unilamelares são estáveis por algumas semanas, período após o qual elas se agregam ou se fundem em lipossomas unilamelares grandes ou multilamelares. Depois de vários dias ou semanas, dependendo principalmente da concentração, pureza, temperatura e da força iônica, a suspensão de vesículas unilamelares grandes transforma-se em lipossomas multilamelares (Lasic, 1988). A adição de açúcares pode prevenir a transformação dos lipossomas unilamelares pequenos e grandes para multilamelares, provavelmente devido à interação específica do açúcar com a cabeça polar dos lipídios, o que pode ser muito útil para a estocagem das vesículas a longo prazo (Lasic, 1988).

Embora a estocagem das vesículas lipídicas tenha se mostrado estável por 15 dias, avaliou-se também sua conservação na forma liofilizada, visando-se elevar seu prazo de prateleira, geralmente estabelecido em um ano como mínimo para produtos farmacêuticos.

Em todas as amostras a rehidratação do pó liofilizado em presença do manitol como crioprotetor foi atingida rapidamente sem a presença de precipitados nas amostras. A Tabela 5.35 mostra os valores dos diâmetros médios obtidos após a rehidratação manual das suspensões com água deionizada e a Figura 5.31 mostra as distribuições de tamanhos correspondentes para cada amostra.

Tabela 5.35 – Valores dos diâmetros médios obtidos durante o escalonamento da produção das vesículas lipídicas de SPC/Col por injeção de etanol após a liofilização e rehidratação das suspensões. As condições experimentais foram as mesmas mencionadas na Tabela 5.34.

<i>Condição Experimental</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Volume de Lipossomas (mL)	100	200	300	600	800
Diâmetro Médio após Liofilização e Rehidratação (nm)	782,3	680,0	605,7	499,2	442,3

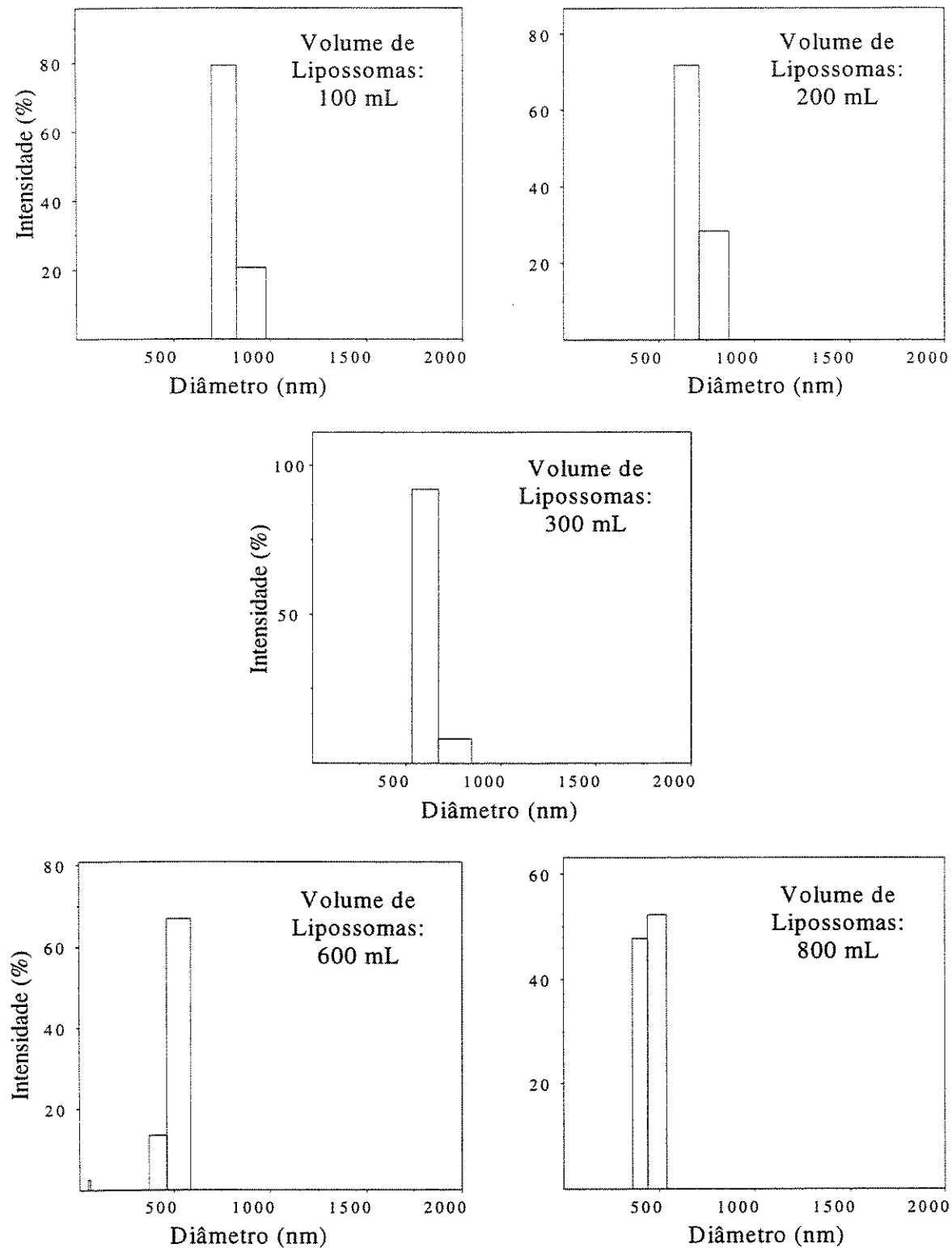


Figura 5.31 – Distribuição de tamanhos dos lipossomas liofilizados durante 24 horas após rehidratação. Índices de polidispersão menores de 0,5.

Pela Figura 5.31, pode-se observar as mudanças nas distribuições de tamanho, uma vez que todas as amostras apresentaram uma redução na faixa de diâmetros médios obtidos, não se obtendo após a rehidratação dos lipossomas liofilizados, partículas com diâmetro de vesícula maiores de 1000 nm.

De maneira geral, após a rehidratação, apenas uma população de vesículas pode ser observada, tendo havido uma possível agregação das populações de menores tamanhos observadas antes da liofilização. Os diâmetros médios das vesículas lipídicas variaram de 442 aos 782 nm. Pode-se concluir desta forma, que o crioprotetor selecionado não foi efetivo na prevenção da agregação e fusão dos lipossomas.

Estudos posteriores usando sacarose como crioprotetor alternativo mostraram também que este não é efetivo no processo de liofilização, sendo provavelmente necessário maior tempo e menor temperatura durante a etapa de liofilização, que aquelas empregadas quando do uso do manitol. Embora o emprego de outros tipos de açúcares poderia ser factível nesta etapa, seus usos seriam limitados pelos custos geralmente maiores que apresentam estes crioprotetores.

5.3.8 Encapsulação Ativa de Doxorrubicina em Lipossomas de SPC/Col Preparados por Injeção de Etanol em Maior Escala

Embora o processo de liofilização ao que foram submetidas as vesículas lipídicas preparadas durante o escalonamento provocou um aumento no diâmetro médio e uma acentuada agregação dos lipossomas, realizou-se uma nova batelada de vesículas as quais foram liofilizadas e rehidratadas nas mesmas condições anteriormente descritas, para avaliar o comportamento destes sistemas na encapsulação de doxorubicina.

As vesículas lipídicas preparadas mostraram uma distribuição de tamanhos semelhantes à obtida na batelada anterior, embora os diâmetros médios para os lipossomas antes da liofilização e os rehidratados foram menores que os obtidos anteriormente. Este resultado poderia novamente estar relacionado à viscosidade da solução orgânica de lipídios em etanol que seria influenciada por uma temperatura ambiente mais alta no

período em que foram preparadas estas vesículas lipídicas, uma vez que em nossos ensaios a temperatura desta solução orgânica não foi controlada. A encapsulação ativa do composto terapêutico foi realizada em uma razão molar inicial fármaco/lipídio (F/L_{inicial}) de 1 durante 10 minutos a 60 °C e 200 rpm. Como mostrado na Tabela 5.36, as eficiências de encapsulação obtidas variaram entre 52 e 73%, sendo a mais baixa a obtida para o sistema contendo as vesículas de menor diâmetro médio. Provavelmente este resultado obtido esteja relacionado com as características iniciais da suspensão de lipossomas, como por exemplo a distribuição de tamanhos, e não com possíveis efeitos do processo de liofilização e posterior rehidratação em si.

De modo geral as eficiências de encapsulação obtidas nestas vesículas foram menores que as obtidas anteriormente para razões molares iniciais menores, nas quais valores de eficiências acima de 90% foram obtidos, embora os valores agora obtidos tenham sido muito próximos dos atingidos pelas vesículas preparadas em pequena escala com sonicação na mesma razão molar inicial fármaco/lipídio.

Tabela 5.36 – Valores dos diâmetros médios e das eficiências de encapsulação obtidos durante o escalonamento da produção das vesículas lipídicas de SPC/Col por injeção de etanol após a liofilização e rehidratação das suspensões.

<i>Condição Experimental</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Volume de Lipossomas (mL)	100	200	300	600	800
Eficiência de Encapsulação (%)	60,0	73,1	61,6	58,9	51,9
Diâmetro Médio após Liofilização e Rehidratação (nm)	653,3	599,5	520,0	401,0	380,5

5.3.9 Avaliação das Características de Lamelaridade das Vesículas Lipídicas de SPC/Col Preparados por Injeção de Etanol em Maior Escala

O estudo das características físico-químicas das vesículas lipídicas preparadas pelo método de injeção de etanol em maior escala, como o diâmetro médio e a lamelaridade ou número de bicamadas, poderia ser muito importante para avaliar a adequação destes lipossomas na encapsulação de compostos com características hidrofílicas ou hidrofóbicas. Vesículas com várias lamelas lipídicas apresentariam um menor potencial de encapsulação de substâncias hidrofílicas, uma vez que seu volume aquoso é reduzido quando comparado com o cerne aquoso das vesículas unilamelares, estas últimas geralmente mais adequadas para a incorporação de compostos no interior de suas bicamadas. Entretanto, quando a administração de lipossomas com elevado diâmetro não é crítica, a utilização de vesículas multilamelares pode ser vantajosa para a liberação controlada do medicamento, uma vez que o rompimento das lamelas individuais poderia ocorrer em etapas.

O volume total (100 mL) de vesículas empregadas neste estudo foi preparado em uma composição lipídica inicial de 100 mmol/L de SPC/Col/DMPE de 40:40:20 mol% a uma temperatura da fase aquosa de 50 °C e agitação de 700 rpm. A amostra destas vesículas lipídicas com distribuição de tamanho bimodal apresentou diâmetros médios para cada população de 127 nm (99,4%) e de 2080 nm (0,6%). Embora nesta suspensão lipídica se tenha uma pequena população de vesículas com tamanhos relativamente grandes, a maior proporção de lipossomas se encontra na faixa de 100 ao 130 nm. Assim, desconsiderou-se a presença da população de maior diâmetro médio para se estimar a proporção de grupamentos amino na face da bicamada exposta ao meio aquoso, a menos estas decorrentes da incorporação do fosfolípido DMPE nos lipossomas.

Para esta amostra, a concentração externa de moléculas de amina detectada por reação com TNBS foi de 0,15 mmol/L, representando 75% da concentração total. Este resultado conduz à conclusão de que os lipossomas preparados pela metodologia de injeção de etanol em maior escala foram vesículas lipídicas unilamelares pequenas (New, 1990).

5.3.10 Análise Preliminar da Viabilidade Econômica da Produção de Lipossomas Preparados por Injeção de Etanol em Larga Escala Encapsulando Kanamicina

Dentro da engenharia econômica, define-se a avaliação econômica de um projeto de planta de produção como a análise dos dados de custo referentes ao projeto em questão, projeto este tido como tecnicamente viável.

A análise da viabilidade econômica da produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol foi efetuada pela avaliação em escala de ordem de grandeza, na qual o investimento total foi calculado por intermédio de índices baseados nos preços dos principais equipamentos a serem empregados. Embora o desvio em relação ao valor correto do investimento necessário nesta etapa possa ser alto, estes cálculos permitem obter a primeira estimativa econômica do retorno do investimento e a verificação dos principais componentes do custo (Barbosa, 2003).

Selecionou-se para este estudo específico o agente terapêutico kanamicina como fármaco de interesse a ser encapsulado, por ser aplicável a casos de tuberculose multirresistente que, segundo a OMS, está em torno de 5% do total de casos de tuberculose, embora em países em desenvolvimento índices maiores tenham sido já verificados. Na quimioterapia com kanamicina por via intramuscular recomenda-se uma dosagem ótima de 15 mg/kg de massa corpórea (usualmente de 750 mg a 1 g) por dia, dividida em duas doses diárias. Estima-se, então, para um paciente de 60 kg, uma dosagem requerida do fármaco livre de 900 mg/dia. Com base nos valores mais adequados de razões molares finais fármaco/lipídios obtidas para as vesículas lipídicas preparadas por injeção de etanol automatizada, pode-se determinar a massa do composto terapêutico kanamicina associada a uma preparação de lipossomas contendo, por exemplo, uma concentração de 2 mmol/L de lipídios, conforme mostrado na Tabela 5.37, juntamente com outras características de relevância para esta preparação.

Tabela 5.37 – Valores dos parâmetros considerados e estimados no cálculo da massa total de kanamicina incorporada em uma amostra de 10 mL de lipossomas de SPC/Col preparados por injeção de etanol automatizada a uma concentração lipídica de 2 mmol/L. A área ocupada por molécula de SPC/Col foi considerada nos cálculos como $38,0 \text{ \AA}^2$.

<i>Variável</i>	<i>Valor</i>
Diâmetro médio das vesículas(nm)	150,0
Razão molar final fármaco/lipídio (F/L _{final})	0,1
Concentração do fármaco em solução (mmol/L)	0,2
Concentração de kanamicina no cerne aquoso das vesículas (mmol/L)	53,5
Massa de kanamicina incorporada nos 10 mL de suspensão lipossomal (mg)	312

Uma vez que a literatura registra aumentos na eficácia terapêutica dos agentes tuberculostáticos encapsulados em lipossomas de até 2.000 vezes (Agarwal e col., 1994), para determinar os efeitos terapêuticos das preparações lipossomais de kanamicina e estabelecer os níveis de fármaco efetivamente requeridos, ensaios *in vitro* e *in vivo* destas preparações devem ser realizados. Considerando-se que a mínima eficácia terapêutica da kanamicina encapsulada nos lipossomas seria equivalente à do fármaco na sua forma livre, necessitar-se-ia três doses diárias de uma suspensão de 10 mL com as características explicitadas na Tabela 5.37 ou então realizar uma terapia com um volume três vezes maior desta amostra.

Considerando-se o tempo de terapia recomendado pelo Ministério da Saúde (1995) de 5 dias, cada doente precisaria de um volume total de fármaco encapsulado de 150 mL. Estimando que dos quase 9 milhões de infectados anualmente no mundo, cerca de 5% precisariam deste tipo de terapia com o composto kanamicina encapsulado em lipossomas, uma demanda mínima anual de 67.500 L de medicamento seria verificada. É interessante ressaltar que a literatura na qual comumente se aborda o escalonamento da produção de

lipossomas pelo método de injeção de etanol, considera-se como capacidade industrial a produção de centenas de litros por batelada (Wagner e col., 2002).

Industrialmente, define-se a receita bruta ou lucro operacional como o montante gerado com as vendas (receita bruta operacional ou faturamento) descontados os custos (Schmidell e col., 2001), estando englobadas nos custos as despesas relativas às compras e às transformações requeridas (fabricação, matéria-prima, utilidades, mão-de-obra, despesas administrativas, industriais, comerciais, dentre outras). Embora seja importante mencionar a receita bruta de um processo produtivo, o valor real que permite avaliar o movimento financeiro de um processo seria a entrada em caixa, também denominado fluxo monetário. Este valor de fluxo monetário é representado pela receita bruta menos o imposto de renda.

A Figura 5.32 mostra uma proposta de planta para a produção de vesículas lipídicas com diâmetro médio em torno de 150 nm apresentando um gradiente de pH de cerca de 3,4 unidades preparadas pelo método de injeção de etanol e a incorporação de kanamicina nestas vesículas, resultando em suspensões a 2 mmol/L em lipídios contendo 0,2 mmol/L de fármaco.

A planta proposta neste trabalho operaria de forma descontínua, considerando-se uma eficiência de produção máxima de 90% com relação ao rendimento do processo, visto que, na temperatura de injeção empregada ocorre evaporação de boa parte do etanol, e também levando-se em conta que nos ensaios realizados em menor escala verificam-se perdas de até 5% do material decorrentes de sua transferência entre os diferentes equipamentos do sistema. Estimando-se uma produção anual de 69.000 L, (aproximadamente 69 m³/ano) de suspensão e um tempo de operação da planta de produção de 240 dias/ano, podem ser obtidos aproximadamente 288 L de lipossomas por dia.

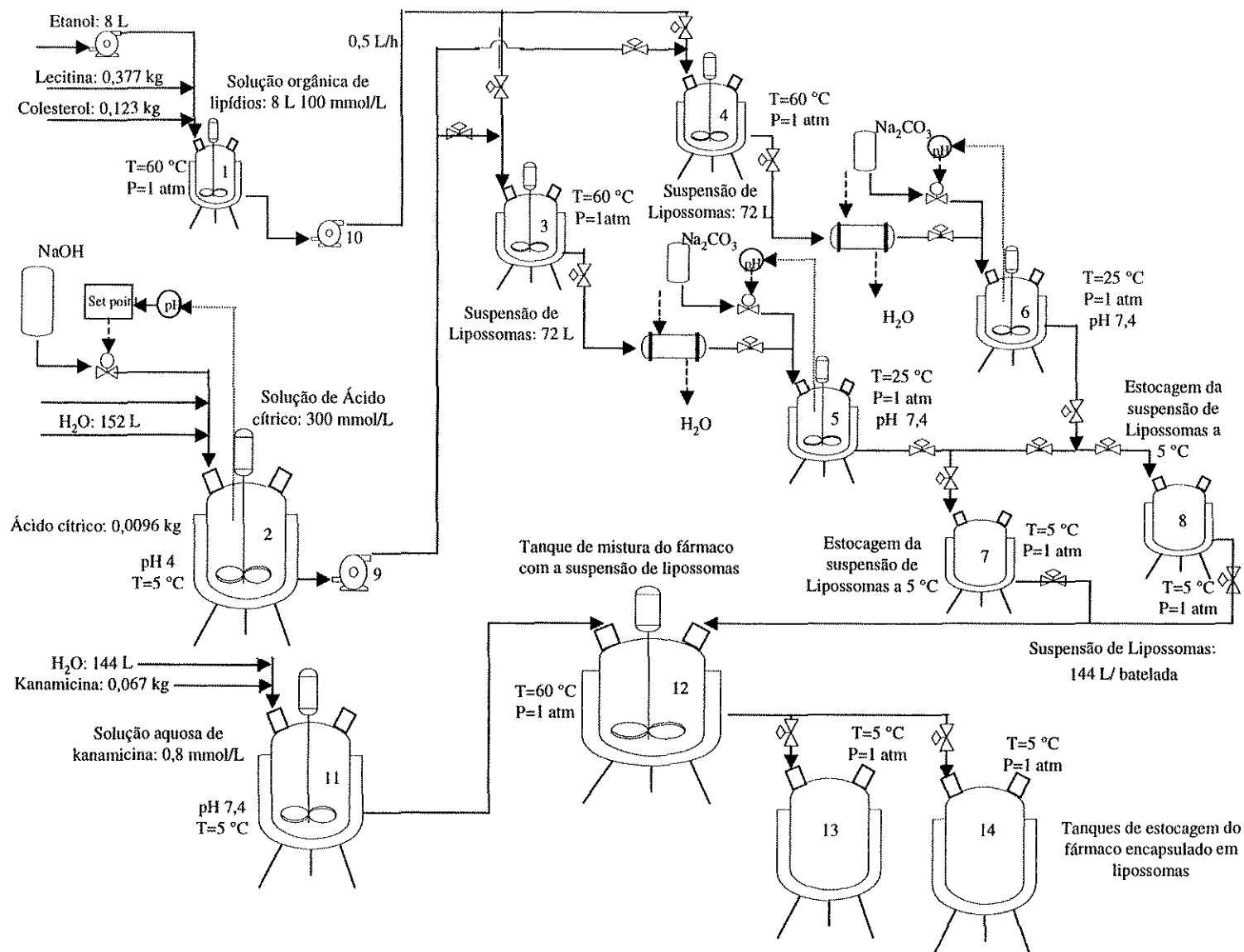


Figura 5.32 – Fluxograma do processo de produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol encapsulando o fármaco kanamicina.

Na Figura 5.32, os tanques 1 e 2 contêm as soluções orgânica de lipídios e aquosa de ácido cítrico respectivamente. Os equipamentos 3 e 4 são os dois tanques de mistura para os quais as soluções orgânica e aquosa são transportadas pelas bombas 9 e 10 para a formação dos lipossomas. Os equipamentos 5 e 6 são tanques encamisados nos quais é ajustado o pH das suspensões preparadas a 25 °C. Os equipamentos 7 e 8 são os dois tanques de armazenamento das suspensões de vesículas com temperatura controlada a 5 °C. O tanque 11 é o de armazenamento da solução aquosa do fármaco kanamicina, que é incubada com a suspensão de lipossomas a 60 °C no tanque de mistura 12. Os equipamentos 13 e 14 são dois tanques de armazenamento da suspensão terapêutica a 5 °C.

O preço de equipamentos na indústria química pode ser afetado por diversos fatores como o seu tamanho, o material de construção, a instrumentação, a inflação e outras condições de mercado. Na indústria de bioprocessos, a maioria dos equipamentos empregados são construídos de aço inoxidável, sendo então a mudança de tamanho a que mais afeta seu preço (Petrides, 2000). Frequentemente a estimativa de preços dos equipamentos a serem utilizados em indústrias de bioprocessos é realizada a partir da equação 5.6.

$$\text{Custo}_2 = \text{Custo}_1 (\text{Tamanho}_2/\text{Tamanho}_1)^a \quad (5.6)$$

O valor do expoente a encontra-se na faixa de 0,5 e 1. Um valor normalmente empregado para este expoente é 0,6 e, de acordo com esta consideração, quando o tamanho de um equipamento dobra, seu custo incrementa em aproximadamente 52%. Com base na expressão 5.6 e nos preços sugeridos por Petrides (2000) foram calculados os preços dos equipamentos propostos no fluxograma mostrado anteriormente. A Tabela 5.38 mostra esta estimativa de preços.

Tabela 5.38 – Estimativa dos preços de equipamentos da planta de produção de lipossomas.

<i>Equipamento</i>	<i>Quantidade</i>	<i>Preço unitário</i> (US\$)	<i>Custo total</i> (US\$)
Tanque agitado encamisado (1) de 15 L	1	3.580,00	3.580,00
Tanque agitado encamisado, (3,4,5,6,7,8) de 100 L	6	11.160,00	66.960,00
Tanque agitado encamisado (2,11,13,14) de 200 L	4	16.900,00	67.600,00
Tanque agitado encamisado (12) de 400 L	1	25.600,00	25.600,00
Bombas centrífugas (9,10)	2	2.500,00	5.000,00
Custo total de compra de equipamento (CC)			168.740,00

O investimento envolve todas as despesas relativas à construção e instalação dos equipamentos na planta, incluindo também o início da operação da planta. Considerou-se nesta etapa, que a indústria responsável pela produção das vesículas lipídicas tenha uma certa infraestrutura no ramo biotecnológico, como por exemplo, a existência de laboratórios dotados de equipamentos necessários para a caracterização dos lipossomas, e que opere já na produção de medicamentos, sendo o setor de produção de lipossomas uma unidade adicional no projeto global. Admitiu-se também que esta indústria conta com capacidade ociosa em sua área de utilidades, suficiente para fornecer água e vapor, como também adequado tratamento de resíduos sólidos e efluentes.

O custo total de produção ou os gastos que advirão com a operação da planta de produção é a soma de dois tipos de componentes, os custos variáveis (CV) e os custos fixos (CF). Nos custos variáveis estão incluídas todas as despesas que dependem da quantidade de produção, enquanto encontram-se nos fixos, os que dependem exclusivamente da organização e administração. Estes últimos custos não se alteram com variações na escala de produção.

Na Tabela 5.39 encontram-se os índices médios utilizados na indústria de bioprocessos segundo Petrides (2000) e que devido às características deste processo, devem ser semelhantes.

Tabela 5.39 – Índices médios de composição do investimento total a partir do preço dos equipamentos (Petrides, 2000).

<i>Item de custo</i>	<i>Média do multiplicador</i>	<i>Investimento (US\$)</i>
1 - CUSTO DIRETO DA PLANTA (CD)		
Instalação	$0,50 \times CC$	84.370,00
Tubulação	$0,40 \times CC$	67.496,00
Instrumentação	$0,35 \times CC$	59.059,00
Isolamento	$0,03 \times CC$	5.062,20
Instalação elétrica	$0,15 \times CC$	25.311,00
Subtotal		241.298,20
2 - CUSTO TOTAL INDIRETO DA PLANTA (CI)		
Engenharia	$0,25 \times CD$	60.324,55
Construção	$0,35 \times CD$	84.454,37
Subtotal		144.778,92
3 - CUSTO TOTAL DA PLANTA (CTP=CD+CI)		386.077,12
Honorárias do empreiteiro (HE)	$0,05 \times CTP$	19.303,85
Contingência (C)	$0,10 \times CTP$	38.607,71
4 - CAPITAL FIXO TOTAL (CFT=CTP+HE+C)		443.988,69
Capital de giro (C_{giro})	$0,10 \times CFT$	44.398,86
Custo de partida ($C_{startup}$)	$0,05 \times CFT$	22.199,43
5 - CAPITAL DE INVESTIMENTO (CTI=CFT+C_{giro}+$C_{startup}$)		510.586,99

A Tabela 5.40 mostra a estimativa do custo das principais matérias-primas envolvidas no processo em questão. Para a avaliação da viabilidade econômica deste sistema considerou-se em todos os casos o preço praticado pela Sigma Chemical Company, EUA (2001). Geralmente, em processos biotecnológicos, de 10 a 80% do custo total de produção é atribuído à matéria-prima. Considerando-se a porcentagem mínima de 10% e sem considerar os custos de mão-de-obra, tem-se então que o custo de produção anual das vesículas lipídicas encapsulando o composto kanamicina será de US\$ 2.694.239,30.

Tabela 5.40 – Estimativa dos custos da matéria-prima (Catálogo da Sigma Chemical Company, 2001).

<i>Material</i>	<i>Quantidade (kg/ano)</i>	<i>Preço unitário(US\$/kg)</i>	<i>Custo total (US\$/ano)</i>
Lecitina	90,48	218,00	19.724,64
Colesterol	29,52	6.280,00	185.385,60
Etanol	1.920,00	0,50 – 0,60	960,00
Ácido Cítrico	2,30	14,89	34,25
Kanamicina	16,11	3.704,00	59.671,44
Água	72.960,00	0,05-0,20	3.648,00
Custo total da matéria-prima			269.423,93

O preço de venda dos lipossomas produzidos é de difícil estimativa, pois os produtos equivalentes no mercado destinam-se mais freqüentemente para aplicações cosméticas que para farmacêuticas. Tomou-se então como base o preço praticado pela Sigma Chemical Company, EUA para vesículas vazias, de aproximadamente US\$ 80 para uma formulação de 10 mL de lipossomas com diâmetros médios de até 400 nm obtidos por extrusão.

Se os impostos calculados sobre o lucro bruto correspondem a 40%, pode-se então estimar os rendimentos e o lucro líquido considerando-se um preço de US\$ 100 por litro. A Tabela 5.41 apresenta a análise econômica global para esta planta de produção.

Pode-se observar que como o custo de investimento é menor que os lucros líquidos anuais obtidos, a planta é viável economicamente. Nestas condições, o preço do produto final poderia ainda ser menor que o estimado. Considerando-se a taxa de juros nula, estima-se que o período de recuperação do investimento seja inferior a três meses (2,4 meses).

Tabela 5.41 –Análise econômica total para a produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol.

<i>Item</i>	<i>Valor</i>
Capital total de investimento (US\$)	510.586,99
Custo total da matéria prima (US\$/ano)	269.423,93
Custo total de produção (US\$/ano)	2.694.239,30
Capacidade da planta (L/ano)	69.000
Preço de venda (US\$/L)	100,00
Rendimentos (US\$/ano)	6.900.000,00
Lucro bruto (US\$/ano)	4.205.760,70
Impostos (US\$/ano)	1.682.304,28
Lucro líquido (US\$/ano)	2.523.456,42

Desta forma, observa-se que não somente este processo é economicamente viável, como também é economicamente atraente. Salienta-se que para a realização deste trabalho, este método de preparação de lipossomas foi escolhido justamente pelo baixo investimento em equipamentos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

1. Com relação às características das matérias-primas empregadas no trabalho, observou-se que a área média ocupada por molécula para os lipídios e para as misturas compostas por estes foram de $40 \text{ \AA}^2$ para o DSPC, $38 \text{ \AA}^2$ para o Col, $38 \text{ \AA}^2$ para a mistura DSPC/Col, $46 \text{ \AA}^2$ para a SPC e $38 \text{ \AA}^2$ para a mistura SPC/Col. A temperatura de transição de fases da SPC foi de $50,4 \text{ }^\circ\text{C}$ e os baixos coeficientes de partição da kanamicina indicaram seu caráter predominantemente hidrofílico.

2. Vesículas lipídicas preparadas por extrusão permitiram a encapsulação ativa de isoniazida, pirazinamida e rifampicina com eficiências de encapsulação de até 28,9%.

3. A incorporação ativa de isoniazida em lipossomas preparados pelo método de injeção de etanol em escala de bancada foi sensível a variações na razão molar inicial fármaco/lipídio utilizada. A eficiência de encapsulação deste fármaco em vesículas submetidas ao processo de congelamento-descongelamento foi próxima à obtida para as vesículas não tratadas e para vesículas extrudadas.

4. A incorporação passiva de rifampicina em lipossomas de SPC/Col preparados pelo método de injeção de etanol em pequena escala possibilitou a encapsulação deste composto com eficiências de até 21,3%.

5. A encapsulação ativa de tuberculostáticos em vesículas de SPC/Col preparadas pelo método de injeção de etanol em escala de bancada permitiu obter eficiências de encapsulação de até 100% para a isoniazida e de 63% para o fármaco kanamicina. Variações nas razões molares iniciais provocaram alterações nas razões molares finais e nas eficiências de encapsulação ativa dos compostos nas vesículas lipídicas de SPC/Col. A temperatura e o tempo de incubação mostraram-se também como parâmetros importantes

na encapsulação ativa de kanamicina, sendo que maiores eficiências foram obtidas a 60 °C e 60 minutos de incubação.

6. A encapsulação passiva de kanamicina permitiu obter uma eficiência de encapsulação de apenas 1,45%.

7. As eficiências de encapsulação atingidas na incorporação ativa de doxorubicina em vesículas de SPC/Col preparadas pelo método de injeção de etanol em escala de bancada foram altas, chegando até 100%, sendo sensíveis às variações nas razões molares iniciais fármaco/lipídio empregadas durante a incubação. Entretanto, os lipossomas obtidos por injeção de etanol não apresentaram retenção estável deste composto após cinco dias de estocagem e recomenda-se, então, que a incorporação ativa de fármacos em lipossomas preparados por injeção de etanol deve ser efetuada tão logo o gradiente de pH seja estabelecido nas vesículas.

8. Os estudos de ampliação de escala mostraram que o tipo e a intensidade da agitação da fase aquosa, bem como sua temperatura e o diâmetro da agulha de injeção foram as variáveis operacionais que mais influenciaram o diâmetro médio e a distribuição de tamanhos das vesículas preparadas por injeção de etanol. As vesículas lipídicas de SPC/Col preparadas podem ser consideradas como unilamelares pequenas.

9. As eficiências de encapsulação ativa de pirazinamida e kanamicina em vesículas obtidas em escala ampliada pelo método automatizado de injeção de etanol foram principalmente influenciadas pela concentração inicial de lipídios e pela agitação da fase aquosa. O melhor desempenho na encapsulação ativa de kanamicina foi mostrado pelas vesículas contendo DSPC/Col, que apresentaram boa estabilidade estrutural.

10. O modelo matemático empregado para o estudo de transposição de escala da produção de lipossomas pelo método de injeção de etanol mostrou-se apropriado.

11. A avaliação da conservação das vesículas obtidas em maior escala na forma liofilizada mostrou uma redução na faixa de diâmetros médios obtidos acompanhada, entretanto, do aumento do diâmetro médio das vesículas, indicando que os crioprotetores selecionados não foram efetivos na prevenção da agregação e fusão dos lipossomas.

12. A encapsulação ativa de doxorrubicina em lipossomas liofilizados e rehidratados permitiu obter eficiências de encapsulação menores que as obtidas nas vesículas não liofilizadas.

13. A análise preliminar da viabilidade econômica da produção de lipossomas por injeção de etanol incorporando kanamicina em maior escala mostrou que o processo é economicamente viável.

6.2. Sugestões

Como continuidade ao trabalho desenvolvido sugere-se:

1. Avaliar a encapsulação conjunta dos compostos terapêuticos selecionados em vesículas preparadas pelo método de injeção de etanol em maior escala;
2. Avaliar o uso de outros crioprotetores para a liofilização das vesículas lipídicas;
3. Monitorar a estabilidade de estocagem e de retenção do fármaco ativamente encapsulado das vesículas lipídicas liofilizadas, por no mínimo quatro semanas;
4. Efetuar a avaliação do desempenho *in vitro* das preparações mais estáveis encapsulando os agentes tuberculostáticos.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, L. B.; SINHA, I.; FRANZBLAU, S. G.; KRAHENBUHL, J. L. e METHA, R. T. Effective treatment of acute and chronic murine tuberculosis with liposome encapsulated clofazimine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, p. 1638 - 1643, 1999.

AEGIS - AIDS Education Global Information System. Isoniazid. Disponível em <<http://www.aegis.org/pubs/drugs/28.html>> Acesso em 21 novembro, 2001.

AEGIS - AIDS Education Global Information System. Pyrazinamid. Disponível em <<http://www.aegis.org/pubs/drugs/29.html>> Acesso em 21 novembro, 2001.

AEGIS - AIDS Education Global Information System. Streptomycin sulfate. Disponível em <<http://www.aegis.org/pubs/drugs/115.html>> Acesso em 21 novembro, 2001.

AGARWAL, A.; KANDPAL, H.; GUPTA, H. P.; SINGH, N. B. e GUPTA, C. M. Tuftsin-bearing liposomes as rifampin vehicles in treatment of tuberculosis in mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 38, n. 3, p. 588 - 593, 1994.

AGGER, E. M. e ANDERSEN, P. Tuberculosis subunit vaccine development: on role of interferon- γ . *Vaccine*, v. 19, p. 2298 - 2302, 2001.

AJAY, K. A. e GUPTA, C. M. Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 41, p. 135 - 146, 2000.

ALLÉMANN, E.; LEROUX, J. C. e GURNY, R. Biodegradable nanoparticles of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) for parenteral administration. In: Lieberman, H. A. Rieger, M. M. e Banker, G. S. (Eds). *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*. Marcel Dekker, New York, p. 163 - 193, 1998.

ALLEN, T. M.; RYAM, J. L. e PAPAHA DJOPOULOS, D. Gangliosides reduce leakage of aqueous-space markers from liposomes in the presence of human plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 818, p. 205 - 210, 1985.

AMAN, T.; RASHID, A.; KULSOOM, R. e KHOKKAR, I. Spectrotometric determination of streptomycin. *Analytical Letters*, v. 28 (5), p.881 - 892, 1995.

ANDREAS WAGNER, A. A.; VORAUER-ULHB, K. e KATINGERB, H. Liposomes produced in a pilot scale: production, purification and efficiency aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 54, p. 213 - 219, 2002.

AVIS, K. E. e WU, V. L. *Biotechnology and biopharmaceutical manufacturing, processing, and preservation drug manufacturing technologies series*. Interpharmaceutical Press., v. 2, 1996.

BAGGIO, M. S. B. Substâncias tensoativas. Os fenômenos de autoconstrução e auto-organização de substâncias tensoativas e sua importância na agricultura e em biotecnologia. *Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento*, n. 8, ano II, maio/junho, 1999.

BARENHOLZ, Y. e CROMMELIN, D. A. Liposomes as pharmaceutical dosage forms. In: Swarbrick, J. e Boylan, J. C. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, v. 9, Marcel Dekker Inc., New York, p. 1 - 39, 1994.

BARROS N. B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1995.

BARROS, B. N.; SPACINO, I. S. e BRUNS, R. E. Como fazer experimentos. Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

BATZRI, S. e KORN, E. D. Single bilayer liposomes prepared withoth sonication. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 298, p. 1015 - 1019, 1973.

BENJAMIN, D. M.; McCORMACK, J. J. e GUMP, D. W. Use of newer amino group reagents for the detection and determination of kanamycin. *Analytical Chemistry*, v. 45, n. 8, July, 1973.

BERKOW, R. Manual merck de medicina: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Rocca, p. 126 - 141, 1989.

BERMUDEZ, L. E. Use of liposome preparation to treat mycobacterial infections. *Immunobiology*, v. 191, n. 4 - 5, p. 578 - 583, 1994.

BERMUDEZ, L. S.; YAU-YONG, A. O.; LIN, J. P.; COGGER, J. e YOUNG, L. S. Treatment of disseminated Mycobacterium avium complex infection of beige mice with liposome-encapsulated aminoglycosides. *Journal of Infectology Disease*, v. 161 p. 1262 - 1268, 1990.

BOX, G. E. e DRAPER. *Empirical model-building and response surfaces*. New York : John Wiley, 1987.

BOX, G. E. P. e WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. University of Wisconsin, Technical Report 9, 1973.

BRAUN, F. O.; KORTING, H. C. e MAIBACH, H. I. Liposome dermatics. Guesbach Conference, 1992.

BREWER, G. A. Isoniazid. In Florey, K. *Analytical profiles of drug substances*. New York: Academic Press, p.185 - 238, 1977.

BRIDGES, P. A. e TAYLOR, K. M. G. An Investigation of some of the factors influencing the jet nebulisation of liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 204, p. 69 - 79, 2000.

BRIDGES, P. A. e TAYLOR, K. M. G. Nebulisers for the generation of liposomal aerosols. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 173, p.117 - 125, 1998.

CALHEIROS, C. S. Encapsulação de isoniazida, pirazinamida e estreptomicina em lipossomas para a administração por inalação. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

CARDOZO, M. G; VALENZUELA, A. N; LABROUSSE, J. O; PEREZ G. M. R; GARCÍA, C. R e GARCÍA, O. H. Farmacocinética de kanamicina suministrada por vía intramuscular en bovinos. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 2000.

CATARINA RODRIQUES, A. C.; GAMEIROA, P.; M. PRIETOB, M. e DE CASTRO, A. B. Interaction of rifampin and isoniazid with large unilamellar liposomes: spectroscopic location studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1620, p. 151 – 159, 2003.

CAVALLI, R.; CAPUTO, O.; CARLOTTI, M. E.; TROTTA, M.; SCARNECCHIA, C. e GASCO, M. R. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 148, p. 47 - 54, 1997.

CHAMBERS, M.; WRIGTH, D. C.; BRISKER, J.; WILLIAMS, A.; HATCH, G.; GAVIER-WIDÉN, D.; HALL, G.; MARSH, P. D. e HEWINSON, R. G. A single dose of killed *Mycobacterium bovis* BCG in a novel class of adjuvant (Novasome™) protects guinea pigs from lethal tuberculosis. *Vaccine*, (não publicado, disponível on-line 14 de Outubro), 2003.

CHEN Jr, P. S.; TORIBARA, T. Y. e WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 11, p. 1756 - 1758, 1956.

CONLEY, J.; YANG, H.; WILSON, T.; BLASETT, K.; DI NINNO, V.; SCHNELL, G. e WONG, J. P. Aerosol delivery of liposome-encapsulated ciprofloxacin: aerosol characterization and efficacy against *Francisella tularensis* infection in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 1288 - 1292, 1997.

COSTA, C. A. M. Preparação e caracterização de lipossomas encapsulando ácido azelaico, 5- fluororacil e bleomicina para aplicação na terapia de melanomas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

CROMMELIN, D. J. A. e SCHREIER, H. Liposomes. In: Kreuter, J. *Colloidal Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker Inc., New York, p. 73 - 191, 1994.

CYNAMON, M. H.; SWENSON, C. E.; PALMER, G. S. e GINSBERG, R. S. Liposome-encapsulated-amikacin therapy of *Mycobacterium avium* complex infection in beige mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 33, p. 1179 - 1183, 1989.

DE CHASTEIGNER, S.; FESSI, H.; CAVÉ, G.; DEVISSAGUET, J. P. e PUISIEUX, F. Gastro-intestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocápsulas. *S. T. P. Pharmaceutical Science*. v. 5, p. 242 - 246, 1995.

DEOL, P. e KHULLER, G. K. Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs in mice. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 1334 (2 - 3), p. 161 - 172, 1997.

DEOL, P.; KHULLER, G. K. e JOSHI, K. Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induce in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 1211 – 1214, 1997.

DIPALI, S. B.; KULKARNI, S. B. e BETAGERI, G. V. Comparative study of separation of non-encapsulated drug from unilamellar liposomes by various methods. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 48: (11), p. 1112 - 1115, 1996.

FINLAY, W.H. e WONG, J.P. Regional lung deposition of nebulized liposome-encapsulated ciprofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 167, p. 121 - 127, 1998.

FIÚZA, M. Palestra proferida na mesa redonda resistência do *M. tuberculosis* às drogas. VII Simpósio Brasileiro em Micobactérias, Rio de Janeiro, novembro de 1997.

FORADADA, M. e ESTELRICH, J. Encapsulation of thioguanine in liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 124, p. 261 - 269, 1995.

FORD Jr., N. C. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. R. Pecora (Editor) Plenum Press, New York, p. 7 - 57, 1985.

FRESTA, M.; SPADARO, A.; CERNIGLIA, G.; MORAGA R. I.; PUGLISI, G. e FURNERI, P. M. Intracellular accumulation of ofloxacin-loaded liposomes in human synovial fibroblasts. *Antimicrobiological Agents Chemotherapy*, v. 39, p. 1372 - 1375, 1995.

FUZIA, M. SP lidera o ranking de casos de tuberculose no país. O estado de São Paulo, São Paulo, Julho, 1999.

GABIZON, A. e PAPAHAJOPOULOS, D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1103, p. 94 - 100, 1992.

GANGADHARAM, P. R. J., ASHTEKAR, D. A., FLASHER, D. L. e DÜZGÜNES, N. Therapy of *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice with streptomycin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 725 - 730, 1995.

GANGADHARAM, P. R. J., ASHTEKAR, D. A., GHORI, N., GOLDSTEIN, J. A., DEBS, R. J. e DÜZGÜNES, N. Chemotherapeutic potential of free and liposome encapsulated streptomycin against experimental *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 28, p. 425 - 435, 1991.

GANGADHARAN, P. R. J.; ISEMAN, M. D.; PETERSON, P. K. e VERHOEL, J. Antimycobacterial drugs. *Antimicrobial Agents Annual 1*. Elsevier Scientific Publications, BV, Amsterdam, p. 17 - 39, 1986.

GAY, J. D.; DE YOUNG, D. R. e ROBERTS, G. D. In vitro activities of norfloxacin and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, and *M. kansasii*. *Antimicrobiological Agents Chemotherapy*, v. 26, p. 94 - 96, 1984.

GILBERT, B.E.; WILSON, S.Z.; GARCON, N.M.; WYDE, P.R. e KNIGHT, V. Characterization and administration of cyclosporine liposomes as a small-particles aerosol. *Transplantation*, v. 56, p. 974 - 977, 1993.

GONZALEZ-TOTHI, R. J. Liposomes and pulmonary alveolar macrophages: functional and morphological interactions. *Experimental Lung Research*, 1991.

GREGORIADIS, G. In: *Liposomes Dermatics - Liposomes in drug delivery: present and future*, editado por Braun-Falco, Korting, p. 346 - 352, 1992.

HARAN, G.; COHEN, R.; BAR, L. K. e BARENHOLZ, Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1151, p. 210 - 215, 1993.

HARRIS, E. L. V e ANGAL, S. *Protein purification methods: a practical approach*. Oxford University Press, New York, p. 296, 1989.

HEIFETS, L. B. e LINDHOLM-LEVY, P. J. Bacteriostatic and bactericidal activity of ciprofloxacin and ofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* complex. *Tubercle*, v. 68, p. 267 - 276, 1987.

ISRAELACHVILI, J. N. e MITCHELL, D. J. A model for the packing of lipids in bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 389, p. 13 - 19, 1975.

ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular and surface forces. 2nd ed. Academic Press Ltd, cap. 17, 1992.

ISRAELACHVILI, J. N. Intermolecular Surface Forces, 2^{ed.}, San Diego, 1994.

JOSHI, M. e MISRA, A. Dry powder inhalation of liposomal ketotifen fumarate: formulation and characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 223, p. 15 - 27, 2001a.

JOSHI, M. e MISRA, A. Liposomal budesonide for dry powder inhaler: preparation and stabilization. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, v. 2, n. 4, art. 25, 2001b.

JUSTO, O. R. Preparação e caracterização de lipossomas para a administração por inalação de compostos terapêuticos utilizados na terapia da tuberculose. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1999.

KLIBANOV, A. L.; MARUYAMA, K.; TORCHILIN, V. P. e HUANG, L. Amphipatic polyethyleneglycol effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Letters*, v. 268, n. 1, p. 235 - 237, 1990.

KOGA, H.; MIYASAKI, Y.; KOHNO, S. e HARA, K. A drug delivery system and biological response modifiers for the treatment of Mycobacterial infection. *Kekkaku*, v. 69, n. 2, p. 113 - 118, 1994.

KONAN, Y. N.; GURNY, R. e ALLÉMANN, E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 233, p. 239 - 252, 2002.

KREMER, J. M. H.; ESKER, M. W. J.; PAHAMAMANOHARAM, C. e WIERSEMA, P. H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry*, v. 16, n. 17, p. 3932 - 3935, 1977.

KREUTER, J. Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems III: materials, stability, toxicity, possibilities of targeting and use. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 58, p. 242 - 249, 1983.

KRIFTNER, R. W. Liposome production: the ethanol injection technique and the development of the first approved liposome dermatic. Apud BRAUN, F. O.; KORTING, H. C. e MAIBACH, H. I. Guesbach Conference. Liposome Dermatics, 1992.

KURUNOV, I. N. Effectiveness of a liposomal form of Rifampicin in the treatment of experimental tuberculosis in mice. *Problemy Tuberkuleza*, v. 1 - 2, p. 13 - 15, 1992.

KURUNOV, I. N. Effectiveness of liposomal antibacterial drugs in the inhalation therapy of experimental tuberculosis. *Problemy Tuberkuleza*, v. 1, p. 38 - 40, 1995.

LABANA, S.; PANDEY, R.; SHARMA, S. e KHULLER, G. K. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampin) encapsulated in liposomes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 20, p. 301-304, 2003.

LACAZ, C. D. Antibióticos. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 381 - 390, 1969.

LASIC, D. D. Liposomes. *American Scientist*, v. 80, p. 20 - 31, 1992.

LASIC, D. D. Liposomes: from physics to applications. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1993.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 307 - 321, 1998.

LASIC, D. D. The mechanism of vesicle formation. *Biochemistry Journal*, v. 256, p. 1 - 11, 1988.

LASIC, D. D.; MARTIN, F. J.; GABIZON, A.; HUANG, S. K. e PAPAHAADJOPOULOS, D. Stearically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1070, p. 187 - 192, 1991.

LEUNG, K. K. M.; BRIDGES, P. A. e TAYLOR, K. M. G. The stability of liposomes to ultrasonic nebulisation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 145, p. 95 - 102, 1996.

LEVENSPIEL, O. Chemical reaction engineering. John Wiley & Sons Inc., EUA, 3ra Edição, 1999.

LIMA, H. O. S. Estudo da encapsulação de fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose em lipossomas e ciclodextrinas. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2001.

LIMA, K. M.; SILVA, C. L. e RODRIGUEZ, J. M. Microesferas biodegradáveis. uma nova alternativa para administração de vacinas de DNA. *Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento*. n 12, ano II, janeiro/fevereiro, 2000.

LIMA, K.M.; BONATO, V.L.D.; FACCIOLI, L.H.; BRANDÃO, I.T.; SANTOS, S.A.; COELHO-CASTELO, A.A.M.; LEÃO, S.C. e SILVA, C.L. Comparison of different delivery system of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. *Vaccine*, v. 19, p. 3518 - 3525, 2001.

LOWRIE, D. B.; TASCAN, R. E.; BONATO, V. L.; LIMA, V. M.; FRACCIOLI, L. H.; STAVROPOLOUS, E.; COLSTON, M. J.; HEWINSON, R. G.; MOELLING, K. e SILVA, C. L. Therapy tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*, v. 400, p. 269 - 271, 1999.

LUCINDA-SILVA, R. M. e EVANGELISTA, R. C. Microspheres of alginato-chitosan containing isoniazid. *Journal of Microencapsulation*, v. 20, n. 2, p. 145 - 152, 2003.

MADDEN, T. D.; HARRIGAN, PP. R.; TAI, L. C.; BALLY, M. B.; MAYER, L. D.; REDELMEIER, T. E.; LOUGHREY, H. C.; TILCOCK, C. P. S.; REINISH, L. W. e CULLIS, P. R. Accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 53, p. 37 - 46, 1990.

MAURER-SPUREJ, E.; WONG, K.F.; MAURER, N.; FENSK, D.B. e CULLIS, P.R. Factors influencing uptake and retention of amino-containing drugs in large unilamellar vesicles exhibiting transmembrane pH gradients. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1416, p.1 - 10, 1999.

MAYER, L. D.; BALLY, M. B.; HOPE, M. J. e CULLIS, P. R. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 40, p. 333 - 345, 1986.

MAYER, L. D.; HOPE, M. J.; CULLIS, P. R. e JANOFF, A. S. Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 817, p. 193 - 196, 1985.

MAYER, L. D.; MADDEN, T. D., BALLY, M. B. e CULLIS, P. R. pH gradient-mediated drug entrapment in liposomes. in Gregoriadis, G., *Liposome Technology*, v.II, Boca Raton: CRC Press Inc., p. 27 – 45, 1993.

MAYER, L. D.; REAMER, J. e BALLY, M. B. Intravenous pretreatment with empty pH gradient liposomes alters the pharmacokinetics and toxicity of doxorubicin through In Vivo active drug encapsulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 88, p. 96 - 102, 1999.

MAYER, L. D.; TAI, L. C. L.; BALLY, M. B.; MITILENES, G. N.; GINSBERG, R. S. e CULLIS, P. R. Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1025, p. 143 - 151, 1990.

McCALLION, N. M.; TAYLOR, K. M. G.; BRIDGES, P. A.; THOMAS, M. e TAYLOR, A. J. Jet nebuliser for pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 130, p. 1 - 11, 1996.

MEDDA, S.; MAHATO, S. B.; MAHADEVAN, P. R. e BASU, M. K. Glycoside-bearing liposomal delivery systems against macrophage-associated disorders involving Mycobacterium leprae and Mycobacterium tuberculosis. *Indian Journal of Biochemistry Biophysics* ed. 32, v. 3, p. 147 – 151, 1995.

MELO, F. F.; DALCOLMO, M.; HIIJAR, M. A. e PRADO, W. T. Prefácio do I consenso brasileiro de tuberculose. *Jornal de Pneumologia*, v. 23, n. 6, p. 279 – 280, 1997.

MELO, M. F. SP lidera o ranking de casos de tuberculose no país. *O Estado de São Paulo*, São Paulo, Julho, 1999.

METHA, R. T.; KEYHANI, A.; MCQUEEN, T. J.; ROSENBAUM, B.; ROLSTON, K. V. e TARRAND, J. J. In vitro activities of free and liposomal drugs against Mycobacterium avium-M. intracellulare complex and M. tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 2584 - 2587, 1993.

MICROBIOLOGIA. Disponível em <<http://www.microbiologia.com.ar>> Acesso em 20 novembro, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de normas para o controle da tuberculose (editado em 1995). *Jornal de Pneumologia*, v. 23, n. 6, p. 281 – 293, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programas e projetos. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/programas/tuberculose/intro.html>> Acesso em 21 junho, 2001.

MORAES, Â. M. Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade de lipossomas contendo o-carboranilpropilamina, L-p boronofenilalanina e doxorubicina. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1996.

NAEFF, R. Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 18, p. 343 - 347, 1996.

NELSON, M. R. e RICHARDSON, C. Liposomal amikacin (Mikasone) in the treatment of HIV related mycobacterial disease. 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada; Abstr. A91b, 1997.

NEW, R. R. C. *Liposomes: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, 1990.

NIGHTINGALE, S. D.; SALETAN, S. L.; SWENSON, C.; LAWERENCE, A. J.; WATSON, D. A.; PILKIEWICZ, F. G.; SILVERMAN, E. G. e CAL, S. X. Liposome-encapsulated gentamicin treatment of Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare complex bacteremia in AIDS patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 37, p. 1869 – 1872, 1993.

OH, Y.K.; NIX, D. E. e STRAUBINGER, R. M. Formulation and Efficacy of Liposome-Encapsulated Antibiotics for Therapy of Intracellular Mycobacterium avium Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 2104 - 2111, 1995.

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

OROZCO, L. C.; FORERO, M.; WASSERMAN, M. e AHUMADA, J. J. Distribution of liposomes in tuberculous mice. *Tubercle*, v. 71, p. 209 - 214, 1990.

OROZCO, L.; QUINTANA, F.; BELTAN, R.; MORENO, I.; WASSERMAN, M. e RODRIGUEZ, G. The use of rifampin and isoniazid entrapped in liposomes for the treatment of murine tuberculosis. *Tubercle*, v. 67, p. 91 - 97, 1986.

OSTRO, M. J. Liposomes. *Scientific American*, v. 256, n. 1, p. 90 - 99, 1987.

PAPAHADJOPOULOS, D.; ALLEN, T. M.; GABIZON, A.; MAYHEW, E.; MATTHAY, K.; HUANG, S. K.; LEE, K. D.; WOODLE, M. C.; LASIC, D. D.; REDEMANN, C. e MARTIN, F. J. Stearically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, p. 11460 - 11464, 1991.

PARAMPAL, D.; KHULLER, G. K. e JOSHI, K. Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induce in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 1211 - 1214, June, 1997.

PEER, D. e MARGALIT, R. Physicochemical evaluation of a stability-driven approach to drug entrapment in regular and in surface-modified liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 383, n. 2, p. 185 - 190, 2000.

PEIXOTO, E. Glicenina: uma nova droga para combater a tuberculose. *Informativo do Conselho Regional de Química 4a Região*, edição Março/Abril, 2000.

PERRET, S.; GOLDING, M. e WILLIAMS, P. A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 43, p. 154 - 161, 1991.

PERUGINI, P. e PAVANETTO, F. Liposomes containing boronophenylalanine for boron neutron capture therapy. *Journal of Microencapsulation*, v. 15, p. 473 - 483, 1998.

PONS, M.; FORADADA, M. e ESTELRICH, J. Liposomes obtained by ethanol injection method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 95, p. 51 - 56, 1995.

RAYNAUD, C.; LANEELLE, M. A.; SENARATNE, R. H.; DRAPER, P.; LANEELLE, G. e DAFTE, M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamide activity. *Microbiology*, v.145, p. 1359 - 1367, 1999.

REY, L. e MAY, J. C. *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products*. Marcel Dekker, New York, 1999.

- RIBAS, A. M. Estudo da estabilidade de bicamadas lipídicas em presença de tensoativos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1997.
- ROBERTS, G. Langmuir-blodgett films. New York: Plenum Press, 425 p. 1990.
- RODNEY, L. B. e LICHTENBERG, D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemestry and Physics of Lipids*, v. 64, p. 129 - 142, 1993.
- ROUHI, A. M. Tuberculosis: a tough adversary. *Chemical & Engineering News*, p. 52 - 69, 1999.
- S. DOMAZOU, A. S. e LUISI, P. L. Size distribution of spontaneously formed liposomes by the alcohol injection method. *Journal of Liposome Research*, v. 12, n. 3, p. 205 - 220, 2002.
- SAARI, M.; VIDGREN, M. T.; KOSKINEN, M. O.; TÛRJANMAA, V. M. H. e NIEMINEN, M. M. Pulmonary distribution and clearance of two beclomethasone liposome formulations in healthy volunteers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 181, p. 1 - 9, 1999.
- SAITO, H. e TOMIOKA, H. Therapeutic efficacy of liposomal entrapped Rifampin against *Mycobacterium avium* complex infection induced in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 33, p. 429 - 433, 1989.
- SCHFFAZICK, S. R.; STANISÇUASKI, S. G.; DE LUCCA, L. F. e RAFFIN, A. P. Caracterização e estabilidade física química de sistemas poliméricos nanopartículados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 726 - 737, 2003.
- SCHMIDELL, W.; DE ALMEIDA, U. L.; AQUARONE, E. e BORZANI, W. *Biotechnology Industrial. Engenharia Bioquímica*, v. 2 Edgard Blücher Ltda, São Paulo, Brasil, 2001.
- SCHWARZ, C. e MEHNERT, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 157, p. 171 - 179, 1997.
-

SCOPES, R. K. Protein purification. Principles and Practice. Springer Advance Texts in Chemistry, 3rd ed., 1994.

SECRETARIA DE SAÚDE DE CAMPINAS. Informe epidemiológico - Dia nacional de combate à tuberculose. Prefeitura Municipal de Campinas. São Paulo, Novembro, 1998.

SENARATNE, R. H.; MOBASHERI, H.; PAPA VINASASUNDARAM, K. G.; JENNER, P.; LEA, E. J. A. e DRAPER, P. Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. Journal of Bacteriology, v. 180, p. 3541 - 3547, 1998.

SUNTRES, Z. E. e SHEK, P. N. Liposomes promote pulmonary glucocorticoid delivery. Journal of Drug Targeting, v. 6, p. 175 - 182, 1998.

SUZUKI, T.; KOMATSU, H. e MIYAJIMA, K. Effects of glucose and its oligomers on the stability of freeze-dried liposomes. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1278, p. 176 - 182, 1996.

SZOKA, F. Jr. e PAPA HADJOPOULOS, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Annual Reviews of Biophysical and Bioengineering, v. 9, p. 467 - 508, 1980.

SZOKA, Jr. Preparation of liposome and lipid complex compositions. United States Patent, 5.549.910, August, 1996.

TALSMA, H. e CROMMELIN, D. J. A. Liposomes as drug delivery system, Part 1: Preparation - Biopharmacy, 1992a.

TALSMA, H. e CROMMELIN, D. J. A. Liposomes as drug delivery system, Part 2: Characterization - Biopharmacy, 1992b.

TAYLOR, K. M. G. e McCALLION, O. N. M. Ultrasonic nebulisers for pulmonary drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, v. 153, p. 93 - 104, 1997.

TAYLOR, K. M. G. e NEWTON, J. M. Liposomes for controlled delivery of drugs to the lung. Thorax, v.47, p.257 - 259, 1992.

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

THE MERCK INDEX: AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, DRUGS AND BIOLOGICALS, 12ed. New Jersey: Rahway, 1996.

THOMAS, D. A.; MYERS, M. A.; WICHERT, B.; SCHREIER, H. e GONZALEZ-ROTHI, R. J. Acute effects of liposome aerosol inhalation on pulmonary function in healthy human volunteers. *Chest*, v.99, p.1268 - 1270, 1991.

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

VLADIMIRSKI, M. A e LADIGINA, G. A. Antibacterial activity of liposome-entrapped Streptomycin in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomedicine (Paris)*, v. 36, p. 375, 1982.

VLADIMIRSKI, M. A; LADIGINA, G. A. e TENTSOVA, A. Effectiveness of liposomes-entrapped streptomycin in experimental tuberculosis in mice. *Antibiotiki*, v. 28, p. 23 - 26, 1983.

VLADIMIRSKI, M. A; LADIGINA, G. A. e TENTSOVA, A. Liposomes as vehicles of antitubercular drugs: a new approach to experimental chemotherapy of tuberculosis. *Tuberkle*, v. 7, p. 53 - 56, 1980.

VORAUER-UHL, K. A.; FÜRN SCHLIEF, E.; WAGNER, A.; FERKO, B. e KATINGER, H. Topical applied liposome encapsulated superoxide dismutase reduces postburn wound size and edema formation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 14, p. 63 - 67, 2001.

WALDREP, J. C.; ARPPE, J.; JANSÁ, K. A. e KNIGHT, V. High dose cyclosporin A and budesonide-liposome aerosols. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 152, p. 27 - 36, 1997.

WALDREP, J. C.; ARPPE, J.; JANSÁ, K. A. e VIDGREN, M. Experimental pulmonary delivery of cyclosporin a by liposome aerosol. *International Journal of Pharmaceutics*, v.160, p. 239 - 249, 1998.

WONG, J. P.; DI NINNO, V. L. e CHERWONOGRODZKY, J. W. Liposome-encapsulated ciprofloxacin is effective in the protection and treatment of BALB/c mice against *Francisella tularensis*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 168, p. 793 - 794, 1993.

WONG, J. P.; DI NINNO, V. L.; CHERWONOGRODZKY, J. W.; DELA CRUZ, R. e SARAVOLAC, E. G. Liposome-encapsulated ciprofloxacin for the prevention and treatment of infectious diseases caused by intracellular pathogens - In A. t. Florence and G. Gregoriadis (ed.), *Liposomes in biomedical applications*. Harwood Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, p. 105 - 120, 1995.

WOODLE, M. C. e LASIC, D. D. Sterically stabilized liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1113, p. 171 - 199, 1992.

WOODLE, M. C.; COLLINS, L. R.; SPONSLER, E.; KOSSOVSKY, N.; PAPAHAADJOPOULOS, D. e MARTIN, F. J. Sterically stabilized liposomes: reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. *Biophysical Journal*, v. 61, p. 902 - 910, 1992.

YU-KYOUNG; NIX, D. E. e STRAUBINGER, R. M. Formulations and efficacy of liposome-encapsulated antibiotics for therapy of intracellular *M. avium* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p. 2104 - 2111, 1995.

ZINGEL, C.; SACHSE, A.; RÖBLING, G. L. e MÜLLER, R. H. Lyophilization and rehydration of iopromide-carrying liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 140, p. 13 - 24, 1996.